



Departamento de Microbiología e Inmunología. Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales.
Universidad Nacional de Río Cuarto.

**Control Biológico de Insectos Plaga Vectores de Hongos Aflatoxicogénicos.
Compatibilidad Con Insecticidas Naturales y/o Sintéticos.**

TRABAJO DE TESIS

Presentado por

Mic. BARRA PAULA SABINA

Para optar al grado de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Director: Dra. ETCHEVERRY MIRIAM G.

Co- Director: Dra. NESCI ANDREA V.

Río Cuarto. Córdoba. Junio 2014.

El presente trabajo fue realizado en la Orientación Ecología Microbiana, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, y se presenta como requerimiento para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Director de Tesis: Dra. Etcheverry Miriam.

Co-Director de Tesis: Dra. Nesci Andrea.

Aprobado por el Jurado:

Dra. Benuzzi Delia A.

Dra. López Lastra Claudia C.

Dra. Alzamora Stella M.

Agradecimientos:

A **Dios**, por ser mi compañía, por poner en mi camino a muchas personas que me ayudaron a alcanzar esta meta.

A **Javier** mi amor, por su constante apoyo, amor e incondicionalidad y por esta nueva lucecita que comenzó a iluminar nuestras vidas.

A **mis padres**, Viviana y Adelqui por ser mi ejemplo y sostén, por su apoyo en todo momento, simplemente por estar siempre, gracias.

A **mi hermano** Juan Paulo, por ser mi cómplice de vida, mi amigo, por su grandeza, por poder contar con él siempre.

A **Miriam** y **Andrea**, por su compromiso, enseñanzas, esfuerzo, confianza, dedicación, constante apoyo y estímulo, por ser mis referentes, por permitirme ser parte de este Gran Equipo de Ecología Microbiana, gracias por ayudarme a cumplir este objetivo.

A **Meli, Ana, Dai, Nati** y **Ale** por tantos momentos compartidos, por todas las experiencias vividas, por formar parte del día a día, gracias por estar.

Al **Departamento** de Microbiología e Inmunología de la **Facultad** de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales.

Al **jurado** por sus sugerencias durante el desarrollo de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (**CONICET**) por su apoyo para el desarrollo de esta tesis.

A todos muchas gracias...

“Cambiaré de opinión tantas veces y tan a menudo como adquiriera conocimientos nuevos, el día que me aperciba que mi cerebro ha dejado de ser apto para esos cambios, dejaré de trabajar. Compadezco de todo corazón a todos los que después de haber adquirido y expresado una opinión, no pueden abandonarla nunca más.”

Florentino Ameghino.

INTRODUCCION	1-24
Referencias bibliográficas	25-37
HIPOTESIS	38
OBJETIVO GENERAL	39
Sección I	
Aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos. Su evaluación contra <i>Tribolium confusum</i> , <i>Sitophilus zeamais</i> y <i>Rhizopertha dominica</i> en maíz almacenado	
Introducción de la sección	40-48
Objetivos específicos	49
Materiales y métodos	
1. Aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos	50
1.1. Delimitación de la zona de muestreo	50
1.2. Recolección de muestras de suelo	50
1.3. Recolección de muestras de desechos	50
1.4. Cultivo de insectos	50
2. Identificación morfológica	52
2.1. Identificación microscópica presuntiva de posibles entomopatógenos	52
2.2. Identificación macroscópica presuntiva de posibles entomopatógenos	53
3. Identificación molecular	54
3.1. Extracción de ADN fúngico	54
3.2. Determinación de productos de PCR	55
3.3. Purificación, secuenciamiento e identificación	55
4. Evaluación de la adherencia de conidios viables al insecto	56
5. Actividad insecticida de hongos entomopatógenos	56
6. Análisis estadístico de los datos	57
Resultados	
1. Aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos	58
1.1. Caracterización de hongos entomopatógenos aislados de muestras de suelo	58
1.2. Caracterización de hongos entomopatógenos aislados de muestras de desechos	58
1.3. Caracterización de hongos entomopatógenos aislados de insectos trampa	58
2. Identificación morfológica y molecular de hongos entomopatógenos	59
3. Actividad insecticida de hongos entomopatógenos	63
Discusión	65-67
Conclusiones parciales	68
Referencias bibliográficas	69-76

Sección II

Compatibilidad *in vitro* de sustancias insecticidas y fungicidas naturales y de grado alimentario con *Purpureocillium lilacinum* y su efecto contra *Aspergillus flavus*.

Introducción de la sección	77-84
Objetivos específicos	85
Materiales y métodos	
1. Evaluación de la compatibilidad de <i>P. lilacinum</i> con sustancias insecticidas	86
1.1. Preparación de los inóculos	86
1.2. Preparación de los antioxidantes	86
1.3. Preparación de los fitoquímicos naturales	87
1.4. Determinación de la viabilidad de las esporas de <i>P. lilacinum</i> en agar harina de maíz	87
2. Evaluación del efecto de las sustancias insecticidas y <i>P. lilacinum</i> sobre el crecimiento y la acumulación de AFB ₁ por <i>A. flavus</i> en agar harina de maíz	88
2.1. Preparación del inóculo aflatoxicogénico	88
2.2. Preparación de los antioxidantes	88
2.3. Evaluación de los parámetros de crecimiento	89
2.4. Análisis de aflatoxina B ₁	89
3. Análisis estadístico de los datos	90
Resultados	
1. Evaluación de la compatibilidad de <i>P. lilacinum</i> con sustancias insecticidas	91
1.1. Viabilidad de las esporas de <i>P. lilacinum</i> en presencia de los antioxidantes (BHA y BHT) y fitoquímicos (AC y AF) en agar harina de maíz	91
2. Evaluación del efecto de las sustancias insecticidas y <i>P. lilacinum</i> sobre el crecimiento y la acumulación de AFB ₁ por <i>A. flavus</i> en agar harina de maíz.	92
2.1. Efecto de las sustancias insecticidas y <i>P. lilacinum</i> sobre la fase de latencia y la velocidad de crecimiento de <i>A. flavus</i>	92
2.2. Análisis de AFB ₁ .	93
Discusión	95-98
Conclusiones parciales	99
Referencias bibliográficas	100-108

Sección III

Actividad insecticida y/o fungicida del tratamiento combinado *P. lilacinum* + agente químico en granos de maíz. Efecto sobre la acumulación de aflatoxina B₁.

Introducción de la sección	109-110
Objetivos específicos	111
Materiales y métodos	
1. Efecto insecticida del tratamiento combinado <i>P. lilacinum</i> + BHT; la mezcla BHA+BHT y el fitoquímico natural AC sobre <i>T. confusum</i> , <i>S. zeamais</i> y <i>R. dominica</i> , y	112

fungicida sobre la flora fúngica natural del grano de maíz	
1.1. Preparación del inóculo entomopatógeno	112
1.2. Preparación de antioxidantes	112
1.3. Preparación de fitoquímicos naturales	112
1.4. Cultivo de insectos	112
1.5. Preparación del sustrato	112
1.6. Condiciones de incubación	112
1.7. Determinación de las poblaciones fúngicas	113
2. Efecto insecticida del tratamiento combinado <i>P. lilacinum</i> + BHT contra <i>T. confusum</i> , en granos de maíz estériles acondicionados a diferentes actividades de agua.	114
2.1. Preparación del sustrato	114
2.2. Determinación de las poblaciones fúngicas	115
3. Análisis de AFB ₁	115
4. Análisis estadístico de los datos	116
Resultados	
1. Efecto insecticida del tratamiento combinado <i>P. lilacinum</i> + BHT; la mezcla BHA+BHT y el fitoquímico natural AC sobre <i>T. confusum</i> , <i>S. zeamais</i> y <i>R. dominica</i> . Evaluación del efecto fungicida sobre la flora fúngica natural del grano de maíz.	117
2. Efecto insecticida del tratamiento combinado <i>P. lilacinum</i> + BHT contra <i>T. confusum</i> en granos de maíz estériles acondicionados a diferentes actividades de agua.	124
3. Análisis de AFB ₁ .	126
Discusión	130-132
Conclusiones parciales	133
Referencias bibliográficas	134-137
Sección IV	
Manipulación ecofisiológica de <i>Purpureocillium lilacinum</i> para estimular su actividad insecticida contra <i>Tribolium confusum</i> .	
Introducción de la sección	138-143
Objetivos específicos	144
Materiales y métodos	
1. Modificación nutricional para estimular la eficiencia insecticida de <i>P. lilacinum</i>	145
1.1. Preparación del inóculo entomopatógeno	145
1.2. Cultivo de insectos	145
1.3. Medios de cultivos	145
1.4. Estudio de virulencia	145
2. Estimación de la producción y la actividad de enzimas extracelulares involucradas en la virulencia del hongo entomopatógeno	146

2.1. Estimación de la actividad enzimática y la velocidad de crecimiento de <i>P. lilacinum</i> en diferentes sustratos	146
2.2. Estimación de la producción de enzimas extracelulares	147
3. Análisis estadístico de los datos	149
Resultados	
1. Modificación nutricional para estimular la eficiencia insecticida de <i>P. lilacinum</i>	151
2. Estimación de la producción y la actividad de enzimas extracelulares involucradas en la virulencia del hongo entomopatógeno	152
2.1. Estimación de la actividad enzimática y la velocidad de crecimiento de <i>P. lilacinum</i> en diferentes sustratos	152
Discusión	157-160
Conclusiones parciales	161
Referencias bibliográficas	162-167
CONCLUSIONES FINALES	168

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Clasificación actual del género *Aspergillus* 6

Tabla 2. Especies que integran la Sección *Flavi* 10

SECCIÓN I

Tabla I.1. Resumen de los principales géneros del Phylum *Hypocreales* 45

Tabla I.2. Clasificación filogenética actual dentro de *Hypocreales* 46

Tabla I.3. Porcentaje de infección de insectos cebo y residuos contaminados 59

Tabla I.4. Homología de las secuencias del gen de traducción del factor de elongación alpha 1 de los aislamientos de *P. lilacinum*, con secuencias presentes en el GenBank 60

Tabla I.5. TL₅₀ y porcentajes de mortalidad para insectos adultos de *T. confusum*, *S. zeamais* y *R. dominica* expuestos a *P. lilacinum* 64

SECCIÓN II

Tabla II.1. Clasificación toxicológica y etiquetado de plaguicidas de acuerdo a la OMS 77

Tabla II.2. Límites permitidos de insecticidas químicos en alimentos 78

Tabla II.3. Porcentaje de compatibilidad entre *P. lilacinum* y los mejores tratamientos de antioxidantes sintéticos y fitoquímicos naturales 92

Tabla II.4. Efecto de *P. lilacinum* y antioxidante sintético sobre la fase de latencia de *A. flavus* 93

Tabla II.5. Efecto de *P. lilacinum* y antioxidante sintético sobre la velocidad de crecimiento de *A. flavus* 93

SECCIÓN III

Tabla III.1. Tratamientos aplicados 112

Tabla III.2. Tratamientos aplicados 115

Tabla III.3. Significancia de tratamientos, actividad de agua, cepas y sus interacciones sobre la actividad fungicida e insecticida en granos de maíz estériles 126

Tabla III.4. Influencia de los tratamientos sobre la producción de aflatoxina B₁ por *A. flavus* a diferentes actividades de agua 126

SECCIÓN IV

Tabla IV.1. Significancia de las cepas fúngicas, medio de cultivo y su interacción en la actividad insecticida de dos cepas de *P. lilacinum* frente a *T. confusum* 151

Tabla IV.2. Significancia de la actividad de agua, cepa fúngica, sustrato y sus interacciones en la velocidad de crecimiento de *P. lilacinum* 153

INTRODUCCION

Figura 1. Distribución porcentual de la producción de maíz en el territorio de la República Argentina	2
Figura 2. Estructuras morfológicas del género <i>Aspergillus</i>	7
Figura 3. Características microscópicas de <i>A. flavus</i>	12
Figura 4. Estructura de las aflatoxinas	16
Figura 5. Insectos adultos de <i>Sitophilus zeamais</i> , <i>Rhyzopertha dominica</i> y <i>Tribolium confusum</i>	22

SECCIÓN I

Figura I.1. Ciclo de vida de hongos entomopatógenos del orden <i>Hypocreales</i>	44
Figura I.2. Características de <i>Purpureocillium lilacinum</i>	48
Figura I.3. Esquema del régimen de cultivo de los aislamientos en MEA	53
Figura I.4. Incidencia de potenciales hongos entomopatógenos en muestras de suelo. Diferentes géneros fúngicos en muestras de suelo	58
Figura I.5. Frecuencia de aislamiento de diferentes géneros fúngicos en los insectos cebo	59
Figura I.6. Desarrollo de cepas entomopatógenas a 25 ± 1 y $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en MEA	62
Figura I.7. Características microscópicas de aislamientos entomopatógenos	62
Figura I.8. Insectos colonizados con los aislamientos entomopatógenos	63

SECCIÓN II

Figura II.1. Efecto de antioxidantes sintéticos y fitoquímicos naturales sobre la viabilidad de las esporas de <i>P. lilacinum</i>	91
---	----

SECCIÓN III

Figura III.1. Efecto de diferentes tratamientos sobre el recuento fúngico total de maíz, el recuento de <i>A. flavus</i> y el de <i>P. lilacinum</i>	118
Figura III.2. Efecto de diferentes tratamientos, en presencia de <i>S. zeamais</i> , sobre el recuento fúngico total de maíz, el recuento de <i>A. flavus</i> y el de <i>P. lilacinum</i>	119
Figura III.3. Efecto de diferentes tratamientos, en presencia de <i>R. dominica</i> , sobre el recuento fúngico total de maíz, el recuento de <i>A. flavus</i> y el de <i>P. lilacinum</i>	120
Figura III.4. Efecto de diferentes tratamientos, en presencia de <i>T. confusum</i> , sobre el recuento fúngico total de maíz, el recuento de <i>A. flavus</i> y el de <i>P. lilacinum</i>	121
Figura III.5. Actividad insecticida de los diferentes tratamientos contra <i>S. zeamais</i> , <i>R. dominica</i> y <i>T. confusum</i>	123
Figura III.6. Efecto de los tratamientos sobre el porcentaje de infección de <i>S. zeamais</i> , <i>R. dominica</i> y <i>T. confusum</i> con <i>A. flavus</i>	124

Figura III.7. Recuento de <i>A. flavus</i> y <i>P. lilacinum</i> bajo diferentes tratamientos, en presencia de <i>T. confusum</i>	127
Figura III.8. Actividad insecticida de los diferentes tratamientos contra <i>T. confusum</i>	128
Figura III.9. Efecto de los tratamientos sobre el porcentaje de infección de <i>T. confusum</i> con <i>A. flavus</i>	129

SECCIÓN IV

Figura IV.1. Tiempo Letal para <i>T. confusum</i> expuestos a <i>P. lilacinum</i> cultivado en medio con y sin hidrocarburos	152
Figura IV.2. Tiempo Letal de <i>P. lilacinum</i> luego de desarrollar en presencia de los Hidrocarburos	152
Figura IV.3. Índice de actividad de enzimas extracelulares de dos cepas de <i>P. lilacinum</i>	153
Figura IV.4. Efecto de diferentes sustratos sobre la velocidad de crecimiento de <i>P. lilacinum</i>	154
Figura IV.5. Producción de proteasas a diferentes a_w y pH	155
Figura IV.6. Producción de amilasas a diferentes tiempos y pH	155
Figura IV.7. Producción de lipasas	156

Resumen

El maíz (*Zea mays* L) es un cultivo de gran importancia económica en todo el mundo ya que se usa como alimento humano y/o para ganado. La producción mundial para la cosecha 2014 será de 967,52 millones de toneladas. Argentina ocupa el segundo lugar como país exportador y es uno de los principales países productores. A nivel regional Córdoba y Buenos Aires concentran el 70% de la producción nacional. A través del tiempo el agricultor se ha dedicado a producir y su mayor preocupación se ha centralizado en aumentar los rendimientos, esta actitud sumada a los cambios agroecológicos a nivel mundial, ha puesto en jaque la conservación de “excelente calidad” que por mucho tiempo ha manifestado el típico maíz argentino. La calidad de los granos comienza en el campo y se conserva en el almacenamiento, un ecosistema complejo afectado por un amplio rango de diversos factores ecológicos. La interacción de estos factores influye de manera directa sobre el riesgo de contaminación fúngica y con micotoxinas. Existe un consenso internacional en las exigencias con respecto a los niveles aceptables de ciertas micotoxinas que contaminan el maíz, especialmente aflatoxinas. Las aflatoxinas son metabolitos tóxicos producidos por varias especies de *Aspergillus* de la Sección *Flavi*. Conociendo, que muchos insectos, además de dañar los granos, llevan internamente esporas fúngicas y son importantes agentes que facilitan el incremento de los niveles de aflatoxinas en el almacenamiento, debemos implementar estrategias para controlarlos. Actualmente el control de plagas poscosecha se realiza principalmente con productos químicos sintéticos, sin embargo existe una búsqueda de métodos menos nocivos para el hombre y el medioambiente, con el objetivo de lograr una protección más saludable de los cultivos. Con este propósito se planteó que el uso combinado de diferentes métodos, como el empleo de agentes de control biológico de insectos vectores de hongos aflatoxicogénicos sumado al uso de agentes químicos sintéticos de grado alimentario y/o naturales en dosis subletales, podrían reducir la contaminación con aflatoxinas en el maíz almacenado. Para ello aislamos e identificamos hongos entomopatógenos nativos de diferentes componentes del agroecosistema de maíz y evaluamos su virulencia contra *Tribolium confusum*, *Rhizopertha dominica* y *Sitophilus zeamais*, tres insectos plaga de maíz almacenado. Se pudo demostrar que el suelo fue el mejor sustrato para el aislamiento de hongos entomopatógenos y la especie más abundante del agroecosistema fue *Purpureocillium lilacinum* que puede considerarse un buen candidato para el control biológico de insectos en el ecosistema de almacenamiento. Por otro lado evaluamos la compatibilidad de *P. lilacinum* con antioxidantes de grado alimentario (BHA, BHT y sus mezclas) y fitoquímicos naturales (AC, AF y sus mezclas) con actividad fungicida y/o insecticida previamente demostrada. Estos compuestos químicos en dosis subletales predisponen al insecto al ataque por el agente de biocontrol y no afectan el recuento de esporas viables de *P. lilacinum*. Además, la mezcla de este hongo entomopatógeno con el BHA inhibió el crecimiento y la producción de AFB₁ de *A. flavus in vitro*. Por otro lado, mediante bioensayos en granos, probamos el efecto de *P. lilacinum* y los agentes químicos seleccionados sobre *T. confusum* y corroboramos que dicho tratamiento posee efecto insecticida y disminuye la concentración de aflatoxinas. Frente a la efectividad del agente de biocontrol, se decidió comenzar a dilucidar los posibles mecanismos de patogénesis fúngica sobre los insectos. La mayoría de los modelos actuales sugieren que el mecanismo primario de infección implica la producción de una batería de enzimas hidrolíticas que atacan al huésped en un proceso de degradación, permitiendo la penetración de las hifas a través de la cutícula. En este estudio, se estimuló la eficiencia insecticida de *P. lilacinum* mediante una modificación nutricional del hongo y se realizó una primera aproximación sobre el perfil enzimático del hongo entomopatógeno. La condición óptima de producción enzimática fue tres días de incubación a pH alcalino, mientras que la disponibilidad de agua afectó de manera particular la producción de cada enzima evaluada. Además, la incorporación de alcanos, de estructura similar a los presentes en la cutícula de los insectos (n-octacosano y n-hexadecano), al medio de cultivo mejoró la eficiencia insecticida de *P. lilacinum* contra *T. confusum*. Por lo tanto, es posible implementar esta estrategia de prevención, combinando hongo entomopatógeno y agente químico de grado alimentario para disminuir el impacto de la contaminación aflatoxicogénica.

Abstract

Maize (*Zea mays* L.) is a crop of major economic importance in the world because it is used as human and/or livestock feed. The world production during growing season 2013-2014 will be 967.52 million tonnes. Argentina is the second maize supplier in the external market and one of the largest producers. Cordoba and Buenos Aires concentrate 70% of national production. Over the years the farmer has been dedicated to the production and the major concern has focused on increasing yields. This attitude combined with agro-ecological changes worldwide has endangered the conservation of "excellent quality" that has long characterized the typical Argentinian maize. The grain quality begins in the field and is kept in storage, a complex ecosystem affected by a wide range of different ecological factors. The interaction of these factors has a direct influence on the risk of fungal contamination and mycotoxins. There is an international general assent about admissible levels of mycotoxins, aflatoxins especially. Aflatoxins (AFB) are toxic metabolites produced by many species of *Aspergillus* Section *Flavi*. Knowing that many insects, besides damaging the grain, are vectors of *Aspergillus* Section *Flavi* which facilitates increased levels of aflatoxins, integrated control strategies are necessary. Currently postharvest pest control is performed mainly with synthetic chemicals, but there is a search for methods less damaging to humans and the environment, with the aim of achieving a more healthful crop protection. For this purpose the following hypothesis was raised: the combined use of different methods such as the use of biological control agents of insect vectors of aflatoxigenic fungi, plus the use of food grade antioxidants in sublethal doses, could help to reduce aflatoxins in stored maize. First we isolate and identify native entomopathogenic fungi of different components of maize agroecosystem and evaluated their virulence against *Tribolium confusum*, *Sitophilus zeamais* and *Rhizopertha dominica*, three insect pests of stored maize. It could be shown that soil was the best substrate for the isolation of entomopathogenic fungi. The most abundant species in the agroecosystem was *Purpureocillium lilacinum* that can be considered a good candidate for biological control of insects in the storage ecosystem. Furthermore we evaluate the compatibility of *P. lilacinum* strains with different food grade antioxidants (BHA, BHT and their mixture) and natural phytochemicals (AC, AF, and their mixtures) with fungicidal and/or insecticidal activity previously demonstrated. These chemicals at sublethal doses may act as physiologic stressors and so predispose the insect to entomopathogenic fungus attack and do not affect the count of viable spores of *P. lilacinum*. Also, the growth of *A. flavus* and AFB₁ production was inhibited by the mixture of *P. lilacinum* and BHA *in vitro*. Moreover, we tested the effect of *P. lilacinum* and selected chemical agents against *T. confusum* on grains. It was demonstrated that this treatment had insecticidal effect and decreased the concentration of aflatoxin. Due to the effectiveness of the biocontrol agent, we decided to start elucidating the possible mechanisms of fungal pathogenesis of insects. Most current models suggest that the primary mechanism of infection involves the production of a battery of hydrolytic enzymes that attack the host in a process of degradation, allowing penetration of the hyphae through the cuticle. In this study, the efficiency of *P. lilacinum* insecticide was stimulated using a nutritional modification and a first approximation of the profile of the entomopathogenic fungus enzyme was performed. The optimum condition for enzymes production was three days of incubation at alkaline pH. Whereas water availability affect enzyme production. Furthermore, the incorporation to the culture medium of alkanes (n-octacosane and n-hexadecane), similar to those present in the cuticle structures of insects, improved the insecticide efficiency of *P. lilacinum* against *T. confusum*. The triple effect of losses due to insects, fungi, and mycotoxins can be devastating when conditions are favorable for maize deterioration. Therefore, it is possible to implement this prevention strategy, combining entomopathogenic fungus and food grade chemical agent to reduce the impact of aflatoxigenic contamination of maize.

El Maíz

Origen y breve descripción.

El maíz es el cereal de los pueblos y de diferentes culturas del continente americano. Las más antiguas civilizaciones de América estuvieron acompañadas en su desarrollo por esta planta. El maíz, desde el 1750 se clasificó dentro del género *Zea* y no había sufrido modificaciones taxonómicas importantes hasta el siglo XX, cuando se integró la teocinte a este género.

Aunque no se han resuelto por completo todos los detalles que permitan explicar su origen y domesticación, los científicos llegaron a un consenso: el ancestro directo del maíz es la teocinte. No obstante, la teoría antagónica del origen a partir de un maíz silvestre extinto en la actualidad, adoptó diferentes versiones por varias décadas. George Beadle en 1939 dio forma a la hipótesis de la evolución de la teocinte y la intervención humana en el proceso de domesticación del maíz. Los estudios pioneros de la taxonomía de la teocinte los realiza Schrader en 1833, quien lo clasifica como *Euchlaena mexicana* (*Zea mexicana* (Schrad) Kuntze). Esta especie puede cruzarse libremente con el maíz, por lo que surge la teoría que el maíz deriva de esta especie a través de variaciones espontáneas y discontinuas (Bartolini 1990).

Botánicamente, el maíz (*Zea mays* L) pertenece a la familia de las gramíneas. Es una especie que se reproduce por polinización cruzada, la flor femenina (mazorca o espiga) se ubica en lugares distantes a las masculinas (espiguillas). La planta de maíz posee una alta tasa de actividad fotosintética, con un alto potencial para la producción de carbohidratos por unidad de superficie por día (Aldrich y col., 1975).

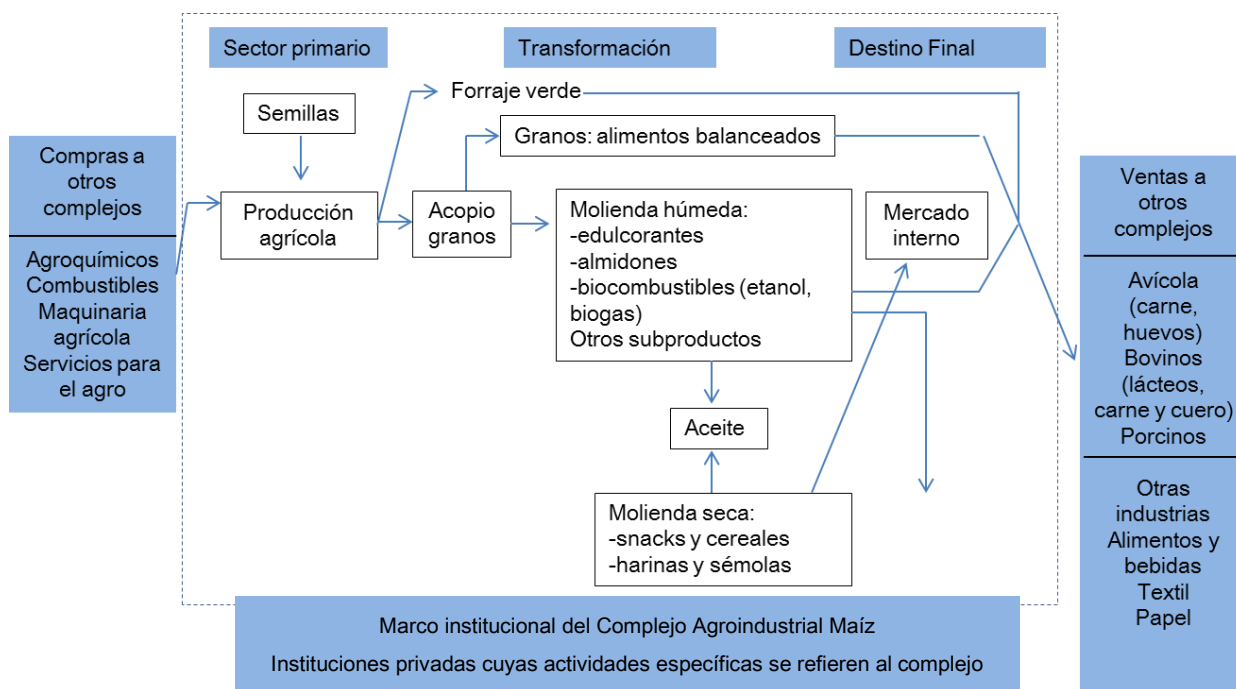
El desarrollo de la planta de maíz se puede dividir en las siguientes fases: una fase vegetativa inicial en la cual se forman las primeras hojas, el desarrollo es ascendente y la producción de materia seca es lenta. Esta fase termina con la diferenciación de los órganos de reproducción o por elongación del entrenudo, o ambos. En un segundo ciclo se desarrollan las hojas, el tallo y los órganos reproductivos, culminando con la emisión de los estigmas.

La fase de reproducción, se inicia con la fertilización de las estructuras femeninas que se diferenciarán en espiga y granos. Esta etapa se caracteriza por un rápido aumento del peso de los granos acompañado de una ligera disminución del peso de las hojas, el tallo y la mazorca (Tanaka y Yamaguchi 1972).

Importancia económica

El maíz es un cultivo de gran importancia económica a nivel mundial como alimento humano o alimento para ganado y alrededor de 600 subproductos derivan de los granos desde alimentos, almidón, aceite, bebidas alcohólicas, plásticos, papeles y biocombustibles (Aldrich y col., 1975; Gonzales 1995).

El conjunto de las cadenas ganaderas han absorbido en los últimos 5 años, en promedio, el 36% de la producción de maíz, siendo la producción lechera y la de carne bovina las principales demandantes. El volumen de maíz que demandan estas dos cadenas, incluyen aquel utilizado como alimento de ganado directamente en el campo, es decir, aquel que se siembra, se cosecha o pica, y se consume en el campo, ya sea en grano o como silaje, respectivamente. Por este motivo, la producción total de maíz exhibida puede diferir de las estimaciones oficiales ya que estas últimas generalmente no contemplan el volumen de autoconsumo que, además, viene creciendo año tras año en nuestro país (FADA 2013). La molienda, por su parte, demandó en promedio el 6% de la producción nacional, siendo notable la predominancia de la molienda húmeda por sobre la seca. Con respecto a la industria del etanol en base a maíz, en el año 2012 se comenzaron a producir los primeros litros, mientras que en el año 2013 la demanda de maíz requerida para esta nueva industria se estima superior a la correspondiente a la industria de la molienda seca (FADA 2013).



Fuente: Centro de Estudios Regional y Espacial (CERE) (2011).

Cabe destacar que, a pesar de que a nivel nacional el 42% de la producción de maíz se consume internamente, la provincia de Córdoba industrializa y/o consume sólo el 21% del cereal que produce (Garzon y col., 2011).

Concepto general de calidad de los granos

La calidad de los granos es un atributo muy importante. El uso que tendrá un lote particular de granos se encuentra fuertemente asociado a su composición final. Por lo tanto, la calidad se define como el grado de aptitud de un producto para un uso determinado (Aguirrezabal y Andrade 1998). De este modo la calidad de los granos comienza en el campo, ya que las condiciones de cultivo, el desarrollo del mismo y el tratamiento que recibe hasta su almacenaje, influyen en esta propiedad. La calidad de los granos, no sólo es afectada por las operaciones de secado, sino también por factores ambientales como la temperatura y la humedad durante el llenado de los mismos, por las prácticas de almacenamiento y por su transporte (INTA 2006). Los granos almacenados constituyen un agroecosistema complejo por la serie de interacciones producidas entre luz, temperatura, humedad y agentes bióticos como insectos y hongos que repercuten en la calidad del grano de maíz (Olakojo y Akinlosotu 2004; Neethirajan y col., 2007). Durante el almacenamiento ocurre el fenómeno de la respiración, causada por el propio grano, dando origen a actividades metabólicas de los seres vivos allí presentes, produciendo energía y agua, que tienden a acumularse en el propio lugar donde se generaron, formando focos de calentamiento que son los primeros indicios de un proceso deteriorativo del producto almacenado (Alabadan y Oyewo 2005). Para mantener la calidad, se controla la humedad del grano, la humedad relativa y la temperatura ambiente, ya que son determinantes para la conservación (Rosas y col., 2007).

El contenido de humedad es muy importante, ya que si es mayor a 15,5%, durante su almacenamiento pueden crecer hongos e insectos y producirse pérdidas importantes (Méndez y col., 2005), debido a la producción de toxinas y deterioro del grano (Charm 2007). De acuerdo a Mngadi y col., (2008) y Wagacha y Muthomi (2008), la formación de micotoxinas en granos infectados por hongos, como consecuencia de la humedad y temperatura, son un peligro potencial para la salud humana y animal, con el agravante de una baja calidad del producto final que se elabora.

Por otra parte, cuando el contenido de humedad de los granos almacenados aumenta, también lo hace el espacio de aire entre los mismos, lo que contribuye a una mayor resistencia del flujo de aire a través del grano. En este sentido, Jiménez y col., (2004) demostraron que la migración de la humedad del grano prevalece, por lo cual se requiere de mayor tiempo para que el contenido de agua en el grano comience a estabilizarse, por efecto del movimiento del aire intersticial. Por otra parte, los granos de la capa superior del silo permanecen húmedos, lo que conforma una zona de riesgo, con posibles pérdidas de materia seca y calidad. Esta situación es aún más crítica en regiones de climas cálidos, donde las temperaturas son elevadas, lo cual aumenta la actividad biológica en la capa superior del silo, mayor respiración del grano y mayor actividad metabólica de hongos e insectos (Hernández y col., 2009). En este mismo orden de ideas es importante señalar los trabajos realizados por Alabadan (2006) y Volenik y col., (2007), los cuales establecieron que también la temperatura afecta la calidad del grano durante su

almacenamiento, como consecuencia del crecimiento de hongos e insectos. El calor metabólico liberado por la infestación de insectos en el grano es la principal causa del cambio de temperatura durante el almacenamiento, cuyo mecanismo de transferencia se realiza por conducción, produciéndose un gradiente de temperatura por convección. La temperatura y la humedad actúan entonces como catalizadores de los procesos metabólicos, aumentando la tasa de respiración de los granos y las pérdidas de materia seca. A mayor temperatura y humedad, mayor riesgo durante la conservación de los granos, y a su vez un grano que no está sano y limpio es más propenso a ser atacado por hongos e insectos (Newman 2003). De los microorganismos que colonizan los granos, los hongos son los más tolerantes a menores actividades de agua (a_w), teniendo por lo tanto la mayor influencia en el ecosistema de los granos almacenados constituyéndose como importantes agentes de deterioro.

Entre las especies de hongos filamentosos, los que predominan en el agroecosistema de maíz en regiones templadas incluyen: *Cladosporium* spp., *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. (Lacey y col., 1980; Lacey y Magan 1991; Moss 1991; Wicklow 1995).

En estudios micológicos realizados en maíz y productos derivados, en Argentina, se han demostrado que los principales géneros aislados fueron: *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Alternaria*; siendo *Fusarium verticillioides*, *F. nygamai*, *F. proliferatum*, *Penicillium minioluteum*, *P. funiculosum*, *P. variable*, *P. decumbens*, *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* las especies aisladas con mayor frecuencia (González y col., 1995; González 1995; Etcheverry y col., 1999, Nesci 2005).

Género *Aspergillus*

Taxonomía.

Aspergillus, uno de los géneros fúngicos más antiguo y mejor estudiado, recibió su nombre de Micheli en 1729. Observando al microscopio la estructura que da soporte a las esporas, el conidióforo, Micheli lo asoció a un aparato que utiliza el Clero romano católico para rociar agua bendita durante una parte de la liturgia llamada el *asperges* (“Has de espolvorear” del verbo latino *Aspergers*) (Ainsworth, 1976). Pertenece al grupo de los Deuteromycetes.

En 1926 Thom y Church realizaron la primera publicación sobre el género. El género *Aspergillus* se había convertido en uno de los grupos más conocido y estudiado. Su prevalencia en el medio ambiente natural, la facilidad de su cultivo en medios de laboratorio y la importancia económica de varias de sus especies hizo que muchos micólogos fueran atraídos a su estudio.

Recientemente, se han producido importantes cambios en la taxonomía de *Aspergillus* spp. y sus teleomorfos. Desde 1965, el libro por excelencia sobre el género ha sido “The genus *Aspergillus*” de Raper y Fennell. En esta monografía se aceptaban 132 especies subdivididas en

18 grupos. Samson (1979) realizó una recopilación de las especies y variedades descritas posteriormente, con una revisión crítica sobre la validez de los taxones publicados.

La sistemática actual de *Aspergillus* se ha visto enormemente influida por los trabajos presentados en dos reuniones científicas dedicadas exclusivamente a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (Samson y Pitt 1985; 1990). La monografía de Raper y Fennell (1965) presentaba serios problemas de adecuación a la normativa del Código Internacional de Nomenclatura Botánica (ICBN). Gams y col., (1985) reclasificaron al género y lo dividieron en 6 subgéneros, cada uno de los cuales se dividió a su vez en una o más secciones (tabla 1) que se corresponden con los 18 grupos descritos por Raper y Fennell (1965). Muchas especies del género *Aspergillus* presentan además un teleomorfo dentro de los *Ascomycetes*, pero Raper y Fennell (1965) retuvieron el nombre *Aspergillus* tanto para el teleomorfo como para el anamorfo. Gams y Samson (1985) y Kozakiewicz (1989) se encargaron de realizar los cambios necesarios para su adecuación debido a que los nombres de los sinónimos más antiguos presentan prioridad para la designación, no obstante su estricta aplicación en el género *Aspergillus* implicaría sustituir algunos nombres que son ampliamente utilizados. Con el fin de proteger los nombres en uso, la Comisión Internacional de *Penicillium* y *Aspergillus* elaboró una lista de 186 especies de *Aspergillus* y 72 teleomorfos con el anamorfo *Aspergillus* (Pitt y Samson 1993). En el año 2000, Peterson redujo el número de subgéneros a solo 3 basándose en estudios filogenéticos y las secuencias del ARN ribosomal. Vargas y col., (2003) demostraron la relación evolutiva de las especies productoras de micotoxinas, principalmente de los grupos productores de ocratoxina (Sección *Circumdati*) y aflatoxinas (Sección *Flavi*).

Algunas especies de *Aspergillus* producen regularmente ambos tipos de esporas sexuales y asexuales, en otras especies la forma sexual es rara o incluso nunca se vio. Las formas perfectas de *Aspergillus* actualmente aceptadas son: *Chaetosartorya*, *Emericella*, *Eurotium*, *Hemicarpenales*, *Neocarpenales*, *Neosartorya*, *Petromyces*, *Sclerocleista* y *Warcupiella* (tabla 1).

Tabla 1. Clasificación actual del género *Aspergillus*^a.

Subgénero	Sección	Sinónimo ^b	Especie tipo	Teleomorfo
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	Grupo <i>A. glaucus</i>	<i>A. glaucus</i>	<i>Eurotium</i>
	<i>Restricti</i>	Grupo <i>A. restrictus</i>	<i>A. restrictus</i>	--
<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i>	Grupo <i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>Neosartorya</i>
	<i>Cervini</i>	Grupo <i>A. cervinus</i>	<i>A. cervinus</i>	--
<i>Ornati</i>		Grupo <i>A. ornatus</i>	<i>A. ornatulus</i> <i>A. paradoxus</i>	<i>Warcupiella</i> , <i>Sclerocleista</i> , <i>Hemicarpenales</i>
<i>Clavati</i>	<i>Clavati</i>	Grupo <i>A. clavatus</i>	<i>A. clavatus</i>	<i>Neocarpenales</i>
<i>Nidulantes</i>	<i>Nidulantes</i>	Grupo <i>A. nidulans</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>Emericella</i>
	<i>Versicolores</i>	Grupo <i>A. versicolor</i>	<i>A. versicolor</i>	--
	<i>Usti</i>	Grupo <i>A. ustus</i>	<i>A. ustus</i>	--
	<i>Terrei</i>	Grupo <i>A. terreus</i>	<i>A. terreus</i>	<i>Fennellia</i>
	<i>Flavipedes</i>	Grupo <i>A. flavipes</i>	<i>A. flavipes</i>	<i>Fennellia</i>
<i>Circumdati</i>	<i>Wentii</i>	Grupo <i>A. wentii</i>	<i>A. wentii</i>	--
	<i>Flavi</i>	Grupo <i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>Petromyces</i>

<i>Nigri</i>	Grupo <i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	<i>Petromyces</i>
<i>Circumdati</i>	Grupo <i>A. ochraceus</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>Petromyces</i>
<i>Candidi</i>	Grupo <i>A. candidus</i>	<i>A. candidus</i>	--
<i>Cremeri</i>	Grupo <i>A. cremeus</i>	<i>A. cremeus</i>	<i>Chaecosartorya</i>
<i>Sparsi</i>	Grupo <i>A. sparsus</i>	<i>A. sparsus</i>	--

^a: adaptada de Gams y col., (1985); Geiser (2008)

^b: grupos establecidos por Raper y Fennell (1965)

Características morfológicas y fisiología.

Aspergillus es un género mitospórico que se caracteriza por la producción de hifas especializadas, denominadas conidióforos, sobre los que se encuentran las células conidiógenas que originan las esporas asexuales o conidios (figura 2).

El conidióforo aunque es una estructura unicelular posee tres partes bien diferenciadas: vesícula (extremo apical hinchado), estipe (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula) y célula pie (sección final, a veces separada por un septo, que une el conidióforo con el micelio).

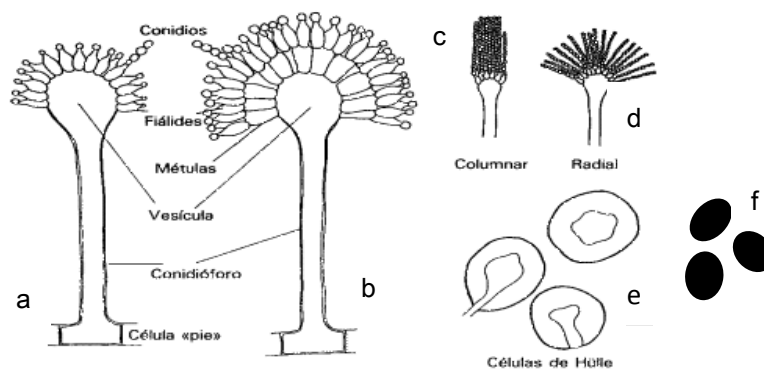


Figura 2. Estructuras morfológicas del género *Aspergillus*. (a) conidióforo uniseriado. (b) conidióforo biseriado. (c-d) cabezas conidiales. (e) células de Hülle (f) esclerocios (Samson y col., 2000).

Sobre la vesícula se disponen las células conidiógenas, denominadas fiálides. En muchas especies entre la vesícula y las fiálides se encuentran otras células denominadas méntulas. Las cabezas conidiales que sólo presentan fiálides se denominan uniseriadas, y las que presentan fiálides y méntulas, biseriadas. Cuando algunas especies producen un estadio teleomórfico, se pueden observar estructuras pertenecientes a cuerpos fructíferos de reproducción sexual, tales como las células de Hülle, características de los cleistotecios de *Emericella* (Pitt y Hocking 1997). Además de la reproducción asexual por esporas (conidios), algunos miembros del género *Aspergillus* se reproducen por la formación de esclerocios, estructuras formadas por firmes masas de células empaquetadas que frecuentemente son visibles sin la ayuda del microscopio (Klich y Pitt 1988).

Los hongos del género *Aspergillus* tienen actividad saprófita siendo la principal causa de degradación de productos de la agricultura, antes y después de la cosecha. La mayoría de las especies están adaptadas para la degradación de polímeros complejos, pero también pueden crecer a expensas de sustratos tan diversos como el estiércol, tejidos humanos y papel

(Polacheck y col., 1989). Se ha reportado incluso, una especie de *Aspergillus* no identificada que es capaz de solubilizar el carbón (Torzilli e Isbister 1994). Las esporas del género *Aspergillus* se dispersan por las corrientes de aire. Cuando entran en contacto con superficies líquidas o sólidas, se depositan y si las condiciones de humedad son favorables germinan (Kanaani y col., 2008). La capacidad de dispersión a nivel mundial con habilidad para crecer en una amplia gama de sustratos implica que es un género ubicuo, siendo este adjetivo el más comúnmente utilizado para definirlo.

Ecología del ecosistema de almacenamiento

Posterior a la cosecha, en el almacenamiento, los granos quedan expuestos a un amplio rango de complejos factores ecológicos (Maier y col., 1996), la actividad de agua, la temperatura y el aire, son los más importantes en la colonización fúngica y la infestación con insectos (Montross y col., 1999) además de las características propias del grano almacenado (Maier y col., 1996).

White y Sinha (1980) definieron que los sistemas de almacenamiento de granos son ecológicamente inestables ya que pueden verse afectados por muchas especies con alto potencial reproductivo y así dañar el grano en un período corto de tiempo. Muchas especies del género *Aspergillus* son xerofílicas siendo capaces de deteriorar alimentos que excedan mínimamente los límites seguros de humedad. Por ello, un gran número de estas especies se encuentran particularmente en los granos almacenados (Pitt y Hocking 1985; 1997).

La actividad biológica está determinada por la disponibilidad de agua, ya que ningún ser vivo puede crecer si en su ambiente no hay agua disponible para su utilización (Lacey y Magan 1991; Cooke y Wipps 1993; Magan y col., 2003). En la literatura más antigua de la industria alimentaria, el concepto de disponibilidad de agua fue definido con el término humedad relativa de equilibrio (HRE). La HRE concierne a la atmósfera en un espacio cerrado, donde la presión de vapor de agua que rodea a un alimento está en equilibrio con la humedad del alimento a la misma temperatura. El otro término utilizado universalmente para definir la disponibilidad de agua, es la actividad de agua (a_w) que se define como la relación entre la presión de vapor del agua de un sustrato en equilibrio y la del agua pura a la misma temperatura y presión. Por otro lado, el potencial de agua (Ψ) está relacionado a las fuerzas externas que atrapan el agua libre (Griffin 1982).

El maíz generalmente es cosechado con porcentajes de humedad entre 18 y 20% y luego se somete a sistemas de secado con motivo de disminuir dicho porcentaje. Un secado inadecuado favorece el desarrollo fúngico, lo cual resulta en la reducción de la calidad y cantidad del grano almacenado (Marin y col., 1998). Por lo tanto, para un sistema de almacenamiento seguro, el contenido de humedad del grano, así como el del aire circundante debe ser reducido y controlado (Jayas y White 2003). Los granos de maíz son materiales higroscópicos (absorben y liberan agua), se componen de una cantidad constante de materia seca, pero su contenido de agua varía

(Devereau y col., 2002), a mayor humedad el grano se calienta y resulta un ambiente favorable para el ataque fúngico (Brewbaker 2003). Las especies de *Aspergillus* difieren en sus requisitos de a_w , por lo tanto la presencia de una especie en particular en un alimento o pienso es, a menudo, indicador de las condiciones de almacenamiento. La a_w puede afectar la germinación de diferentes maneras. Cuando disminuye la a_w , la fase de latencia puede durar varios meses, mientras que a a_w más altas ($>0,98$), la fase de latencia puede durar desde unas pocas horas a varios días (Kozakiewicz y Smith 1994).

Se han realizado varios estudios para examinar la relación entre la temperatura y la humedad relativa en el almacenamiento de granos y los resultados han puesto de manifiesto una relación directa entre ellos, a medida que aumenta la temperatura, el grano libera humedad al aire que lo rodea, aumentando de este modo la humedad relativa (Devereau y col., 2002). Por lo tanto la a_w y la temperatura son dos factores importantes en la determinación del tiempo de almacenamiento seguro de los granos. La interacción entre ambos factores determina, no solo el rango en el que un hongo puede germinar, crecer y esporular, sino también modifica las relaciones interespecíficas de las distintas poblaciones microbianas, como también la modificación en la producción de micotoxinas (Lacey y Magan 1991).

Por otro lado los granos, así como el resto de organismos vivos presentes en el agroecosistema de almacenamiento (hongos, insectos, ácaros, entre otros) respiran, durante este proceso se consume O_2 y CO_2 y se produce H_2O y calor (Bern y col., 2013). El CO_2 , la humedad y el calor producidos por la respiración de los granos conllevan a un incremento en la temperatura y consecuentemente a la reducción de materia seca del grano almacenado (Lee 1999). Se ha demostrado que si el contenido de humedad de los granos almacenados aumenta, la tasa de respiración también se ve aumentada. Por todo esto, White y Sinha (1980) ya señalaban que la supervivencia y multiplicación de hongos e insectos en el grano dependen en gran medida de la temperatura y los niveles de humedad del agroecosistema de almacenamiento.

Aspergillus* Sección *Flavi

Breve descripción de la Sección.

Las especies pertenecientes al género *Aspergillus*, subgénero *Circumdati* y a la Sección *Flavi* se encuentran entre las más estudiadas, debido a que han sido aisladas de una gran variedad de alimentos en los cuales se las ha implicado con el deterioro de los mismos y/o producción de aflatoxinas, lo que refleja su importancia económica. Entre las especies de esta Sección se puede reconocer a: *A. flavus* Link, *A. parasiticus* Speare, *A. tamaris* Kita, *A. pseudotamaris* Ito y col., *A. caelatus* BW Horn, *A. nomius* Kurtzman y col., *A. bombycis* Peterson y col., *A. oryzae* (Ahlburg) Cohn y *A. sojae* Sokaguchi y Yomada, entre otras (tabla 2).

Tabla 2. Especies que integran la Sección *Flavi*.

Especies	Clado	Capacidad toxicogénica ^a
<i>A. robustus</i>	-	-
<i>A. leporis</i>	-	-
<i>A. avanaceus</i>	-	-
<i>A. lanosus</i>	" <i>P. alliaceus</i> "	-
<i>A. alliaceus</i>	" <i>P. alliaceus</i> "	-
<i>A. albertensis</i>	" <i>P. alliaceus</i> "	-
<i>A. bombycis</i>	" <i>A. flavus</i> "	AFB, AFG, ácido kojico
<i>A. nomius</i>	" <i>A. flavus</i> "	AFB, AFG, ácido kojico
<i>A. oryzae</i>	" <i>A. flavus</i> "	ACP, ácido kojico
<i>A. subolivaceus</i>	" <i>A. flavus</i> "	-
<i>A. flavus</i>	" <i>A. flavus</i> "	AFB, ACP, ácido kojico
<i>A. thomii</i>	" <i>A. flavus</i> "	-
<i>A. terricola</i> var. <i>americanus</i>	" <i>A. flavus</i> "	-
<i>A. parasiticus</i>	" <i>A. flavus</i> "	AFB, AFG, ácido kojico
<i>A. toxicarius</i>	" <i>A. flavus</i> "	AFB, AFG, ácido kojico
<i>A. sojae</i>	" <i>A. flavus</i> "	ácido kojico
<i>A. minisclerotium</i>	" <i>A. flavus</i> "	ACP, AFB, AFG, ácido aspergílico, ácido kojico, aflatrem
<i>A. arachidicola</i>	" <i>A. flavus</i> "	AFB, AFG, ácido kojico, parasiticólido, crisogina
<i>A. caelatus</i>	" <i>A. tamarii</i> "	ácido kojico
<i>A. pseudotamarii</i>	" <i>A. tamarii</i> "	AFB, ACP, ácido kojico
<i>A. coremiiiformis</i>	" <i>A. tamarii</i> "	-
<i>A. flavofurcatus</i>	" <i>A. tamarii</i> "	-
<i>A. terricola</i> var. <i>Indica</i>	" <i>A. tamarii</i> "	-
<i>A. terricola</i>	" <i>A. tamarii</i> "	-
<i>A. tamarii</i>	" <i>A. tamarii</i> "	ACP, ácido kojico
<i>E. astellata</i>	" <i>E. astellata</i> "	AFB ₁ , esterigmatocistina
<i>E. venezuelensis</i>	" <i>E. astellata</i> "	AFB ₁ , esterigmatocistina
<i>A. ochraceoroseus</i>	" <i>A. ochraceoroseus</i> "	AFB ₁ , esterigmatocistina
<i>A. rambellii</i>	" <i>A. ochraceoroseus</i> "	AFB ₁ , esterigmatocistina, 3-O-metilesterigmatocistina

^aAFB: aflatoxinas tipo B; AFG: aflatoxinas tipo G; ACP: ácido ciclopiazónico.

Fuente: Ito y col., (2001); Peterson y col., (2001); Varga y col., (2003); Frisvad y col., (2004, 2005); Pildain y col., (2008); Varga y col., (2011).

Los métodos de identificación clásicos de las especies de la Sección se llevan a cabo mediante el examen de características morfo y fisiológicas en diferentes medios de cultivo (Samson y col., 2000). Se parte de cultivos puros crecidos en medios de cultivos conocidos. Las primeras micrografías taxonómicas fueron a partir de cepas crecidas en un medio definido adaptado del medio de cultivo Czapek Dox y comúnmente denominado "medio Czapek-Dox", éste contiene sacarosa como fuente de carbono y nitrato como fuente de nitrógeno (Raper Fennell 1965). Sin embargo, la variación entre cepas dentro de cada especie es bastante importante, con una variedad de efectos sutiles, como el intercambio de aire, luz y volumen del medio que pueden afectar la morfología (Okuda y col., 2000). Por ello los taxonomistas contemporáneos usualmente hacen crecer la misma cepa en varios medios y los incuban a diferentes temperaturas para

finalmente identificar la especie (Klich 2006). Las características morfológicas más importantes, se basan en el color verde amarillento a verde oliváceo de las colonias, un conidióforo con un estipe septado que termina en una vesícula de la cual nacen células conidiógenas (métulas y fiálides). Las fiálides dan origen a los conidios en largas cadenas con distinta pigmentación y textura (Pitt y Hocking 1997), junto con características fisiológicas tales como el crecimiento a distintas temperaturas, son las más utilizadas para realizar una aproximación a especie (Klich y Pitt 1988; Ito y col., 2001; Peterson y col., 2000; 2001). Sin embargo debido a que las características que definen a cada especie se encuentran muy solapadas, en la actualidad se trata de efectuar estudios que incluyan metodologías morfológicas, fisiológicas, químicas y genéticas para evitar errores por divergencia intra e interespecíficas (Samson y col., 2000).

Aspergillus flavus

La secuenciación del genoma de *A. oryzae* proporciona una excelente herramienta para obtener conocimientos en la biología básica de este organismo (Machida y col., 2005; Galagan y col., 2005). La secuenciación de *A. flavus* (NRRL 3357) está en curso, sin embargo la bibliografía indica en una primera aproximación, que el tamaño del genoma es de unos 37 Mb distribuido en ocho cromosomas, que codifican más de 12.000 genes funcionales (Payne y col., 2006; Chang y Ehrlich 2010). El tamaño del genoma de *A. flavus* es ligeramente mayor al de otros *Aspergillus*, como *A. fumigatus* (~ 30 Mb), *A. terreus* (30 Mb), *A. niger* (34 Mb) y *A. nidulans* (31 Mb) (Birren y col., 2004; Galagan y col., 2005; Nierman y col., 2005; Pel y col., 2007; Fedorova y col., 2008). *A. flavus* es genéticamente casi idéntico a *A. oryzae*. La genómica comparativa define a *A. flavus* como un organismo ambiental mientras que la cepa secuenciada de *A. oryzae* es un hongo 'domesticado', a partir de haber sido utilizado en la fermentación de la soja durante miles de años, y rara vez causa enfermedad (Hedayati y col., 2007).

Al igual que otras especies de *Aspergillus*, *A. flavus* tiene distribución mundial. Esto probablemente es el resultado de la producción de un gran número de conidios que se dispersan fácilmente por el aire y posiblemente, por los insectos. La composición de la atmósfera tiene un gran impacto sobre el desarrollo de este hongo, siendo la humedad la variable más importante (Gibson y col., 1994). *A. flavus* tiene su óptimo desarrollo a la actividad de agua (a_w) entre 0,86 y 0,96 (Vujanovic y col., 2001). La temperatura óptima de crecimiento es de 25°C, no obstante es capaz de desarrollar en un rango de temperatura entre 12 y 48°C lo que contribuye a su patogenicidad en los seres humanos.

A. flavus pasa la mayor parte de su ciclo de vida como saprófito en el suelo, donde desempeña un importante rol como reciclador de nutrientes (Scheidegger y Payne 2003). La capacidad de *A. flavus* para sobrevivir en condiciones adversas le permite dejar fuera de competencia a otros organismos por los sustratos presentes en el suelo (Bhatnagar y col., 2000). El hongo es productor de esclerocios. Los esclerocios son estructuras de resistencia que

contienen una variedad de metabolitos tóxicos, entre ellos, aflatoxinas (Wicklow 1990). Las cepas de *A. flavus* que producen esclerocios pueden o no elaborar aflatoxinas (Bennett y col., 1979; Cotty 1989). Los esclerocios pueden germinar para producir hifas o producir conidios (esporas asexuales), que se dispersan en el suelo y el aire. Existe una clasificación de *A. flavus* según el tamaño de los esclerocios que produce: cepas L (Grupo I) aquellas cuyos esclerocios presentan un diámetro $>400 \mu\text{m}$ y cepas S (Grupo II) para esclerocios $<400 \mu\text{m}$. Ambos tipos de cepas S y L son productoras de aflatoxinas B_1 y B_2 , mientras que la tipo S además produce aflatoxinas G_1 y G_2 (Cotty 1989; Horn 2005).

Las características morfológicas típicas de *A. flavus* Link se resumen en conidióforos incoloros de paredes gruesas y muy rugosas, por lo general de menos de 1 mm de longitud. Las vesículas son alargadas en cultivos jóvenes, volviéndose más tarde en subglobosas o globosas, que varían entre 10 hasta $65 \mu\text{m}$ de diámetro. Las fiálides son uniseriadas o biseriadas. Las ramas primarias son de hasta $10 \mu\text{m}$ de longitud, y la secundaria hasta $5 \mu\text{m}$ de longitud. Los conidios son típicamente globosos a subglobosos, equinulados de $3,5$ a $4,5 \mu\text{m}$ de diámetro (Samson y col., 2000; Horn 1997; Klich y Pitt 1988) (figura 3).

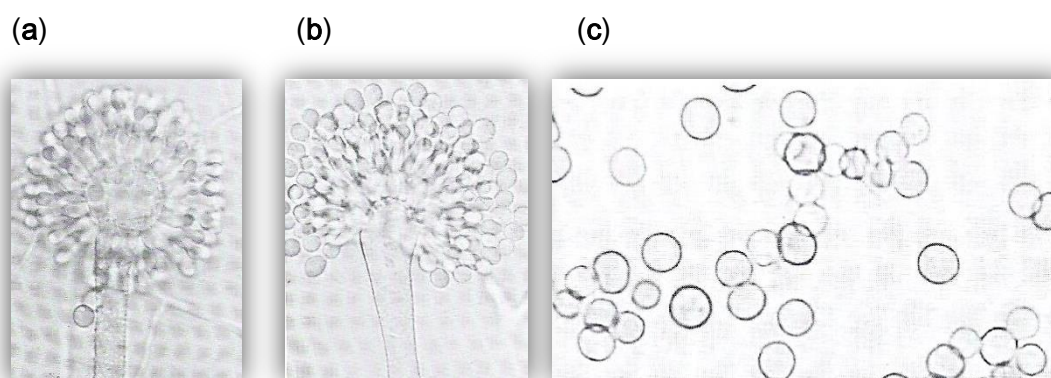


Figura 3. Características microscópicas de *A. flavus*. (a y b) conidióforo; (c) conidios en 1000X.

Aflatoxinas

Los efectos nocivos de las micotoxinas sobre la salud humana son conocidos desde hace tiempo. La enfermedad de "La feria de San Antonio", por ejemplo, adquirida por los espigadores de centeno (contaminado por hongos toxicogénicos) en los campos después de la cosecha se halla documentada desde la Edad Media. Durante los años 1940 y 1950, al comienzo de la segunda guerra mundial, se produjeron episodios de una enfermedad letal en humanos en Rusia. Esta situación fue bien documentada y se refirió como "Aleucia Tóxica Alimentaria" (ATA). Esta enfermedad devastadora con efectos necrotizantes, hemorrágicos y sobre el sistema nervioso central, resultando a menudo en la muerte, fue reconocida como una manifestación tóxica de la contaminación de los granos cosechados con hongos productores de micotoxinas (Richard 2003).

Las micotoxinas surgen como compuestos de interés toxicológico luego de descubrirse su rol como agentes etiológicos de la “enfermedad X” de los pavos reportada en los años 60. Esta enfermedad asociada al consumo de una harina de maní procedente de Brasil causó la muerte de más de 100.000 pavos en Inglaterra. Con el tiempo se descubrió que ciertas sustancias tóxicas aisladas del alimento causaron dicha enfermedad. Estas sustancias se denominaron “aflatoxinas” ya que el principal hongo productor de estas es *Aspergillus flavus* (Sargeant y col., 1961).

Después de las aflatoxinas se descubrieron otras micotoxinas entre las cuales se incluyen los tricotricos, la ocratoxina A, la zearalenona y hacia finales de la década de los noventa las fumonisinas (Bezuidenhout y col., 1988).

La contaminación con micotoxinas de diversos productos alimenticios y productos agrícolas, es un problema importante en los trópicos y sub-trópicos, donde las condiciones climáticas, agrícolas y las prácticas de almacenamiento son propicias para el crecimiento de hongos y la producción de toxinas (Kumar y col., 2008).

Las aflatoxinas son metabolitos tóxicos producidos por *A. flavus*, *A. parasiticus* (Codner y col., 1963; Schroeder 1966), *A. nomius* (Kurtzman y col., 1987), *A. pseudotamarii* (Ito y col., 2001), *A. bombycis* (Peterson y col., 2001), *A. toxicarius* (Murakami 1971; Murakami et al. 1982; Frisvad y col., 2005), *A. parvisclerotigenus* (Saito y Tsurota 1993; Frisvad y col., 2005), *A. minisclerotigenes*, *A. arachidicola* (Pildain y col., 2008) y *A. pseudonomius* y *A. pseudocaelatus* dentro de *Aspergillus* Sección *Flavi*. Las especies productoras de aflatoxinas se encuentran dispersas a través de los árboles filogenéticos lo cual indica que la capacidad de producción de aflatoxinas se perdió (o se ganó) varias veces durante la evolución. Se consideran como productos metabólicos secundarios, es decir que no tienen una función directa en el metabolismo vital fisiológico del hongo, sino que parecen ser un factor de defensa para un medio hostil. Se han discutido varias hipótesis sobre las funciones de las aflatoxinas tales como: protección contra competidores o insectos predadores, la promoción de la formación de los conidios y esclerocios y la remoción del exceso de acetato producido cuando el hongo crece sobre sustratos con alto contenido de carbono (Bu'Lock 1965; Drummond y Pinnock 1990; Calvo y col., 2001; Wilkinson y col., 2004).

Químicamente, las aflatoxinas pertenecen al grupo de derivados de las bisfuranoisocumarinas (figura 4). Su síntesis se relaciona con la condensación de un Acetil CoA que reacciona con grupos malonatos produciendo malonil CoA, que luego va a formar un compuesto policetónico. En la siguiente etapa, a partir de una ciclización y aromatización se origina la antrona y su compuesto oxidado que es el ácido norsolínico; a partir de este compuesto se forman las aflatoxinas (Hsieh y col., 1976). Aunque han sido identificados al menos 20 tipos diferentes de aflatoxinas, las más comunes son la B₁, B₂, G₁ y G₂. Las aflatoxinas B y G emiten luz ultravioleta de onda larga, excitándose a 225-365 nm y emitiendo a 425-450 nm, con lo cual pueden observarse bajo la luz ultravioleta, emitiendo luz azul o verde, de donde toman el nombre de B (blue) y G (green) según el caso. Los subíndices 1 y 2 indican los patrones de movilidad

cromatográfica de los componentes en placas de cromatografía de capa delgada (TLC). Las aflatoxinas B₂ y G₂ son derivados hemiacetálicos de las aflatoxinas B₁ y G₁ respectivamente (Hethcote y Hibbert 1978). Otros miembros del grupo son derivados de estas cuatro aflatoxinas y se producen como consecuencia de la actividad metabólica de sistemas animales o microbianos. Ellos son el aflatoxicol y las aflatoxinas M₁, M₂, P₁ y Q₁. Signorini y col., (2012) demostraron una correlación positiva entre el contenido de micotoxinas en los ensilados de maíz y el nivel de micotoxinas en la leche de vaca. Hasta el 6% de la dosis administrada de aflatoxina se excreta en la leche (EFSA 2004).

Las micotoxinas pueden ser carcinogénicas, mutagénicas, genotóxicas, teratogénicas, neurotóxicas y estrogénicas (Fung y Clark 2004; Jestoi 2008; Köppen y col., 2010). La habilidad de las micotoxinas para inducir varios tipos de cáncer en animales domésticos y de experimentación constituye una gran preocupación para la salud pública. En 1993 la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) clasificó las micotoxinas de acuerdo a su carcinogenicidad, encontrando micotoxinas clasificables en el grupo 1 correspondientes a compuestos carcinogénicos para humanos (como la aflatoxina B₁), en el grupo 2 correspondiente a compuestos posiblemente carcinógenos para humanos (aflatoxina M₁, ocratoxina, fumonisina B₁) y en el grupo 3, correspondiente a compuestos no carcinógenos para humanos (como zearalenona y tricotecenos) (IARC 1993).

La AFB₁ es la más tóxica. La patogenicidad se relaciona con la gran estabilidad en los diferentes medios bióticos y ambientales (Valdivia 1998). La capacidad toxicogénica de las aflatoxinas G₁, B₂ y G₂ es de aproximadamente 50, 20 y 10% con respecto a la AFB₁ (Roebuck y Maxuitenko 1994). No obstante, la susceptibilidad está muy influenciada por la raza, especie, edad, dosis, tiempo de exposición y el estado nutricional.

Efectos de la AFB₁ sobre la salud animal.

Además de los efectos carcinogénicos se conocen efectos adversos de las micotoxinas en la salud en general, tanto de animales de producción como mascotas. Dentro de los síntomas se encuentran la reducción en la ganancia de peso, efectos adversos en la reproducción, daño al sistema inmunológico, síntomas severos de intoxicación e incluso muerte cuando la dosis de micotoxina es demasiado alta (Hussein y Brasel 2001; Leeson y col., 1995).

Efectos de la AFB₁ sobre la salud humana.

Los humanos pueden estar expuestos a las micotoxinas por consumo de alimentos contaminados, lo que da como resultado una intoxicación aguda o crónica.

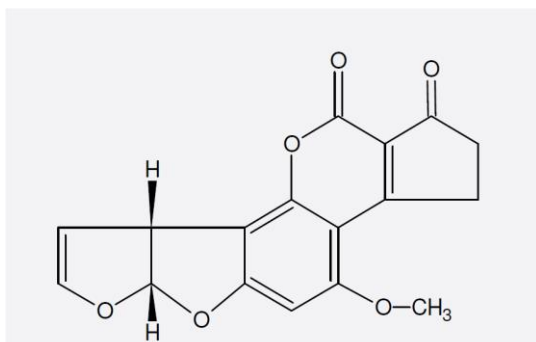
La intoxicación aguda se manifiesta por vómito, dolor abdominal, edema pulmonar, infiltración grasa y necrosis del hígado. El estado nutricional es importante en la expresión de esta

toxicidad; una dieta baja en lípidos hace más vulnerable el hígado a las aflatoxinas lo mismo que las dietas deficientes en proteínas; al contrario, el hígado con gran cantidad de ácidos grasos insaturados no es afectado por estas toxinas (Casas 1989).

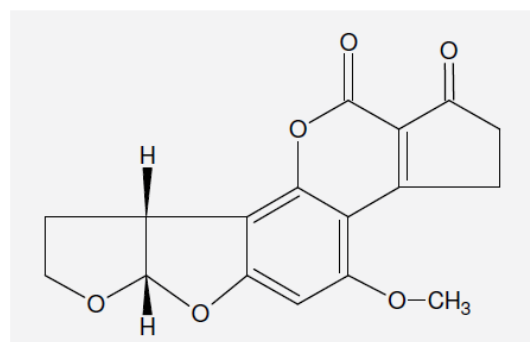
Sobre la intoxicación crónica por aflatoxinas, principalmente la B₁ que es ante todo un potente carcinogénico, interesan los efectos que se producen por la exposición por períodos largos de tiempo y a bajas concentraciones. Las aflatoxinas actúan sobre las membranas celulares inhibiendo el ADN y la síntesis de ARN, la incorporación de aminoácidos y fosfolípidos y alternando el metabolismo de los lípidos y proteínas. El daño hepático se ha demostrado por cambios clínicos y químicos de las funciones hepáticas y cambios histopatológicos, lesión de los conductos biliares, degeneración hepatocelular, necrosis y fibrosis del hígado (McLean y Dutton 1995).

La inmunidad celular también está afectada por el consumo de aflatoxinas; es así como se reducen la fagocitosis por macrófagos, los efectos retardados de la hipersensibilidad, la linfoblastogénesis (respuesta a mitógenos), el rechazo de injertos y las células del sistema fagocítico. En cuanto a la respuesta inmunológica, las células T son aparentemente más susceptibles a las aflatoxinas que las células B. Además, están reducidas las inmunoglobulinas G y A, la actividad del complemento y la actividad bactericida del suero. El tiempo que dura la inmunosupresión es muy variable y una vez que se retira la aflatoxina B₁, la respuesta inmunológica vuelve a ser normal (Massey y col., 1995).

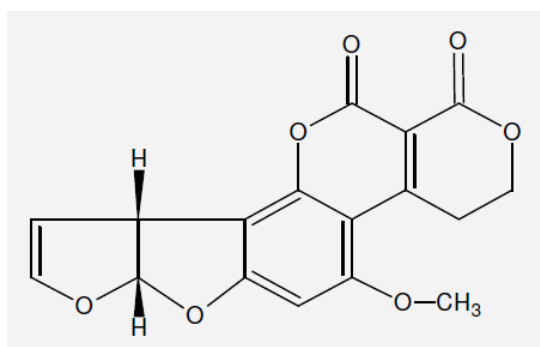
Se cree que las aflatoxinas pueden ser factor etiológico de encefalopatía y degeneración grasa visceral, similar al síndrome de Reyé, el cual es común en ciudades con clima húmedo y cálido. Así mismo, se han encontrado aflatoxinas en trabajadores textiles muertos por fibrosis intersticial pulmonar, en los que se cree que probablemente tuvieron exposición ocupacional y la vía de entrada fue la respiratoria; también existen reportes de residuos de aflatoxina en suero, hígado, orina y heces diarreicas de niños con Kwashiorkor (Peraica y col., 1999). Las aflatoxinas también se han asociado con Paraparesia Espástica Tropical (PET). Se considera que además de ser cancerígenas e inmunosupresoras, pueden interferir con algunas vías metabólicas de los esfingolípidos. Por otro lado, la inmunosupresión que producen puede permitir a los retrovirus exógenos disparar reacciones autoinmunes en los organismos contaminados (Fidias 2002).



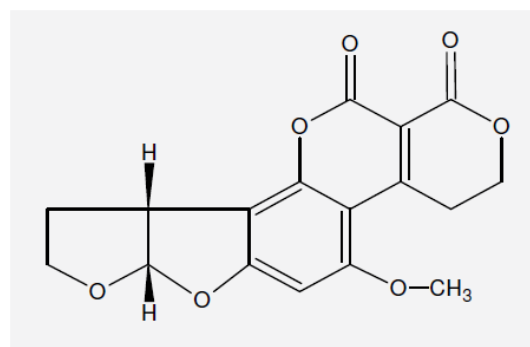
Aflatoxina B₁ (AFB₁): 2,3, 6a á, 9a á-
TETRAHIDRO-4-METOXICICLOPENTA
(C) FURO (3',2':4,5) FURO (2,3-h) (1)
BENZO-PIRANO-1,11-DIONA.



