



2019

Bioinsumos a base de cepas de  
*Aspergillus flavus*  
no toxicogénicas para reducir la acumulación de aflatoxinas en maíz

Alumna: Marianela Bossa

Directora: Dra. Sofía Noemí Chulze

Co-directora: Dra. María Silvina Alaniz Zanon



Este trabajo fue llevado a cabo en el área de Micología del  
Departamento de Microbiología e Inmunología de la  
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales  
de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Para optar al título de:  
MICROBIÓLOGA

.....  
Marianela Bossa

TEMA:

**Bioinsumos a base de cepas de *Aspergillus flavus* no  
toxicogénicas para reducir la acumulación de  
aflatoxinas en maíz**

.....  
Directora: Dra. Sofía Noemí Chulze

.....  
Co-directora: Dra. María Silvina Alaniz Zanon

Jurado integrado por:

.....  
Dra. Sofía Noemí Chulze

.....  
Dra. Carina Magnoli

.....  
Dra. Susana Bettera



## AGRADECIMIENTOS

Gracias a ellos esto fue posible, que nunca dejaron que caiga, que siempre me apoyaron, me escucharon quejar, me dieron ese empujón para seguir, por ser mis pilares, mi sostén todos los días, que a pesar de la distancia siempre estuvieron tan cerca de mí. Por los valores y educación que me inculcaron, la posibilidad de estudiar que me brindaron. Gracias por confiar en mí, en ponerse orgullosos con cada logro. GRACIAS MAMÁ Y PAPÁ, esto es para ustedes.

A una persona muy especial, a mi hermanita, a Lía, con quien tenemos una conexión única, por ser mi consejera, mi oído, quién confía ciegamente en mí, por su apoyo y cariños todos los días, voy a estar para vos toda mi vida.

A mi abuelo Mingo tan presente siempre y en todo momento, por su amor hacia mí, quién se emociona con cada logro, quién me enseñó a ir siempre con la verdad, ser sincero, quién ocupa un gran lugar en mi corazón, la persona más buena y grandiosa del mundo, todo un ejemplo y orgullo para mí que seas mi abuelo.

A mis dos abuelas, que me ensañaron a lucharla hasta el último, a disfrutar el presente, gracias a las dos por la paciencia que me tuvieron desde chiquita. Gracias abuela Inés por malcriarme, por ser mi cómplice, porque por más de que no entendieras nada de lo que estudiaba, siempre me preguntabas, porque me demostraste ser única para vos.

A mi abuelo Pelado que me enseñó a que no hay que postergar nada, que los sueños hay que cumplirlos y ahora, quién siempre me espera con un capuccino.

Al resto de mi familia, Fer, Tini, Eli, Nahue, Mónica, Tíos y primos, por ser parte de este camino, desde el principio, por estar, por preguntar, preocuparse.

A mis amigas de Ucacha, Valen, Carli, Agus, Debo, Vir, Romi, Luli, Pau, Pame, Juli, Maca, que están desde el día uno, por enseñarme a no guardar rencor, porque a pesar de las diferencias entre una y otra, siempre estamos. No las cambio por nada. Por estar de una forma tan incondicional en este último tiempo, por compartir tantos momentos buenos y malos, por contenerme de una manera única, por siempre alentarme a seguir. Porque bastaba en escribir o llamar que ahí están.

A mis amigas de la universidad, Mari, Ro, Fati, Lu, Juli, que desde primer año hasta ahora seguimos, porque siempre estuvieron y siguen estando, por entenderme mejor que nadie, por dar los mejores consejos.

A ellos, Gastón, Pancho y Chino, que este último año al lado de ellos todo fue más divertido, porque no solamente era juntarse a salir, sino las horas de charlas y consejos, a Gastón por los abrazos, risas, lágrimas juntos, por ese amigo que nunca te va a abandonar.

A ella, que además de excelente profesional, es una maravillosa persona, a Silvi, por ser más que una codirectora, por ser una amiga, una compañera. Siempre dispuesta a ayudar al otro, una persona comprometida con la carrera y responsable con todas sus actividades. Quién transmite pasión por la carrera, gracias Silvi, de todo corazón. Por las horas de trabajo, de charla en el laboratorio, por escucharme llorar, por darme todos los consejos que me diste. GRACIAS!

A mis compañeros, por los mates compartidos, las horas de risas y quejas, todo fue más fácil con compañeros como ustedes.

A los chicos del laboratorio, siempre dispuestos a ayudarme, por hacerse cargo de mí cuando Silvi no estaba en el laboratorio.

A mi directora Dra. Sofía y a los jurados Dra. Carina Magnoli y Dra. Susana Bettera, por sus críticas constructivas, por el tiempo brindado, por el compromiso y buena predisposición que tuvieron hacia mí.

A todas aquellas personas que compartieron algún momento de estos 6 años conmigo.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, por haberme dado la posibilidad de estudiar, por haberme dado la posibilidad de conocer a una gran cantidad de personas, que no sólo me formaron desde lo académico y profesional, sino también a crecer como persona.

Sin todos ustedes, nada de esto hubiese posible.

**¡MUCHAS GRACIAS!**

## RESUMEN

El maíz es el segundo cultivo de importancia en Argentina e insumo principal para diversas cadenas agroalimentarias. Entre las especies fúngicas toxicogénicas que infectan los granos de maíz se encuentra *Aspergillus* de la sección *Flavi* (principalmente *A. flavus*). Esta infección puede generar pérdidas en el rendimiento, calidad e inocuidad de los granos debido a la producción de aflatoxinas (AFs). Los objetivos principales de este trabajo fueron la preparación de bioformulados a base de cepas de *A. flavus* no aflatoxicogénicas como potenciales agentes de control biológico y la evaluación a nivel de campo del efecto de dichos bioformulados para reducir los niveles de acumulación de AFs. Se realizaron dos ensayos a campo en la provincia de Córdoba, uno en la localidad de Espinillos y otro en Achiras. En dichos ensayos se aplicaron tres bioformulados: dos formulados simples a base de las cepas de *A. flavus* no toxicogénicas AFCHG2 y ARG5/30, y uno mixto a base de la combinación de estas mismas cepas. Se recolectaron muestras de suelo antes de la aplicación de los bioformulados y al momento de la cosecha, a partir de las cuales se evaluó el recuento fúngico total, la abundancia de cepas de *Aspergillus* de la sección *Flavi*, analizando su capacidad toxicogénica y los grupos de compatibilidad vegetativa (GCVs). Además, al momento de la cosecha se recolectaron muestras de granos de maíz, determinando la incidencia de AFs en los mismos, y el porcentaje de infección con *Aspergillus* de la sección *Flavi*. Las cepas de *A. flavus* fueron caracterizadas del mismo modo que las cepas provenientes de las muestras de suelo. Los resultados obtenidos del presente trabajo demuestran que los tres bioformulados ensayados fueron capaces de competir con las cepas de *A. flavus* toxicogénicas nativas en el suelo y lograron colonizar este sustrato desplazando a las productoras de AFs. Las cepas de *A. flavus* evaluadas interactuarían entre sí y con cepas nativas en el ecosistema influyendo también sobre la invasión de los granos de maíz. Tanto la evaluación de la capacidad toxicogénica como el monitoreo a través de los GCVs fue útil para confirmar dicho desplazamiento. Además, se observaron reducciones de un 100% en la contaminación con aflatoxinas en granos de maíz. Así, considerando los resultados obtenidos y el análisis de los datos aportados por estos estudios, se concluye que el bioformulado simple a base de la cepa no aflatoxicogénica de *A. flavus* AFCHG2 fue el más efectivo para desplazar a las cepas toxicogénicas nativas de los campos, disminuyendo así la acumulación de AFs en los granos de maíz, por lo que resulta de interés para ser empleado como agente de control biológico.



## ÍNDICE GENERAL

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Maíz	1
1.1.1. Características del cultivo de maíz	1
1.1.2. Importancia del uso del maíz	2
1.2. Género <i>Aspergillus</i>	4
1.2.1. Morfología	4
1.2.1.1. Características macroscópicas	6
1.2.1.2. Características microscópicas	7
1.2.2. <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i>	8
1.2.3. Ciclo de infección de <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> en maíz	9
1.2.4. Grupos de Compatibilidad Vegetativa	11
1.3. Micotoxinas	13
1.3.1. Generalidades	13
1.3.2. Aflatoxinas	14
1.3.2.1. Toxicidad y regulación	16
1.3.2.2. Situación de aflatoxinas en Argentina	18
1.4. Cambio climático	19
1.5. Control de aflatoxinas	20
1.5.1. Control biológico	21
1.5.1.1. Control biológico por exclusión competitiva	23
<b>2. Hipótesis y objetivos</b>	<b>27</b>
2.1. Hipótesis de trabajo	27
2.2. Objetivo general y específicos	27
<b>3. Materiales y métodos</b>	<b>29</b>
3.1. Medios de cultivo	29
3.2. Evaluación de cepas como potenciales agentes de biocontrol para reducir la contaminación con aflatoxinas en ensayos a campo	30
3.2.1. Cepas fúngicas	30
3.2.2. Preparación de los bioformulados	31
3.2.3. Diseño de los ensayos a campo y aplicación de los bioformulados	31
3.3. Análisis micológico de suelo	33
3.3.1. Muestreo de suelo	33
3.3.2. Recuento fúngico y aislamiento de <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> aislados de muestras de suelo	34
3.4. Análisis de muestras de granos de maíz	35

3.4.1. Muestreo de granos de maíz	35
3.4.2. Evaluación del porcentaje de infección de granos de maíz con <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> y aislamientos de cepas	36
3.4.3. Detección y cuantificación de aflatoxinas en granos de maíz	36
3.5. Análisis de cepas aisladas de ensayos a campo	37
3.5.1. Evaluación de la capacidad aflatoxicogénica	37
3.5.2. Análisis de aflatoxinas por HPLC	38
3.5.3. Análisis de Grupos de Compatibilidad Vegetativa	38
3.5.3.1. Generación de mutantes de las cepas recuperadas	38
3.5.3.2. Fenotipificación de las mutantes obtenidas	38
3.5.3.3. Ensayos de autocomplementación y de complementación	39
3.6. Análisis estadísticos	40
<b>4. Resultados y discusión</b>	<b>41</b>
4.1. Obtención de los bioformulados	41
4.2. Recuento fúngico y aislamiento de <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> en muestras de suelo	41
4.3. Evaluación del porcentaje de infección de los granos de maíz con <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> y aislamiento de cepas	48
4.4. Evaluación de la capacidad aflatoxicogénica de las cepas de <i>Aspergillus flavus</i> aisladas de los ensayos a campo	51
4.5. Análisis de Grupos de Compatibilidad Vegetativa	58
4.6. Detección y cuantificación de aflatoxinas en granos de maíz	61
<b>5. Conclusiones y perspectivas futuras</b>	<b>65</b>
5.1. Conclusiones	65
5.2. Perspectivas futuras	66
<b>6. Bibliografía</b>	<b>67</b>

## ÍNDICE DE TABLAS, GRÁFICOS Y FIGURAS

### **Tablas**

<b>Tabla 1</b>	Valores promedio de los recuentos de <i>Aspergillus flavus</i> de cada inoculante	41
<b>Tabla 2</b>	Promedio del recuento fúngico total de las muestras de suelo pre-inoculación y al momento de la cosecha en el ensayo realizado en Espinillos	43
<b>Tabla 3</b>	Promedio del recuento fúngico total de las muestras de suelo pre-inoculación y al momento de la cosecha en el ensayo realizado en Achiras	43
<b>Tabla 4</b>	Abundancia de <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> en suelo pre-inoculación y al momento de la cosecha en las muestras obtenidas de los ensayos realizados en Espinillos y Achiras	45
<b>Tabla 5</b>	Incidencia natural con aflatoxina B <sub>1</sub> en los granos de maíz	59

### **Gráficos**

<b>Gráfico 1</b>	Porcentajes de infección de los granos de maíz con <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> en las muestras obtenidas de los ensayos en Espinillos y Achiras	49
<b>Gráfico 2</b>	Capacidad aflatoxicogénica de las cepas de <i>Aspergillus flavus</i> aisladas de las muestras de suelo pre-inoculación y al momento de la cosecha de los ensayos realizados en los campos de Espinillos y de Achiras	52
<b>Gráfico 3</b>	Capacidad aflatoxicogénica de las cepas de <i>Aspergillus flavus</i> aisladas de las muestras de grano de los ensayos realizados en los campos de Espinillos y de Achiras	54