Aflatoxina B₂ (AFB₂): 2, 3, 6a, 8, 9, 9a á-
HEXADIDRO-4-METOXICICLOPENTA
(C) FURO (3',2':4,5) FURO (2,3-h) (1)
BENZO-PIRANO-1,11-DIONA.



Aflatoxina G₁ (AFG₁): 3, 4, 7a, 10 á-
TETRAHIDRO-5-METOXI-1H, 12H-
FURO-(3',2': 4,5) FURO (2,3-h)-PIRANO
(3,4c) (1)-BENZOPIRANO-1,12-DIONA.



Aflatoxina G₂ (AFG₂): 3, 4, 7a, 9, 10, 10a
á-HEXAHIDRO-5-METOXI-1H, 12H-
FURO (3',2':4,5) FURO (2,3-h)-PIRANO-
(3,4c) (1)-BENZOPIRANO-1,12-DIONA.

Figura 4. Estructura de las aflatoxinas.

Incidencia de aflatoxinas en Argentina

La presencia natural de micotoxinas en Argentina se ha investigado en granos de maíz (Chulze y col., 1989; Sydenham y col., 1993; Resnik y col., 1996; González y col., 1999; Etcheverry y col., 1999; Pacin y col., 2001; Broggi y col., 2007; Pacin y col., 2009) en fracciones de molienda en seco (Broggi y col., 2002) así como en otros productos obtenidos de este cereal (Solovey y col., 1999).

La disminución del valor nutricional del maíz y/o la producción de micotoxinas es consecuencia del ataque fúngico de los granos almacenados (Frisvad y col., 2006). Este efecto es relevante debido a la importancia de este producto en la economía argentina (FADA 2013).

El análisis micológico en diferentes genotipos de maíz mostró la presencia principalmente de tres géneros fúngicos, *Fusarium* (100%), *Penicillium* (67%) y *Aspergillus* (60%). Estos géneros

están representados por un gran número de especies (Etcheverry y col., 1999). Si bien los niveles de exposición a las aflatoxinas en nuestro país no llevan a desencadenar toxicosis agudas, existe la posibilidad de las exposiciones crónicas.

Garrido y col., (2012) analizaron un total de 3246 muestras de maíz, 1655 muestras de maíz recién cosechado y 1591 de maíz almacenado obtenidas de diferentes regiones de Argentina, entre los años 1999 a 2010. Excepto para las muestras de maíz recién cosechado del 2003 y para las muestras provenientes de almacenamiento del año 2007, los niveles de aflatoxinas registrados fueron bajos. Los valores promedio de la aflatoxina B₁ para muestras recién cosechadas fueron entre 0,38 y 2,54 mg kg⁻¹ y para las muestras de maíz almacenado fueron entre 0,22 y 4,5 mg kg⁻¹. En general, se ve la tendencia de incremento de la toxina cuando el grano pasa al agroecosistema de almacenamiento, a pesar de haberse registrado valores por debajo de los límites permitidos en la mayoría de las muestras analizadas. El límite máximo permitido de aflatoxinas totales en Argentina para maíz en grano (entero, partido, laminado, peleteado) y harina y sémola es de 20 µg kg⁻¹ (CAA 2002).

Plagas

Generalidades

Posteriormente a la cosecha, los granos rara vez son inmediatamente consumidos por humanos o animales domésticos. En la mayoría de los casos su producción es estacional, y por ello se almacenan en estructuras aptas que aseguren la viabilidad del producto, energía alimentaria, calidad nutricional y comerciabilidad para el futuro. Los granos almacenados son susceptibles al deterioro en el tiempo, de modo que prolongar el período de almacenamiento podría ocasionar su deterioro debido a múltiples factores. Se produce un profundo cambio en el ecosistema del grano, desde el campo donde el ambiente es controlado fundamentalmente por las fluctuaciones de las condiciones climáticas, al medioambiente comparativamente más estable del almacenamiento donde se produce una redistribución del inóculo fúngico como así también la introducción de inóculos adicionales (Flannigan 1978). La temperatura, la humedad y otros factores juegan un importante rol no solo en el crecimiento de hongos toxicogénicos sino también en el desarrollo de insectos. Los insectos y ácaros también interactúan en la colonización de los granos generando ambientes que promueven el crecimiento mediante calentamiento espontáneo del grano seco, agua por respiración y migración de la humedad (Sinha y Wallace 1966). También pueden proveer sitios para la infección fúngica a través del daño que pueden ocasionar en los granos (Wallace y Sinha 1981), por lo que es imprescindible dimensionar que en este sistema biológico los insectos son un problema importante: su tamaño, capacidad de reproducción y su gran facilidad de adaptación a los diferentes medios, determinan que los métodos para su control rara vez tengan el éxito deseado. Para aumentar la eficiencia de su control, primero es necesario

identificarlos, ya que dependiendo del ecosistema donde se encuentren, no todas las especies son dañinas y de éstas, algunas lo son más que otras.

Las plagas del maíz son aquellas especies que afectan, directa o indirectamente, la cantidad o la calidad de grano que se desea obtener, bien sea durante el proceso de su producción en el campo, o en el almacenamiento y procesamiento previos a su uso final (Clavijo y Pérez Greiner 2000).

Insectos en maíz almacenado

Aproximadamente 250 especies de insectos atacan los granos y sus productos durante el almacenamiento y de éstas, alrededor de 20 son de mayor importancia. Hay 13 especies de insectos que están bien adaptadas para vivir en los granos del maíz almacenado y que son responsables de la mayor parte del daño que sufren los granos de maíz, tanto en el campo como en las condiciones de almacenamiento comercial. Además hay 175 especies de insectos y ácaros consideradas secundarias pero que pueden ser dañinas cuando son abundantes y bajo condiciones ambientales especiales (FAO 2001).

En base al daño que ocasionan, los insectos se han agrupado en especies primarias, que aunque son relativamente pocas, son capaces de dañar granos sanos, producen el llamado picado de la vaina del grano pudiendo colocar sus huevos dentro y fuera de los mismos teniendo gran importancia económica. Los primeros en aparecer son las larvas y pupas de coleópteros y lepidópteros que atacan el grano sano (White 1995). Dentro del grupo de plagas primarias se encuentran el gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais*) el barrenador grande del grano (*Prostaphanus truncatus*) y la palomilla de los granos (*Sitotroga cerealella*) (FAO 1985). Luego actúan las especies secundarias, coleópteros y carroñeros, son aquellas que atacan granos partidos o que previamente han sido dañados por las primarias y se multiplican con facilidad en los productos obtenidos de la molienda de granos (White 1995). Entre las plagas secundarias se encuentran la polilla bandeada (*Plodia interpunctella*), el escarabajo castaño de la harina (*Tribolium castaneum*), el escarabajo confuso de la harina (*T. confusum*) y el pequeño barrenador de los granos (*Rhyzopertha dominica*) (FAO 1985). Cuando la humedad aumenta aparecen los insectos fungívoros (coleópteros) que se alimentan de micelio y esporas (White 1995). Esta categoría de insectos del almacenamiento se alimentan de hongos y aunque son alimentadores externos, que no dañan directamente el grano a través de la alimentación, contaminan la masa de granos a través de su presencia y la actividad metabólica. La actividad metabólica genera calor y produce agua a través del proceso de condensación, que fomenta el crecimiento de hongos y deterioro del grano (Magan y col., 2003). Estos insectos fungívoros, en general, se denominan especies terciarias debido a que se multiplican en granos y productos en avanzado estado de deterioro causado por otros insectos o por microorganismos. Esta agrupación es algo arbitraria, porque algunas especies pueden ser secundarias para granos enteros y sanos, porque biológicamente

no están capacitadas para dañarlos y necesitan que otros insectos inicien el daño, pero pueden ser primarias para los productos de la molienda (Cotton 1956).

Otro aspecto interesante está relacionado con los productos que atacan. Hay especies que son polifagicas y se alimentan y multiplican en una gran variedad de productos; otras son específicas y sólo pueden reproducirse en un determinado grano o producto. Algunos insectos son específicos en cuanto a los requerimientos de humedad y temperatura; algunos no sobreviven en granos secos, y otros lo hacen solamente si las temperaturas son relativamente altas (Koehler 2003). También es importante conocer la forma en que se dispersan, hay especies que tienen una gran capacidad de vuelo, otras lo hacen caminando y por último, hay algunas que son más bien sedentarias. Los insectos tienen hábitos propios. Cada generación responde al medio de manera similar a sus ancestros, así la ovoposición, alimentación, migración y respuesta al medio, generalmente sigue un determinado patrón. Sin embargo, no todos los insectos de una misma especie son iguales. La influencia del medio puede inducir cambios para su mejor adaptación y supervivencia (Arias 1983).

En el maíz, la cebada, la avena, la soja y el sorgo, las condiciones requeridas para que el grano se clasifique como infestado son: a partir de una muestra de 1000 g que contenga:

1. más de un gorgojo vivo;
2. un gorgojo vivo más otros insectos vivos;
3. ningún gorgojo vivo pero con 10 insectos vivos dañinos para el grano almacenado

(Hagstrum y col., 2012).

La tolerancia de insectos en productos terminados como harina o harina de maíz, es más estricta. De acuerdo a lo establecido por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), el número máximo de insectos permitidos antes de que el alimento se considere contaminado, por ejemplo para harina de maíz es de uno o más insectos enteros (o su equivalente) cada 50 g o un promedio de 25 o más fragmentos de insectos cada 25 g (FDA 2009).

La identificación específica de la plaga que se encuentra dentro de una muestra es importante porque los insectos tienen diferencias en cuanto a potenciales daños, biología, comportamientos, temperaturas de crecimiento, necesidad de humedad y potencial reproductivo. Reconocer el insecto es el primer paso en la comprensión y el control del problema de los insectos. El conocimiento de la biología de los insectos permitiría llevar a cabo un buen programa de manejo integrado de plagas (Hagstrum y col., 2012).

Principales especies de insectos plaga

***Sitophilus zeamais* (Motschulsky). Gorgojo del maíz**

Su ciclo de vida mínimo medio es de 26 días a 30°C y 75-76% de humedad relativa. La distribución se produce en zonas tropicales y templadas, las zonas cálidas y húmedas donde se

cultiva el maíz son las favoritas, pero se pueden encontrar en climas más fríos como los existentes en Canadá. Las hembras pueden depositar 300 a 400 huevos sobre los granos de cereales en el campo y el almacenamiento. Las larvas se alimentan de los granos y allí se transforman en pupas.

Los insectos adultos miden 3 a 3,5 mm de largo. El gorgojo del maíz tiene un rango de huésped similar al gorgojo del arroz y al granero picudo y aunque es comúnmente encontrado en el maíz, se alimentan de la mayoría de los granos de cereales, como el trigo, la cebada, el sorgo, el centeno y el arroz. Los gorgojos de maíz prefieren los granos enteros, no obstante existen registros donde se ha informado que pueden alimentarse de muchos productos de granos procesados incluyendo alimentos para mascotas y pastas. Generalmente, depositan un huevo por grano (Lathrop 1914; Gómez y col., 1982), pero en ocasiones puede emerger más de un adulto. Si se colocan varios huevos, las larvas compiten por agresión activa entre los ocupantes de la semilla (Guedes y col., 2010). La supervivencia de un estadio inmaduro es sólo del 18% (Throne 1994). La oviposición no se produce si la humedad relativa es inferior al 60% (Arbogast 1991). Las infestaciones de los granos con estadios inmaduros se pueden determinar mediante la tinción de los granos para ver fácilmente el tapón de la ovoposición colocado en la cavidad del huevo para proteger al gorgojo inmaduro. El ciclo de vida promedio de los gorgojos del maíz es de 35 días a 27°C (Sharifi y Mills 1971), con un tiempo máximo de desarrollo de 110 días a 18°C. La mayor supervivencia de todos los estadios inmaduros se obtiene a 25°C (Throne 1994). La temperatura mínima de desarrollo es de 13°C. El huevo y los estadios de larva y pupa rara vez se ven porque están confinados al interior del grano. Los huevos son de color blanco cremoso y apenas visible a simple vista. La capacidad de eclosión es de aproximadamente 90% y la mortalidad en el primer estadio larvario puede ser de hasta 30% con una HR del 50% (Arbogast 1991). Las larvas son de color blanco cremoso con una cabeza marrón y sin patas. Ellas pasan por cuatro estadios antes de pupar dentro del grano. Durante los cuatro o cinco meses de clima frío del invierno, la larva se mantiene dentro de los granos. En general, se producen cuatro a cinco generaciones por año en los silos de almacenamiento. Los edificios de almacenamiento con calefacción pueden llegar al doble de generaciones. Los adultos viven alrededor de cuatro a ocho meses. Los gorgojos del maíz adultos son un poco más grandes que los gorgojos de arroz, además tienen perforaciones circulares en el tórax, comparables con los pequeños orificios ovales que presenta el gorgojo del arroz y manchas de color distintivas en las alas anteriores. Los gorgojos del maíz presentan mayor capacidad para volar que los gorgojos del arroz (figura I.3).

***Rhyzopertha dominica* (Fabricius). Pequeño barrenador de los granos**

Su ciclo de vida mínimo medio es de 25 días a 34°C. La distribución de esta plaga es mundial, tanto los adultos como las larvas son voraces. Las hembras depositan 300 a 500 huevos en la superficie del grano, a menudo en grupos. Así las larvas comen el grano y se alimentan además del polvo de desecho. Las pupas, por lo general, forman celdas en el interior del grano,

pero pueden dejarlo para pupar en el polvo de los granos dañados; esta etapa dura de cinco a ocho días. Los adultos son pequeños, de 2 a 3 mm, de color negro-marrón. Debido a su naturaleza altamente destructiva se lo asocia a algunos escarabajos barrenadores de la madera.

Son fácilmente identificables por su forma. Su cuerpo es delgado y cilíndrico, de forma similar a una bala. La cabeza está ubicada por debajo del tórax y cuello redondo con forma de campana, el cual presenta una cubierta con orificios que disminuyen gradualmente su tamaño hacia la posición posterior. La antena posee 10 segmentos. El contenido de humedad del grano es un punto crítico para la oviposición y el desarrollo. Los granos con un contenido de humedad por debajo del 8% no son adecuados para la ovoposición. El desarrollo del huevo dura 32 días a 18,1°C pero sólo cinco días a 36°C. El efecto de este rango de temperatura es aún más sutil para el desarrollo larvario. Un aumento de 3 grados en la temperatura (25 a 28°C) resulta en un incremento de 17 días en el desarrollo de las larvas. Las larvas son de color blanco y en forma de C. Tienen entre cuatro y cinco estadios larvales en granos enteros, o dos a siete (generalmente de tres a cuatro) si se alimentan de harinas. Las temperaturas limitantes para el desarrollo de las larvas son 18,2°C y 38,6°C (Arbogast 1991). Las larvas pueden completar su desarrollo en los restos de granos. Los adultos generalmente se mantienen dentro del grano por unos pocos días antes de su aparición. Las hembras apareadas comienzan a ovipositar dos semanas más tarde y continúan durante cuatro meses. *Rhyzopertha dominica* infesta todos los tipos de granos de cereales, pero prefieren el trigo, el maíz o el arroz marrón con cáscara. De origen tropical, posiblemente del subcontinente indio, ya que también se alimentan de los maníes, frutos secos, semillas para pájaros, granos de cacao y frijoles, así como de productos elaborados, como macarrones, tabaco y especias secas. Desarrollan bien en las harinas infestadas con escarabajos. Los granos infestados con el pequeño barrenador tienen un olor característico dulce y ligeramente picante. Este olor se debe a la secreción de la feromona masculina producida que ha demostrado ser un señuelo eficaz para su uso en trampas para insectos. Estos insectos vuelan, pero debido a su tamaño es fácilmente capturado por las corrientes de aire. Los tiempos de vuelo están influenciados por las estaciones y la iluminación (Potter 1935). Por ejemplo, la máxima actividad de vuelo ocurre durante primavera y otoño (Toews y col., 2006). Ellos no infestan los granos en el campo (Hagstrum 2001), no obstante pueden sobrevivir fuera del agroecosistema de almacenamiento, en semillas y bellotas de otras plantas (Jia y col., 2008) (figura 1.3).

***Tribolium confusum* (Jackelin du Val). Escarabajo confuso de la harina**

Su ciclo de vida mínimo medio es de 20 días a 35°C o 45 días a 25°C. Los adultos pueden vivir hasta 6 meses. Las hembras ovipositan hasta 450 huevos entre la harina o residuos de los granos. Los huevos están cubiertos con una secreción pegajosa que permite que se adhieran a la superficie y facilitar la infestación. Se incuban entre 5 y 12 días, dando origen a larvas pequeñas, delgadas, cilíndricas de 1-5 mm de longitud, de color blanco matizado de amarillo. Presentan 3

pares de patas y pelechan de 7 a 8 veces. La pupa al principio es blanca, gradualmente cambia a amarillo, después a café y finalmente se transforma en adulto. Aunque son pequeños, aproximadamente 1/8 de pulgada de largo, los adultos son longevos y pueden vivir por más de tres años (Walter 1990). Tanto el escarabajo rojo como el de la harina atacan productos de granos almacenados tales como harina, cereales, galletas, frijoles, especias, pastas, alimentos para mascotas secos, flores secas, chocolate, frutos secos, semillas y especímenes de museo (Vía 1999, Weston y Rattlingourd 2000). Estos escarabajos tienen piezas bucales que le permiten masticar pero no morder o picar. Solo se registran casos de respuestas alérgicas para el escarabajo rojo (Alanko y col., 2000), pero no se conocen casos de transmisión de enfermedad. El escarabajo confuso de la harina al parecer recibió este nombre debido a la confusión sobre su identidad ya que es muy similar al escarabajo rojo de la harina, a primera vista (Walter 1990). El escarabajo confuso de la harina, de origen africano, tiene una amplia distribución, ya que se encuentra en todo el mundo en los climas más fríos (Smith y Whitman 1992). El escarabajo rojo de la harina es de color marrón rojizo y el extremo de las antenas presenta tres segmentos (Bousquet 1990), mientras que el escarabajo confuso de la harina es del mismo color pero el final de las antenas consta de cuatro segmentos (Walter 1990). La cabeza es visible desde arriba, no tiene pico y el tórax presenta lados paralelos (Anónimo 1986). Los escarabajos rojos y confusos de la harina viven en el mismo entorno y compiten por los recursos (Willis y Roth 1950; Ryan y col., 1970). El escarabajo rojo de la harina puede volar mientras que el escarabajo confuso de la harina no vuela. Estos insectos se sienten atraídos por los granos con alto contenido de humedad y pueden causar un tinte gris en los granos que están infestados, además emiten un olor desagradable, y su presencia estimula el crecimiento de hongos en el grano (figura 1.3).

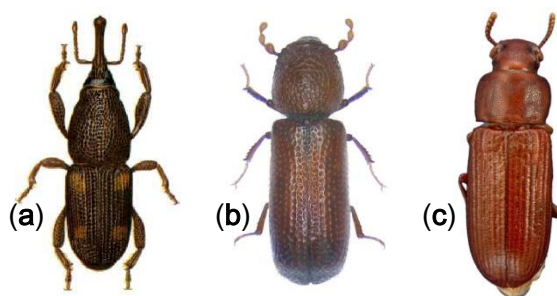


Figura 5. Insectos adultos de (a) *Sitophilus zeamais* (Motschulsky), (b) *Rhyzopertha dominica* (Fabricius), (c) *Tribolium confusum* (Jackelin du Val).

Manejo integrado de insectos plaga vectores de hongos toxicogénicos

El riesgo de contaminación fúngica y con micotoxinas de los granos almacenados depende de una compleja interacción de varios factores que incluyen: contenido de humedad, temperatura, composición de las especies fúngicas, sus interacciones con los insectos y las características propias del almacenamiento (Mills, 1986; Miller 1995). La interacción entre insectos y con el medio

ambiente bajo condiciones favorables, generalmente maximiza la actividad biológica favoreciendo el desarrollo y multiplicación fúngica (Mills 1986; Milton y Pausey 1988; Sauer 1988), dando lugar a una rápida sucesión poblacional con el consecuente deterioro del producto almacenado. Por otro lado, es sabido desde hace mucho tiempo, que la humedad es un factor importante involucrado en la atracción de insectos a los sitios del almacenamiento (Willis y Roth 1950). La presencia de insectos en granos almacenados que presentan contaminación fúngica favorece la proliferación y/o induce la presencia de especies de *Aspergillus*, particularmente *A. flavus* y *A. parasiticus* (Simpanya y col., 2001), lo cual demuestra que tienen un rol muy importante en la contaminación micotoxicogénica (Diener y col., 1987). Barney y col., (1995) ya habían demostrado que los insectos pueden actuar como vectores de los hongos, llevando sus esporas interna o externamente, participando como una fuente móvil de metabolitos fúngicos y micotoxinas. Estos resultados coinciden con nuestras investigaciones previas donde encontramos que a través del control de insectos plaga, logramos reducir la dispersión de *Aspergillus* aflatoxicogénicos en maíz y maní almacenado (Nesci y col., 2011a, b).

Actualmente la mayoría del control poscosecha de insectos se realiza con insecticidas químicos sintéticos. En general los fumigantes aplicados en los silos, actúan como vapores en concentraciones mortales para el ser humano, de modo que requieren el mayor grado de hermeticidad posible y un tiempo de exposición determinado (Casini y Santajuliana, 2012).

Sin embargo la búsqueda de métodos para la protección natural de cultivos sigue vigente a pesar de que el mercado ofrece una variedad de productos muy amplia. Entendemos que la tendencia es buscar alternativas para prevenir la entrada de xenobióticos en la cadena alimentaria (Jayashree y Subramanyam, 1999). La naturaleza nos proporciona medios para la protección de los cultivos, que merecen nuestra atención. Estos se originan en la riqueza intrínseca de las especies ya que surgen de su lucha por la supervivencia. La protección natural de cultivos reduce el riesgo de la resistencia en los insectos, no tiene consecuencias letales para los enemigos naturales, reduce la aparición de plagas secundarias, es menos nocivo para el hombre y no ocasiona daños en el medio ambiente (Stoll, 1989).

A través de muchos años de investigación hemos demostrado que para evitar la contaminación por micotoxinas, los productos almacenados podrían ser tratados con antioxidantes sintéticos de grado alimentario, tales como butilhidroxianisol (BHA) y butilhidroxitolueno (BHT) (Nesci y col., 2003; Nesci y col., 2008; Passone y col., 2008), fitoquímicos naturales (Nesci y Etcheverry 2006; Nesci y col., 2007; Nesci y Etcheverry 2009; Nesci y col., 2009) y aceites esenciales (Bluma y col., 2009), que presentan por un lado bioactividad contra los hongos y además han demostrado tener efecto insecticida contra las principales plagas de granos almacenados (Nesci y col., 2011a, b).

Por otro lado, los hongos entomopatógenos son enemigos naturales de un amplio rango de insectos y algunas especies son usadas como biopesticidas microbianos (Tanada y Kaya 1993; James y Elzen 2001). La selección de aislamientos virulentos adaptados a los componentes

locales del agroecosistema es uno de los aspectos más importante en el desarrollo de micoinsecticidas (Cortez-Madrigal y col., 2003). También se conoce que la utilización combinada de insecticidas sintéticos con agentes entomopatógenos puede aumentar la eficiencia del control (Moino y Alves 1998; Quintela y McCoy 1998), siendo una alternativa alentadora para reducir el nivel de aflatoxinas en granos almacenados mediante un manejo integrado de plagas.

1. Aguirrezábal L., Andrade F. (1998) Calidad de productos agrícolas. Bases ecofisiológicas, genéticas y de manejo agronómico. Unidad Integrada Balcarce INTA, FCA UNMP. 315 p.
2. Ainsworth GC. (1976) Introduction to the History of Mycology (Cambridge: Cambridge University Press).
3. Alabadan BA., Oyew OA. (2005) Temperature variations within wooden and metal grain silos in the tropics during storage of maize (*Zea mays*). *Journal of Sciences* 6: 59-67.
4. Alabadan BA. (2006) Temperature changes in bulk stored maize. Assumption University. *Journal of Technology* 9: 187-192.
5. Alanko K., Tuomi T., Vanhanen M., Pajari-Backas M., Kanerva L., Havu K., Saarinen K., Bruynzeel DP. (2000) Occupational IgE-mediated allergy to *Tribolium confusum* (Confused Flour Beetle). *Allergy* 55: 879-882.
6. Aldrich SR., Scott WO., Long ER. (1975) Modern Corn Production. Second Edition. Champaign, IL: A. & L. publications.
7. Anonymous (1986) Stored-Grain Insects (USDA). *Agricultural Handbook* 500 p.
8. Arias VC., Dell'Orto Trivelli H. (1983) Distribución e importancia de los insectos que dañan granos y productos almacenados en Chile. FAO-INIA, Chile, Santiago. 67 p.
9. Arbogast RT. (1991) Beetles: Coleoptera. pp. 131-176. In: Gorha JR. (ed.), Ecology and Management of Food-Industry Pests. FDA Technical Bulletin 4. VA: Association of Analytical Chemists.
10. Barney RJ., Price BD., Sedlacek JD., Siddiqui M. (1995) Fungal species composition and abundance on stored corn as influenced by several management practices and maize weevil (coleóptera: *Curculionidae*). *Crop Protection* 14: 159-161
11. Bartolini R (1990). El maíz. In: Rodríguez del Rincón A. (ed.) ediciones Mundi-prensa. Madrid. España. pp 9.
12. Beadle GW. (1939) Teosinte and the origin of maize. *Journal of Heredity* 30: 245-247.
13. Bennett JW., Horowitz PC., Lee LS. (1979) Production of sclerotia by aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycologia* 71: 415-422.
14. Bezuidenhout SC., Gelderblom WCA., Gorst Allman CP., Horak RM., Marasas WFO., Spiteller G., Vleggaar R. (1988) Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *Journal of the Chemical Society* 743-745.
15. Bhatnagar D., Cleveland TE., Payne GA. (2000) *Aspergillus flavus*. In: Robinson RK., Batt CA., Patel PD. (eds.) Encyclopedia of Food Microbiology. London, Academic Press: 72-79.
16. Bern C., Hurburghn CR., Brumm TJ. (2013) Managing grain after harvest. Course Works, Agricultural and Biosystems Engineering Department, Iowa State University Bookstore.

17. Birren B., Denning D., Nierman B. (2004) Comparative analysis of an emerging fungal pathogen, *Aspergillus terreus*. Disponible en:
http://www.aspergillus.org.uk/indexhome.htm?secure/sequence_info/index.php~main
18. Bluma R, Landa M, Etcheverry M. (2009) Impact of volatile compounds generated by essential oils on *Aspergillus* section *Flavi* growth parameters and aflatoxin accumulation. *Journal of Science Food Agriculture* 89: 1473–1480.
19. Bousquet Y. (1990) Beetles associated with stored products Canada. *Canadian Government Publishing Centre*, Ottawa 189-192.
20. Brewbaker JL. (2003) Corn production in the tropics. The Hawaii experience. College of tropical agriculture and human resources University of Hawaii at Manoa. Disponible en:
<http://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/corn2003.pdf>.
21. Broggi LE., Pacin AM., Gasparovic A., Sacchi C., Rothermel A., Gallay A., y col., (2007) Natural occurrence of aflatoxins, deoxynivalenol, fumonisins and Zearalenone in maize from Entre Rios Province, Argentina. *Mycotoxin Research* 23: 59-64.
22. Broggi LE., Resnik SL., Pacin AM., González HHL., Cano G., Taglieri D. (2002) Distribution of fumonisins in dry milled corn fractions in Argentina. *Food Additives and Contaminants* 19: 465-469.
23. Bu'Lock JD. (1965) The biosynthesis of natural products. McGraw-Hill, NY. pp 535.
24. Calvo AM., Gardner HW., Keller NP. (2001) Genetic connection between fatty acids metabolism and sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Journal Biological Chemistry* 276: 25766-25774.
25. Casas G. (1989) Micología general. Primera edición. Ediciones de la UCV Caracas.
26. Casini C., Santajuliana M. (2012) Proyecto de eficiencia de cosecha, postcosecha de granos y agroindustria en origen. INTA (Instituto Nacional de Tecnología agropecuaria).
<http://www.cosechaypostcosecha.org/data/articulos/postcosecha/ControlPlagasGranosAlmacenados.asp>.
27. Chang PK., Ehrlich KC. (2010) What does genetic diversity of *Aspergillus flavus* tell us about *Aspergillus oryzae*? *International Journal of Food Microbiology* 138: 189–99.
28. Charm S. (2007) Food engineering applied to accommodate food regulations, quality and testing. *Alimentos Ciencia e Ingeniería* 16: 5-8.
29. Chulze S., Bertinetti C., Dalcerro A., Etcheverry M., Farnochi C., Torres A., y col., (1989) Incidence of aflatoxins, zearalenone and deoxynivalenol on corn in Argentina. *Mycotoxin Research* 5: 9-12.
30. Clavijo S., Perez Greiner G. (2003) Protección y sanidad vegetal: Insectos plagas del maíz. In: Fontana Nieves H., Gonzales Narváez C. (eds.) Sección 2. Cap 6. Fundación Polar. pp 345-358.
31. Código Alimentario Argentino (2002). Resolución 66/2002 y 344/2002. Resolución GMC N° 025/02. Apéndice.

32. Codner RC., Sargeant K., Yeo R. (1963) Production of aflatoxin by the culture of strains of *Aspergillus flavus oryzae* on sterilized peanuts. *Biotechnology and Bioengineering* 5: 185–192.
33. Cooke RC., Whipps JM. (1993) *Ecophysiology of fungi*. Cambridge, Blackwell Scientific publication, University Press.
34. Cortez-Madrigal H., Alatorre-Rosas R., Mora-Aguilera G., Bravo-Mojica H., Ortíz-García CF., Aceves-Navarro LA. (2003) Characterization of multispore and monospore isolates *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* for the management of *Toxoptera aurantii* in cocoa. *Biocontrol* 48: 321–334.
35. Cotton RT. (1956) *Pests of stored grain and grain products*. Minneapolis, MN, USA, Burgess Publishing.
36. Cotty PJ. (1989) Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology* 79: 808–814.
37. Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA). Estimation of Crop Production. Disponible en: <http://www.produccionmundialmaiz.com/>. Acceso: mayo 2014.
38. Devereau AD., Myhara R., Anderson C. (2002). Physical factors in post-harvest quality. In: Golob P., Farrell G., Orchard JE. (eds.) *Crop Post-Harvest: Science and Technology: Principles and Practice*, Volume 1. Ames, Iowa: Blackwell Science Ltd. pp. 62-92.
39. Diener UL., Cole RJ., Sanders TH., Payne GA., Lee LS., Klich MA. (1987) Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology* 25: 249-270.
40. Drummond J., Pinnock DE. (1990) Aflatoxin production by entomopathogenic isolates of *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 55: 332-336.
41. EFSA (2004). European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to aflatoxin B₁ as undesirable substance in animal feed. *EFSA Journal* 39: 1-27.
42. Etcheverry M., Nesci A., Barros G., Torres A., Chulze S. (1999) Occurrence of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxin B₁ in corn genotypes and corn meal in Argentina. *Mycopathologia* 37–41.
43. Fedorova ND., Khaldi N., Joarda VS., Maiti R., Amedeo P., y col., (2008) Genomic islands in the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Genetics* 4: e1000046
44. Fidas LS. (2002) Retrovirus, mycotoxins, immunosuppression and neurodegeneration. *Journal of Neurology* 35: 562-571.
45. Flannigan B. (1978) Primary contamination of barley and whist grain by storage fungi. *Transactions of the British of Mycological Society* 37-42.
46. Food and Drug Administration (FDA) (2009) *Defect Levels Hand book*. The Food Defect Action Levels. Levels of natural or unavoidable defects in foods that present no health hazards for humans.
<http://www.fda.gov/food/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidancedocuments/sanitation/ucm056174.htm#CHPTA>.

47. Frisvad JC., Samson RA., Smedsgaard J. (2004) *Emericella astellata*, a new producer of aflatoxin B₁, B₂ and sterigmatocystin. *Letters in Applied Microbiology* 38: 440-445.
48. Frisvad JC., Skouboe P., Samson RA. (2005) Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B₁, sterigmatocystin and 3-o-methyl sterigmatocystin, *Aspergillus rambelli* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 28: 442-453.
49. Frisvad JC., Thrane U., Samson RA., Pitt JI. (2006) Important mycotoxins and the fungi which produce them. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 571: 3-31.
50. Fundación agropecuaria para el desarrollo de Argentina (FADA). (2013) Contribución del maíz y su cadena al desarrollo regional. Una opción para lograr pleno empleo en Río Cuarto. Disponible en: <http://www.fundacionfada.org>
51. Fung F., Clark RF. (2004) Health effects of mycotoxins: a toxicological overview. *Clinical Toxicology* 42: 17-234.
52. Fussell B. (1992) The story of corn. New York, NY, USA, Alfred A. Knopp.
53. Galagan JE., Calvo SE., Cuomo C., Ma LJ., Wortman JR., y col., (2005) Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 438: 1105–1115.
54. Gams W., Samson RA. (1985) Tipification of *Aspergillus* and related teleomorph genera. In: Samson RA., Pitt JI. (eds.) *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics* 23-31 New York, Plenum Press.
55. Gams W., Christensen M., Onions AH., Pitt JI., Samson RA. (1985) Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In: Samson RA., Pitt JI. (eds.) *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics* 55-62 New York, USA: Plenum Press.
56. Garrido CE., Hernández Pezzani C., Pacin A. (2012) Mycotoxins occurrence in Argentina's maize (*Zea mays* L.), from 1999 to 2010. *Food Control* 25: 660-665.
57. Garzón JM., Vera ML. (2011) "Una Argentina Productiva, Competitiva y Federal. Cadena porcina", Documento de Trabajo N°89, IERAL de Fundación Mediterránea.
58. Geiser DM. (2008) Sexual structures in *Aspergillus*: morphology, importance and genomics. *Medical Mycology* 12: 1-6.
59. Gibson AM., Baranyi J., Pitt MJ., Eyles MJ., Roberts TA. (1994) Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *International Journal of Food Microbiology* 23: 419–431.
60. Gomez LA., Rodriguez JG., Poneleit CG., Blake, DF. (1982) Preference and utilization of maize endosperm variants by the rice weevil. *Journal of Economic Entomology* 75: 363-367.
61. González HHL., Martínez EJ., Pacin AM., Resnik SL., Sydenham EW. (1999) Natural co-occurrence of fumonisins, deoxynivalenol, zearalenone and aflatoxins in field trial corn in Argentina. *Food Additives and Contaminants* 16: 565-569.

62. Gonzalez HHL. (1995) Estudios de la distribución de la micoflora contaminante de maíz recién cosechado. Riesgo potencial de aparición de micotoxinas en la región maicera Argentina. [PhD thesis]. Univ. de Buenos Aires.
63. González HHL., Resnik SL., Boca RT., Marasas WFO. (1995) Mycoflora of Argentinian corn harvested in the main production área in 1990. *Mycopathologia* 130: 831-837.
64. González U. (1995). *El Maíz y su Conservación*. 1ª edición. 14-320, Trillas, Distrito Federal, México.
65. Griffin DM. (1982) Water and microbial stress. In: Alexander, M. (ed.) *Advances in Microbial Ecology*, Vol. 5. Plenum Publishing corporation, New York. pp. 91-136.
66. Guedes NMP., Guedes RNC., Campbell JF., Throne JE. (2010) Contest behaviour of maize weevil larvae when competing within seeds. *Animal Behaviour* 79: 281-289.
67. Hagstrum DW., Phillips TW., Cuperus G. (2012) *Stored Product protection*. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service. ISBN: 978-0-98550003-0-6.
68. Hagstrum DW. (2001) Immigration of insects into bins storing newly harvested wheat on 12 Kansas farms. *Journal of Stored Products Research* 37: 221-229.
69. Heathcote JG., Hibbert JR. (1978) *Aflatoxin: Chemical and biological aspects*. Elsevier Scientific, Amsterdam.
70. Hedayati MT., Pasqualotto AC., Warn PA., Bowyer P., Denning DW. (2007) *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* 153: 1677-1692.
71. Hernández C., Rodríguez Y., Niño Z., Pérez S. (2009) Efecto del Almacenamiento de Granos de Maíz (*Zea mays*) sobre la Calidad del Aceite Extraído. *Información Tecnológica* 20: 21-30.
72. Horn BW. (2005) colonization of wounded peanut sedes by soil fungi: selective for species from *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycologia* 97: 202-217
73. Horn, B. (1997) *Aspergillus caelatus*, a new species in section *Flavi*. *Mycotaxon* 56: 185-191.
74. Hsieh D., Lin M., Singh R. (1976) Biosynthesis of aflatoxin: conversion of norsolonic acid and other hypothetical intermediates into aflatoxin B₁. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24: 1170-1176.
75. Hussein HS., Brasel JM. (2001) Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167: 101-134.
76. International Agency for Research on Cancer (IARC). *Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Human*, Vol. 56, Lyon, France, 1993: 257-263. INDEC, Instituto Nacional de Estadística y Censos de la República Argentina. (2009). Disponible en: <http://www.indec.mecon.ar/>.

77. INTA, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria; *Calidad del Grano de Maíz* (2006) (en línea). http://www.produccionbovina.com/informacion_tecnica/suplementacion/80-grano_maiz.pdf.
78. Ito Y., Peterson SW., Wicklow DT., Goto T. (2001) *Aspergillus pseudotamarii*, new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycological Research* 105: 233–239.
79. Ito Y., Peterson, SW., Goto T (1999). Characters of aflatoxigenic fungi isolated from silk worm frass and tea field soil in Japan. *Mycotoxins* 49: 37-41.
80. James RR., Elzen GW. (2001) Antagonism between *Beauveria bassiana* and imidacloprid when combined for *Bemisia argentifolii* (Homoptera: *Aleyrodidae*) control. *Journal of Economical Entomology* 94: 357–361.
81. Jayashree T., Subramanyam C. (1999) Antiaflatoxigenic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. *Letters of Applied Microbiology* 28: 179–183
82. Jayas DS., White NDG. (2003) Storage and drying of grain in Canada: low cost approaches. *Food Control* 14: 255–261.
83. Jestoi M. (2008) Emerging Fusarium-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformine a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48: 21-49.
84. Jia F., Towes MD., Campbell JF., Ramaswamy SB. (2008) Survival and reproduction of lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: *Bostrichidae*) on flora associated with native habitats in Kansas. *Journal of Stored Products Research* 44: 366–372.
85. Jiménez H., Navarrete JL., Botello E. (2004) Estudio Numérico de la Convección Natural de Calor y Masa 2-D en Granos Almacenados en Silos Cilíndricos. *Agrociencia* 38: 325-342.
86. Kanaani H., Hargreaves Megan., Ristovski Z., Morawska L. (2008) Deposition rates of fungal spores in indoor environments, factors effecting them and comparison with non-biological aerosols. *Atmospheric Environment* 42: 7141-7154.
87. Klich MA., Pitt JI. (1988). Laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. CSIRO, Division of food research Sydney. Academic Press. Australia.
88. Klich MA. (2006) identification of clinically relevant aspergilli. *Medical Mycology* 44: 127-131.
89. Koehler PG. (April 2003). Pantry and Stored Food Pests. EDIS. Disponible en: <http://edis.ifas.ufl.edu/IG095>
90. Köppen R., Koch M., Siegel D., Merkel S., Maul R., Nehls I. (2010) Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86: 1595-1612.
91. Kozakiewicz Z. (1989) *Aspergillus* species on stored products. *Mycological Papers* 161, Wallingford, CAB International.
92. Kozakiewicz Z., Smith D. (1994) Physiology of *Aspergillus*. In: Smith JE. (ed.) *Aspergillus*. Plenum Press. pp. 23-38. New York, NY.
93. Krishnan S., Manavathu EK., Chandrasekar PH. (2009) *Aspergillus flavus*: an emerging non-fumigatus *Aspergillus* species of significance. *Mycoses* 52: 206–222.

94. Kumar V., Basu MS., Rajendran TP. (2008) Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. *Crop Protection* 27: 891-905.
95. Kurtzman CP., Horn BW., Hesseltine CW. (1987) *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Journal: Antonie van Leeuwenhoek* 53: 147-158.
96. Lacey J., Magan N. (1991) Fungi in cereals grains: their occurrence and water and temperature relationships. In: Chelkowsky J. (ed.) Cereal grain, mycotoxins, fungi and quality in drying and storage. *Developments in Food Science* 77-118. Elsevier, Amsterdam.
97. Lacey J., Hill ST., Edwards MA. (1980) Microorganisms in stored grain their enumeration and significance. *Tropical Stored Products* 39: 19-33.
98. Lathrop HF. (1914) Egg laying behavior of the rice weevil *Calandra oryzae* Linn. *Ohio National* 14: 321-328.
99. Lee, S. (1999) Low-temperature damp corn storage with and without Chemical preservatives. Doctoral (PhD) dissertation. The University of Guelph.
100. Leeson S., Diaz GJ., Summers JD. (1995) Poultry metabolic disorders and mycotoxins. *University Books*, Guelph, Ontario. pp 249- 280.
101. Machida M., Asai K., Sano M., Tanaka T., Kumagai T., y col., (2005) Genom sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* 438: 1157-1161.
102. Magan N., Rusell H., Cairns V., Aldred D. (2003) Post-harvest fungal ecology: impact of fungal growth and mycotoxins accumulation in stored grains. *European Journal of Plant Pathology* 109: 723-730.
103. Maier D., Adams EWH., Throne JE., Mason LJ. (1996) Temperature management of the maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: *Curculionidae*), in three locations in the United States. *Journal of Stored Products Research* 32: 255-273.
104. Marín S., Companys NE., Sanchis V., Ramos AJ., Magan N. (1998) Effect of water activity and temperature on competing abilities of common maize fungi. *Mycological Research* 120: 959-964.
105. Massey TE., Stewart JM., Daniels L. (1995) Biochemical and molecular aspects of mammalian susceptibility to Aflatoxin B, carcinogenicity. *Proceedings as Society for experimental biology and medicine* 208: 213-217.
106. McLean M., Dutton MF. (1995) Cellular interactions and metabolism of Aflatoxin: An update. *Pharmacology and Therapeutics* 65: 163-192.
107. Méndez MG., Solorza FJ., Velázquez DVM., Gómez MN., Paredes LO., Bello-Pérez LA. (2005) Composición Química y Caracterización Calorimétrica de Híbridos y Variedades de Maíz Cultivadas en México. *Agrociencia* 39: 267-274.
108. Miller JD. (1995) Fungi and mycotoxins in grain: Implications for stored product research. A review. *Journal of Stored Products Research* 31: 1-16.

109. Mills JT. (1986) Postharvest insect-fungus associations affecting seed deterioration. Pathological interactions affecting seed deterioration. CSSA. Special publication 12: 39-51.
110. Milton RF., Pawsey RK. (1988) Spoilage relating to the storage and transport of cereals and oil seeds. *International Journal of Food Microbiology* 7: 211-217.
111. Mngadi P., Goviden R. Odhav B. (2008). Co-occurring Mycotoxins in Animal Feeds. *African Journal of Biotechnology* 7: 2239-2243.
112. Moino Jr. A, Alves SB (1998) Efeito de Imidacloprid e Fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 27: 611-619.
113. Montross JE., Montross MD., Bakker-Arkema FW. (1999) Grain storage. In: Bakker-Arkema FW., Amirante DP., Ruiz-Altisent M., Studman CJ. (eds.) CIGR Hand Book of Agricultural Engineering. Volume IV. pp. 46-59. Agro-Processing Engineering. St. Joseph, Michigan, USA.
114. Moss MO. (1991) Mycology of cereal grain and cereal products. In: Chelkawski J. (ed.) Cereal Grain: Micotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage. Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam. pp. 23-51.
115. Murakami H. (1971) Classification of the koji mold. *Journal of General and Applied Microbiology* 17: 281-309.
116. Murakami H., Hayashi K., Ushijima S. (1982) Useful key characters separating three *Aspergillus* taxa: *A. sojae*, *A. parasiticus*, and *A. toxicarius*. *Journal of General and Applied Microbiology* 28: 55-60.
117. Neethirajan S., Karunakaran C., Jayas D., White N. (2007) Detection Techniques for Stored Product Insects in Grain. *Food Control* 18: 157-162.
118. Nesci A., Rodriguez M., Etcheverry M. (2003) Control of *Aspergillus* growth and aflatoxin production using antioxidants at different conditions of water activity and pH. *Journal of Applied Microbiology* 95: 279-287.
119. Nesci A. (2005) Comportamiento ecofisiológico de *Aspergillus* Sección *Flavi* en el agroecosistema de maíz. Estrategias de prevención químicas y biológicas [*PhD thesis*]. Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
120. Nesci A., Etcheverry M. (2006) Control of *Aspergillus* growth and aflatoxin production using natural maize phytochemicals under different conditions of water activity. *Pest Management Science* 62: 775-784.
121. Nesci A., Gsponer N., Etcheverry M. (2007) Natural maize phenolic acids for control of aflatoxigenic fungi on maize. *Journal of Food Science* 72: 180-185
122. Nesci A., Ferrari L., Etcheverry M. (2008) Effect of synthetic antioxidants on stored maize grain mycoflora *in situ*. *Journal of Science Food Agriculture* 88: 797-804.

123. Nesci A., Etcheverry M. (2009) Effect of natural maize phytochemicals on *Aspergillus* section *Flavi* sclerotia characteristics under different conditions of growth media and water potential. *Fungal Ecology* 2: 44–51
124. Nesci A., Marín S., Etcheverry M., Sanchis V. (2009) Natural maize phytochemicals for control of maize mycoflora and aflatoxigenic fungi. *World Mycotoxins Journal* 3: 305–312.
125. Nesci A., Barra P., Etcheverry M. (2011a) Integrated management of insect vectors of *Aspergillus flavus* in stored maize using synthetic antioxidants and natural phytochemicals. *Journal of Stored Products Research* 47: 231–237
126. Nesci A., Montemarani A., Passone MA., Etcheverry M. (2010b) Insecticidal activity of synthetic antioxidants, natural phytochemicals, and essential oils against an *Aspergillus* section *Flavi* vector (*Oryzaephilus surinamensis* L.) in microcosm. *Journal of Pest Science* 84: 107–115.
127. Newman C. (2003). *Grain Storage: Maintaining Grain Quality*, Farmnote 65: 1-4, Government of Australia, Department of Agriculture, Australia.
128. Nierman WC., Pain A., Anderson MJ., Wortman MJ., Kim SH., y col., (2005) Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 438: 1151–1156.
129. Okuda T., Klich MA., Seifert KA., Ando K. (2000) Media and incubation effects on morphological characteristics of *Penicillium* and *Aspergillus*. (2000). In: Samson RA., Pitt JI. (eds.) *Integration of Modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. 510. pp. 83-99
130. Olakojo SA., Akinlosotu TA. (2004) Comparative Study of Storage Methods of Maize Grains in South Western Nigeria. *African Journal of Biotechnology* 3: 362-365.
131. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) (1985) *Seca–aireación de granos*. Serie: Tecnología Postcosecha 5. Roma, Italia. 80 p.
132. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) (2001) *El maíz en los trópicos: mejoramiento y producción*. Roma, Italia.
133. Pacin AM., Broggi L., Resnik SL., González HHL. (2001) Mycoflora and Mycotoxins natural occurrence in corn from Entre Ríos Province, Argentina. *Mycotoxin Research* 17: 31-38.
134. Pacin AM., Ciancio Bovier E., González HHL., Whitechurch EM., Martínez EJ., Resnik SL. (2009) Fungal and fumonisins contamination in Argentine maize (*Zea mays* L.) Silo Bags. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 2778-2781.
135. Passone M., Bluma R., Nesci A., Resnik S., Etcheverry M. (2008) Impact of food grade antioxidants on peanut pods and seeds mycoflora in storage system from Córdoba, Argentina. *Journal of Food Safety* 28: 550–566.
136. Payne GA., Nierman WC., Wortman JR., Pritchard BL., Brown D., y col., (2006) Whole genome comparison of *Aspergillus flavus* and *A. oryzae*. *Medical Mycology* 44: 9–11.

137. Pel HJ., de Winde JH., Archer DB., Dyer PS., Hofmann G., y col., (2007) Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature Biotechnology* 25: 221–31.
138. Peraica M., Radic B., Lucic A., Pavlovic M. (1999) World Health Organization. Bulletin of the world health organization, Geneva.
139. Peterson SW. (2000) Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based upon rDNA sequence analysis. In: Samson RA, Pitt JI, (eds.) Classification of *Penicillium* and *Aspergillus*: integration of modern taxonomic methods. Reading, UK: Harwood Publishers. pp. 323–356.
140. Peterson SW., Ito Y., Horn BW., Goto T. (2001) *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia* 93: 689–703.
141. Pildain MB., Frisvad JC., Vaamonde G., Cabral D., Varga J., Samson RA. (2008) Two novel aflatoxin producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 725– 735.
142. Pitt JI., Hocking AD. (1997) Fungi and Food Spoilage. Blackie Academic and Professional, London UK.
143. Pitt JI., Samson RA. (1993) Species names in current use in the *Trichocomaceae* (Fungi, Eurotiales). *Regnum Vegetabile* 128: 13-57.
144. Pitt JI., Hocking AD. (1985). Fungi and Food Spoilage. Academic Press Inc; New York.
145. Polacheck I., Salkin IF., Schenhav D., Ofer L., Maggen M., Haines JH. (1989) Damage to an ancient parchment document by *Aspergillus*. *Mycopathologia* 106: 89–93.
146. Potter C. (1935) The biology and distribution of *Rhizopertha dominica* (Fab.) *Transactions of the Entomological Society of London* 83: 449-482.
147. Quintela ED, McCoy CW (1998) Synergistic effect of imidacloprid and two entomopathogenic fungi on the behavior and survival of larvae of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) in soil. *Journal of Economic Entomology* 91: 110-122.
148. Raper KB., Fennel DI. (1965) The genus *Aspergillus*. Baltimore: Williams & Wilkins. p. 686.
149. Resnik SL., Neira MS., Pacin A., Martinez E., Apro N., Latreite S. (1996) A survey of natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in Argentine field corn: 1983-1994. *Food Additives and Contaminants* 3: 115-120.
150. Richard JL. (2003). Mycotoxins and human disease. In: Anaissie EJ., McGinnis MR., Pfaller MA. (eds.) *Clinical Mycology*. Churchill Livingstone, New York. pp. 589–598.
151. Roebuck BD., Maxuitenko YY. (1994) Biochemical mechanisms and biological implications of the toxicity of Aflatoxins as related to aflatoxin carcinogenesis. In: Eaton DL., Groopman JD. (eds.) The toxicology of Aflatoxins. Human health, veterinary and agricultural significance. pp. 27-44. San Diego: Academic Press.
152. Rosas I., y col., (2007). Calidad Física y Fisiológica de Semilla de Maíz Criollo Almacenada en Silo Metálico y con Métodos Tradicionales en Oaxaca, México. *Fitotecnica Mexicana* 30: 69-78.

153. Ryan MF., Park T., Mertz DB. (1970) Flour beetles: responses to extracts of their own pupae. *Science* 170: 178-180.
154. Saito M., Tsuruta O. (1993) A new variety of *Aspergillus flavus* from tropical soil in Thailand and its aflatoxin productivity. *Proceedings of the Japanese Association of Mycotoxicology* 37: 31–36.
155. Samson RA. (1979). A compilation of the *Aspergilli* described since 1965. *Studies in Mycology* 18: 1-38.
156. Samson RA., Pitt JI. (1985) Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* Systematics. New York: Plenum Press. USA. pp. 483.
157. Samson RA., Pitt JI. (1990) Modern Concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. New York: Plenum Press. USA. pp. 478.
158. Samson, RA., Hoekstra ES., Frisvad JC., Filtenborg O. (2000). Introduction to Food and Airborne Fungi. 6th ed. Central Bureau voor Schimmel cultures (CBS), Utrecht, The Netherlands.
159. Sargeant K., Sheridan A., O'Kelly J., Carnaghan RBA. (1961) Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature* 192: 1096- 1097.
160. Sauer DB. (1988) Effects of fungal deterioration on grain: nutritional value, toxicity and germination. *International Journal of Food Microbiology* 7: 267-275
161. Scheidegger KA., Payne GA. (2003) Unlocking the secrets behind secondary metabolism: a review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. *Journal of Toxicology* 22: 423–459.
162. Schrader H. (1833) Index Seminum Hort Acad Gottingen 1832: 25-26. Disponible en: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?16116>.
163. Schröder HW. (1966) Effect of corn steep liquor on mycelial growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus*. *Applied Microbiology* 14: 381-385.
164. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGyP) (2014) Agricultura, Estimaciones Agrícolas, Campaña 2013-2014. Disponible en: <http://www.sagpya.gov.ar>.
165. Sharifi S., Mills RB. (1971) Radiographic studies of *Sitophilus zeamais* (Mots) in wheat kernels. *Journal of Stored Products Research* 7: 185-206.
166. Signorini ML., Gaggiotti M., Molineri A., Chiericatti CA., Zapata de Basílico ML., Basílico JC., Pisani M. (2012) Exposure assessment of mycotoxins in cow's milk in Argentina. *Food Chemistry Toxicology* 50: 250-257.
167. Simpanya MF., Allotey J., Mpuchane S. (2001) Insect and mycoflora interactions in maize flour. *African Journal of Food Agriculture Nutrition and Development* 1: 3–8.
168. Sinha RN., Wallace HAH. (1966) Ecology of insect induced hot spots in stored grain in Western Canada. *Researches on Population Ecology* 107-132.

169. Smith EH., Whitman RC. (1992) Field Guide to Structural Pests. *National Pest Management Association*, Dunn Loring, VA.
170. Solovey MMS., Somozat C., Cano G., Pacin A., Resnik S. (1999) A survey of fumonisins, deoxynivalenol, zearalenone and aflatoxins contamination in cornbased food products in Argentina. *Food Additives and Contaminants* 16: 325-329.
171. Stoll G. (1989) Protección natural de cultivos, basada en recursos locales en el trópico y subtrópico. *Tropical Agroecology* Vol. 1. Alemania. 184 p.
172. Sydenham EW., Shepard GS., Thiel PG., Marasas WFO., Rheeder JP., Peralta Sanhueza CE., y col., (1993) Fumonisin in Argentinian field trial corn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 891-895.
173. Tanada Y., Kaya HK. (1993) Insect pathology. Academic Press Inc, San Diego, pp 362: 575-576, 583
174. Tanaka A., Yamaguchi I. (1972) Dry matter production, yield components and grain yield of the maize plant. *Faculty of Agriculture of Hokkaido* 71-132.
175. Thom C., Church M. (1926) The Aspergilli (Baltimore: Williams & Wilkins).
176. Throne J. (1994) Life history of immature maize weevils (Coleoptera: *Curculionidae*) on corn stored at constant temperatures and relative humidities in the laboratory. *Environmental Entomology* 23: 1459-1471.
177. Toews MD., Campbell JF., Arthur FH., Ramaswamy SB. (2006) Outdoor flight activity and immigration of *Rhyzopertha dominica* into seed wheat warehouses. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 121: 73-85.
178. Torzilli AP., Isbister JD. (1994) Comparison of coal solubilization by bacteria and fungi. *Biodegradation* 5: 55-62.
179. Valdivia AG. (1998) Sustancias potencialmente tóxicas en los alimentos. In: Acevedo S., Lamas J. (eds.) Curso de toxicología ambiental. pp. 204-222. Aguascalientes, México: UUA, SEDESOL, SEMARNAP e INE.
180. Varga J., Rigó K., Tóth B., Téren J., Kozakiewicz Z. (2003) Evolutionary relationships among aspergillus species producing economically important mycotoxins. *Food Technology and Biotechnology* 41: 29-36
181. Varga J., Frisvad JC., Samson RA. (2011) Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Studies in Mycology* 69: 57-80.
182. Via S. (1999) Cannibalism facilitates the use of a novel environment in the flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Heredity* 82: 267-275.
183. Volenik M., y col., (2007). Influence of Relative Humidity and Temperature on the Changes in Grain Moisture in Stored Soybean and Maize. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 72: 215-219.

184. Vujanovic V., Smoragiewicz W., Krzysztyniak K. (2001) Airborne fungal ecological niche determination as one of the possibilities for indirect mycotoxin risk assessment in indoor air. *Environmental Toxicology* 16: 1–8.
185. Wagacha JM., Muthomi JW. (2008) Mycotoxin Problem in Africa: Current Status, Implications to Food Safety and Health and Possible Management Strategies. *International Journal of Food Microbiology* 124: 1-12.
186. Wallace HAH., Sinha RN. (1981) Causal factors operative in distributional patterns and abundance of fungi: a multivariate study. In: Wicklow DT., Carroll GC. (eds.) *The Fungal Community Its Organization and Role in ecosystems*. New York: Marcel Dekker Inc. pp. 233-247.
187. Walter VE. (1990) Stored product pests. In: Story K., Moreland D. (eds.) *Handbook of Pest Control*. Franzak & Foster Co., Cleveland, OH. pp. 526-529.
188. Watson SA. (1988) Corn marketing, processing and utilization. In: Sprague GF., Dudley JW., (eds.) *Corn and corn improvement*. pp. 882-940. Madison WI, USA, American Society of Agronomy.
189. Weston PA., Rattlingourd PL. (2000) Progeny production by *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) on maize previously infested by *Sitotroga cerealla* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Economic Entomology* 93: 533-536.
190. White NDG., Sinha RN. (1980) Changes in stored-wheat ecosystems infested with two combinations of insect species. *Canadian Journal of Zoology* 58: 1524–1534.
191. White NDG. (1995) Insects, mites and insecticides in stored-grain ecosystems. In: Jayas P., White NDG., Muir WE. (eds.) *Stored grain ecosystems*. Marcel Dekker, New York. pp. 123–167.
192. Wicklow DT. (1995) The mycology of stored grain: an ecological perspective. In: Jayas DS., White NDG., Muir WE. (eds.) *Stored-Grain Ecosystems*. Marcel Dekker. pp. 197-249.
193. Wicklow DT. (1990) Adaptation in *Aspergillus flavus*. *Transactions of Mycological Sociation of Japan* 31: 511-523.
194. Wilkinson HH., Ramaswamy A., Sim CS., Keller NP. (2004) Increased conidiation associated with progression along the sterigmatocystin biosynthetic pathway. *Micologia* 96: 1190-1198.
195. Willis ER., Roth LM. (1950) The attraction of *Tribolium castaneum* to flour. *Journal of Economic Entomology* 43: 927.

Hipótesis

Conociendo que muchos insectos, además de dañar los granos, llevan internamente *Aspergillus* Sección *Flavi* y son importantes agentes que facilitarían el incremento de los niveles de aflatoxinas en el almacenamiento, debemos implementar estrategias para minimizar su impacto negativo.

Hipótesis

El uso combinado de diferentes métodos, como el empleo de agentes de control biológico de insectos vectores de hongos aflatoxicogénicos sumado al uso de agentes químicos sintéticos y/o naturales en dosis subletales, podrían contribuir a la reducción de la contaminación con aflatoxinas en el maíz almacenado.

Objetivo general

Probar insecticidas biológicos autóctonos sobre insectos plaga vectores de hongos aflatoxicogénicos en el agroecosistema de almacenamiento de maíz, evaluando la compatibilidad con sustancias insecticidas naturales y/o sintéticas para disminuir el impacto de la contaminación aflatoxicogénica.

Sección I

Aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos. Su evaluación contra *Tribolium confusum*, *Sitophilus zeamais* y *Rhizopertha dominica* en maíz almacenado.

Generalidades

Con más de un millón de especies, los insectos no solo son la población animal con el mayor número de individuos, sino también un grupo que causa el mayor daño en el manejo agroforestal. Por lo tanto es importante comprender la biología de sus enemigos naturales. Entre ellos se encuentran los hongos entomopatógenos, este tipo de hongos se caracteriza por ser un grupo muy heterogéneo. Pertenecen a diferentes grupos sistemáticos e incluso su biología es a menudo muy diferente. Sin embargo, todos ellos son patógenos de insectos, por lo que su eficacia para infectar a sus huéspedes es tan grande que puede convertirse en un factor de regulación de la abundancia de insectos (Augustyniuk-Kram y Kram 2012). Mientras que muchos hongos entomopatógenos importantes tienen caracteres diagnósticos que los hacen rápidamente identificables, una gran cantidad han sido documentados a raíz de una rigurosa revisión taxonómica que ha transformado la clasificación de estos hongos (James y col., 2006; Hibbett y col., 2007) provocando cambios profundos para muchos de los principales taxones. Este tipo de hongos incluye desde los que producen conidios que son los hongos entomopatógenos comúnmente más encontrados, moviéndose a través de los *Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, *Zygomycetes*, *Peronosporomycetes* y *Chytridiomycetes* que son cada vez menos frecuentes y pueden tener rangos de huéspedes más limitados.

Principales grupos de hongos entomopatógenos

Blastocladiomycete y *Peronosporomycete*

Estos organismos filogenéticamente diferentes producen zoosporas uni o biflageladas como unidades de dispersión infecciosas. Las zoosporas flageladas pueden ser liberadas a partir de dos tipos posibles de esporangios, los de paredes delgadas o gruesas. Es poco común detectar huéspedes infectados por estos hongos durante sus estadios vegetativos; en general sólo se detectan cuando los esporangios se han formado o están liberando zoosporas. Los *Oomicetos* ya no son aceptados como verdaderos hongos (aunque todavía son estudiados por los micólogos), desde hace unos años están clasificados como "pseudohongos" en el reino que se refiere a organismos tan diversos como *Chromista* o *Straminipila* (Alexopoulos y col., 1996; Dick 2001).

Entomophthorales

La reclasificación filogenética de hongos (James y col., 2006; Hibbett y col., 2007) validó lo que algunos micólogos afirmaron durante mucho tiempo, que el phylum *Zygomycota* era un

conjunto heterogéneo. La nueva clasificación filogenética rechazó este phylum, reubicando los *Zygomycetes* micorríticos en un nuevo phylum *Glomeromycota*, y distribuyó los restantes *Zygomycetes* en nuevos subphylum *Entomophthoromycotina*, *Kickxellomycotina*, *Mucormycotina* y *Zoopagomycotina* sin asignar estos taxones a ningún phylum. En función de futuras investigaciones, cada uno de estos subphylum pueden ser reconocidos como un nuevo phylum (o parcialmente re combinado en otro nuevo phylum), pero ninguno de sus taxones pertenecen a *Glomeromycota*. Los *Entomophthorales* comprenden los entomopatógenos *Zygomycetes* más significativos. Los únicos otros *Zygomycetes* asociados a los artrópodos son los tricomycetos endocomensales (término utilizado de forma descriptiva y no taxonómica) en los intestinos de los insectos y los crustáceos (Lichtwardt y col., 2001). La taxonomía de los *Entomophthorales* se basa principalmente en los conidios primarios (y secundarios) que son sus principales unidades infectivas; de este grupo de esporas de resistencia de paredes gruesas, zygosporas o azygosporas (que sólo las diferencia si se produce o no una conjugación gametangial, respectivamente, antes que se produzcan) por lo general tienen poco valor taxonómico, excepto en el rango de familia (Humber 1989). Después de un importante y largo debate sobre la taxonomía familiar y genérica de los *Entomophthorales* (resumidos en Humber 1981; 1989), el más ampliamente aceptado y utilizado en taxonomía actual para este fin reconoce seis familias dentro de este orden (Humber 1989), al menos dos de las cuales (*Neozygiteae* y *Entomophthoraceae*) son patógenos para los artrópodos.

Basidiomycetes

El mundo de los *Basidiomycetes* entomopatógenos es muy pequeño en comparación con la rica diversidad de *Entomophthorales* y *Ascomycetes* que afectan insectos y otros invertebrados. Hay una gran diversidad de *Basidiomycetes* que utilizan los nematodos como fuentes de nutrientes alternativas. Los únicos agentes patógenos o parásitos *Basidiomycetes* asociados con los insectos son los hongos-roya como *Septobasidiales*, y especialmente las decenas de especies de *Septobasidium* (Couch, 1938). El conocimiento global de estos hongos depende en gran medida de Couch (1938); sin embargo hubo importantes estudios posteriores sobre este género que incluyen los de Azéma (1975) y la validación de Couch (1938) por Gómez y Henk (2004) con muchas especies nuevas. La mención de *Basidiomycetes* antes de los hongos *Ascomycetes* puede sorprender, pero la reciente reevaluación filogenética de los hongos (James y col., 2006) indica claramente que la *Basidiomycota* precedió a la *Ascomycota*.

Ascomycetes

Una gran diversidad de hongos *Ascomycetes*, están asociados de manera obligada a insectos y otros artrópodos huéspedes, aunque los taxones patógenos/parásitos no están

distribuidos de manera uniforme dentro del phylum *Ascomycota*. Los más diversos *Ascomycetes* entomopatógenos son los ectoparásitos *Laboulbeniomyces* (Tavares 1985), este grupo comprende más de 2000 especies en más de 140 géneros. Entre los *Ascomycetes* bitunicados denominados anteriormente *Loculoascomycetes*, (ahora *Dothideomycetes*) *Myriangium* y *Podonectria* se encuentran entre los géneros menos comunes que atacan a los insectos. El mayor número y diversidad de formas sexuales y conidios de ascomicetes entomopatógenos se ubican en el orden *Hypocreales* (*Sordariomycetes*: anteriormente clase *Pyrenomycetes*). La gran mayoría de estos hongos son asignados a tres familias: *Clavicipitaceae*, *Cordycipitaceae* y *Ophiocordycipitaceae* (recientemente dividida de la familia *Clavicipitaceae* por motivos filogenéticos (Sung y col., 2007)). Se encuentra entre estos taxones *Clavicipitoid* donde se incluyen todos los principales entomopatógenos conidiales, así como los centenares de especies descritas originalmente en *Cordyceps*. La mayoría de los hongos que son entomopatógenos productores de conidios se ubican en las clasificaciones existentes de *Ascomycota*, sin embargo las mayores incertidumbres taxonómicas involucran géneros que ahora se sabe que son filogenéticamente heterogéneos, con sus conceptos genéricos tradicionales, incluyendo hongos compatibles a dos o más órdenes o familias diferentes.

Samson (1974) reconoció dos secciones en *Paecilomyces*, las especies dentro de la Sección *Paecilomyces* eran anamorfos de ascomicetes productores de cleistotecios (*Eurotiomycetes*: *Eurotiales*), no entomopatógenos y teleomorfos de la clase *Plectomycetes* (*Byssochlamys*, etc.). Mientras que los entomopatógenos que fueron localizados en *Paecilomyces* Sección *Isarioidea* eran todos entomopatógenos, anamorfos de *Ascomycetes* productores de peritecios en las familias *Clavicipitoid* de *Hypocreales* (Luangsa-ard y col., 2004) y teleomorfos de la clase *Pyrenomycetes*. Luangsa-ard y col., (2005) reclasificaron la mayoría de estas especies en *Cordycipitaceae* en el género *Isaria*, las pocas especies residuales de la Sección *Isarioidea* fueron asignadas en la familia *Clavicipitaceae* (*Paecilomyces carneus*, *P. marquandii*) y *Ophiocordycipitaceae* (*Paecilomyces lilacinus*) (tablas I.1 y I.2). Muchas todavía se conocen como especies *Paecilomyces* pero ya existen registros de reclasificación, *Paecilomyces lilacinus* fue reasignada recientemente como la única especie de un nuevo género *Purpureocillium* (Luangsa-ard y col., 2011).

Biología de los hongos entomopatógenos

La mayoría de los hongos entomopatógenos, si no todos, tienen ciclos de vida que se sincronizan con etapas en el insecto huésped y de vida libre (Shah y Pell 2003), siendo un componente importante y generalizado de la mayoría los ecosistemas terrestres. Por supuesto, la propagación de especies individuales es diferente. Sin embargo algunos de ellos se pueden encontrar prácticamente en todo el mundo (Augustyniuk-Kram y Kram 2012). Los

Entomophthorales suelen informarse como patógenos de plagas forestales en hábitats de bosques templados (Burges 1981), pero son poco frecuentes en los bosques tropicales (Evans 1982). Los bosques húmedos tropicales tienen una biota de hongos patógenos de insectos rica y variada, y la gran mayoría de las especies pertenecen al género *Cordyceps* (*Ascomycota: Hypocreales*) (Evans 1982; Aung y col., 2008). Mientras que otras especies de *Hypocreales* tales como *Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria* y *Paecilomyces* son los hongos dominantes que se encuentran en los insectos del suelo (Samson y col., 1988; Keller y Zimmerman 1989). A pesar de que *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* son comunes en muchos hábitats, se conoce que *B. bassiana* es muy sensible a los efectos de perturbación de los cultivos y por lo tanto su presencia es restringida a los hábitats naturales. Por el contrario, se conoce la capacidad de *M. anisopliae* para persistir en los suelos cultivados (Rath y col., 1992; Vanninen 1995; Quesada-Moraga y col., 2007; Sánchez-Peña y col., 2011). La literatura muestra que la frecuencia de hongos entomopatógenos en suelos de cultivos intensivos es menor que en los suelos forestales (Vanninen y col., 1989; Miętkiewski y col., 1991; Vanninen 1995; Chandler y col., 1997; Bałazy 2004). En comparación con las zonas agrícolas la diversidad de hongos entomopatógenos en los bosques templados es más importante (Sosnowska y col., 2004).

Ciclo de infección.

Los ciclos de vida de *Hypocreales* y *Entomophthorales* son ligeramente diferentes. Sin embargo, la supervivencia y la propagación en el medio ambiente de ambos grupos es dependiente de la infección del huésped que invariablemente conduce a su muerte. El ciclo de vida del hongo entomopatógeno consiste en una fase parasitaria (por infección del huésped hasta su muerte) y una fase saprofita (después de la muerte del huésped) (Augustyniuk-Kram y Kram 2012).

En contraste con otros entomopatógenos (bacterias y virus), que entran en los insectos con los alimentos, los hongos entomopatógenos infectan a su huésped a través de la cutícula externa. El proceso de infección implica: la adhesión de la espora en la cutícula de los insectos, la penetración de la cutícula por el tubo germinal, el desarrollo del hongo en el interior del cuerpo del insecto y la colonización del hemocele por hifas del hongo. Las esporas generalmente están cubiertas con una capa de mucus compuesta de proteínas y glucanos, lo que facilita su adhesión a la cutícula del insecto. Las esporas una vez germinadas producen estructuras especializadas llamadas apresorios. El apresorio es responsable de la unión de las esporas germinadas a la superficie epicuticular. El proceso de penetración de la cutícula de los insectos es un resultado de la presión mecánica y la actividad enzimática del tubo germinal. Una vez en el interior del cuerpo del insecto el hongo entomopatógeno crece como propágulos levaduriformes (blastosporas), partes de hifas o protoplastos que carecen de una pared celular. Estas estructuras se extienden a través del hemocele. La muerte del insecto es generalmente

resultado de un daño mecánico causado por el crecimiento de micelio fúngico en el interior del insecto (momificación) o por toxinas producidas y liberadas por el patógeno. *Beauveria*, *Metarhizium* y *Tolypocladium* son conocidos por secretar una amplia gama de toxinas. Algunas de ellas como destruxinas, beauvericina y efrapeptinas se conocen completamente su estructura química, su acción y su contribución en el proceso de patogénesis (Roberts 1981; Hajek y St. Leger 1994; Hajek y Shimazu 1996). Después de la muerte del insecto huésped, el hongo coloniza el cadáver y durante 2-3 días forma hifas aéreas para luego esporular (figura I.1). En condiciones apropiadas, en particular una alta humedad relativa (HR), el hongo romperá la cutícula del insecto, diseminando esporas aéreas. Esto puede permitir la transmisión horizontal o vertical de la enfermedad dentro de la población de insectos. Estas esporas producidas dentro del insecto muerto permiten que el hongo sobreviva durante largos períodos de tiempo en condiciones adversas (Samson y col., 1988). La dispersión de las esporas se produce por el viento. Los hongos del orden *Hypocreales* también pueden sobrevivir en el medio ambiente (si no colonizan un nuevo huésped), en cadáveres momificados o como conidios libres en el suelo (Hajek y St. Leger 1994; Hajek y Shimazu 1996).

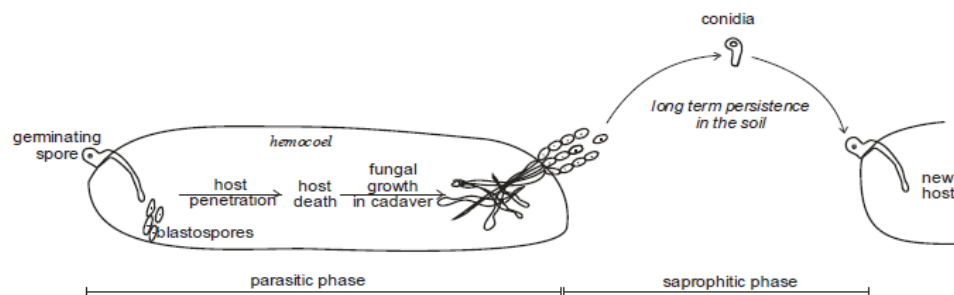


Figura I. 1. Ciclo de vida de hongos entomopatógenos del orden *Hypocreales* (Augustyniuk-Kram y Kram 2012).

Mientras que los hongos que se agrupan en el orden *Hypocreales* producen sólo esporas asexuales, las especies del orden *Entomophthorales* producen dos tipos de esporas: asexuales (conidios primarios) y sexuales (zygo o azygosporas) llamadas esporas de resistencia. Los conidios del orden *Hypocreales* y los conidios primarios del orden *Entomophthorales* se producen externamente en la superficie del insecto después de su colonización y la muerte. Estas esporas de resistencia le brindan una ventaja adaptativa a los patógenos cuando los insectos huéspedes son pocos y/o las condiciones ambientales son desfavorables. Estas esporas pueden surgir de la meiosis (zygosporas) o mitosis (azygosporas) y persistir en el suelo durante largos períodos de tiempo (Wilding y Brady 1984; Glare y Milner 1991). Sin embargo existen especies que no producen esporas de resistencia. No obstante, el mecanismo por el cual sortean las condiciones ambientales desfavorables sería por inclusión de cuerpos esféricos de hifas dentro de cadáveres de insectos, producción de conidios de pared gruesa

(loricoconidios) en el suelo, o por ciclos entre pequeñas poblaciones de huéspedes invernantes (Feng y col., 1991; 1992; Nielsen y col., 1998). Los hongos que no producen esporas sexuales también pueden formar estructuras de hibernación basadas en hifas comprimidas (esclerocios) o esporas de resistencia de paredes gruesas (clamidosporas).

Género *Paecilomyces*

Se conocen cerca de 700 especies de hongos entomopatógenos agrupadas en 100 órdenes. Muchos de ellos se ubican principalmente en dos órdenes: *Entomophthorales* dentro del phylum *Glomeromycota* e *Hypocreales* en el phylum *Ascomycota* (Hibbett y col., 2007; Sung y col., 2007). Estudios filogenéticos recientes permitieron una reclasificación de muchas especies. Por ejemplo, especies como *Paecilomyces farinosus* y *P. fumosoroseus* pertenecen actualmente al género *Isaria* (Luangsa-ard y col., 2004) y especies como *Verticillium lecanii* al género *Lecanicillium* (Zare y Gams 2001). Además se determinó que *P. lilacinus* no debía incluirse en el género *Paecilomyces*, el cual está muy bien representado por el hongo termófilo y a menudo patógeno *Paecilomyces variotii*, se propone entonces el nuevo género denominado *Purpureocillium* y posteriormente se acepta la combinación *Purpureocillium lilacinum* (Luangsa-ard y col., 2011).

Entre los grandes cambios taxonómicos que afectan a los hongos entomopatógenos, los más importantes y de mayor alcance involucran a los ascomycetes y su estado conidial (anamórfico) clasificados dentro de la clase *Pyrenomycetes* del orden *Hypocreales*. Uno de los primeros cambios que se observaron fue en los entomopatógenos cuyos ascos se producen en peritecios (cuerpos fructíferos) ubicados en la antigua clase *Pyrenomycetes*, nombre basado en la morfología del cuerpo fructífero, ahora se ubican en la clase *Sordariomycetes*, un nombre basado en una denominación genérica. La mayoría de estos hongos han sido reconocidos en la familia *Clavicipitaceae* (principalmente los géneros *Cordyceps*, *Torrubiella* o *Hypocrella*). Una reclasificación filogenética ha dividido a la familia *Clavicipitaceae* en tres (Sung y col., 2007) con una reelaboración importante de la taxonomía de *Cordyceps* y posteriormente una reorganización de los estados anamórficos entre estas familias.

Tabla I.1. Resumen de los principales géneros teleomorfos (sexual) y anamorfos (asexual) patógenos de invertebrados del Phylum *Hypocreales* (Sung y col., 2007).

Familia			
	<i>Clavicipitaceae</i>	<i>Cordycipitaceae</i>	<i>Ophiocordycipitaceae</i>
Teleomorfo	<i>Hypocrella</i> , <i>Metacordyceps</i> , <i>Regiocrella</i> , <i>Torrubiella</i>	<i>Cordyceps s. str.</i> , <i>Torrubiella</i>	<i>Ophiocordyceps</i> , <i>Elaphocordyceps</i>
Anamorfo	<i>Aschersonia</i> , <i>Metarhizium</i> ,	<i>Beauveria</i> , <i>Engyodontium</i> , <i>Isaria</i> ,	<i>Haptocillium</i> , <i>Harposporium</i>

<i>Nomuraea</i> , <i>Paecilomyces-like</i> ¹ <i>Pochonia</i> , <i>Rotiferophthora</i> , <i>Verticillium-like</i> ²	<i>Lecanicillium</i> , <i>Mariannaea-like</i> <i>Microhilum</i> , <i>Simplicillium</i>	<i>Hirsutella</i> , <i>Hymenostilbe</i> , <i>Paecilomyces-like</i> ¹ , <i>Paraisaria</i> , <i>Sorospora</i> , <i>Syngliocladium</i> <i>Tolypocladium</i> , <i>Verticillium-like</i> ²
--	---	---

¹Especies anteriormente en *Paecilomyces* Sec. *Isarioidea*, ahora excluidos de *Paecilomyces* propiamente dichos pero también de *Isaria*.

²Especies anteriormente en *Verticillium* Sec. *Prostrata*, ahora excluidos de *Verticillium* propiamente dichos, pero aún no reclasificado en los géneros reconocidos por Zare y col., 2000; 2001; Sung y col., 2001; Gams y Zare 2001.

Tabla I. 2. Clasificación filogenética actual dentro de *Hypocreales* de especies anteriormente clasificadas en *Paecilomyces* Sec. *Isarioidea* (Luangsa-ar y col., 2005; Sung y col., 2007).

Familia	Género	Especies incluidas
<i>Clavicipitaceae</i>	<i>Paecilomyces</i> ¹	<i>carneus</i> , <i>marquandii</i>
<i>Cordycipitaceae</i>	<i>Isaria</i>	<i>amoenorosea</i> , <i>cateniannulata</i> , <i>cateniobliqua</i> , <i>cicadae</i> , <i>coleopterora</i> , <i>farinosa</i> , <i>fumosorosea</i> , <i>ghanensis</i> , <i>tenuipes</i>
<i>Ophiocordycipitaceae</i>	<i>Paecilomyces</i> ¹	<i>lilacinus</i>

¹No hay nuevas asignaciones genéricas para el resto de los hipocreales anamórficos. Estos hongos por defecto deben ser tratados como *Paecilomyces* con carácter provisorio. Las afinidades genéricas de otras especies "Paecilomyces" excluidas observadas por Luangsa-ard y col., (2005) siguen siendo inciertas.

El análisis filogenético de la región del gen 18S ARNr confirma los datos de Luangsa-ard y col., (2004), mostrando la naturaleza polifilética de *Paecilomyces*. La especie tipo, *Paecilomyces variotii*, se encuentra en la familia *Trichocomaceae* (Eurotiales) cerca de *Aspergillus*, *Penicillium* y especies relacionadas, formando un grupo relacionado con los *Onygenales*. Por otro lado, *P. lilacinus* pertenece a la *Ophiocordycipitaceae*, una familia recientemente introducida por Sung y col., (2007). La especie de esporas púrpuras *Paecilomyces marquandii* es fenotípicamente similar a *P. lilacinus*, pero difiere con el grupo de *P. lilacinus* en el análisis filogenético utilizando la región de genes 18S ARNr y las especies de esporas verdes dentro de la familia de *Clavicipitaceae*. Un detallado análisis filogenético mostró que la especie *Paecilomyces* color púrpura, *P. lilacinus*, *Isaria takamizusanensis* y *Nomuraea atypicola* están estrechamente relacionadas (Sung y col., 2007; Luangsa-ard y col., 2011) y tienen idéntica secuencia parcial 18S. Ninguna de estas especies puede incluirse en algún género ya definido, lo que justifica la introducción del nuevo género *Purpureocillium* para ellas. Fenotípicamente *Paecilomyces sensu stricto* (s. str.) (*P. variotii*) puede ser diferenciada de *Purpureocillium* por su rápido crecimiento en medios agarizados. Especies que pertenecen a *Paecilomyces s. str.* tienen temperaturas de crecimiento óptima y máxima más altas (30-45°C) en comparación con *Purpureocillium* (25-33°C). Además, el color de conidios de *Paecilomyces*

s. str. es marrón oliva y frecuentemente forma clamidosporas, mientras que los conidios de *Purpureocillium* son de color lila y no forman clamidosporas.

Samson (1974) consideró a *P. lilacinus* y *P. marquandii* como especies muy cercanas una de otra, a partir de la morfología general y el color de las esporas. No obstante, *P. marquandii* difiere de *P. lilacinum* por sus conidióforos hialinos y el reverso de color amarillo típico, por lo que, aunque ambas especies tienen una morfología similar, las filogenias mostraron que se separan en dos familias del orden *Hypocreales*.

Las colonias de *Paecilomyces* en agar extracto de malta presentan crecimiento moderado a rápido y consisten de un micelio basal o costroso compacto con numerosos conidióforos que provocan un crecimiento flocoso, con excesivo micelio aéreo. Las colonias son blancas al comienzo convirtiéndose en rosa y después lila cuando inicia la esporulación. El reverso es, por lo general, morado, amarillo o incoloro. Los conidióforos derivan de hifas sumergidas, mononematoso, rígido, verticilado, con fiálides ovales o cilíndricas con cuello característico y densamente agrupados formando verticilos de ramas y fiálides cilíndricas con o sin cuellos muy cortos. Los conidios se presentan en cadenas divergentes, rectas o ligeramente curvas, elipsoidales a fusiformes, ligeramente rugosas hialinas y de color púrpura cuando se ven agrupadas (Luangsa-ard y col., 2011).

Purpureocillium lilacinum

La designación del género *Purpureocillium* surge del color púrpura característico de los conidios de la especie tipo *Purpureocillium lilacinum*.

Purpureocillium es un género fúngico de la división *Ascomycota*, clase *Sordariomycetes*, orden *Hypocreales*, dentro de la familia *Ophiocordycipitaceae*. La especie *P. lilacinum* fue descrita por primera vez por (Thom) Luangsa-ard, Hou-Braken, Hywel-Jones and Samson (2011), sin embargo puede encontrarse en la bibliografía como sinónimo de *Paecillium*, *Penicillium lilacinum* (Thom) (1919); *Paecilomyces lilacinus* (Thom) (1974); *Paecilomyces nostocoides* (1983). Las colonias en agar extracto de malta (MEA) presentan crecimiento rápido, alcanzando diámetros de 25-35 mm después de 7 días de incubación a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y no desarrollan o crecen muy lentamente a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ (0-10 mm). Las colonias presentan crecimiento pegado al medio de cultivo y pueden o no tener micelio aéreo flocoso. Algunas cepas pueden ser muy flocosas, de color blanco en los primeros estadios de crecimiento, adquiriendo luego una tonalidad vinacea; el reverso en tonos morados o, a veces, incoloro. Los conidióforos surgen de hifas de 4-6 mm de largo, en ocasiones formando synnemata suelta hasta de 2 mm de alto (una estructura de transporte de esporas formada por conidióforos compactados), tallos con gruesas paredes rugosas de 3-4 μm de ancho formado por ramas verticiladas con espirales entre dos y cuatro fiálides. Las fiálides de 6-9 x 2,5-3 μm , presentan una porción basal hinchada que se estrecha en un cuello corto de alrededor de 1 μm de ancho.

Los conidios se observan en cadenas divergentes, elipsoidales a fusiformes, de paredes lisas a ligeramente rugosas, hialinos, no obstante se los ve color púrpura cuando están aglomerados, 2-3 x 2-4 μm . También existen estructuras conidiales atípicas: fiálides solitarias o en verticilos, 2-4, de longitud variable; fiálides con formas típicas de *P. lilacinum* o muy largas (más de 30 μm) tipo *Acremonium*. Conidios cilíndricos, en ocasiones ligeramente curvos, formando cabezas viscosas sobre estas estructuras tipo *Acremonium*. Estos conidios son variables en tamaño, 2,0-1,4 x 1,5-2,5 μm (figura I.2). Este tipo de conidiogénesis fue observado por Okada y col., (1995) para *P. nostocoides*. No produce clamidosporas.

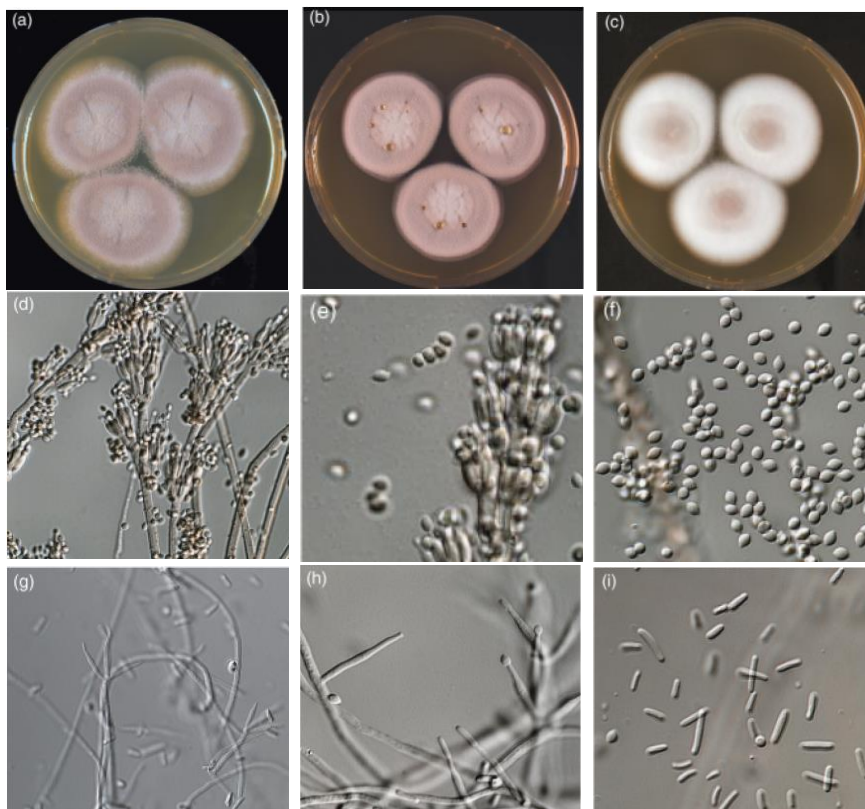


Figura I.2. *Purpureocillium lilacinum*. (a-c) cultivo en MEA de 14 días de incubación. (a) y (b) colonias típicas esporuladas y (c) colonia flocosa. (d y e) conidióforos bien definidos. (f) conidios fusiforme típico. (g y h) conidióforo tipo *Acremonium*. (i) conidios cilíndricos.

Aislar e identificar hongos entomopatógenos nativos, a partir de diferentes componentes del agroecosistema de maíz. Evaluar su virulencia contra *Tribolium confusum*, *Rhizopertha dominica* y *Sitophilus zeamais*, tres insectos plaga de maíz almacenado, vectores de hongos aflatoxicogénicos.

1. Aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos.

1.1. Delimitación de la zona de muestreo.

Las muestras de suelo se obtuvieron de un campo experimental perteneciente a la Universidad Nacional de Río Cuarto, en Río Cuarto, Córdoba, Argentina (30° 57' de latitud Sur, 64° 50' de longitud Oeste, 562 m de altitud) durante la temporada de cultivo de maíz 2009-2010. El suelo posee una textura franco-arenosa (pH 6,1 en agua 1:1 v/v, materia orgánica 1,4%, 86 ppm de nitratos) (Kraus y col., 1999).

1.2. Recolección de muestras de suelo.

El muestreo se realizó durante los primeros 20 días de desarrollo de la cosecha de maíz. Fueron recolectadas cincuenta muestras de suelo no rizosférico. Cada una de las muestras fue tomada a partir de los 3 cm superiores del suelo en diferentes sitios dentro del campo. El diagrama de toma de muestra consistió en el trazado de una doble diagonal perpendicular a intervalos de 4 mts. Las muestras se colocaron individualmente en bolsas de plástico y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

1.3. Recolección de las muestras de desecho.

De las cincuenta muestras de suelo recolectadas, se seleccionaron veinticinco al azar y se secaron en estufa de aire forzado, a 50°C durante 24 h. Las muestras de suelo secas se pasaron a través de un tamiz (2 mm tamaño de malla) y los desechos separados se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

1.4. Cultivo de insectos.

Se trabajó con tres cepas de insectos plaga de maíz almacenado. El gorgojo confuso de la harina *Tribolium confusum* (Jacquelin du Val), el gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) y el gorgojo barrenador *Rhyzopertha dominica* (Fabricius). Las cepas se obtuvieron del Departamento de Zoología Agrícola de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina. Se trabajó con insectos adultos de ambos sexos de 1-3 semanas de edad. Fueron mantenidos en recipientes de plástico con diferentes dietas según cada especie: semillas de trigo la cepa de *S. zeamais*, granos de maíz la cepa de *R. dominica* y una mezcla a base de harina de trigo, almidón de maíz y levadura (10:10:1,5) para la cepa de *T. confusum*. Todos se incubaron a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 5\%$ humedad relativa (HR) y fotoperíodo de 12:12 h ciclo de luz: oscuridad.

1.4.1. Materiales.

- Agua peptonada: peptona de carne 1 g; agua destilada 1000 mL.
- Solución de hipoclorito de sodio: hipoclorito de sodio 10 mL; agua destilada 1000 mL.
- Medio de aislamiento semiselectivo para entomopatógenos (SM): harina de maíz 17 g; NaCl 17,5 g; rosa de bengala 75 mg; tritón X-100 0,3 mL; cloranfenicol 50 mg; estreptomicina 0,1 mL; cicloheximida 2,5 mL; agar-agar 15 g; agua destilada 1000 mL.
- Agar dextrosa sabouraud (SDA): tripticasa 5 g; peptona de carne 5 g; glucosa 20 g; agar-agar 15 g; 1000 mL agua destilada.
- Agar dextrosa papa (PDA): dextrosa 10 g; papa 200 g; agar-agar 15 g; agua destilada 1000 mL.
- Agar agua (AA): agar-agar 15 g, agua destilada 1000 mL.
- 800 insectos: 200 en suelo sin secar; 500 en suelo seco sin desechos y 100 en granos de maíz.

1.4.2. Metodología.

Aislamiento a partir de insectos cebo.

Se utilizaron tres tipos de sustratos, veinticinco muestras de suelo seco sin desechos (250 g cada una). Diez muestras de suelo sin secar con desechos (250 g cada una), y cinco muestras de granos de maíz (500 g cada una). Los granos de maíz fueron cosechados de plantas cultivadas en el mismo campo experimental donde se obtuvieron las muestras de suelo en la temporada 2009-2010. Todas las muestras fueron fraccionadas en frascos de plástico de 500 mL de capacidad y se adicionaron además, a cada una, veinte insectos adultos de *T. confusum* (gorgojo empleado como cebo). Todos los frascos se colocaron en una cámara con condiciones controladas de temperatura $27 \pm 1^\circ\text{C}$ y humedad relativa $70 \pm 5\%$ (HR) donde se incubaron durante 15 días. Cumplidos los días de incubación, los recipientes fueron llevados a -20°C , durante 24 h, para matar a los insectos. Luego, las muestras de suelo y maíz fueron tamizadas para recuperar los insectos que se analizaron para determinar si estaban colonizados por hongos entomopatógenos. Los insectos recuperados fueron sometidos a una desinfección superficial con la solución de hipoclorito de sodio durante 1 min. El agente de desinfección fue eliminado con dos lavados sucesivos con agua destilada estéril (5 minutos cada uno). Finalmente, se sembraron en medio de aislamiento semiselectivo para entomopatógenos (SM) y se incubaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 10 días. Después del período de incubación, se analizaron los insectos colonizados. Las colonias aisladas de los insectos, con características de potenciales hongos entomopatógenos se repicaron en SDA y se incubaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 10 días. El tratamiento control consistió en tomar 80 insectos de los recipientes donde se mantuvo la cepa, y se congelaron a -20°C para producir la muerte. Luego, los insectos fueron desinfectados superficialmente y finalmente sembrados e incubados como se describió anteriormente. Después de la observación

microscópica, a cada aislamiento se le asignó un género de acuerdo con Samson (1974), Samson y col., (1988), Humber (2005) y Luangsa-ard y col., (2011).

Aislamiento a partir de suelo.

El método de aislamiento empleado fue una adaptación de la metodología de Garrido-Jurado y col., (2011). La enumeración de los propágulos fúngicos se llevó a cabo en medio sólido, 10 g de suelo de cada una de 25 muestras seleccionadas aleatoriamente de un total de 50, se mezclaron con 90 mL de una solución de agua peptonada al 0.1%. Se realizaron diluciones decimales seriadas, se sembraron alícuotas de 0.1 mL en medio SM y se incubaron a 25°C durante 13 días. El recuento se expresó como \log_{10} por g de suelo. Los hongos se repicaron a medio SDA para obtener cultivos puros y se identificaron mediante características microscópicas como se describió anteriormente.

Aislamiento a partir de desechos.

La experiencia se llevó a cabo según la metodología propuesta por Nesci y Etcheverry (2002) con algunas modificaciones. Se trabajó con veinticinco piezas de desechos recuperadas de cada una de las 25 muestras de suelo. A cada pieza se le realizó una desinfección superficial con hipoclorito de sodio al 1% durante 1 min. El agente de desinfección fue eliminado con dos lavados sucesivos con agua destilada estéril (5 min cada uno). Las piezas de desechos fueron sembradas directamente en medio SM e incubadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 10 días. Cumplido el período de incubación, se analizaron las piezas de desechos que fueron colonizadas. El recuento fúngico se expresó como porcentaje de piezas contaminadas. Posteriormente se repicaron y se identificaron como se ha descrito anteriormente.

2. Identificación morfológica.

2.1. Identificación microscópica presuntiva de posibles hongos entomopatógenos.

2.1.1. Materiales.

- Solución de hidróxido de potasio (KOH) 1%
- Colorante básico: azul de metileno

2.1.2. Metodología.

Confección de los preparados para observación microscópica.

Para una correcta observación microscópica se utilizó KOH 1% y azul de metileno. La metodología descrita por McGinnis (1980) con modificaciones, consistió en:

a. Colocar una gota de KOH 1% en un portaobjeto y luego agregar, con ansa, el material a examinar. El KOH se agrega porque muchos hongos son típicamente hialinos y se dificulta su

observación al microscopio. La acción clarificante del KOH, limpia la muestra degradando los restos de tejidos vegetales y facilitando así su observación.

b. Antes de colocar el cubreobjetos también agregamos una gota de azul de metileno, este colorante penetra los tejidos fúngicos y de esta manera se aumenta el contraste para la observación.

c. Observación con objetivo de 40X.

De esta manera se realizó la identificación microscópica presuntiva de posibles hongos entomopatógenos, de acuerdo a Samson y col., (1988), Humber (2005) y Sung y col., (2007)

2.2. Identificación macroscópica presuntiva de posibles hongos entomopatógenos.

2.2.1. Materiales.

- Agar Extracto de Malta (MEA): extracto de malta 20 g, peptona de soya 1 g, glucosa 20 g, agar-agar 15 g, agua destilada 1000 mL.

- Inóculos entomopatógenos: suspensiones de 10^7 esporas mL^{-1} en agua destilada estéril con 0.01% de Tritón X-100 de las 21 cepas de posibles entomopatógenos

- Agar agua semisólido: agar 1 g, agua 1000 mL.

2.2.2. Metodología.

La identificación de los posibles entomopatógenos se realizó utilizando el medio de cultivo MEA adaptando la metodología propuesta por Pitt 1988 y Pitt y Hocking 1997. A partir de cada aislamiento crecido en MEA se realizó una suspensión de esporas en agar semisólido de manera de permitir la hidratación de las esporas, dichas suspensiones se dejaron reposar 30 min a temperatura ambiente. Las esporas se inocularon en placas con MEA en puntos equidistantes del borde y del centro de la placa, siguiendo el esquema de inoculación que se muestra en la siguiente figura I.3.:

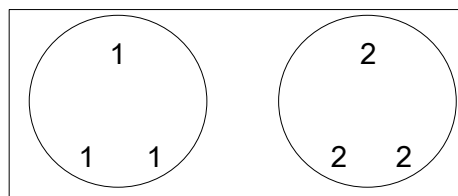


Figura I.3. Esquema del régimen de cultivo de los aislamientos en MEA.

3. Identificación molecular.

3.1. Extracción de AD fúngico

3.1.1. Materiales.

- Agar Papa Dextrosa (PDA). Descripto en I.1.4.1
- Buffer de extracción (Tris-HCl 100 mM, CTAB 2%, NaCl 1,4 mM)
- Buffer de precipitación (CTAB 14 mM, NaCl 40 mM, pH 8)
- Perlas de vidrio (425-600 μm de diámetro)
- Solventes: cloroformo, isopropanol, etanol 70%
- Agua libre de nucleasas
- Taq ADN polimerasa (Invitrogen, Brasil)
- Buffer 5 X (Invitrogen)
- dNTPs (Invitrogen)
- Mg^{+2}
- Cebador directo EF1T (ATGGGTAAGGACAAGAC) (Invitrogen, Carlsbad, CA)
- Cebador inverso EF2T (GGAAGTACCAGTGATCATGTT) (Invitrogen, Carlsbad, CA)

3.1.2. Metodología de extracción de ADN.

Los cultivos fúngicos obtenidos de los ensayos anteriores, fueron mantenidos en suelo estéril, según la metodología descrita por Abreu y col., (2003). Los aislamientos de hongos caracterizados morfológicamente como potenciales entomopatógenos crecieron en PDA a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 7 días. La extracción de ADN a partir de la biomasa micelial, se realizó según el procedimiento de Passone y col., (2010) con algunas modificaciones. Se transfirió una alícuota de 100 mg de micelio de cada aislamiento fúngico a tubos Eppendorf.

El micelio se agitó en vórtex durante 1 minuto en presencia de 300 μL de agua estéril más 700 μL de buffer de extracción y perlas de vidrio para favorecer la ruptura del micelio fúngico. Se incubó a 65°C durante 60 minutos y se adicionaron 500 μL de cloroformo a cada muestra. Se homogeneizó y centrifugó durante 10 min a 13000 rpm. Se recuperó la fase acuosa y se añadieron 500 μL de cloroformo. Se homogeneizó y centrifugó nuevamente durante 10 minutos a 13000 rpm. La fase acuosa se precipitó con 2 volúmenes de buffer de precipitación. Después de incubar 1 h a temperatura ambiente se homogeneizó y centrifugó durante 5 min a 13000 rpm. Luego cada muestra fue homogeneizada por inversión en presencia de 350 μL de NaCl (1M) y 350 μL de cloroformo y centrifugada durante 5 min a 13000 rpm. Se recuperó la fase clorofórmica y se precipitó con 0,6 volúmenes de isopropanol a -20°C . Después de incubar durante 20 min a temperatura ambiente, se centrifugó durante 10 min a 13000 rpm y se desechó la fase acuosa. Por último se lavó el pellet de ADN con etanol 70% y se resuspendió en 25 μL de agua libre de nucleasas.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR; TECHNE TC-512, Barloworld, Scientific Ltd., Reino Unido) se llevó a cabo en reacciones de 50 μL con las siguientes concentraciones: 5 U μL^{-1} de Taq ADN polimerasa, Buffer 5 X, 2 mM de dNTPs, 1,5 mM de Mg^{+2} , y 3 pmol μL^{-1} de cada cebador. Los cebadores utilizados fueron específicos para hongos, directo EF1T e inverso EF2T (O'Donnell y col., 1998). La PCR se llevó a cabo usando el siguiente protocolo: desnaturalización inicial a 94°C durante 1 min, seguido de 31 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 s, hibridación de cebadores a 56°C durante 45 s, elongación de la cadena a 72°C durante 1 min, y una elongación final a 72°C durante 5 min. La reacción se mantuvo a 4°C. La presencia de productos de PCR se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa.

3.2. Determinación de productos de PCR.

3.2.1. Materiales.

- Agarosa 0,96 g
- Buffer TBE 1X 16 mL
- agua HPLC 64 mL
- Gel Red 8 μL (Biotium)
- Marcador de pares de bases (diluido 1/10 en Buffer TBE 0,5X y calentado durante 3 minutos a 65°C) 3 μL por muestra (Invitrogen).
- Buffer de carga (Invitrogen).

3.2.2. Metodología.

Para confirmar la presencia de los productos de PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa. Mezclando la agarosa y el buffer se obtuvo un volumen final de 80 mL de agarosa, se agitó y luego se calentó para su completa disolución. Una vez templado a 50°C se agregó el colorante de bases de ADN, Gel Red. Finalmente se vertió todo el volumen en la cubeta hasta su solidificación. A cada una de las muestras de ADN amplificado, se las mezcló con buffer de carga antes de sembrarlas en el gel. Además, se sembró un marcador de pares de bases de concentración conocida (Lambda Hind III) para estimar la concentración de ADN necesario para el secuenciamiento.

3.3. Purificación, secuenciamiento e identificación.

La purificación de productos de PCR se realizó utilizando un kit de limpieza de ADN Wizard (producto A9282, Promega, Madison, WI). Todas las muestras fueron secuenciadas utilizando un secuenciador Applied Biosystems ABI 3730 (Applied Biosystems). Cada producto de PCR fue secuenciado en dos direcciones, directa y reversa, las secuencias consenso fueron creadas por medio del programa BioEdit versión 7.0.9.0 (Thompson y col., 1994). (<http://www.mbio.ncsu.edu/RNasaP/detalles/programs/BIOEDIT/bioedit.html>).

4. Evaluación de la adherencia de conidios viables al insecto.

4.1 Materiales.

- 1200 insectos *T. confusum*
- 20 suspensiones fúngicas de entomopatógenos. Descrito en I.2.2.1
- agua peptonada al 0.1%. Descrito en I.1.4.1
- Agar Papa Dextrosa (PDA). Descrito en I.1.4.1

4.2 Metodología.

Se pesaron 0.1 g de insectos vivos (aproximadamente 60 insectos) para cada aislado fúngico a evaluar, los cuales fueron colocados en viales. Por otro lado se preparó una suspensión fúngica como se describió en el punto I.2.2.1. Esto se realizó por cada aislado fúngico a ensayar. Se tomó 1 mL de esa suspensión y se agregó al vial conteniendo los insectos, de esta manera hongo e insecto estuvieron en contacto durante 30 segundos. A partir de esta primera muestra se realizaron diluciones decimales seriadas en agua peptonada, hasta la dilución 10^{-4} . Cada una de estas diluciones fue sembrada en placas de Petri conteniendo PDA. Las placas se incubaron durante 7 días a 25°C y al cabo de este tiempo se realizó el recuento de las unidades formadoras de colonias por gr (ufc gr⁻¹).

5. Actividad insecticida de los hongos entomopatógenos.

Determinación del porcentaje de mortalidad y TL₅₀ de *T. confusum*, *S. zeamais* y *R. dominica*.

5.1 Materiales.

- 20 suspensiones fúngicas de entomopatógenos. Descrito en I.2.2.1.
- 500 g de granos de maíz esterilizados con 2 ciclos de autoclave (121°C durante 15 minutos c/u)
- 400 insectos *T. confusum*; 400 insectos *S. zeamais*; 400 insectos *R. dominica*.
- Agar Agua (AA). Descrito en I.1.4.1

5.2 Metodología.

Para cada uno de 20 aislamientos fúngicos, que fueron identificados molecularmente como *P. lilacinum*, se calculó el TL₅₀, el cual se define como el número de días hasta alcanzar el 50% de mortalidad de la población de insectos.

Para este propósito, se siguió la metodología propuesta por Padín y col., (1997) con algunas modificaciones. Se trabajó con submuestras de 500 g de granos de maíz estériles que se fraccionaron en recipientes de plástico a los que se les adicionó, por separado, 20 adultos de cada insecto plaga *T. confusum*, *S. zeamais* y *R. dominica* previamente tratados por inmersión

durante 30 s con 600 μL de una suspensión de 10^7 esporas mL^{-1} de cada hongo entomopatógeno (Goettel e Inglis 1997). Todos los recipientes se colocaron en una cámara con condiciones controladas ($27 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 5\%$ de humedad relativa, con fotoperíodo de 12:12 h ciclo de luz:oscuridad) (Wicklow y col., 1998). Se analizó la mortalidad durante 20 días y se comparó con las muestras controles que consistieron en insectos no inoculados con entomopatógenos. Todos los insectos muertos se colocaron directamente sobre placas con medio agar agua (AA) y se incubaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 7 días, para confirmar que el hongo inoculado fuera el agente causal de la muerte del insecto. El TL_{50} para cada uno de las cepas fúngicos se calculó mediante un análisis Probit.

6. Análisis estadístico de los datos.

Para calcular el TL_{50} y el porcentaje de mortalidad, se realizó un análisis de la varianza de los datos utilizando el programa estadístico SigmaStat para Windows versión 3.0 (SPSS, Chicago, IL, EE.UU.). Para establecer diferencias se realizó un test a posteriori con el método de comparación Holm-Sidak con un nivel de significancia $p < 0,05$.

1. Aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos.

1.1 Caracterización de hongos entomopatógenos aislados de muestras de suelo.

El recuento de hongos filamentosos aislados de las muestras de suelo varió entre 2×10^2 y $1,1 \times 10^4$ ufc g^{-1} (figura I.4 a). El análisis de la microfiora mostró que el 64% del total de la población de hongos aislados se confirmó como género fúngico potencialmente entomopatógeno. El principal género entomopatógeno aislado fue *Paecilomyces*, correspondiendo al 75% del total de los aislamientos (figura I.4 b).

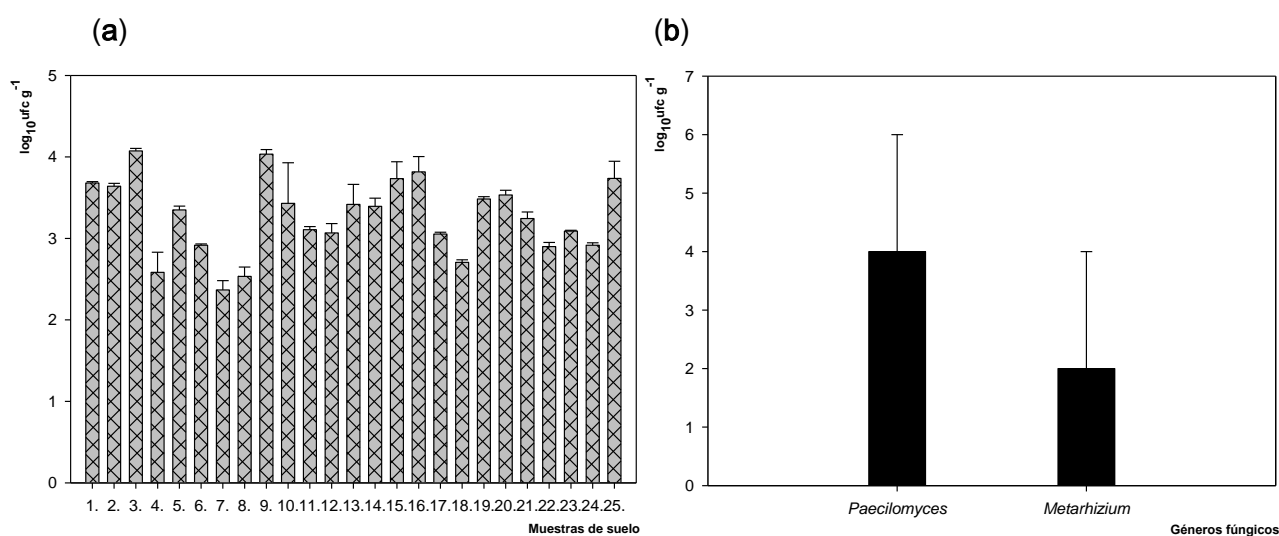


Figura I.4. (a) Incidencia de potenciales hongos entomopatógenos en muestras de suelo. (b) Incidencia de diferentes géneros fúngicos en muestras de suelo.

1.2 Caracterización de hongos entomopatógenos aislados de muestras de desechos.

El análisis de microbiota que se realizó en las 25 muestras de desechos, mostró que el 40% de las muestras de desechos estaban contaminadas con hongos, con porcentajes que variaron entre 4 y 36% (tabla I.3). Todos los hongos aislados fueron identificados dentro de los géneros *Fusarium* y *Penicillium*, ninguno de interés en este estudio.

1.3 Caracterización de hongos entomopatógenos aislados de insectos trampa.

El número total de insectos cebo que se sembraron en medio de aislamiento semiselectivo (SM) fueron 800: 200 contacto previo con 10 muestras de suelo sin secar y con desechos, 500 contacto previo con 25 muestras de suelo seco sin desechos y 100 contacto previo con 5 muestras de granos de maíz. La tabla I.3 muestra el porcentaje de muestras con contaminación fúngica, con las cuales los insectos tuvieron contacto. En el 90% de las muestras de suelo y en el total de las muestras de granos, los insectos presentaron contaminación fúngica. Sin embargo, todos los insectos colocados en granos de maíz fueron colonizados por *Fusarium*. Las muestras

de suelo seco y sin secar que tuvieron contacto con los insectos cebo, mostraron entre 5-45 y 5-25% de contaminación fúngica, respectivamente. Se detectaron porcentajes de infección más altos en muestras de suelo seco. Solamente los insectos de 4 muestras estuvieron completamente libres de contaminación fúngica. La figura 1.5 muestra la frecuencia de los diferentes géneros *Penicillium*, *Fusarium* y *Paecilomyces* aislados de los insectos cebo. El género *Penicillium* fue el que se aisló con mayor frecuencia 56,3%. El 40,5% fueron identificados como especies del género *Fusarium* y sólo el 3,2% fueron identificados como especies de un género potencialmente entomopatógeno, *Paecilomyces*.

Tabla 1.3. Porcentaje de infección de insectos cebo en contacto con muestras de suelo sin secar, suelo seco y granos de maíz con hongos potencialmente entomopatógenos. Porcentaje de residuos contaminados.

Sustrato	% infección (\pm DE)	
	Insectos cebo	Desechos
Suelo seco	21 \pm 2,4	15,2 \pm 3,7
Suelo sin secar	10,5 \pm 2,8	NE
Granos de maíz	100 \pm 0	NE

NE: no evaluado

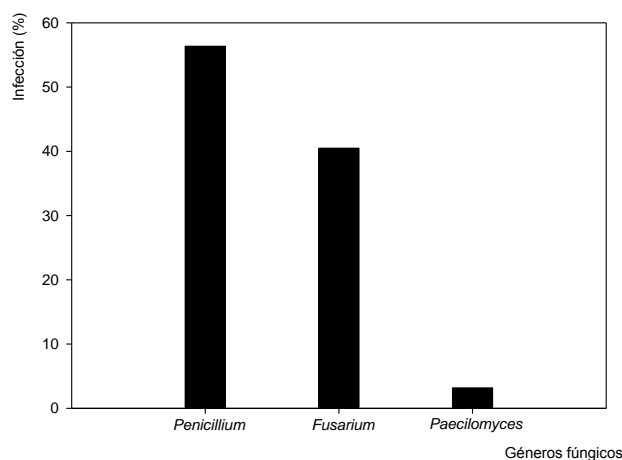


Figura 1.5. Frecuencia de aislamiento de diferentes géneros fúngicos en los insectos trampa.

2. Identificación morfológica y molecular de hongos entomopatógenos.

Los 35 aislamientos de *Paecilomyces* fueron identificados como *Paecilomyces lilacinus*. Estos aislados mostraron colonias de rápido crecimiento en MEA que alcanzaron un diámetro de 20-37 mm después de 7 días de incubación a 25°C (figura 1.6 a y b). Las características culturales fueron micelio basal, con o sin proliferación de micelio aéreo flooso, al comienzo de color blanco y volviéndose violáceo con los días. La mayoría presentó el reverso en tonos púrpuras y algunos incoloros. Los conidióforos son erectos, con gruesas paredes rugosas de alrededor de 3 μ m de ancho y culminan en ramas verticiladas con dos a cuatro fiálides. Las fiálides presentan tamaños

de 8 x 2,1 μm y tienen una porción basal hinchada que va disminuyendo hasta un cuello corto. Los conidios se agrupan en cadenas divergentes, de forma elipsoidal a fusiforme, hialinos, de 2,8 x 2,4 μm . No se observó desarrollo, o este fue muy escaso con colonias de 2-3 mm de diámetro, cuando se incubaron a 37°C.

Estas cepas fueron seleccionadas para el análisis de ADN, de las cuales 27 mostraron resultados de secuencias limpias. Todos los aislamientos secuenciados fueron comparados en el GenBank, y se identificaron como *Purpureocillium lilacinum* (tabla I.4). Quince aislamientos mostraron una homología del 99% con secuencias de *P. lilacinum* ya registradas. Nueve cepas son idénticas y 3 aislamientos mostraron homologías de 98, 97 y 95% al compararlas mediante el análisis de BLAST.

Tabla I.4. Homología de las secuencias del gen de traducción del factor de elongación alpha 1 de los aislamientos de *P. lilacinum*, con secuencias presentes en el GenBank. Se muestra la información de las secuencias y los resultados del BLAST, para los accesos de mayor identidad encontrados en el GenBank.

N° de acceso en GenBank	Cepa fúngica	Longitud de secuencia	N° PB usados en BLAST	Resultados del BLAST		
				Homología de las secuencias con cepas de <i>P. lilacinum</i>	Máxima identidad (%)	Secuencia alineada (%)
JQ926202	46S	587	364	CBS 74988	100	62
JQ926203	56S	539	346	CBS 74988	99	64
JQ926204	68S	584	364	CBS 74988	99	62
JQ926205	61S	590	364	CBS 74988	100	61
JQ926206	64S	590	364	CBS 74988	100	61
JQ926207	66S	578	364	CBS 74988	99	62
JQ926208	14S	587	364	CBS 74988	99	62
JQ926209	62S	581	364	CBS 74988	99	62
JQ926210	32S	557	364	CBS 74988	99	65
JQ926211	44S	590	364	CBS 74988	100	61
JQ926212	50S	573	351	DTO 30H4	99	61
JQ926213	42S	586	361	DTO 149F4	100	61
JQ926214	38S	586	361	DTO 149F4	100	61
JQ926215	20S	525	364	CBS 74988	100	69
JQ926216	77S	590	364	CBS 74988	99	61
JQ926217	90S	578	364	CBS 74988	100	62
JQ926218	29S	587	364	CBS 74988	99	62
JQ926219	84S	590	364	CBS 74988	99	61
JQ926220	01S	590	364	CBS 74988	99	61
JQ926221	57S	590	364	CBS 74988	99	61
JQ926222	39S	590	364	CBS 74988	98	61
JQ926223	79S	590	364	CBS 74988	99	61
JQ926224	25S	580	355	CBS 74988	99	61
JQ926225	81S	590	364	CBS 74988	100	61
JQ926226	52S	396	227	CBS 74988	95	57
JQ926227	82S	325	154	DTO 149F4	97	47
JQ926228	22S	509	364	CBS 74988	99	71

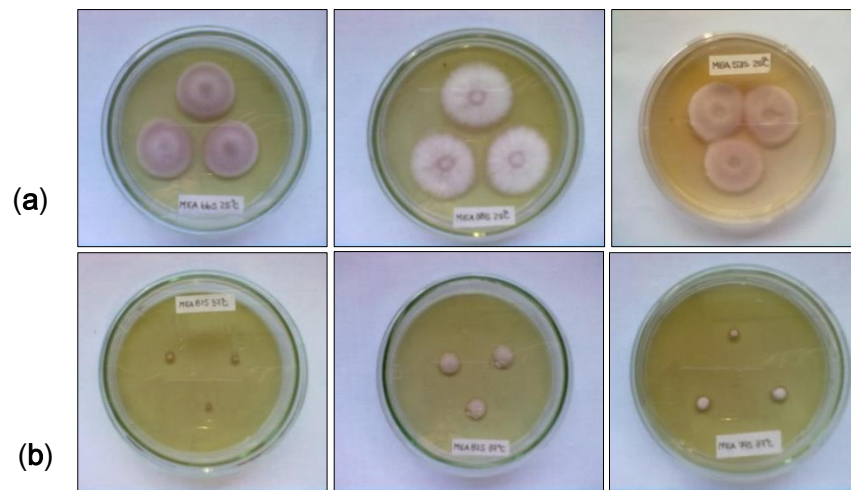


Figura I.6. Desarrollo de cepas entomopatógenas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (a) y $37 \pm 1^\circ\text{C}$ (b) en MEA.

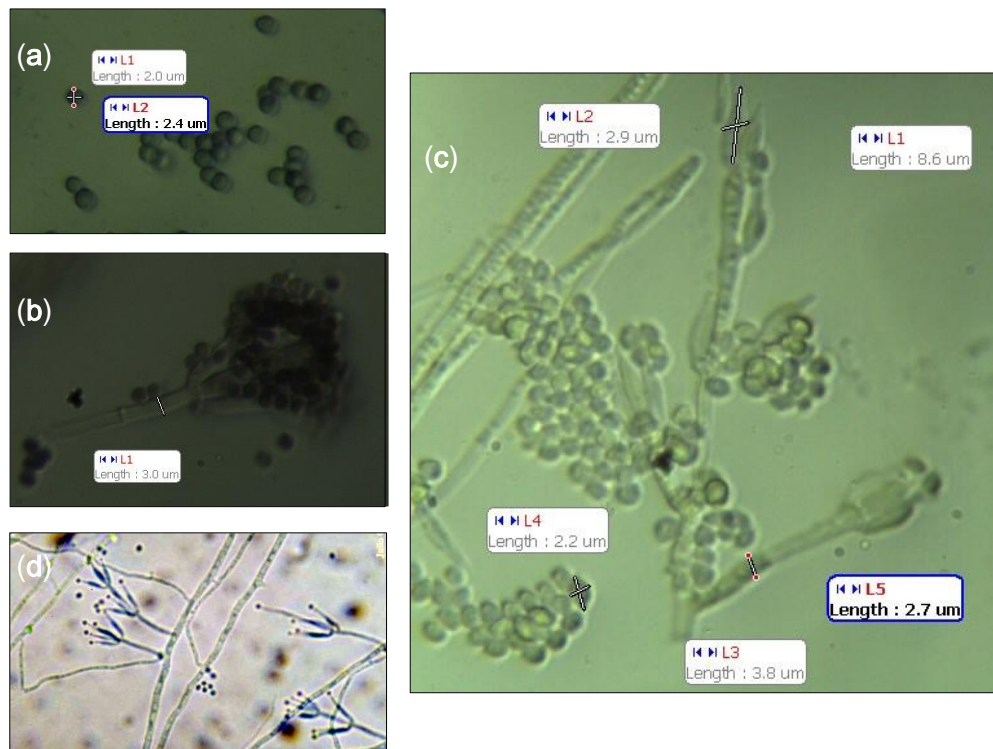


Figura I.7. Características microscópicas de aislamientos entomopatógenos crecidos a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 7 días: (a) diámetro de conidios, (b) diámetro del estipe del conidióforo, (c) diámetro de fálides y estípes, (d) micelio.

3. Actividad insecticida de hongos entomopatógenos.

3.1 Determinación del porcentaje de mortalidad y TL_{50} de *P. lilacinum* contra *T. confusum*, *S. zeamais* y *R. dominica*.

La mortalidad en el tratamiento control fue baja (<10%) y no se detectó desarrollo fúngico a partir de esos insectos. Los valores de TL_{50} para las 20 cepas de *P. lilacinum* ensayadas contra *T. confusum* variaron de 4,66 a 17,41 días (tabla 3). Sin embargo, los valores de TL_{50} contra *S. zeamais* y *R. dominica* fueron más altos, oscilaron entre 11,13 a >62,5 días y 9,38 a 48,38 días, respectivamente. La cepa JQ926223 mostró el menor TL_{50} para *T. confusum* y *R. dominica*, pero el mayor para *S. zeamais*. La cepa JQ926212 ha demostrado un TL_{50} similar para los tres insectos evaluados, con un rango de 11,7 a 14,95 días. Después de 20 días de la aplicación fúngica, la cepa JQ926223 presentó la mayor tasa de mortalidad para *T. confusum* y *R. dominica* (90 y 65%, respectivamente). Mientras que la cepa JQ926212 mostró una tasa de mortalidad de 45, 50 y 45% para *T. confusum*, *S. zeamais* y *R. dominica*, respectivamente. Para todos los insectos muertos en cada tratamiento, se confirmó la infección fúngica con *P. lilacinum* (figura I.8).



Figura I.8. Insectos colonizados con los aislamientos entomopatógenos.

Tabla I.5. LT_{50} y porcentajes de mortalidad para insectos adultos de *T. confusum*, *S. zeamais* y *R. dominica* expuestos durante 20 días a 20 cepas de *P. lilacinum*.

Cepas	<i>Tribolium confusum</i>		<i>Sitophilus zeamais</i>		<i>Rhyzopertha dominica</i>	
	LT_{50} (días)	Mortalidad (%)	LT_{50} (días)	Mortalidad (%)	LT_{50} (días)	Mortalidad (%)
JQ926202	17.41b	35h	11.13a	50 ^a	12.23b	55c
JQ926203	14.8b	35h	62.5h	10h	37.6d	20h
JQ926204	16.79b	35h	>i	15g	43.18f	20h
JQ926205	12.4b	40g	37.92e	30d	20.34b	40e
JQ926206	6.81a	65c	26.62d	25e	15.47b	45d
JQ926207	8.36a	55d	18.16c	35c	26.04b	25g
JQ926208	8.47a	55d	53.3f	30d	22.9b	40e
JQ926210	14.41b	35h	>i	15g	14.49b	45d
JQ926211	15.48b	35h	37.75e	25e	18.24b	40e
JQ926212	11.7b	45f	13.99b	50a	14.95b	45d
JQ926214	5.58a	75b	36.58e	15g	21.9b	40e
JQ926216	10.7b	50e	52.75f	25e	21.6b	30f
JQ926217	9.89b	50e	59.33g	20f	17.58b	40e
JQ926218	12.11b	45f	>i	10h	48.38g	20h
JQ926220	7.81a	65c	19.47c	30d	11.75b	60b
JQ926222	8.19a	35h	51.16f	30d	25.1b	30f
JQ926223	4.66a	90a	>i	10h	9.38 ^a	65a
JQ926225	10.79b	55d	27.58d	35c	40.43e	15i
JQ926226	5.75a	75b	>i	15g	32.16c	30f
JQ926228	12.75b	40g	38.21e	40b	23.48b	40e

>62,5 días

Valores dentro de una columna seguidos por la misma letra (s) no son significativamente diferentes con un $p > 0,05$.

Los métodos utilizados para aislar hongos entomopatógenos a partir de la siembra en placa de muestras de suelo, siembra en placa de muestras de desechos e insectos cebo (*T. confusum*), en 3 tipos de sustratos, mostraron diferencias en el desarrollo de los hongos potencialmente entomopatógenos en medio de aislamiento semiselectivo. Zimmerman (1986) sugiere el método de cebo como una metodología estándar de aislamiento de hongos entomopatógenos. Tradicionalmente se emplean larvas altamente susceptibles de la polilla de la cera, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: *Pyrilidae*). Sin embargo, otros estudios mostraron que las cepas más virulentas de entomopatógenos se aislaron con mayor frecuencia de fases larvianas y adultas de los insectos que se pretenden controlar (Prior 1991; Klingen y Haukeland 2006).

Todos los insectos cebo en contacto con las muestras de granos de maíz mostraron contaminación con hongos del género *Fusarium*. Mientras que los insectos cebo en contacto con muestras de suelo seco y sin secar presentaron contaminación con los géneros *Penicillium*, *Fusarium* y *Paecilomyces*. El menor porcentaje correspondió a colonias de hongos potencialmente entomopatógenos, mientras que no se aislaron entomopatógenos de interés a partir de las muestras de desechos. En contraste, el mayor número de hongos potencialmente entomopatógenos como *Paecilomyces* y *Metarhizium* se aislaron de las muestras de suelo. Por lo tanto, los datos sugieren que estos hongos no se distribuyen de igual manera en los diferentes componentes del agroecosistema de maíz.

Nuestros resultados son similares a los de Demirci y Denizhan (2010), ellos evaluaron un potencial agente de biocontrol para el ácaro productor de roya en la manzana y mostraron que gran parte de los hongos aislados a partir de cadáveres de ácaros eran contaminantes saprofitos o comunes tales como *Rhizopus* spp. y *Penicillium* spp., y el único género entomopatógeno aislado fue *Paecilomyces* spp.

El suelo es el hábitat natural de los hongos entomopatógenos (Hajek 1997) y los estudios han mostrado diferencias en la abundancia relativa presente en diferentes suelos, como el destinado a uso agrícola, suelos adyacentes a cultivos y los bosques (Bidochka y col., 1998; Keller y col., 2003). Muchas de las especies pertenecen al phylum *Ascomycota*, tales como *Beauveria* spp., *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces* spp. Estos géneros desarrollan en el suelo la parte de su ciclo de vida en que se encuentran fuera de los insectos hospedadores (Keller y Zimmermann 1989). Jenkins y Grzywacz (2000) propusieron que hay microorganismos competidores que producen metabolitos activos que pueden afectar a la viabilidad de los propágulos fúngicos de interés. En un estudio previo se evaluaron las poblaciones fúngicas del suelo en campos destinados al cultivo de maíz en Río Cuarto, Córdoba, Argentina, se encontró que los géneros predominantes fueron *Aspergillus*, *Fusarium*, y *Penicillium* (Nesci y col., 2006). Pereira y col., (2010; 2011) encontraron que el recuento

de *Fusarium* spp. en muestras tomadas del mismo campo experimental del cual obtuvimos las muestras para este estudio fue del orden de 4 y 2 log g⁻¹ de maíz y suelo, respectivamente.

Es posible que la alta incidencia del género *Fusarium* y *Penicillium* en los diferentes componentes del agroecosistema de maíz haya influido en la colonización de los insectos cebo. La mayoría de las especies de *Fusarium* son saprófitos y miembros relativamente abundantes de la microbiota del suelo (Leslie y Summerell 2006). Muchas especies se conocen como patógenos de plantas, insectos y seres humanos, además hay especies de *Fusarium* patógenas para los insectos y no patógenas para las plantas (Majumbar y col., 2008). En algunos trabajos de investigación, especies aisladas de larvas y adultos de insectos se reportaron como patógenos de estos insectos huéspedes (Claydon y Grove 1984; Sur y col., 1999). Mientras que en otros estudios, *Fusarium* se presenta como un patógeno oportunista para los insectos en el suelo (Ali-Shtayeh y col., 2002; Sun Bing y col., 2008; Abdullah y Mohamed Amin 2009).

Tuininga y col., (2009) realizaron un análisis de diferentes muestras de campo y encontraron deficiencias importantes en las condiciones ambientales necesarias para mantener hongos entomopatógenos en hojas secas. Probablemente, algo similar ocurre con nuestras muestras de desechos en las que no se encontraron hongos de interés para este estudio. De acuerdo con otros autores (Asensio y col., 2003), en nuestro estudio, confirmamos que el suelo es un importante reservorio de hongos entomopatógenos, potenciales antagonistas para el control de insectos plaga.

Paecilomyces pertenece a la familia de hongos filamentosos, como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Humber 1997), está presente en el suelo y en materia orgánica en descomposición y, por lo general, se reconoce como agente causal de cuadros infecciosos en los animales e insectos (Luangsa-ard y col., 2011). Este género incluye especies nematófagas como *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) (Hoodle 2011; Rodríguez Dos Santos y Del Pozo Núñez 2003) y *Paecilomyces lilacinus* (Borisov y Ushchekov 1997; Gökce y Er 2005; Fiedler Sosnowska 2007). *P. lilacinus* se evaluó como agente de control biológico contra el gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* (Ahmed 2010). Existen también reportes que señalan a *P. lilacinus* como un patógeno humano (Takayasu y col., 1977), sin embargo, existe una gran diferenciación en el huésped de infección entre las cepas de este hongo (Fiedler y Sosnowska 2007). Esta especie se ha reportado como agente causal de infecciones en pacientes con su sistema inmunológico debilitado (Luangsa-ard y col., 2011). En nuestro estudio, a partir de las características macro y micromorfológicas todos los aislamientos de *Paecilomyces*, fueron identificados como *P. lilacinus* según las claves taxonómicas de Samson (1974), Samson y col., (1988), y Humber (2005). La posterior identificación a partir de la extracción, amplificación y secuenciamiento del ADN, mostró que todos los aislamientos identificados como *P. lilacinus* según sus características macro y micromorfológicas, eran *Purpureocillium lilacinum*. Luangsa-ard y col., (2011) reportaron que especies previamente asignadas a *Paecilomyces lilacinus* fueron reacomodadas dentro del género *Purpureocillium*.

La evaluación *in vitro* del potencial de los hongos entomopatógenos contra plagas de insectos, es un paso esencial en la selección de cepas virulentas antes de la aplicación a gran escala. Los resultados de nuestro estudio indican que hubo variabilidad en la virulencia de los 21 aislamientos de *P. lilacinum* contra los tres insectos plaga evaluados. Sólo uno de los aislamientos, JQ926212, mostró una virulencia similar contra los tres insectos ensayados. Niveles de letalidad similares se observaron con diferentes cepas de *M. anisopliae* contra trips (Sánchez- Pena y col., 2011). Rodríguez-Kabana y col., (1984) encontraron diferencias significativas en la patogenicidad de distintas cepas de *P. lilacinus* contra el nematodo *Meloidogyne arenaria* (Chitwood). Adane y col., (1996) demostraron que varios aislamientos de *B. bassiana*, obtenidos a partir de diferentes insectos coleópteros, tuvieron diferencias significativas en su virulencia contra *S. zeamais*. El aislamiento JQ926223, utilizado en nuestro estudio, mostró el mayor porcentaje de mortalidad frente a *T. confusum* y *R. dominica*. Resultados similares con elevadas tasas de mortalidad se registraron con *M. anisopliae* contra *Sitophilus granarius* (Linnaeus) (Khashaveh y col., 2008). Golnaz y col., (2011) demostraron que un aislamiento de *B. bassiana* mostró un TL_{50} de 10,45 días para *S. granarius*, similar a la media de TL_{50} (10,23 días) de los 21 aislamientos de *P. lilacinum* evaluados en este estudio frente a *T. confusum*.

En conclusión, este estudio muestra que el suelo destinado al cultivo de maíz, es un importante reservorio de hongos entomopatógenos. Los métodos de identificación macro y microscópica combinados con la extracción y secuenciamiento de ADN, son necesarios para la caracterización de estos hongos. Las cepas de *P. lilacinum* JQ926223 y JQ926212 nativas de suelo del agroecosistema de maíz serán evaluadas como agentes de control biológico en el ecosistema de maíz almacenado.

' El suelo, destinado al cultivo de maíz, resultó ser el mejor sustrato de aislamiento de hongos entomopatógenos.

' Los aislamientos fúngicos evaluados mostraron elevada patogenicidad, ya que el recuento de esporas viables presentó resultados similares en todos los aislamientos, con valores próximos al inoculado.

' La identificación de los hongos potencialmente entomopatógenos aislados en este estudio, fue realizada por la combinación de métodos de observación macro y microscópicos, además de la extracción y secuenciamiento del ADN.

' Todas las cepas de potenciales entomopatógenos evaluadas fueron identificadas como *Purpureocillium lilacinum*.

' Las cepas de *P. lilacinum* evaluadas mostraron buena virulencia contra los insectos plaga.

' La cepa JQ926212 demostró un bajo TL₅₀ (~14 días) y una tasa de mortalidad similar (45-50%) para los tres insectos evaluados.

' La cepa JQ926223 presentó la mayor tasa de mortalidad para *T. confusum* (90%) y *R. dominica* (65%).

1. Abdullah SK., Mohamed Amin MK. (2009) Occurrence of insect-associated fungi in cultivated soil in Basrah, Iraq. *Proceedings of the first conference of Biological Sciences*. Mosul, Iraq. pp. 222-227.
2. Abreu J., Gonzalez J., Jaqueman F. (2003) Conservación por liofilización de diferentes especies de géneros de levaduras. *Revista Alimentaria* 119-122.
3. Adane K., Moore D., Archer SA. (1996) Preliminary studies on the use of *Beauveria bassiana* to control *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) in the laboratory. *Journal of Stored Products Research* 32: 105–113.
4. Ahmed BI. (2010) Potentials of entomopathogenic fungi in controlling the menace of maize weevil *Sitophilus zeamais* Motsch (Coleoptera: Curculinidae) on stored maize grain. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 43: 107–115.
5. Alexopoulos CJ., Mims CW., Blackwell M. (1996) Introductory mycology. Fourth Edition. John Wiley and Sons. Inc. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore. pp. 706-708.
6. Ali-Shtayeh MS., Mara ABB., Jamous RM. (2002) Distribution, occurrence and characterization of entomopathogenic fungi in agricultural soil in the Palestinian area. *Mycopathologia* 235-244.
7. Asensio L., Carbonell T., López-Jimenez JA., López-Llorca LV. (2003) Entomopathogenic fungi in soils from Alicante province. *Spanish Journal of Agricultural Research* 3: 37–45.
8. Augustyniuk-Kram A., Kram KJ. (2012) Entomopathogenic fungi as an important natural regulator of insect outbreaks in forests. Agricultural and Biological Sciences. In: Blanco J., Lo Y. (eds.), Cap 12. DOI: 10.5772/30596.
9. Aung OM., Soyong K., Hyde KD. (2008) Diversity of entomopathogenic fungi in rainforests of Chiang Mai Province, Thailand. *Fungal Diversity* 30: 15-22.
10. Azema R. (1975) Le genre *Septobasidium* Patouillard. *Documents Mycologiques* 6: 1-24.
11. Bałazy S. (2004) Znaczenie obszarów chronionych dla zachowania zasobów grzybów entomopatogenic znych (Significance of protected areas for the preservation of entomopathogenic fungi). *Kosmos* 53: 5-16. (in Polish with English summary).
12. Bidochka MJ., Kasperski JE., Wild GAM. (1998) Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. *Canadian Journals of Botany* 1198-1204.
13. Borisov BA., Ushchekov AT. (1997) Entomogenous fungi hyphomycetes against the nightshade leaf miner. *Zash K Rastenij* 5: 10–11.

14. Burges HD. (1981) Safety, safety testing and quality control of microbial pesticides. In: Burges HD. (ed.) *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. London: Academic Press. pp. 737-767.
15. Chandler D., Hay D., Reid AP. (1997) Sampling and occurrence of entomopathogenic fungi and nematodes in UK soils. *Applied Soil Ecology* 5: 133–141, ISSN 0929-1393.
16. Claydon N., Grove F. (1984) *Fusarium* as an insect pathogens. In: Moss MO., Smith E. (eds.), *The Applied Mycology of Fusarium*. Cambridge University Press. pp. 115-123.
17. Couch JN. (1938) The Genus *Septobasidium*. Chapel Hill: University of North Carolina Press. pp. 480.
18. Demirci F., Denizhan E. (2010) *Paecilomyces lilacinus*, a potential biocontrol agent on apple rust mite *Aculus schlechtendali* and interactions with some fungicides *in vitro*. *Phytoparasitica* 38: 125–132.
19. Dick MW. (2001) *Straminipilous* fungi: Systematics of the *Peronosporomycetes* including accounts of the marine straminipilous protists, the *Plasmodiophorids*, and similar organisms. Dordrecht, The Nether lands: Kluwer Academic Publ. pp. 670.
20. Etcheverry M., Nesci A., Barros G., Torres A., Chulze S. (1999) Occurrence of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxin B₁ in corn genotypes and corn meal in Argentina. *Mycopathologia* 147: 37-41.
21. Evans HC. (1982) Entomogenous fungi in tropical forest ecosystems: an appraisal. *Ecological Entomology* 7: 47–60.
22. Fiedler Z., Sosnowska D. (2007) Nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson is also a biological agent for control of greenhouse insects and mite pests. *Biocontrol* 52: 547–558.
23. Gams W., Zare R. (2001) A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. III. Generic classification. *Nova Hedwigia* 72: 329-337.
24. Garrido-Jurado I., Torrent J., Barrón V., Corpas A., Quesada-Moraga E. (2011) Soil properties affect the availability, movement and virulence of entomopathogenic fungi conidia against puparia of *Ceratitis capitata* (Diptera: *Tephritidae*). *Biological Control* 58: 277–285.
25. Glare TR., Milner RJ. (1991) Ecology of entomopathogenic fungi. In: Arora DK., Ajello L., Mukerji KG. (eds.) *Handbook of applied Mycology: humans, animals, and insects*. Marcel Dekker, New York. pp. 547-612.
26. Gökce A., Er MK. (2005) Pathogenicity of *Paecilomyces* spp. to the glasshouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, with some observations on the fungal infection process. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 29: 331–339.
27. Goettel MS., Inglis GD. (1997) Fungi: hyphomycetes. In: Lacey LA. (ed.) *Manual of techniques in insect pathology*. Academic Press, San Diego. pp 213–249.

28. Golnaz S., Mohammad H., Sohrab I. (2011) Insecticidal effect of diatomaceous earth against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptero: *Bruchidae*) and *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: *Curculionidae*) under laboratory conditions. *African Journal of Microbiology Research* 5: 3574–3578.
29. Gómez LD., Henk DA. (2004) Validations of the species of *Septobasidium* (*Basidiomycetes*) described by John N. Couch. *Lankesteriana* 4: 75-96.
30. Hajek AE. (1997) Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. *Advances in Microbial Ecology* 15: 193–249.
31. Hajek AE., Shimazu M. (1996) Types of spores produced by *Entomophaga maimaiga* infecting the gypsy moth *Lymantria dispar*. *Canadian Journal of Botany* 74: 708-715.
32. Hajek AE., St. Leger RJ. (1994) Interactions between fungal pathogens and insect host. *Annual Review of Entomology* 39: 293-322.
33. Hallsworth JE., Magan N. (1994) Improved biological control by changing polyols/trehalose in conidia of entomopathogens. In: Brighton crop protection conference, pests and diseases. *British Crop Protection* 1091–1096.
34. Hibbett DS., Binder M., Bischoff JF., Blackwell M., Cannon PF., Eriksson OE., Huhndorf S., James T., Kirk PM., Lücking R., Lumbsch HT., Lutzoni F., Matheny PB., McLaughlin DJ., Powell MJ., Redhead S., Schoch CL., Spatafora JW., Stalpers JA., Vilgalys R., Aime MC., Aptroot A., Bauer R., Begerow D., Benny GL., Castlebury LA. Crous PW. Dai YC., Gams W., Geiser DM., Griffith GW., Gueidan C., Hawksworth DL., Hestmark G., Hosaka K., Humber RA., Hyde KD., Ironside JE., Kõljalg U., Kurtzman CP., Larsson KH., Lichtwardt R., Longcore J., Miądlikowska J., Miller A., Moncalvo JM., Mozley Standridge S., Oberwinkler F., Parmasto E., Reeb V., Rogers JD., Roux C., Ryvarden L., Sampaio JP., Schüler A., Sugiyama J., Thorn RG., Tibell L., Untereiner WA., Walker C., Wang Z., Weir A., Weiss M., White MM., Winka K., Yao YJ., Zhang N. (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111: 509-547.
35. Hoodle MS. (2011) The biology and management of silverleaf whitefly *Bemisia argentifolii* bellows and perring (Homoptera: *Aleyrodidae*) on greenhouse grown ornamentals. Disponible en: <http://www.biocontrol.ucr.edu/bemisia.html>.
36. Humber RA. (1997) Fungi: identification. In: Lacey LA. (ed.) *Manual of techniques in insect pathology*. Academic Press, London. pp. 153–185.
37. Humber RA. (2005) Entomopathogenic fungal identification. *Plant Protection Research Unit*. US Plant, Soil & Nutrition Laboratory.
38. Humber RA. (1981) An alternative view of certain taxonomic criteria used in the *Entomophthorales* (*Zygomycetes*). *Mycotaxon* 13: 191-240.
39. Humber RA. (1989) Synopsis of a revised classification for the *Entomophthorales* (*Zygomycotina*). *Mycotaxon* 34: 441-460.