### **Figuras**

<b>Figura 1</b>	Principales áreas productoras de maíz en Argentina	3
<b>Figura 2</b>	Morfología del género <i>Aspergillus</i>	5
<b>Figura 3</b>	Colonias de <i>Aspergillus flavus</i> desarrolladas en Agar Czapek Extracto de levadura (CYA) luego de 7 días de incubación a 25°C	6
<b>Figura 4</b>	Fotografías de <i>Aspergillus flavus</i>	7
<b>Figura 5</b>	Ciclo de vida de <i>Aspergillus flavus</i> en el ecosistema agrícola	10
<b>Figura 6</b>	Vía de utilización del nitrógeno en <i>Aspergillus</i>	12
<b>Figura 7</b>	Estructura química de las cuatro aflatoxinas principales	15
<b>Figura 8</b>	Vías metabólicas y toxicidad de las aflatoxinas en animales	17

<b>Figura 9</b>	Ubicación de las localidades de Achiras y Espinillos	32
<b>Figura 10</b>	Diseño del ensayo realizado en las localidades de Achiras y Espinillos	33
<b>Figura 11</b>	Esquema de muestreo de suelo para cada parcela	34
<b>Figura 12</b>	Esquema de muestreo de granos de maíz para cada parcela	35
<b>Figura 13</b>	Equipo utilizado para desgranar maíz	35
<b>Figura 14</b>	Esquema de siembra de los ensayos de autocomplementación y complementación	37
<b>Figura 15</b>	Muestra de suelo sembrada en el medio de cultivo DRBC luego de 7 días de incubación a $28 \pm 1^\circ\text{C}$	42
<b>Figura 16</b>	Granos de maíz desinfectados superficialmente y sembrados en el medio de cultivo DRBC, incubado durante 7 días a $28^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$	49
<b>Figura 17</b>	Cepas de <i>Aspergillus flavus</i> en medio MEA	52
<b>Figura 18</b>	Análisis de los grupos de compatibilidad vegetativa	59

# INTRODUCCIÓN





## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Maíz

#### 1.1.1. Características del cultivo de maíz

El maíz (*Zea mays* L.) es una especie perteneciente a la familia de las gramíneas. Éste es un cultivo de aproximadamente 7000 a 10000 años de antigüedad y aunque todavía hay discrepancias respecto a su origen, la evidencia más antigua del maíz se remonta a México, donde pequeñas mazorcas de maíz fueron encontradas en cuevas de habitantes primitivos (Paliwal y col., 2001). Los granjeros seleccionaban las plantas de teocinte (ancestro del maíz) basándose en el fenotipo de las mismas, como por ejemplo mazorcas más grandes y de mejor aspecto. A través de una serie de selecciones que consistieron de sólo unas pocas mutaciones se desarrolló el moderno *Zea mays* (DuPont Pioneer, 2015).

El cultivo de maíz es de fácil desarrollo y de producción anual. Las plantas poseen porte robusto y pueden alcanzar una envergadura de hasta 4 m (Ortas, 2008). La obtención de granos cosechables al final de una campaña es el resultado de dos procesos simultáneos e interdependientes: el crecimiento y el desarrollo. El primero de ellos hace referencia al aumento en el número y tamaño de las células que constituyen los diversos órganos de la planta, que se incrementan mediante condiciones de crecimiento favorables (humedad, nutrientes y temperatura); mientras que el desarrollo es la sucesión progresiva de las etapas que conducen a establecer la morfología propia del organismo adulto, a medida que avanza el ciclo ontogénico (Andrade y col., 1996).

El cultivo de maíz requiere para su desarrollo una temperatura base cercana a 8°C, con una óptima entre 30 y 34°C, siendo entre 15 a 20°C la ideal para la germinación, y entre 20 a 32°C para la fructificación. Por otra parte, la temperatura máxima a la cual cesa el desarrollo del cultivo se encuentra entre 40 y 44°C (Andrade y col., 1996). En cuanto a los requerimientos hídricos, el agua disponible es el principal factor que limita el crecimiento y el rendimiento del cultivo en condiciones extensivas. En promedio, el cultivo necesita 650 mm de agua desde la siembra hasta la cosecha (INTA, 2015), y durante el crecimiento vegetativo es cuando más cantidad de agua se requiere (Ortas, 2008).

La escala fenológica más utilizada para describir el ciclo del cultivo de maíz es la de Ritchie y Hanway (1982). En ella se distinguen dos grandes etapas, la vegetativa y la reproductiva. Las subdivisiones numéricas de la etapa vegetativa, identificada con la letra V, corresponden al número de hojas totalmente expandidas:  $V_E$ : emergencia,  $V_1$ :

primera hoja, V<sub>2</sub>: segunda hoja, V<sub>N</sub>: enésima hoja, V<sub>T</sub>: panojamiento. La etapa reproductiva comienza con la emergencia de los estigmas (R<sub>1</sub>) y finaliza con la madurez fisiológica de los granos (R<sub>6</sub>). Las subdivisiones de la etapa reproductiva corresponden a distintos momentos del llenado del grano, R<sub>2</sub>: cuaje, R<sub>3</sub>: grano lechoso, R<sub>4</sub>: grano pastoso, R<sub>5</sub>: grano dentado (Andrade y col., 1996).

El maíz cumple un rol fundamental en la rotación de cultivos. El INTA recomienda rotaciones largas con maíz, sorgo o trigo, con una frecuencia de siembra de maní no menor a cuatro años. El maní es uno de los cultivos responsables de intensificar la erosión de suelos frágiles (INTA, 2014). Esta práctica permite diversificar los riesgos productivos, inhibiendo la proliferación de patógenos, insectos y malezas, y evitando desequilibrios químicos de importancia (Pedrol y col., 2003). Además, el maíz, el sorgo o el trigo aportan volúmenes abundantes de rastrojo que otorga sustentabilidad al sistema (INTA, 2014). Éste tiene una elevada relación C:N que hace que se descomponga y libere los nutrientes lentamente. Además, el sistema radical del maíz aumenta la proporción de macroporos en el suelo, condición favorable para el crecimiento de las raíces de los cultivos siguientes y para la formación de las vainas de maní (Pedrol y col., 2003).

### 1.1.2. Importancia del uso del maíz

La producción de maíz tiene un papel importante en la agricultura mundial, tanto a nivel económico como agronómico. El 58% del maíz producido es utilizado para alimentación animal, el 27% se industrializa y el 15% es consumido directamente como alimento humano y para otros usos. Este cereal representa el 33% del intercambio comercial mundial de cereales (FADA, 2019).

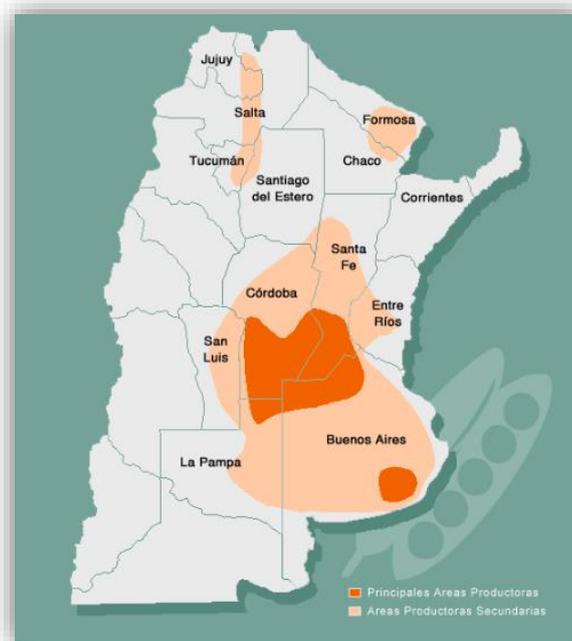
El maíz es el segundo cultivo de importancia para Argentina, luego de la soja. Este país ocupa el cuarto lugar como productor de maíz, detrás de Estados Unidos, China y Brasil, y es el tercer país exportador a nivel mundial, siendo Estados Unidos y Brasil los primeros (FADA, 2019).

Considerando los niveles altos de producción, el maíz tiene importancia en el desarrollo económico nacional, por ejemplo, generando diversidad de puestos de trabajo, entre productores, transportistas, acopiadores, industrias agro-alimenticias, industria de bioetanol y co-productos, y representa un insumo principal para diversas cadenas de gran relevancia agroalimentaria. La producción nacional de maíz en 2017 aumentó un 24,3% respecto a 2016 (FADA, 2019). El área sembrada de maíz en la campaña 2017/18 fue de más de 9 millones de hectáreas (Secretaría de Agroindustria

de la Nación, 2019). Para la campaña 2018/2019 se observó un aumento del 3% de la superficie implantada, proyectándose como una cosecha récord (FADA, 2019).

En el mercado interno el maíz tiene diversos usos, entre ellos, la alimentación animal para la producción de carnes (aviar, porcina y bovina), leche y la producción de biocombustibles como el bioetanol. El principal destino del maíz argentino es la exportación (52%), seguido por el consumo animal (27%) y el sector molinero (4%). Un porcentaje bajo de la producción se destina a la producción de semillas. Durante el año 2017, la producción de bioetanol de maíz, uno de los destinos más nuevos para el agregado de valor del maíz con plantas en las provincias de Córdoba, San Luis y Santa Fe, consumió un 3% de la producción nacional del grano (FADA, 2019).

En los últimos 10 años la provincia de Córdoba se consolidó como una de las más importantes en la producción de maíz. Actualmente produce el 33% del maíz del país, seguida por Buenos Aires (26%), Santa Fe (12%) y Santiago del Estero (9%) (**Fig. 1**). Particularmente, desde la campaña 2013/14 en adelante, el Departamento Río Cuarto es el mayor productor de maíz a nivel provincial y nacional (FADA, 2019).



**Figura 1.** Principales áreas productoras de maíz en Argentina ([http://www.intagro.com/mapas/arg\\_maiz.asp](http://www.intagro.com/mapas/arg_maiz.asp)).

El maíz está expuesto a varias enfermedades que pueden producir graves pérdidas de rendimiento y calidad del grano, teniendo un impacto negativo en la economía. Un ejemplo de estas enfermedades son las causadas por distintas especies fúngicas que pueden ser capaces de producir micotoxinas en el cultivo (Garrido y col.,

2012). Una problemática actual y en la que se basa este trabajo final de grado es la contaminación con aflatoxinas (AFs), micotoxinas producidas por especies de *Aspergillus* sección *Flavi*.

## 1.2. Género *Aspergillus*

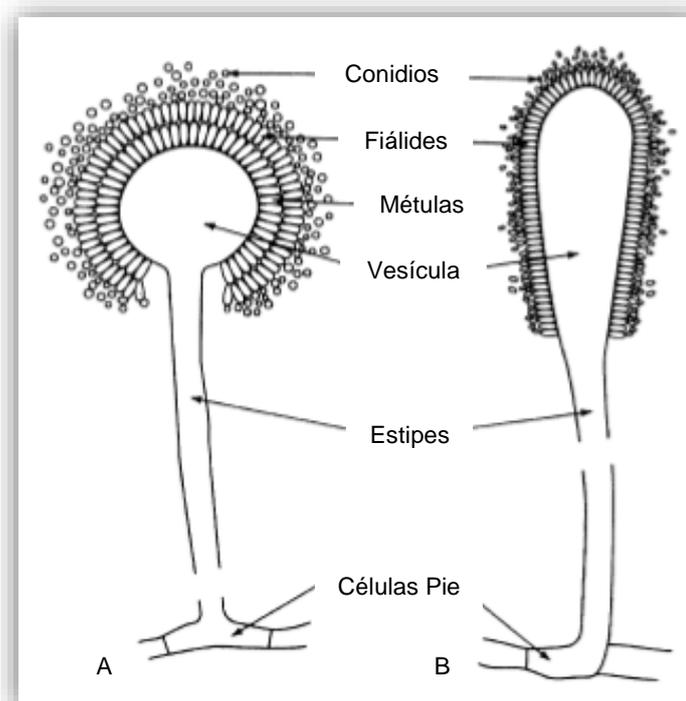
El género *Aspergillus* pertenece al Filo Ascomycota, y fue descrito por primera vez por Micheli en 1729. Las especies de este género son capaces de ocupar diversos nichos ecológicos, creciendo principalmente de forma saprófita sobre vegetales en descomposición (Bennett, 2010). La mayoría de los miembros del género fueron aislados de zonas de climas tropicales y subtropicales entre las latitudes 26°N y 35°S. La temperatura óptima de desarrollo varía entre 25 – 40°C, con una temperatura mínima de 10°C (Klich, 2002 a).