40. James TY., Kauff F., Schoch C., Matheny PB., Hofstetter V., Cox CJ., Celio G., Geuidan C., Fraker E., Miadlikowska J., Lumbsch HT., Rauhut A., Reeb V., Arnold AE., Amtoft A., Stajich JE., Hosaka K., Sung GH., Johnson D., O'Rourke B., Crockett M., Binder M., Curtis JM., Slot JC., Wang Z., Wilson AW., Schüler A., Longcore JE., O'Donnell K., Mozley Standridge S., Porter D., Letcher PM., Powell MJ., Taylor JW., White MM., Griffith GW., Davies DR., Humber RA., Morton JB., Sugiyama J., Rossmann A., Rogers JD., Pfister DH., Hewitt D., Hansen K., Hambleton S., Shoemaker RA., Kohlmeyer J., Volkman Kohlmeyer B., Spotts RA., Serdani M., Crous PW., Hughes KW., Matsuura K., Langer E., Langer G., Untereiner WA., Lücking R., Büdel B., Geiser DM., Aptroot A., Diederich P., Schmitt I., Schultz M., Yahr R., Hibbett DS., Lutzoni F., McLaughlin DJ., Spatafora JW., Vilgalys R. (2006) Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* (London) 443: 818-822.
41. Jenkins NE., Grzywacz D. (2000) Quality control of fungal and viral biocontrol agents- assurance of product performance. *Biocontrol Sciences of Technology* 10: 753-777.
42. Keller S., Zimmerman G. (1989) Mycopathogens of soil insects. In: Wilding N., Collins NM., Hammond PM., Webber JF. (eds.) *Insect Fungus Interactions*. pp. 240-270, Academic Press. London.
43. Keller S., Kessler P., Schweizer C. (2003) Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria rogniartii* and *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol* 307-319.
44. Khashaveh A., Safaralizade MH., Ghosta Y. (2008) Pathogenicity of three Iranian isolates of the fungus, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Deuteromycotina: *Hyphomycetes*) against granary weevil, *Sitophilus granaries* L. (Coleoptera: *Curculionidae*). *International Research Journal of Biological Sciences* 8: 804-808.
45. Klingen I., Haukeland S. (2006) The soil as a reservoir for natural enemies of pest insects and mites with emphasis on fungi and nematodes. In: Eilenberg J., Hokkanen HMT. (eds.) *An ecological and societal approach to biological control*. Springer, Dordrecht. pp. 145-211.
46. Kraus TA., Blanco CA., Núñez CO. (1999) Los ambientes naturales del sur de la provincia de Córdoba. Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto (ed.) Río Cuarto, Córdoba, Argentina. pp 112.
47. Leslie JF., Summerell BA. (2006) *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg. In: Leslie JF., Summerell BA. (eds.) *The Fusarium Laboratory Manual*. pp. 274- 279. Blackwell Publishing.
48. Lichtwardt RW., Cafaro MJ., White MM. (2001) The *Trichomyces*: Fungal Associates of Arthropods. Disponible en: <http://www.nhm.ku.edu/fungi/monograph/text/mono.htm>.

49. Luangsa-ard J., Houbraken J., Doorn T., Hong SB., Borman AM., Hywel Jones NL., Samson R. (2011) *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiology Letters* 321: 141–149.
50. Luangsa-ard JJ., Hywel Jones NL., Samson RA. (2004) The polyphyletic nature of *Paecilomyces* sensu lato based on 18S-generated rDNA phylogeny. *Mycologia* 96: 773–780.
51. Luangsa-ard JJ., Hywel Jones NL., Manoch L., Samson RA. (2005) On the relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species. *Mycological Research* 109: 581-589.
52. Majumbar A., Boetel MA., Jaronski TS. (2008) Discovery of *Fusarium solani* as a naturally occurring pathogen of sugarbeet root maggot (Diptera: *Ulidiidae*) pupae: Prevalence and baseline susceptibility. *Journal of Invertebrate Pathology* 1-8.
53. McGinnis MR. (1980) Laboratory Handbook of Medical Mycology. Chapter 3. *Clinical Specimens*. Academic Press, Inc. New York. pp. 101-102.
54. Miętkiewski R., Zurek M., Tkaczuk C., Bałazy S. (1991) Occurrence of entomopathogenic fungi in arable soil, forest soil and litter. *Roczniki Nauk Rolniczych* 21: 61–68 (in Polish with English summary).
55. Nesci, A. and Etcheverry, M. (2002) *Aspergillus* section *Flavi* from field maize in Argentina. *Letters in Applied Microbiology* 34: 343–348.
56. Nesci A., Barros G., Castillo C., Etcheverry M. (2006) Soil fungal population in pre-harvest maize ecosystem in different tillage practices in Argentina. *Soil Tillage Research* 91:143–149.
57. O'Donnell K., Cigelnik E., Nirenberg HI. (1998) Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90: 465–493.
58. Okada G., Sakai N., Yamagishi M. (1995) *Acremonium*-like submerged conidiation in *Paecilomyces nostocoides* and *P. lilacinus*. *Mycoscience* 36: 345-351.
59. Padín SB., Dal Bello, GM., Vasicek AL. (1997) Pathogenicity of *Beauveria bassiana* for adults of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: *Tenebrionidae*) in stored grains. *Entomophaga* 569-574.
60. Passone MA., Rosso LC., Ciancio A., Etcheverry M. (2010) Detection and quantification of *Aspergillus* section *Flavi* spp. in stored peanuts by real time PCR of *nor-1* gene, and effects of storage conditions on aflatoxin production. *International of Journal of Food Microbiology* 138: 276-281.
61. 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. *Biological Control* 258-266.
62. 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. *International Journal of Agronomy* Article ID 486914. doi:10.1155/2011/486914.
63. Pitt JI., Hocking AD. (eds.) (1997) Methods for isolation, environmental and identification. In: Fungi and food spoilage. CSIRO *Division of food Science and technology*. Sydney Academic press, Australia. pp. 469-488.
64. Pitt JI. (1998) A laboratory guide to common *Penicillium* species. CSIRO, *Division of Food Research* Sydney Academic Press, Australia.
65. Prior C. (1991) Discovery and characterisation of fungal pathogens for locust and grasshopper control. In: Lomer CJ., Prior C. (eds.) Biological control of locusts and grasshoppers. Wallingford, UK. C.A.B. *International* 159-179.
66. Quesada Moraga E., Navas Cortés JA., Maranhao EAA., Ortiz Urquiza A., Santiago Álvarez C. (2007) Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycological Research* 111: 947–966.
67. Rath AC., Koen TB., Yip HY. (1992) The influence of abiotic factors on the distribution and abundance of *Metarhizium anisopliae* in Tasmanian pasture soils. *Mycological Research* 96: 378–384.
68. Roberts DW. (1981) Toxins of entomopathogenic fungi. In: Burges HD. (ed.) *Microbial control of pests and plant diseases* 441-464. Academic press. London and New York.
69. Rodriguez Dos Santos A., del Pozo Núñez E. (2003) Aislamiento de hongos entomopatógenos en Uruguay y su virulencia sobre *Trialeurodes vaporariorum* West. *Agrociencia* 7: 71–78.
70. Rodriguez Kabana R., Morgan Jones G., Goda G., Gintis BO. (1984) Effectiveness of species of *Gliocladium*, *Paecilomyces* and *Verticillium* for control of *Meloidogyne arenaria* in field soil. *Nematropica* 14: 155–170.
71. Samson RA. (1974) *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. *Studies in Mycology* 6: 1–110.
72. Samson RA., Evans HC., Latgé JP. (1988) Atlas of Entomopathogenic Fungi. Springer. Verlag. New York, USA. pp. 187.
73. Sánchez Pena SR., Lara JSJ., Medina RF. (2011) Occurrence of entomopathogenic fungi from agricultural and natural ecosystems in Saltillo, Mexico, and their virulence towards thrips and whiteflies. *Journal of Insect Sciences* 11: 1–10.
74. Shah PA., Pell JK. (2003) Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61: 413–423.
75. Sosnowska D., Bałazy S., Prishchepa L., Mikulskaya N. (2004) Biodiversity of Arthropod Pathogens in the Białowieza Forest. *Journal of Plant Protection Research* 44: 313-321.

76. Sun Bing D., Yu HY., Chen AJ., Liu XZ. (2008) Insect-associated fungi in soils of field crops and orchards. *Crop Protection* 27: 1421–1426.
77. Sung GH., Hywel Jones NL., Sung JM., Luangsa-ard JJ., Shreshtha B., Spatafora JW. (2007) Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the *Clavicipitaceae* fungi. *Studies in Mycology* 57: 5-59.
78. Sung GH., Spatafora JW., Zare R., Hodge KT., Gams W. (2001) A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. II. Phylogenetic analyses of SSU and LSU nuclear rDNA sequences from anamorphs and teleomorphs of the *Clavicipitaceae*. *Nova Hedwigia* 72: 311-328.
79. Sung GH., Hywel Jones NL., Sung JM., Luangsa-ard JJ., Shrestha B., Spatafora JW. (2007) Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the *Clavicipitaceae* fungi. *Studies in Mycology* 57: 5-59.
80. Sur B., Bihari V., Sharma A., Basu SK. (1999) Survey of termite inhabited soil and mosquito breeding insects in Lucknow, India for potential mycopathogens of *Anopheles stephensi*. *Mycopathologia* 144: 77–80.
81. Takayasu S., Akagi M., Shimizu Y. (1977) Cutaneous mycosis caused by *Paecilomyces lilacinus*. *Archives for Dermatology* 113: 1687–1690.
82. Tavares I. (1985) *Laboulbeniales* (Fungi: *Ascomycetes*). Lehre: *Mycologia Memoir* N° 9. J Cramer. pp. 627.
83. Thompson JD., Higgins DG., Gibson TJ. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673–4680.
84. Tuininga AR., Miller JL., Morath SU., Daniels TJ., Falco RC., Marchese M., Sahabi S., Rosa D., Stafford KC. (2009) Isolation of entomopathogenic fungi from soils and *Ixodes Scapularis* (Acari: *Ixodidae*) ticks: prevalence and methods. *Journal of Medical Entomology* 46: 557–565.
85. Vänninen I. (1995) Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: effect of geographical location, habitat type and soil type. *Mycological Research* 100: 93–101.
86. Vänninen I., Husberg GB., Hokkanen HMT. (1989) Occurrence of entomopathogenic fungi and entomopathogenic nematodes in cultivated soils in Finland. *Acta Entomologica Fennica* 53: 65–71.
87. Wicklow DT., Weaver DK., Throne JE. (1998) Fungal colonists of maize grain conditioned at constant temperatures and humidities. *Journal of Stored Products Research*. pp. 355-361.
88. Zare R., Gams W., Culham A. (2000) A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata* I. Phylogenetic studies using ITS sequences. *Nova Hedwigia* 71: 465-480.
89. Zare R., Gams W., Evans HC. (2001) A revision of *Verticillium* section *Prostrata* V. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora*. *Nova Hedwigia* 73: 51-86.

90. Zare R, Gams W. (2001) A revision of *Verticillium* section *Prostrata* VI. The genus *Haptocillium*. *Nova Hedwigia* 73: 271-292.
91. Zimmermann G. (1986) The *Galleria* bait method for detection o entomopathogenic fungi in soil. *Journal of Applied Entomology* 213-215.

Sección II

Compatibilidad *in vitro* de sustancias insecticidas y fungicidas naturales y de grado alimentario, con *Purpureocillium lilacinum* y su efecto contra *Aspergillus flavus*.

Manejo actual de plagas en granos almacenados

En la actualidad, el control de insectos plaga poscosecha se realiza principalmente con insecticidas sintéticos, estos productos presentan diferente grado de selectividad sobre los organismos que se quieren destruir y además, como toda sustancia química, pueden provocar efectos adversos, de diferente severidad sobre el hombre y también sobre otras especies del ambiente esenciales para el mantenimiento del equilibrio ecológico (Pina 2012). Dentro de los pesticidas aprobados por el SENASA y la SAGyP, que actualmente se aplican en granos almacenados en nuestro país, existen los que son a base de principios activos organofosforados y organoclorados como clorpirifós, fenitrotion, mercaptotion, pirimifós, diclorvos, los cuales se comercializan como productos líquidos o en polvo; y otros cuyo principio activo es un piretroide como la deltametrina. Dentro de los organofosforados, el producto comercialmente más difundido es el fosforo de aluminio (fosfina), el cual actúa en forma de gas (Casini y Santajuliana 2012).

Existe a nivel internacional una clasificación de ingredientes activos de los plaguicidas de acuerdo a la toxicidad aguda según el criterio de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Tabla II.1), a partir de un acuerdo de cooperación entre diversas instituciones: Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), Organización Internacional del Trabajo (OIT), Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), Organización Mundial de la Salud (OMS), Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial (ONUDI), Organización de las Naciones Unidas para la Formación Profesional e Investigaciones (UNITAR) y Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), en el marco del Programa Internacional sobre Seguridad de Químicos.

Tabla II.1. Clasificación toxicológica y etiquetado de plaguicidas de acuerdo a la OMS 2009.

Clasificación según riesgo	Clasificación de peligro	Color de banda	Leyenda
CLASE Ia Producto sumamente peligroso	Muy tóxico	Rojo	Muy tóxico
CLASE Ib Producto muy peligroso	Tóxico	Rojo	Tóxico
CLASE II Producto moderadamente peligroso	Nocivo	Amarillo	Nocivo
CLASE III Producto poco peligroso	Cuidado	Azul	Cuidado
CLASE IV Producto que no ofrece peligro		Verde	Cuidado

Dicha clasificación, sujeta a actualizaciones periódicas, se realizó en base a la peligrosidad, entendiendo ésta como su capacidad de producir daño agudo a la salud cuando se da una o múltiples exposiciones en un tiempo relativamente corto, en base a la dosis letal media (DL₅₀) aguda, por vía oral o dérmica, según sea el producto formulado comercializado en forma sólida o líquida (OMS 2009).

De acuerdo a la legislación de la Unión Europea, los límites permitidos de pesticidas son mucho menores que los recomendados en Argentina, inclusive en Argentina, muchas veces los niveles encontrados exceden los límites recomendados (tabla II.2) (Casini y Santajuliana 2012).

Tabla II.2. Límites permitidos de insecticidas químicos en alimentos.

Pesticida	Legislación		Niveles encontrados
	Europea	Argentina	
Diclorvos	20 ppb	2000 ppb	5400 ppb
Fenitrotion	20 ppb	100 ppb	350 ppb
Malation	20 ppb	8000 ppb	120 ppb
Endosulfan	20 ppb	500 ppb	90 ppb

Fuente: Casini y Santajuliana (2012).

Sin embargo, actualmente la contaminación de los granos por productos químicos es un tema de mucha preocupación. Es necesario tomar conciencia que los granos son alimentos que directa o indirectamente serán destinados al consumo para seres vivos. Por lo tanto deben estar libres de residuos de productos químicos y biológicos ya que estos se manifiestan hasta en el producto ya elaborado para consumo (Casini y Santajuliana 2012).

Durante las últimas décadas, la aplicación de pesticidas sintéticos para el control de las plagas agrícolas, ha sido una práctica habitual (Taylor 1989), sin embargo, estos pesticidas pueden afectar negativamente al medio ambiente y su uso continuado para el control de plagas de granos almacenados ha ocasionado serios problemas, como por ejemplo la resistencia de las plagas a los insecticidas (Sartori y col., 1991). La resistencia a la fosfina, uno de los plaguicidas más aplicados en la actualidad, fue el primer reporte de resistencia señalado en cepas de *Sitophilus granarius* (L) (Monro y col., 1972), subsecuentemente se señalaron casos de resistencia a este pesticida en varias especies de insectos plaga en granos almacenados, como por ejemplo en *Sitophilus oryzae* (L) (Champ y Dyte 1976). Más tarde, Taylor (1989) demostró amplia resistencia a la fosfina en un gran número de especies plagas de granos almacenados. En estudios recientes, se demostró que dicha resistencia también se detecta en poblaciones de *Sitophilus zeamais* (Pimentel y col., 2009). Esta resistencia, sin duda conlleva a una reducción en la efectividad del plaguicida con el paso del tiempo.

Por esta razón, se necesitan alternativas a los fumigantes convencionales e insecticidas de contacto (López y col., 2008). La creciente demanda de una agricultura de bajo impacto medioambiental ha impulsado a los investigadores y la industria, a trabajar en el desarrollo de

pesticidas alternativos, menos tóxicos y ecológicamente aceptables, que se ajustan a las exigentes normas internacionales (FAO-WHO 2010). Una de las alternativas, es el uso de antioxidantes sintéticos permitidos como el butilhidroxianisol (BHA) y el butilhidroxitolueno (BHT), ambos clasificados de grado alimentario según el JECFA (1996), los cuales poseen actividad fungicida contra *Aspergillus* de la Sección *Flavi* en granos almacenados (Nesci y col., 2003; Nesci y col., 2008; Passone y col., 2008). También los compuestos fenólicos como el ácido cinámico (AC) y ácido ferúlico (AF), ambos presentes naturalmente en los cereales, presentan efectos antifúngicos efectivos (Nesci y Etcheverry 2006; Nesci y col., 2007; Nesci y Etcheverry 2009; Nesci y col., 2009). Estos compuestos además de efecto antifúngico han demostrado ser insecticidas efectivos contra las principales plagas vectores de hongos toxicogénicos en el agroecosistema de almacenamiento (Nesci y col., 2011a, b). Por otro lado, existen un gran número de investigaciones sobre el efecto de los aceites esenciales sobre patógenos de postcosecha (Bishop y Thornton 1977). Su bioactividad en la fase de vapor es una característica que los hace atractivos como posibles fumigantes para la protección de granos almacenados (Bluma y col., 2009). El efecto insecticida que tienen muchos aceites esenciales se ha explicado principalmente por la presencia de monoterpenos y sesquiterpenos (Leyva y col., 2007). El efecto insecticida de un gran número de aceites esenciales y otros extractos de plantas ha sido evaluado contra varias plagas agrícolas importantes (Regnault-Roger y Hamraoui 1993; Golob y col., 1999; Weaver y col., 1994; Kéita y col., 2001) El aceite esencial de *Eupatorium glabratum* (K) ha sido reportado como insecticida natural para el control de *S. zeamais* (M) y *Ryzopertha dominica* (F) y como fungicida para algunos hongos del maíz almacenado (Bekele y Hassanali 2001; Neiro y col., 2009; Long y col., 2010).

El aceite esencial de clavo de olor, cuyo componente principal es el eugenol (Bluma y Etcheverry 2008) mostró actividad insecticida contra una de las principales plagas de maní almacenado *Oryzaephilus surinamensis*, vector de *Aspergillus* Sección *Flavi* (Nesci y col., 2011b), inhibiendo además el crecimiento fúngico y/o la producción de aflatoxinas (Bluma y Etcheverry 2008).

Sin embargo, los compuestos botánicos usados como insecticidas hasta la actualidad constituyen solamente el 1% del mercado mundial de insecticidas (Rozman y col., 2007). Además, las fracciones volátiles de diferentes aceites esenciales han demostrado actividad frente a hongos aflatoxigénicos (Bluma y col., 2009). Extractos de plantas aromáticas de *Eucalyptus globosus*, *Chenopodium ambrosioides*, *Lantana achyranthifolia* (D) y *Lippia graveolens* han demostrado efecto fungistático sobre *Aspergillus flavus* (Link), *A. parasiticus* (Link), *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum* (Pers. Sacc), *P. italicum* y *P. ulaiense* (HM. Hsieh) (Hernández y col., 2008; Marangon y col., 2008; Rocha y col., 2009). Las fracciones volátiles de los aceites esenciales de *Pëumus boldus* (Mol) y *Lippia turbinata* var. *Integrifolia* (Griseb) mostraron actividad antifúngica contra *Aspergillus* Sección *Flavi* en maní almacenado (Passone y Etcheverry 2014).

Insecticidas químicos

Generalidades

Un aditivo es una sustancia o mezcla de sustancias diferentes al alimento, que se encuentran en el mismo, como resultado de producción, almacenamiento o empaquetado, añadido intencionalmente para lograr ciertos beneficios, como mejorar el nivel nutritivo, conservar la frescura, impedir el deterioro por microorganismos e insectos, generar alguna propiedad sensorial deseable o bien como ayuda de proceso (Hodge 1973; Fennema 1976). Su uso se debe limitar a las sustancias que han demostrado un beneficio al consumidor, sin riesgo para la salud. Éste debe ser no tóxico y debidamente evaluado en sus aspectos toxicológicos (Crampton 1977). Debido al riesgo toxicológico que pudiese implicar un aditivo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y otras organizaciones internacionales como la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), han sugerido una ingesta diaria aceptable (IDA), en base al peso corporal del individuo, siendo la cantidad de aditivo (u otro compuesto) en un alimento que puede ser ingerido diariamente en la dieta durante toda la vida, sin que se presente un riesgo para la salud humana, basándose en estudios de toxicidad aguda y prolongada (FAO/WHO 1975). Además, se debe aplicar un factor de seguridad que consiste en usar una concentración 100 veces menor respecto a la dosis en la cual no fueron detectados efectos adversos (Oser 1978).

Por otro lado, aquellos aditivos que se usan como conservantes de alimentos para prevenir la contaminación microbiana, usados en tratamientos inadecuados pueden provocar efectos indeseables.

Antioxidantes de grado alimentario

Las grasas y aceites pueden sufrir transformaciones que además de reducir el valor nutritivo del alimento producen compuestos volátiles que imparten olores y sabores desagradables. El término rancidez se usa para describir los diferentes mecanismos a través de los cuales se alteran los lípidos y se han dividido en dos grandes grupos: lipólisis o rancidez hidrolítica y autooxidación o rancidez oxidativa. La lipólisis es catalizada por lipasas y por efecto de las altas temperaturas se liberan ácidos grasos de los triacilglicéridos y de los fosfolípidos. Por otro lado la autooxidación es una de las transformaciones más comunes de los alimentos que contienen grasas y otras sustancias insaturadas; consiste principalmente en la oxidación de los ácidos grasos con dobles ligaduras, pero se llega a efectuar con otras sustancias de interés biológico, como la vitamina A.

El papel de los antioxidantes es controlar en parte el deterioro que puedan sufrir las grasas (a un nivel de uso del 0,2%) prolongando de esta forma la vida útil de los alimentos. Entre los antioxidantes más usados están: butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), etoxiquina, monobutilhidroquinona terciaria (TBHQ), propilgalato (PG) y alfa tocoferol. Este último es un

producto que se encuentra naturalmente en aceites vegetales y trigo, siendo conocido como vitamina E (Valle y Florentino 2000). Las diferencias en la actividad de los distintos tipos radican en las estructuras químicas de los mismos, las cuales influyen propiedades físicas como la volatilidad, solubilidad y estabilidad térmica. Además del criterio estructura-función, existen factores como la naturaleza de los lípidos que requieren protección, el estado físico del alimento, las condiciones de almacenamiento y la actividad de agua que determinan la efectividad de los antioxidantes empleados (Jadhav y col., 1996).

Existen estudios sobre la actividad fungicida y fungistática de diferentes antioxidantes como (2-*tert*butil-4-hidroxianisole) (BHA) y (2,6-di-*tert*butil-p-cresol) (BHT), para el control del crecimiento y la síntesis de aflatoxinas por *A. flavus* (Link) y *A. parasiticus* (Speare) (Chang y Branen 1975; Fung y col., 1977; Beuchat y Jones 1978; Ahmand 1979; Lin y Fung 1983; Thompson 1991; 1992). El éster del ácido p-hidroxibenzoico (parabeno de propilo) presenta una fuerte actividad fungicida (Chiple y Uraih 1980). Estudios más recientes revelaron que los antioxidantes de grado alimentario, como el BHA, BHT, parabeno de propilo, ácido ferúlico y ácido cinámico pueden considerarse eficaces fungitóxicos capaces de controlar la germinación de conidios, el crecimiento, la producción de AFB₁ y la expresión del gen aflD por *A. flavus* y *A. parasiticus*, *in vitro* (Nesci y col., 2003; Nesci y Etcheverry 2006; Passone y col., 2005; 2011).

Compuestos fenólicos

Los componentes fenólicos han sido utilizados como agentes antimicrobianos desde 1867 como sanitizantes (Dadvison 2005). Algunos de estos derivados fenólicos se encuentran en forma natural (polifenoles, fenoles), parabenos (metil, propil y etilester y el ácido p-hidroxibenzoico) y en muchos países se permite su uso directo como antimicrobiano para alimentos (Shahidi 1995).

El modo de acción de estos compuestos no ha sido aún bien determinado, se sabe que pueden inactivar enzimas esenciales, reaccionar con la membrana celular o alterar la función del material genético y se ha observado que las grasas, proteínas, concentraciones de sal, pH y temperatura afectan la actividad antimicrobiana de estos compuestos (Smid y Gorris 1999).

Los cereales naturalmente contienen una amplia gama de compuestos fenólicos. Presentan un contenido significativo de ácidos fenólicos tales como ferúlico, cafeico, p-hydroxybenzoico, protocatéquico, p-cumárico, vanílico y ácido sirínico (White y Xing 1997). Otros incluyen derivados del ácido benzoico y cinámico, antocianidinas, quininas, flavonoles, chalconas, flavonas, flavanonas y compuestos amino fenólicos (Thompson 1994; Maillard y Berset 1995; Shahidi y Nacz 1995; Lloyd y col., 2000). Algunos de estos fitoquímicos, como el ácido ferúlico y diferulatos, se encuentran predominantemente en los granos (Maillard y Berset 1995; Shahidi y Nacz 1995; Lloyd y col., 2000; Bunzel y col., 2001). El mayor contenido de ácido ferúlico libre se encuentra en el maíz, seguido por el arroz y la avena, y el menor en el trigo (Adom y Liu 2002). El ácido ferúlico puede obtenerse por síntesis química y a través de la transformación biológica de

diferentes plantas para ser utilizados en las industrias de alimentos (Ou y Kwok 2004). El contenido fenólico total en los granos (ácido ferúlico en maíz: 15,5 mmol g⁻¹ de grano) (Adom y Liu 2002) suele no ser suficiente para controlar el deterioro ocasionado por hongos y la producción de toxinas. Sin embargo, si esta concentración fenólica natural de los granos es aumentada mediante el agregado de concentraciones conocidas de compuestos fenólicos, las funciones de protección también aumentarían (Nesci y col., 2009).

Efecto antimicrobiano: posible mecanismo de acción

Es muy limitada la información acerca del mecanismo de acción de los fitoquímicos naturales sobre *Aspergillus*. El efecto inhibitorio de los compuestos fenólicos se atribuye a la presencia de grupos OH capaces de formar enlaces de hidrógeno con los sitios activos de las enzimas diana, lo que podría aumentar la actividad antimicrobiana (Farag y col., 1989). Los compuestos fenólicos sensibilizan la membrana celular y cuando se saturan los sitios sobre los cuales actúan se presenta un grave daño en la membrana citoplasmática. Kabara (1991) menciona que los efectos de los compuestos fenólicos pueden ser a dos niveles, sobre la integridad de la pared celular y membrana citoplasmática así como sobre la respuesta fisiológica del microorganismo. Los compuestos fenólicos pueden desnaturalizar a las enzimas responsables del inicio de la germinación de las esporas o interferir con el uso de aminoácidos necesarios para iniciar el proceso de germinación (Nychas 1995).

Por otro lado, principalmente tres compuestos fenólicos (acetosyringona, syringaldehído y ácido sinpínico) interrumpen la reacción catalizada por enzimas, necesaria para completar la síntesis de AFB₁ (Hua y col., 1999). Los compuestos fenólicos parecen ser una clase particularmente importante de compuestos, que causan latencia exógena de esporas. Algunos derivados hidroxilados del ácido cinámico tales como el ácido ferúlico, metil-cis-3,4-dimetoxicinamato y metil-cis-ferulato, son eficaces en la inhibición de la germinación (Stahmann y col., 1975; Trione 1981; Pacifici 2004).

No se produce estimulación de la producción de aflatoxinas en presencia de concentraciones subinhibitorias de los fitoquímicos naturales, como si se ha observado con otros inhibidores (Yousef y Marth 1981; Marshall y Bullerman 1986). Sin embargo, estudios previos de Marín y col., (2000) demostraron que el propionato aplicado como conservante, produce estimulación de las poblaciones de *Aspergillus* en maíz almacenado.

Compatibilidad entre control químico y biológico sobre insectos plaga

El desarrollo de resistencia a los insecticidas químicos y la preocupación por los efectos nocivos de los productos químicos sobre la seguridad ambiental y humana, están dando un fuerte

impulso para el desarrollo de estrategias de control biológico, para su uso en el control integrado de plagas (Inglis y col., 2001).

Sin embargo, los hongos entomopatógenos no pueden reemplazar completamente los insecticidas químicos en todos los agroecosistemas. Los insecticidas químicos en general, son necesarios para suprimir la rápida expansión de las poblaciones de insectos plagas. Se han empleado estrategias para aumentar la eficiencia y acelerar la mortalidad de los insectos, mediante la combinación de hongos entomopatógenos con dosis subletales de insecticidas químicos y/o botánicos. Una sustancia química y un hongo entomopatógeno son compatibles cuando la dosis usada de la sustancia química no afecta la viabilidad, el desarrollo y la virulencia del hongo (Alves y col., 1998; Schumacher y Poehling 2012). A pesar de que existe escasa bibliografía sobre la compatibilidad entre los hongos entomopatógenos y productos utilizados en la agricultura orgánica, como fertilizantes e insecticidas (Hirose y col., 2001), es necesario conocer los variados efectos de los insecticidas químicos sobre los hongos entomopatógenos (Olmert y Kenneth 1974; Hall 1981; Anderson y Roberts 1983; Cuthbertson y col., 2003; Li y col., 2004). Se han observado respuestas variadas como sinergismo, antagonismo o neutralidad durante la interacción (Mietkiewsky y Gorski 1995; Gupta y col., 1999). Esta información permitiría seleccionar compuestos apropiados y programar los tratamientos combinados biológico y químico, minimizando efectos deletéreos sobre la eficacia del patógeno (Inglis y col., 2001).

Las aplicaciones de insecticidas selectivos han mejorado la eficiencia de los hongos entomopatógenos contra plagas de insectos (Quintela y McCoy 1998; Dayakar y col., 2000; Serebrov y col., 2005; Purwar y Sachan 2006). Sin embargo, no se pueden ignorar los posibles efectos inhibitorios de los plaguicidas sobre los hongos entomopatógenos.

Klingen y Haukeland (2006) realizaron un estudio exhaustivo sobre el efecto de productos químicos en el desarrollo de hongos entomopatógenos y concluyeron que los insecticidas y herbicidas en general no afectan el crecimiento de estos hongos. Neves y col., (2001) mostraron que cepas de *Paecilomyces* spp. en presencia de insecticidas neonicotinoides tuvieron un mayor crecimiento vegetativo y producción de conidios que en los controles. Estos autores señalan la importancia de evaluar la germinación de los conidios en estudios de compatibilidad. Todorove y col., (1998) refuerzan dicho criterio ya que los conidios fúngicos son el punto crítico para el establecimiento de la infección en un manejo integrado de plagas.

Algunos autores sugieren que la aplicación de algunos pesticidas químicos sintéticos en dosis subletales aumenta la eficacia de los entomopatógenos sobre los insectos plaga, actuando como estresantes fisiológicos y predisponiendo al insecto al ataque del hongo (Inglis y col., 2001).

Alves y col., (1998) y Moino Jr. y Alves (1998) sugirieron posibles explicaciones a la compatibilidad; en primer lugar los hongos, como un mecanismo fisiológico de resistencia al insecticida, serían capaces de metabolizarlo y utilizarlo como nutriente secundario. O bien, en un ambiente tóxico, el hongo podría estar haciendo un esfuerzo reproductivo y así aumentar la producción de conidios. Pero también puede existir un efecto negativo sobre los hongos

entomopatógenos cuando se usan insecticidas. La utilización de insecticidas y agentes fúngicos incompatibles puede dar lugar a la supresión del desarrollo y reproducción del agente, y limitar así su efecto en el manejo integrado (Anderson y Roberts 1983; Duarte y col., 1992; Malo 1993). Las pruebas de compatibilidad *in vitro* tienen la ventaja de exponer al agente patógeno a la máxima actividad posible de productos químicos y/o productos de origen vegetal, situación que no ocurre en condiciones *in vivo*. Sin embargo, cuando un tratamiento es compatible *in vitro*, existe una fuerte evidencia de su selectividad en condiciones de campo. No obstante, una alta toxicidad *in vitro* no significa que el producto siempre será tóxico para ese patógeno *in vivo* (Alves y col., 1998). Este comportamiento de los insecticidas sobre el crecimiento de hongos entomopatógenos puede diferir debido a la naturaleza química de los productos y las especies de hongos que están interactuando con él (Antonio y col., 2001; Kumar y col., 2000).

El establecimiento efectivo de los hongos entomopatógenos en el medioambiente natural es fundamental para el control de insectos plaga. Ignorar este conocimiento podría ser un factor crucial, limitando la consistencia de control en el ecosistema real. La fluctuación de factores como actividad de agua y temperatura podría tener un impacto sobre el efecto de biocontrol. Por lo tanto, hongos como agentes de control biológico deben ser estables a factores abióticos fluctuantes (Magan 2001).

Tolerancia de los hongos entomopatógenos a factores abióticos fluctuantes y a dosis subletales de insecticidas químicos podría permitirnos obtener hongos entomopatógenos medioambientalmente competentes.

El triple efecto de pérdida debido a los insectos, hongos y micotoxinas puede ser devastador cuando las condiciones son favorables para el deterioro de los granos almacenados. El uso combinado de diferentes métodos tales como el uso de agentes de control biológico de insectos plaga vectores de hongos aflatoxicogénicos, sumado al uso de antioxidantes de grado alimentario en dosis subletales, podría ayudar a reducir los niveles de aflatoxinas en el maíz almacenado.

Evaluar la compatibilidad de cepas de *Purpureocillium lilacinum* con antioxidantes de grado alimentario y fitoquímicos naturales a diferentes actividades de agua. Analizar el impacto de los tratamientos con sustancias químicas y hongos entomopatógenos sobre los parámetros de crecimiento y la producción de aflatoxina de *Aspergillus* Sección *Flavi in vitro*.

1. Evaluación de la compatibilidad de *P. lilacinum* con sustancias insecticidas.

1.1 Materiales.

- Inóculo entomopatógeno. Descrito en I.2.2.1. N° de acceso al GenBank: JQ926202- 03-04- 05- 06- 07- 08- 10- 11- 12- 14- 16- 17- 18- 20- 22- 23- 25- 26- 27- 28 mantenidas a 4°C en tierra estéril .

- Agar Papa Dextrosa (PDA). Descrito en I.1.4.1.

- Solución acuosa: agua destilada + 0,01% tritón X-100.

1.1.2 Metodología.

Se utilizaron 21 cepas identificadas como *P. lilacinum*, aisladas originalmente de muestras de suelo obtenidas de un campo experimental de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina. Se identificaron y se depositaron en el GenBank. Todas las cepas mostraron virulencia contra *T. confusum*, *R. dominica* y *S. zeamais*. Estas cepas se mantienen en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba (Argentina).

A partir de cultivos en PDA de 7 días a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ de cada una de las cepas se prepararon suspensiones de 10^7 esporas mL^{-1} en solución acuosa.

1.2 Preparación de antioxidantes.

1.2.1 Materiales.

- Butilhidroxianisol (2*tert* butil-4-hidroxianisol) (BHA)

- Butilhidroxitolueno (2,6-di*tert*buti-p-cresol) (BHT)

- Etanol 95%

1.2.2 Metodología.

Se utilizaron antioxidantes de calidad industrial provistos por Eastman Chemical Company. El BHA con una pureza de 98,5% con elementos trazas de cenizas de sulfato $<0,01\%$, ácido cítrico $<2500\text{ mg g}^{-1}$, arsénico $<3\text{ mg g}^{-1}$ y metales pesados $<10\text{ mg g}^{-1}$. El BHT con 99% de pureza conteniendo como contaminantes cenizas $<0,02\%$, arsénico $<3\text{ mg g}^{-1}$ y metales pesados $<10\text{ mg g}^{-1}$. Los compuestos que contaminan los antioxidantes de calidad industrial no exceden los niveles permitidos por JECFA (1996). Las soluciones stock de BHA ($0,18\text{ mg mL}^{-1}$) y BHT ($0,22\text{ mg mL}^{-1}$) se prepararon en 95% de alcohol etílico.

El medio de cultivo fue tratado con una cantidad apropiada de cada antioxidante que se adicionó después de la preparación del medio a las siguientes concentraciones: BHA: 1 mM [$1,18\text{ mg mL}^{-1}$], BHT: 7 mM [$1,48\text{ mg mL}^{-1}$] y la mezcla de ambos BHA + BHT ($0,7\text{ mM} + 6\text{ mM}$) [$0,126$

mg mL⁻¹ + 1,27 mg mL⁻¹]. Se modificó la actividad acuosa del medio base AHM de acuerdo a Dallyn y Fox (1980), para obtener valores de 0,99, 0,97 y 0,95.

1.3 Preparación de fitoquímicos naturales.

1.3.1 Materiales.

- Ácido trans-cinámico (ácido 3-fenil-2-propenoico) (AC)
- Acido ferúlico (ácido trans-4-hidroxi-3-metoxicinámico) (AF)
- Etanol 80%

1.3.2 Metodología.

Se utilizaron fitoquímicos naturales provistos por Aldrich Chemical, Steinheim, Alemania. Las soluciones stock de AC (0,14 mg mL⁻¹) y AF (0,19 mg mL⁻¹) se prepararon en 80% de alcohol etílico.

El medio de cultivo fue tratado con una cantidad apropiada de cada fitoquímico que se adicionó después de la preparación del medio a las siguientes concentraciones: AC: 1 mM [0,14 mg mL⁻¹], AF: 7mM [1,35 mg mL⁻¹] y la mezcla de ambos AC + AF (0,6 mM + 2 mM) [0,08 mg mL⁻¹ + 0,39 mg mL⁻¹]. Se modificó la actividad acuosa del medio base AHM de acuerdo a Dallyn y Fox (1980), para obtener valores de 0,99, 0,97 y 0,95.

1.4 Determinación de la viabilidad de las esporas de *P. lilacinum* en agar harina de maíz.

1.4.1 Materiales.

- Agar Harina de maíz (AHM): maíz molido 30 g, agar-agar 15 g, agua destilada 1000 mL (Marín y col., 1998).

1.4.2 Metodología.

Siguiendo la metodología descrita por Nesci y col., (2004), se evaluó en medio agar harina de maíz (AHM) la compatibilidad de las 21 cepas de *P. lilacinum* con dosis de antioxidantes sintéticos de grado alimentario y fitoquímicos naturales. Para determinar las mejores dosis que no afectaran la viabilidad de las esporas se realizó una selección previa donde evaluamos las siguientes concentraciones: 1mM, 2mM, 3mM, 4mM, 5mM, 7mM y 10mM.

Una vez seleccionadas las mejores concentraciones, las soluciones de antioxidantes y fitoquímicos naturales se añadieron al medio AHM. El medio base utilizado se preparó colocando 30 g de maíz seco molido en 1 l de agua destilada y se colocó a baño María durante 60 min. La mezcla resultante se filtró a través de un filtro de gasa. Se completó el volumen de agua que pudo haberse evaporado. Se le agregó el agar y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min. La a_w del medio base (0,99) se ajustó a 0,97 y 0,95 por la adición de glicerol (Dallyn y Fox 1980). La

a_w de cada medio fue corroborada utilizando un equipo AquaLab (serie 4, TE, USA) y los medios se fraccionaron en placas de Petri estériles. En el tratamiento control, se añadió la cantidad equivalente de etanol, mientras que en el resto de los tratamientos se mantuvo la cantidad de agua. El recuento de hongos entomopatógenos se determinó por el método de diseminación en placa. Se inocularon alícuotas de 0,1 mL de las diluciones seriadas de una suspensión de 10^7 esporas mL^{-1} de cada aislamiento sobre los medios con los diferentes tratamientos. Las placas de Petri con los mismos valores de a_w se colocaron en bolsas de polietileno las cuales se sellaron, y se incubaron durante 25 días a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. El recuento de hongos con cada uno de los tratamientos se expresó como \log_{10} ufc mL^{-1} . Los datos recolectados se compararon con los obtenidos en los controles para determinar el efecto de los antioxidantes y fitoquímicos sobre la viabilidad de las esporas de los entomopatógenos. Los tratamientos fueron agrupados como compatibles o no-compatibles. Se consideraron compatibles los tratamientos en los que se observó un incremento en la viabilidad de las esporas, con respecto al obtenido en los controles ($>100\%$), mientras que los no-compatibles fueron aquellos que mostraron una reducción en la viabilidad de las esporas con respecto al control ($<100\%$) (Ganga Visalakshy y col., 2005).

2. Evaluación del efecto de las sustancias insecticidas y *P. lilacinum* sobre el crecimiento y la acumulación de AFB₁ por *A. flavus* en agar harina de maíz.

2.1. Preparación del inóculo aflatoxicogénico.

2.1.1. Materiales.

- Agar Extracto de Malta (MEA): Descripto en I.2.2.1.
- Cepa de *Aspergillus* Sección *Flavi*: *A. flavus* RCM89 mantenida en MEA a 4°C .
- Agar Harina de maíz (AHM). Descripto en II.1.4.1.
- Agar semisólido: Descripto en I.2.2.1.
- Cepas de *P. lilacinum*. Descripto en II.2.2.1.

2.1.2. Metodología.

Se trabajó con una cepa de *A. flavus* aflatoxicogénica, aislada a partir de maíz almacenado (Nesci y col., 2008) e identificada según Pitt y Hocking (1997), Klich y Pitt (1988) y Pitt (1988). La cepa se mantiene en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba (Argentina). Se preparó una suspensión en agar semisólido de 10^4 esporas mL^{-1} a partir de cultivos en MEA de 7 días a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.2. Preparación de antioxidantes. Descripto en II.1.2.

2.3. Evaluación de los parámetros de crecimiento.

2.3.1. Metodología.

Se evaluó el efecto de los antioxidantes sintéticos, fitoquímicos naturales y *P. lilacinum* sobre la fase de latencia y la velocidad de crecimiento de *A. flavus*. El medio básico utilizado en este ensayo fue AHM a tres a_w (0,99, 0,97 y 0,95). El ensayo consistió en evaluar las siguientes interacciones: *A. flavus* RCM89 + *P. lilacinum*; *A. flavus* RCM89 + BHA (1 mM) y *A. flavus* RCM89 + BHA (1mM) + *P. lilacinum*. Además se sembraron controles de cada género fúngico en AHM a las tres a_w .

Para la primera interacción, una alícuota de 1 mL de una suspensión de 10^7 esporas mL^{-1} de *P. lilacinum* fue vertida en placas de Petri con 20 mL de AHM. En la segunda interacción, el medio AHM fue modificado con BHA 1mM. Para la última interacción el medio con BHA 1mM se vertió en las placas de Petri que contenían 1mL de suspensión de *P. lilacinum*. En todos los tratamientos, una vez que el medio solidificó, se inóculo por punción central la suspensión de 10^4 esporas mL^{-1} de *A. flavus* RCM89 (Pitt 1979).

Todas las placas fueron incubadas en bolsas de polietileno, agrupadas de acuerdo a la a_w , a 25°C. Se midió el radio de la colonia diariamente o según fuera necesario en 2 direcciones en ángulo recto durante un período de 11 días. La velocidad de crecimiento radial (mm d^{-1}) fue calculada por regresión lineal de la fase lineal de crecimiento (extensión radial del micelio vs. tiempo), y el tiempo en el cual la línea interceptó el eje x se usó para calcular la fase de latencia en relación a *A. flavus* RCM89, las cepas fúngicas entomopatógenas, el antioxidante sintético y la actividad de agua. La fase de latencia corresponde al período de tiempo que transcurre desde que se inocula el hongo hasta que el desarrollo fúngico es visible. Durante la fase de latencia comienza la germinación de las esporas y la formación de las primeras hifas (Meletiadis y col., 2001). Una vez que la germinación ha comenzado dando lugar a las primeras hifas, se produce la difusión del micelio y formación de colonias macroscópicas.

Después de transcurrido el tiempo de incubación, se tomó un taco de micelio (1x1 cm) de cada placa, control y/o tratamiento, donde hubo desarrollo fúngico, para la posterior determinación y cuantificación de AFB₁.

2.4. Análisis de AFB₁.

2.4.1. Materiales.

- Para la extracción de aflatoxina B₁ se utilizaron los siguientes solventes y reactivos: cloroformo, acetonitrilo, metanol, ácido trifluoroacético, ácido acético glacial y agua.

- solución derivatizante: ácido trifluoroacético: ácido acético glacial: agua (20:10:70 v/v).

- Fase móvil: acetonitrilo: metanol: agua (1:1:4 v/v). Se filtró a través de filtro de 0,2 μm .

- Soluciones estándares de uso cromatográfico (HPLC) de aflatoxina B₁: 15,9 ng mL⁻¹, 5,07 ng mL⁻¹ y 3,9 ng mL⁻¹.

2.4.2. Metodología.

La extracción de aflatoxinas se realizó siguiendo la metodología propuesta por Geisen (1996) la cual fue adaptada para este ensayo. De cada colonia correspondiente a cada tratamiento y controles se tomó un trozo de AHM (1x1 cm). Se transfirió a un tubo eppendorf, previamente pesado, al cual se le adicionaron 500 µL de cloroformo. La mezcla fue centrifugada a 4000 rpm durante 20 minutos. El trozo de agar fue removido y el extracto clorofórmico fue evaporado. La determinación cuantitativa por Cromatografía Líquida de alta Eficacia (HPLC) se realizó según la metodología propuesta por Trucksess y col., (1994). Cada muestra fue suspendida en una mezcla de acetonitrilo:agua (9:1). Una alícuota de esa suspensión (200 µL) fue derivatizada con 700 µL de solución derivatizante. La toxina derivatizada (50 µL de solución) fue analizada usando un equipo de HPLC de fase reversa con un sistema de detección de fluorescencia. El sistema de HPLC consistió de una bomba Hewlett Packard 1100 (Palo Alto, CA, USA) conectada a un detector de fluorescencia programable Hewlett Packard 1046 y ambos conectados a un software Hewlett Packard. Las separaciones cromatográficas fueron desarrolladas en una columna de fase reversa C18 (150 x 4,6 mm d.i, tamaño de partícula 5 µm, Luna-Phenomenex, Torrance, CA) conectada a una precolumna SecurityGuard KJO-4282 (20 x 4,6 mm i.d, tamaño de partícula 5 µm, Phenomenex). Se usó la fase móvil a una velocidad de flujo de 1 mL min⁻¹. La fluorescencia de la aflatoxina derivatizada fue registrada a las longitudes de onda de excitación y emisión 360 y 440 nm, respectivamente. Se construyeron curvas de calibración con diferentes concentraciones de aflatoxina B₁. La AFB₁ fue cuantificada por correlación de la altura de los picos cromatográficos de los extractos de las muestras y las curvas estándares. El límite de detección del método analítico fue de 1 ng g⁻¹.

3. Análisis estadístico de los datos.

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para evaluar el efecto de tratamientos y actividades de agua sobre la viabilidad de las esporas del hongo entomopatógeno. Para establecer diferencias se realizó un test a posteriori con el método de comparación Waller-Duncan k-ratio t-test con un nivel de significancia p<0,05. Además, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para la fase de latencia y la velocidad de crecimiento, con un test a posteriori con el método de comparación Tuckey test p<0,05. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el programa SAS (versión 9.1 SAS Institutelnc, Cary NC, USA).

1. Evaluación de la compatibilidad de *P. lilacinum* con sustancias insecticidas.

1.1. Viabilidad de las esporas de *P. lilacinum* en presencia de antioxidantes (BHA - BHT) y fitoquímicos (AC - AF) en agar harina de maíz.

El análisis estadístico de los efectos de antioxidantes sintéticos y fitoquímicos naturales y la interacción entre los tratamientos y las cepas de *P. lilacinum* sobre la viabilidad de las esporas, mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$). El principal efecto fue el de las sustancias químicas ($F=39,15$) y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre cepas ($F=1,87$; $p < 0,0116$) y a_w ($F=0,10$; $p < 0,9015$). La figura II.1 resume el efecto de los tratamientos sobre las 21 cepas de *P. lilacinum* a las 3 a_w . El antioxidante de grado alimentario BHA, BHT, la mezcla BHA+BHT y el fitoquímico natural AC no tuvieron efecto significativo sobre el recuento de esporas de las 21 cepas de *P. lilacinum*. Por otro lado, el AF y la mezcla AF + AC causaron una reducción estadísticamente significativa en el recuento de esporas viables en relación al control. El recuento de esporas de *P. lilacinum* fue significativamente afectado con concentraciones más altas de BHA y AC (2, 3, 4, 5, 7 y 10 mM) y de BHT y AF (10mM).

El efecto de los tratamientos sobre la viabilidad de las esporas del hongo entomopatógeno se expresa como compatibilidad en los tratamientos en la tabla II.3. Catorce, 18, 14 y 8 cepas mostraron esporas viables con BHT, AC, la mezcla BHA + BHT y BHA respectivamente. En esos tratamientos la viabilidad de las esporas fue significativamente mayor que en los controles. La cepa JQ926212 con BHA mostró el menor número de esporas viables, mientras que la cepa JQ926222 mostró la mayor viabilidad de las esporas (117,8%). Con la mezcla BHA + BHT. Las cepas JQ926202 y JQ926222 mostraron compatibilidad con los 4 tratamientos evaluados.

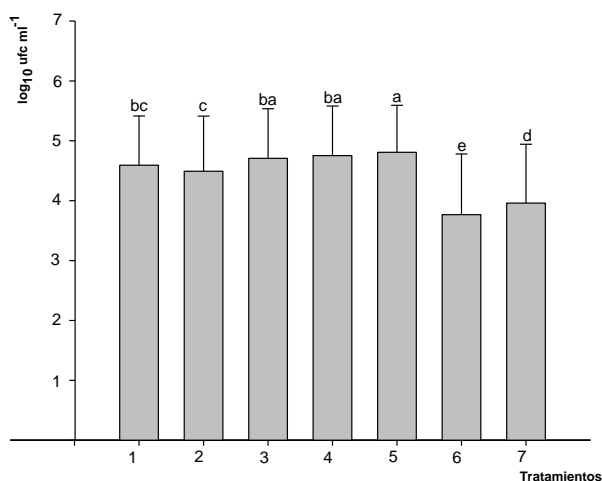


Figura II.1. Efecto de antioxidantes sintéticos y fitoquímicos naturales sobre la viabilidad de las esporas de 21 cepas de *P. lilacinum*, a tres actividades de agua. Las barras representan la media y el error estándar de cada tratamiento. Letras diferentes entre las barras indican diferencias significativas de acuerdo al test Waller-Duncan k-radio t-test (Radio K=100, Valor crítico T=1,75688, mínima diferencia significativa= 0,1634). (1) Control, (2) BHA: 1 mM, (3) BHT: 7 mM, (4) BHA + BHT: 0.7 + 6 mM, (5) CA: 1 mM, (6) FA: 7 mM and (7) CA + FA: 0,6 + 2 mM.

Tabla II.3. Porcentaje de compatibilidad entre *P. lilacinum* y los mejores tratamientos de antioxidantes sintéticos y fitoquímicos naturales.

Cepas de <i>P. lilacinum</i> (N° de acceso al GenBank)	Tratamientos			
	BHT	BHA+BHT	AC	BHA
JQ926202	104.5 (C)	117.8 (C)	111.5 (C)	102.1 (C)
JQ926203	91.5 (C)	112.4 (C)	84.1 (C)	93.0 (C)
JQ926204	107.8 (C)	113.5 (C)	96.2 (C)	101.9 (C)
JQ926205	101.1 (C)	96.1 (C)	105.8 (C)	104.7 (C)
JQ926206	108.4 (C)	114.8 (C)	103.0 (C)	95.8 (C)
JQ926207	104.3 (C)	101.9 (C)	103.2 (C)	95.6 (C)
JQ926208	100.4 (C)	99.1 (C)	106.1 (C)	96.5 (C)
JQ926210	96.5 (C)	100.6 (C)	99.3 (C)	98.7 (C)
JQ926211	108.9 (C)	102.8 (C)	105.0 (C)	98.2 (C)
JQ926212	104.5 (C)	113.2 (C)	102.3 (C)	83.2 (C)
JQ926214	103.9 (C)	95.6 (C)	110.0 (C)	97.4 (C)
JQ926216	93.4 (C)	86.9 (C)	111.5 (C)	102.4 (C)
JQ926217	98.2 (C)	112.8 (C)	105.6 (C)	105.2 (C)
JQ926218	96.1 (C)	101.1 (C)	103.2 (C)	93.7 (C)
JQ926220	97.3 (C)	105.8 (C)	107.6 (C)	86.5 (C)
JQ926222	107.1 (C)	112.2 (C)	102.6 (C)	101.7 (C)
JQ926223	103.9 (C)	102.3 (C)	110.6 (C)	98.7 (C)
JQ926225	100.2 (C)	90.4 (C)	116.1 (C)	101.7 (C)
JQ926226	101.7 (C)	93.8 (C)	108.4 (C)	101.7 (C)
JQ926227	110.4 (C)	1015 (C)	102.6 (C)	99.3 (C)
JQ926228	85.8 (C)	99.1 (C)	104.1 (C)	87.4 (C)

BHT: 7 mM; BHA + BHT: 0.7 + 6 mM; CA: 1 mM; BHA: 1 mM

Compatible (C): incremento en la viabilidad de las esporas con respecto al control (>100%).

No-compatible: reducción en la viabilidad de las esporas con respecto al control (<100%).

2. Evaluación del efecto de las sustancias insecticidas y *P. lilacinum* sobre el crecimiento y la acumulación de AFB₁ por *A. flavus* en agar harina de maíz.

2.1. Efecto de las sustancias insecticidas y *P. lilacinum* sobre la fase de latencia y la velocidad de crecimiento de *A. flavus*.

La tabla II. 4 muestra la fase de latencia de *A. flavus* a las 3 a_w ensayadas, con BHA, las 21 cepas de *P. lilacinum* y la combinación del BHA con las cepas entomopatógenas. Se observó una fase de latencia de *A. flavus* similar en las 3 a_w ensayadas en los controles, en un rango de 3,36 a 3,21 días. Mientras que en interacción con las 21 cepas de *P. lilacinum* la fase de latencia se incrementó a 17 días. De acuerdo con el test de Tukey, la fase de latencia de la cepa aflatoxicogénica fue significativamente influenciada por el antioxidante sintético BHA y la mezcla BHA + *P. lilacinum*.

Las 21 cepas de *P. lilacinum* en interacción con *A. flavus* en AHM, produjeron una completa inhibición del desarrollo de la cepa aflatoxicogénica a todas las a_w evaluadas. Mientras que el BHA produjo un control mayor al 70% en las mismas condiciones. Además, la mezcla del BHA con las 21 cepas de *P. lilacinum* inhibieron completamente el desarrollo de *A. flavus* a las a_w 0,99, 0,97 y 0,95. Por lo tanto las 21 cepas de *P. lilacinum* y la mezcla de estas cepas entomopatógenas con BHA (1 mM) incrementaron la fase de latencia e inhibieron la velocidad de crecimiento de *A. flavus* RCM89 a las a_w 0,99, 0,97 y 0,95 (tabla II.5).

Tabla II.4. Efecto de las interacciones *P. lilacinum*-antioxidante sintético-*A. flavus* sobre la fase de latencia (días) a diferentes actividades de agua.

Tratamiento	<i>A. flavus</i> RCM89		
	0.99	0.97	0.95
Control	3,21 ± 0,09a	3,44 ± 0,16 a	3,36 ± 0,49a
BHA 1 Mm	16,23 ± 2,32b	12,30 ± 1,77b	15,35 ± 0,21b
BHA + <i>P. lilacinum</i> *	>c	>c	>c
<i>P. lilacinum</i> *	>c	>c	>c

Los valores son la media de tres repeticiones. Las medias con una letra en común no son significativamente diferentes (Test de Tukey $p < 0,05$)

*Resumen del efecto de las 21 cepas de *P. lilacinum*
>17 días

Tabla II.5. Efecto del antioxidante sintético y *P. lilacinum* sobre la velocidad de crecimiento de *A. flavus* RCM89 (mm d^{-1}) a diferentes actividades de agua.

Tratamiento	<i>A. flavus</i> RCM89		
	0.99	0.97	0.95
Control	0.93±0.03a	0.87±0.04a	0.94±0.15a
BHA 1 mM	0.19±0.02b	0.25±0.03b	0.19±0.01b
BHA + <i>P. lilacinum</i> *	SDc	SDc	SDc
<i>P. lilacinum</i> *	SDc	SDc	SDc

Los valores son la media de tres repeticiones. Las medias con una letra en común no son significativamente diferentes (Test de Tukey $p < 0,05$)

*Resumen del efecto de las 21 cepas de *P. lilacinum*
SD: sin desarrollo

2.2. Análisis de AFB₁.

Se examinó la acumulación de aflatoxina B₁ en los cultivos controles de *A. flavus* RCM89 y en la interacción con las 21 cepas de *P. lilacinum* y la presencia de BHA en AHM a la a_w 0,99, 0,97 y 0,95. En los tratamientos controles, *A. flavus* acumuló diferentes niveles de aflatoxina B₁. El nivel más

alto se detectó a la a_w 0,97 (5,2 ng g⁻¹). A las a_w 0,99 y 0,95 los niveles de AFB₁ encontrados fueron menores (1,27 y 2,06 ng g⁻¹ respectivamente).

No se detectó producción de aflatoxina B₁ en la interacción del hongo entomopatógeno, el antioxidante BHA y la mezcla de ambos con la cepa de *Aspergillus* ensayada a todas las actividades de agua.

Este estudio se realizó para evaluar la compatibilidad de antioxidantes sintéticos de calidad alimentaria y fitoquímicos naturales con diferentes cepas de *P. lilacinum*, aisladas del agroecosistema de maíz. Los resultados muestran que el BHT, la mezcla BHA+BHT, el BHA y el AC fueron las sustancias que presentaron mayor compatibilidad con las 21 cepas de *P. lilacinum*. Inclusive, el crecimiento de algunas cepas se estimuló en presencia de algunos tratamientos.

Previamente, realizamos una evaluación sobre la actividad insecticida de antioxidantes sintéticos y fitoquímicos naturales contra insectos vectores de *A. flavus* en maíz almacenado y observamos que BHA, BHT, la mezcla BHA+BHT y la mezcla AC+AF en un rango de concentración de 20 a 30 mM, mostraron la mayor actividad insecticida contra *S. zeamais*, *T. confusum* y *R. dominica* después de 120 días de incubación (Nesci y col., 2011a). También evaluamos previamente el efecto de estas sustancias sobre los parámetros de crecimiento de *Aspergillus* Sección *Flavi* y la acumulación de aflatoxinas en medio de cultivo, granos de maíz estériles y granos contaminados naturalmente (Nesci y col., 2003; Nesci y Etcheverry 2006; Nesci y col., 2007; Nesci y col., 2008; Nesci y Etcheverry 2009; Nesci y col., 2009). Los resultados de estos estudios mostraron que el rango de concentración fungicida efectivo de estas sustancias se ubica entre 10 y 30 mM, similar al rango de concentración insecticida. Sin embargo, en el presente estudio observamos que los tratamientos que no afectaron la viabilidad de las esporas del hongo entomopatógeno se aplicaron en un rango de concentración de 0,6–7 mM. Este rango es más bajo que las concentraciones insecticidas y fungicidas efectivas. Por lo tanto, la combinación de las sustancias químicas en dosis subletales con los conidios del hongo entomopatógeno, permitirían lograr una supresión de hongos aflatoxicogénicos e insectos vectores, similar a la obtenida con los tratamientos químicos en dosis más elevadas. Este efecto fungicida, puede estar afectado por la naturaleza química de los productos y las especies fúngicas que se deseen controlar (Kumar y col., 2000; Antonio y col., 2001). El uso de sustancias insecticidas y agentes fúngicos incompatibles puede dar lugar a la supresión del desarrollo y reproducción del agente, y limitar así su efecto en el manejo integrado de plagas (Anderson y Roberts 1983; Duarte y col., 1992; Malo 1993). Akbar y col., (2012) mostraron que la viabilidad de los conidios de *Metarhizium anisopliae* fue muy afectada por los plaguicidas clorpirifós, profenofos y metalaxil. Huang y col., (2008) demostraron que los efectos inhibitorios sobre la germinación de conidios de *Paecilomyces fumosoroseus* aumentaron a medida que se incrementaron las concentraciones de abamectina, triadimefón y clorotalonil.

Los efectos inhibitorios de las sustancias químicas sobre la germinación y el crecimiento de los hongos entomopatógenos pueden variar entre taxones y cepas. Por lo tanto, es posible seleccionar los genotipos que son naturalmente menos susceptibles (Inglis y col., 2001). Sin embargo, en este

estudio no se observaron diferencias significativas entre las cepas de *P. lilacinum*. Se han desarrollado diferentes estudios sobre la compatibilidad de sustancias que se utilizan comúnmente como pesticidas y hongos entomopatógenos. Sin embargo, el presente estudio es el primer informe de compatibilidad entre fitoquímicos naturales y antioxidantes de grado alimentario con esporas de *P. lilacinum* en maíz. Inglis y col., (2001) mostraron que todos los productos agroquímicos son “inhibidores potenciales” de los Hyphomycetes entomopatógenos, incluyendo herbicidas, insecticidas y fungicidas. Sin embargo, una investigación más reciente sobre un estudio exhaustivo del efecto de productos químicos en el desarrollo de los hongos entomopatógenos, concluyó que los insecticidas y herbicidas, en general, no son perjudiciales para el desarrollo de este tipo de hongos (Klingen y Haukeland 2006). Alizadeh y col., (2007) evaluaron el efecto de varios plaguicidas sobre el desarrollo de hongos entomopatógenos y mostraron una baja inhibición fúngica cuando se usó imidacloprid. Algunos autores han demostrado que la adición de aceites de plantas con efectos insecticidas, tales como: el aceite de coco, aceite de neem y aceite de girasol pueden acelerar el crecimiento micelial y la esporulación de *Paecilomyces farinosus*, mejorando así su infectividad contra las plagas objetivo (Ganga Vishalakshy y col., 2005.). Nana y col., (2012) demostraron que la combinación de un extracto emulsificable de *Calpurnia aurea* con *M. anisopliae* no afectó los parámetros de crecimiento fúngico, como la germinación, el crecimiento radial, rendimiento en peso seco de conidios y micelios, independientemente de las concentraciones evaluadas. No existen investigaciones exhaustivas del mecanismo de acción de los antioxidantes y fitoquímicos como insecticidas naturales. Sólo un estudio mostró que el antioxidante BHT actúa como un agente protector de la feromona sexual sintética de *Acleris fimbriana*, incrementando la eficacia de captura (Liu y Meng 2003). La combinación de hongos entomopatógenos e insecticidas en concentraciones subletales puede mostrar efecto sinérgico (Delgado y col., 1999) o aditivo (Andreson y col., 1998). *B. bassiana* aplicada en combinación con imidacloprid contra *Diaprepes nucum* mostró efecto sinérgico, al actuar el imidacloprid como una toxina neural que afecta el comportamiento de los insectos y los predispone a la colonización fúngica (Quintela y McCoy 1998; Boucias y col., 1996).

El medio de cultivo empleado en este estudio, agar harina de maíz (AHM), fue específicamente seleccionado debido a que el ambiente de interacción del hongo entomopatógeno y *A. flavus* será el agroecosistema de almacenamiento de maíz. El desarrollo adecuado de *P. lilacinum* en AHM se produjo debido a que los sustratos ideales para el desarrollo de hongos entomopatógenos de acuerdo a algunos autores, son los cereales, por el importante contenido de carbono y nitrógeno, principales nutrientes requeridos para el crecimiento y esporulación fúngicos. La maltosa, una de las fuentes de carbono más importantes presente en maíz, es utilizada gracias a la acción de las enzimas de hidrólisis del almidón presentes en el hongo (Coudron y col., 1985).

En el presente estudio, la viabilidad de las esporas de las diferentes cepas de *P. lilacinum* no se vio afectada en el rango de actividad de agua evaluada. Por otra parte, las cepas de *P. lilacinum* en AHM mostraron un buen desarrollo a las actividades de agua y temperaturas óptimas de desarrollo y producción de toxinas por *Aspergillus* Sección *Flavi* (Gqaleni y col., 1996). Para la selección de potenciales agentes de biocontrol, es importante tener en cuenta la relación entre las interacciones biológicas y los factores ambientales estresantes (Nesci y col., 2005). Muchas interacciones fúngicas están influenciadas por la actividad de agua, la temperatura y el sustrato (Lacey y Magan 1991). Los cambios en estos factores ambientales tienen un impacto que podría ser crucial para determinar el nivel de co-existencia y el predominio de las especies en un nicho ecológico en particular (Marín y col., 1998; Nesci y col., 2005).

En el presente estudio observamos una inhibición total del desarrollo de *A. flavus* cuando esta cepa toxicogénica interactuó con diferentes cepas de *P. lilacinum*. Además, el BHA produjo un incremento en la fase de latencia y una reducción en la velocidad de crecimiento. Cuando el hongo aflatoxicogénico interactuó con las cepas entomopatógenas combinadas con el BHA, se produjo una inhibición total del crecimiento. Es importante reconocer el momento de germinación de las esporas del hongo toxicogénico, ya que el deterioro comienza tan pronto como la primera hifa puede ser observada. Por consiguiente, un tratamiento efectivo debe afectar tanto la germinación de las esporas como la velocidad de elongación de las hifas, resultando en una fase de latencia más prolongada.

Las cepas del hongo entomopatógeno y la mezcla de estas con el antioxidante BHA tuvieron un mayor efecto inhibitorio sobre el desarrollo del patógeno que cuando se aplicó el BHA solo. La capacidad de un microorganismo para competir y excluir a las especies toxicogénicas durante la colonización de un nicho en particular, aumenta la posibilidad de establecer al potencial agente de control biológico en los nichos específicos y contribuir a la reducción de inóculos indeseables en un ecosistema determinado (Etcheverry y col., 2009).

La producción de aflatoxina B₁ se observó solo en los controles a todas las actividades de agua evaluadas. Se observó una inhibición total de producción de la toxina en presencia del antioxidante BHA 1mM. Este resultado coincide con un estudio previo en el que se evaluó el efecto de los antioxidantes en la acumulación de aflatoxina B₁ en AHM a diferentes actividades de agua (Nesci y col., 2003). En este trabajo previo se observó estimulación de la producción de aflatoxinas en presencia de BHT 1, 10 y 20 mM a 0,98 a_w. El mismo efecto de estimulación se observó en presencia de ácido cinámico 1 y 5 mM a diferentes actividades de agua (Nesci y Etcheverry 2006). El BHA aplicado en dosis subletales no mostró estimulación en la producción de aflatoxinas, por lo tanto, la

compatibilidad entre esta sustancia y el hongo entomopatógeno, sugiere que es posible efectuar esta combinación para lograr un manejo integrado de plagas.

Teniendo como perspectiva la salud humana, el Codex Alimentarius (2006) y la Food and Drugs Administration (FDA) de EE.UU permiten el uso de antioxidantes fenólicos en alimentos debido a que son considerados químicos seguros (GRAS). Por otro lado, la gran diferenciación de huésped de infección entre las cepas de *P. lilacinus* (Fiedler y Sosnowska 2007), recientemente renombrado como *Purpureocillium lilacinum* (Luangsa-ard y col., 2011), considera el uso de este agente de control biológico como medioambientalmente seguro. Por lo tanto, el uso racional de estos químicos en dosis subletales en combinación con el agente de biocontrol, es una estrategia prometedora para un manejo integrado de plagas.

' El BHT, la mezcla BHA + BHT y el ácido cinámico fueron las sustancias que mostraron mayor compatibilidad con las cepas de *P. lilacinum*.

' Las cepas de *P. lilacinum* produjeron una completa inhibición del desarrollo del hongo toxicogénico *A. flavus* cuando crecieron en interacción.

' La presencia del antioxidante BHA (1mM a diferentes a_w) aumentó la fase de latencia y disminuyó la velocidad de crecimiento del patógeno *A. flavus*.

' El mayor efecto de inhibición sobre la velocidad de crecimiento del hongo aflatoxicogénico se produjo en presencia de los entomopatógenos. Este efecto es mayor que el producido por el BHA solo.

1. Adom KK., Liu RH. (2002) Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6182–6187.
2. Ahmand S. (1979) Inhibition of mold growth by butylated hydroxyanisole. [MS thesis]. Washington State University, Pulman, WA, USA.
3. Akbar S., Freed S., Hameed A., Tahira Gul H., Akmal M., Naem Malik M., Naeem M., Khan M. (2012) Compatibility of *Metarhizium anisopliae* with different insecticides and fungicides. *African Journal of Microbiology Research* 17: 3956-3962.
4. Alizadeh A., Samih MA., Khezri M., Riseh RS. (2007) Compatibility of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill with several pesticides. *International Journal of Agriculture and Biology* 9: 31-34.
5. Alves SB., Moino Jr. A., Almeida JEM. (1998) Produtos fitosanitários e entomopatógenos. In: Alves SB (ed.) *Controle microbiano de insetos* 217-238. São Paulo, Fealq, 1163 p.
6. Anderson TE., Roberts DW. (1983) Compatibility of *Beauveria bassiana* strain with formulations used in Colorado Potato Beetle (Coleoptera: *Chrysomelidae*) control. *Journal of Economic Entomology* 76: 1437-1441.
7. Anderson TE., Hajek AE., Roberts DW., Preisler K., Robertson JL. (1989) Colorado potato beetle (Coleoptera: *Chrysomelidae*): effects of combinations of *Beauveria bassiana* with insecticides. *Journal of Economic Entomology* 82: 83- 89.
8. Antonio BF., Almeida JEM., Clovis L. (2001) Effect of Thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. *Neotropic Entomology* 30: 437-447.
9. Beuchat LR., Jones WK. (1978) Effect of food preservatives and antioxidants on colony formation by heated conidia of *Aspergillus flavus*. *Acta Alimentaria* 7: 373–384.
10. Bishop CD., Thornton IB. (1977) Evaluation of the antifungal activity of the essential oils of *Monarda citriodora* var. *citriodora* and *Melaleuca alternifolia* on post harvest pathogen. *Journal of Essential Oil Research* 9: 77–82.
11. Bluma R., Landa M., Etcheverry M. (2009) Impact of volatile compounds generated by essential oils on *Aspergillus* section *Flavi* growth parameters and aflatoxin accumulation. *Journal of Science Food Agriculture* 89: 1473–1480.
12. Bluma R., Etcheverry G. (2008) Application of essential oils in maize grain: impact on *Aspergillus* section *Flavi* growth parameters and aflatoxin accumulation. *Food Microbiology* 25: 324-334.
13. Boucias DG., Stokes C., Storey G., Pendland JC. (1996) The effect of imidacloprid on the termite *Reticulitermes flavipes* and its interaction with the mycopathogen *Beauveria bassiana*. *Pflanzenchutz Nachr Bayer* 49: 103-145.
14. Bunzel M., Ralph J., Martia JM., Hatfield RD., Steinhart H. (2001) Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre. *Journal of Sciences Food Agriculture* 81: 653–60.

15. Casini C., Santajuliana M. (2012) Control de plagas en granos almacenados. Disponible en: <http://www.cosechaypostcosecha.org/data/articulos/postcosecha/ControlPlagasGranosAlmacenados.asp>. INTA EEA Manfredi.
16. Champ BR., Dyte CE. (1976) FAO global survey of pesticide susceptibility of stored grain pests. FAO Plant Production and Protection Series 5, FAO, Rome, Italy. 297 p.
17. Chang HC., Branen AL. (1975) Antimicrobial effects of butylated hydroxyanisole (BHA). *Journal of Food Science* 40: 349-351.
18. Chipley HR., Uraih N. (1980) Inhibition of *Aspergillus* growth and aflatoxin release by derivatives of benzoic acid. *Applied and Environmental Microbiology* 40: 352-357.
19. Clark RA., Casagrande RA., Wallace DB. (1982) Influence of pesticides on *Beauveria bassiana*, a pathogen of the Colorado potato beetle. *Environmental Entomology* 11: 67-70
20. Codex Alimentarius, 2006. Food Additive Details. Update up to the 29th session of the Codex Alimentarius Commission. The Joint FAO/WHO Committee on Food Additives. <http://www.codexalimentarius.net/web/jecfa>.
21. Coker RD. (1997) "Mycotoxins and their control: constraints and opportunities". Natural Resources Institute. University of Greenwich.
22. Coudron JA., Kroha MJ., El Sayed GN. (1985) A novel semi-liquid for propagating entomopathogenic fungi. *Journal of Invertebrated Pathology* 46: 335-336.
23. Crampton RF. (1977) Health and food chemicals. *Journal of Royal Society of Health*. October.
24. Cuthbertson AGS., Murchie AK. (2003) The impact of fungicides to control Apple scab (*Venturia inaequalis*) on the predatory mite *Anystis baccarum* and its prey *Aculus schlechtendali* (Apple rust mite) in Northern Ireland Brambley orchards. *Crop Protection* 22: 1125-1130.
25. Dadvison MP. (2005) Antimicrobial in food. Tylor & Francis (ed.) pp: 621-623.
26. Dallyn H., Fox A. (1980) Spoilage of material of reduced water activity by xerophilic fungi. In: Gould GH., Corry EL. (eds.) Microbial growth and survival in extreme environments. London and New York: Academic Press. pp. 129-139.
27. Dayakar S., Kanaujia KR., Rathore RRS. (2000) Compatibility of entomogenous fungi with commonly used insecticides for management of *Spodoptera litura* (Fab.). In: Ignacimuthu S., Sen A. (eds.) Microbials in Insect Pest Management. Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd, M. Delhi, Kolkata. pp. 47-52.
28. Delgado FX., Britton JH., Onsager J.A., Swearingen W. (1999) Field assessment of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and potential synergism with diflubenzuron for control of savana grasshopper complex (orthoptera) in Mali. *Journal of Invertebrated Pathology* 73: 34-39.
29. Duarte A., Menendez JM., Triguero N. (1992) Estudio preliminar sobre la compatibilidad de *Metarhizium anisopliae* con algunos plaguicidas químicos. *Revista Baracoa* 22: 31-39.
30. Dube B., Smart GC. (1987) Biological control of *Meloidogyne* by *Paecilomyces lilacinus* and *Pasteuria penetrans*. *Journal of Nematology* 19: 222-227.

31. Etcheverry M., Scandolaro A., Nesci A., Vilas Boas Ribeiro MS., Pereira P., Battilani P. (2009) Biological interactions to select biocontrol agents against toxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* from Maize. *Mycopathologia* 167: 287–295.
32. FAO/WHO (1975). Expert Committee on Food Additives, Toxicological evaluation of some food colors. Enzymes, flavor enhancers, thickening agents and certain other food additives. WHO Food Additives Series No. 6. Ginebra, Suiza. FAO, WHO. 2010. Codex Alimentarius. Pesticide Residues in Food. http://www.codexalimentarius.net/mrls/pestdes/jsp/pest_q-e.jsp
33. Farag RS., Daw ZY., Hewedi FM., El-Baroty GSA. (1989). Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *Journal of Food Protection* 52: 665–7.
34. Fennema OR. (1976). Principles of Food Science. Part 1. Food Chemistry. Dekker, New York.
35. Fiedler Z., Sosnowska D. (2007) Nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson is also a biological agent for control of greenhouse insects and mite pests. *BioControl* 52: 547-558.
36. Fung DYC., Taylor S. Kahan J. (1977) Effects of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) on growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Safety* 1: 39–53.
37. Ganga Visalakshy PN., Krishnamoorthy A., Kumar AM. (2005) Compatibility of plants oils and additives with *Paecilomyces farinosus*, a potential entomopathogenic fungus. *Journal of Food Agriculture and Environment* 1: 333-335.
38. Garcia D., Ramos AJ., Sanchis V., Marin S. (2009) Predicting Mycotoxins in Foods: A Review. *Food Microbiology* 26: 757-769. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2009.05.014>
39. Gardner W., Storey GW. (1995) Sensitivity of *Beauveria bassiana* to selecte herbicides. *Journal of Economic Entomology* 78: 1257–79.
40. Geisen, R., 1996. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 19: 388-392.
41. Golob, P., C. Moss, M. Dales, A. Fidge y J. Evans. 1999. The use of spices and medicinals as bioactive protectans for grains. FAO Agricultural Services. Boletín 137. Roma. 197 p.
42. Gqaleni N., Smith JE., Gettinby G. (1996) The production of cyclopiazonic acid by *Penicillium commune* and cyclopiazonic acid and aflatoxin by *Aspergillus flavus* as affected by water activity and temperature on maize grains. *Mycopathologia* 136: 103-108.
43. Gupta P., Paul MS., Sharma SN. (1999) Studies on compatibility of white muscardine fungus *Beauveria bassiana* with neem products. *Indian Phytopathology* 52: 278-280.
44. Hall RA. (1981) Laboratory studies on the effects of fungicides, acaricides and insecticides on the entomopathogenic fungus, *Verticillium lecanii*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 29: 39-48.
45. Hill RA., Lacey J. (1983) Factors determining the mycoflora of stored barley grain. *Annual Applied Biology* 102: 467-483.

46. Hirose E., Neves PMOJ., Zequi JAC., Martins LH., Peralta CH., Moino Jr. A. (2001) Effect of biofertilizers and neem oil on the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 44: 419-423.
47. Hodge, L. (1973). Environmental Pollution. Holt, Reinhart and Wiston Inc. New York.
48. Hua SST., Grosjean OK., Baker JL. (1999) Inhibition of aflatoxin biosynthesis by phenolic compounds. *Letters in Applied Microbiology* 29: 289–91.
49. Huang Z., Shun xiang R., Jian hui WU., Huang T. (2008) Effect of pesticides on infectious activity of *Paecilomyces fumosoroseus*. *Journal of South China Agricultural University* 3: 16-20
50. Inglis GD., Goettel MS., Butt TM., Strasser H. (2001) Use of Hyphomycetos fungi for managing insect pests. In: Butt TM., Jackson C., Magan N. (eds.) *Fungi as Biological Agents. Progress, Problems and Potential*. CAB Publishing, Wallingford, UK. pp. 23 69.
51. Jadhav SJ., Nimbalkar SS., Kulkarni D., Madhavi DL. (1996) Lipid oxidation in biological and food systems food antioxidants. Marcel Dekker, INC. New York. pp 5-63.
52. Jatala P. (1986) Biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 24: 453-489.
53. JECFA (1996) Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants in food. WHO Food Additives Series, N° 35. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva. pp. 3–86.
54. Kabara JJ. (1991) Phenols and chelators. In: Russell, N.J., Gould, G.W. (eds.) *Food Preservatives*. Blackie, London, pp. 200–214.
55. Khan A., Williams KL., Nevalainen HKM. (2006) Control of plant parasitic nematodes by *Paecilomyces lilacinus* and *Monacrosporium lysipagum* in pot trials. *BioControl* 51: 643– 658.
56. Klich MA., Pitt JI. (1988) Differentiation of *Aspergillus flavus* from *Aspergillus parasiticus* and other closely related species. *Transaction of the British Mycology Society* 91: 99-108.
57. Klingen I., Haukeland S. (2006) The soil as a reservoir for natural enemies of pest insects and mites with emphasis on fungi and nematodes. In: Eilenberg J., Hokkanen HMT. (eds.) *An ecological and societal approach to biological control*. Springer, Dordrecht. pp. 145–211.
58. Kumar A., Mukherjee P., Guha A., Adyantaya SD., Mandale AB., Kumar R., Sastry M. (2000) Amphoterization of colloidal gold particles by capping with valine molecules and their phase transfer from water to toluene by electrostatic complexation with fatty amine molecules. *Langmuir* 16: 9775– 9783.
59. Lacey J., Hill ST., Edwards MA. (1980) Microorganisms in stored grains their enumeration and significance. *Tropical Storage Products Information* 39: 19-33.
60. Lacey J., Magan N. (1991) Fungi in cereal grains: their occurrence, water and temperature relationships. In: Chelkowski J. (ed.) *Cereal Grain. Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage*. Elsevier, Amsterdam. pp. 77-117.

61. Li W., Wang XF., Sheng CF. (2004) Impact of sixteen Chemical pesticides on conidial germination of two entomophthoralean fungi: *Cinidiobolus thromboides* and *Pandora nouryi*. *Biocontrol Science and Technology* 14: 737-741.
62. Lin CCS., Fung DYC. (1983) Effect of BHA, BHT, TBHQ and PG on growth and toxigenesis of selected aspergilli. *Journal of Food Science* 48: 576–580.
63. Liu YX., Meng XZ. (2003) Trapping effect of synthetic sex pheromone of *Acleris fimbriana* (Lepidoptera: *Tortricidae*) in Chinese northern orchard. *Journal of Chemical Sciences* 58: 421-425.
64. Lloyd BJ., Siebenmorgen TJ., Beers KW. (2000) Effect of commercial processing on antioxidants in rice bran. *Chemistry Education Research* 77: 551–555.
65. Lopez MD., Jordan MJ., Pascual-Villalobos MJ. (2008) Toxic compounds in essential oils of coriander, caraway and basil active against stored rice pests. *Journal of Stored Products Research* 44: 273–278.
66. Luangsa-ard J., Houbraken J., Doorn T., Hong SB., Borman AM., Hywel Jones NL., Samson R. (2011) *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiological Letters* 321: 141–149.
67. Magan, N. (2001) Physiological approaches to improving the ecological fitness of fungal biocontrol agents. In: ed. Butt TM., Jackson C., Magan N. (eds.) *Fungi as Biocontrol Agents* Wallingford: CAB International.
68. Maillard MN., Berset C. (1995) Evolution of antioxidant activity during kitning: role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 43: 1789–1793.
69. Malo AR. (1993) Estudio sobre la compatibilidad del hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. con formulaciones comerciales de fungicidas e insecticidas. *Revista Colombiana de Entomología* 19: 151-158.
70. Marín S., Magan N., Abellana M., Canela R., Ramos AJ., Sanchis V. (2000) Selective effect of propionates and water activity on maize mycoflora and impact on fumonisin B₁ accumulation. *Journal of Stored Products Research* 36: 203–214.
71. Marín S., Sanchis V., Ramos AJ., Viñas I., Magan N. (1998) Environmental factors in vitro interactions and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize grain. *Mycological Research* 102: 831-837.
72. Marshall DL., Bullerman LB. (1986) Effect of sucrose esters in combination with selected mold inhibitors on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Food Protection* 49: 378–382.
73. Meitkiewski R., Gorski R. (1995) Growth of selected entomopathogenic fungi species and isolates on media containing insecticides. *Acta Mycologica* 30: 27-33.
74. Meletiadis J., Meis JF., Mouton JW., Verweij PE. (2001) Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 478-484.

75. Moino Jr. A., Alves SB. (1998) Efeito de Imidacloprid e Fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 27: 611-619.
76. Monro HA., Uptis E., Bond EJ. (1972) Resistance of a laboratory strain of *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: *Curculionidae*) to phosphine. *Journal of Stored Products Research* 8: 199-207.
77. Morgan Jones G., White GF., Rodriguez Kabana R. (1984) Phytonematode pathology: ultrastructural studies. II. Parasitism of *Meloidogyne arenaria* eggs and larvae by *Paecilomyces lilacinus*. *Nematropica* 14: 57-71.
78. Nana P., Maniania NK., Maranga RO., Boga HI., Kutima HL., Eloff JN. (2012) Compatibility between *Calpuria aurea* leaf extract, attraction aggregation, and attachment pheromone and entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* on viability, growth, and virulence of the pathogen. *Journal of Pest Science* 85: 109-115.
79. Nesci A., Barra P., Etcheverry M. (2011a) Integrated management of insect vectors of *Aspergillus flavus* in stored maize using synthetic antioxidants and natural phytochemicals. *Journal of Stored Products Research* 47: 231-237.
80. Nesci A., Montemarani A., Passone MA., Etcheverry M. (2011b) Insecticidal activity of synthetic antioxidants, natural phytochemicals, and essential oils against an *Aspergillus* Section *Flavi* vector (*Oryzaephilus surinamensis* L.) in microcosm. *Journal of Pest Science* 84: 107-115
81. Nesci A., Etcheverry M. (2009) Effect of natural maize phytochemicals on *Aspergillus* Section *Flavi* sclerotia characteristics under different conditions of growth media and water potential. *Fungal Ecology* 2: 44-51.
82. Nesci A., Marín S., Etcheverry M., Sanchis V. (2009) Natural maize phytochemicals for control of maize mycoflora and aflatoxigenic fungi. *World Mycotoxin Journal* 3: 305-312.
83. Nesci A., Ferrari L., Etcheverry M. (2008) Effect of synthetic antioxidants on stored maize grain mycoflora *in situ*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88: 797-804.
84. Nesci A., Gsponer N., Etcheverry M. (2007) Natural maize phenolic acids for control of aflatoxigenic fungi on maize. *Journal of Food Science* 72: 180-185.
85. Nesci A., Etcheverry M. (2006) Control of *Aspergillus* growth and aflatoxin production using natural maize phytochemicals under different conditions of water activity. *Pest Management Science* 62: 775-784.
86. Nesci A., Rodriguez M., Etcheverry M. (2003) Control of *Aspergillus* growth and aflatoxin production using antioxidants at different conditions of water activity and pH. *Journal of Applied Microbiology* 95: 279-287.
87. Neves PMOJ., Hirose E., Tchujo PT., Moino Jr. A. (2001) Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoid insecticides. *Neotropical Entomology* 30: 263- 68.
88. Nychas J. (1995) Natural antimicrobials from plants. En: Gould GW. (ed.) *New Methods of Food Preservation* p. 59-89. London: Chapman and Hall.

89. Oliveria GN., Neves PMOJ., Kawazoe LS. (2003) Compatibility between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and insecticides used in coffee plantations. *Scientia Agrícola* 60: 663-667.
90. Olmert I., Kenneth RG. (1974) Sensitivity of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, and *Verticillium sp.* to fungicides and insecticides. *Environmental Entomology* 3: 33-38.
91. Oser, B.L. (1978). Benefit/risk, whose, what, how much? *Food Technology* 32: 55.
92. Ou S., Kwok KC. (2004) Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of Science Food Agriculture* 84: 1261–1269.
93. Pacifici B. (2004) Germinazione della spora. Disponible en: [www.pacificinet.it/biologia/Micologia/Germinazione della spora.htm](http://www.pacificinet.it/biologia/Micologia/Germinazione%20della%20spora.htm).
94. Passone M., Etcheverry M. (2014) Antifungal impact of volatile fractions of *Peumus boldus* and *Lippia turbinata* on *Aspergillus* section *Flavi* and residual levels of these oils in irradiated peanut. *International Journal of Food Microbiology* 168-169: 17-23.
95. Passone M., Resnik S., Etcheverry M. (2008) The potential of food grade antioxidants in the control of *Aspergillus* section *Flavi*, interrelated mycoflora and aflatoxin B₁ accumulation on peanut grains. *Food Control* 19: 364-371.
96. Passone M., Resnik S., Etcheverry M. (2005) *In vitro* effect of phenolic antioxidants on germination, growth and aflatoxin B₁ accumulation by peanuts *Aspergillus* section *Flavi*. *Journal of Applied Microbiology* 99: 682–691.
97. Pepper EH., Klessling RL. (1963) A list of bacteria, fungi, yeast, nematode and viruses occurring on an withering barley kernels. *Poc. Ass of Seed analysis N. Am.* 53: 199-208.
98. Pimentela M., Guedesa R., Sousa A., Totolac M. (2009) Phosphine resistance in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: *Curculionidae*). *Journal of Stored Products Research* 45: 71-74.
99. Pina JI. (2012) Clasificación Toxicológica y Etiquetado de Productos Fitosanitarios. Criterios Regulatorios Locales e Internacionales. Primera ed. Buenos Aires: ILSI Argentina. Vol III. 40 p.
100. Pitt JI., Hocking AD. (1997) *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic and Professional, London.
101. Pitt JI. (1979) The Genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London.
102. Pitt JI. (1988) A laboratory guide to common *Penicillium* species. CSIRO Division of Food Research Sydney, North Ryde, Australia.
103. Purwar JP., Sachan GC. (2006) Synergistic effect of entomogenous fungi on some insecticides against Bihar hairy caterpillar *Spilarctia oblique* (Lepidoptera: *Arctiidae*). *Microbiological Research* 161: 38-42.
104. Quintela ED., McCoy CW. (1998) Synergistic effect of imidacloprid and two entomopathogenic fungi on the behavior and survival of larvae of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: *Curculionidae*) in soil. *Journal of Economic Entomology* 91: 110-122.

105. Regnault-Roger C, Hamraoui A (1993) Efficiency of plants from the south of France used as traditional protectants of *Phaseolus vulgaris* L. against its bruchid *Acanthoscelides obtectus* (Say). *Journal of Stored Products Research* 29: 259–264.
106. Rozman V., Kalinovic I., Korunic Z. (2007) Toxicity of naturally occurring compounds of *Lamiaceae* and *Lauraceae* to three stored-product insects. *Journal of Stored Products Research* 43: 349–355.
107. Sartori MR., Pacheco IA., Vilar RMG. (1991) Resistance to phosphine in stored grain insect in Brazil. In: Fleurat-Lessart F., Ducom P. (eds.) Proceedings of the 5th International Working Conference on Stored-products Protection. Bordeaux, France, 9-14 September 1990, pp. 1041-1049.
108. SAS. 2001. SAS System for Windows 6.11. Cary, N.C.: SAS Inst.
109. Serebrov VV., Khodyrev VP., Gerber ON., Tsvetkova VP. (2005) Perspectives of combined use of entomopathogenic fungi and chemical insecticides against Colorado beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). *Mycology and Phytopathology* 39: 89-98.
110. Shahidi F., Naczk M. (1995). Phenolic compounds in grains. In: Food phenolics: sources chemistry, effects, applications. Lancaster, Pa.: Tecomic Publishing Co. Inc. pp. 3–39.
111. Smid EJ, Gorris LGM (1999). Natural antimicrobials for food preservation. In: Rahman S., (ed.) Handbook of food preservation, CRC, New York.
- Stahmann MA., Abramson P., Wu L. (1975) A chromatographic method for estimating growth by glucosamine analysis of diseased tissues. *Biochemie und Physiologie Der Pflanzen* 168: 267– 76.
112. Taylor RWD. (1989) Phosphine: a major fumigant at risk. *International Pest Control* 31: 10-14.
113. Thompson DP. (1994) Minimum inhibitory concentration of esters of phydroxybenzoic acid (paraben) combinations against toxigenic fungi. *Journal of Food Protection* 57: 133–135.
114. Thompson DP. (1991) Effect of butylated hydroxyanisole on conidial germination of toxigenic species of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Food Protection* 54: 375–377.
115. Thompson DP. (1992) Inhibition of mycelial growth of mycotoxigenic fungi by phenolic antioxidants. *Mycologia* 84: 791–793.
116. Todorove SI., Coderre D., Duchesne RM., Côté JC. (1998) Compatibility of *Beauveria bassiana* with selected fungicide and herbicides. *Environmental Entomology* 27: 427–433
117. Trione EJ. (1981) Natural regulators of fungal development. In: Plant disease control: resistance and susceptibility. New York: Wiley. p 85–102.
118. Trucksess MW., Stack ME., Nesheim S., Albert RH., Romer TR. (1994) Multifunctional column coupled with liquid chromatography for determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂ in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts and pistachio nuts: collaborative study. *Journal of AOAC International* 6: 1512-1521.
119. Valle Vega P., Florentino BL. (2000) Toxicología de alimentos. Cap 4: aditivos Instituto Nacional de Salud Pública. Centro Nacional de Salud Ambiental, México, pp 129-169.

120. Weaver KD., Dunkel VF., Potter CR., Ntezurubanza L. (1994) Contact and fumigant efficacy of powdered and intact *Ocimum canum* Sims (Lamiales: *Lamiaceae*) against *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) adults (Coleoptera: *Bruchidae*). *Journal of Stored Products Research* 30: 243-252.
121. White PJ., Xing Y. (1997) Antioxidants from Cereals and Legumes. In: Shahidi F. (ed.) *Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects, and Applications*; AOCS Press: Champaign, IL.
122. Yousef AE., Marth EH. (1981) Growth and synthesis of aflatoxin by *Aspergillus parasiticus* in the presence of sorbic acid. *Journal of Food Protection* 44: 741-5.

Sección III

Actividad insecticida y/o fungicida del tratamiento combinado *Purpureocillium lilacinum* + agente químico en granos de maíz. Efecto sobre la acumulación de aflatoxina B₁.

Generalidades

El control biológico surge al comienzo del siglo XIX (Badii y col., 2000b) cuando algunos investigadores de diferentes países acentuaron el importante papel de los organismos entomófagos en la naturaleza. Con el biocontrol se intenta restablecer el perturbado equilibrio ecológico, mediante la utilización de organismos vivos o sus metabolitos, para eliminar o reducir los daños causados por organismos perjudiciales. La evolución natural de los sistemas de producción agraria han derivado en los últimos años hacia métodos de control de plagas y enfermedades más racionales y respetuosas con el medio ambiente, y de hecho amigable con la filosofía de desarrollo sustentable (Badii 2004; Badii y Abreu 2006a, b; Badii y Ruvalcaba 2006; Badii y col., 2005) y la noción de la conservación de recursos, la biodiversidad y la ética ambiental (Badii y col., 2000a). Estas nuevas técnicas han derivado hacia el concepto y desarrollo de la producción integrada (Badii y col., 2003a, b; 2004a, b).

Según Wilson y Pusey (1985) el control en las etapas de almacenamiento luego de la cosecha, puede ser una buena posibilidad para el tratamiento de los granos debido a que es posible controlar los parámetros ambientales en dicho agroecosistema. Sin embargo Droby y col., (1998) consideran que existe una pérdida de eficacia de los agentes de biocontrol cuando estos son estudiados bajo las condiciones naturales de almacenamiento.

El ecosistema del grano, después de la cosecha, sufre un profundo cambio que le permite la redistribución del inóculo fúngico como así también la introducción de inóculos adicionales. El proceso del desarrollo fúngico presenta dos fases: una metabólica primaria y otra secundaria, en ésta última puede llevarse a cabo la síntesis de micotoxinas. El desarrollo y la producción de toxinas pueden ocurrir sobre el cultivo en el campo, en el almacenamiento o en ambos. Cada hongo toxicogénico tiene requerimientos de humedad, temperatura, oxígeno y sustratos particulares para el crecimiento y desarrollo, los cuales pueden diferir de aquellos requeridos para la producción de toxinas (Magan y Lacey 1984).

La presencia de *A. flavus* en maíz antes de la cosecha había sido reportado por Taubenhau (1920) y Tuite (1961), sin embargo, fue el descubrimiento de la contaminación por aflatoxinas antes de la cosecha lo que invitó a prestar considerable atención a una investigación interdisciplinaria sobre la ecología y patología de un hongo que hasta ese momento se había clasificado como un "moho de almacenamiento".

En el campo y durante su almacenamiento, los granos se ven afectados por diferentes hongos saprófitos como especies del género *Aspergillus* (Cotty y col., 1994; Nesci y Etcheverry 2002; Nesci y col., 2008) que son la principal causa de degradación de los productos agrícolas. Además, los insectos plaga que se encuentran en los ecosistemas de almacenamiento también ocasionan importantes daños (Setamau y col., 1998). Como ya hemos mencionado, muchos insectos, además de dañar el grano son vectores de *Aspergillus* Sección *Flavi*, lo cual podría

umentar los niveles de aflatoxinas (Oshugi y col., 1999), por lo que es necesario el desarrollo de estrategias para lograr un control integrado.

A partir de lo expuesto, se puede resumir que el riesgo de contaminación en los granos de maíz con hongos y micotoxinas depende de una compleja interacción de varios factores entre los cuales se incluyen: el contenido de humedad, la temperatura, la composición de especies fúngicas, sus interacciones con los insectos y la historia previa del almacenamiento (Mills 1986; Miller 1995). La interacción entre los insectos con el medio ambiente a una temperatura y contenido de humedad favorables usualmente maximiza la actividad biológica, dando como resultado una rápida sucesión poblacional que culmina en un producto almacenado completamente deteriorado.

Previamente detallamos el uso actual de insecticidas químicos sintéticos para el manejo de plagas poscosecha, mencionando la peligrosidad que representan para la salud y el medioambiente, además de considerar el desarrollo de resistencia en los insectos.

Conociendo las exigencias del mercado y de los consumidores, entendemos que la tendencia es buscar alternativas para prevenir la entrada de xenobióticos en la cadena alimentaria (Jayashree y Subramanyam 1999). Por lo tanto, la búsqueda de métodos naturales para la protección de cultivos es válida, porque la oferta que existe en el mercado de fungicidas e insecticidas aún pertenece al paradigma de los productos sintéticos que resultan contaminantes ambientales.

El control biológico de insectos vectores de hongos aflatoxicogénicos, mediante el uso de hongos entomopatógenos, es otra alternativa que tratamos de desarrollar. Numerosos estudios muestran que diferentes aislados son potenciales agentes de biocontrol efectivos contra algunas plagas de productos almacenados (Tanya y Doberski 1984; Adane y col., 1996; Hidalgo y col., 1998; Dal Bello y col., 2001, Ekesi y col., 2001, Padin y col., 2002, Khashaveh y col., 2008). Sin embargo, existe una búsqueda constante de nuevos posibles agentes de biocontrol.

Evaluar mediante bioensayos, el efecto de *Purpureocillium lilacinum* y los agentes químicos seleccionados sobre *Sitophilus zeamais*, *Rhizopertha dominica* y *Tribolium confusum* y sobre la flora fúngica natural del grano de maíz. Analizar en granos de maíz estériles, acondicionados a diferentes a_w , el efecto insecticida de *P. lilacinum* combinado con los agentes químicos seleccionados contra *T. confusum*.

1. Efecto insecticida del tratamiento combinado *P. lilacinum* + BHT, la mezcla BHA + BHT y el fitoquímico natural AC contra *T. confusum*, *S. zeamais* y *R. dominica*, y fungicida sobre la flora fúngica natural del grano de maíz.

1.1. Preparación del inóculo entomopatógeno. Descripto en II.1.1.2.

1.2. Preparación de antioxidantes. Descripto en II.1.2.2.

1.3. Preparación de fitoquímicos naturales. Descripto en II.1.3.2.

1.4. Cultivo de insectos. Descripto en I.1.4.

1.5. Preparación del sustrato.

1.5.1. Materiales.

- granos de maíz naturales

1.5.2. Metodología.

Para realizar este estudio se utilizaron granos de maíz naturales, sin esterilizar, un aw inicial de 0,7625. Los granos se mantuvieron a 4°C hasta su utilización.

1.6. Condiciones de incubación.

1.6.1. Metodología.

Se pesaron submuestras de 500 g de granos de maíz contaminados naturalmente en recipientes plásticos de 500 mL de capacidad. Estas muestras fueron sometidas a 49 tratamientos que se detallan a continuación:

Tabla III.1. Tratamientos aplicados.

Tratamientos			
Sin insectos	con <i>S. zeamais</i>	con <i>R. dominica</i>	con <i>T. confusum</i>
T0: maíz acondicionado	TC1: maíz + <i>S. zeamais</i>	TC2: maíz + <i>R. dominica</i>	TC3: maíz + <i>T. confusum</i>
T1: maíz + <i>P. lilacinum</i> JQ926223 (control)	T10: maíz + <i>P. lilacinum</i> + <i>S. zeamais</i> + <i>A. flavus</i> + BHT	T13: maíz + <i>P. lilacinum</i> + <i>R. dominica</i> + <i>A. flavus</i> + BHT	T16: maíz + <i>P. lilacinum</i> + <i>T. confusum</i> + <i>A. flavus</i> + BHT
T2: maíz + <i>A. flavus</i> (control)	T10.1: maíz + <i>P. lilacinum</i> + <i>S. zeamais</i>	T13.1: maíz + <i>P. lilacinum</i> + <i>R. dominica</i>	T16.1: maíz + <i>P. lilacinum</i> + <i>T. confusum</i>
T3: maíz + <i>P. lilacinum</i> + BHT	T10.2: maíz + <i>A. flavus</i> + <i>S. zeamais</i>	T13.2: maíz + <i>A. flavus</i> + <i>R. dominica</i>	T16.2: maíz + <i>A. flavus</i> + <i>T. confusum</i>
T4: maíz + <i>P. lilacinum</i> + BHA:BHT	T10.3: maíz + <i>P. lilacinum</i> + <i>A. flavus</i> + <i>S. zeamais</i>	T13.3: maíz + <i>P. lilacinum</i> + <i>A. flavus</i> + <i>R. dominica</i>	T16.3: maíz + <i>P. lilacinum</i> + <i>A. flavus</i> + <i>T. confusum</i>

T5: maíz + <i>P. lilacinum</i> + AC	T10.3: maíz + <i>P. lilacinum</i> + <i>A. flavus</i> + <i>S. zeamais</i>	T13.4: maíz + <i>P. lilacinum</i> + <i>R. dominica</i> + BHT	T16.4: maíz + <i>P. lilacinum</i> + <i>T. confusum</i> + BHT
T6: maíz + <i>A. flavus</i> + BHT	T10.4: maíz + <i>P. lilacinum</i> + <i>S. zeamais</i> + BHT	T13.5: maíz + <i>A. flavus</i> + <i>R. dominica</i> + BHT	T16.5: maíz + <i>A. flavus</i> + <i>T. confusum</i> + BHT
T7: maíz + <i>A. flavus</i> + BHA:BHT	T10.5: maíz + <i>A. flavus</i> + <i>S. zeamais</i> + BHT	T14: maíz + <i>P. lilacinum</i> + <i>R. dominica</i> + <i>A. flavus</i> + BHA:BHT	T17: maíz + <i>P. lilacinum</i> + <i>T. confusum</i> + <i>A. flavus</i> + BHA:BHT
T8: maíz + <i>A. flavus</i> + AC	T11: maíz + <i>P. lilacinum</i> + <i>S. zeamais</i> + <i>A. flavus</i> + BHA:BHT	T14: maíz + <i>P. lilacinum</i> + <i>R. dominica</i> + <i>A. flavus</i> + BHA:BHT	T17.4: maíz + <i>P. lilacinum</i> + <i>T. confusum</i> + BHA:BHT
T9: maíz + <i>P. lilacinum</i> + <i>A. flavus</i>	T11.4: maíz + <i>P. lilacinum</i> + <i>S. zeamais</i> + BHA:BHT	T14.4: maíz + <i>P. lilacinum</i> + <i>R. dominica</i> + BHA:BHT	T17.5: maíz + <i>A. flavus</i> + <i>T. confusum</i> + BHA:BHT
	T11.5: maíz + <i>A. flavus</i> + <i>S. zeamais</i> + BHA:BHT	T14.5: maíz + <i>A. flavus</i> + <i>R. dominica</i> + BHA:BHT	T18: maíz + <i>P. lilacinum</i> + <i>T. confusum</i> + <i>A. flavus</i> + AC
	T12: maíz + <i>P. lilacinum</i> + <i>S. zeamais</i> + <i>A. flavus</i> + AC	T15: maíz + <i>P. lilacinum</i> + <i>R. dominica</i> + <i>A. flavus</i> + AC	T18.4: maíz + <i>P. lilacinum</i> + <i>T. confusum</i> + AC
	T12.4: maíz + <i>P. lilacinum</i> + <i>S. zeamais</i> + AC	T15.4: maíz + <i>P. lilacinum</i> + <i>R. dominica</i> + AC	T18.5: maíz + <i>A. flavus</i> + <i>T. confusum</i> + AC
	T12.5: maíz + <i>A. flavus</i> + <i>S. zeamais</i> + AC	T15.5: maíz + <i>A. flavus</i> + <i>R. dominica</i> + AC	

1.7. Determinación de las poblaciones fúngicas.

1.7.1. Materiales.

- Agar dicloran - rosa de bengala cloranfenicol (DRBC) suplementado con NaCl: glucosa 10 g; peptona de soya 5 g; KH_2PO_4 1 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g; dicloran 2 mg; cloranfenicol 100 mg; rosa de bengala 25 mg; NaCl 30 g; agar-agar 15 g; agua destilada 1000 mL.

- Medio de aislamiento semiselectivo para entomopatógenos (SM). Descrito en I.1.4.1
- solución de agua peptonada. Descrito en I.1.4.1.

1.7.2. Metodología.

Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se procesaron. De cada recipiente plástico se pesaron 10 g de granos de maíz, que fueron mezclados con 90 mL de la solución de agua peptonada, a partir de esta suspensión se realizaron diluciones decimales seriadas. Se sembraron alícuotas de 0.1 mL en placas de Petri que contenían medio de cultivo SM y medio de cultivo DRBC. Las placas de incubaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 10 días respectivamente. El recuento de esporas fúngicas se determinó como UFC g^{-1} en cada tratamiento. En los tratamientos que

contenían insectos, previamente se separaron los insectos de los granos distinguiendo los vivos de los muertos. Los insectos vivos se colocaron a -20°C durante 30 minutos. Los insectos fueron sembrados en ambos tipos de medio de cultivo: SM para verificar desarrollo de *P. lilacinum* y corroborar que fue el agente causal de muerte; y DRBC para constatar que dichos insectos son vectores del hongo aflatoxicogénico. Las placas donde fueron sembrados se incubaron a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta observar desarrollo fúngico a partir del insecto.

2. Efecto insecticida del tratamiento combinado *P. lilacinum* + BHT contra *T. confusum* en granos de maíz estériles acondicionados a diferentes actividades de agua.

2.1. Preparación del sustrato.

2.1.1. Materiales.

- granos de maíz naturales esterilizados con 2 ciclos de autoclave (121°C durante 15 minutos).

- agua destilada estéril

2.1.2. Metodología.

Para realizar este estudio se utilizaron granos de maíz naturales estériles con un nivel inicial de a_w de 0,7625, los cuales se mantuvieron a 4°C . Mediante la adición de agua destilada estéril, los granos de maíz se rehidrataron y se llevaron a las actividades acuosas de 0,995, 0,971 y 0,955 de acuerdo a la curva de adsorción de humedad de los mismos. Los granos se almacenaron a 4°C durante 48 h, con agitaciones periódicas, permitiendo con esta homogeneización lograr la a_w requerida. Luego del período de acondicionamiento se midió la a_w de los granos utilizando un equipo de medición AquaLab (series 4, TE, USA).

Los recipientes plásticos con el maíz acondicionado a cada a_w , se inocularon con 1 mL de una suspensión de esporas (10^4 esporas mL^{-1}) de *A. flavus* y/o 1 mL de una suspensión de esporas (10^7 esporas mL^{-1}) de *P. lilacinum*, de acuerdo al tratamiento. Este volumen de agua ya había sido sustraído de la cantidad inicial de agua añadida para la rehidratación para mantener el nivel de a_w del grano. Veinte adultos de *T. confusum*, fueron colocados en cada recipiente. Se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento. Todos los recipientes se incubaron en una cámara conteniendo recipientes con soluciones de glicerol-agua de la misma a_w que los tratamientos, con la finalidad de mantener la humedad relativa en el equilibrio correcto. Las cámaras se incubaron a $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 11 días. Los tratamientos aplicados se detallan en la tabla III.2:

Tabla III.2. Tratamientos aplicados.

Tratamiento	Maíz (g)	N° de insectos (<i>T. confusum</i>)	Compuesto químico	Inóculo fúngico
1	500			
2	500			<i>P. lilacinum</i>
3	500			<i>A. flavus</i>
4	500		BHT	<i>P. lilacinum</i>
5	500		BHT	<i>A. flavus</i>
6	500	20		
7	500	20		<i>P. lilacinum</i>
8	500	20		<i>A. flavus</i>
9	500	20		<i>P. lilacinum</i> + <i>A. flavus</i>
10	500	20	BHT	<i>P. lilacinum</i>
11	500	20	BHT	<i>A. flavus</i>
12	500	20	BHT	<i>P. lilacinum</i> + <i>A. flavus</i>
13	500	20	BHT	

2.2. Determinación de las poblaciones fúngicas. Descripto en III.1.7.

Después de 11 días de incubación ($27 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 5\%$ HR, y fotoperíodo de 12:12h) se tomó una muestra de 40 g de granos de maíz de cada tratamiento para la cuantificación de aflatoxina B₁.

3. Análisis de AFB₁.

3.1. Materiales.

- Solvente de extracción
- Columna multifuncional (Mycosep 224, MFC, Romer®)
- Solución derivatizante
- Fase móvil
- Solución estándar de uso cromatográfico (HPLC) de aflatoxina B₁: 15.9 ng mL⁻¹, 5.07 ng mL⁻¹ y 3.9 ng mL⁻¹.

3.2. Metodología.

La determinación de AFB₁ se desarrolló de acuerdo al método oficial AOAC 994.08 con modificaciones. Se tomaron de cada tratamiento 50 g de maíz molido y se realizó la extracción con 100 mL de una solución de acetonitrilo:agua (9:1 v/v) en agitación durante 30 min el sobrenadante se filtró a través de papel de filtro Whatman N° 4. Una alícuota de 5 mL del extracto se colocó en una columna de limpieza multifuncional (Mycosep® 224 AflaZon, RomerLabs, Inc. América). El filtrado (2mL) se evaporó a sequedad y se redisolvió en 400 µL de fase móvil antes del análisis por HPLC. La cuantificación de aflatoxina se desarrolló por cromatografía líquida de

alta eficacia (HPLC) de acuerdo a Trucksess y col., (1994) con algunas modificaciones (Descrito en II.2.4.2.)

4. Análisis estadístico de los datos.

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para evaluar el efecto de tratamientos y actividades de agua sobre el recuento fúngico y la actividad insecticida, utilizando el programa estadístico InfoStat para Windows versión 2008 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Para establecer diferencias se realizó un test a posteriori con el método de comparación Tuckey test con un nivel de significancia $p < 0,05$.

1. Efecto insecticida del tratamiento combinado *P. lilacinum* + BHT, la mezcla BHA + BHT y el fitoquímico natural AC contra *T. confusum*, *S. zeamais* y *R. dominica*. Evaluación del efecto fungicida sobre la flora fúngica natural del grano de maíz.

En la figura III.1 se muestra el efecto de *P. lilacinum* JQ926223 y los agentes químicos seleccionados sobre la flora fúngica natural del grano de maíz. Se observó una reducción significativa de la flora fúngica total en presencia del tratamiento T3 (*P. lilacinum* + BHT) con un recuento de 8 log, mientras que, el resto de los tratamientos no mostraron diferencias con respecto al control, el cual presentó un recuento de 10 log. Los diferentes tratamientos afectaron de manera diferente el recuento del hongo toxicogénico y del entomopatógeno. Se observó el menor recuento de *A. flavus* con el tratamiento T3, mientras que *P. lilacinum* con este tratamiento no mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al control.

La evaluación del efecto de los mismos tratamientos se realizó para los tres insectos plaga de maíz almacenado. En presencia de *S. zeamais* (figura III.2) todos los tratamientos redujeron significativamente el recuento fúngico total, a excepción del tratamiento T11 (*P. lilacinum* + *A. flavus* + insecto + (BHA+BHT)) y T12.4 (*P. lilacinum* + insecto + AC). Con los tratamientos T10.3 (*P. lilacinum* + *A. flavus* + insecto) y T10.4 (*P. lilacinum* + insecto + BHT) no se detectó recuento de *P. lilacinum*. En presencia de *R. dominica* (figura III.3) y *T. confusum* (figura III.4), ningún tratamiento mostró reducciones estadísticamente significativas en el recuento fúngico total, con respecto al control que fue de 9 unidades log. El mismo efecto se observó sobre el recuento de *A. flavus* en presencia de *R. dominica*, mientras que en presencia de *T. confusum* y el tratamiento T16.4 (*P. lilacinum* + insecto + BHT) el recuento de *A. flavus* fue de 8 log. El recuento de *P. lilacinum* no se vio afectado por ningún tratamiento en presencia de *T. confusum*, incluso se obtuvieron recuentos de 10 log con los tratamientos T16.4 y T17.4 (*P. lilacinum* + insecto + BHT y *P. lilacinum* + insecto + (BHA+BHT), respectivamente) que fueron superiores al recuento obtenido en el control (7 log). Similares resultados observamos en presencia de *R. dominica*. Ningún tratamiento afectó significativamente el recuento de *P. lilacinum* a excepción del tratamiento T13.3 (*P. lilacinum* + *A. flavus* + insecto) donde se observó inhibición total del desarrollo.

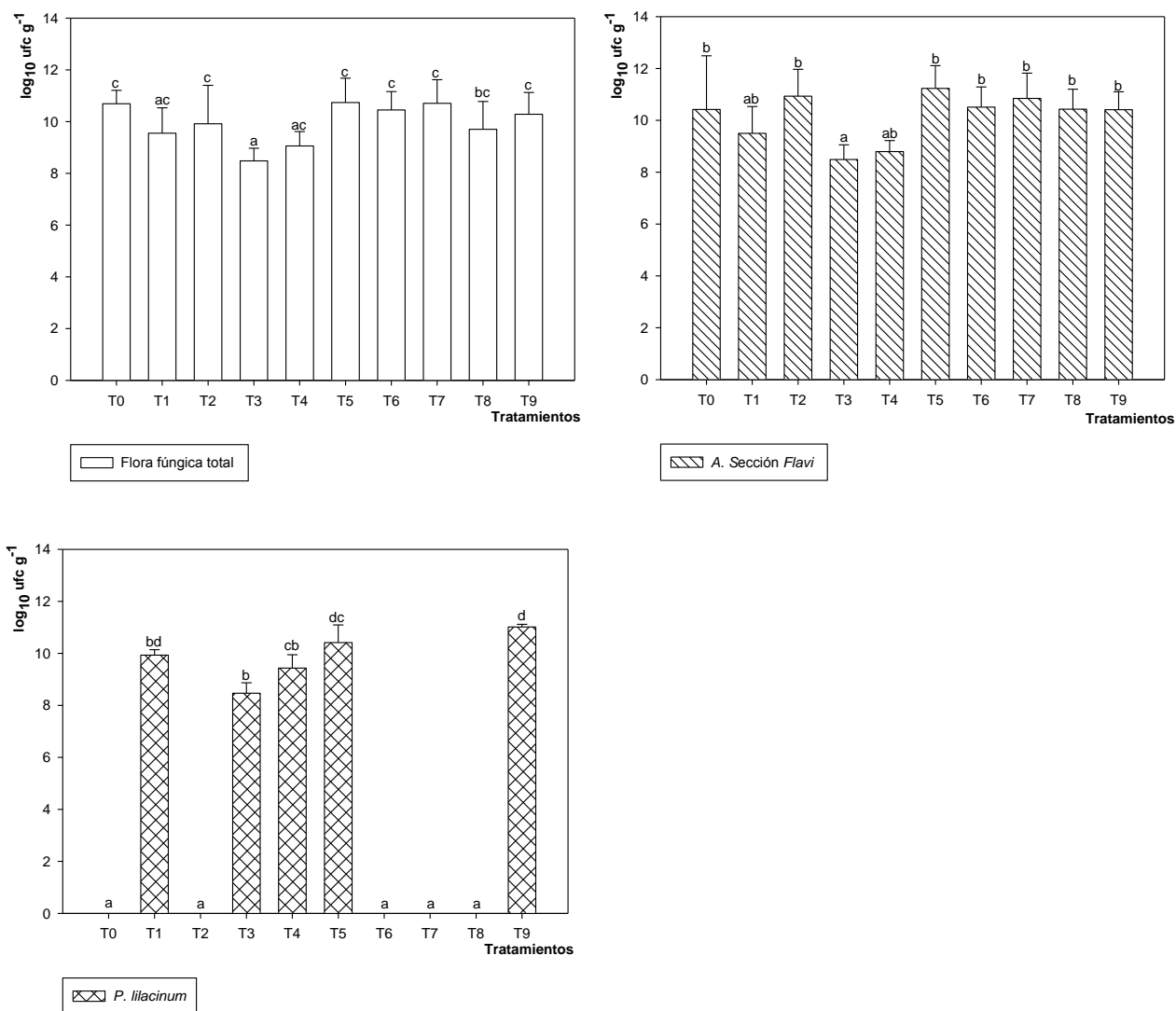


Figura III.1. Efecto de diferentes tratamientos T0: maíz acondicionado (control); T1: maíz + *P. lilacinum* JQ926223; T2: maíz + *A. flavus* RCM89; T3: maíz + *P. lilacinum* + BHT; T4: maíz + *P. lilacinum* + (BHA+BHT); T5: maíz + *P. lilacinum* + AC; T6: maíz + *A. flavus* + BHT; T7: maíz + *A. flavus* + (BHA+BHT); T8: maíz + *A. flavus* + AC; T9: maíz + *P. lilacinum* + *A. flavus*; sobre el recuento fúngico total de maíz, el recuento de *A. flavus* y el de *P. lilacinum*.

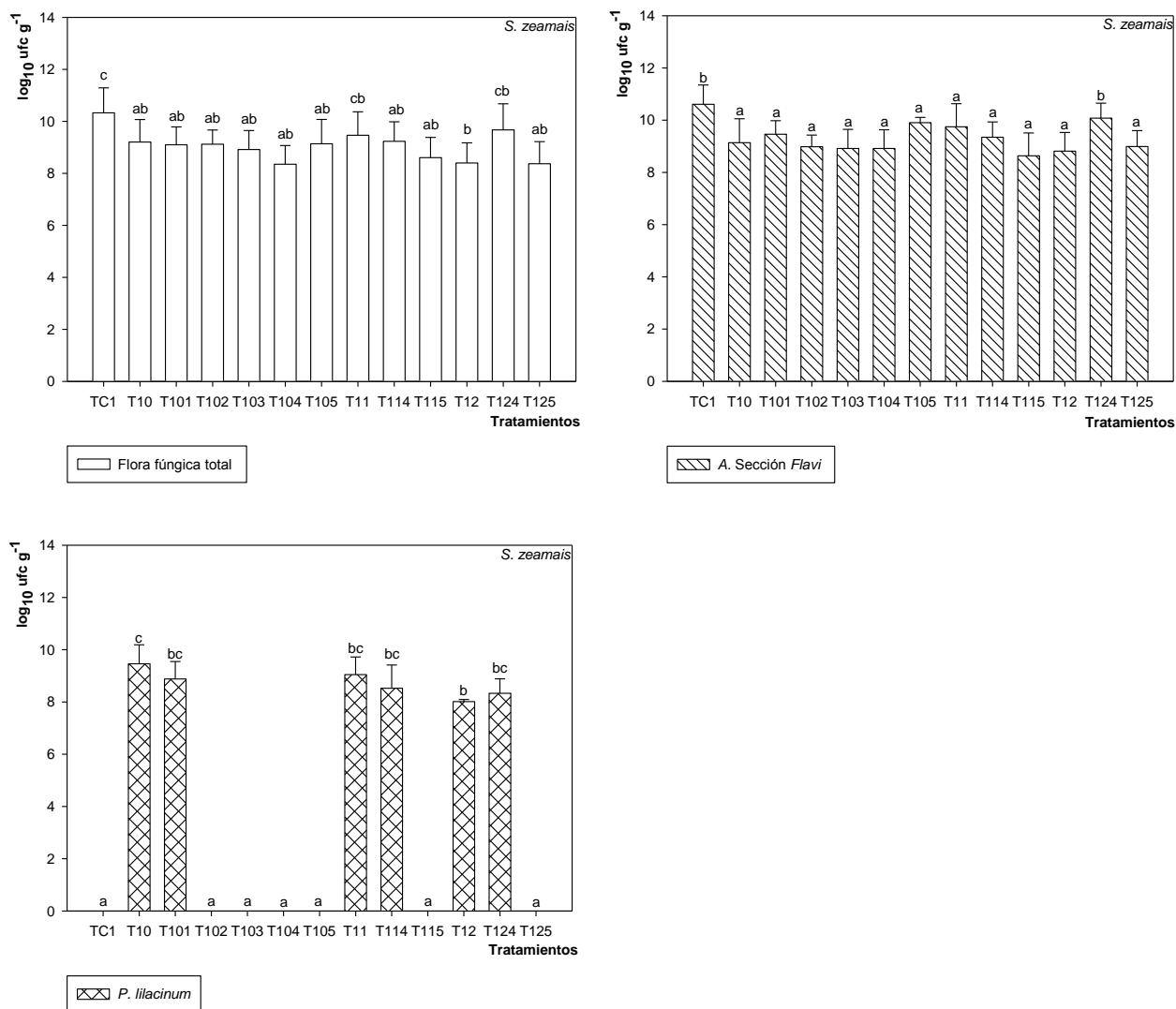


Figura III.2. Efecto de diferentes tratamientos TC1: maíz + *S. zeamais* ; T10/13/16: *P. lilacinum* JQ926223 + *A. flavus* RCM89 + BHT + *S. zeamais*; T10.1/13.1/16.1: *P. lilacinum* + *S. zeamais*; T10.2/13.2/16.2: *A. flavus* + *S. zeamais*; T10.3/13.3/16.3: *P. lilacinum* + *A. flavus* + *S. zeamais*; T10.4/13.4/16.4: *P. lilacinum* + *S. zeamais* + BHT; T10.5/13.5/16.5: *A. flavus* + *S. zeamais* + BHT; T11/14/17: *P. lilacinum* + *A. flavus* + *S. zeamais* + (BHA+BHT); T11.4/14.4/17.4: *P. lilacinum* + *S. zeamais* + (BHA+BHT); T11.5/14.5/17.5: *A. flavus* + *S. zeamais* + (BHA+BHT); T12/15/18: *P. lilacinum* + *A. flavus* + *S. zeamais* + AC; T12.4/15.4/18.4: *P. lilacinum* + *S. zeamais* + AC; T12.5/15.5/18.5: *A. flavus* + *S. zeamais* + AC; sobre el recuento fúngico total de maíz, el recuento de *A. flavus* y el de *P. lilacinum*.

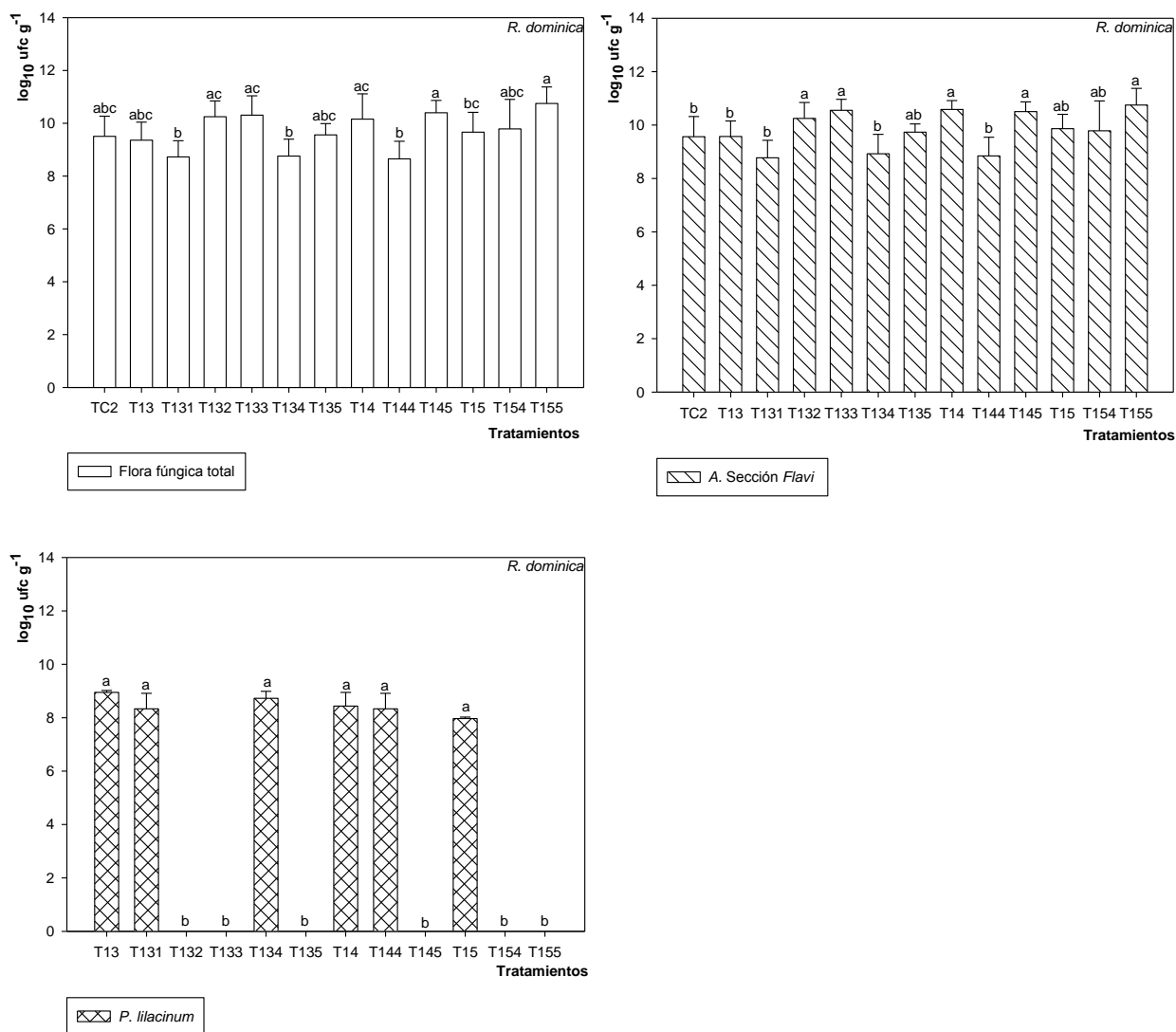


Figura III.3. Efecto de diferentes tratamientos TC1: maíz + *R. dominica* ; T10/13/16: *P. lilacinum* JQ926223 + *A. flavus* RCM89 +BHT+*R. dominica*; T10.1/13.1/16.1: *P. lilacinum* + *R. dominica*; T10.2/13.2/16.2: *A. flavus* + *R. dominica*; T10.3/13.3/16.3: *P. lilacinum* + *A. flavus* + *R. dominica*; T10.4/13.4/16.4: *P. lilacinum* + *R. dominica* + BHT; T10.5/13.5/16.5: *A. flavus* + *R. dominica* + BHT; T11/14/17: *P. lilacinum* + *A. flavus* + *R. dominica* + BHA:BHT; T11.4/14.4/17.4: *P. lilacinum* + *R. dominica* +(BHA+BHT); T11.5/14.5/17.5: *A. flavus* + *R. dominica* + (BHA+BHT); T12/15/18: *P. lilacinum* + *A. flavus* + *R. dominica* + AC; T12.4/15.4/18.4: *P. lilacinum* + *R. dominica* + AC; T12.5/15.5/18.5: *A. flavus* + *R. dominica* + AC; sobre el recuento fúngico total de maíz, el recuento de *A. flavus* y el de *P. lilacinum*.

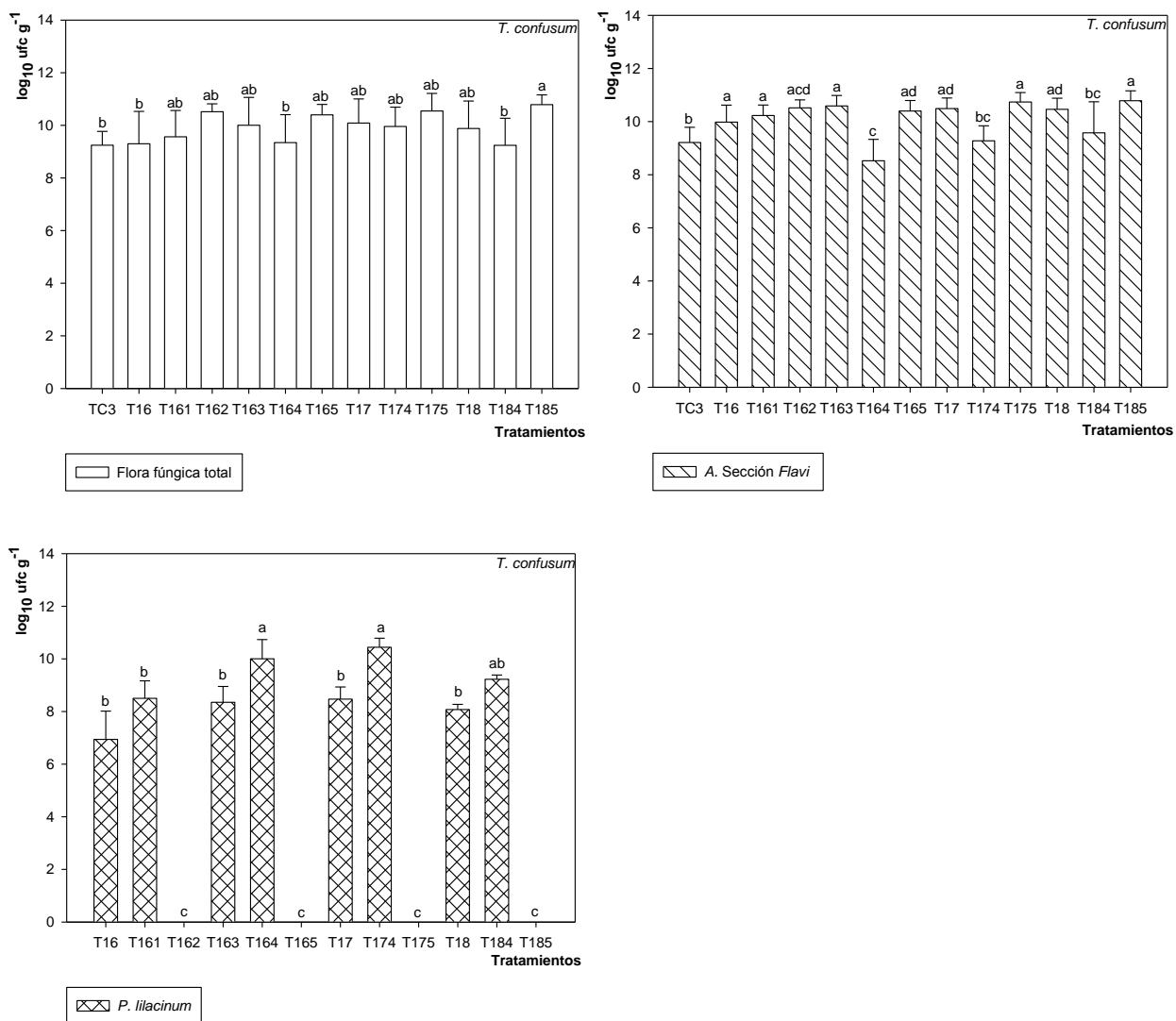


Figura III.4. Efecto de diferentes tratamientos TC1: maíz + *T. confusum*; T10/13/16: *P. lilacinum* JQ926223 + *A. flavus* RCM89 + BHT + *T. confusum*; T10.1/13.1/16.1: *P. lilacinum* + *T. confusum*; T10.2/13.2/16.2: *A. flavus* + *T. confusum*; T10.3/13.3/16.3: *P. lilacinum* + *A. flavus* + *T. confusum*; T10.4/13.4/16.4: *P. lilacinum* + *T. confusum* + BHT; T10.5/13.5/16.5: *A. flavus* + *T. confusum* + BHT; T11/14/17: *P. lilacinum* + *A. flavus* + *T. confusum* + (BHA+BHT); T11.4/14.4/17.4: *P. lilacinum* + *T. confusum* + (BHA+BHT); T11.5/14.5/17.5: *A. flavus* + *T. confusum* + (BHA+BHT); T12/15/18: *P. lilacinum* + *A. flavus* + *T. confusum* + AC; T12.4/15.4/18.4: *P. lilacinum* + *T. confusum* + AC; T12.5/15.5/18.5: *A. flavus* + *T. confusum* + AC; sobre el recuento fúngico total de maíz, el recuento de *A. flavus* y el de *P. lilacinum*.

Los tratamientos mostraron diferencias estadísticamente significativas en la actividad insecticida después de 11 días de exposición ($p < 0,0001$). El hongo entomopatógeno combinado con el antioxidante BHT (T6) y el fitoquímico AC (T12) mostraron un 100% de efectividad insecticida contra los 3 insectos ensayados. Un comportamiento similar se observó con el tratamiento BHA+BHT con y sin inóculo de *P. lilacinum* (T8 y T10 respectivamente) y con el tratamiento de AC solo (T13) (figura III.5).

También se evaluó la frecuencia de aislamiento del hongo toxicogénico a partir de los insectos vectores expuestos a los diferentes tratamientos (figura III.6). La frecuencia de aislamiento de *A. flavus* en insectos vivos y muertos mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$). Los insectos mostraron contaminación con *A. flavus*, en todos los tratamientos. Los insectos vivos y muertos recuperados de los controles (T1) y los insectos muertos de todos los tratamientos, para los tres insectos evaluados, mostraron 100% de contaminación con *A. flavus*. Mientras que no se aisló *A. flavus* de los insectos vivos recuperados de los tratamientos T6, T8, T10, T12 y T13.

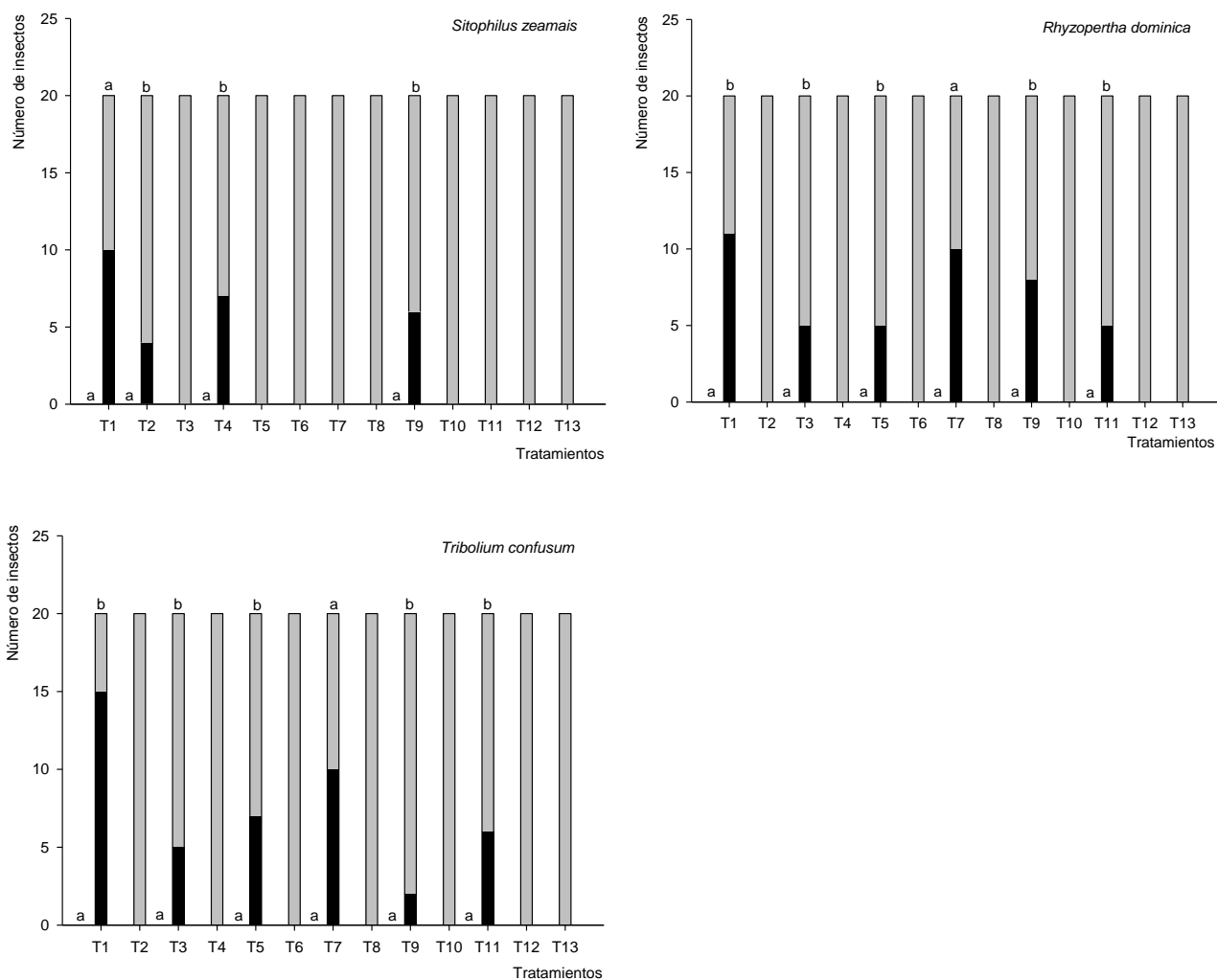


Figura III.5. Actividad insecticida de los diferentes tratamientos contra *Sitophilus zeamais*, *Rhyzopertha dominica* y *Tribolium confusum*. Negro: insectos vivos. Gris: insectos muertos. T1: maíz + insecto; T2: *P. lilacinum* JQ926223 + *A. flavus* + BHT + insecto; T3: *P. lilacinum* + insecto; T4: *A. flavus* + insecto; T5: *P. lilacinum* + *A. flavus* + insecto; T6: *P. lilacinum* + insecto + BHT; T7: *A. flavus* + insecto + BHT; T8: *P. lilacinum* + *A. flavus* + insecto + (BHA+BHT); T9: *P. lilacinum* + insecto + (BHA+BHT); T10: *A. flavus* + insecto + (BHA+BHT); T11: *P. lilacinum* + *A. flavus* + insecto + AC; T12: *P. lilacinum* + insecto + AC; T13: *A. flavus* + insecto + AC. Los insectos vivos y muertos de cada tratamiento con la misma letra no tienen diferencia estadísticamente significativa de acuerdo al test de Tuckey ($p < 0,05$).

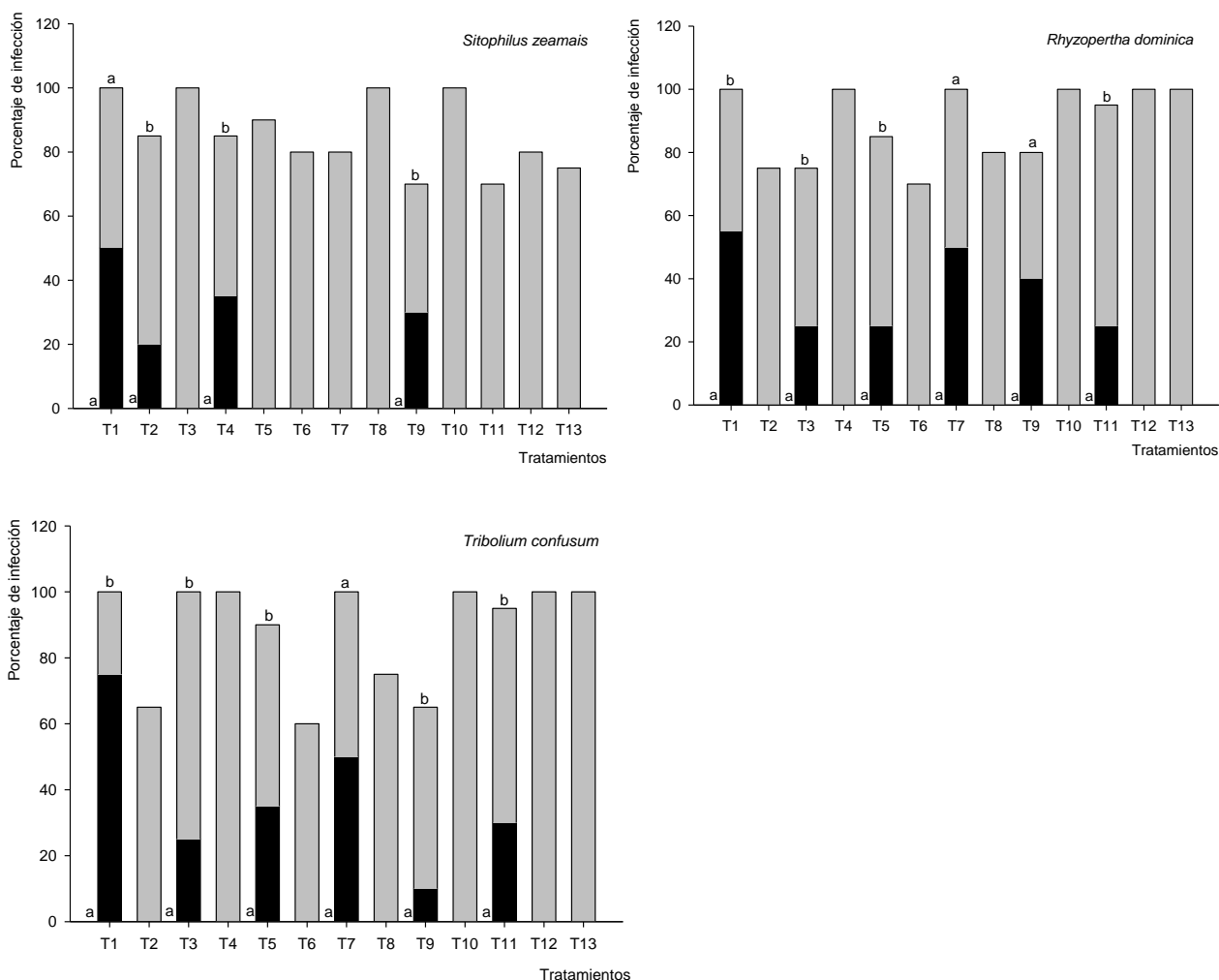


Figura III.6. Efecto de los tratamientos sobre el porcentaje de infección de *Sitophilus zeamais*, *Rhyzopertha dominica* y *Tribolium confusum* con *A. flavus*. Negro: insectos vivos. Gris: insectos muertos. T1: maíz + insecto; T2: *P. lilacinum* JQ926223 + *A. flavus* + BHT + insecto; T3: *P. lilacinum* + insecto; T4: *A. flavus* + insecto; T5: *P. lilacinum* + *A. flavus* + insecto; T6: *P. lilacinum* + insecto + BHT; T7: *A. flavus* + insecto + BHT; T8: *P. lilacinum* + *A. flavus* + insecto + (BHA+BHT); T9: *P. lilacinum* + insecto + (BHA+BHT); T10: *A. flavus* + insecto + (BHA+BHT); T11: *P. lilacinum* + *A. flavus* + insecto + AC; T12: *P. lilacinum* + insecto + AC; T13: *A. flavus* + insecto + AC. Los insectos vivos y muertos de cada tratamiento con la misma letra no tienen diferencia estadísticamente significativa de acuerdo al test de Tuckey ($p < 0,05$).