Los miembros del género *Aspergillus* son de interés debido a su impacto positivo como agentes de fermentación (Klich, 2002 a) y por estar involucrados en procesos industriales, como producción de enzimas (principalmente amilasas) y ácidos orgánicos. Tienen la capacidad de degradar desechos vegetales como residuos de cosechas. Muchas especies están adaptadas para degradar polímeros complejos de las plantas, pero también pueden degradar diversos sustratos como estiércol y tejidos humanos (Bennett, 2010). Sin embargo, algunas especies de este género tienen un impacto negativo debido a su capacidad toxicogénica, patogénica y degradadora de productos agrícolas (Klich, 2002 a); siendo el aspecto negativo fundamental la producción de micotoxinas, metabolitos secundarios que contaminan granos y productos derivados, representando una amenaza para la salud humana y animal. Determinadas especies de *Aspergillus* también pueden causar infecciones localizadas y sistémicas, denominadas Aspergillosis, que se caracterizan por el crecimiento del hongo dentro del huésped, especialmente en individuos inmunocomprometidos (Bennett, 2010).

### 1.2.1. Morfología

*Aspergillus* es un género que incluye más de 330 especies identificadas (Samson y col., 2014). Éstas se caracterizan por la presencia de conidióforos, conocidos también como “cabeza aspergilar”. Esta estructura es la que sostiene a las esporas asexuales, y es el carácter taxonómico más importante del género (Bennett, 2010). Durante la diferenciación micelial ciertas células se agrandan formando la pared celular y células vegetativas denominadas células pie. Esta célula pie está conectada a la base del conidióforo, y puede formar una “T” o una “L”. El pie se extiende desde la célula pie

hasta expandirse en el ápice dando lugar a la vesícula. En algunas especies, los conidios surgen de estructuras denominadas fiálides, unidas directamente a la vesícula, formando cabezas aspergilar uniseriadas. En otras especies, hay una segunda capa de células entre la vesícula y las fiálides, llamadas métulas, que forman cabezas aspergilar biseriadas (Pitt y Hocking, 1997; Klich, 2002 b). Estas estructuras se muestran en la **Fig. 2**. El tamaño y la disposición de las cabezas conidiales, así como el color de las esporas que llevan son características importantes para la identificación mediante caracteres morfológicos (Bennett, 2010).



**Figura 2.** Morfología del género *Aspergillus*. **A:** cabeza aspergilar biseriada; célula pie en forma de "T". **B:** cabeza aspergilar uniseriada; célula pie en forma de "L" (Klich, 2007).

Los criterios para clasificar a las especies del género *Aspergillus* se basan en las características morfológicas (macroscópicas y microscópicas) de las colonias desarrolladas en los medios de cultivo propuestos en el sistema de identificación de Klich (2002 b). Esta descripción morfológica es sólo un aspecto de la compleja clasificación polifásica que actualmente se realiza de estas especies.

### 1.2.1.1. Características macroscópicas

Las principales características macroscópicas que se tienen en cuenta para la identificación morfológica de especies de *Aspergillus* son (Klich y Pitt, 1988; Klich, 2002 b):

- Color de las colonias: determinado por el color de los conidios, característica importante para la clasificación subgenérica (**Fig. 3**).



**Figura 3.** Colonias de *Aspergillus flavus* desarrolladas en Agar Czapek Extracto de levadura (CYA) luego de 7 días de incubación a 25°C.

- Diámetro de la colonia: influenciado por la composición y la temperatura del medio.

- Color del micelio: el micelio es el conjunto de células vegetativas que dan origen a los conidióforos. Usualmente es blanco, pero algunas especies producen micelio de otros colores.

- Producción de exudados: pequeñas gotas de líquido que se forman en la superficie del micelio.

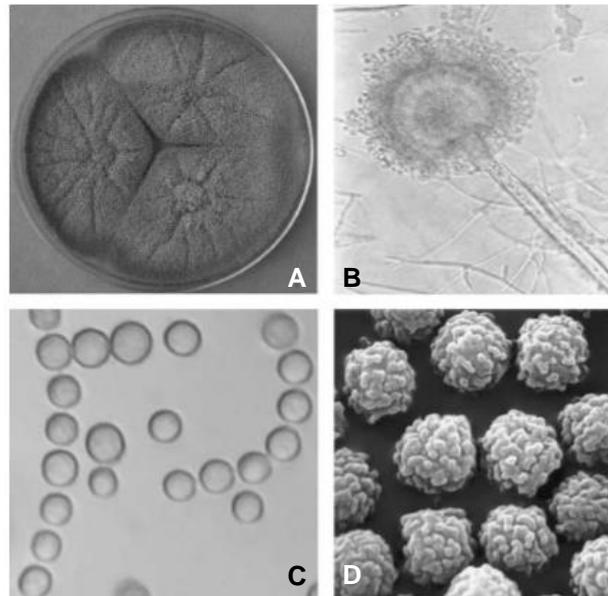
- Color del reverso de la colonia: el color es a menudo dependiente del medio.

- Formación de esclerocios: masas compactas de hifas, generalmente esféricas, subesféricas o elipsoidales que no contienen esporas. Son estructuras de resistencia que le permiten al hongo sobrevivir en condiciones desfavorables, y germinar en condiciones favorables.

- Formación de cleistotecios: se forman en las especies con estadio sexual (teleomorfo), son cuerpos fructíferos que no tienen apertura natural y que contienen ascos con ascosporas (esporas sexuales).

### 1.2.1.2. Características microscópicas

Las características microscópicas del género *Aspergillus* que se tienen en cuenta para la identificación morfológica se evalúan en Agar Extracto de malta (MEA) y son (Klich y Pitt, 1988; Klich, 2002 b) (**Fig. 4**):



**Figura 4.** Fotografías de *Aspergillus flavus*. **A:** Colonias de *A. flavus* luego de una incubación por 7 días a 25°C en Agar Czapek Extracto de levadura (CYA). **B:** Conidióforo de *A. flavus*. **C:** conidios de *A. flavus* observados en microscopio óptico (100x). **D:** Conidio de *A. flavus* observados en microscopio electrónico de barrido (Klich, 2007).

- Seriación: cantidad de capas celulares entre la pared de la vesícula y los conidios.

- Vesícula: es el ápice del conidióforo. Su forma puede variar de globosa, hemisférica, elíptica a elongada (forma de clava).

- Conidios: son también llamados esporas asexuales, sirven fundamentalmente para la dispersión. Los conidios en las especies de *Aspergillus* son unicelulares, de paredes lisas u ornamentadas, hialinas o pigmentadas.

- Fiálides: son células conidiógenas especializadas que se desarrollan sobre el área fértil de la vesícula.

- Estipe: la longitud, el color y la textura de la superficie son importantes.

- Células de Hülle: son células de pared gruesa, altamente refractivas asociadas a los cleistotecios en algunas especies teleomórficas.

- Paredes de los cleistotecios y las ascosporas: la textura de la pared, el color y la forma de los cleistotecios y la ornamentación de las ascosporas son las características más importantes en la determinación de las especies teleomórficas.

### 1.2.2. *Aspergillus* sección *Flavi*

La clasificación del género *Aspergillus* se basa tradicionalmente en caracteres morfológicos. Raper y Fennell (1965) dividieron el género en 18 grupos. La clasificación en grupos no tiene un estatus dentro de las reglas formales de la nomenclatura, y basado en esto, Gams y col. (1985) introdujeron nombres de subgéneros y secciones en *Aspergillus*. La clasificación basada en el fenotipo de subgéneros y secciones corresponde en gran medida con las filogenias publicadas actualmente. Peterson (2008) plantea 5 subgéneros y 16 secciones en *Aspergillus*. Houbraken y col. (2014) y Hubka y col. (2015) proponen 4 subgéneros (*Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati* y *Nidulantes*) y 20 secciones (Samson y col., 2014). Dentro de estas secciones, se ubica *Aspergillus* sección *Flavi* como la de mayor impacto económico. Esta sección contiene las principales especies productoras de AFs: *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. La sección *Flavi* también incluye otras dos especies de importancia económica, *A. oryzae* y *A. sojae*, importantes en la fermentación industrial, que a diferencia de *A. flavus* y *A. parasiticus*, no producen AFs (Klich, 2007).

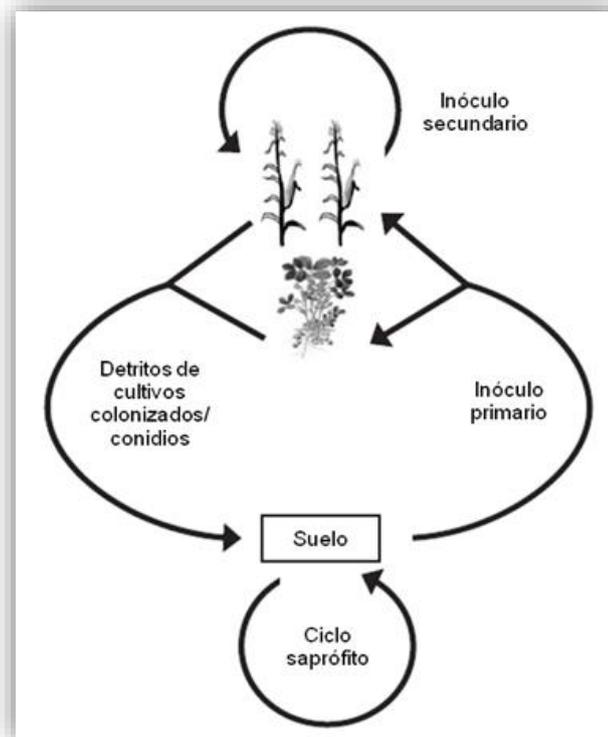
*A. flavus* es patógeno oportunista de plantas, animales, insectos y humanos. En cultivos, causa descomposición en cualquier etapa de desarrollo. Además, puede producir AFs como metabolito secundario en las semillas de varios cultivos (Klich, 2007). Esta especie se aísla más frecuentemente en zonas templadas a cálidas, entre las latitudes 26 – 35°, que en zonas templadas tropicales o más frías (Klich, 2002 b), incluyendo distintas zonas agrícolas y pudiendo afectar a cultivos tales como maíz, maní, algodón, higos, nueces, pistachos, etc. (Ehrlich y col., 2015).

Las colonias de esta especie se caracterizan por poseer una coloración amarillo-verdosa de rápido crecimiento, generalmente de 65 a 70 mm de diámetro después de 7 días de incubación en oscuridad, en Agar Czapek Extracto de levadura (CYA). El estipe mide aproximadamente 400 a 800 µm de largo y es de pared rugosa. Las vesículas son globosas a elongadas y presentan un diámetro de 20 a 45 µm, y al menos el 20% de las cabezas aspergiliares son biseriadas. Los conidios son globosos a elipsoidales, en su mayoría de 3 – 6 µm, con paredes lisas o finamente rugosas. Además, algunas cepas producen estructuras globulares negras de paredes firmes, llamadas esclerocios, que como se mencionó en la sección 1.2.1.1, son estructuras de resistencia, que contienen reservas alimenticias y le permiten al hongo permanecer viable durante periodos

ambientales extremos (Klich, 2002 b). En base al tamaño y la cantidad de esclerocios las cepas de *A. flavus* pueden presentar dos morfotipos diferentes, denominándose cepas L y cepas S. Las cepas L producen pocos esclerocios con un diámetro promedio mayor a 400  $\mu\text{m}$  y las cepas S producen numerosos esclerocios pero con un diámetro inferior a 400  $\mu\text{m}$  (Cotty, 1989). Las cepas S producen generalmente mayores niveles de AFs, mientras que las cepas L producen bajos niveles de AFs o son atoxicogénicas. A partir de esto se sugirió que las cepas S, al producir concentraciones más altas de AFs, pueden ser una fuente importante de contaminación con estas micotoxinas en maíz y algodón (Orum y col., 1997; Jaime-García y Cotty, 2006).