2. Efecto insecticida del tratamiento combinado *P. lilacinum* + BHT contra *T. confusum* en granos de maíz estériles acondicionados a diferentes actividades de agua.

Se determinó el recuento del hongo aflatoxicogénico y del entomopatógeno al final del período de incubación para evaluar el efecto de los tratamientos sobre cada uno de ellos. El recuento de ambos géneros se incrementó significativamente con el tiempo (figura III.7). La solución inicial de esporas (10^4 esp mL^{-1}) de *A. flavus* superó los 9 log después del período de incubación, mientras que las esporas de *P. lilacinum* se mantuvieron viables en presencia de

todos los tratamientos a lo largo de todo el período experimental, a las 3 actividades de agua evaluadas.

El análisis estadístico del efecto de los tratamientos, actividad de agua (a_w), cepas fúngicas y sus interacciones sobre la actividad fungicida e insecticida mostró diferencias estadísticamente significativas. El principal efecto fue el de los tratamientos para ambos géneros fúngicos (tabla III.3).

El tratamiento combinado *P. lilacinum* + *A. flavus* + BHT (T12) redujo el recuento del hongo aflatoxicogénico a 9,1 log al compararlo con 10,6 log encontrados en el tratamiento control (T3), a los 11 días de incubación. Similar efecto observamos cuando ambos tratamientos fueron aplicados por separado, T5 (BHT) y T9 (*P. lilacinum*). A pesar de que la reducción en el recuento de *A. flavus* fue significativa, los valores encontrados superan los 8 log. Cabe destacar que en presencia de esta elevada población de *A. flavus*, el hongo entomopatógeno se mantuvo viable durante el período de almacenamiento, en todas las condiciones de a_w evaluadas (figura III.7).

Los tratamientos mostraron diferencias estadísticamente significativas en la actividad insecticida después de 11 días de incubación ($p < 0,0001$). Este comportamiento se mantuvo en las diferentes actividades de agua. El porcentaje de mortalidad obtenido con el tratamiento T9 (*P. lilacinum*) fue de 100, 90 y 60% a las actividades de agua 0,99, 0,97 y 0,95 respectivamente. Con el tratamiento combinado T10 (*P. lilacinum* + BHT), se obtuvo una mortalidad del 75%, la cual se mantuvo a medida que disminuyó la actividad de agua (figura III.8).

Con respecto al efecto de los tratamientos sobre el porcentaje de infección de *Tribolium confusum* con *A. flavus* (figura III.9), los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas ($p < 0,0001$). El inóculo elevado de *A. flavus* que se mantuvo durante todo el bioensayo, afectó directamente el efecto insecticida de los tratamientos. Con el tratamiento T9 (*P. lilacinum*) todos los insectos vivos y muertos mostraron contaminación con *A. flavus* a la actividad de agua más elevada (0,99) un 40% de contaminación a 0,97 y 95% de contaminación a 0,95, mientras que con el tratamiento T10 (*P. lilacinum* + BHT) ningún insecto vivo ni muerto mostró contaminación con *A. flavus* a la actividad de agua 0,99, y el 5 y el 10% de los insectos muertos presentaron contaminación con a las a_w 0,97 y 0,95 respectivamente. Por otro lado, el tratamiento T7 (*P. lilacinum* + *T. confusum*) mostró el mayor potencial insecticida de la cepa entomopatógena con porcentajes de mortalidad entre 80 y 90% a las tres a_w ensayadas. Los insectos vivos y muertos de este tratamiento (T7) no presentaron contaminación con *A. flavus*.

El antioxidante BHT (T13) mostró un buen efecto insecticida, con porcentajes de mortalidad entre 60 y 80%. Los insectos vivos y muertos recuperados de dicho tratamiento no mostraron contaminación con *A. flavus*.

3. Análisis de AFB₁.

La tabla III.4 muestra los valores de aflatoxina B₁ acumulada en los granos de maíz después de 11 días de exposición a los diferentes tratamientos. *A. flavus* produjo AFB₁ a las 3 a_w evaluadas, observándose diferentes valores de AFB₁. La mayor producción se detectó a la a_w 0,95, con una concentración final de 495 ng g⁻¹ de AFB₁. Mientras que, a las a_w 0,97 y 0,99 los valores de aflatoxina encontrados fueron inferiores, 235 y 115 ng g⁻¹ respectivamente. La menor concentración de aflatoxina B₁ se encontró en la muestra de granos a la cual se le aplicó el tratamiento T12 (*P. lilacinum* + BHT), con porcentajes de reducción de 99,3% a la a_w 0,97 y 98,3 y 87,9% a las a_w 0,99 y 0,95 respectivamente.

Tabla III.3. Significancia de tratamientos (T), actividad de agua (a_w), cepas (I) y sus interacciones sobre la actividad fungicida e insecticida en granos de maíz estériles.

Factor	GL ^a	CM ^b	F ^c	Pr < F
I	1	2.16	107.02**	<0.0001
a _w	2	1.32	65.15**	<0.0001
T	12	104.63	5176.49**	<0.0001
I*a _w	2	0.04	1.82	0.1690
I*T	12	171.35	8477.24**	<0.0001
a _w *T	24	0.13	6.37**	<0.0001
I * a _w *T	24	0.21	10.28**	<0.0001
Error	78	0.02		

^a : grados de libertad

^b : cuadrados medios

^c F- Snedecor

** significativo p<0,0001

Tabla III.4. Influencia de los tratamientos sobre la producción de aflatoxina B₁ por *A. flavus* RCM89 a diferentes actividades de agua.

a _w	Tratamientos						
	T1	T3	T5	T8	T9	T11	T12
0.99	1.1	115	2(98,41)	294(0)	175(0)	10(92,06)	1,8(98,41)
0.97	Nd	235	6(97,45)	52(77,9)	210(10,6)	4(98,3)	1,6(99,32)
0.95	Nd	495	250(49,5)	106(78,6)	294(40,6)	70(85,66)	60(87,88)

Porcentaje de inhibición de AFB₁ entre paréntesis

Valores de AFB₁ en ng g⁻¹

T1: maíz acondicionado; T3: control *A. flavus* RCM89; T5: *A. flavus* +BHT; T8: *A. flavus* + *T. confusum*; T9: *P. lilacinum* + *A. flavus* + *T. confusum*; T11: *A. flavus* + *T. confusum* + BHT; T12: *P. lilacinum* + *A. flavus* + *T. confusum* + BHT.

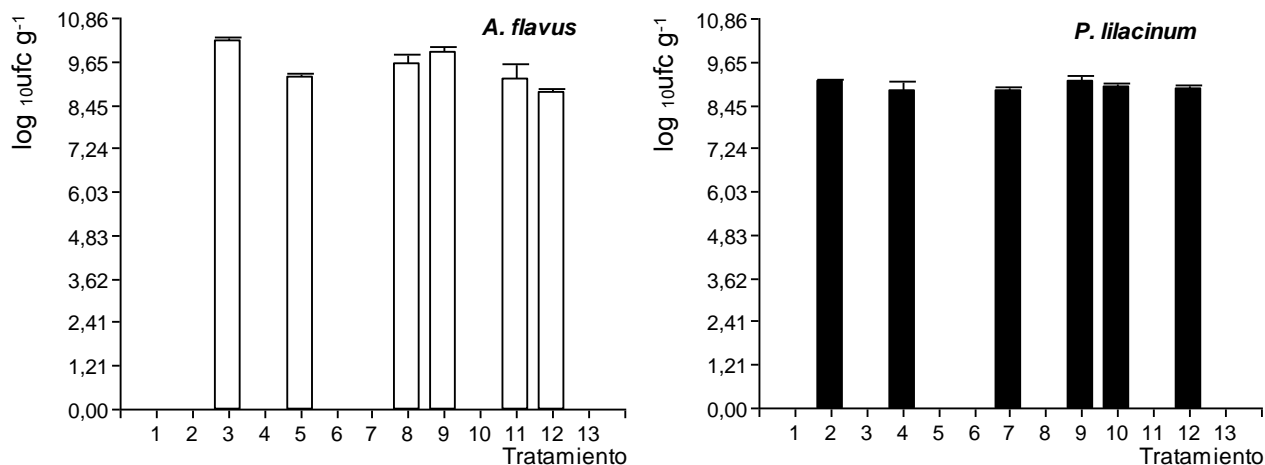


Figura III.7. Recuento de *A. flavus* y *P. lilacinum* bajo diferentes tratamientos: T1: maíz acondicionado; T2: control JQ926223; T3: control *A. flavus*; T4: JQ926223 + BHT; T5: *A. flavus* + BHT; T6: maíz + *T. confusum*; T7: JQ926223 + *T. confusum*; T8: *A. flavus* + *T. confusum*; T9: JQ926223 + *A. flavus* + *T. confusum*; T10: JQ926223 + *T. confusum* + BHT; T11: *A. flavus* + *T. confusum* + BHT; T12: JQ926223 + *A. flavus* + *T. confusum* + BHT; T13: *T. confusum* + BHT, a diferentes actividades de agua: 0,99, 0,97 y 0,95.

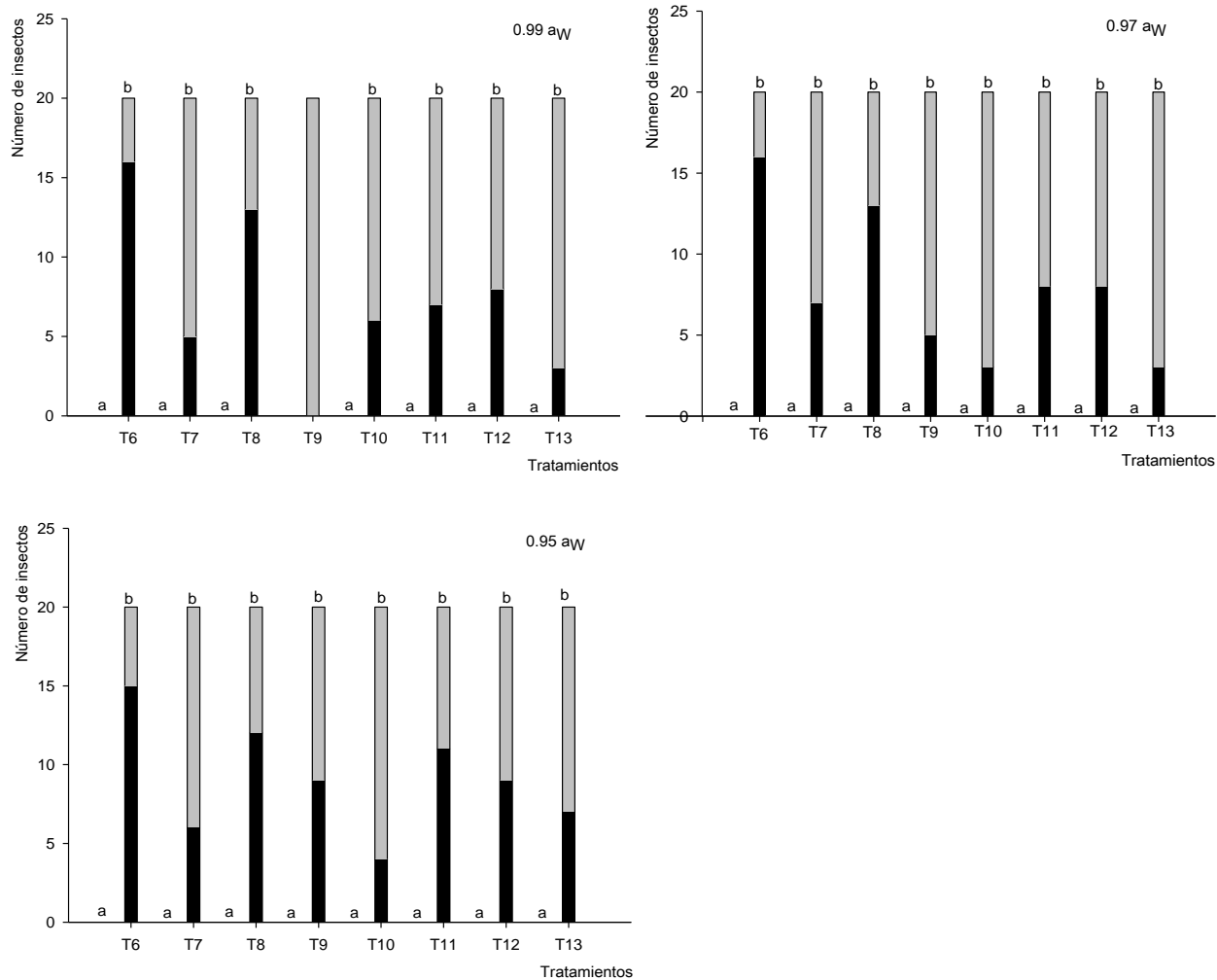


Figura III.8. Actividad insecticida de los diferentes tratamientos contra *Tribolium confusum* a las tres actividades de agua. Negro: insectos vivos. Gris: insectos muertos. T6: maíz + *T. confusum*; T7: *P. lilacinum* JQ926223 + *T. confusum*; T8: *A. flavus* + *T. confusum*; T9: *P. lilacinum* + *A. flavus* + *T. confusum*; T10: *P. lilacinum* + *T. confusum* + BHT; T11: *A. flavus* + *T. confusum* + BHT; T12: *P. lilacinum* + *A. flavus* + *T. confusum* + BHT; T13: *T. confusum* + BHT. Los insectos vivos y muertos de cada tratamiento con la misma letra no tienen diferencia estadísticamente significativa de acuerdo al test de Tuckey ($p < 0,05$).

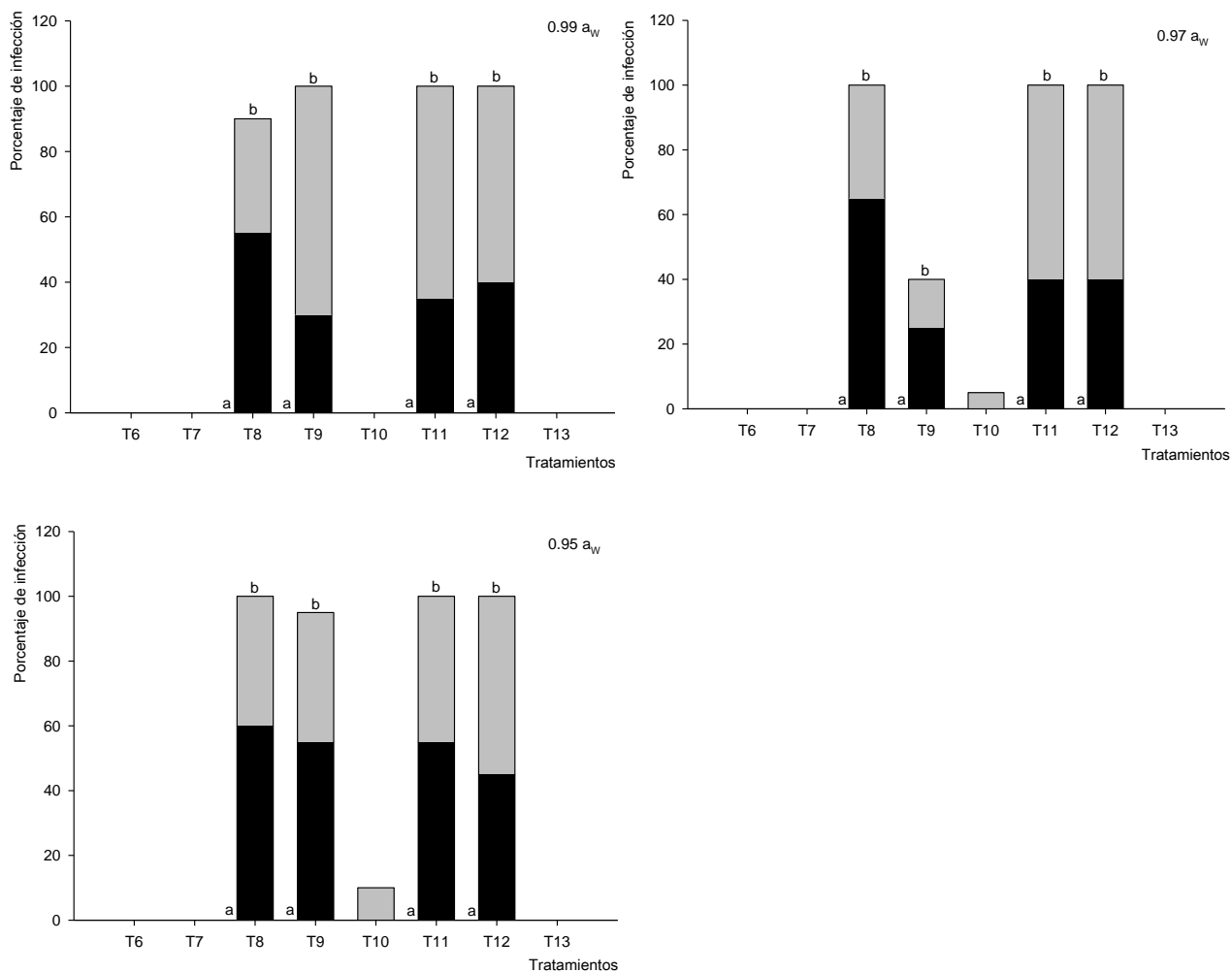


Figura III.9. Efecto de los tratamientos sobre el porcentaje de infección de *Tribolium confusum* con *A. flavus* a las tres a_w . Negro: insectos vivos. Gris: insectos muertos. T6: maíz + *T. confusum*; T7: *P. lilacinum* JQ926223 + *T. confusum*; T8: *A. flavus* + *T. confusum*; T9: *P. lilacinum* + *A. flavus* + *T. confusum*; T10: *P. lilacinum* + *T. confusum* + BHT; T11: *A. flavus* + *T. confusum* + BHT; T12: *P. lilacinum* + *A. flavus* + *T. confusum* + BHT; T13: *T. confusum* + BHT. Los insectos vivos y muertos de cada tratamiento con la misma letra no tienen diferencia estadísticamente significativa de acuerdo al test de Tuckey ($p < 0,05$).

Los antioxidantes sintéticos y naturales mostraron su potencial como insecticidas para la preservación del maíz almacenado y redujeron, además, la dispersión de *A. flavus* por parte de los insectos vectores. Por lo tanto, la aplicación de estos compuestos químicos puede influir en las poblaciones de *Aspergillus* sección *Flavi* y en la acumulación de aflatoxina B₁ en este agroecosistema.

La primera selección de los diferentes tratamientos, se realizó *in vitro* en granos de maíz contaminados naturalmente, es decir, no sometidos a un proceso de esterilización. Pudimos observar que los tratamientos T6 (*P. lilacinum* + BHT) y T12 (*P. lilacinum* + AC), produjeron un 100% de mortalidad de *S. zeamais*, *R. dominica* y *T. confusum*. El mismo comportamiento mostró el tratamiento T8 (*P. lilacinum* + (BHA + BHT)), T10 (BHA + BHT) y T13 (CA) (datos no mostrados). En un estudio previo encontramos resultados similares donde BHA, BHT y la mezcla BHA + BHT fueron eficaces insecticidas contra *S. zeamais*, *T. confusum* y *R. dominica* (Nesci y col., 2011a). Los mejores tratamientos seleccionados se evaluaron en granos de maíz estériles a 3 a_w contra *T. confusum*. En este ensayo la población de *A. flavus* se mantuvo en los tratamientos controles durante todo el período de almacenamiento a todas las a_w evaluadas. Resultados similares encontramos previamente en granos de maíz almacenados durante mayores períodos de tiempo (Nesci y col., 2008). *P. lilacinum* fue eficaz entomopatógeno contra *T. confusum*, con porcentajes de mortalidad de 100, 90 y 60% a las a_w 0,99, 0,97 y 0,95 respectivamente, mientras que el tratamiento combinado *P. lilacinum* + BHT mostró una mortalidad del 75% a las tres a_w. Éste es el primer reporte de *P. lilacinum* como agente de biocontrol de *T. confusum* en granos almacenados.

Existen referencias bibliográficas que muestran el aumento de la eficiencia insecticida de los hongos entomopatógenos cuando se los combina con otras sustancias, que pueden o no tener efecto insecticida. Algunos investigadores estudiaron la eficacia de *M. anisopliae* solo o en combinación con matrices solidas contra *Tribolium castaneum*. Los resultados obtenidos sobre la mortalidad de insectos adultos de *T. castaneum* infestando granos de trigo, tratados con conidios de *M. anisopliae* aplicados en formulaciones en polvo, indicaron que la mortalidad fue relativamente alta (53,3 a 73,3%) cuando los conidios fúngicos se aplicaron en combinación con ceniza, polvo de tiza y carbón (Batta y col., 2005). Resultados similares (hasta 80% de mortalidad de adultos) se obtuvieron al evaluar el efecto insecticida del polvo de conidios de *B. bassiana* contra *Sitophilus oryzae* que infestan diferentes tipos de sustratos (Rice y Cogburn 1999). Otros autores mostraron que la mortalidad de *T. confusum* aumentó a medida que se incrementó la dosis de tierra de diatomeas en las formulaciones de hongos. Por ejemplo, en el trigo, la mortalidad causada por *M. anisopliae* combinado con tierra de diatomeas era mayor al 70%, mientras que la mortalidad de los insectos cuando *M. anisopliae* se aplicó solo fue del 54% (Michalaki y col., 2006). La disminución en las concentraciones de tierra de diatomeas conduce a la disminución de la mortalidad de los insectos en todos los casos. Además, la menor

concentración de la tierra de diatomeas no tuvo efectos insecticidas contra insectos diana (Sabbour 2012).

En este trabajo, el agente de biocontrol *P. lilacinum* logró mantenerse viable en el agroecosistema del maíz almacenado, encontrando un incremento de la población al final del período de incubación. El mantenimiento de una alta viabilidad del entomopatógeno en el ecosistema donde debe actuar, es esencial para que sea eficaz, siendo este un requisito para la aceptación del plaguicida en el mercado (Hedgecock y col., 1995; Hong y col., 2001). Los resultados de nuestro estudio fueron similares a los reportados por Mar y col., (2012), quienes mostraron que cepas de *Paecilomyces lilacinus* aisladas de hábitats naturales eran capaces de mantener un porcentaje de germinación superior al 80%, 60 días después de la incubación en arroz, trigo, centeno, maíz y sorgo.

En este ensayo, los mejores tratamientos seleccionados no mostraron una importante disminución en el recuento de *A. flavus*, pero tampoco se observó estimulación a pesar de haber utilizado dosis subinhibitorias de los agentes químicos. Smith y Moss (1985) y Lacey (1989) sostienen, que las dosis subinhibitorias, junto con una inadecuada distribución de los productos químicos, podrían favorecer el crecimiento de hongos en el material tratado con un bajo nivel inicial de contaminación. En investigaciones previas, se observó estimulación de la población de *A. flavus* y la producción de aflatoxinas con algunas dosis de antioxidantes de grado alimentario y ácidos fenólicos en maíz irradiado (Nesci y col., 2007) y granos de maíz no estériles (Nesci y col., 2009). Se aisló *A. flavus* de insectos muertos y vivos de los diferentes tratamientos. Sin embargo, no encontramos contaminación con *A. flavus* en insectos muertos y vivos recuperados de los granos de maíz tratados con *P. lilacinum* + BHT (T10) a la a_w 0,99 sin embargo si observamos infección, pero en bajo porcentaje, 5% y 10%, en los insectos muertos a las a_w 0,97 y 0,95 respectivamente. Por otra parte, tampoco se observó contaminación con *A. flavus* en los insectos muertos y vivos recolectados del maíz tratado con el antioxidante BHT. El mismo comportamiento se observó en los insectos muertos y vivos de *S. zeamais* y *T. confusum* recuperados de granos de maíz tratados con BHA y la mezcla BHA + BHT (Nesci y col., 2011a) y de maní con los mismos tratamientos (Nesci y col., 2011b).

La reducción en el contenido de aflatoxina B₁ no siempre es proporcional a la disminución de la población o del crecimiento de *A. flavus*. En nuestro estudio, en todos los tratamientos a los 11 días de incubación, se detectó producción de aflatoxina B₁. El tratamiento control, a la a_w 0,95 mostró el mayor valor de AFB₁, mientras que el más bajo se encontró en presencia del tratamiento T12 (*P. lilacinum* + *A. flavus* + *T. confusum* + BHT) a la a_w 0,97. Estos resultados no coinciden con estudios previos en agar harina de maíz (Nesci y Etcheverry 2006), en maíz irradiado (Nesci y col., 2007) y en maíz natural (Nesci y col., 2011a), donde en la mayoría de los tratamientos a los 11 días de incubación, no se detectó acumulación de aflatoxina B₁. Cabe destacar que en nuestro ensayo el nivel poblacional de *A. flavus* al final del período de incubación fue elevado, encontrándose en el rango de 4 a 10,6 log. La cantidad de AFB₁ producida por *A. flavus* en presencia de *P. lilacinum* y/o el antioxidante fue más baja que la registrada en el tratamiento

control. Estos datos sugieren que no se produjo estimulación de la producción de toxina en presencia de niveles subinhibitorios de antioxidantes, como se había observado con otros fungicidas (Yousef y Marth 1981; Marshall y Bullerman 1986).

' El tratamiento *P. lilacinum* + BHT fue capaz de reducir la flora fúngica natural del grano de maíz.

' Los tratamientos: *P. lilacinum* + BHT, *P. lilacinum* + AC y *P. lilacinum* + (BHA+BHT) mostraron 100% de efectividad insecticida contra *S. zeamais*, *T. confusum* y *R. dominica* en granos de maíz.

' *P. lilacinum* mostró 100, 90 y 60% de mortalidad contra *T. confusum* en maíz acondicionado a las a_w 0,99, 0,97 y 0,95 respectivamente.

' El tratamiento *P. lilacinum* + BHT mostró 75% de mortalidad contra *T. confusum* a las tres a_w ensayadas. Con este tratamiento, ningún insecto mostró contaminación con *A. flavus* a la a_w 0,99. El 5% y el 10% de los insectos muertos presentaron contaminación con *A. flavus* a las a_w 0,97 y 0,95 respectivamente.

1. Adane K., Moore D., Archer SA. (1996) Preliminary studies on the use of *Beauveria bassiana* to control *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: *Curculionidae*) in the laboratory. *Journal of Stored Products Research* 32: 105-113.
2. Badii MH., Flores AE., Quiróz H., Torres R., Foroughbakhchb R. (2000a) Depredación y control biológico. Pp. 53-60. In: Badii MH., Flores AE., Galán LJ. (eds.) Fundamentos y Perspectivas de Control Biológico. UANL, Monterrey.
3. Badii MH., Tejada LO., Flores AE., Lopez CE., Quiróz H. (2000b). Historia, fundamentos e importancia. Pp. 3-17. En: Badii MH., Flores AE., Galán LJ. (eds.) Fundamentos y Perspectivas de Control Biológico. UANL, Monterrey.
4. Badii MH., Flores AE., García Salas JA., López JH., Torres R. (2003a). Estatus de control biológico, con énfasis en México y América Latina. *Calidad Ambiental* 8: 18-23.
5. Badii MH., Flores EA., Ponce G, Quiróz H., Foroughbakhch R., Torres R. (2003b). Control biológico un método ambientalmente amigable. *Calidad Ambiental* 8: 20-23.
6. Badii MH., Flores AE., Ponce G., Quiróz H., García Salas JA., Foroughbakhch R. (2004a) Formas de evaluar los enemigos naturales en control biológico. *CULCYT* 1: 3-11.
7. Badii MH., Bernal J., Flores AE., Quiróz H., López JO., García JA. (2004b) Estrategias metodológicas de control biológico. *Calidad Ambiental* 11: 16-22.
8. Badii MH., Castillo J., Wong A. (2005) Towards sustainability in urban areas. *Innovaciones de Negocios* 2: 179-200.
9. Badii MH., Ruvalcaba I. (2006) Fragmentación del hábitat: el primer jinete de Apocalipsis. *Calidad Ambiental* 11: 8-13.
10. Badii MH., Abreu JL. (2006a). Sustentabilidad. *Deana* 1: 21-36.
11. Badii MH., Abreu JL. (2006b). Metapoblación, conservación de recursos y sustentabilidad. *Deana* 1: 37-51.
12. Batta YA. (2005). Control of the lesser grain lesser (*Rhyzopertha dominica* (F.) Coleoptera: *Bostrichidae*) by treatments with residual formulation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: *Hyphomycetes*). *Journal of Stored Products Research* 41: 221- 229.
13. Cotty PJ. (1994) Influence of field application of an atoxigenic strain of *Aspergillus flavus* on the populations of *A. flavus* infecting cotton bolls and on the aflatoxin content of cottonseed. *Phytopathology* 84: 1270-1277.
14. Dal Bello G., Padin S., Lastrab CL., Fabrizio M. (2000) Laboratory evaluation of chemical biological control of rice weevil, *Sitophilus oryzae* L. in store grain. *Journal of Stored Product Research* 37: 77-84.
15. Di Rienzo JA., Casanoves F., Balzarini MG., Gonzalez L., Tablada M., Robledo CW. (2008). *InfoStat, versión 2008*, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

16. Droby S., Cohen A., Weiss B., Horev B., Chalutz E., Katz H., Keren M., Shachnai A. (1998) Commercial testing of Aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. *Biological Control* 12: 97–100.
17. Ekesi S., Egwurube EA., Akpa AD., Onu I. (2001) Laboratory evaluation of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* for the control of the groundnut bruchid, *Caryedon serratus* on groundnut. *Journal of Stored Products Research* 37: 313-321.
18. Hedgecock S., Moore D., Higgins PM., Prior C. (1995) Influence of moisture content on temperature tolerance and storage of *Metarhizium flavoviridae* conidia in an oil formulation. *Biocontrol Science and Technology* 5: 371-377.
19. Hidalgo E., Moore D., Le Patourel G. (1998) The effect of different formulations of *Beauveria bassiana* on *Sitophilus zeamais* in stored maize. *Journal of Stored Products Research* 34: 171-179.
20. Hong D., Gunn J., Ellis HR., Jenkins EN., Moore D. (2001) The effect of storage environmental of the longevity of conidia of *Beauveria bassiana*. *Mycological Research* 105: 597-602.
21. Jayashree T., Subramanyam C. (1999) Antiaflatoxic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. *Letters in Applied Microbiology* 28: 179–183.
22. Khashaveh A., Hassan Safaralizade M., Ghosta Y. (2008) Pathogenicity of three iranian isolates of the fungus, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Deuteromycotina: *Hyphomycetes*) against granary weevil, *Sitophilus granarius* L. (Coleoptera: *Curculionidae*). *Journal of Biological Sciences* 8: 804-808.
23. Lacey J. (1989) Prevention of mould growth and mycotoxin production through control of environmental factors. In: Natori S., Hashimoto K., Ueno Y., (eds.) *Mycotoxins and phycotoxins, bioactive molecules*. 10: 161–169.
24. Magan N., Lacey J. (1984) Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 82: 83-93.
25. Mar TT., Lumyong S. (2012) Conidial production of entomopathogenic fungi in solid state fermentation. *KKU Research Journal* 17: 762-768.
26. Marshall DL., Bullerman LB. (1986) Effect of sucrose esters in combination with selected mold inhibitors on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Food Protection* 49: 378–82.
27. Michalaki MP., Athanassiou CG., Kavallieratos NG., Batta YA., Balotis JN. (2006) Effectiveness of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin applied alone or in combination with diatomaceous earth against *Tribolium confusum* Jacquelin du Val: influence of temperature relative humidity and type of commodity. *Crop Protection* 25: 418–425.
28. Miller JD. (1995) Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored products research. *Journal of Stored Products Research* 31: 1-16

29. Mills JT. (1986) Postharvest insect-fungus associations affecting seed deterioration. Pathological interactions affecting seed deterioration, *CSSA Special Publication* 12: 39-51.
30. Nesci A., Barra P., Etcheverry M. (2011a) Integrated management of insect vectors of *Aspergillus flavus* in stored maize, using synthetic antioxidants and natural phytochemicals. *Journal of Stored Products Research* 47: 231-237.
31. Nesci A., Montemarani A., Passone MA., Etcheverry M. (2011b) Insecticidal activity of synthetic antioxidants, natural phytochemicals, and essential oils against an *Aspergillus* Section *Flavi* vector (*Oryzaephilus surinamensis* L.) in microcosm. *Journal of Pest Science* 84: 107–115.
32. Nesci A., Marín S., Etcheverry M., Sanchis V. (2009) Natural maize phytochemicals for control of maize mycoflora and aflatoxigenic fungi. *World Mycotoxin Journal* 3: 305–312.
33. Nesci A., Ferrari L., Etcheverry M. (2008) Effect of synthetic antioxidants on stored maize grain mycoflora *in situ*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88: 797-804.
34. Nesci A., Gsponer N., Etcheverry M. (2007) Natural maize phenolic acids for control of aflatoxigenic fungi on maize. *Journal of Food Science* 72:180–185.
35. Nesci A., Etcheverry M. (2006) Control of *Aspergillus* growth and aflatoxin production using natural maize phytochemicals under different conditions of water activity. *Pest Management Science* 62: 775-784.
36. Nesci A., Etcheverry M. (2002) *Aspergillus* Section *Flavi* from field maize in Argentina. *Letters in Applied Microbiology* 34: 343–348.
37. Oshugi M., Fan WZ., Hase K., Xiong Q., Tezuca Y., Komatsu K., Namba T., Saitoh T., Tazaca K., Kadota S. (1999) Active-oxygen scavenging activity of traditional nourishing tonic herbal medicines and active constituents of *Rhodiola sacra*. *Journal of Ethnopharmacology* 67: 111-119.
38. Padin S., Dal Bello G., Fabrizio M. (2002) Grain loss caused by *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae* and *Acanthoscelides obtectus* in stored durum wheat and beans treated with *Beauveria bassiana*. *Journal of Stored Products Research* 38: 69-74.
39. RiceWC., Cogburn RR. (1999) Activity of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: *Hyphomycetes*) against three coleopteran pests of stored grain. *Journal of Economic Entomology* 92: 691-694.
40. Sabbour MM., El-Sayed Abd-El-Aziz S., Sherief MA. (2012) Efficacy of three entomopathogenic fungi alone or in combination with diatomaceous earth modifications for the control of three pyralid moths in stored grains. *Journal of Plant Protection Research* 52: 359-363.
41. Setamau M., Cardwell KF., Schulthess F., Hell K. (1998) Effect of insect damage to maize ears, with special reference to *Mussidiani grivenella* (Lepidoptera: *Pyralidae*) on *Aspergillus flavus* (Deuteromycetes: *Moniliales*) infection and aflatoxina production in maize before harvest in the Republic of Benin. *Journal of Economic Entomology* 91: 433- 438.
42. Smith JE., Moss MO. (1985) Mycotoxins, formation, analysis and significance. 148 pp. John Wiley and Sons, New York.

43. Tanya S., Doberski J. (1984) An investigation of the entomogenous fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. as a potential biological control agent for *Oryzaephilus surinamensis* (L.). *Journal of Stored Products Research* 20: 17-23.
44. Taubenhaus JJ. (1920) A study of the black and the yellow molds of ear corns. Texas Agricultural Experiments Station Bulletin N°270.
45. Trucksess MW., Stack ME., Nesheim S., Albert RH., Romer TR. (1994) Multifunctional column coupled with liquid chromatography for determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂ in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts and pistachio nuts: collaborative study. *Journal of AOAC* 6: 1512-1521.
46. Tuite J. (1961) Fungi isolated from unstored corn seed in Indiana in 1956-1958. *Plant Diseases Reporter* 45: 212-215
47. Wilson CL., Pusey PL. (1985) Potential for biological control of postharvest plant diseases. *Plant Diseases* 69: 375-378.
48. Yousef AE., Marth EH. (1981) Growth and synthesis of aflatoxin by *Aspergillus parasiticus* in the presence of sorbic acid. *Journal of Food Protection* 44:741-745.

Sección IV

Manipulación ecofisiológica de *Purpureocillium lilacinum* para estimular su actividad insecticida contra *Tribolium confusum*.

La mayoría de los estudios para el desarrollo de un agente de biocontrol se focalizan en el potencial para la producción de inóculo. A pesar de que estos estudios son numerosos, la mayoría se han concentrado en optimizar la cantidad de propágulos o fragmentos de micelio producidos, centrandose muy poca atención en la calidad del inóculo (Magan 2001). Por lo tanto es importante considerar la existencia del problema práctico real del establecimiento y de la efectividad de los agentes de biocontrol en el medioambiente natural. Por ello, necesitamos conocer si la manipulación ecofisiológica del agente de biocontrol en estudio cumple un rol en el mejoramiento de la calidad del inóculo.

Todos los hongos necesitan la presencia física del agua para la difusión de nutrientes dentro de la célula y para la liberación de enzimas extracelulares. Además necesitan tomar agua para mantener la estructura del citosol. Sin embargo, el agua puede estar en el ambiente pero no estar disponible. Frente a condiciones de baja actividad de agua, los hongos son capaces de acumular polioles (alcoholes de azúcares acíclicos) en altas concentraciones reduciendo el potencial de agua intracelular (Brown 1978; Adler y col., 1982; Hallsworth y Magan 1994a, b; Pascual y col., 2000a, Frey y Magan 2001) mientras que al mismo tiempo previenen la inhibición enzimática por deshidratación (Carpenter y Crowe 1988); de esta manera el agua está disponible para que el hongo mantenga turgencia lo que permite continuar con el funcionamiento de la célula de manera eficiente. Abadias y col., (2001) mostraron la correlación entre la acumulación total de polioles y el ajuste del potencial de agua intracelular en la levadura *Candida sake*. Algunos hongos sintetizan el aminoácido prolina en lugar de polioles cuando crecen en medios de cultivo cuyo potencial de agua se ha modificado con solutos iónicos y no iónicos (Luard 1982). Ambos, los polioles y la prolina son compatibles con el metabolismo fúngico aún en elevada concentración (no desestabilizan ni inhiben enzimas). Además de mantener la turgencia fúngica y proteger a las enzimas de la desnaturalización, los polioles pueden también desempeñar otros roles. Cumplir una función metabólica y producir energía durante su conversión en otro componente, en los llamados ciclos fútiles (Jennings y Burke 1990). En este sentido la energía se pierde durante este ciclo sin cambios en las concentraciones de los componentes implicados. Esta "energía disipada" regula la sobreproducción de ATP a expensas de ADP bajo condiciones de carbono en exceso, lo que conduce a la producción de metabolitos de reserva y la reducción de equivalentes. El exceso de equivalentes reducidos bajo estas condiciones puede también ser regulado por polioles conduciendo en dicho sentido a reacciones de óxido-reducción. Por ejemplo, la formación de manitol a partir de glucosa consume equivalentes reducidos (Jennings y Burke 1990).

Invasión del insecto

Antes de describir los mecanismos de la patogénesis fúngica de insectos, es importante distinguir la diferencia entre patogenicidad y virulencia. Patogenicidad es la capacidad cualitativa

de un patógeno de causar enfermedad, mientras que virulencia es el tenor cuantitativo de enfermedad que un patógeno puede incitar en un huésped susceptible. Por lo tanto, es posible tener un aislamiento no virulento de una especie patógena con respecto a un huésped individual. Las primeras investigaciones especularon con el mecanismo de infección de los insectos por hongos era a través de la ingestión del agente de control (Samson y col., 1988). Sin embargo, con los años se ha demostrado que la mayoría de los hongos entomopatógenos invaden los insectos por penetración de la cutícula (Hajek y St. Leger 1994). Este mecanismo distingue a los hongos de otros patógenos de insectos, como las bacterias, virus y nematodos, que penetran en su huésped a través del intestino medio.

El inicio del contacto entre un hongo entomopatógeno y el insecto se produce a través de la cutícula de los insectos. En primer lugar, la espora fúngica debe adherirse a la cutícula del insecto y reconocer a un huésped susceptible. La estructura física y química tanto de la capa exterior del tegumento del insecto como la capa exterior de la pared de las esporas fúngicas juega un papel importante en el proceso de adhesión y reconocimiento (Samson y col., 1988; Boucias y Pendland 1991; Hajek y St. Leger 1994). Los hongos también secretan pequeñas proteínas, denominadas hidrofobinas, implicadas en la formación de estructuras hidrofóbicas, como hifas aéreas, esporas y cuerpos fructíferos para mediar la unión entre el hongo y la cutícula del insecto (Wösten y Vocht 2000).

Después de la unión de la espora al insecto, siempre y cuando los factores que influyen en la patogenicidad, como la disponibilidad de agua, la temperatura y la nutrición sean favorables, las esporas germinan y penetran la cutícula a través de una estructura denominada apresorio. Se han encontrado muchos hongos capaces de secretar además, un mucílago durante la elongación del tubo germinativo y/o formación del apresorio que ayuda a consolidar la unión de la espora (Bidochka y col., 1997). Por otra parte, debido a su carácter higroscópico, se crea un entorno favorable para las enzimas extracelulares liberadas por estas estructuras (Boucias y Pendland 1991). El cuello de botella crucial para la germinación de la mayoría de los hongos, agentes de control biológico, en la superficie de la cutícula de insectos es la disponibilidad de agua. La mayoría de los agentes de biocontrol de hongos requieren una humedad relativa del 95% como mínimo para germinar (Gillespie y Crawford 1986), una condición que no suele prevalecer en el campo durante largos períodos de tiempo.

La germinación de la espora sobre la cutícula no siempre resulta en la infección. Varios factores, tales como los ambientales, fisiológicos y/o morfológicos del huésped pueden prevenir la patogénesis después de la germinación. El éxito de la penetración del tegumento debe implicar actividades mecánicas y enzimáticas en el tubo germinativo en desarrollo como lo demuestra la presencia de depresiones y zonas de histólisis en el sitio de penetración (Samson y col., 1988; St. Leger y col., 1989).

La mayoría de los modelos actuales sugieren que el mecanismo primario de infección implica la producción de una batería de enzimas hidrolíticas que atacan el huésped en un proceso

de degradación, permitiendo la penetración de las hifas a través de la cutícula. No muy sorprendentemente, las enzimas fúngicas que hidrolizan la quitina y proteínas (quitinasas y proteasas, respectivamente), que representan los principales constituyentes de la cutícula del insecto, se consideran vitales para el proceso de infección (Fang 2009)

Las proteasas secretadas (más de 100; Cox y Wills 1987), durante las primeras etapas de penetración (Bidochka y Khachatourians 1990), son consideradas el factor de virulencia más importante debido a que las proteínas son el componente mayoritario en el exoesqueleto (61-70%) (Hepburn 1985; Bidochka 1989) y cubierta de huevos de insectos (Anderson 1985; Margaritis 1985) además de que se encuentran rodeando las microfibrillas de quitina (Blackwell y Weih 1980). Las proteasas se dividen según su mecanismo catalítico, en serina, cisteína, aspartato y metaloproteasas (Barrett 1994). De todas ellas las serina proteasas constituyen el grupo más numeroso (Barrett 1994). Existe una gran disponibilidad bibliográfica a cerca de proteasas producidas por diversas especies de hongos entomopatógenos (St. Leger y col., 1987; Goettel y col., 1989). No obstante, los hongos entomopatógenos producen una gama de enzimas de degradación de la cutícula correspondientes a diferentes polímeros de la cutícula de los insectos (Días 2005; Fang y col., 2009).

Algunos hongos producen enzimas para convertir los tejidos del insecto en nutrientes para su crecimiento. Los insectos que presentan cutícula esclerotizada rara vez son utilizados por los hongos, sin embargo, los hongos entomopatógenos producen enzimas eficientes para degradar esta capa protectora de insectos (Fang y col., 2009). St. Leger y col., (1986b) observaron grandes variaciones en los niveles de producción de enzimas entre diferentes aislados de hongos entomopatógenos. Sin embargo, todos los aislamientos mostraron una alta producción de endoproteasas (St. Leger 1986b).

El orden de aparición de las enzimas se produce de acuerdo a los constituyentes de la cutícula. La quitinasa es una enzima inducible y en la cutícula la quitina se encuentra dentro de una matriz de proteína, por lo que la aparición de la quitinasa es el resultado de la inducción por quitina después de la degradación de las proteínas cuticulares. La detección de lipasa puede deberse a que la enzima está generalmente unida a la pared en cultivos jóvenes (St. Leger y col., 1986a, b, c). Samsinakova y col., (1971), mostraron que las quitinasas eran efectivas contra la cutícula de larvas de *Galleria mellonella* solamente si se aplicaba después que las proteasas. De manera similar, Smith y col., (1981), demostraron que la hidrólisis completa de la cutícula de larvas de *Heliothis zea*, con preparaciones comerciales, fue lograda con una secuencia de proteasas seguida de quitinasas.

Hidrocarburos

Las cutículas de insectos se componen de un conjunto de diversos compuestos con variación en el contenido y composición (Blamquist y Dillwith 1985; Lockey 1988; Buckner 1993;

Nelson y Blomquist 1995). Esta composición de la superficie de los insectos tiene profundas consecuencias sobre los aspectos ecológicos y de comportamiento del insecto. Los lípidos cuticulares incluyen componentes con actividad antifúngica y compuestos tóxicos para los hongos entomopatógenos (Smith y Gula 1982; Saito y Aoki 1983; Golebiowski y col., 2008). Los hidrocarburos como n-alcenos, alquenos y cadenas metil-ramificadas, son los lípidos epicuticulares más comunes y han sido muy estudiados (Blomquist y Dillwith 1985; Blomquist y col., 1987; Lockey 1988). Los hidrocarburos cuticulares pueden estimular (Boucias y Pendland 1984; Boucias y col., 1988) o inhibir (Lord y Howard 2004) la interacción hongo-cutícula. Para estudiar las vías catabólicas de la degradación de alcanos por *Beauveria bassiana* se han utilizado hidrocarburos radiomarcados y se vio que las vías de degradación implican mecanismos de β oxidación (Pedrini y col., 2006; 2007). El desarrollo de un entomopatógeno en presencia de alcanos se ha relacionado con un incremento en la virulencia ya que cepas de *B. bassiana* cultivadas en medios de cultivo con alcanos, mostraron un notable incremento, 2 a 4 veces, en la mortalidad contra el gorgojo del frijol *Acanthoscelides obtectus*, en comparación con células cultivadas en glucosa (Crespo y col., 2002). Estos datos indican que la degradación de alcanos representa una ruta metabólica clave que está vinculada con la patogénesis de los hongos entomopatógenos.

Los hongos necesitan una fuente de carbono para la germinación de sus conidios (Smith y Gula 1981). Ferron (1985) mostró que la quitina y algunos ácidos grasos son utilizados de manera eficiente para ese propósito, lo que indica que los hongos entomopatógenos pueden utilizar los nutrientes presentes en y dentro del tegumento de los insectos. Boucias y Latge (1988) propusieron que los lípidos epicuticulares de los insectos podrían ser importantes en la adhesión del hongo a la cutícula. Estudios preliminares mostraron que los hifomycetes entomopatógenos son capaces de degradar hidrocarburos alifáticos de cadena media, así como esteroides y gliceroides (Smith y Gula 1981; St. Leger y col., 1988). En adultos de *Tribolium castaneum* (*Tenebrionidae*) los hidrocarburos representan aproximadamente el 40% del extracto lipídico cuticular. Una mezcla simple de cadenas saturadas lineales y ramificadas (C27-C29) representan solo el 30% de estos hidrocarburos, mientras que contienen una importante cantidad de una mezcla de cadenas cortas, mayoritariamente 1-pentadecano, completando el 70% restante (Baker y col., 1984). Las larvas presentan una mezcla más simple de hidrocarburos que el insecto adulto, predominando principalmente mezclas de n-C28 + n-C29 para el 80% del total de lípidos cuticulares y no se detectan ni C15:1 ni quinonas en dicho extracto cuticular (Villaverde y Juárez sin publicar). En el gorgojo del arroz, *Sitophilus oryzae*, los hidrocarburos constituyen cerca del 30% de los extractos de lípidos de la superficie, los principales componentes son alcadienos de 33, 35 y 37 átomos de carbono (Baker y col., 1984) con dobles enlaces situados en su mayoría en las posiciones $\Delta 7$ 17; $\Delta 7$ 19; $\Delta 7$ 21 (Nelson y col., 1984). Entre otras razones la baja susceptibilidad de esta especie de insectos podría estar asociada con una pobre capacidad de los hongos entomopatógenos de degradar alcadienos de cadena muy larga, es decir, ni secreciones

de defensa ni cadenas hidrocarbonadas muy largas son detectadas en los insectos susceptibles como *Tenebrio molitor* (*Tenebrionidae*), *Rhyzopertha dominica* (*Bostrichidae*) y *Acanthoscelides obtectus* (*Bruchidae*) (Lockey 1978; Howard y Liang 1993; Crespo y col., 2002). Los hongos entomopatógenos presentan la habilidad de degradar los alcanos presentes en la cutícula de insectos y utilizarlos para producir energía e incorporarlos dentro de componentes celulares (Napolitano y Juárez 1997).

Actualmente se busca optimizar la formulación, producción y aplicación de cepas virulentas de hongos contra una amplia variedad de plagas de insectos (Batterman 1998). Una definición aceptada de virulencia es “grado de patogenicidad dentro de un grupo o especie” (Shapiro-Ilan y col., 2005) que se puede medir ya sea como concentración letal 50 (CL₅₀) o tiempo letal 50 (TL₅₀). La reducción del tiempo para producir la muerte del insecto es el principal objetivo de investigación para lograr una mayor virulencia (St. Leger y col., 1996). La variabilidad en la virulencia entre cepas fúngicas contra diferentes insectos puede estar relacionada con la producción de enzimas, entre otros factores (Bidochka y Khachatourians 1990). A partir de la bioquímica del mecanismo de degradación cuticular y su potencial como una metodología alternativa de control de plagas, se planteó una hipótesis en base a la probabilidad de que hongos con su mecanismo de degradación de hidrocarburos mejorado puede relacionarse directamente con una mayor virulencia. La superficie de los conidios de hongos se compone de una capa hidrófoba que interactúa con la epicutícula de los insectos (Boucias y Pendland 1991; Terhune y Hoch 1993); por lo tanto la adaptación creciendo en presencia de alcanos podría aumentar la afinidad de los hongos por la cutícula de los insectos. Una alternativa para incrementar la virulencia fúngica puede desarrollarse durante los primeros pasos de la infección, mediante el uso de un insecto huésped como única fuente de carbono para el desarrollo fúngico.

La virulencia fúngica a menudo se relaciona con la velocidad de crecimiento y la capacidad para germinar rápidamente. La germinación de las esporas fúngicas es crucial para comenzar el proceso de infección. Un elevado porcentaje de germinación puede incrementar la probabilidad de infección (Altre y col., 1999). Los primeros estadios de germinación en *B. bassiana* requieren de una fuente exógena de carbono (Smith y Grula 1981) y la germinación de conidios hidrofóbicos probablemente está favorecida por un incremento en la afinidad del hongo por los componentes cuticulares. Existen reportes donde la germinación fúngica se vio incrementada ~5 veces después de una adaptación del hongo en presencia de hidrocarburos (Crespo y col., 2006), sugiriendo que los hidrocarburos pueden desencadenar la germinación así como funcionar como un sustrato catabólico.

La capacidad de utilización de nutrientes complejos a partir de la superficie cuticular podría mejorarse facilitando su degradación. Para este fin, la adaptación a crecer con insectos como única fuente de nutrientes podría mejorar efectivamente los parámetros de virulencia ya sea acortando el tiempo para matar o aumentando el número de insectos muertos. Después de una

adaptación de 14 días creciendo en presencia de n-C16, algunas cepas virulentas para coleópteros mejoraron su capacidad insecticida con una mortalidad que aumentó de $26 \pm 5\%$ a $60 \pm 7\%$ en *A. obtectus* (Crespo y col., 2002) y desde $26 \pm 8\%$ a $51 \pm 17\%$ en *R. dominica* (Padín y Dal Bello, comunicación personal).

Estos datos apoyan la evidencia de que la barrera de la cutícula de los insectos podría ser atravesada más fácilmente gracias a una mayor capacidad de degradación de los hidrocarburos. Por lo tanto, se puede establecer una relación directa entre la capacidad fúngica de catabolizar cadenas de hidrocarburos y la virulencia.

Estimular la eficiencia insecticida de *Purpureocillium lilacinum* mediante la modificación nutricional del hongo. Realizar una primera aproximación sobre el perfil enzimático de *P. lilacinum*.

1. **Modificación nutricional para estimular la eficiencia insecticida de *P. lilacinum*.**

1.1. Preparación del inóculo entomopatógeno. Descripto en I.2.2.1.

1.2. Cultivo de insectos. Descripto en I.1.4.

1.3. Medios de cultivo.

1.3.1. Materiales.

- Granos de maíz esterilizados con dos ciclos de autoclave (121°C durante 15 min c/u).

- Hidrocarburo sintético con 16 átomos de carbono: n-hexadecano (n-C16) diluido al 15% p/v en hexano.

- Hidrocarburo sintético con 18 átomos de carbono: n-octacosano (n-C28) diluido al 15% p/v en hexano.

- Medio de cultivo control (CC): KH_2PO_4 0,4 g, Na_2HPO_4 1,4 g, MgSO_4 0,6 g, KCl 1 g, NH_4NO_3 1,4 g, glucosa 20 g, extracto de levadura 10 g, agar-agar 15 g, agua destilada 1000 mL.

- Medio de cultivo suplementado (SC): $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0.4 g, PO_4HNa_2 1,4 g, SO_4Mg 0,6 g, ClK 1 g, NO_3NH_4 1,4 g, hidrocarburo sintético 20 mL, agar-agar 15 g, agua destilada 1000 mL.

- Agar agua (AA). Descripto en I.1.4.1.

1.3.2. Metodología.

Para la elaboración del medio de cultivo suplementado con hidrocarburos sintéticos, se trabajó con un medio mínimo al cual se le modificó la fuente carbonada (Crespo y col., 2002) y la a_w a 0,99, 0,97 y 0,95 mediante la adición de un soluto no iónico, glicerol (Dallyn y Fox 1980). En el medio suplementado se agregó n-C16 o n-C28 y la mezcla de ambos. Se preparó una solución de cada alcano en hexano al 15% p/v. El n-octacosano en solución precipita inmediatamente, por lo que debe mantenerse a baño María. Antes de adicionarlos al medio de cultivo, se filtraron con filtros de nylon con un tamaño de poro de 2 μm . Se incorporaron al medio de cultivo mínimo esterilizado en autoclave a 121°C y templado a 50°C en proporción de 2 mL cada 100 mL de medio.

1.4. Estudio de virulencia.

1.4.1. Metodología.

En cada medio de cultivo se sembró una alícuota de 1 mL de una suspensión de 10^7 esporas mL^{-1} de la cepa fúngica a estimular, se diseminó el inóculo con espátula de Drigalsky y se incubó durante 15 días a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Las placas de Petri con la misma a_w fueron colocadas en bolsas de polietileno cerradas, para evitar modificaciones en la actividad de agua. Transcurrido el

tiempo de incubación, a partir de cada placa se prepararon suspensiones de 10^7 esporas mL^{-1} de cada cepa de *P. lilacinum* a evaluar. Por otro lado se fraccionaron sub-muestras de 500 g de granos de maíz estériles en recipientes de plástico de 500 mL de capacidad y se agregaron a cada uno 20 insectos *T. confusum*. Estos insectos fueron tratados por inmersión durante 30 segundos en 1 mL de la suspensión de 10^7 esporas mL^{-1} (Goettel e Inglis 1997) de cada una de las cepas crecidas en los diferentes medios de cultivo. Los recipientes se incubaron en una cámara con condiciones controladas ($27 \pm 1^\circ \text{C}$, $70 \pm 5\%$ H.R., y fotoperiodo de 12:12 h) (Wicklow y col., 1998) y se analizó la mortalidad durante 20 días. Los resultados fueron comparados con controles no tratados. Los insectos muertos se sembraron directamente en placas de Petri que contenían medio agar agua y se incubaron a 25°C hasta observar desarrollo fúngico a partir del insecto, para confirmar que el hongo inoculado fuera el agente causal de la muerte. Calculamos el tiempo letal para cada cepa fúngica a partir de un análisis Probit.

2. Estimación de la producción y la actividad de enzimas extracelulares involucradas en la virulencia del hongo entomopatógeno.

2.1. Estimación de la actividad enzimática y la velocidad de crecimiento de *P. lilacinum* en diferentes sustratos.

2.1.1. Preparación del inóculo entomopatógeno. Descrito en I.2.2.1.

2.1.2. Materiales.

- agar nutritivo suplementado con gelatina: peptona 5 g, extracto de carne 3 g, NaCl 5 g, gelatina 10 g, agar-agar 15 g, agua destilada 1000 mL.

- agar nutritivo suplementado con almidón: peptona 5 g, extracto de carne 3, NaCl 5 g, almidón 10 g, agar- agar 15 g, agua destilada 1000 mL.

- medio suplementado con tween-20: peptona 10 g, NaCl 5 g, CaCl_2 1 g, Tween-20 10 mL, agar- agar 15 g, agua destilada 1000 mL.

- agar semisólido: agar-agar 2 g, agua destilada 1000 mL.

2.1.3. Soluciones de revelado.

- solución acuosa de reactivo de cloruro de mercurio: HgCl_2 15 g, HCl 7M 20 mL, llevado a un volumen final de 100 mL con agua destilada estéril.

- reactivo de yodo: cristales de yodo 65 mg, KI 130 mg en 100 mL de agua destilada estéril.

2.1.4. Metodología.

Según la metodología propuesta por Hankin y Anagnostakis (1975) evaluamos la actividad proteasa, amilasa y lipasa de las cepas de *P. lilacinum* JQ926212 y JQ926223. Para la actividad

proteasa, una suspensión de esporas de las cepas evaluadas fue inoculada por punción central en placas que contenían agar nutritivo suplementado con 1% de gelatina. Se incubaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 días. La degradación de la gelatina se observó como un halo de hidrólisis alrededor de la colonia fúngica. Esta zona se hace claramente visible si se inunda la placa con una solución saturada acuosa de reactivo de cloruro de mercurio. La solución de cloruro de mercurio reacciona con la gelatina presente en el medio de cultivo para producir un precipitado blanco que se hace visible en la zona de hidrólisis. El tamaño del halo de hidrólisis se tomó como indicativo de la actividad proteasa extracelular de la cepa fúngica. Además, se midió el radio de la colonia diariamente, o según fuera necesario, en 2 direcciones en ángulo recto durante un período de 11 días. La velocidad de crecimiento radial (mm d^{-1}) fue calculada por regresión lineal de la fase lineal de crecimiento (extensión radial del micelio vs. tiempo).

La actividad amilolítica se evaluó utilizando el almidón como fuente de carbohidratos en el medio de cultivo. Las esporas de cada cepa fúngica se inocularon por punción central, en placas de Petri que contenían agar nutritivo suplementado con 1% de almidón. Se incubaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 días. Al final del período de incubación, las placas fueron inundadas con reactivo de yodo, de esta manera se pudo visualizar un halo inmediatamente alrededor de la colonia, correspondiente a la zona de degradación del almidón, el cual se tomó como indicativo de la actividad amilolítica extracelular de la cepa fúngica. También se evaluó la velocidad de crecimiento de las cepas entomopatógenas en el medio suplementado con almidón, como se describió anteriormente.

Por último, evaluamos la producción de la enzima lipasa en las cepas fúngicas. Las esporas de cada cepa se inocularon por punción central en placas de Petri que contenían medio de crecimiento suplementado con 1% de tween-20. Se incubaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 días. Al final del período de incubación, se observó un halo de precipitación en torno a la colonia fúngica. Esta formación se atribuye a la producción de ácidos grasos a partir de lípidos presentes en el sustrato, siendo una estimación directa de la actividad lipolítica del hongo. Además, se calculó la velocidad de crecimiento en presencia de este sustrato.

La actividad enzimática (AE) en los tres sustratos se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$AE = D - d$$

(D) diámetro de la colonia + zona de hidrólisis; (d) diámetro de la colonia.

2.2. Estimación de la producción de enzimas extracelulares.

2.2.1. Materiales.

- medio mínimo suplementado con gelatina: NaCl 0,36 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,36 g, extracto de levadura 0,24 g, gelatina 0,5 g, 50 mL buffer para cada pH.

- medio mínimo suplementado con almidón: NaCl 0,36 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,36 g, extracto de levadura 0,24 g, almidón 0,5 g, 50 mL buffer para cada pH.

- buffer citrato pH 3-3,5:

Solución A: (ácido cítrico ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) 0,1M + hidróxido de sodio (NaOH) 1M 5:1) 40mL

Solución B: (ácido clorhídrico HCl 0,1M) 60mL

- buffer fosfato pH 7:

Solución A: (Fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4) 0,2M) 39mL

Solución B: (Fosfato disódico (Na_2HPO_4) 0,2M) 61mL

- buffer glicina pH 9-11:

Para pH 9

Solución A: (glicina 1M) 85,03mL

Solución B: (hidróxido de sodio (NaOH) 1N) 14,96mL

Para pH 11

Solución A: (glicina 1M) 52,3mL

Solución B: (hidróxido de sodio (NaOH) 1N) 47,7mL

- medio mínimo suplementado con tween-20: KNO_3 0,2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05 g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,044 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,11 g, Tween-20 0,5 mL, 50 mL buffer para cada pH.

- Reactivo de Biuret: $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 3,8 g, EDTA 6,7 g, NaOH 5 N 200 mL, KI 1 g, agua destilada 700 mL.

- emulsión de reacción: 25% (v/v) de aceite de oliva, 75% (v/v) de goma arábiga, 2 mL de buffer fosfato 10 mM a pH 7.

- Hidróxido de sodio (NaOH) 0,05 M: NaOH 1,9 g, agua destilada 1000 mL.

- Albúmina bovina.

2.2.2. Metodología.

A partir del método de Biuret, realizamos la determinación estimativa de la concentración total de proteasas extracelulares producidas por las cepas JQ926212 y JQ926223 de *P. lilacinum*. En primer lugar, desarrollamos una curva de calibración para proteínas totales, utilizando un extracto concentrado de albúmina bovina de 1 mg mL⁻¹. A partir del concentrado, particionamos en tubos eppendorf diferentes alícuotas de 25, 50, 75 y 100 µL y llevamos a volumen final de 100 µL con agua destilada estéril. Empleamos como blanco 100 µL de agua destilada. Se adicionó a cada tubo eppendorf 1mL de reactivo de Biuret. Para medir la absorbancia de cada solución de albumina y del blanco utilizamos un espectrofotómetro UV visible. Con los datos obtenidos graficamos absorbancia vs. concentración (mg mL⁻¹).

El ensayo se diseñó de la siguiente manera: ambas cepas fúngicas crecieron en erlenmeyers con 100 mL de medio mínimo suplementado con gelatina al 1% en distintas condiciones de a_w . La a_w del medio base se ajustó a 0,99, 0,97 y 0,95 por adición de un soluto no iónico, glicerol, según Dallyn y Fox (1980). El pH del medio fue ajustado a 3, 7, 9 y 11 con el agregado de buffer de citrato, fosfato y glicina respectivamente. Cada tratamiento fue inoculado con 1 mL de una suspensión de 10⁷ esporas mL⁻¹ de cada cepa de *P. lilacinum*. Se incubaron en

agitador a 150 rpm durante 3, 7, 10 y 15 días a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. A cada tiempo tomamos, en esterilidad, una alícuota de 1 mL de cada cultivo y centrifugamos a 13000 rpm durante 10 min. Recuperamos una alícuota de 100 μL y le adicionamos 1 mL de reactivo de Biuret. Medimos la absorbancia a 545 nm a cada muestra. A partir de la curva de calibración calculamos la concentración de proteínas totales de cada muestra. Empleamos como blanco de medición 1 mL de buffer sin inocular.

A partir de un análisis espectrofotométrico, realizamos la estimación cuantitativa de producción de enzimas amilasas de ambas cepas fúngicas. Las cepas crecieron en erlenmeyers con 100 mL de medio mínimo suplementado con almidón al 1% a distintas condiciones de a_w . El pH y la a_w del medio base se ajustaron como se describió anteriormente. Cada tratamiento fue inoculado con 1 mL de una concentración conocida de cada cepa de *P. lilacinum* (10^7 esporas mL^{-1}) y se incubaron en agitador a 150 rpm durante 3, 7, 10 y 15 días a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. A cada tiempo tomamos, en esterilidad, una alícuota de 1,5 mL de cada cultivo y centrifugamos a 5000 rpm durante 5 min. Recuperamos 1 mL del sobrenadante que empleamos como CEE (Extracto Crudo de Enzima) y le adicionamos 1 mL de una solución de almidón 1%. Se incubó a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min. Adicionamos 6 mL de agua para detener la reacción. Determinamos la actividad enzimática a partir de la medición de absorbancia a 540 nm. Empleamos como blanco de medición 1 mL de agua destilada.

Para la determinación de lipasas se siguió la metodología descrita por Hasan y col., (2013). Las cepas crecieron en erlenmeyers con 100 mL de medio mínimo suplementado con tween-20 al 1% a distintas condiciones de a_w . La actividad de agua y el pH se ajustaron como se describió en las dos experiencias anteriores. Cada tratamiento se inoculó con 1 mL de una concentración conocida de cada cepa de *P. lilacinum* (10^7 esporas mL^{-1}) y fueron incubados en agitador a 150 rpm durante 3, 7, 10 y 15 días a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

A cada tiempo tomamos, en esterilidad, una alícuota de 1 mL de cada cultivo y lo agregamos a 5 mL de una emulsión de reacción. Se incubó durante 30 min a 37°C y posteriormente se detuvo la reacción con el agregado de 15 mL de acetona/etanol (1:1) (v/v). Se utilizó fenolftaleína en etanol 90° al 1% como indicador.

La cantidad de ácidos grasos liberados, debido a la actividad de la enzima, se calculó mediante titulación con NaOH 0,05 M hasta el viraje del color de la mezcla de reacción a rosa. Una unidad de lipasa se define como la enzima que liberó 1 mol de ácido graso por minuto a 37°C a pH 7. Un mL de volumen de titulación es igual a 2,5 unidades de lipasa (Hasan y col., 2013).

3. Análisis estadístico de los datos.

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para evaluar el efecto de los diferentes sustratos y cepa fúngica sobre la producción enzimática. Por otro lado, con el mismo análisis

evaluamos el efecto de la a_w y sustrato sobre la velocidad de crecimiento de las diferentes cepas fúngicas y por último, el efecto de la actividad de agua, tiempo de incubación y pH sobre la producción de lipasas, amilasas y proteasas utilizando el programa estadístico InfoStat para Windows versión 2008 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Para establecer diferencias se realizó un test a posteriori con el método de comparación Tuckey test con un nivel de significancia $p < 0,05$.

1. Modificación nutricional para estimular la eficiencia insecticida de *P. lilacinum*.

El análisis estadístico del efecto de cepa, medio de cultivo y su interacción sobre la eficiencia insecticida de *P. lilacinum* mostró diferencias significativas (tabla IV.1). Aunque el principal efecto fue el de cepa, observamos diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de mortalidad según el medio de cultivo empleado para el desarrollo fúngico.

Con la cepa JQ926223 obtuvimos 80% de mortalidad cuando creció en medio de cultivo suplementado con C28 y con la mezcla C28 + C16, mientras que la cepa JQ926212 tuvo 75 y 60% de mortalidad con estos medios respectivamente. Ambos porcentajes son superiores a la mortalidad obtenida en los controles donde fue 70% y 50% para JQ926223 y JQ926212 respectivamente. El TL₅₀ de ambas cepas de *P. lilacinum* luego de desarrollar en presencia del n-octacosano y la mezcla (n-octacosano + n-hexadecano) fue en promedio 10,9 y 9,6 días respectivamente, ambos valores fueron menores al obtenido en el control 12,5 días (figura IV.1). En general la cepa JQ926212 mostró mayor TL₅₀ que la JQ926223 (figura IV.2). Sin embargo, la reducción en el TL₅₀ obtenido con la cepa crecida en medio suplementado comparado con el obtenido en los controles fue mayor para la cepa JQ926212.

Tabla IV.1. Significancia de las cepas fúngicas (I), medio de cultivo (CM) y su interacción en la actividad insecticida de dos cepas de *P. lilacinum* frente a *T. confusum* a 25 ° C.