### 1.2.3. Ciclo de infección de *Aspergillus* sección *Flavi* en maíz

El ciclo de vida de *A. flavus* / *A. parasiticus* en los campos agrícolas (**Fig. 5**) se puede dividir en dos etapas: la colonización de residuos vegetales en el suelo, y la invasión de semillas y granos en plantas en crecimiento activo (Horn, 2007). El suelo es la principal fuente de inóculo de ambas especies fúngicas (Horn, 2005 a). En aquellos cultivos con fruto aéreo tales como el maíz, cuyo fruto está físicamente separado del inóculo primario, se requiere del efecto del viento y de artrópodos como transportadores de inóculo secundario para la instalación de la infección (Olanya y col., 1997; Jaime-García y Cotty, 2004; Horn, 2007). Ciertos factores como estrés hídrico, altas temperaturas, lo cual desencadena una baja resistencia de la planta, y daños provocados por insectos ayudan a promover la infección (Abbas y col., 2004; Horn, 2007). Una vez que las condiciones son propicias, *A. flavus* / *A. parasiticus* puede ingresar a la planta mediante distintas vías de acceso (Klich, 2007). Luego de la cosecha, los conidios son liberados al suelo, colonizan el material vegetal allí depositado y permanecen en estado de dormición debido al efecto fungistático del suelo. Los esclerocios producidos por algunas cepas de *A. flavus* en el suelo son la fuente más eficiente de inóculo primario para iniciar un ciclo de infección en las plantas hospedadas (Battilani y col., 2013). Únicamente cuando se encuentran en presencia de una fuente de nutrientes utilizables son capaces de germinar, dando así inicio a un nuevo ciclo (Horn, 2007; Accinelli y col., 2014).



**Figura 5.** Ciclo de vida de *Aspergillus flavus* en el ecosistema agrícola (Horn, 2007).

Respecto al inóculo secundario, los adultos de las principales plagas de insectos del maíz transportan el inóculo primario del suelo al follaje de la planta, y son capaces de poner huevos en los granos. Las larvas se alimentan de granos que eventualmente pueden estar colonizados por *A. flavus*, y luego caen al suelo o permanecen en partes de plantas en descomposición (Horn, 2007). En cuanto al viento, el maíz se vuelve susceptible a la infección en la etapa de floración, cuando las partículas de polvo arrastradas por el viento transportan las esporas de *A. flavus* desde el suelo hasta las estigmas del maíz, que emergen de las mazorcas durante la etapa reproductiva R<sub>1</sub> (Battilani y col., 2013). Las esporas germinan en un estigma, la penetran y el micelio crece hasta llegar al grano con el que está asociado ese estigma, y de esta forma se establece la infección. La propagación lateral del hongo a los granos adyacentes puede ocurrir más tarde (Abbas y col., 2017). La colonización en los estigmas y en la superficie del grano puede continuar y aumentar a lo largo de la temporada dependiendo de varios factores ecológicos y climáticos (Battilani y col., 2013).

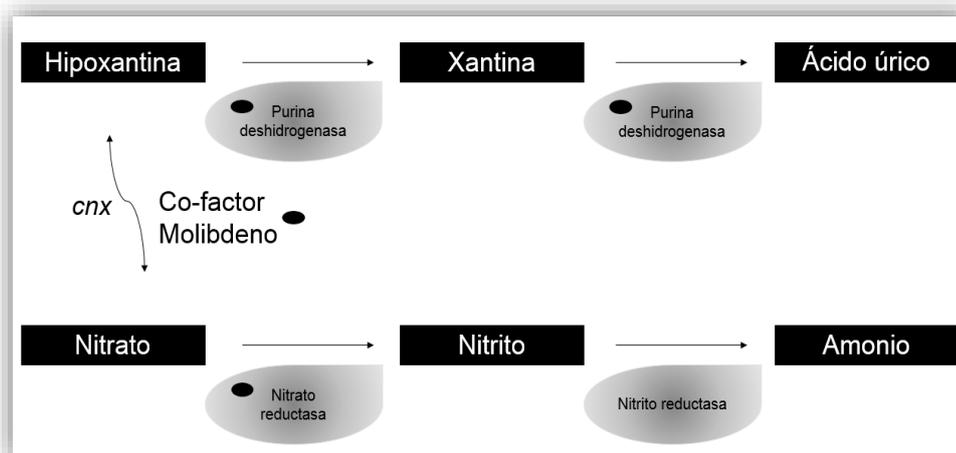
#### 1.2.4. Grupos de Compatibilidad Vegetativa

El género *Aspergillus*, al igual que los demás hongos filamentosos, presenta dos tipos de sistemas de reconocimiento que median el flujo génico en las poblaciones: un sistema de compatibilidad sexual y otro de incompatibilidad vegetativa. Se piensa que la incompatibilidad vegetativa puede haber evolucionado como una manera de limitar la transmisión de virus deletéreos y plásmidos (Grubisha y Cotty, 2010).

En las especies de *Aspergillus* la formación de un heterocarion estable seguida de la anastomosis de hifas está controlado por una serie de *loci het* pertenecientes al mismo grupo de compatibilidad vegetativa (GCV) (Bayman y Cotty, 1991 b). Sin embargo, la fusión de hifas entre cepas de diferentes GCVs generalmente resulta en una muerte celular programada (Grubisha y Cotty, 2010). En otras palabras, dos individuos que tienen los mismos alelos en todos los *loci het* corresponden a un mismo GCV, y a su vez se consideran pertenecientes a un mismo linaje clonal (Mehl y Cotty, 2010).

Los GCVs se identifican típicamente mediante la complementación de mutantes auxótrofos incapaces de utilizar nitrato (mutantes *nit*) (Papa, 1986). La complementación se evidencia por una zona de crecimiento denso de tipo salvaje y una esporulación intensa en la intersección de las dos colonias debido a la anastomosis hifal y la complementación nutricional en el heterocarion. Los heterocariones pueden formarse sólo entre mutantes *nit* de cepas compatibles vegetativamente. Estas mutantes *nit* son generadas utilizando un medio que contiene clorato, que actúa como análogo del nitrato y es convertido por la enzima nitrato reductasa en clorito, el cual resulta tóxico (Cove, 1976). En las mutantes resistentes al clorato se reconocen sectores de rápido crecimiento, que ponen de manifiesto una deficiencia en la enzima nitrato reductasa (Horn y col., 1995).

La vía de utilización de nitrógeno en *Aspergillus* es similar a la de otros Ascomycota. El nitrato es reducido a nitrito por la enzima nitrato reductasa. Este nitrito se reduce a amonio por la nitrito reductasa y posteriormente el amonio es utilizado por la célula a través de diferentes vías (**Fig. 6**).



**Figura 6.** Vía de utilización del nitrógeno en *Aspergillus*.

La nitrato reductasa es un octámero codificado por el gen *niaD*. Aquellas cepas con mutaciones en *niaD* no pueden usar el nitrato como fuente de nitrógeno, pero esto no afecta su capacidad de utilizar otros compuestos nitrogenados. Junto a la proteína NIAD, un cofactor que contiene molibdeno es parte activa de la enzima nitrato reductasa. Existen cinco *loci* que codifican partes del cofactor molibdeno (*cnxABC*, *cnxE*, *cnxF*, *cnxG* y *cnxH*), pero conjuntamente los cinco *loci* son llamados *cnx*, por las siglas de *Cofactor Nitrate reductase and Xanthine dehydrogenase* (Schwarz y Mendel, 2006). Este cofactor también funciona como parte de la enzima purina deshidrogenasa. Así, ni la nitrato reductasa ni la purina deshidrogenasa puede funcionar si alguna de las partes del cofactor molibdeno ha sido alterada. Por lo tanto, las mutantes *cnx* no pueden utilizar nitrato ni hipoxantina como fuente de nitrógeno, pero sí pueden utilizar otros compuestos nitrogenados para su desarrollo.

Existen dos *loci* regulatorios que influyen en la utilización de nitrato en *Aspergillus*. El primero es un regulador global de nitrógeno llamado *areA*, cuyas mutantes usualmente no son recuperadas de los sectores resistentes a clorato, y una segunda proteína regulatoria, codificada por el locus *nirA*, que afecta sólo a la vía de utilización del nitrato. Las mutantes *nirA* tienen afectadas tanto la nitrato como la nitrito reductasa y por lo tanto no pueden usar nitrato ni nitrito como fuente de nitrógeno (Leslie, 2004).

Los datos de secuencia confirman que las cepas pertenecientes a un mismo GCV están estrechamente relacionadas y son distintas de otro GCV. Las características fenotípicas tales como el tamaño de los esclerocios y la capacidad de producir AFs, generalmente se conservan dentro de un mismo GCV. Por ejemplo, la producción de AFs es más similar dentro de un mismo GCV que entre GCVs distintos, y algunos GCVs están compuestos sólo de miembros atoxicogénicos (Mehl y Cotty, 2010).

El número de GCVs en un campo puede variar según el tipo de suelo, el clima y el tipo de cultivo, e incluso puede variar de un año a otro. Los análisis de GCVs han demostrado que las cepas de *A. flavus* genéticamente distintas interactúan con frecuencia durante la dispersión, el crecimiento y la infección de los cultivos (Moore y col., 2011). Aunque aparentemente *A. flavus* no tiene especificidad de hospedador, las distribuciones de diferentes linajes de *A. flavus* sugieren que pueden adaptarse a nichos especializados y exhibir ventajas competitivas en suelos, hospedadores, regiones y estaciones específicas (Mehl y Cotty, 2009).

El estudio de los GCVs puede ser utilizado para estimar la diversidad genética, limitar el potencial de heterocariosis y el flujo de genes asexuales (Bayman y Cotty, 1991 b), como así también para monitorear la incidencia de cepas potencialmente biocontroladoras en ensayos a campo para el desarrollo de agentes de control biológico (Cotty, 1994; Donner y col., 2010; Alaniz Zanon y col, 2013).

En términos ideales, las cepas que se utilicen de manera segura en biocontrol deberían pertenecer a GCVs que no incluyan cepas toxicogénicas, de manera tal de garantizar que cepas toxicogénicas y no toxicogénicas no intercambien material genético y puedan dar lugar a una progenie capaz de producir AFs (Ehrlich y col., 2007).

### 1.3. Micotoxinas

#### 1.3.1. Generalidades

En la década de 1960, la “enfermedad X de los pavos” causó la muerte de aproximadamente cien mil pavos en Inglaterra. Esta fue causada por harinas de maní originarias de Brasil y África contaminadas con *A. flavus* y AFs (Blout, 1961; Forgacs, 1962). A raíz de este acontecimiento, las micotoxinas (toxinas producidas por hongos filamentosos), fueron ganando importancia.

La ingestión, inhalación o absorción cutánea de micotoxinas reduce la actividad metabólica, generando enfermedad y/o hasta la muerte de animales y humanos (Pitt, 1996; FAO, 2003). Son compuestos biológicamente activos que se generan como resultado de la interacción entre el huésped, el ambiente y el hongo toxicogénico. La exposición a micotoxinas puede producir toxicidad tanto aguda como crónica, generando efectos nocivos en el sistema nervioso central, cardiovascular, respiratorio y digestivo. Además, son agentes cancerígenos, mutagénicos, teratogénicos e inmunodepresores o supresores.

Las micotoxinas no tienen función aparente en el metabolismo normal de los hongos. Se producen principalmente, aunque no exclusivamente, cuando el hongo

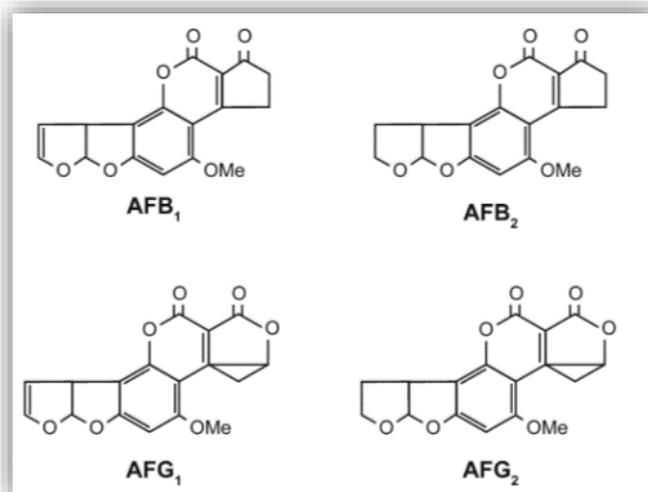
alcanza la madurez. Las micotoxinas suelen detectarse en los derivados alimentarios para humanos y animales, pudiendo producirse en el campo antes y después de la cosecha, durante el procesamiento, almacenamiento y transporte, lo que afecta negativamente a la calidad de los alimentos y piensos (Sforza y col., 2006).

Estas toxinas pueden ingresar a las cadenas alimenticias humanas y animales a través de la contaminación directa o indirecta. La contaminación directa, ocurre cuando el producto o alimento es infectado por un hongo toxicogénico, con la posterior formación de micotoxinas. La contaminación indirecta de los alimentos y piensos se produce cuando algún ingrediente ha sido contaminado previamente por una especie fúngica toxicogénica, y aunque el hongo haya sido eliminado durante el procesamiento, las micotoxinas pueden permanecer en el producto final. Los hongos toxicogénicos pueden crecer y desarrollarse en los alimentos durante su producción, procesamiento, transporte y almacenamiento (Bezerra da Rocha y col., 2014).

Las micotoxinas de importancia mundial, con efectos considerables sobre la salud humana y animal, y que generan pérdidas directas e indirectas en agricultura son: AFs, deoxinivalenol, nivalenol, zearalenona, fumonisinas, ocratoxinas, patulina, citrinina, moniliformina, altenueno, alternariol, alternariol monometil éter, ácido tenuazónico y altertoxinas, entre otras, sintetizadas principalmente por especies de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*. (CAST, 2003; FAO, 2003; Moreno y col., 2012). La FAO estima que el 25% de los cultivos alimentarios mundiales, incluidos muchos alimentos básicos, se ven afectados por hongos productores de micotoxinas (CAST, 2003).

### 1.3.2. Aflatoxinas

Químicamente, las AFs derivan de la difuranocumarina y son producidas por la vía de los policétidos. Existen cuatro AFs principales: aflatoxina B<sub>1</sub>, aflatoxina B<sub>2</sub>, aflatoxina G<sub>1</sub> y aflatoxina G<sub>2</sub> (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub>, respectivamente) (**Fig. 7**). Las letras B (*Blue*) y G (*Green*) se refieren a la fluorescencia azul o verde que presentan bajo la luz ultravioleta (366 nm), respectivamente, y los números indican la distancia relativa de migración en una placa de cromatografía en capa fina. Además de estas cuatro AFs, se han descrito otras 12 AFs más, especialmente como productos de biotransformación de los metabolitos principales en mamíferos. Por ejemplo, las vacas metabolizan la AFB<sub>1</sub> del alimento en un derivado monohidroxilado llamado aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) que luego se secreta en la leche, como producto de la detoxificación (Bennett y col., 2007; Klich, 2007).



**Figura 7.** Estructura química de las cuatro aflatoxinas principales (Bennett y col., 2007).

Las cepas toxicogénicas de *A. flavus* solamente tienen la capacidad de producir AFB<sub>1</sub> y/o AFB<sub>2</sub>, mientras que *A. parasiticus* puede producir las cuatro AFs principales (CAST, 2003). La pérdida de la capacidad de producción de AFs del grupo G por *A. flavus* implica una deleción en la región *norB – cypA*, genes que se encuentran en el *cluster* de biosíntesis de AFs. El gen *cypA* codifica para la citocromo P450 monooxigenasa, necesaria para la formación de AFG (Ehrlich y col., 2004).

La AFB<sub>1</sub> está clasificada por la Agencia Internacional de Investigaciones sobre Cáncer (IARC) como una toxina del grupo 1A debido a su carcinogenicidad demostrada en humanos (IARC, 1993).

Durante varias décadas, se creía que *A. flavus* y *A. parasiticus* eran las únicas especies capaces de producir AFs. En 1987 fue reportado por Kurtzman y col. que cepas de la especie *A. nomius* también son aflatoxicogénicas. Posteriormente, se han descrito otras especies productoras de AFs: *A. bombycis* (Peterson y col., 2001), *A. ochraceoroseus* (Klich y col., 2000, 2003), *A. pseudotamarii* (Ito y col., 2001), *A. tamarii* (Goto y col., 1996) y *Emericella astellata* (Frisvad y col., 2004). En comparación con *A. flavus* y *A. parasiticus*, estas especies son menos abundantes en la naturaleza y rara vez se encuentran en ecosistemas agrícolas. En la naturaleza, los niveles de biosíntesis de AFs varían de acuerdo a la cepa y a las condiciones climáticas en las que se desarrollan. Las condiciones de alta temperatura y baja humedad desencadenan en la planta un estrés por sequía, generando daños y favoreciendo la contaminación con AFs en el campo (Scheidegger y Payne, 2003; Abbas y col., 2004), ya que bajo estas condiciones *A. flavus* se convierte en el patógeno dominante en el maíz (Payne y col., 1998; Piva y col., 2006; Battilani y col., 2008; Zorzete y col., 2008; Giorni y col., 2009).

La temperatura ideal para la síntesis de AFB<sub>1</sub> es de 20 – 35°C, dependiendo del sustrato, siendo 28°C la temperatura óptima para la producción de AFs (Sanchis y Magan, 2004). La actividad acuosa ( $a_w$ ) mínima para que *A. flavus* se desarrolle en maíz es de 0,73, a una temperatura de 26 – 32°C. Los límites de producción de AFs son similares dentro de este rango de temperatura, con  $a_w$  de 0,85 a 0,89 (Battilani y Logrieco, 2014).

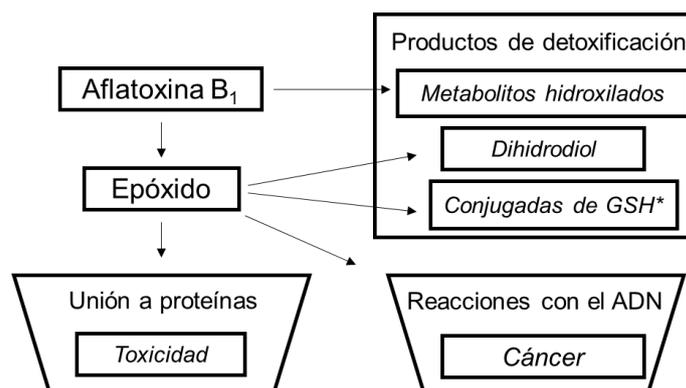
El maíz, el maní y el algodón, se encuentran entre los cultivos más frecuentemente contaminados con AFs. Los cultivos a menudo se contaminan con AFs en el campo antes de la cosecha, y especialmente durante los años de sequía y altas temperaturas, cuando las plantas se debilitan y se vuelven más susceptibles al daño por insectos (Atehnkeng y col., 2014). Una vez cosechados, los granos almacenados también tienen un alto riesgo de ser contaminados con AFs. En el almacenamiento, las variables más importantes que favorecen el crecimiento fúngico son el contenido de humedad del sustrato, la humedad relativa del entorno y la temperatura (Detroy y col., 1971; Wilson y col., 1994; Bennett y col., 2007). Después de la cosecha, los granos de maíz se secan hasta un contenido de humedad inferior al 14%, para luego almacenarlos en condiciones que mantienen continuamente un nivel de humedad suficientemente bajo para evitar el crecimiento fúngico y la producción de AFs (Abbas y col., 2017).

Las agencias reguladoras gubernamentales asumen que el contenido de AFs en el maíz puede analizarse después de la cosecha y que los niveles no aumentarán durante el almacenamiento. En los países desarrollados, este supuesto es válido, pero en los países sub-desarrollados, donde el maíz no destinado a la exportación a menudo se almacena en condiciones que están lejos de ser las ideales puede ocurrir una producción sustancial de AFs después de la cosecha (Abbas y col., 2017). De este modo, el desarrollo de estrategias tendientes a controlar y minimizar la contaminación de los granos con especies aflatoxicogénicas adquiere suma importancia tanto a campo como durante el almacenamiento.

#### 1.3.2.1. Toxicidad y regulación

La toxicidad de una micotoxina se manifestará por sus efectos sobre la salud y la productividad de los cultivos, las personas y los animales, y estos efectos influirán en el valor económico de las actividades humanas y los productos agrícolas y pecuarios (FAO, 2003).

Las AFs son un grupo de compuestos estrechamente relacionados con pequeñas diferencias en la composición química. En los animales la AFB<sub>1</sub> se metaboliza a través de una serie de vías que compiten entre sí. Estas vías se resumen en la **Fig. 8**.



**Figura 8.** Vías metabólicas y toxicidad de las aflatoxinas en animales (Williams y col., 2004).

La enzima citocromo P450 convierte a las AFs en la forma reactiva, es decir en epóxido. Este compuesto puede unirse al ADN y a las proteínas (Williams y col., 2004). En el ADN, el epóxido de aflatoxina reactiva se une a las guaninas pudiendo causar transversiones de GC a TA. Un sistema de glutatión-S-transferasa cataliza la conjugación de AFs activadas con glutatión reducido, y permite que sean excretadas (Raj y col., 1986).

La enfermedad causada por la exposición a AFs se denomina aflatoxicosis, pudiendo ser aguda o crónica. La aflatoxicosis aguda tiene un inicio rápido y síntomas claramente definidos, que terminan en la muerte del individuo. La toxicidad crónica es más difícil de diagnosticar y se caracteriza por la exposición a dosis bajas de AFs durante un largo periodo de tiempo. La aflatoxicosis crónica puede producir cáncer principalmente de hígado, supresión del sistema inmunológico, teratogenicidad y otros síntomas (Bennett y Klich, 2003).

Estas moléculas afectan a la agroindustria de muchos países, influyendo en o incluso impidiendo la exportación, reduciendo la producción ganadera y agrícola y, en algunos casos, afectando la salud humana (Leung y col., 2006; Lagogianni y Tsitsigiannis, 2019). Es por eso que están rigurosamente reguladas. La FDA (U.S. *Food and Drug Administration*), considera a las AFs contaminantes inevitables de los alimentos, por lo que su objetivo ha sido minimizar esta contaminación, implementando regulaciones que atiendan el problema en cuestión (Williams y col., 2004). Debido a la gran preocupación por las consecuencias de la exposición a AFs, las agencias regulatorias gubernamentales han establecido límites de tolerancia muy bajos para estas micotoxinas. Los organismos como el USDA (U.S. *Department of Agriculture*) y la EC (*European Commission*), han sugerido regulaciones que establecen límites máximos para la comercialización. La EC establece los siguientes límites: 5 µg/kg para AFB<sub>1</sub> y 10 µg/kg para AFs totales (suma de B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>) en “maíz para ser sometido a

clasificación u otro tratamiento físico antes del consumo humano o uso como ingrediente en alimento” (EC, 2010). La FDA ha definido niveles máximos de 20 µg/kg para AFs en alimentos para consumo humano directo y alimentos para ganado lechero y animales inmaduros, excepto en la leche. En leche, el límite máximo de AFM<sub>1</sub> permitido por la FDA es de 0,5 µg/kg; en alimentos para la cría de ganado vacuno, cerdos reproductores o aves de corral maduras, el nivel máximo de AFs es de 100 µg/kg; en alimentos para porcinos, 200 µg/kg; en alimentos para animales de producción, como así también en grano destinado a fermentación para producir etanol, 300 µg/kg (Abbas y col., 2017). En Estados Unidos para alimentos y piensos derivados del maíz, se establece un límite de 20 ng/g de AFs totales, mientras que la Unión Europea es más estricta, estableciendo un límite máximo de 1 ng/g para AFB<sub>1</sub> y de 4 ng/g para AFs totales (Van Egmond y Jonker, 2004; Abbas y col., 2006). La Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria de Brasil (ANVISA), establece los siguientes límites: en leche líquida el máximo de AFM<sub>1</sub> permitido es 0,5 µg/kg, en leche en polvo el máximo de AFM<sub>1</sub> permitido es de 5 µg/kg y en quesos el máximo permitido de esta misma AF es de 2,5 µg/kg. ANVISA establece como límite máximo permitido en maíz, maíz en grano (entero, partido, amasado, molido), harinas o sémolas de maíz, 20 µg/kg de AFs totales (ANVISA, 2011). Por su parte, el Mercado Común del Sur (MERCOSUR) establece los siguientes límites máximos admisibles de AFs: 0,5 µg/L de AFM<sub>1</sub> en leche líquida; 5 µg/kg de AFM<sub>1</sub> en leche en polvo; 20 µg/kg de AFs totales en maíz en grano (entero, partido, aplastado, mondado) y en harinas o sémolas de maíz (MERCOSUR, 2002).

#### 1.3.2.2. Situación de aflatoxinas en Argentina

La demanda de alimentos está orientada cada vez con mayor énfasis a productos con mayor valor nutritivo y desarrollados bajo un determinado sistema de aseguramiento de la calidad. Esto significa proveer al mercado internacional productos con garantía de calidad superior y en cantidad suficiente, de manera de satisfacer permanentemente la demanda de los consumidores, aún por sobre sus propias expectativas (Alaniz Zanon, 2016).