Factor	GL ^a	CM ^b	F ^c	Pr < F
I	1	35.71	242.08**	p<0.0001
CM	2	9.93	67.29**	p<0.0001
I*CM	2	9.59	65.03**	p<0.0001

^a grados de libertad
^b cuadrados medios
^c F- Snedecor
**significativo p<0.0001

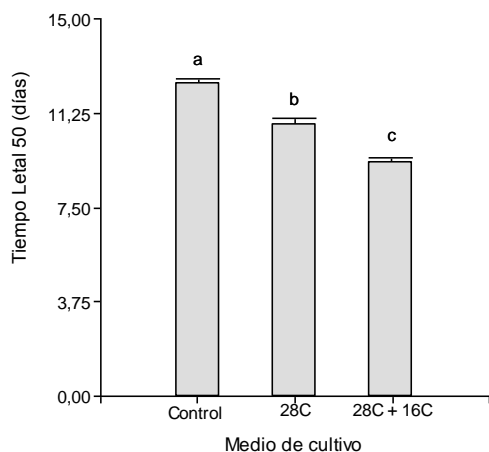


Figura IV.1. Tiempo Letal (TL_{50}) para los insectos *T. confusum* expuestos durante 15 días a las cepas de *P. lilacinum* JQ926212 y JQ926223 cultivadas en medio con y sin hidrocarburos.

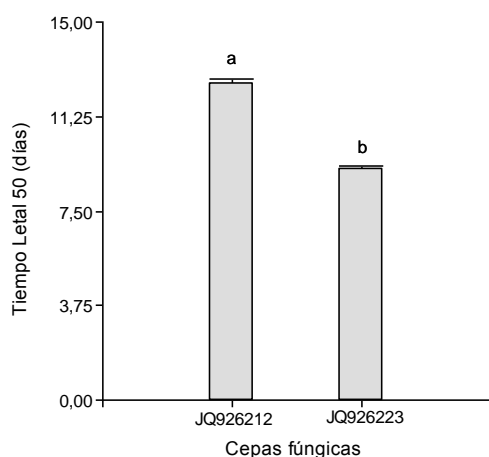


Figura IV.2. Tiempo Letal (TL_{50}) de dos cepas de *P. lilacinum* JQ926212 y JQ926223 luego de desarrollar en presencia de los hidrocarburos.

2. Estimación de la producción y la actividad de enzimas extracelulares involucradas en la virulencia del hongo entomopatógeno.

2.1 Estimación de la actividad enzimática y la velocidad de crecimiento de *P. lilacinum* en diferentes sustratos.

Mediante el empleo de gelatina, tween-20 y almidón como sustratos, se confirmó la producción de proteasas, lipasas y amilasas respectivamente por dos cepas de *P. lilacinum*. Los análisis estadísticos del efecto de sustrato, actividad de agua, cepa y sus interacciones sobre la producción de enzimas mostraron diferencias significativas ($p < 0,0001$). El mayor efecto fue el de sustrato ($F=79,99$) seguido por el de cepas ($F=31,41$). La mayor producción de enzimas extracelulares se obtuvo con el sustrato almidón, ambas cepas registraron la mayor producción a la a_w 0,99. En general, la cepa JQ926212 produjo menor cantidad de enzimas extracelulares que la cepa JQ926223. A la a_w 0,95, la cepa JQ926212 no produjo lipasas ni proteasas (figura IV.3).

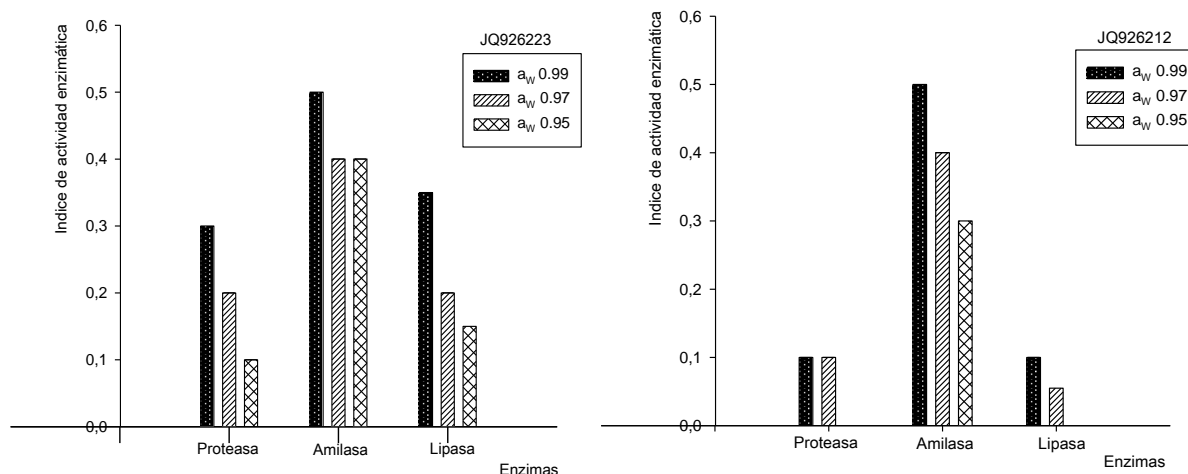


Figura IV.3. Índice de actividad de enzimas extracelulares de dos cepas de *P. lilacinum*.

La figura IV.4 muestra la velocidad de crecimiento de *P. lilacinum* JQ926212 y JQ926223 a diferentes a_w en presencia de los distintos sustratos a 25°C. Los análisis estadísticos sobre el efecto de las cepas, los sustratos, las a_w y las interacciones mostraron diferencias significativas (tabla IV.2). El mayor efecto fue el de a_w . En la figura se observa una reducción en la velocidad de crecimiento a medida que disminuye la a_w del medio de cultivo. La gelatina fue el sustrato donde, en general, ambas cepas mostraron mayor velocidad de crecimiento.

Tabla IV.2. Significancia de la actividad de agua (a_w), cepa fúngica (I), sustrato (S) y sus interacciones en la velocidad de crecimiento de *P. lilacinum* a 25°C.

Factor	GL ^a	CM ^b	F ^c	Pr < F
I	1	3.8×10^{-4}	25.21**	p<0.0001
a_w	2	0.02	1371.54**	p<0.0001
S	2	0.02	1265.70**	p<0.0001
I* a_w	2	8.6×10^{-4}	57.29**	p<0.0001
I*S	2	7.6×10^{-4}	50.22**	p<0.0001
a_w *S	4	7.9×10^{-4}	52.18**	p<0.0001
I* a_w *S	4	8.7×10^{-4}	57.64**	p<0.0001

a grados de libertad

b cuadrados medios

c F- Snedecor

** significativo p<0,0001

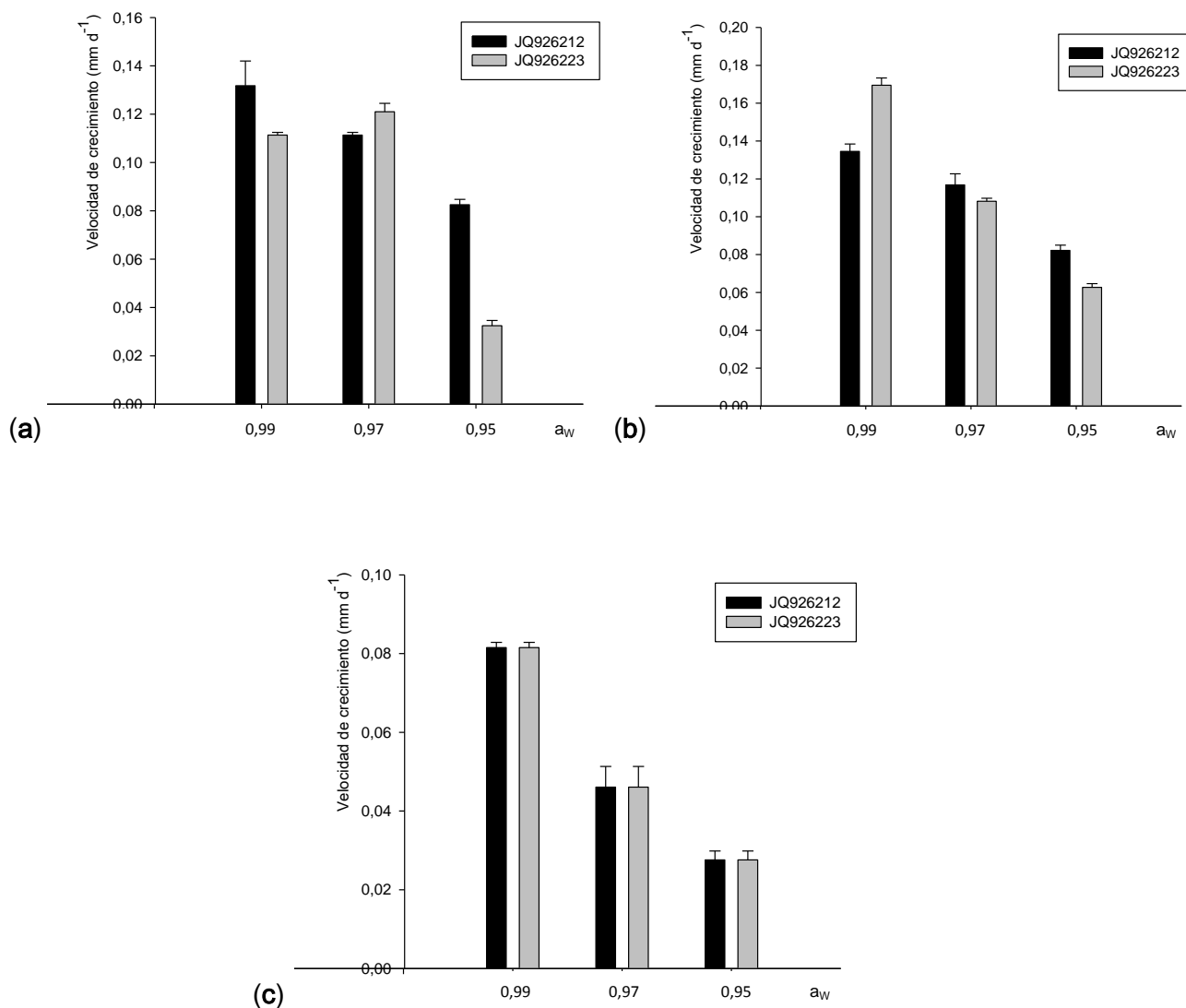


Figura IV.4. Efecto de diferentes sustratos (a) almidón, (b) gelatina, (c) tween-20, sobre la velocidad de crecimiento de *P. lilacinum* JQ926212 y JQ926223.

Se midió la producción de proteasas por espectrofotometría a pH 3, 7, 9 y 11 y a los 3, 7, 10 y 15 días de incubación. Se registraron valores elevados de proteasas. Los análisis estadísticos del efecto de cepa, a_w, pH, tiempo de incubación y sus interacciones mostraron diferencias significativas ($p < 0,0001$). El mayor efecto fue el de a_w ($F=35,38$) y pH ($F=4,52$). En general, las condiciones óptimas de producción fueron pH alcalino y a_w 0,95. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas con la producción registrada a pH ácido y a_w 0,97 (figura IV.5).

La estimación cuantitativa de la producción de amilasas, también se realizó mediante un análisis espectrofotométrico. Los análisis estadísticos del efecto de cepa, a_w, pH, tiempo de incubación y sus interacciones mostraron diferencias significativas ($p < 0,0001$). El mayor efecto fue el de pH ($F=23,29$) y tiempo de incubación ($F=14,88$). A los 3 días de incubación y pH 9, se

registró la mayor producción de amilasas, observando resultados similares a pH neutro (figura IV.6).

Mediante estimación de la capacidad de degradación del sustrato tween-20, se determinó la producción de enzimas lipolíticas. El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($p < 0,0001$). El principal efecto fue el de tiempo de incubación ($F=106,10$) y a_w ($F=5,58$). La máxima actividad lipolítica se registró a los 3 días de incubación, a la a_w 0,99 y pH alcalino (figura IV.7).

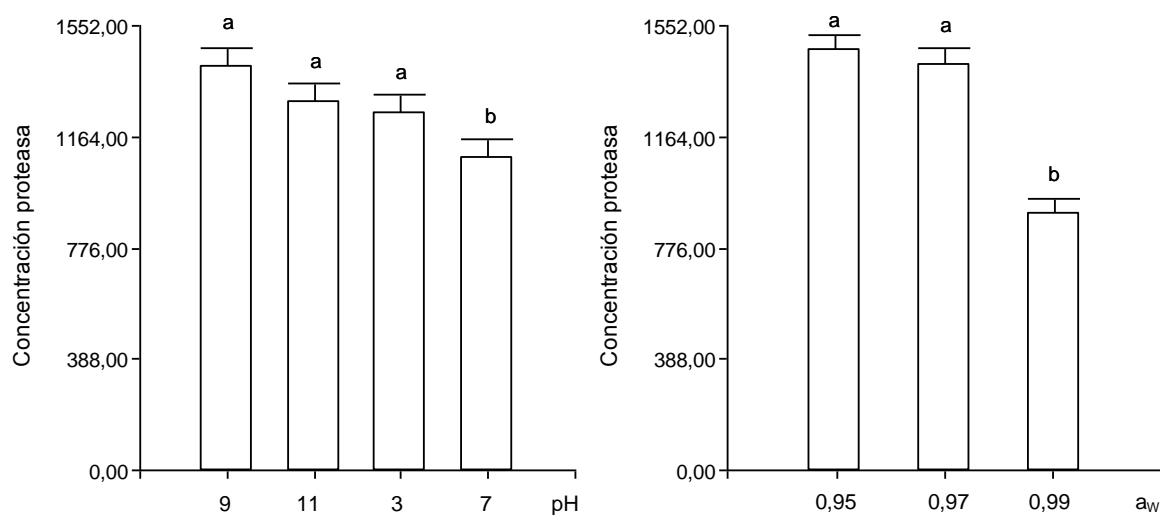


Figura IV.5. Producción de proteasas a diferentes a_w y pH por las cepas JQ926212 y JQ926223.

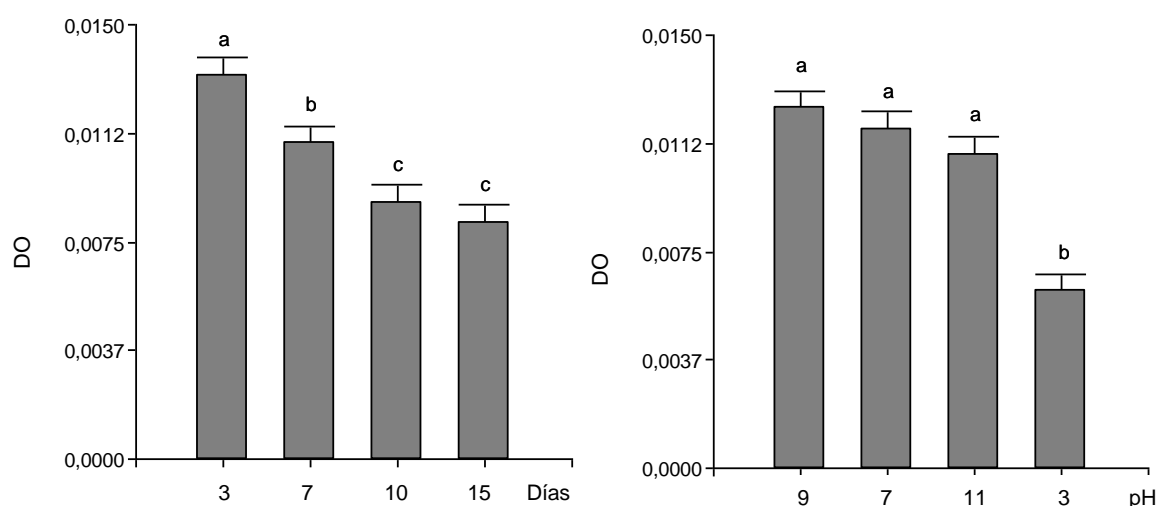


Figura IV.6. Producción de amilasas a diferentes tiempos y pH por las cepas JQ926212 y JQ926223.

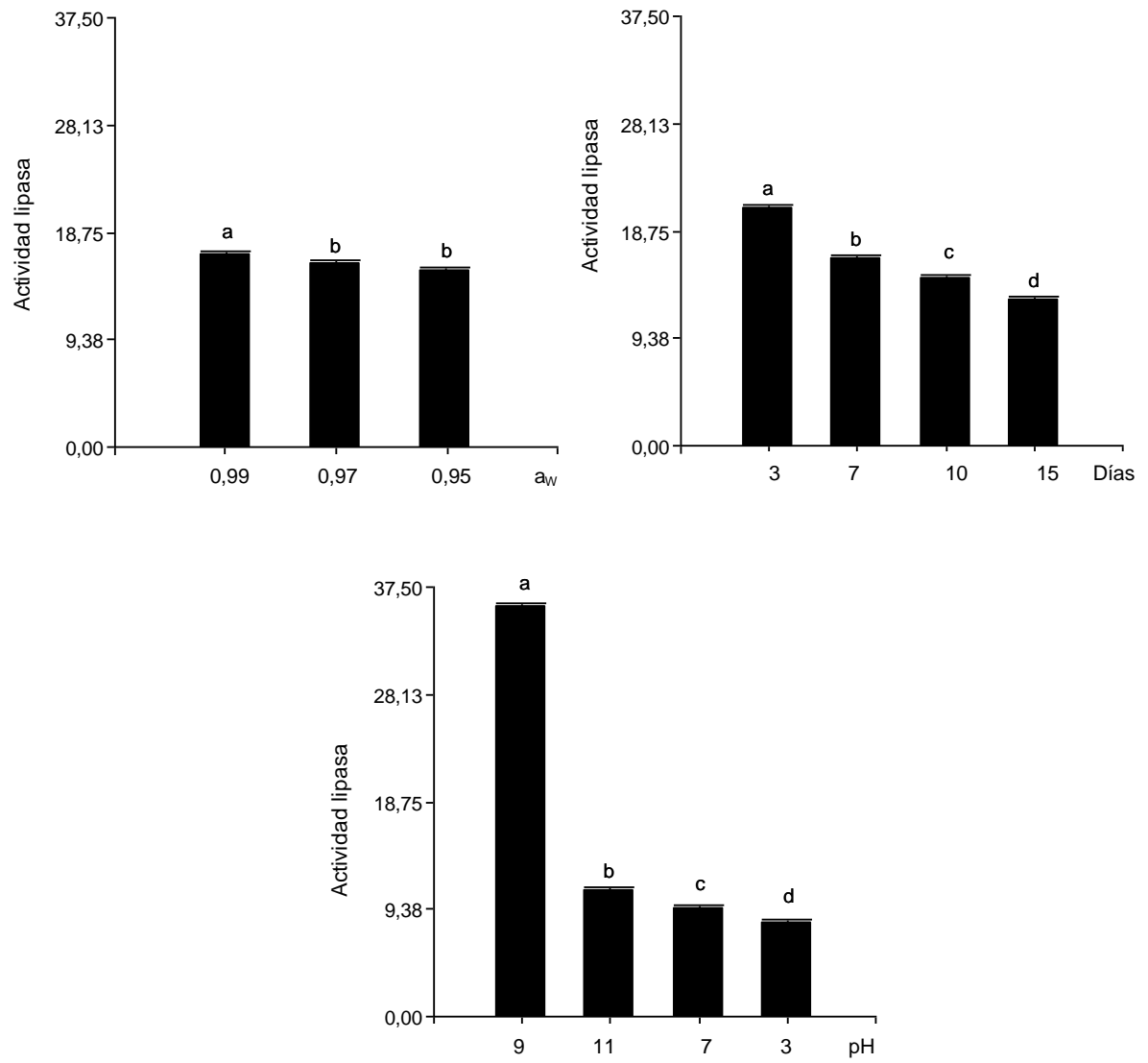


Figura IV.7. Producción de lipasas por las cepas JQ926212 y JQ926223.

La definición de virulencia más aceptada actualmente en patología de invertebrados es el grado de patogenicidad de un microorganismo dentro de un grupo o especie (Shapiro-Llan y col., 2005). En hongos entomopatógenos la virulencia puede variar con distintos sustratos nutritivos, presencia de otros microorganismos, factores climáticos, cuando se realiza el pasaje sobre insectos de distinta susceptibilidad al patógeno o cuando se multiplican en medios de cultivo sintéticos (Lecuona y Alves 1996). La virulencia de hongos entomopatógenos también es frecuentemente relacionada con la rapidez en la germinación y el crecimiento sobre la cutícula de los insectos hospedadores. Este aspecto refleja que además de las ventajas metabólicas que se aprecian en los hongos estimulados por repique en medios de cultivos con hidrocarburos; para degradar los hidrocarburos de las cutículas de los insectos (Suarez y col., 2000; Crespo y col., 2000; Pedrini 2006), la interacción hongo-cutícula se ve favorecida debido a un incremento de la afinidad de los conidios hidrofóbicos por los componentes cuticulares, disponiendo así de una ventaja inicial durante el proceso infectivo. En nuestro estudio el principal efecto fue el de cepa, no obstante, observamos diferencias significativas en el porcentaje de mortalidad según el medio de cultivo empleado para el desarrollo fúngico. Obtuvimos alrededor de un 15% más de mortalidad cuando hicimos crecer a las cepas de *P. lilacinum* crecieron en medios de cultivo suplementados con hidrocarburos. Pedrini y col., (2011), confirmaron la susceptibilidad de *A. obtectus* a *B. bassiana*, incrementando la mortalidad entre 60 a 100%, dependiendo de la cepa, luego de 14 días de su inoculación con hongos desarrollados en medios suplementados con hidrocarburos.

Asimismo, en *R. dominica* se detectó un significativo incremento en la mortalidad alcanzando un 90%. Estos resultados coinciden con los obtenidos en estudios anteriores en *A. obtectus* y en *Triatoma infestans* (Hemiptera: *Reduviidae*) utilizando cultivos adaptados a crecer en hidrocarburos, permitiendo concluir que mediante esta metodología es posible aumentar la virulencia favoreciendo las etapas iniciales de la infección (Crespo y col., 2002; Pedrini y col., 2007; 2009). Este incremento se evidencia tanto por un aumento en el porcentaje de mortalidad (Crespo y col., 2002) como por una disminución del tiempo letal medio (Pedrini y col., 2009).

Una vez producida la adhesión y germinación de los conidios, la penetración a través de la cutícula es la siguiente etapa del ciclo infectivo. La degradación de los hidrocarburos comienza con la reacción de complejos enzimáticos.

En nuestro estudio las condiciones óptimas de producción de proteasas fueron pH alcalino y a_w 0,95; sin embargo no hubo diferencias significativas con la producción obtenida a pH ácido y a_w 0,97. En general los valores de proteasas registrados fueron altos, probablemente debido a que la técnica empleada es para detección de proteínas totales. Resultados similares fueron reportados por Gómez Fernandez y col., (2012) quienes mostraron que *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *Paecilomyces* spp. fueron buenos productores de proteasas. Dicha producción se vio incrementada cuando los hongos crecieron en ausencia de glucosa y con gelatina como única fuente de carbono. Cada cepa fúngica mostró un aparato enzimático distinto, siendo *Paecilomyces* spp. la cepa que mostró mayor versatilidad para diferentes sustratos de enzimas. En el mismo estudio no se observó producción de proteasas cuando las cepas crecieron en medios de cultivo que contenían cutícula de insectos. Los autores atribuyen este resultado a que probablemente los hongos tenían una concentración muy baja de células en las condiciones del ensayo. Tiago y Silva (2007) mostraron resultados similares de *M. anisopliae* cuando desarrolló sobre la cutícula de *Mahanarva fimbriolata* y *Deois flavopicta*; sin embargo estos autores afirman que la mayor expresión de proteasas extracelulares (Pr1 y Pr2) se obtiene al hacer desarrollar la cepa fúngica en medio de cultivo líquido. Paterson y col., (1994); Pinto y col., (2002) y Tiago y col., (2002), lo confirmaron al analizar la producción de proteasas extracelulares por una cepa de *M. anisopliae* en medio de cultivo líquido con cutículas de varios insectos y polillas, indicando que dichas enzimas se producen en presencia de exoesqueleto. Otros estudios realizados con cepas del género *Pochonia* mostraron que este género también es productor de proteasas extracelulares en presencia de gelatina (Segers y col., 1994; López Llorca y col., 2002; Mendoza Gives y col., 2003; Mortan y col., 2003).

En nuestro estudio, el tiempo de incubación no mostró efecto significativo sobre la producción de proteasas, sin embargo Petlamul y Prasertsan (2012) mostraron que *M. anisopliae* y *B. bassiana* tuvieron actividad proteasa elevada durante los primeros 4,5 a 6 días de incubación, coincidiendo con lo reportado por otros investigadores quienes observaron la mayor actividad proteasa a los 5 días de incubación para ambas especies *M. anisopliae* y *B. bassiana* (Phar y Kaur 2010). La actividad proteasa de las cepas fúngicas decrece a medida que pasan los días de incubación, probablemente por limitación de

nutrientes o autólisis celular. Hasan y col., (2013) mostraron que la mayor actividad proteolítica de *V. lecanii* se observó a pH 7 y 9 después de 7 días de incubación y dicha actividad enzimática fue mínima a pH ácido. El mismo resultado fue reportado por St. Leger y col., (1999), quienes estudiaron la influencia del pH del medio sobre la producción de proteasas y concluyeron que la producción disminuye a medida que se acidifica el medio.

Macheronni y col., (2004) mostraron que las lipasas no se producen a pH ácido y son secretadas a pH neutro y alcalino. Resultados similares encontraron Silva y col., (2005), al evaluar la producción de lipasas por *M. anisopliae* en presencia de diferentes fuentes carbonadas. Los autores relacionaron este tipo de enzimas con la patogenicidad del hongo. En nuestro estudio, la máxima actividad lipolítica se registró a los 3 días de incubación, a la a_w 0,99 y pH alcalino. Hasan y col., (2013) registraron que el pH óptimo para la producción de lipasas por *V. lecanii* fue el pH 7. Esteves y col., (2009) concluyeron que las enzimas lipasas en *Pochonia clamydospora* son secretadas en pequeñas cantidades cuando se compara con la producción de otras enzimas extracelulares. Además en general la producción de lipasas requiere más días de incubación en comparación con la producción del resto de enzimas. En este estudio la actividad lipolítica en general fue baja, quizás porque la producción de enzimas puede haber requerido más tiempo. La mayoría de las cepas aumentaron la actividad de degradación de lípidos después de 7 días de incubación en un medio de cultivo líquido modificado con aceite de oliva, este sustrato ha demostrado aumentar la actividad lipolítica en *Fusarium solani* (Maia y col., 1999) y *M. anisopliae* (Silva y col., 2005), por lo que se pueden encontrar diferentes resultados dependiendo del sustrato utilizado.

Como ya mencionamos anteriormente, las enzimas extracelulares que degradan compuestos presentes en la cutícula de los insectos (Charnley 1997), tales como proteasas, quitinasas y lipasas están de alguna manera relacionadas con la virulencia de los hongos entomopatógenos (Jackson y col., 1985). Sin embargo, otros estudios no muestran una correlación entre las actividades enzimáticas y la patogenicidad fúngica (Rosato y col., 1981). Nuestros resultados fueron similares a los de López-Llorca y Carbonell (1999), con una elevada actividad proteolítica en todas las cepas. Las lipasas también estuvieron presentes en cantidades menores, mientras que la actividad amilolítica fue apenas detectable para la mayoría de las cepas. Esto podría deberse a una falta de producción de enzimas o a una localización intracelular o en la pared celular, debido a que se observó un buen crecimiento en los medios de cultivo suplementados con almidón. Según Jackson y col., (1985) existe

una relación inversa entre la actividad amilolítica y la patogenicidad. Existen al menos 2 hipótesis para estas observaciones (a) una ausencia de producción de amilasas puede ser fortuita asociado a algún factor de virulencia del hongo, o (b) los aislamientos no virulentos son predominantemente saprófitos y es probable que requieran alta actividad amilolítica para lograr la degradación de los residuos orgánicos del suelo. En nuestro estudio la óptima producción de actividad amilolítica fue a los 3 días de incubación y pH 9, no obstante se obtuvieron resultados similares a pH neutro. Estos resultados no coinciden con lo observado por Hasan y col., (2013) quienes encontraron la máxima actividad amilolítica de *V. lecanii* al séptimo día de incubación a pH 3 observando que la actividad disminuyó gradualmente hasta el día 21. Similares fueron los resultados encontrados por Maccheroni Jr. (2004) quien no encontró actividad amilolítica a pH alcalino en cepas de *Colletotrichum* spp. aisladas de muestras de hongos, pétalos y frutos; y si registraron degradación del almidón a pH neutro y ácido. López- Llorca y col., (1999) obtuvieron el mismo resultado en la producción de amilasas extracelulares por cepas de *V. lecanii* aisladas de muestras de suelo e insectos.

' La producción de enzimas de *P. lilacinum* fue influenciada por la a_w y los diferentes sustratos.

' La máxima producción de proteasas, amilasas y lipasas fue obtenida durante los primeros 3 días de incubación de *P. lilacinum* a pH alcalino.

' La a_w 0,99 fue óptima para la producción de lipasas y 0,95 para la producción de proteasas. No hubo diferencias en la producción de amilasas.

' La incorporación de n-octacosano y n-hexadecano al medio de cultivo mejoró la eficiencia insecticida de *P. lilacinum* contra *T. confusum*.

1. Abadias M., Teixido N., Usall J., Vinas I., Magan N. (2001) Improving water stress tolerance of the biocontrol yeast *Candida sake* grown in molasses-based media by physiological manipulation. *Canadian Journal of Microbiology* 47: 123-129.
2. Adler L., Pederson A., Tunblad-Johansson I. (1982) Polyol accumulation by two filamentous fungi grown at different concentrations of NaCl. *Physiologia Plantarum* 56: 139-142.
3. Altre JA., Vanderberg JD., Cantone FA. (1999) Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to diamondback moth, *Plutella xylostella*: correlation with spore size, germination speed, and attachment to cuticle. *Journal of Invertebrated Pathology* 73: 332-338.
4. Baker JE., Woo SM., Nelson DR., Fatland CL. (1984) Oleofins as major components of epicuticular lipids of three *Sithophilus weevils*. *Comparative Biochemical Physiology* 77: 877-884.
5. Barrett AJ. (1994) Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. *Methods in Enzymology* 244: 1-15.
6. Bidochka MJ. (1989) Interaction of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* with the migratory grasshopper *Melanoplus sanguinipes* a systematic study of pathogenesis. (PhD. Thesis). University of Saskatchewan. Canada.
7. Bidochka MJ., Khachatourians GG. (1990) Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper *Melanoplus sanguinipes*. *Journal of Invertebrated Pathology* 59: 165-173.
8. Bidochka MJ., St Leger RS., Roberts DW. (1997) Mechanisms of Deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. *Memoirs of the Entomological Society of Canada* 171: 213- 224.
9. Blackwell J., Weih MA. (1980) Structure of chitin-protein complexes: ovipositor of the ichneumon fly *Megarthyssa*. *Journal of Molecular Biology* 137: 49-60
10. Blomquist GJ., Nelson DR., de Renobales M. (1987) Chemistry, biochemistry and physiology of insect cuticular lipids. *Arch. Insect Biochemistry and Physiology* 6:227-265.
11. Blomquist, GJ., Dillwith JW. (1985) "Cuticular lipids". In: Kerkutand GA., Gilbert LI. (eds.) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* (Oxford: Pergamon Press), 117-154.
12. Boucias D., Pendland J. (1991) Attachment of mycopathogens to cuticle. In: Cole GT., Hoch HC., (eds.) *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*. Plenum Press: New York, NY, USA. pp. 101-127.
13. Boucias DG., Latge JP. (1988) Non-specific induction of germination of *Coridiobolus obscurus* and *Nomuraea rileyi* host and non-host cuticle extracts. *Journal of Invertebrate Pathology* 51: 168-171.
14. Boucias DG., Pendland JC. (1984) Nutritional requirements for conidial germination of several host range pathotypes of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *Journal of Invertebrate Pathology* 43: 288-292.

15. Boucias DG., Pendland JC., Latge JP. (1988) Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic *Deuteromyces* to host insect cuticle. *Applied Environmental Microbiology* 54: 1795-1805.
16. Buckner JS (1993) "Cuticular polar lipids of insects". In: Stanley-Samuelson DW., Nelson DR. (eds.) *Insect Lipids: Chemistry, Biochemistry and Biology* 227-270.
17. Carpenter JF., Crowe JH. (1988) The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiology* 25: 244-255.
18. Charnley AK. (2003) Fungal pathogens of insects: Cuticle degrading enzymes and toxins. In: *Advances in Botanical Research. Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology* 40: 241-321.
19. Cox D., Willis JH. (1987) Analysis of the cuticular proteins of *Hyalophora cecropia* with two dimensional electrophoresis. *Insect Biochemistry* 17: 457-468.
20. Crespo R., Juárez MP., Dal Bello GM., Padín S., Calderón Fernández G., Pedrini N. (2002) Increased mortality of *Acanthoscelides obtectus* by alkane-grown *Beauveria bassiana*. *BioControl* 47: 685-696.
21. Crespo R., Pedrini N., Juárez MP., Dal Bello G. (2006) Volatile organic compounds released by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiological Research* doi:10.1016/j.micres.
22. Dallyn H., Fox A. (1980) Spoilage of material of reduced water activity by xerophilic fungi. In: Gould GH., Corry EL. (eds.) *Microbial growth and survival in extreme environments*. London and New York: Academic Press 129-139.
23. Dias, B.A. (2005). Estudo de Proteases Degradadoras de Cutícula Produzidas Pelo Fungo Entomopatogênico *Beauveria bassiana*. Londrina. 70p. (M.Sc. Dissertation. Universidade Estadual de Londrina).
24. Esteves I., Peteira B., Atkins S., Magan N., Kerry B. (2009) Production of extracellular enzymes by different isolates of *Pochonia chlamydosporia*. *Mycological Research* 113: 867-876.
25. Fang WG., Feng J., Fan YH., Zhang YJ., Bidochka MJ., Leger RJS., Pei Y. (2009) Expressing a fusion protein with protease and chitinase activities increases the virulence of the insect pathogen *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 102: 155-159.
26. Ferron P. (1985) Fungal control. In: Kerkut GA., Gilbert LI. (eds.) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Academic Press, New York. pp. 313-346.
27. Frey S., Magan N. (2001) Production of the fungal biocontrol agent *Ulocladium atrum* by submerged fermentation: accumulation of endogenous reserves and shelf-life studies. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56: 372-377.
28. Goettel MS., Inglis GD. (1997) Fungi: Hyphomycetes. *Manual of Techniques in Insect Pathology*. In: Lacey LA. (ed.) Academic Press, San Diego, pp. 213-249.
29. Goettel MS., St. Leger RJ., Rizzo NW., Staples RC., Roberts DW. (1989) Ultrastructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus

- Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Journal of General Microbiology* 135: 2233-2239.
30. Golebiowski M., Malinski E., Bogus, M., Kumirska J., Stepnowski P. (2008) The cuticular fatty acids of *Calliphora vicina*, *Dendrolimus pini* and *Galleria mellonella* larvae and their role in resistance to fungal infection. *Insect Biochemical Molecular Biology* 38: 619–627.
31. Hajek AE., St. Leger RJ. (1994) Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology* 39: 293–322.
32. Hallsworth JE., Magan N. (1994a). Effects of KCl concentration on accumulation of acyclic sugar alcohols and trehalose in conidia of three entomopathogenic fungi. *Letters in Applied Microbiology* 18: 8-11.
33. Hallsworth JE., Magan N. (1994b). Effect of carbohydrate type and concentration on polyhydroxy alcohol and trehalose content of conidia of three entomopathogenic fungi. *Microbiology* 140: 2705-2713.
34. Hankin L., Anagnostakis SL. (1975) The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* 67: 597-607.
35. Hasan S., Ahmad A., Purwar A., Khan N., Kundan R., Gupta G. (2013) Production of extracellular enzymes in the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *Bioinformation* 9: 238-242.
36. Hepburn HR. (1985) Structure of the integument. In: Kerkut GA., Gilbert LI. (eds.) *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology* 3: 1- 58. Pergamon, Oxford.
37. Howard RW., Liang Y. (1993) Cuticular hydrocarbons of winged and wingless morphs of the ectoparasitoid *Choetospila elegans* westwood (Hymenoptera: *Pteromalidae*) and its host, larval lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica*) (Coleoptera: *Bostrichidae*). *Comparative Biochemistry Physiology* 106: 407–414.
38. Jackson CW., Heale JB., Hall RA. (1985) Traits associated with virulence to the aphid *Macrosiphoniella sanborni* in eighteen isolates of *Verticillium lecanii*. *Annual applied Biology* 106: 39-48.
39. Jennings DH., Burke RM. (1990) Compatible solutes - the mycological dimension and their role as physiological buffering agents. *New Phytologist* 116: 227-283.
40. Locke KH. (1978) The adult cuticular hydrocarbons of *Tenebrio molitor* L. and *Tenebrio obscurus* F. (Coleoptera: *Tenebrionidae*). *Insect Biochemistry* 8: 237–250.
41. Lockey KH. (1988) Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comparative Biochemistry Physiology* 89: 595–645.
42. Lopez-Llorca LV., Carbonell T. (1999) Characterization of Spanish strains of *Verticillium lecanii*. *Revista Iberoamericana de Micología* 16: 136-42.
43. Lopez-Llorca LV., Salinas J. (1999) *Prácticas de Fitopatología*. Revista Iberoamericana de Micología. ISBN 84-7908-537-1. Publicaciones de la Universidad de Alicante.

44. Lord JC., Howard RW. (2004) A proposed role for the cuticular fatty amides of *Liposcelis bostrychophila* (Psocoptera: *Liposcelidae*) in preventing adhesion of entomopathogenic fungi with dry-conidia. *Mycopathologia* 158: 211–217.
45. Luard EJ. (1982) Growth and accumulation of solutes by *Phytophthora cinnamomi* and other lower fungi in response to changes in external solute potential. *Journal of General Microbiology* 128: 2583- 2590.
46. Maccheroni Jr W., Welington LA., Azevedo JL. (2004) Ambient pH-regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus *Colletotrichum*. *Scientia Agricola* 61: 298-302.
47. Magan N. (2001) Physiological approaches to improving the ecological fitness of fungal biocontrol agents. In: Butt TM., Jackson C., Magan N. (eds.) *Fungi as Biocontrol Agents* Wallingford: CAB International.
48. Mendoza de Gives P., Behnke JM., Davies KG. (2003). Extracellular enzyme production by nematophagous fungi in the presence and absence of nematodes. *International Journal of Nematology* 13: 27-36.
49. Morton CO., Hirsch PR., Peberdy JF., Kerry BR. (2003) Cloning of and genetic variation in protease VCP1 from the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. *Mycological Research* 107: 38–46.
50. Napolitano R., Juárez MP. (1997) Entomopathogenous fungi degrade epicuticular hydrocarbons of *Triatoma infestans*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 344: 208–214.
51. Nelson DR., Fatland CL., Baker JE. (1984) Mass spectral analysis of epicuticular n-alkadienes in three *Sitophilus weevils*. *Insect Biochemistry* 14: 435–444.
52. Nelson DR., Blomquist GJ. (1995) Insect waxes. In: Hamilton RJ. (ed.) *Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions*. The Oily Press, LTD: Dundee, Scotland, UK. pp. 1-90.
53. Pascual S., Melgarejo P., Magan N. (2000) Accumulation of compatible solutes in *Penicillium frequentans* grown at reduced water activity and biocontrol of *Monilinia laxa*. *Biocontrol Science and Technology* 10: 71-80.
54. Patterson IC., Charnley K., Cooper RM., Clarkson JM. (1994) Specific induction of a cuticle-degrading protease of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Microbiology* 140: 185–189.
55. Pedrini N., Crespo R., Juárez MP. (2007) Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 146: 124-137.
56. Pedrini N., Juárez M., Crespo R., de Alaniz M. (2006) Clues on the role of *Beauveria bassiana* catalases in alkane degradation events. *Mycologia* 98: 528-534.
57. Pedrini N., Mijailovsky SJ., Girotti JR., Stariolo R., Cardozo RM., Gentile A., Juárez MP. (2009) Control of pyrethroid-resistant chagas disease vectors with entomopathogenic fungi. *Plos Neglected Tropical Diseases* 3:434. <http://www.plosntds.org/doi/pntd.0000434> abril 2011.

58. Rosato YB., Messias CL., Azevedo JL. (1981) Production of extracellular enzymes by isolates of *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 38: 1-3.
59. Saito T., Aoki J. (1983) Toxicity of free fatty acids on the larval surfaces of 2 Lepidopterous insects towards *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill and *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown Et Smith (Deuteromycetes: *Moniliales*). *Applied Entomology and Zoology* 18: 225-233.
60. Samsinakova A., Misikova S., Leopold J. (1971) Action of enzymatic systems of *Beauveria bassiana* on the cuticle of the greater wax moth larvae (*Galleria mellonella*). *Journal of Invertebrate Pathology* 18: 322-330.
61. Samson RA., Evans HC., Latgé JP. (1988) Atlas of Entomopathogenic Fungi. Springer. Verlag. New York, USA. pp. 187.
62. Segers R., Butt TM., Kerry BR., Peberdy JF. (1994) The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* produces a chymoelastase-like protease which hydrolyses host nematode proteins in situ. *Microbiology* 140: 2715–2723.
63. Shapiro-Ilan DI., Fuxa JR., Lacey LA., Onstad DW., Kaya HK. (2005) Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. *Journal of Invertebrate Pathology* 88: 1–7.
64. Smith RJ., Gula A. (1981) Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 37: 222–230.
65. Smith RJ., Gula EA. (1982) Toxic components on the larval Surface of the Corn-Earworm (*Heliothis zea*) and their effects on germination and growth of *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 39: 15–22.
66. Smith RJ., Pehrul S., Gula EA. (1981) Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of the corn earworm (*Heliothis zea*). *Journal of Invertebrate Pathology* 38: 335-344.
67. St. Leger R.J., Cooper RM., Charnley AK. (1986a). Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degradation *in vitro* by enzymes from entomopathogens. *Journal of Invertebrate Pathology* 47: 167–177.
68. St. Leger R.J., Charnley AK., Cooper RM. (1986b). Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* 48: 85–95.
69. St. Leger R.J., Cooper RM., Charnley AK. (1986c) Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* 47: 295-302.
70. St. Leger R.J., Cooper RM., Charnley AK. (1988) The Effect of melanization of *Manduca sexta* cuticle on growth and infection by *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 52: 459-470.
71. St. Leger R.J., Cooper RM., Charnley AK. (1987) Production of cuticle-degrading enzymes by the Entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticles from *Colliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. *Journal of General Microbiology* 133:1371–1382.

72. St. Leger RJ., Joshi L., Bidochka MJ., Roberts DW. (1996) Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 93: 16349–16354.
73. Terhune BT., Hoch HC. (1993) Substrate hydrophobicity and adherence of *Uromyces urediospores* and germlings. *Experimental Mycology* 17: 241–252.
74. Wösten HAB., de Vocht ML. (2000) Hydrophobins, the fungal coat unraveled. *Biochimica et Biophysica Acta* 1469: 79–86.

Conclusiones finales

Las conclusiones más relevantes alcanzadas durante el desarrollo de esta tesis fueron las siguientes:

- El suelo fue el mejor sustrato del agroecosistema de maíz para el aislamiento de potenciales agentes de biocontrol, siendo la especie entomopatógena *Purpureocillium lilacinum* la que mostró mayor virulencia contra *Tribolium confusum*, *Rhizopertha dominica* y *Sitophilus zeamais*, principales insectos plaga de maíz almacenado, vectores de hongos aflatoxicogénicos.
- Los antioxidantes de grado alimentario butilhidroxianisol (BHA) y butilhidroxitolueno (BHT) y el fitoquímico natural ácido cinámico (AC), todos con actividad insecticida y fungicida probada, no afectaron la viabilidad de las esporas de *P. lilacinum*, mostrando compatibilidad con el hongo entomopatógeno.
- *P. lilacinum* además de mostrar virulencia contra los insectos vectores, produjo una inhibición completa del desarrollo del hongo toxicogénico *A. flavus* cuando interaccionaron en medio de cultivo.
- La producción enzimática de *P. lilacinum* se vio afectada principalmente por la disponibilidad de agua y el tipo de sustrato, alcanzándose la máxima producción de proteasas, amilasas y lipasas en los primeros días de incubación a pH alcalino.
- Se logró un incremento de la eficiencia insecticida de las cepas entomopatógenas cuando crecieron en presencia de alcanos.
- La combinación entre el hongo entomopatógeno *P. lilacinum* y el antioxidante de grado alimentario BHT en dosis subletal, mostró 100% de efectividad insecticida contra los insectos plaga en granos de maíz y redujo la acumulación de AFB₁ siendo un potencial tratamiento para el manejo integrado.

Isolation and identification of entomopathogenic fungi and their evaluation against Tribolium confusum, Sitophilus zeamais, and Rhyzopertha dominica in stored maize

P. Barra, L. Rosso, A. Nesci & M. Etcheverry

Journal of Pest Science

ISSN 1612-4758

Volume 86

Number 2

J Pest Sci (2013) 86:217-226

DOI 10.1007/s10340-012-0460-z



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Isolation and identification of entomopathogenic fungi and their evaluation against *Tribolium confusum*, *Sitophilus zeamais*, and *Rhizopertha dominica* in stored maize

P. Barra · L. Rosso · A. Nesci · M. Etcheverry

Received: 31 May 2012 / Accepted: 26 August 2012 / Published online: 7 September 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract The objective of this study was to isolate and identify native entomopathogenic fungi from different components of maize agroecosystem, and evaluate their virulence against *Tribolium confusum*, *Rhizopertha dominica*, and *Sitophilus zeamais*, three insect pest vectors of aflatoxigenic fungi. *Paecilomyces* and *Metarhizium* were the most abundant genera isolated from the soil. Identification of fungal cultures by DNA extraction, amplification, and sequencing showed that all isolates macro- and micromorphological identified as *P. lilacinus* were *Purpureocillium lilacinum*. The isolate JQ926223 showed the lowest LT₅₀ for *T. confusum* (4, 66 days) and *R. dominica* (9, 38 days), and the isolate JQ926212 demonstrated similar LT₅₀ for the three insects evaluated between the range of 11, 7 to 14, 95 days. Maximum mortality rate was observed for the isolate JQ926223. The isolates of *Purpureocillium lilacinum* JQ926223 and JQ926212 may be considered good candidates for biologic control in the ecosystem of stored maize.

Keywords Entomopathogenic fungi · Maize agroecosystem · Stored pest · LT₅₀ · Mortality

Communicated by C.G. Athanassiou.

P. Barra · A. Nesci (✉) · M. Etcheverry
Laboratorio de Ecología Microbiana, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas Físico Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Ruta Nacional 36, km 601, Río Cuarto, Córdoba, Argentina
e-mail: anesci@exa.unrc.edu.ar

L. Rosso
Istituto per la Protezione delle Piante, Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Bari, Italy

Introduction

Maize (*Zea mays* L.) is one of the main crops in Argentina. Over the sixty percent of maize produced in this country is exported (INAI 2009). To maintain or increase this percentage, maize producers and stockpilers must assure the importer countries good quality grains and free of contaminants. The saprophytic activity of different fungus, like species of the genus *Aspergillus*, is the main cause of degradation of agricultural products before and after harvest. Fungi of this genus can grow in a wide range of environmental conditions; therefore, preharvest, harvest, and storage conditions are ideal (Payne 1998). Potentially toxigenic *Aspergillus* section *Flavi* strains were extensively distributed in non-rhizospheric soil, debris, and insects of maize agroecosystem (Nesci and Etcheverry 2002). Moreover, *Aspergillus* section *Flavi* was constantly recovering from soil under different tillage practices (Nesci et al. 2006). The agroecosystem of stored grain has its own dynamic which depends on environmental, biologic, and substrate-specific factors. The interaction between the substrate, the biologic, and the abiotic factors may favor the invasion of *Aspergillus* species and lead to the concomitant production of mycotoxins called aflatoxins. Aflatoxins, especially aflatoxin B₁ (AFB₁), are considered the most carcinogenic, mutagenic, and teratogenic substance found naturally in foods and feeds (IARC 1993).

Insects are involved in the colonization of grains. They can provide sites for fungal infection through the damage that can result in grain. It is therefore essential to understand that in this biologic system, insects are a common problem. *Sitophilus zeamais* (Motschulsky), *Rhizopertha dominica* (Fabricius), and *Tribolium confusum* (Jacquelin du Val) cause significant damage to stored maize (Mejía 2007). Damage may be direct, such as weight loss, reduced

germination, and reduced nutritional value of grain. Indirect damage can be heat and moisture migration, reservoir of disease, and distribution of microorganisms (White 1995). Previous studies show that certain insects that attack stored grains have the ability to disperse toxigenic *Aspergillus flavus* in those grains (Nesci et al. 2011a, b).

Knowing that many insects, besides damaging the grain, are vectors of *Aspergillus* section *Flavi* which facilitates increased levels of aflatoxins, integrated control strategies are necessary. Currently, most of the post-harvest management of insect pests is made with synthetic chemical insecticides. However, the use of synthetic insecticides allowed in Argentine grains for export is very limited (Casini and Santajuliana 2012). In recent times, the research is aimed at finding ways to prevent the entry of xenobiotics in the food chain (Jayashree and Subramanyam 1999). Therefore, the search for natural methods of crop protection is still valid despite the fact that the market offers a wide variety of products. There are biologic agents with natural potential to protect crops. This derives from the intrinsic richness of species and their struggle for survival (Stoll 1989). Entomopathogenic fungi are natural enemies of a wide range of insects and some species are used as microbial bio pesticides (Tanada and Kaya 1993; James and Elzen 2001). Entomopathogenic fungi are distributed in a wide range of habitats including aquatic forest, agricultural, pasture, desert, and urban habitats (Sánchez-Pena 1990; Lacey et al. 1996; Chandler et al. 1997). The selection of virulent isolates adapted to local components of the agroecosystem is one of the most important aspects in the development of mycoinsecticides (Cortez-Madrigal et al. 2003). Soil is considered an excellent environmental shelter for entomopathogenic fungi since it is protected from UV radiation and other adverse abiotic and biotic influences (Keller and Zimmermann 1989). Isolation of entomopathogenic fungi involves soil sampling since that is their natural habitat (Asensio et al. 2003). It is also interesting to compare the diversity of entomopathogenic fungi in different components of the same ecosystem to obtain greater variety of antagonistic microorganisms (Cross et al. 1999; Bidochka et al. 1998; Asensio et al. 2003).

Numerous studies show that isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin are potential microbial control agents against some stored product pests (Tanya and Doberski 1984; Adane et al. 1996; Hidalgo et al. 1998; Dal Bello et al. 2001; Ekesi et al. 2001; Padin et al. 2002; Khashaveh et al. 2008). Nevertheless, there is a constant search for other fungal biologic control agents, including nematophagous fungi like *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson (Fiedler and Sosnowska 2007). *P. lilacinus* is a soil-inhabiting fungus that has shown promising results for

use as an effective biocontrol agent (Morgan-Jones et al. 1984; Jatala 1986; Dube and Smart 1987; Khan et al. 2006).

The objective of this study was to isolate and identify native entomopathogenic fungi from different components of maize agroecosystem, and evaluate their virulence against *Tribolium confusum*, *Rhizopertha dominica*, and *Sitophilus zeamais*, three insect pest vectors of aflatoxigenic fungi.

Materials and methods

Sampling site

Soil samples were collected from the University of Río Cuarto Experimental Field Station in Río Cuarto, Córdoba, Argentina (30°57'S latitude, 64°50'W longitude, 562 m altitude) during the maize growing season (2009–2010). Soil consisted of a sandy loam texture (pH 6.1 in water 1:1 v/v, 1.4 % organic matter, 86 ppm of nitrates).

Collection procedures

Sampling was performed during the first 20 days of development of the maize crop. Fifty samples of non-rhizospheric soil were collected. Each of the samples was taken from the top 3 cm of soil at different places within the field. The samples were taken in double diagonal section at 4 m intervals. Samples were individually placed in plastic bags and stored at -20°C until analysis.

From 50 soil samples, 25 samples were selected randomly and dried at 50°C during 24 h. Dried samples were passed through a testing sieve (2-mm mesh size) and the debris separated from the soil. The debris were placed in plastic bags and stored at -20°C until use.

Isolation and identification of entomopathogenic fungi

Insect baiting method

Cultures of one strain of the confused flour beetle *Tribolium confusum* (Jacquelin du Val) were obtained from the Department of Agricultural Zoology, Faculty of Agronomy, University of Buenos Aires, Argentina. Mixed-sex adults 1–3 weeks old were used in the test. Insects were reared on a diet of wheat flour, corn starch, and yeast (10:10:1.5) in plastic containers containing 200 g of the mixture. Insects were reared at $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ and $70 \pm 5\%$ relative humidity (R.H.) and photoperiod of 12:12 h light:dark cycle. These insects were used to entomopathogenic fungi isolation. Three types of substrates were used; twenty five dried soil samples (250 g each) without debris,

10 not-dried soil samples (250 g each) with debris, and 5 maize grain samples (500 g each). Maize grains were harvested from plants grown in the same experimental maize field in the growing season 2009–2010. All samples were weighed in plastic jars of 500-ml capacity. Twenty adults of insects were placed per jar. All jars were placed in a chamber with controlled conditions $27 \pm 1^\circ\text{C}$ and $70 \pm 5\%$ relative humidity (R.H.) and incubated during 15 days. After 15 days, all samples were frozen at -20°C to kill insects. Then, the soil and maize samples were sieved to recover the insects. Recovery insects were surface-disinfected using 1 % sodium hypochlorite for 1 min. The disinfected agent was eliminated and insects were washed two times in sterile distilled water (5 min each time). Insects were finally plated directly on semi-selective isolation media (SM) (maize meal 17 g l^{-1} , CINa 17.5 g l^{-1} , rose bengal 75 mg l^{-1} , triton X-100 0.3 ml l^{-1} , chloramphenicol 50 mg l^{-1} , streptomycin 0.1 ml l^{-1} , cycloheximide 2.5 ml l^{-1} , and agar-agar 15 g l^{-1} , 1,000 ml) and incubated at 25°C during 10 days. After the incubation period, colonized insects were analyzed. The colonies isolated from insects, suspected to be entomopathogenic fungi, were subcultured on Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (trypticase 5 g l^{-1} , peptone beef 5 g l^{-1} , glucose 20 g l^{-1} , and agar-agar 15 g l^{-1} , 1,000 ml) and incubated at 25°C during 10 days. The control treatment consisted of taking 80 insects from containers in which they were kept, and frozen at -20°C to kill them. Then, the insects were surface disinfected and finally plated directly and incubated as described above. After microscopic observation, genus was assigned according to Samson (1974), Samson et al. (1988), Humber (2005) and Luangsa-ard et al. (2011).

Soil samples

The soil plating method was adapted from Garrido-Jurado et al. (2011). Enumeration of fungal propagules was carried out on solid medium, by the surface spread method, by blending 10 g of soil from each of the 25 samples randomly selected from a total of 50 samples with 90 ml 0.1 % peptone water solution. Serial dilutions from each sample and 0.1 ml aliquots were inoculated in SM medium and incubated at 25°C for 13 days. Fungal count was expressed as \log_{10} per g of soil. The fungi were subcultured to SDA medium to obtain pure cultures and identified by microscopic characteristics as described above.

Debris samples

The experience was conducted according to the methodology proposed by Nesci and Etcheverry (2002) with some modifications. Twenty five pieces of debris from each of

the 25 samples were surface disinfected using 1 % sodium hypochlorite for 1 min. The disinfected agent was eliminated and debris pieces were washed two times in sterile distilled water (5 min each time). Debris pieces were finally plated directly on SM medium and incubated at 25°C for 10 days. After the incubation period, colonized debris was analyzed. Count of possible entomopathogenic fungi was expressed as percentage of contaminated pieces. The fungi were subcultured and identified as described above.

Extraction of DNA from fungi grown in culture

The fungal cultures isolated in the previous assays were maintained in sterile soil (Abreu et al. 2003). All fungal cultures were grown on PDA medium for 7 days at 25°C . Mycelial biomass was extracted for DNA analyses according to the procedure of Passone et al. (2010) with same modifications. An aliquot of 100 mg mycelium of each fungal isolate was transferred into microtubes. The mycelium was vortexed for 1 min in the presence of 300 μl of sterile water plus 700 μl of extraction buffer (100 mM Tris-HCl, 2 % CTAB, 1.4 mM NaCl) and glass beads (425–600 μm diameters) to favor the disruption of fungal material. After incubation at 65°C for 60 min, 500 μl of chloroform was added to the sample, homogenized and centrifuged for 10 min at 13,000 rpm. The aqueous phase was recovered and 500 μl of chloroform was added. The sample was homogenized and centrifuged again for 10 min at 13,000 rpm. The aqueous phase was recovered and precipitated with 2 volumes of precipitation buffer (14 mM CTAB, 40 mM NaCl, pH 8). After incubation at room temperature for 1 h, the sample was homogenized and centrifuged for 5 min at 13,000 rpm. The sample was homogenized by inversion in presence of NaCl (1 M) 350 μl and chloroform 350 μl and centrifuged for 5 min at 13,000 rpm. Chloroform phase was recovered and precipitated with 0.6 volumes of isopropanol at -20°C . After incubation at room temperature for 20 min, it was centrifuged for 10 min at 13,000 rpm and the aqueous phase was discarded. Finally, the DNA pellet was washed with 70 % ethanol and suspended in 25 μl of nuclease-free H_2O . Polymerase chain reaction (PCR; TECHNE TC-512, Barloworld, Scientific Ltd., UK) was conducted in 50 μl reactions with the following concentrations: 5 U μl^{-1} of Invitrogen (Brazil) *Taq* DNA polymerase, 5 \times Invitrogen Buffer, 2 mM of dNTPs Invitrogen, 1.5 mM Mg^{2+} , and 3 pmol μl^{-1} of each primer. The primers used were the fungus-specific forward primer EF1T (ATGGGTAAGG-ACAAGAC) and the reverse primer EF2T (GGAAG-TACCAGTGATCATGTT) (O'Donnell et al. 1998) manufactured by Invitrogen Custom Primers (Carlsbad, CA). PCR was carried out by the following protocol: initial

denaturation at 94 °C for 1 min, followed by 31 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 56 °C for 45 s, extension at 72 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 5 min. The reaction was held at 4 °C. The presence of PCR products was confirmed by gel electrophoresis on agarose gel.

Purification, sequencing, and identification of fungal DNA

Purification of PCR products was conducted using DNA Wizard Clean-Up Kit (product A9282, Promega, Madison, WI). To estimate the concentration of DNA needed for sequencing, purified PCR products were compared with Invitrogen's Low DNA Mass Ladder. All samples were sequenced using an Applied Biosystem ABI 3730 sequencer (Applied Biosystem). Each PCR product was sequenced in the forward and reverse directions, and consensus sequences were created by means of the BioEdit program version 7.0.9.0. (Thompson et al. 1994) (<http://www.mbio.ncsu.edu/RNasaP/info/programs/BIOEDIT/bioedit.html>).

Lethal time and percentage of mortality

The lethal time (LT₅₀), the number of days until 50 % of insects were dead, was determined for each of the 20 fungal suspensions. For this purpose, subsamples of maize grains of 500 g were put into plastic jars and then 20 adults of each insect pest *Tribolium confusum*, *Sitophilus zeamais*, and *Rhyzopertha dominica* treated by immersion for 30 s with 600 µl of 10⁷ spores ml⁻¹ suspensions of each entomopathogenic fungi (Goettel and Inglis 1997) were introduced in each jar (Padín et al. 1997). All jars were placed in a chamber with controlled conditions (27 ± 1 °C, 70 ± 5 % R.H., with photoperiod of 12:12 h light:dark cycle) (Wicklów et al. 1998). Mortality was analyzed during 20 days and compared with the untreated control samples. All dead insects were placed directly on plates containing water agar medium (agar–agar 15 g l⁻¹, distilled water 1,000 ml), which were incubated at 25 °C for 7 days to confirm that the inoculated fungus was the causal agent of the death of insects. The lethal time (LT₅₀) for each of the fungal isolates was analyzed by probit analysis.

Statistical analysis

Analysis of variance was performed on LT₅₀ and mortality percentage using SigmaStat for windows version 3.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). To establish differences, Holm-Sidak Method was performed.

Results

Isolating entomopathogenic fungi by the insect bait method

The total number of insects bait plated on semi-selective isolation medium were 800: 200 prior contact with 10 not-dried soil samples with debris, 500 prior contact with 25 dried soil samples without debris, and 100 prior contact with 5 maize grain samples. Table 1 shows the percentage of samples with fungal contamination, in which insects were in contact. In 90 % of soil samples and in 100 % of grain samples, insects showed fungal contamination. However, all insects placed in maize grains were colonized by *Fusarium*.

Samples of not-dried and dried soil used to place insects bait showed between 5–25 and 5–45 %, respectively, of fungal contamination. The highest percentages of infection were detected in dried soil samples. Only insects of 4 samples were completely free of fungal contamination.

Figure 1 shows the frequency of different fungal genera isolated from insect bait. They were *Penicillium*, *Fusarium*, and *Paecilomyces*. Genus *Penicillium* was isolated with more frequency reaching 56.3 % of infection. The 40.5 % of fungal isolates were identified as species from genera *Fusarium*; only 3.2 % were identified as species from genera known to include potential entomopathogenic species, such as *Paecilomyces*.

Entomopathogenic fungi isolated from soil and debris samples

Our results showed that microbiota population was different in soils and debris samples. Densities of filamentous fungi in soil samples varied between 2 × 10² and 1.1 × 10⁴ ufc g⁻¹ (Fig. 2a). Mycoflora analysis showed that the 64 % of total fungal population isolated was confirmed as fungus from possible entomopathogenic genera. Figure 2b shows that the main entomopathogenic genus isolated was *Paecilomyces*, comprising 75 % of the total isolates, while

Table 1 Fungal contaminations with potential entomopathogenic fungi from insects bait prior contact with not-dried soil samples, dried soil samples and maize grain, and percentage of debris contaminated

Substrate	% Infection (±ES)	
	Bait insects	Debris
Dried soil	21 ± 2.4	15.2 ± 3.7
Not-dried soil	10.5 ± 2.8	NE
Maize grain	100 ± 0	NE

NE not evaluated

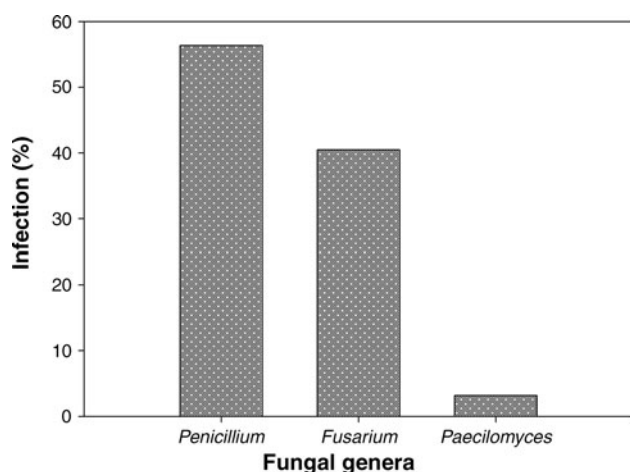


Fig. 1 Frequency of different fungal genera isolated from insects bait

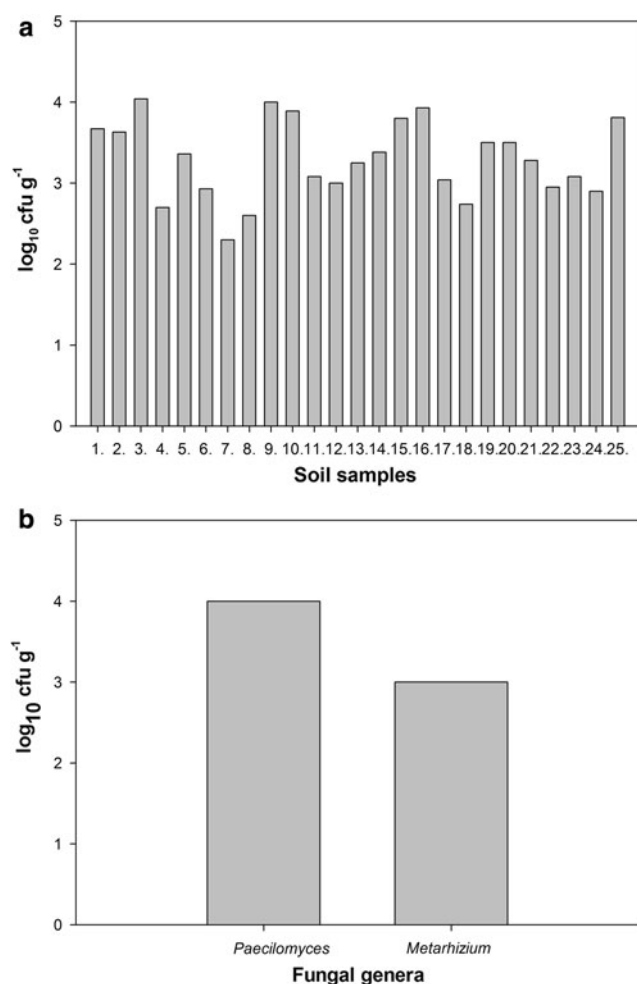


Fig. 2 a Incidence of potential entomopathogenic fungi in soil samples. **b** Incidence of different fungal genera isolates from soil samples

the remaining 25 % corresponded to isolates belonging to the genus *Metarhizium*. The counts were 4 and 3 log for *Paecilomyces* and *Metarhizium*, respectively.

Micobiota analysis of 25 debris samples showed that 40 % of samples (10 samples) were contaminated with fungi with percentage of debris contaminated between 4 and 36 % (Table 1). All fungi isolated were identified as *Fusarium* and *Penicillium*, none of interest in this study.

Identification of entomopathogenic fungus

The 35 *Paecilomyces* isolates were identified as *Paecilomyces lilacinus*. These isolates showed colonies on MEA of fast growing, attaining a diameter of 20–37 mm after 7 days at 25 °C. Colonies consisting of a basal felt with or without floccose aerial overgrowth, the color is white at first and becoming vinaceous, reverse mostly in shades of purple or sometimes uncolored. Conidiophores are erect with roughened thick walls around 3- μ m wide consisting of verticillate branches with two to four phialides. The phialides measure 8 \times 2.1 μ m and have a swollen basal portion tapering into a short neck. Conidia in divergent chains are ellipsoidal to fusiform, hyaline, measuring 2.8 \times 2.4 μ m. No or restricted growth was observed at 37 °C with colonies of 2–3 mm of diameter.

All these isolates were selected for DNA analysis. Seventy-seven cultures isolates provided clean sequence results. All culture isolates, when sequenced and compared with those in GenBank, were identified as *Purpureocillium lilacinum* (Table 2). Fifteen isolates showed a 99 % homology to the BLAST identities for sequences from *P. lilacinum*. Nine isolates are identical to the BLAST identities and 3 isolates showed homologies of 98, 97, and 95 %.

Determination of lethal time (LT₅₀)

The mortality in control treatment was low (<10 %) and no mycosis was detected on any insects. LT₅₀ values for 20 isolates of *P. lilacinum* against *T. confusum* varied from 4.66 to 17.41 days (Table 3). However, LT₅₀ values against *S. zeamais* and *R. dominica* were higher with values ranging between 11.13 to >62.5 days and 9.38 to 48.38 days, respectively. The isolate JQ926223 showed the lowest LT₅₀ for *T. confusum* and *R. dominica*, but the highest LT₅₀ for *S. zeamais*. The isolate JQ926212 demonstrated similar LT₅₀ for the three insects evaluated with a range of 11.7–14.95 days. Maximum mortality rates, 20 days after fungus application for *T. confusum* and *R. dominica*, were observed for the isolate JQ926223 (90 and 65 %, respectively). The isolate JQ926212 showed a mortality rate of 45, 50, and 45 % for *T. confusum*, *S. zeamais*, and *R. dominica*, respectively. Fungal infection with *P. lilacinum* was confirmed for all dead insects in each treatment.

Table 2 Homology of translation elongation factor 1 alpha gene sequences from *Purpureocillium lilacinum* isolates with sequences in GenBank. Sequence informations and BLAST results are shown for closest accessions found in GenBank

GenBank accession N°	Culture strain	Sequence length	N° BP used in BLAST	BLAST results		
				Sequence homology <i>P. lilacinum</i> strain	Max identity (%)	Coverage (%)
JQ926202	46S	587	364	CBS 74988	100	62
JQ926203	56S	539	346	CBS 74988	99	64
JQ926204	68S	584	364	CBS 74988	99	62
JQ926205	61S	590	364	CBS 74988	100	61
JQ926206	64S	590	364	CBS 74988	100	61
JQ926207	66S	578	364	CBS 74988	99	62
JQ926208	14S	587	364	CBS 74988	99	62
JQ926209	62S	581	364	CBS 74988	99	62
JQ926210	32S	557	364	CBS 74988	99	65
JQ926211	44S	590	364	CBS 74988	100	61
JQ926212	50S	573	351	DTO 30H4	99	61
JQ926213	42S	586	361	DTO 149F4	100	61
JQ926214	38S	586	361	DTO 149F4	100	61
JQ926215	20S	525	364	CBS 74988	100	69
JQ926216	77S	590	364	CBS 74988	99	61
JQ926217	90S	578	364	CBS 74988	100	62
JQ926218	29S	587	364	CBS 74988	99	62
JQ926219	84S	590	364	CBS 74988	99	61
JQ926220	01S	590	364	CBS 74988	99	61
JQ926221	57S	590	364	CBS 74988	99	61
JQ926222	39S	590	364	CBS 74988	98	61
JQ926223	79S	590	364	CBS 74988	99	61
JQ926224	25S	580	355	CBS 74988	99	61
JQ926225	81S	590	364	CBS 74988	100	61
JQ926226	52S	396	227	CBS 74988	95	57
JQ926227	82S	325	154	DTO 149F4	97	47
JQ926228	22S	509	364	CBS 74988	99	71

Discussion

The methods used to isolate entomopathogenic fungi using bait insects (*T. confusum*) on three types of substrates, plating soil, and plating debris showed differences in growing potentially entomopathogenic fungi on semi-selective isolation media plates. Zimmermann (1986) suggests that the bait method as a standard isolation of entomopathogenic fungi is using the larvae highly susceptible *Galleria mellonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Pyralidae). However, other studies showed that entomopathogenic strains more virulent were isolated more frequently from larval and adult stages of the insect to be controlled (Prior 1991; Klingen and Haukeland 2006) than with *G. mellonella*. All bait insects placed in maize kernels were contaminated with *Fusarium*. While bait insects placed in not-dried and dried soil showed contamination with *Penicillium*, *Fusarium*, and *Paecilomyces*. The lowest

percentage corresponded to potentially entomopathogenic fungal colonies. No entomopathogenic fungus of interest was isolated from debris samples. In contrast, the higher number of possible entomopathogenic fungi like *Paecilomyces* and *Metarhizium* were obtained from soil samples. Thus, data suggest that these types of fungus are not distributed equally in different components of maize agroecosystem. Our results are similar to Demirci and Denizhan (2010) who while evaluating a potential biocontrol agent on apple rust mite showed that much of the fungi isolated from mite cadavers were saprophytic or common contaminants such as *Rhizopus* spp. and *Penicillium* spp., and *Paecilomyces* was the only one genera isolated known to be entomopathogenic.