La ocurrencia natural de micotoxinas en Argentina ha sido investigada en granos de maíz (Chulze y col., 1989; Sydenham y col., 1993; Resnik y col., 1996; González y col., 1999; Pacin y col., 2001, 2009; Broggi y col., 2007), en fracciones de molienda seca (Broggi y col., 2002) y en otros productos derivados del maíz (Solovey y col., 1999). En un estudio llevado a cabo en Argentina durante 10 años, desde 1999 a 2010, se detectó la presencia de AFs, zearalenona, deoxinivalenol y fumonisinas, en granos de maíz, tanto frescos como almacenados. Este análisis mostró una importante contaminación

con fumonisinas, con los mayores valores en el año 2003 durante el almacenamiento. Se debe tener en cuenta que éstas pueden tener interacciones toxicológicas con las AFs, por lo que la presencia de las fumonisinas debe tenerse en cuenta (Garrido y col., 2012).

#### 1.4. Cambio climático

El calentamiento del planeta Tierra durante los últimos 100 años ha aumentado las temperaturas máximas diarias en zonas tanto urbanas como rurales. Con este incremento, también existe un aumento en los niveles de CO<sub>2</sub> en la atmósfera, los cuales se espera que se dupliquen o tripliquen (de 350 – 400 a 800 – 1200 ppb) en los próximos 25 – 50 años, y por lo tanto las diferentes regiones se verán afectadas por los aumentos de temperatura en 2 – 5°C, junto con el aumento de CO<sub>2</sub> y los episodios de sequía (Magan y col., 2011; Gregory y col., 2009; Bebber y col., 2013, 2014; Bebber y Gurr, 2015).

La capacidad de los hongos para crecer, sobrevivir e interactuar con una amplia variedad de especies vegetales y producir micotoxinas está enormemente influenciada por estos factores medioambientales íntimamente relacionados a los cambios climáticos, como temperatura, humedad relativa, la presencia y tipo de insectos, entre otros. En este sentido, la seguridad alimentaria se ha convertido en un tema de gran importancia a nivel mundial y los potenciales efectos del cambio climático sobre el rendimiento y la calidad de los alimentos, especialmente en lo que respecta a las micotoxinas, ha recibido una importante atención en los últimos años, particularmente desde una perspectiva asociada a análisis de riesgos (Magan y col., 2011).

Debido a esta situación de temperaturas promedio elevadas, se esperaría un cambio en las áreas que tradicionalmente sufren contaminación con micotoxinas, como así también podrían surgir nuevas zonas de riesgo o bien podría suceder que ciertas zonas afectadas por una micotoxina particular comiencen a sufrir contaminación con otra micotoxina (Perrone y col., 2014).

Como se mencionó anteriormente, los eventos de contaminación con AFs son más frecuentes en épocas de calor y sequía, condiciones que pueden generar estrés en la planta hospedera, lo que debilita los mecanismos de defensa de la planta, y facilita la infección por *A. flavus* (Ehrlich y col., 2015). Además, el aumento del estrés hídrico se correlaciona con el aumento de la producción de AFs. El estrés en el hongo también podría conducir a un aumento de los niveles de reproducción sexual, así como a la inducción de activadores transcripcionales del desarrollo y el metabolismo secundario,

---

entre cuyos resultados se encuentra, por ejemplo, la biosíntesis de AFs (Reverberi y col., 2013).

### 1.5. Control de aflatoxinas

El control de la contaminación de AFs se puede lograr ya sea controlando el desarrollo del hongo productor de la micotoxina o controlando la producción de AFs. La presencia de micotoxinas en los productos agrícolas es inevitable aunque el nivel de estos contaminantes se puede disminuir con buenas prácticas agronómicas (Bruns y Abbas, 2006). Se han propuesto varias estrategias de manejo de AFs en diferentes etapas del proceso de producción: a campo (pre-cosecha), durante el almacenamiento y durante el procesamiento (post-cosecha). Un gran número de factores influye en el crecimiento y la distribución de los hongos y la producción de AFs. El conocimiento, manejo y aprovechamiento de estos factores está impulsando el desarrollo de nuevas estrategias de control a nivel de campo (Klich, 2007).

Las AFs constituyen un problema en las plantas bajo situación de estrés, y dicha situación se puede minimizar al disminuir el estrés de la planta. Muchas de las prácticas que los productores agropecuarios utilizan para obtener máxima calidad y rendimiento de los cultivos, también reducen la susceptibilidad a la infección por *A. flavus* y la producción de AFs. Algunas alternativas empleadas con resultados alentadores son: realizar una fertilización adecuada (especialmente con nitrógeno), limitar el daño por insectos utilizando insecticidas o variedades de semillas modificadas genéticamente resistentes al ataque de ciertos insectos, la siembra de semillas adaptadas regionalmente, libres de plagas y enfermedades, para asegurar plantas sanas y vigorosas capaces de resistir el ataque durante la etapa de crecimiento, uso de semillas resistentes a la sequía y la selección de variedades de cultivos capaces de resistir el ataque de hongos, controlar malezas, irrigar cuando sea necesario y cosechar tan pronto como el cultivo esté maduro. Cabe mencionar que a la fecha no existen cultivares comerciales de maíz que sean totalmente resistentes a la contaminación con AFs. Otro aspecto a tener en cuenta es la fecha de siembra, si esta es tal que la floración coincida con la liberación de esporas, es probable que se produzcan ataques fúngicos más frecuentes y severos. En la medida que sea posible, la siembra del cultivo debe programarse para evitar temperaturas altas y estrés por sequía durante el periodo de desarrollo y maduración de las semillas. El arado y la rotación de los cultivos también limitan la contaminación con hongos. Además, se han desarrollado modelos predictivos basados en el uso de *software* que ayudan a los agricultores a predecir el riesgo de micotoxinas durante el año en función de los parámetros climáticos (Jard y col., 2011).

Durante la etapa post-cosecha también se han implementado distintas estrategias de control de AFs, como destrucción del cultivo si éste está altamente contaminado con AFs, alimentación con este cultivo a especies animales menos sensibles a AF, mezcla de semillas de cultivos no contaminados con semillas de cultivos contaminados para reducir los niveles de AFs hasta los niveles permitidos. Además, dependiendo del sustrato, las micotoxinas se pueden extraer químicamente con solventes, reducir los niveles de las toxinas con tratamiento térmico, como la nixtamalización, o con radiación. Actualmente se utilizan tres métodos comerciales: adsorbentes inespecíficos, como las arcillas, que además de eliminar las AFs de los alimentos, pueden unirse a nutrientes y eliminarlos; la amoniación, que implica tratar la semilla con amoníaco gaseoso o hidróxido de amonio, convirtiendo a la AFB<sub>1</sub> en productos menos tóxicos y eliminando más del 90% de la toxina (Klich, 2007). Sin embargo, el hecho de que algunos de estos productos sean ligeramente tóxicos ha impedido la aprobación de este método por parte de la FDA (Park y col., 1988; CAST, 2003). El tercer método es la clasificación de los granos, semillas y demás sustratos por medio de dispositivos electrónicos (Dorner, 2008), pero estos procedimientos son caros y muy poco eficaces. Actualmente, las regulaciones no permiten la descontaminación de alimentos que excedan los límites máximos de contaminación (Jard y col., 2011).

Durante el almacenamiento es importante manejar varios factores, como mantener una humedad de 14 – 15% (Kabak y col., 2006), bajas temperaturas (Burges y Burrel, 1964), una concentración baja de O<sub>2</sub> (51%) y un aumento de la concentración de CO<sub>2</sub>, para así prevenir el desarrollo de hongos productores provenientes de contaminaciones previas (Driehuis y Oude-Elferink, 2000). Debe evitarse la mezcla de granos y un almacenamiento prolongado.

Una estrategia de control de la contaminación con micotoxinas en momentos previos a la cosecha es el biocontrol, ejercido a través de diferentes mecanismos, por ejemplo la exclusión competitiva.

### 1.5.1. Control biológico

Los hongos fitopatógenos representan una gran amenaza para la estabilidad del ecosistema y la producción de alimentos, lo que pone de manifiesto la necesidad de desarrollar métodos para controlar las graves pérdidas causadas por los mismos. Para controlar estos patógenos se utilizan mayormente diversos plaguicidas químicos. Estos, están asociados a peligros para el medio ambiente y la salud, y también representan un riesgo de desarrollo de resistencia en los fitopatógenos. Por este motivo existe la necesidad de desarrollar métodos alternativos, económicos, innovadores y amigables

con el ambiente, mediante los cuales se pueda lograr un manejo sostenible de las enfermedades de las plantas. Para controlar y/o prevenir estas enfermedades, y además proporcionar seguridad alimentaria, preservando la naturaleza y previniendo los riesgos de salud asociados al uso continuo de plaguicidas, se propone el empleo de microorganismos antagonistas naturales (hongos filamentosos, bacterias, levaduras y virus) conocidos como agentes de control biológico (ACB). Según el Consejo Nacional de Investigación de los Estados Unidos, los ACB pueden involucrar el uso de organismos modificados de forma natural o genética y/o el uso de sus genes o productos genéticos para disminuir los efectos dañinos de los patógenos. Hay dos principios fundamentales del control biológico. Por un lado, el uso de ACB se basa en el fenómeno del “control natural” para suprimir la población de los patógenos destructivos de las plantas. El segundo principio hace referencia a que el control biológico no provoca la eliminación de plagas, sino que resulta en la reducción de las especies de plagas, de modo que tanto la plaga como el enemigo natural se mantienen en densidades más bajas en el agroecosistema (Babbal y col., 2017).

El mecanismo de acción de los ACB puede clasificarse como: antagonismo directo y antagonismo indirecto. El antagonismo directo es la consecuencia de una interacción física directa y/o de un alto grado de selectividad para el patógeno por parte de los microorganismos activos de biocontrol. Ejemplos de este mecanismo son: hiperparasitismo, antibiosis, producción de enzimas y de compuestos orgánicos volátiles. El antagonismo indirecto no implica ninguna interacción física directa entre el patógeno y el ACB. Éste incluye la inducción de resistencia sistémica en la planta, la tolerancia al estrés abiótico, la exclusión competitiva del patógeno por nutrientes, por la ocupación del nicho ecológico, por micronutrientes esenciales como el hierro y el manganeso y por sustancias de crecimiento específicas o estimulantes para la germinación y la promoción del crecimiento de la planta (Adivitiya y col., 2017).

Las características ideales de un buen ACB son las siguientes: estabilidad genética, efectividad a bajas concentraciones, poca exigencia en cuanto a requerimientos nutricionales, a factores ambientales y a condiciones de almacenamiento, gran capacidad de crecimiento, efectividad para un gran número de patógenos y/o diversos cultivos, capacidad de reproducirse en medios de crecimiento económicos, facilidad de aplicación, ausencia de capacidad productora de metabolitos secundarios tóxicos para personas y animales, resistencia a plaguicidas, compatibilidad con otros tratamientos químicos o físicos, formulación estable en el tiempo e inocuidad para seres humanos, animales, insectos, vegetales y para el medio ambiente (Babbal y col., 2017).

Muchos ACB, además de prevenir las enfermedades vegetales, también promueven el crecimiento de las mismas, mejoran la tolerancia al estrés, ayudan en la adquisición de nutrientes e inducen resistencia a enfermedades en las plantas. De los ACB desarrollados hasta el momento, sólo el 10% son especies fúngicas (Adivitiya y col., 2017). El uso de ACB para el control de hongos micotoxigénicos se ha centrado en: (a) la eficacia en términos de control de la germinación / crecimiento / colonización por hongos micotoxigénicos en productos alimenticios crudos o procesados y (b) reducción en la producción de la micotoxina asociada a menudo dirigiéndose a los genes biosintéticos involucrados en la biosíntesis de toxinas (Medina y col., 2017).

Los inoculantes biológicos son aquellos productos formulados con microorganismos viables, benéficos, seleccionados para favorecer la nutrición y/o promover el desarrollo de las plantas, siempre respetando al medio ambiente. Como por ejemplo aquéllos empleados para favorecer la fijación de nitrógeno, la absorción de compuestos fosforados y promover el crecimiento vegetal mediante el uso de PGPR (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*) (Brockwell y Bottomley, 1995; Bashan y Gonzalez 1999). Otra clase de inoculantes son aquéllos cuyo objetivo es ejercer control biológico sobre algún organismo patógeno o productor de metabolitos tóxicos (Babbal y col., 2017).

#### 1.5.1.1. Control biológico por exclusión competitiva

El control biológico de la contaminación con micotoxinas en cultivos ha sido exitoso al aplicar una cepa no toxicogénica de una cepa fúngica a un conveniente nicho ecológico normalmente ocupado por hongos toxigénicos. Las cepas fúngicas biocontroladoras no deben producir toxinas y deben ser capaces de suprimir la multiplicación de cepas productoras (Abbas y col., 2017). La premisa de esta estrategia es que las cepas fúngicas no toxicogénicas pueden ocupar el nicho por el cual se compite y desplazar las cepas toxicogénicas en los ecosistemas agrícolas. Así, el objetivo final es reducir los niveles de contaminación con micotoxinas en granos (Klich, 2007).

No todas las cepas de *A. flavus* son capaces de producir AFs, dicha característica ha sido aprovechada por muchos investigadores con la finalidad de desarrollar estrategias de biocontrol, basadas en la exclusión competitiva (Abbas y col., 2009; Accinelli y col., 2011).

El fruto del maíz se encuentra en la parte aérea de la planta, por lo que, los estigmas podrían ser el sitio ideal donde las cepas biocontroladoras compitan con las cepas de *A. flavus* toxicogénicas. Por razones prácticas, resulta más conveniente una

aplicación del bioformulado previa a la formación de las espigas de maíz, directamente sobre las hojas de la planta o bien sobre la superficie del suelo. Se ha demostrado que la inoculación sobre el suelo con una cepa de *A. flavus* biocontroladora es eficaz para reducir el número de esporas aflatoxicogénicas que llegan, transmitidas por el polvo, hasta los estigmas (Abbas y col., 2017).

Según Daigle y Cotty (1995), una de las principales dificultades para la implementación exitosa de esta estrategia de biocontrol es el desarrollo de la formulación, si es un inoculante líquido o un inoculante con soporte sólido (orgánicos o inorgánicos). Además de tener el potencial intrínseco de servir como agente de biocontrol, una formulación eficiente es esencial para la funcionalidad, uso práctico y rendimiento del ACB en el campo (Butt y Copping, 2000). Una formulación sencilla consiste en utilizar granos de cereales inoculados con cepas biocontroladoras de *A. flavus* (Alaniz Zanon y col., 2013). Una vez aplicado al suelo, el hongo reanuda rápidamente el crecimiento y esporula. Otros tipos de sustratos también han sido evaluados como transportadores de cepas biocontroladoras, por ejemplo gránulos de alginato con la cepa biocontroladora “atrapada” en su interior, *pellets* de glúten de trigo con caolín (conocidos como “Pesta”), los cuales además, proporcionan al agente de biocontrol una fuente de alimento adecuada (Daigle y Cotty, 1997). Sin embargo, los altos costos de producción de los gránulos de alginato y *pellets* de Pesta son limitaciones importantes para su uso a escala de campo.

En la actualidad, el uso de granos de cereales como sustrato y transportador de cepas biocontroladoras es la alternativa utilizada para aplicaciones a campo. Los hongos filamentosos están siendo intensamente estudiados por distintas instituciones y laboratorios públicos y privados de todo el mundo respecto a su potencial rol como agentes de biocontrol, y ya son varios los productos comercializados por distintas empresas. Algunos ejemplos son: Triatum® (comercializado por Koppert), producto elaborado a base de una cepa de *Trichoderma harzianum* y DiTera® (Valent Biosciences, Inc.) producido a partir de una cepa de *Myrothecium verrucaria*, ambos empleados para combatir nematodos en plantas ornamentales, uvas, árboles y otros vegetales (Tranier y col., 2014); AQ10® (Ecogen, Inc.) elaborado a base de *Ampelomyces quisqualis* y aplicado en manzanas, uvas, frutillas, tomate, etc. (APS, 2002); AflaGuard® (comercializado por Circle One Global, USA) y *Aspergillus flavus* AF36 (Arizona Cotton Research and Protection Council, USA), elaborados a base de cepas no aflatoxicogénicas para reducir los niveles de contaminación con AFs en maní y algodón, respectivamente (Fravel, 2005). Por otra parte, algunos biopesticidas / bioestimulantes tales como Mycostop®, Serenade Max®, Vacciplant®, Triatum® y Botector® fueron evaluados en ensayos *in vitro* en los que se observó una reducción

significativa en la producción de conidios de *A. flavus*, como así también una importante disminución en los niveles de AFB<sub>1</sub> (Lagogianni y Tsitsigiannis, 2019).

Lyn y col. (2009) han propuesto una formulación líquida para la aplicación directa por pulverización de una cepa no aflatoxigénica de *A. flavus*. Los estudios a campo realizados en el Sur de los Estados Unidos utilizando esta formulación granular dispersable en agua a base de arcilla han demostrado su eficacia en el control de la contaminación del maíz con AFs (Accinelli y col., 2011).

Actualmente, existe un número limitado de estrategias disponibles para prevenir la contaminación con AFs en maíz. Una de las herramientas más prometedoras, es el control biológico basado en la aplicación de una cepa no aflatoxicogénica de *A. flavus* (Abbas y col., 2011 a, b). Esta estrategia ha demostrado ser eficiente bajo condiciones de campo en cultivos de maíz en Estados Unidos (Brown y col., 1991; Abbas y col., 2006).

Las etapas generales involucradas en la producción de un agente fúngico de biocontrol son las siguientes: aislamiento de cepas fúngicas, caracterización y *screening* general, ensayos *in vitro* (etapa de laboratorio), ensayos *in situ* (etapa de laboratorio y/o invernadero), ensayos a campo, producción de biomasa fúngica a gran escala y evaluación de toxicidad sobre organismos blanco y sobre el ecosistema (Jenkins y col., 1998; Alaniz Zanon, 2016). En el presente trabajo se aportan datos importantes, contribuyendo a la línea de investigación asociada a la selección y caracterización de cepas, ensayos *in vitro*, *in situ* y ensayos a campo.



# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS





## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1. Hipótesis de trabajo

Un bioformulado a base de cepas no aflatoxicogénicas de *Aspergillus flavus* nativas de la provincia de Córdoba reduce los niveles de contaminación con aflatoxinas en granos de maíz a nivel pre-cosecha.

### 2.2. Objetivo general y específicos

Desarrollar un bioformulado para reducir la acumulación de aflatoxinas en maíz a nivel pre-cosecha, a base de cepas de *Aspergillus flavus* no aflatoxicogénicas.

#### Objetivos específicos

- ✓ Adquirir destrezas y desarrollar sentido crítico en el manejo de técnicas de uso convencional en las áreas de la Micología y la Micotoxicología.
- ✓ Preparar bioformulados con inóculos simples y mixtos a base de cepas de *Aspergillus flavus* no aflatoxicogénicas como potenciales agentes de biocontrol.
- ✓ Evaluar a nivel de campo el efecto de los bioformulados en muestras de suelo y de granos de maíz, respecto al análisis de cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* aisladas de estas muestras y a la incidencia natural de aflatoxinas en granos.



# MATERIALES Y MÉTODOS





### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Medios de cultivos

Agar agua (AA): 1,5 g agar, 100 ml agua destilada.

Agar Czapek – Clorato (2,5 ó 3%) (P/V): 30 g sacarosa, 3 g NaNO<sub>3</sub>, 0,5 g KCl, 1 g K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H, 15 g agar, 25 ó 30 g KClO<sub>3</sub> (2,5 ó 3%, respectivamente), 1000 ml agua destilada.

Agar Czapek - Dox (Nitrato) (Cz): 30 g sacarosa, 3 g NaNO<sub>3</sub>, 0,5 g MgSO<sub>4</sub>, 0,5 g KCl, 0,01 g FeSO<sub>4</sub>, 1 g K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H, 13 g agar, 1000 ml agua destilada.

Agar Czapek Extracto de levadura (CYA): 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 ml Concentrado Czapek (30 g NaNO<sub>3</sub>, 5 g KCl, 5 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,1 g FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,1 g ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,05 g CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 100 ml agua destilada), 5 g extracto de levadura, 30 g sacarosa, 15 g agar, 1000 ml agua destilada.

Agar Czapek Extracto de levadura con 20% de sacarosa (CY20S): 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 ml Czapek concentrado (30 g NaNO<sub>3</sub>, 5 g KCl, 5 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,1 g FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 100 ml agua destilada), 5 g extracto de levadura, 200 g sacarosa, 15 g agar, 1000 ml agua destilada.

Agar Diclorán Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC): 10 g glucosa, 5 g peptona, 0,6 g MgSO<sub>4</sub>, 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 ml diclorán (0,2% en etanol), 1 ml cloranfenicol (0,2% en etanol), 1 ml rosa de bengala (2,5% en H<sub>2</sub>O), 15 g agar, 1000 ml agua.

Agar Extracto de Malta (AEM): 20 g extracto de malta, 1 g peptona, 20 g glucosa, 20 g agar, 1000 ml agua destilada.

Agar Hipoxantina: 30 g sacarosa, 0,1 g hipoxantina, 0,5 g MgSO<sub>4</sub>, 0,5 g KCl, 1 g K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H, 13 g agar, 1000 ml agua destilada.

Agar Medio Mínimo (MM): 30 g sacarosa, 3 g NaNO<sub>3</sub>, 0,5 g MgSO<sub>4</sub>, 0,5 g KCl, 1 g K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H, 15 g agar, 3 g KNO<sub>3</sub>, 1000 ml agua destilada.

Agar Nitrito: 30 g sacarosa, 0,7 g NaNO<sub>2</sub>, 0,5 g MgSO<sub>4</sub>, 0,5 g KCl, 1 g K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H, 13 g agar, 1000 ml agua destilada.

Agua Peptonada 0,1% (P/V): 0,1 g peptona, 100 ml agua destilada.

Agar semisólido o agar soft 0,2% (P/V): 2 g agar, 100 ml agua destilada.

Agar Tartrato: 30 g sacarosa, 0,9 g tartrato de amonio, 0,5 g MgSO<sub>4</sub>, 0,5 g KCl, 1 g K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H, 13 g agar, 1000 ml agua destilada.

Caldo para producción de AFs: 150 g sacarosa, 40 g glucosa, 20 g extracto de levadura, 10 g peptona de soja, 1000 ml agua destilada.

## 3.2. Evaluación de cepas como potenciales agentes de biocontrol para reducir la contaminación con aflatoxinas en ensayos a campo

### 3.2.1. Cepas fúngicas

En estudios previos de aislamiento y caracterización de cepas de *Aspergillus* sección *Flavi*, la finalidad fue la selección de potenciales agentes de biocontrol de cepas aflatoxicogénicas para reducir los niveles de AFs. Se evaluó un grupo de cepas a fin de determinar la capacidad de producir AFs y ácido ciclopiazónico (otra micotoxina producida por algunas cepas de *A. flavus*), la producción de esclerocios, los genes de tipo de apareamiento (*MAT*). Además, se llevaron a cabo ensayos de competencia *in situ* en granos de maíz. A partir de los resultados obtenidos de dichos estudios, se seleccionaron 2 cepas identificadas como *A. flavus* (AFCHG2 y ARG5/30) para realizar los ensayos de evaluación a campo. La cepa AFCHG2 fue aislada de granos de maní y la cepa ARG5/30 de granos de maíz, ambas recolectadas en la provincia de Córdoba. Estas cepas se caracterizaron como no productoras de AFs ni ácido ciclopiazónico, producen esclerocios de diámetro >400 µm (morfotipo L) y pertenecen a un GCV que incluye sólo cepas no aflatoxicogénicas (Barros y col., 2005, 2006, a, b; Alaniz Zanon y col., 2018). Las cepas se identificaron morfológicamente utilizando la metodología descrita por Klich (2002 b) y a nivel molecular de acuerdo a lo descrito por Alaniz Zanon y col. (2013, 2018). Las mismas se mantienen en la colección de cultivos del Instituto de Investigación en Micología y Micotoxicología (IMICO) CONICET-UNRC en glicerol al 20% a -80°C.