Soil is the natural habitat of entomopathogenic fungi (Hajek 1997) and studies have shown differences in the relative abundance present in different soils like the agricultural use and soils adjacent to crops and forest

Table 3 LT₅₀ and mortality percentage for *Tribolium confusum*, *Sitophilus zeamais* and *Rhyzopertha dominica* adults exposed during 20 days to 20 isolates of *P. lilacinum*

Isolates	<i>Tribolium confusum</i>		<i>Sitophilus zeamais</i>		<i>Rhyzopertha dominica</i>	
	LT ₅₀ (days)	Mortality (%)	LT ₅₀ (days)	Mortality (%)	LT ₅₀ (days)	Mortality (%)
JQ926202	17.41b	35h	11.13a	50a	12.23b	55c
JQ926203	14.8b	35h	62.5h	10h	37.6d	20h
JQ926204	16.79b	35h	>i	15g	43.18f	20h
JQ926205	12.4b	40g	37.92e	30d	20.34b	40e
JQ926206	6.81a	65c	26.62d	25e	15.47b	45d
JQ926207	8.36a	55d	18.16c	35c	26.04b	25g
JQ926208	8.47a	55d	53.3f	30d	22.9b	40e
JQ926210	14.41b	35h	>i	15g	14.49b	45d
JQ926211	15.48b	35h	37.75e	25e	18.24b	40e
JQ926212	11.7b	45f	13.99b	50a	14.95b	45d
JQ926214	5.58a	75b	36.58e	15g	21.9b	40e
JQ926216	10.7b	50e	52.75f	25e	21.6b	30f
JQ926217	9.89b	50e	59.33g	20f	17.58b	40e
JQ926218	12.11b	45f	>i	10h	48.38g	20h
JQ926220	7.81a	65c	19.47c	30d	11.75b	60b
JQ926222	8.19a	35h	51.16f	30d	25.1b	30f
JQ926223	4.66a	90a	>i	10h	9.38a	65a
JQ926225	10.79b	55d	27.58d	35c	40.43e	15i
JQ926226	5.75a	75b	>i	15g	32.16c	30f
JQ926228	12.75b	40g	38.21e	40b	23.48b	40e

>62.5 days

Values within a column followed by the same letter(s) are not significantly different at $P = 0.05$

(Bidochka et al. 1998; Keller et al. 2003). Many of the species belonging to the Phylum Ascomycota, such as *Beauveria* spp., *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces* spp., develop in the soil part of their life cycle in which are outside the insect hosts (Keller and Zimmermann 1989). Jenkins and Grzywacz (2000) proposed that there are competing microorganisms that produce active metabolites that may affect the viability of fungal propagules of interest. In a previous study in which evaluated soil fungal populations of fields for the cultivation of maize in Río Cuarto, Córdoba, Argentina, it was found that the predominant genera were *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Penicillium* (Nesci et al. 2006). Pereira et al. (2010, 2011) found that the count of *Fusarium* spp., obtained from the same field, where we take the different samples for this study, was in the order of 4 and 2 log per g of maize and soil, respectively. It is possible that the high incidence of the genus *Fusarium* and *Penicillium* in different components of maize agroecosystem have influenced the colonization of the insects bait. Most *Fusarium* species are saprophytic and relatively abundant members of soil microbiota (Leslie and Summerell 2006). Many species are known as plant, insects, and humans pathogens, and there are species of *Fusarium* pathogenic for insects and non-pathogenic for

plants (Majumbar et al. 2008). Some species isolated from insect larvae and adults were reported as pathogens of these insects (Claydon and Grove 1984; Sur et al. 1999) and in other studies as an opportunistic pathogen for insects in soil (Ali-Shtayeh et al. 2002; Sun Bing et al. 2008; Abdullah and Mohamed Amin 2009).

Tuininga et al. (2009) analyzing different field samples showed important deficiencies in environmental conditions needed to maintain entomopathogenic fungi in dry leaf litter. Probably, something similar occurs with our debris samples in which no fungi of interest for this study were detected. In agreement with other authors (Asensio et al. 2003) in our study, we confirm that soil is an important reservoir of entomopathogenic fungi, potential antagonist for controlling insect pests.

Paecilomyces belongs to the family of filamentous fungi, like *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Fusarium* (Humber 1997), is present in soil and decaying organic matter, and is usually recognized as an infectious agent in animals and insects (Luangsa-ard et al. 2011). In this genus, there are nematophagous species like *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) (Hoodle 2011; Rodriguez Dos Santos and del Pozo Núñez 2003) and *Paecilomyces lilacinus* (Borisov and Ushchekov 1997; Gökce and Er 2005; Fiedler and

Sosnowska 2007). *P. lilacinus* was evaluated as biologic control agents against maize weevil (*Sitophilus zeamais*) (Ahmed 2010). *P. lilacinus* can be a human pathogen (Takayasu et al. 1977), but there is a large differentiation in host infection between strains of this fungus (Fiedler and Sosnowska 2007). This fungus has been found as the causal agent of infections in patients with compromised immune systems (Luangsa-ard et al. 2011). In our study, according to macro- and micromorphological characteristics, *Paecilomyces* isolates were identified as *P. lilacinus*. These characteristics are consistent with those described by Samson (1974), Samson et al. (1988), and Humber (2005). Identification of fungal cultures by DNA extraction, amplification, and sequencing showed that all isolates macro- and micro-morphologically identified as *P. lilacinus* were *Purpureocillium lilacinum*. Luangsa-ard et al. (2011) show that species previously assigned to *Paecilomyces* like *P. lilacinus* was accommodated in the genus *Purpureocillium*.

In vitro assessment of potential entomopathogenic fungi against insect pests is one essential step in the selection of virulent strains before large scale application. Results of this study indicated that there was variability in the virulence of the 21 isolates of *P. lilacinum* against the three insect pest evaluated. Only one isolate, JQ926212, showed a similar virulence activity against the three insects assayed. Similar lethality levels were observed with different isolates of *M. anisopliae* against thrips (Sánchez-Pena et al. 2011). Rodríguez-Kabana et al. (1984) established significant differences in pathogenicity among different strains of *Paecilomyces lilacinus* against the nematode *Meloidogyne arenaria* (Chitwood). Adane et al. (1996) demonstrated that several isolates of *B. bassiana*, obtained from different coleopteran insects, against *S. zeamais* showed significant differences with respect to virulence. The isolate JQ926223 used in our study showed the highest mortality against *T. confusum* and *R. dominica*. Similar results with high mortality rates were observed with *M. anisopliae* against *Sitophilus granaries* (Linnaeus) (Khashaveh et al. 2008). Golnaz et al. (2011) showed that one isolate of *B. bassiana* had a LT_{50} of 10.45 days against *S. granarius*, similar to the average LT_{50} (10.23 days) of the 21 isolates of *P. lilacinum* against *T. confusum* evaluated in this study.

In conclusion, this study shows that the soil destined for cultivation of maize is an important reservoir of entomopathogenic fungi. The combination of methods, macro- and microscopic identification and DNA extraction and sequencing, are necessary to characterizing these fungi. The native soil *P. lilacinum* JQ926223 and JQ926212 will be evaluated as biologic control agents in the ecosystem of stored maize. Enhancement of the efficacy of different entomopathogens may still be required for successful use (Hallsworth and Magan 1994). These studies should be

coupled with host-pathogen assays in the presence of biotic and abiotic stress factors. Major parameters for fungal growth, such as water requirements and humidity, should be examined in depth for their effect. Assays with induced changes in water stress are currently taking place for the above-mentioned isolated entomopathogenic fungi. In addition, sensitivity and tolerance assays should test the compatibility of these entomopathogenic fungi with natural fungicides. This last point could contribute to an integrated management to reduce aflatoxins in stored grains.

Acknowledgments This work was carried out through grants from the Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, PICT 2193/10 and PICT 1372/08.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

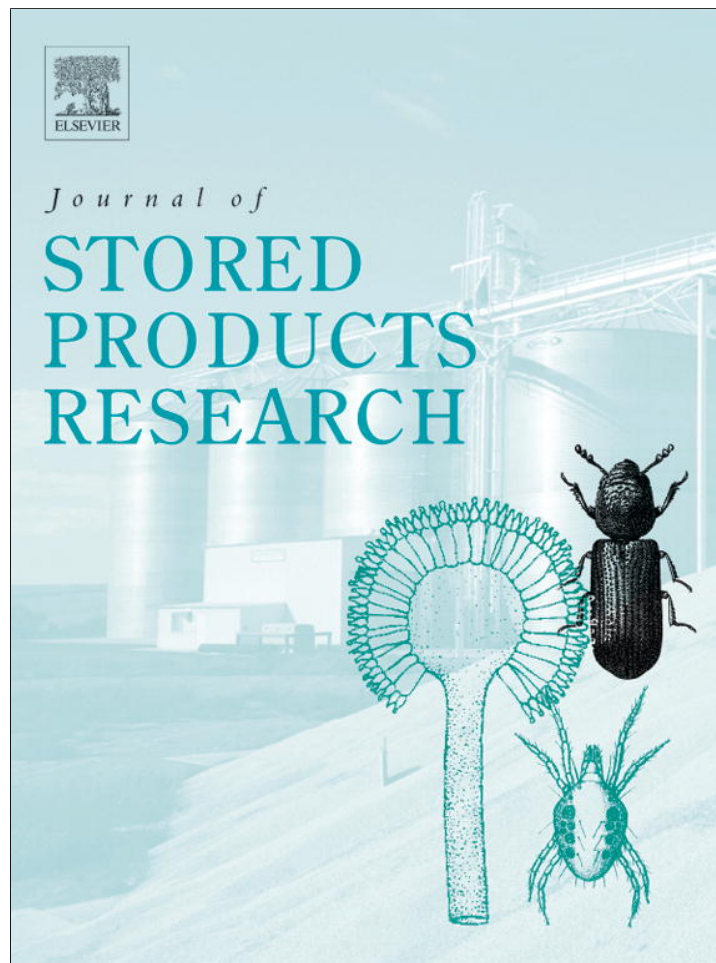
References

- Abdullah SK, Mohamed Amin MK (2009) Occurrence of insect-associated fungi in cultivated soil in Basrah, Iraq. In: Proceedings of the first conference of biological sciences, Mosul, Iraq, pp 222–227
- Abreu J, Gonzalez J, Jaqueman F (2003) Conservación por liofilización de diferentes especies de géneros de levaduras. Rev Alimentaria 343:119–122
- Adane K, Moore D, Archer SA (1996) Preliminary studies on the use of *Beauveria bassiana* to control *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) in the laboratory. J Stored Prod Res 32:105–113
- Ahmed BI (2010) Potentials of entomopathogenic fungi in controlling the menace of maize weevil *Sitophilus zeamais* Motsch (Coleoptera: Curculinidae) on stored maize grain. Arch Phytopathol Plant Prot 43:107–115
- Ali-Shtayeh MS, Mara ABB, Jamous RM (2002) Distribution, occurrence and characterization of entomopathogenic fungi in agricultural soil in the Palestinian area. Mycopathologia 156:235–244
- Asensio L, Carbonell T, López-Jiménez JA, López-Llorca LV (2003) Entomopathogenic fungi in soils from Alicante province. Span J Agric Res 3:37–45
- Bidochka MJ, Kasperski JE, Wild GAM (1998) Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. Can J Bot 76:1198–1204
- Borisov BA, Ushchekov AT (1997) Entomogenous fungi-hyphomycetes against the nightshade leaf miner. Zash K Rastenij 5:10–11
- Casini C, Santajuliana M (2012) Proyecto de eficiencia de cosecha, postcosecha de granos y agroindustria en origen. INTA (Instituto Nacional de Tecnología agropecuaria). <http://www.cosechaypostcosecha.org/data/articulos/postcosecha/ControlPlagasGranosAlmacenados.asp>. Accessed 29 Aug 2012
- Chandler D, Hay D, Reid AP (1997) Sampling and occurrence of entomopathogenic fungi and nematodes in UK soils. Appl Soil Ecol 5:133–141
- Claydon N, Grove F (1984) *Fusarium* as an insect pathogens. In: Moss MO, Smith E (eds) The applied mycology of fusarium. University Press, Cambridge, pp 115–123
- Cortez-Madrigal H, Alatorre-Rosas R, Mora-Aguilera G, Bravo-Mojica H, Ortíz-García CF, Aceves-Navarro LA (2003)

- Characterization of multispore and monospore isolates *Lecanicillium (Verticillium) lecanii* for the management of *Toxoptera aurantii* in cocoa. *Biocontrol* 48:321–334
- Cross JV, Solomon MG, Chandler D, Jarrett P, Richardson PN, Winstanley D, Bathon H, Huber J, Keller B, Langenbruch GA, Zimmermann G (1999) Biocontrol of pests of apples and pears in northern and central Europe. Microbial agents and nematodes. *Biocontrol Sci Technol* 9:125–149
- Dal Bello G, Padin S, Lopez Lastra C, Fabrizio M (2001) Laboratory evaluation of chemical biological control of rice weevil, *Sitophilus oryzae* L. in store grain. *J Stored Prod Res* 37:77–84
- Demirci F, Denizhan E (2010) *Paecilomyces lilacinus*, a potential biocontrol agent on apple rust mite *Aculus schlechtendali* and interactions with some fungicides in vitro. *Phytoparasitica* 38: 125–132
- Dube B, Smart GC (1987) Biological control of *Meloidogyne* by *Paecilomyces lilacinus* and *Pasteuria penetrans*. *J Nematol* 19: 222–227
- Ekesi S, Egwurube EA, Akpa AD, Onu I (2001) Laboratory evaluation of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* for the control of the groundnut bruchid, *Caryedon serratus* on groundnut. *J Stored Prod Res* 37:313–321
- Fiedler Z, Sosnowska D (2007) Nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson is also a biological agent for control of greenhouse insects and mite pests. *Biocontrol* 52:547–558
- Garrido-Jurado I, Torrent J, Barrón V, Corpas A, Quesada-Moraga E (2011) Soil properties affect the availability, movement, and virulence of entomopathogenic fungi conidia against puparia of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Biol Control* 58: 277–285
- Goettel MS, Inglis GD (1997) Fungi: hyphomycetes. In: Lacey LA (ed) Manual of techniques in insect pathology. Academic Press, San Diego, pp 213–249
- Gökçe A, Er MK (2005) Pathogenicity of *Paecilomyces* spp. to the glasshouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, with some observations on the fungal infection process. *Turk J Agric For* 29:331–339
- Golnaz S, Mohammad H, Sohrab I (2011) Insecticidal effect of diatomaceous earth against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) and *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) under laboratory conditions. *Afr J Microbiol Res* 5:3574–3578
- Hajek AE (1997) Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. *Adv Microb Ecol* 15:193–249
- Hallsworth JE, Magan N (1994) Improved biological control by changing polyols/trehalose in conidia of entomopathogens. In: Brighton crop protection conference, pests and diseases 8D-8, British Crop Protection Council, Farnham, pp 1091–1096
- Hidalgo E, Moore D, Le Patourel G (1998) The effect of different formulations of *Beauveria bassiana* on *Sitophilus zeamais* in stored maize. *J Stored Prod Res* 34:171–179
- Hoodle MS (2011) The biology and management of silverleaf whitefly *Bemisia argentifolii* bellows and perring (Homoptera: Aleyrodidae) on greenhouse grown ornamentals. <http://www.biocontrol.ucr.edu/bemisia.html>. Accessed 20 May 2011
- Humber RA (1997) Fungi: identification. In: Lacey LA (ed) Manual of techniques in insect pathology. Academic Press, London, pp 153–185
- Humber R (2005) Entomopathogenic fungal identification. Plant Protection Research Unit. US Plant, Soil & Nutrition Laboratory. <http://arsef.fpsnl.cornell.edu>
- IARC International Agency for Research on Cancer (1993) Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to human, vol 56. IARC, Lyon, pp 257–263
- Instituto para las Negociaciones Agrícolas Internacionales INAI (2009) Maíz. Participación mundial de exportaciones argentinas. Boletín N° 85 16/07/2009. <http://www.inai.org.ar>. Accessed 31 Aug 2012
- James RR, Elzen GW (2001) Antagonism between *Beauveria bassiana* and imidacloprid when combined for *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) control. *J Econ Entomol* 94:357–361
- Jatala P (1986) Biological control of plant parasitic nematodes. *Annu Rev Phytopathol* 24:453–489
- Jayashree T, Subramanyam C (1999) Antiaflatoxic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. *Lett Appl Microbiol* 28:179–183
- Jenkins NE, Grzywacz D (2000) Quality control of fungal and viral biocontrol agents—assurance of product performance. *Biocontrol Sci Technol* 10:753–777
- Keller S, Zimmermann G (1989) Mycopathogens of soil insects. In: Wilding N, Collins NM, Hammond PM, Webber JF (eds) Insect–fungus interactions. Academic press, New York, pp 239–270
- Keller S, Kessler P, Schweizer C (2003) Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol* 48:307–319
- Khan A, Williams KL, Nevalainen HKM (2006) Control of plant-parasitic nematodes by *Paecilomyces lilacinus* and *Monacrosporium lysipagum* in pot trials. *Biocontrol* 51:643–658
- Khashaveh A, Safaralizade MH, Ghosta Y (2008) Pathogenicity of three Iranian isolates of the fungus, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against Granary Weevil, *Sitophilus granarius* L. (Coleoptera: Curculionidae). *J Biol Sci* 8:804–808
- Klingen I, Haukeland S (2006) The soil as a reservoir for natural enemies of pest insects and mites with emphasis on fungi and nematodes. In: Eilenberg J, Hokkanen HMT (eds) An ecological and societal approach to biological control. Springer, Dordrecht, pp 145–211
- Lacey LA, Franssen JJ, Carruthers R (1996) Global distribution of naturally occurring fungi of *Bemisia*, their biologies and use as biological control agents. In: Gerling D, Mayer R (eds) Taxonomy, biology, damage, control and management. Intercept, Andover, pp 401–433
- Leslie JF, Summerell BA (2006) *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg. In: Leslie JF, Summerell BA (eds) The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing, Iowa, pp 274–279
- Luangsa-ard J, Houbraken J, Doorn T, Hong S-B, Borman AM, Hywel-Jones NL, Samson R (2011) *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiol Lett* 321:141–149
- Majumbar A, Boetel MA, Jaronski TS (2008) Discovery of *Fusarium solani* as a naturally occurring pathogen of sugarbeet root maggot (Diptera: Ulidiidae) pupae: prevalence and baseline susceptibility. *J Invertebr Pathol* 97:1–8
- Mejía D (2007) FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). http://www.fao.org/inpho/content/compnd/text/ch23_04.htm
- Morgan-Jones G, White GF, Rodriguez-Kabana R (1984) Phytonematode pathology: ultrastructural studies. II. Parasitism of *Meloidogyne arenaria* eggs and larvae by *Paecilomyces lilacinus*. *Nematologica* 14:57–71
- Nesci A, Etcheverry M (2002) *Aspergillus* section *Flavi* from field maize in Argentina. *Lett Appl Microbiol* 34:343–348
- Nesci A, Barros G, Castillo C, Etcheverry M (2006) Soil fungal population in pre-harvest maize ecosystem in different tillage practices in Argentina. *Soil Tillage Res* 91:143–149
- Nesci A, Barra P, Etcheverry M (2011a) Integrated management of insect vectors of *Aspergillus flavus* in stored maize using synthetic antioxidants and natural phytochemicals. *J Stored Prod Res* 47:231–237

- Nesci A, Montemarani A, Etcheverry M (2011b) Assessment of mycoflora and infestation of insects, vector of *Aspergillus* section *Flavi*, in stored peanut from Argentina. *Mycotoxin Res* 27:5–12
- O'Donnell K, Cigelnik E, Nirenberg HI (1998) Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90:465–493
- Padin S, Bello GD, Fabrizio M (2002) Grain loss caused by *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae* and *Acanthoscelides obtectus* in stored durum wheat and beans treated with *Beauveria bassiana*. *J Stored Prod Res* 38:69–74
- Padin SB, Dal Bello GM, Vasicek AL (1997) Pathogenicity of *Beauveria bassiana* for adults of *Tribolium castaneum* (Col.: Tenebrionidae) in stored grains. *Entomophaga* 42:569–574
- Passone MA, Rosso LC, Ciancio A, Etcheverry M (2010) Detection and quantification of *Aspergillus* section *Flavi* spp. In stored peanuts by real-time PCR of *nor-1* gene, and effects of storage conditions on aflatoxin production. *Int J Food Microbiol* 138:276–281
- Payne GA (1998) Process of contamination by aflatoxin-producing fungi and their impact on crops. In: Sinha KK, Bhatnagar D (eds) *Mycotoxins in agriculture and food safety*. Marcel Dekker Inc, New York, pp 279–306
- 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:10.1155/2011/486914
- Prior C (1991) Discovery and characterization of fungal pathogens for locust and grasshopper control. In: Lomer CJ, Prior C (eds) *Biological control of locusts and grasshoppers*. CAB International, Wallingford, pp 159–179
- Rodríguez Dos Santos A, del Pozo Núñez E (2003) Aislamiento de hongos entomopatógenos en Uruguay y su virulencia sobre *Trialeurodes vaporariorum* West. *Agrociencia* 7:71–78
- Rodríguez-Kabana R, Morgan-Jones G, Goda G, Gintis BO (1984) Effectiveness of species of *Gliocladium*, *Paecilomyces* and *Verticillium* for control of *Meloidogyne arenaria* in field soil. *Nematropica* 14:155–170
- Samson RA (1974) *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. *Stud Mycol* 6:1–110
- Samson RA, Evans HC, Latge JP (1988) *Atlas of entomopathogenic fungi*. Springer, Berlin, p 187
- Sánchez-Pena SR (1990) Some insect-and spider-pathogenic fungi from Mexico with data on their host range. *Fla Entomol* 73:517–522
- Sánchez-Pena SR, Lara JSJ, Medina RF (2011) Occurrence of entomopathogenic fungi from agricultural and natural ecosystems in Saltillo, Mexico, and their virulence towards thrips and whiteflies. *J Insect Sci* 11:1–10
- Stoll G (1989) Protección natural de cultivos, basada en recursos locales en el trópico y subtropico. *Trop Agroecol* 1:184
- Sun Bing D, Yu HY, Chen AJ, Liu XZ (2008) Insect-associated fungi in soils of field crops and orchards. *Crop Prot* 27:1421–1426
- Sur B, Bihari V, Sharma A, Basu SK (1999) Survey of termite inhabited soil and mosquito breeding insects in Lucknow, India for potential mycopathogens of *Anopheles stephensi*. *Mycopathologia* 144:77–80
- Takayasu S, Akagi M, Shimizu Y (1977) Cutaneous mycosis caused by *Paecilomyces lilacinus*. *Arch Dermatol* 113:1687–1690
- Tanada Y, Kaya HK (1993) *Insect pathology*. Academic Press Inc, San Diego, pp 362, 575–576, 583
- Tanya S, Doberski J (1984) An investigation of the entomogenous fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. as a potential biological control agent for *Oryzaephilus surinamensis* (L.). *J Stored Prod Res* 20:17–23
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680
- Tuinga AR, Miller JL, Morath SU, Daniels TJ, Falco RC, Marchese M, Sahabi S, Rosa D, Stafford KC (2009) Isolation of entomopathogenic fungi from soils and *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) ticks: prevalence and methods. *J Med Entomol* 46:557–565
- White NDG (1995) Insects, mites and insecticides in stored-grain ecosystems. In: Jayas P, White NDG, Muir WE (eds) *Stored-grain ecosystems*. Marcel Dekker, New York, pp 123–167
- Wicklow DT, Weaver DK, Throne JE (1998) Fungal colonists of maize grain conditioned at constant temperatures and humidities. *J Stored Prod Res* 34:355–361
- Zimmermann G (1986) The *Galleria* bait method for detection entomopathogenic fungi in soil. *J Appl Entomol* 102:213–215

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Stored Products Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jSpr

In vitro compatibility of natural and food grade fungicide and insecticide substances with *Purpureocillium lilacinum* and their effect against *Aspergillus flavus*

Paula Barra^{a,b}, Andrea Nesci^{a,b,*}, Miriam Etcheverry^{a,b}^aLaboratorio de Ecología Microbiana, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas Físico Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina^bConsejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 13 June 2013

Keywords:

Antioxidants
Entomopathogenic fungi
Insect pest
Natural phytochemicals
Stored maize

ABSTRACT

The objective of our study was to evaluate the compatibility of 21 *Purpureocillium lilacinum* strains with two benzoic acids 2(3)-tert-butyl-4 hydroxyanisole (BHA) and 2,6-di(tert-butyl)-p-cresol (BHT) and two phenolic acids 3-phenyl-2-propenoic acid (CA) and trans-4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid (FA) applied alone or in combination, at different water activities. The impact of chemical substances and entomopathogenic fungi combination on growth parameters and toxin production of *Aspergillus* section *Flavi* *in vitro* was analyzed. BHT, the mixture BHA + BHT, CA and BHA did not significantly influence the count of viable spores of the 21 *P. lilacinum* strains. The strains JQ926202 and JQ926222 showed compatibility with the four treatments evaluated. The 21 *P. lilacinum* strains and the mixture of these entomopathogenic fungi with BHA (1 mM) increased the lag phase and inhibited the growth rate and aflatoxin B₁ production of *Aspergillus flavus* at three a_w assayed.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The maize agroecosystem can be colonized by fungal communities at harvest and storage (Etcheverry et al., 1999; Nesci et al., 2008). Many species of fungi, such as *Aspergillus* section *Flavi*, potentially toxicogenic, are widely distributed in the non-rhizospheric soil, debris and insect of maize agroecosystem (Nesci and Etcheverry, 2002). Insects are involved on fungal grain colonization and can cause significant damage to stored maize. Major insects pest of stored maize include *Sitophilus zeamais* (Motschulsky), *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) and *Tribolium confusum* (Jacquelin du Val) (Mejía, 2007). The constant migration of insect populations within the maize agroecosystem contributes to the dispersal of viable fungal spores of several species (Saint Geroges-Grédelet, 1984). A previous study conducted in stored maize showed a high percentage of live *S. zeamais* and *R. dominica* contaminated with *Aspergillus* section *Flavi* (Nesci et al., 2011). Therefore, insects could facilitate the dispersion of these fungi. The

interaction between the substrate, and the biological and abiotic factors, may promote a moldy substrate and toxin accumulation in stored grains. The main toxins produced by same species of *Aspergillus* section *Flavi* are aflatoxins. These toxins are potent carcinogenic, teratogenic, mutagenic, hepatotoxic and immunosuppressive metabolites (IARC, 1993).

Since many insects carry *Aspergillus* section *Flavi* internally, they are important agents that increase the risk of aflatoxin contamination. Therefore strategies to control insects are needed. Current control measures for these pests rely heavily on the use of synthetic pesticides (Gurusubramanian et al., 2008). However, the indiscriminate use of these chemicals has given rise to a number of problems including resurgence of primary pests (Hazarika et al., 2009), secondary pest outbreak (Cranham, 1966), and resistance development (Kawai, 1997; Gurusubramanian et al., 2008; Roy et al., 2009). One alternative is the use of harmless substances like food grade antioxidants and natural phytochemicals. The effective insecticide concentrations range for these substances was from 20 to 30 mM (Nesci et al., 2011), similar to the effective fungicide concentrations of these chemical against *Aspergillus* section *Flavi* growth and aflatoxin production (Nesci et al., 2003; Nesci and Etcheverry, 2006; Nesci et al., 2007, 2008, 2009).

Another strategy in research is biological control of insect pests. Among the entomopathogenic organisms, fungi are the most

* Corresponding author. Laboratorio de Ecología Microbiana, Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta Nacional 36, Km 601, Río Cuarto, Córdoba, Argentina. Tel./fax: +54 0358 4676231.
E-mail address: anesci@exa.unrc.edu.ar (A. Nesci).

widely distributed in agriculture (Fiedler and Sosnowska, 2007). Isolation of indigenous entomopathogenic fungi is essential to provide a pool of potential biological control agents. The isolation from the same ecosystem in which they must be effective is an advantage for pest control purposes (Lacey et al., 1996; Chandler et al., 1997). Therefore, we isolated and identified native entomopathogenic fungi from different components of maize agroecosystem. The main entomopathogenic genus isolated was *Purpureocillium*. All *Purpureocillium lilacinum* strains showed virulence against the most important insects pest in maize (Barra et al., 2013). These insects are vectors of aflatoxigenic fungi in this cereal (Nesci et al., 2011). *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Samson is a soil saprophyte and has shown promise for use as a biocontrol agent (Morgan-Jones et al., 1984; Jatala, 1986; Dube and Smart, 1987; Khan et al., 2006).

However, entomopathogenic fungi cannot completely replace chemical insecticides in all agroecosystems. Insecticides generally are required to suppress the rapid expansion of pest populations. Strategies have been used to increase efficiency and accelerate insect mortality by combining entomopathogenic fungi with sublethal doses of chemical and botanical insecticides. A chemical substance and an entomopathogenic fungi are compatible when the doses of the chemical substance do not affect the viability, development and virulence of the fungi (Alves et al., 1998; Schumacher and Poehling, 2012). The application of selective insecticides has improved efficiency of the entomopathogenic fungi against insects pest (Quintela and McCoy, 1998; Dayakar et al., 2000; Serebrov et al., 2005; Purwari and Sachan, 2006). There are numerous examples where the application of sublethal doses of chemical pesticides has enhanced the efficacy of entomopathogens against insects pest. Sublethal doses of synthetic chemical insecticides may act as physiologic stressors and so predispose the insect to entomopathogenic fungus attack (Inglis et al., 2001).

The effective establishment of entomopathogenic fungi in the natural environment for control of pests must be considered as a practical problem. Ignorance of this knowledge could be a crucial factor, limiting the consistency of control in the real ecosystem. The fluctuation of water activity and temperature could have an impact on biocontrol effect. Hence, biological control fungi must be stable to fluctuating abiotic factors (Magan, 2001). Moreover, tolerance of entomopathogenic fungi to sublethal doses of synthetic chemical insecticides would allow us to produce entomopathogenic fungi that could compete in a natural storage environment.

The triple effect of losses due to insects, fungi, and mycotoxins can be devastating when conditions are favorable for maize deterioration. The combined use of different methods such as the use of biological control agents of insect vectors of aflatoxigenic fungi, plus the use of food grade antioxidants in sublethal doses, could help reduce aflatoxins in stored maize. The objective of this study was to evaluate the compatibility of *P. lilacinum* strains with different food grade antioxidants and natural phytochemicals at different water activities. The impact of the treatments with chemical substances and entomopathogenic fungi on the parameters of growth and toxin production of *Aspergillus* section *Flavi* *in vitro* was also evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Entomopathogenic fungus

Twenty-one isolates identified as *P. lilacinum* were used in these experiments. These strains were originally isolated from soil samples collected from the University of Río Cuarto Experimental Field Station in Río Cuarto, Córdoba, Argentina and were identified and deposited in GenBank. All strains showed virulence against *T.*

confusum, *R. dominica* and *S. zeamais*, three insect pest vectors of aflatoxigenic fungi (Barra et al., 2013). These strains are held in the Microbiology and Immunology Department Collection of the National University of Río Cuarto, Córdoba (Argentina).

2.2. Aflatoxigenic fungi

One isolates belonging to *Aspergillus* section *Flavi*, aflatoxigenic *Aspergillus flavus* (RCM89) was used in these experiments. This isolate was recovered from stored maize (Nesci et al., 2008) and identified according to Pitt and Hocking (1997), Klich and Pitt (1988) and Pitt (1988). The strain is held in the Microbiology and Immunology Department Collection of the National University of Río Cuarto, Córdoba (Argentina).

2.3. Insecticides and aflatoxigenic fungicides

Effective synthetic antioxidants and phenolic acids against insect vectors of *A. flavus* in maize microcosm (Nesci et al., 2011) were used at different doses to check that their not affect the spores viability of the entomopathogenic fungus. Moreover, these substances showed fungicide effect on *Aspergillus* section *Flavi* growth parameters and aflatoxin production in culture medium, sterilized grain and naturally contaminated grain (Nesci et al., 2003, 2007, 2009; Nesci and Etcheverry, 2006).

Industrial grade antioxidants, obtained from Eastman Chemical Company, were benzoic acid, 2(3)-tert-butyl-4 hydroxyanisole (BHA) and 2,6-di(t-butyl)-p-cresol (BHT). BHA had a purity of 98.5% containing as trace elements sulfated ash <0.01%, citric acid <2500 $\mu\text{g g}^{-1}$, arsenic <3 $\mu\text{g g}^{-1}$ and heavy metals <10 $\mu\text{g g}^{-1}$. BHT had a purity of 99% containing contaminants such as ash <0.02%, arsenic <3 $\mu\text{g g}^{-1}$ and heavy metals <10 $\mu\text{g g}^{-1}$. Contaminants from industrial grade antioxidants do not exceed levels allowed by the Expert Committee on Food Additives (JECFA) (1996). Both compounds were added alone (BHA: 1 mM [1.8 mg ml⁻¹], BHT: 7 mM [1.48 mg ml⁻¹]), and mixed (BHA: 0.7 mM + BHT: 6 mM [0.126 mg ml⁻¹ + 1.27 mg ml⁻¹]). Stock solutions of BHA (0.18 g ml⁻¹) and BHT (0.22 g ml⁻¹) were prepared in 95% ethyl alcohol and the appropriate amount was added to maize meal extract agar (MMEA).

The phenolic acids used were CA: trans-cinnamic acid (3-phenyl-2-propenoic acid) and FA: ferulic acid (trans-4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid) and were obtained from Aldrich Chemical, Steinheim, Germany. Both compounds were added to medium at different doses alone (CA: 1 mM [0.14 mg ml⁻¹], FA: 7 mM [1.35 mg ml⁻¹]) and mixed (CA: 0.6 mM + FA: 2 mM [0.08 mg ml⁻¹ + 0.39 mg ml⁻¹]). Stock solutions of CA (0.14 mg ml⁻¹) and FA (0.19 mg ml⁻¹) were prepared in 80% ethyl alcohol, and the appropriate amount was added to MMEA.

2.4. Entomopathogenic fungus spores viability assay

The compatibility of 21 *P. lilacinum* strains with the best dose of synthetic antioxidants and natural phytochemicals was evaluated according to the methodology described by Nesci et al. (2004). The basic medium used in this study was 3% MMEA. These media were made by boiling 30 g dry maize meal in 1 l distilled water for 60 min. The resulting mixture was filtering through a double layer of muslin. The volume was made up to 1 l with distilled water and the appropriate amount of agar was added (Marín et al., 1998). The water activity (a_w) of the basic medium (0.99) was adjusted to 0.97 and 0.95 by addition of glycerol (Dallyn and Fox, 1980). MMEA was autoclaved at 121 °C for 15 min before cooling to 50 °C and pouring into sterile plastic Petri dishes. The solutions of synthetic antioxidants and natural phytochemicals were added at different doses

alone and mixed to the MMEA. In the control treatment, the equivalent amount of ethyl alcohol was added, while in each treatment the amount of water was maintained.

Entomopathogenic fungi were grown on Potato Dextrose Agar (PDA) (dextrose 10 g l⁻¹, potato 200 g l⁻¹, agar 15 g l⁻¹) for 7 days at 25 °C to obtain heavily sporulating cultures. Fungal count was determined using serial dilutions from a spore suspension of 10⁷ spores ml⁻¹ and 0.1 ml aliquots of ten-fold dilutions were spread on the plates of different treatments. Petri plates of the same a_w values were sealed in polyethylene bags, and incubated for 25 days at 25 ± 1 °C. The fungal count as CFU ml⁻¹ was determined in each treatment.

To assess the effect of chemical insecticides on the fungal count the viability of the entomopathogenic fungi spores, *in vitro* on solid culture media, was determined. The data collected were compared to controls to determine effect on spores viability. The treatments were grouped as compatible or non-compatible. In the compatible group, an enhancement of spore viability (>100%) over control was recorded, whereas that in non-compatible category, reduction in viability (<100%) over control was observed (Ganga Visalakshy et al., 2005).

2.5. Interaction between chemical substances and *P. lilacinum* strains on aflatoxigenic *A. flavus* growth and aflatoxin B₁ accumulation

The inhibitory activity on lag phase and growth rate of the synthetic antioxidants, natural phytochemicals and entomopathogenic fungus against *A. flavus* was tested. *A. flavus* strain was grown on malt extract agar (MEA) for 5 days at 30 °C to obtain heavily sporulating cultures. Entomopathogenic fungal suspensions were prepared following the procedure used for spores viability assay. The basic medium used in this assay was MMEA at three different a_w (0.99, 0.97 and 0.95). The assay consisted of evaluating the following interactions: *A. flavus* RCM89 + *P. lilacinum* strains; *A. flavus* RCM89 + BHA (1 mM) and *A. flavus* RCM89 + *P. lilacinum* strains + BHA (1 mM). For the first interaction each entomopathogenic fungal suspension with 10⁷ spores ml⁻¹ was pour-plated in 20 ml of MMEA. In the second interaction, MMEA medium was amended with BHA 1 mM, and in the last interaction the medium with BHA was poured into the Petri dishes which contained the suspension of *P. lilacinum*. In all treatments, after medium solidification, *A. flavus* RCM89 was spot inoculated with spores suspended in semi-solid agar (Pitt, 1979).

Petri plates of the same a_w values were sealed in polyethylene bags. The inoculated plates were incubated at 25 °C and the colony radii were measured daily during 11 days. For each colony, two radii measured at right angles to one another were averaged to find the mean radius for that colony. All colony radii were determined by using three replicates for each test interaction. A linear model was used to describe mycelial fungal growth. The radial growth rate (mm day⁻¹) was subsequently calculated by linear regression of the linear phase for growth and the time at which the line intercept the x-axis was used to calculate the lag phase in relation to *Aspergillus* RCM89, entomopathogenic fungal strain, synthetic antioxidant and water activity. Lag phase is referred to a delay before the visual fungal growth occurred. During lag phase begins the germination of the spores and the initial hyphal formation (Meletiadiis et al., 2001). Once germination has taken place, hyphae elongate leading to mycelium spreading and macroscopic colonies formation.

After 11 days of incubation at 25 °C, a plug of agar medium and biomass (1 × 1 cm) was taken from each colony of each treatment for aflatoxin B₁ determination. It was transferred to an Eppendorf tube, and 500 µl of chloroform was added. The mixture was centrifuged at 850 × g for 20 min, and the solvent was removed

from the chloroform extract under nitrogen gas. The residue was redissolved in 10 µl of chloroform for screening by TLC (Geisen, 1996). Samples were quantitatively determined by HPLC following the methodology of detection of Trucksess et al. (1994). Pure AFB₁ solution (Sigma, St. Louis, MO, USA) was used as standard. The limit of detection of the analytical method was 1 ng g⁻¹.

2.6. Statistical analysis

The effect of treatment and water activity on spores viability of entomopathogenic fungus was analyzed with ANOVA. To establish significant differences, Waller–Duncan k-ratio *t*-test (*P* < 0.05) was performed. Also, the ANOVA was done for lag phase and growth rate; and the Tukey test (*P* < 0.001) was performed to establish significant differences. For all statistical analysis SAS (version 9.1, SAS Institute Inc, Cary NC, USA.) was used.

3. Results

3.1. Compatibility of different antioxidants and natural phytochemicals with *P. lilacinum* strains

Statistical analyses of the effects of antioxidants and natural phytochemicals and the interaction between *P. lilacinum* strains and treatments on spores viability of each strain showed significant differences (*P* < 0.001). The major effect was that of chemical substances (*F* = 39.15). No significant differences between strains (*F* = 1.87, *P* > 0.0116) and a_w (*F* = 0.10, *P* > 0.9015) were observed; thus, Fig. 1 summarizes the effect of treatments on the 21 fungal strains and the three a_w tested. The food grade antioxidants BHA, BHT, the mixture BHA + BHT and the natural phytochemical CA did not significantly influence the count of viable spores of the 21 *P. lilacinum* strains. FA and the mixture FA + CA caused a significant inhibition of the count of viable spores relative to the untreated control. The entomopathogenic viable spores count was significantly affected with highest concentrations of BHA and CA (2, 3, 4, 5, 7 and 10 mM) and BHT and FA (10 mM).

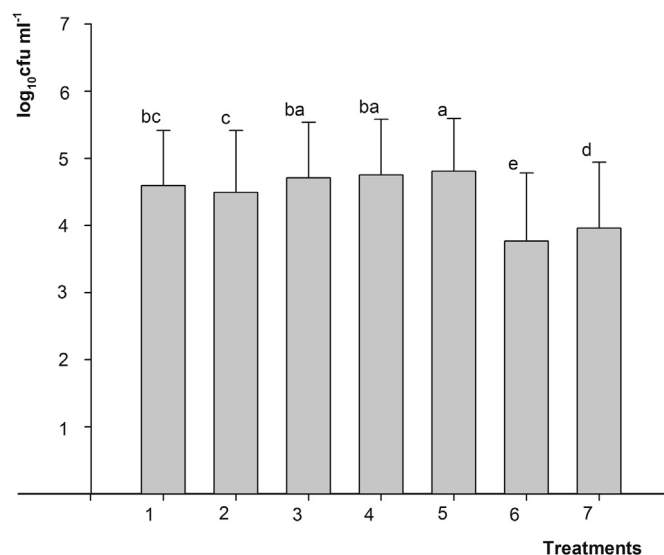


Fig. 1. Effect of synthetic antioxidants and natural phytochemicals on 21 *P. lilacinum* strains viable spores count at three a_w after 25 days of incubation at 25 °C. Bars represent means and standard errors for different treatment. Different letters above each bar indicate a significant difference based on Waller–Duncan k-ratio *t*-test (k-ratio = 100, Critical value of *T* = 1.75688, Minimum significant difference = 0.1634). (1) Control, (2) BHA: 1 mM, (3) BHT: 7 mM, (4) BHA + BHT: 0.7 + 6 mM, (5) CA: 1 mM, (6) FA: 7 mM and (7) CA + FA: 0.6 + 2 mM.

The compatibility between the treatments which showed the least effect on spores viability fungal count is shown in Table 1. Fourteen, 18, 14 and 8 strains showed spores viability with BHT, CA, the mixture BHA + BHT and BHA respectively. In these treatments spore viability was significantly higher than in the control. The strain JQ926212 with BHA had the least number of viable spores, while the strain JQ926202 showed the greatest spore viability (117.8%) with the mixture BHA + BHT. The strains JQ926202 and JQ926222 showed compatibility with the four treatments evaluated.

3.2. Interactions of *A. flavus* with BHA and *P. lilacinum* strains

The lag phase (days) of *A. flavus* RCM89 at three water activities, with BHA, the 21 *P. lilacinum* strains and the combination of BHA with the entomopathogenic fungus, are shown in Table 2. In untreated controls similar lag phases were observed for *A. flavus* RCM89 at the three water activities evaluated. They varied from 3.36 to 3.21 days. The lag phase increased by 17 days by interaction with the 21 *P. lilacinum* strains. According to the Tukey test the lag phase of the aflatoxigenic strain was significantly influenced by the BHA and BHA + *P. lilacinum* mixture.

Paired cultures of *A. flavus* with the 21 *P. lilacinum* strains caused complete inhibition of growth of the aflatoxigenic strain at all a_w values tested, while BHA gave greater than 70% control at the same conditions. As well, the mixture BHA + *P. lilacinum* strains completely inhibited growth of *A. flavus* at 0.99, 0.97 and 0.95 a_w . Thus, the 21 *P. lilacinum* strains and the mixture of these entomopathogenic fungi with BHA (1 mM) inhibited the growth rate and increased the lag phase of *A. flavus* RCM89 at 0.99, 0.97 and 0.95 a_w (Table 3).

We examined the aflatoxin B₁ accumulation in paired cultures between *A. flavus* RCM89 in interaction with 21 *P. lilacinum* strains and the presence of BHA in MMEA at 0.99, 0.97 and 0.95 a_w . In control treatments, *A. flavus* strain accumulated different levels of aflatoxin B₁. The higher level was detected at 0.97 a_w (5.2 ng g⁻¹). At 0.99 and 0.95 a_w AFB₁ levels were lower (1.27 and 2.06 ng g⁻¹, respectively). No AFB₁ production was detected in the interaction of entomopathogenic fungus, BHA and the mixture of entomopathogenic

Table 1
Percentage of viable spores of *P. lilacinum* strains at different treatments.

<i>P. lilacinum</i> strains (GenBank accession N°)	Treatments			
	BHT	BHA + BHT	CA	BHA
JQ926202	104.5 (C)	117.8 (C)	111.5 (C)	102.1 (C)
JQ926203	91.5	112.4 (C)	84.1	93.0
JQ926204	107.8 (C)	113.5 (C)	96.2	101.9 (C)
JQ926205	101.1 (C)	96.1	105.8 (C)	104.7 (C)
JQ926206	108.4 (C)	114.8 (C)	103.0 (C)	95.8
JQ926207	104.3 (C)	101.9 (C)	103.2 (C)	95.6
JQ926208	100.4 (C)	99.1	106.1 (C)	96.5
JQ926210	96.5	100.6 (C)	99.3	98.7
JQ926211	108.9 (C)	102.8 (C)	105.0 (C)	98.2
JQ926212	104.5 (C)	113.2 (C)	102.3 (C)	83.2
JQ926214	103.9 (C)	95.6	110.0 (C)	97.4
JQ926216	93.4	86.9	111.5 (C)	102.4 (C)
JQ926217	98.2	112.8 (C)	105.6 (C)	105.2 (C)
JQ926218	96.1	101.1 (C)	103.2 (C)	93.7
JQ926220	97.3	105.8 (C)	107.6 (C)	86.5
JQ926222	107.1 (C)	112.2 (C)	102.6 (C)	101.7 (C)
JQ926223	103.9 (C)	102.3 (C)	110.6 (C)	98.7
JQ926225	100.2 (C)	90.4	116.1 (C)	101.7 (C)
JQ926226	101.7 (C)	93.8	108.4 (C)	101.7 (C)
JQ926227	110.4 (C)	101.5 (C)	102.6 (C)	99.3
JQ926228	85.8	99.1	104.1 (C)	87.4

BHT: 7 mM; BHA + BHT: 0.7 + 6 mM; CA: 1 mM; BHA: 1 mM.
Compatible (C): an enhancement of spores viability (>100%) over control.
Non-compatible: reduction in viability (<100%) over control.

Table 2
Effect of *P. lilacinum*–synthetic antioxidant–*A. flavus* interactions on the lag phase (days) under different water activity conditions.

Treatment	<i>A. flavus</i> RCM89		
	0.99	0.97	0.95
Control	3.21 ± 0.09a	3.44 ± 0.16 a	3.36 ± 0.49a
BHA 1 mM	16.23 ± 2.32b	12.30 ± 1.77b	15.35 ± 0.21b
BHA + <i>P. lilacinum</i> ^a	>c	>c	>c
<i>P. lilacinum</i> ^a	>c	>c	>c

Values are the mean of three replicates. Means in a column with a letter in common are not significantly different ($P < 0.05$, Tukey test).

^a Effect of 21 *P. lilacinum* strains on *A. flavus* lag phase.

fungus + BHA with the *Aspergillus* strain assayed at all water activities.

4. Discussion

The present study was done to evaluate the compatibility of food grade antioxidants and natural phytochemicals with different strains of *P. lilacinum*, isolated from maize agroecosystem. The results revealed that BHT, the mixture BHA + BHT, CA and BHA were the most compatible substances with the 21 entomopathogenic fungi strains. Moreover the growth of some strains was stimulated in the presence of some treatments.

Previously, we performed a study of the insecticidal activity of synthetic antioxidants and natural phytochemicals against insect vectors of *A. flavus* in stored maize, and we observed that BHA, BHT, the mixture BHA + BHT, FA and the mixture FA + CA, in the concentration range of 20–30 mM, had the highest insecticidal activity against *S. zeamais*, *T. confusum* and *R. dominica* after 120 days of incubation (Nesci et al., 2011). Moreover, we previously evaluated the effect of these substances on *Aspergillus* section *Flavi* growth parameters and aflatoxin production in culture medium, sterilized grain and naturally contaminated grain (Nesci et al., 2003; Nesci and Etcheverry, 2006; Nesci et al., 2007; Nesci et al., 2008; Nesci and Etcheverry, 2009; Nesci et al., 2009). The results of these studies showed that the effective fungicide concentration range for these substances was from 10 to 30 mM, similar to the insecticide concentration range. However, in the present study we observed that the treatments in the concentration range of 0.6–7 mM did not affect the count of viable spores. This range is lower than those effective fungicides and insecticides concentrations. Therefore, the combination of low doses of these chemical substances with the entomopathogenic fungus promote a level of insect and aflatoxigenic fungi suppression similar to that achieved with full chemical treatment.

This outcome of insecticides on the growth of fungi can be different due to the chemical nature of products and the fungal species that are interacting with it (Antonio et al., 2001; Kumar

Table 3
Effect of synthetic antioxidant and *P. lilacinum* on growth rate (mm d⁻¹) of *A. flavus* RCM89 under different water activity conditions.

Treatment	<i>A. flavus</i> RCM89		
	0.99	0.97	0.95
Control	0.93 ± 0.03a	0.87 ± 0.04a	0.94 ± 0.15a
BHA 1 mM	0.19 ± 0.02b	0.25 ± 0.03b	0.19 ± 0.01b
BHA + <i>P. lilacinum</i> ^a	NGc	NGc	NGc
<i>P. lilacinum</i> ^a	NGc	NGc	NGc

mm d⁻¹ = radial growth rate.
Values are the mean of three replicates. Means in a column with a letter in common are not significantly different ($P < 0.05$, Tukey test).

NG: no growth.
^a Effect of 21 *P. lilacinum* strains on *A. flavus* growth rate.

et al., 2000). The use of incompatible insecticides and fungal agents may lead to suppression of growth and reproduction of the agent, and thus limit its effect on integrated pest management (Anderson and Roberts, 1983; Duarte et al., 1992; Malo, 1993). Akbar et al. (2012) showed that isolates of *Metarhizium anisopliae* were badly affected by chlorpyrifos, match, profenofos and metalaxyl. Huang et al. (2008) showed that the inhibitory effects on *Paecilomyces fumosoroseus* conidia germination increased when the triadimefon, chlorothalonil and abamectin concentrations were increased.

The inhibitory effects of chemical substances on the germination and growth of entomopathogenic fungi often vary among taxa and strains. Therefore, it may be possible to select genotypes which are naturally less susceptible (Inglis et al., 2001). Nevertheless, in this study no significant differences were observed between *P. lilacinum* strains. There are different studies regarding the effect of compatibility of substances that are commonly used as pesticides and entomopathogenic fungi. However, this study is the first report of compatibility between natural phytochemicals present in maize and food grade antioxidants on viability of *P. lilacinum* spores. Inglis et al. (2001) showed that all classes of agrochemicals are potentially inhibitory to entomopathogenic Hyphomycetes, including herbicides, insecticides and fungicides. More recent research performed a comprehensive study on the effect of chemicals on the development of entomopathogenic fungi and concluded that insecticides and herbicides are generally not harmful to the growth of these kinds of fungi (Klingen and Haukeland, 2006). Alizadeh et al. (2007) tested the effect of several pesticides on entomopathogenic fungal development and showed relatively little fungal inhibition of imidacloprid. Some authors showed that the addition of plant oils with insecticide effects, such as coconut, neem and sunflower oil could accelerate mycelia growth and sporulation of *Paecilomyces farinosus*, thereby enhancing its infectivity against target pests (Ganga Vishalakshy et al., 2005). Nana et al. (2012) demonstrated that combination of emulsifiable extract from *Calpurnia aurea* with *M. anisopliae* did not affect fungal growth parameters, namely, germination, radial growth, mycelial dried weight and conidial yield regardless of the concentrations tested. Alves et al. (1998) and Moino Jr. and Alves (1998) suggested possible explanations for this compatibility: The fungi, as a physiological mechanism of insecticide resistance, would be able to metabolize and use it as secondary nutrient. Conversely, in a toxic environment, the fungus could increase the production of conidia.

The mechanisms of action of antioxidants and natural phytochemicals as insecticides have not been studied. Only one study showed the antioxidant BHT as a protective agent of synthetic sex pheromone of *Acleris fimbriana*, increasing the catching efficacy (Liu and Meng, 2003). The combination of entomopathogenic fungi and sublethal concentrations of insecticides can exhibit synergistic (Anderson et al., 1989) or additive (Delgado et al., 1999) effect. The enhanced efficacy (i.e. synergistic effect) of *Beauveria bassiana* applied in combination with imidacloprid against *Diaprepes abbreviatus* was due to the effect of imidacloprid as a neural toxin that can affect the behavior of various insects promoting fungal colonization (Quintela and McCoy, 1998; Boucias et al., 1996).

Maize meal extract agar (MMEA) was specifically chosen because entomopathogenic fungi and *A. flavus* will be in interaction in stored maize. The successful development of *P. lilacinum* strains in MMEA was supported by other authors who noted that the ideal substrate for optimal development of entomopathogenic fungi is a cereal, because carbon and nitrogen, supplied by this cereal, are the main nutrients required for growth and sporulation. Maltose, one of the best carbon sources present in maize, release by the action of starch hydrolyzing enzymes present in the fungus induces sporulation (Coudron et al., 1985).

In the current study, spore viability of *P. lilacinum* strains was not affected by the range of a_w evaluated. Moreover, in the MMEA

medium *P. lilacinum* strains showed good growth at the water activities and temperature appropriate for growth and toxin production by *Aspergillus* Section *Flavi* (Gqaleni et al., 1996). To select potential biocontrol agents, it is important to consider the relationship between biological interactions and stressful environmental factors (Nesci et al., 2005). Many fungal interactions are influenced by water activity, temperature and substrate (Lacey and Magan, 1991). Changes in these environmental factors have an impact that could be crucial in determining the level of co-existence and dominance of species in a particular ecological niche (Marín et al., 1998; Nesci et al., 2005). In this study we observed a total inhibition of *A. flavus* growth rate when this toxigenic strain interacts with all *P. lilacinum* strains. However, BHA produced an increase of the lag phase and a reduction of *A. flavus* growth rate. A total *A. flavus* growth inhibition was observed when this fungus interacts with the entomopathogens and the antioxidant. It is important to know when the germination of the spores begins, because spoilage occurs as soon as visible hyphae can be observed. Therefore, an effective treatment must affect the germination and elongation rates of spores, resulting in longer lag phases.

The entomopathogenic fungi and the mixture of these with the antioxidant BHA showed higher inhibitory effect on the growth of the pathogen that when the antioxidant was evaluated alone. The ability of a microorganism to compete and exclude toxigenic species during the colonization of a particular niche, increase the possibility to establish the potential biocontrol agent in the specific niches and contribute to reduce the undesirable inoculums in the specific ecosystem (Etcheverry et al., 2009).

Aflatoxin B₁ production only occurred in control treatments at all water activities evaluated. Total inhibition of aflatoxin production was observed in the presence of BHA 1 mM. This result coincided with a previous study in which we evaluated the effect of antioxidants on aflatoxin B₁ accumulation in MMEA at different water activities (Nesci et al., 2003). In this previous study we observed stimulation of toxin production in the presence of BHT 1, 10 and 20 mM at 0.98 a_w . The same effect of stimulation was observed in the presence of cinnamic acid 1 and 5 mM at different water activities (Nesci and Etcheverry, 2006). The BHA used at sublethal doses did not show stimulation on aflatoxin production, therefore the compatibility of this substance with the entomopathogenic fungi suggests that it is possible to perform this combination to achieve an integrated pest management.

From a human health perspective, the Codex Alimentarius (2006) and the US Food and Drug Administration (FDA) allow the use of phenolic antioxidants in foods because they are regarded as safe (GRAS) chemicals. Furthermore, the large differentiation in host infection between strains of *Paecilomyces lilacinus* (Fiedler and Sosnowska, 2007), recently rename as *P. lilacinum* (Luangsa-ard et al., 2011), consider the use of this biological control agent safe for the environment. Therefore the rational use of reduced level of these chemicals in combination with the biocontrol agent is a promising strategy of integrated pest management. Research to further study and the evaluation of the implementation in the real ecosystem are now in progress.

Acknowledgments

This work was carried out by grants from the Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, PICT 2193/10 and PICT 1372/08.

References

- Akbar, S., Freed, S., Hameed, A., Tahira Gul, H., Akmal, M., Naem Malik, M., Naeem, M., Khan, M., 2012. Compatibility of *Metarhizium anisopliae* with different insecticides and fungicides. African Journal of Microbiology Research 17, 3956–3962.

- Alizadeh, A., Samih, M.A., Khezri, M., Riseh, R.S., 2007. Compatibility of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. with several pesticides. *International Journal of Agriculture and Biology* 9, 31–34.
- Alves, S.B., Moine Jr., A., Almeida, J.E.M., 1998. Produtos fitosanitários e entomopatogênicos. In: Alves, S.B. (Ed.), *Controle microbiano de insetos*. Fealq, São Paulo.
- Anderson, T.E., Hajek, A.E., Roberts, D.W., Preisler, K., Robertson, J.L., 1989. Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae): effects of combinations of *Beauveria bassiana* with insecticides. *Journal of Economic Entomology* 82 (1), 83–89.
- Anderson, T.E., Roberts, D.W., 1983. Compatibility of *Beauveria bassiana* strain with formulations used in Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) control. *Journal of Economic Entomology* 76, 1437–1441.
- Antonio, B.F., Almeida, J.E.M., Clovis, L., 2001. Effect of Thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. *Neotropical Entomology* 30, 437–447.
- Barra, P., Rosso, L., Nesci, A., Etcheverry, M., 2013. Isolation and identification of entomopathogenic fungi and their evaluation against *Tribolium confusum*, *Sitophilus zeamais*, and *Rhyzopertha dominica* in stored maize. *Journal of Pest Science* 86, 217–226.
- Boucias, D.G., Stokes, C., Storey, G., Pendland, J.C., 1996. The effect of imidacloprid on the termite *Reticulitermes flavipes* and its interaction with the mycopathogen *Beauveria bassiana*. *Pflanzenchutz-Nachr Bayer* 49, 103–145.
- Chandler, D., Hay, D., Reid, A.P., 1997. Sampling and occurrence of entomopathogenic fungi and nematodes in UK soils. *Applied Soil Ecology* 5, 133–141.
- Codex Alimentarius, 2006. Food Additive Details. Update up to the 29th session of the Codex Alimentarius Committee. The Joint FAO/WHO Committee on Food Additives. <http://www.codexalimentarius.net/web/jecfa>.
- Coudron, J.A., Kroha, M.J., El-Sayed, G.N., 1985. A novel semi-liquid for propagating entomopathogenic fungi. *Journal of Invertebrate Pathology* 46, 335–336.
- Cranham, J.E., 1966. Tea pests and their control. *Annual Review of Entomology* 11, 491–514.
- Dallyn, H., Fox, A., 1980. Spoilage of material of reduced water activity by xerophilic fungi. In: Gould, G.H., Corry, E.L. (Eds.), *Microbial Growth and Survival in Extreme Environments*. London and New York.
- Dayakar, S., Kanaujia, K.R., Rathore, R.R.S., 2000. Compatibility of entomogenous fungi with commonly used insecticides for management of *Spodoptera litura* (Fab.). In: Ignacimuthu, S., Sen, A. (Eds.), *Microbials in Insect Pest Management*. Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd, M. Delhi, Kolkata.
- Delgado, F.X., Britton, J.H., Onsager, J.A., Swearingen, W., 1999. Field assessment of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and potential synergism with diflubenzuron for control of savana grasshopper complex (orthoptera) in Mali. *Journal of Invertebrate Pathology* 73, 34–39.
- Duarte, A., Menendez, J.M., Triguero, N., 1992. Estudio preliminar sobre la compatibilidad de *Metarhizium anisopliae* con algunos plaguicidas químicos. *Revista Forestal Baracoa* 22, 31–39.
- Dube, B., Smart, G.C., 1987. Biological control of *Meloidogyne* by *Paecilomyces lilacinus* and *Pasteuria penetrans*. *Journal of Nematology* 19, 222–227.
- Etcheverry, M., Nesci, A., Barros, G., Torres, A., Chulze, S., 1999. Occurrence of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxin B₁ in corn genotypes and corn meal in Argentina. *Mycopathologia* 147, 37–41.
- Etcheverry, M., Scandola, A., Nesci, A., Vilas Boas Ribeiro, M.S., Pereira, P., Battilani, P., 2009. Biological interactions to select biocontrol agents against toxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* from maize. *Mycopathologia* 167, 287–295.
- Fiedler, Z., Sosnowska, D., 2007. Nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson is also a biological agent for control of greenhouse insects and mite pests. *BioControl* 52, 547–558.
- Ganga Visalakshy, P.N., Krishnamoorthy, A., Manoj Kumar, A., 2005. Compatibility of plant oils and additives with *Paecilomyces farinosus*, a potential entomopathogenic fungus. *Journal of Food Agriculture and Environment* 4, 333–335.
- Geisen, R., 1996. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 19, 388–392.
- Gqaleni, N., Smith, J.E., Gettinby, G., 1996. The production of cyclopiazonic acid by *Penicillium commune* and cyclopiazonic acid and aflatoxin by *Aspergillus flavus* as affected by water activity and temperature on maize grains. *Mycopathologia* 136, 103–108.
- Gurusubramanian, G., Rahman, A., Sarmah, M., Roy, S., Bora, S., 2008. Pesticide usage pattern in tea ecosystem, their retrospects and alternative measures. *Journal of Environmental Biology* 29, 813–826.
- Hazarika, L.K., Bhuyan, M., Hazarika, B.N., 2009. Insect pests of tea and their management. *Annual Review of Entomology* 54, 267–284.
- Huang, Z., Shun-xiang, R., Jian-hui, W.U., Huang, T., 2008. Effect of pesticides on infectious activity of *Paecilomyces fumosoroseus*. *Journal of South China Agricultural University*, 03.
- IARC International Agency for Research on Cancer, 1993. *Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans*. IARC, Lyon, France.
- Inglis, G.D., Goettel, M.S., Butt, T.M., Strasser, H., 2001. Use of Hyphomycetes fungi for managing insect pests. In: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (Eds.), *Fungi as Biological Agents*. Progress, Problems and Potential. CAB Publishing, Wallingford, UK.
- Jatala, P., 1986. Biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 24, 453–489.
- Joint FAO/WHO. Expert Committee on Food Additives (JECFA), 1996. *Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Human*, vol. 56, pp. 257–263. Lyon, France.
- Kawai, A., 1997. Prospect for integrated pest management in tea cultivation in Japan. *JARQ* 31, 213–217.
- Khan, A., Williams, K.L., Nevalainen, H.K.M., 2006. Control of plant-parasitic nematodes by *Paecilomyces lilacinus* and *Monacrosporium lysipagum* in pot trials. *BioControl* 51, 643–658.
- Klich, M.A., Pitt, J.I., 1988. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *Aspergillus parasiticus* and other closely related species. *Transaction of the British Mycological Society* 91, 99–108.
- Klingen, I., Haukeland, S., 2006. The soil as a reservoir for natural enemies of pest insects and mites with emphasis on fungi and nematodes. In: Eilenberg, J., Hokkanen, H.M.T. (Eds.), *An Ecological and Societal Approach to Biological Control*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Kumar, A., Mukherjee, P., Guha, A., Adyantaya, S.D., Mandale, A.B., Kumar, R., Sastry, M., 2000. Amphoterization of colloidal gold particles by capping with valine molecules and their phase transfer from water to toluene by electrostatic complexation with fatty amine molecules. *Langmuir* 16, 9775–9783.
- Lacey, J., Magan, N., 1991. Fungi in cereal grains: their occurrence and water and temperature relationships. In: Chelkowski, J. (Ed.), *Cereal Grain, Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage*. Elsevier Science Publisher BV, Amsterdam.
- Lacey, L.A., Franssen, J.J., Carruthers, R., 1996. Global distribution of naturally occurring fungi of *Bemisia*, their biology and use as biological control agents. In: Gerling, D., Mayer, R. (Eds.), *Taxonomy, Biology, Damage, Control and Management*. Andover.
- Liu, Y.X., Meng, X.Z., 2003. Trapping effect of synthetic sex pheromone of *Acleris fimbriata* (Lepidoptera: Tortricidae) in Chinese northern orchard. *Journal of Chemical Sciences* 58, 421–425.
- Luangsa-ard, J., Houbakern, J., Doom, T., Hong, S.-B., Borman, A.M., Hywel-Jones, N.L., Samson, R., 2011. *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiology Letters* 321, 141–149.
- Magan, N., 2001. Physiological approaches to improving the ecological fitness of fungal biocontrol agents. In: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (Eds.), *Fungi as Biocontrol Agents*. Progress, Problems and Potential. CAB Publishing, Wallingford, UK.
- Malo, A.R., 1993. Estudio sobre la compatibilidad del hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. con formulaciones comerciales de fungicidas e insecticidas. *Revista Colombiana de Entomología* 19, 151–158.
- Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J., Viñas, I., Magan, N., 1998. Environmental factors *in vitro* interactions and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize grain. *Mycological Research* 102, 831–837.
- Mejia, D., 2007. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). <http://www.fao.org/inpho/content/compend/text/ch2304.htm>.
- Meletiadis, J., Meis, J.F., Mouton, J.W., Verweij, P.E., 2001. Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 478–484.
- Moine Jr., A., Alves, S.B., 1998. Efeito de Imidacloprid e Fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e no comportamento de limpeza de *Heterotermestenus* (Hagen). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 27, 611–619.
- Morgan-Jones, G., White, G.F., Rodriguez-Kabana, R., 1984. Phytonematode pathology: ultrastructural studies. II. Parasitism of *Meloidogyne arenaria* eggs and larvae by *Paecilomyces lilacinus*. *Nematropica* 14, 57–71.
- Nana, P., Maniania, N.K., Maranga, R.O., Boga, H.L., Kutima, H.L., Eloff, J.N., 2012. Compatibility between *Calpurnia aurea* leaf extract, attraction aggregation, and attachment pheromone and entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* on viability, growth, and virulence of the pathogen. *Journal of Pest Sciences* 85, 109–115.
- Nesci, A., Etcheverry, M., 2002. *Aspergillus* section *Flavi* populations from field maize in Argentina. *Letters in Applied Microbiology* 34, 343–348.
- Nesci, A., Etcheverry, M., 2006. Control of *Aspergillus* growth and aflatoxin production using natural maize phytochemicals under different conditions of water activity. *Pest Management Science* 62, 775–784.
- Nesci, A., Etcheverry, M., 2009. Effect of natural maize phytochemicals on *Aspergillus* Section *Flavi* sclerotia characteristics under different conditions of growth media and water potential. *Fungal Ecology* 2, 44–51.
- Nesci, A., Rodriguez, M., Etcheverry, M., 2003. Control of *Aspergillus* growth and aflatoxin production using antioxidants at different conditions of water activity and pH. *Journal of Applied Microbiology* 95, 279–287.
- Nesci, A., Etcheverry, M., Magan, N., 2004. Osmotic and matrix potential effects on growth, sugar alcohol and sugar accumulation by *Aspergillus* Section *Flavi* strains from Argentina. *Journal of Applied Microbiology* 96, 965–972.
- Nesci, A., Bluma, R., Etcheverry, M., 2005. *In vitro* selection of maize rhizobacteria to study potential biological control of *Aspergillus* section *Flavi*. *European Journal of Plant Pathology* 113, 1–13.
- Nesci, A., Gsponer, N., Etcheverry, M., 2007. Natural maize phenolic acids for control aflatoxigenic fungi on maize. *Journal of Food Science* 72, 180–185.
- Nesci, A., Ferrari, L., Etcheverry, M., 2008. Effect of synthetic antioxidants on stored maize grain mycoflora *in situ*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88, 797–804.
- Nesci, A., Marín, S., Etcheverry, M., Sanchis, V., 2009. Natural maize phytochemicals for control of maize mycoflora and aflatoxigenic fungi. *World Mycotoxin Journal* 3, 305–312.

- Nesci, A., Barra, P., Etcheverry, M., 2011. Integrated management of insect vectors of *Aspergillus flavus* in stored maize using synthetic antioxidants and natural phytochemicals. *Journal of Stored Products Research* 47, 231–237.
- Pitt, J.I., 1979. The Genus *Penicillium* and its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London.
- Pitt, J.I., 1988. A Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species. CSIRO Division of Food Research Sydney, North Ryde, Australia.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., 1997. In: Pitt, J.I., Hocking, A.D. (Eds.), *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic and Professional, London.
- Purwari, J.P., Sachan, G.C., 2006. Synergistic effect of entomogenous fungi on some insecticides against Bihar hairy caterpillar *Spilarctia oblique* (Lepidoptera: Arctiidae). *Microbiological Research* 161, 38–42.
- Quintela, E.D., McCoy, C.W., 1998. Synergistic effect of imidacloprid and two entomopathogenic fungi on the behavior and survival of larvae of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) in soil. *Journal of Economic Entomology* 91, 110–122.
- Roy, S., Gurusubramanian, G., Mukhopadhyay, A., 2009. Antifeedant and insecticidal activity of *Clerodendron infortunatum* Gaertn. (Verbinaceae) extract tested on tea mosquito bug, *Helopeltis theivora* Waterhouse (Hetoraptera: miridae). *Field Crops Research* 10, 152–158.
- Saint Geroges-Grédelet, D., 1984. Effects of dietary lipids on the population growth of *Dermatophagoides pteronyssinus*. In: *Proceedings of 6th International Congress of Acarology*, Chichester.
- Schumacher, V., Poehling, H.M., 2012. In vitro effect of pesticides on the germination, vegetative growth, and conidial production of two strains of *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Biology* 116, 121–132.
- Serebrov, V.V., Khodyrev, V.P., Gerber, O.N., Tsvetkova, V.P., 2005. Perspectives of combined use of entomopathogenic fungi and chemical insecticides against Colorado beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). *Mycology and Phytopathology* 39, 89–98.
- Trucksess, M.W., Stack, M.E., Nesheim, S., Albert, R.H., Romer, T.R., 1994. Multifunctional column coupled with liquid chromatography for determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2 in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts and pistachio nuts: collaborative study. *Journal of AOAC International* 6, 1512–1521.