### 3.2.2. Preparación de los bioformulados

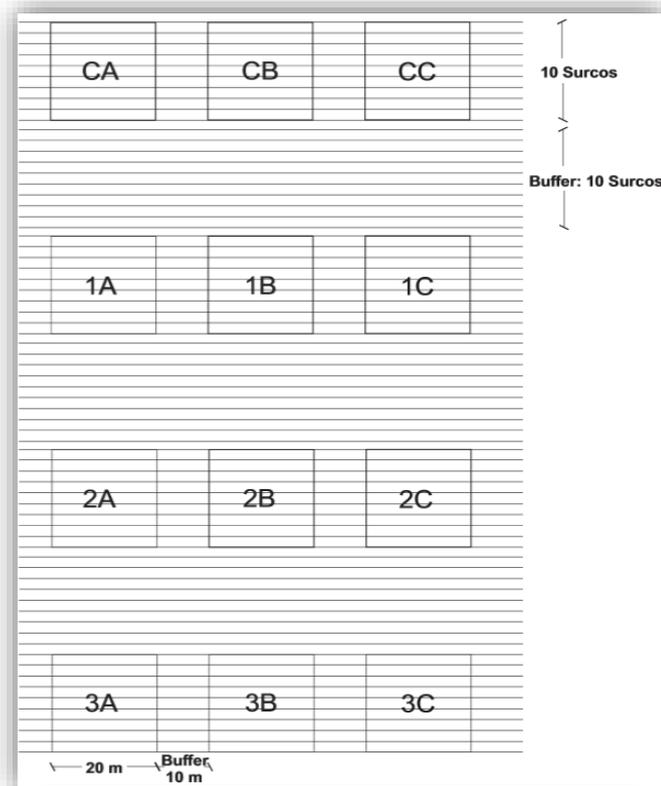
Las cepas de *A. flavus* AFCHG2 y ARG5/30 desarrollaron mediante fermentación en sustrato sólido utilizando arroz de tipo grano fino largo esterilizado dos veces en autoclave, la primera vez seco y la segunda vez hidratado con agua destilada (30%, V/P), dentro de bolsas de plástico esterilizables por autoclave (121°C, 15 min). Dicho sustrato (3 kg para cada bioformulado) se inoculó con 1 ml de una suspensión de conidios de cada una de las cepas de manera individual a razón de  $10^7$  conidios/ml, los cuales fueron obtenidos a partir de un cultivo de 7 días en AEM. Las bolsas plásticas fueron incubadas entre 7 – 10 días a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  y se agitaron diariamente en forma manual para evitar la formación de agregados de micelio fúngico y arroz. Finalizado el periodo de incubación, el sustrato fue secado en estufa de aire forzado a  $40^\circ\text{C}$ , para posteriormente determinar el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) de *A. flavus* por gramo de sustrato. Se utilizó la metodología de recuento en placa de células viables, homogeneizando 10 g de sustrato en 90 ml de agua peptonada al 0,1% (P/V). Esta mezcla fue colocada en frascos Erlenmeyer en agitador orbital y posteriormente se hicieron diluciones decimales hasta  $10^{-3}$  (Alaniz Zanon y col., 2013). De cada una de estas diluciones se sembró 0,1 ml en agar DRBC (Horn y Dörner, 1998), por triplicado. Las placas de Petri fueron incubadas por 5 – 7 días en oscuridad a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Se formularon 3 tipos de inóculos: 1) Inóculo simple con la cepa AFCHG2; 2) Inóculo simple con la cepa ARG5/30; 3) Inóculo mixto con ambas cepas (AFCHG2 + ARG5/30). Los bioformulados fueron mantenidos en recipientes plásticos herméticos a  $4^\circ\text{C}$  hasta ser aplicados en el campo.

### 3.2.3. Diseño de los ensayos a campo y aplicación de los bioformulados

Se seleccionaron dos campos comerciales con el mismo manejo agronómico de la provincia de Córdoba, uno ubicado en la localidad de Espinillos, correspondiente a una región productiva núcleo maicera, y otro en cercanías a la localidad de Achiras, siendo esta última una zona sub-húmeda/árida (**Fig. 9**). Ambas zonas presentaban condiciones predisponentes para la contaminación con AFs (altas temperaturas y precipitaciones relativamente bajas). Los ensayos fueron llevados a cabo durante la campaña 2017/2018 (siembra tardía). En ambos campos, el maíz se sembró en el mes de noviembre del 2017 y se cosechó en los meses de mayo-junio del 2018.





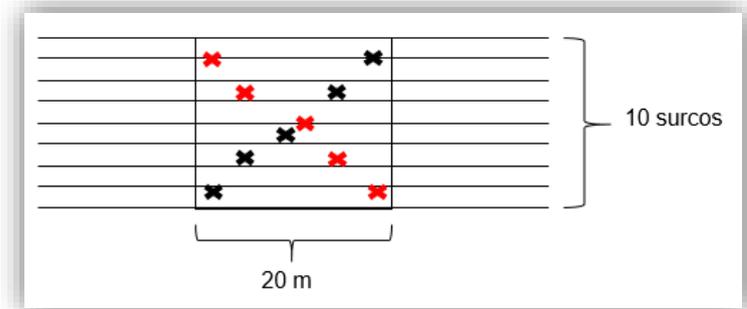
**Figura 10.** Diseño del ensayo realizado en las localidades de Achiras y Espinillos. C: control sin inocular; 1: inoculación con bioformulado simple a base de AFCHG2; 2: inoculación con bioformulado mixto a base de AFCHG2 + ARG5/30; 3: inoculación con bioformulado simple a base de ARG5/30. Las letras A, B, C, representan réplicas de cada tratamiento.

### 3.3. Análisis micológico de suelo

#### 3.3.1. Muestreo de suelo

Se realizaron dos muestreos de suelo: uno antes de la aplicación de los bioformulados y otro al momento de la cosecha. Cada muestra de suelo se conformó de 5 sub-muestras recolectadas desde los 5 cm de profundidad hasta la superficie, en dos diagonales extendidas desde las esquinas opuestas de cada parcela. En la **Fig. 11** se indica el esquema de muestreo, en donde cada cruz representa una sub-muestra. De las 10 sub-muestras de cada parcela, obtenidas en cada uno de los momentos de muestreo, 5 de ellas fueron combinadas, obteniendo de este modo, 2 muestras de cada parcela (Alaniz Zanon y col., 2018). Así, las cinco cruces rojas (**Fig. 11**) conforman una de las muestras de una parcela, y las cinco cruces negras conforman la segunda muestra de esa misma parcela. Posteriormente cada muestra fue secada en estufa de

aire forzado por 1 – 2 días a 25 – 30°C y pasada a través de un tamiz (malla con poro de 2 mm de diámetro) con la finalidad de eliminar partículas de gran tamaño.



**Figura 11.** Esquema de muestreo de suelo para cada parcela (10 surcos x 20 m).

### 3.3.2. Recuento fúngico y aislamiento de *Aspergillus* sección *Flavi* aislados de muestras de suelo

El recuento de hongos totales a partir de las muestras de suelo (recolectadas antes de la inoculación con los bioformulados y al momento de la cosecha) se realizó por medio de la técnica de siembra en superficie. Para tal fin se pesaron 10 g de suelo de cada muestra y se añadieron a un frasco Erlenmeyer con 90 ml de agua peptonada al 0,1% (P/V). Este procedimiento se realizó por duplicado. Posteriormente se colocaron en un agitador orbital durante 30 min a 150 rpm. Finalizado este tiempo, se prepararon diluciones seriadas ( $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ). Una alícuota de 0,1 ml de cada una de las diluciones se sembró en superficie con espátula de Drigalsky en placas de Petri con el medio DRBC. Las placas se incubaron en oscuridad durante 5 – 7 días a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ . Luego del periodo de incubación, se llevó a cabo el recuento. Estos valores fueron expresados en unidades formadoras de colonias por gramo de muestra de suelo (UFC/g). Aquellas colonias fúngicas coincidentes con características típicas de *Aspergillus* sección *Flavi* fueron sub-cultivadas en placas con agar AEM (Alaniz Zanon y col., 2018).

A partir de las cepas desarrolladas en AEM se realizaron cultivos monospóricos para la posterior identificación morfológica según la clave de Klich (2002 b). Para la obtención de cultivos monospóricos, se sembraron estrías paralelas desde una suspensión de esporas preparada en agar semisólido de cada una de las cepas en placas de Petri conteniendo agar agua, cargando el ansa una única vez. Este procedimiento se realizó por triplicado. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 16 h. Luego fueron observadas bajo lupa en condiciones de

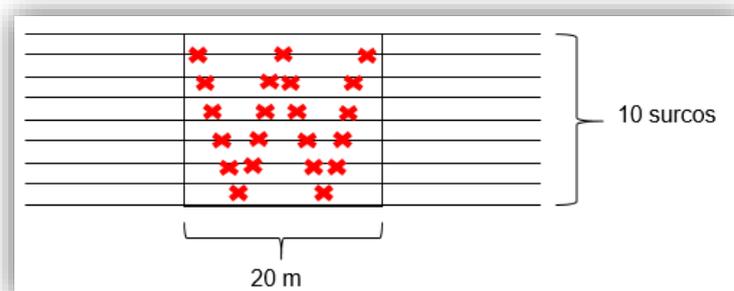
esterilidad y 3 esporas germinadas se transfirieron a placas con AEM, incubándose éstas a 28 – 30°C durante 7 días (Alaniz Zanon, 2016).

Finalmente, como se describirá en el apartado 3.5., se evaluó la capacidad aflatoxicogénica de las cepas aisladas y se llevó a cabo un análisis de GCVs comparando cada cepa con las 2 cepas potencialmente biocontroladoras aplicadas a campo, cuyo GCV era ya conocido.

### 3.4. Análisis de muestras de granos de maíz

#### 3.4.1. Muestreo de granos de maíz

En el periodo de cosecha del maíz (Junio – Julio de 2018), se recolectó en forma manual un número representativo de mazorcas de cada tratamiento, entre 60 y 100 mazorcas por cada repetición. El muestreo se hizo en W (**Fig. 12**). Las muestras fueron llevadas al laboratorio para ser desgranadas de forma mecánica, con el equipo que se muestra en la **Fig. 13**.



**Figura 12.** Esquema de muestreo de granos de maíz para cada parcela (10 surcos x 20 m).



**Figura 13.** Equipo utilizado para desgranar maíz.

Las muestras de todos los tratamientos y de los controles de cada ensayo se sometieron a los siguientes análisis: 1) evaluación de la infección de los granos con *Aspergillus* sección *Flavi* e incidencia de cepas no aflatoxicogénicas pertenecientes a los GCVs aplicados a campo, y 2) incidencia de AFs en granos de maíz (detección y cuantificación de AFs).

#### 3.4.2. Evaluación del porcentaje de infección de granos de maíz con *Aspergillus* sección *Flavi* y aislamiento de cepas

Para determinar el porcentaje de infección fúngica, 200 granos de cada muestra fueron analizados. Los granos de maíz se desinfectaron superficialmente sumergiéndolos durante 2 min en etanol al 70% y luego por otros 2 min en hipoclorito de sodio al 0,4%. Luego se procedió a sembrarlos con pinzas metálicas estériles en placas de Petri con agar DRBC (Pitt y Hocking, 2009). Las placas se incubaron a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 7 días. Finalizado el periodo de incubación se determinó el porcentaje de infección de los granos con *Aspergillus* sección *Flavi*. Aquellas colonias fúngicas coincidentes con características típicas de *Aspergillus* sección *Flavi* fueron subcultivadas en AEM para su posterior identificación a partir de cultivos monospóricos, tal como se detalló en el apartado **3.3.2**.

Al igual que con las cepas provenientes de las muestras de suelo, se evaluó la capacidad aflatoxicogénica de las cepas aisladas de grano y se llevó a cabo un análisis de GCVs comparando cada cepa con los GCVs de las 2 cepas inoculadas a campo.

#### 3.4.3. Detección y cuantificación de aflatoxinas en granos de maíz

La detección y cuantificación de AFs en los granos de maíz se efectuó utilizando la metodología propuesta por AOAC (2000). La muestra fue molida (aproximadamente 3 kg), homogeneizada y cuarteada hasta la obtención de 25 g (3 repeticiones) de maíz molido, al cual se le añadió una solución de acetonitrilo: H<sub>2</sub>O (84:16, V/V) y se agitó durante 30 min en agitador orbital. Posteriormente se filtró el sobrenadante utilizando papel Whatman N°4, y 5 ml del extracto crudo fueron pasados a través de una columna de limpieza MycoSep®224 AflaZon (Laboratorios Romer, USA). Luego, 2 ml del extracto purificado fueron recuperados, se transfirieron a un vial color caramelo y se evaporaron a sequedad con nitrógeno gaseoso. La detección y cuantificación de las AFs se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta *performance* (HPLC), según la metodología propuesta por Horn y col. (1996). Cada extracto seco fue resuspendido en 400 µl de una mezcla de acetonitrilo: metanol: H<sub>2</sub>O (1:1:4, V/V/V) y la mitad de ese volumen (200 µl)

se derivatizó agregando 700 µl de una solución de ácido trifluoroacético: ácido acético glacial: H<sub>2</sub>O (20:10:70, V/V/V), a una temperatura de 65°C durante 8,5 min. La detección y cuantificación de las AFs se llevó a cabo inyectando 50 µl del extracto de cada muestra en el equipo de HPLC. Este sistema consistió en una bomba Hewlett Packard modelo 1100 (Hewlett Packard, Palo Alto, CA) conectada a un detector de fluorescencia Hewlett Packard modelo 1046A y a un módulo de datos Hewlett Packard Kayak XA (ChemStation Rev. A.06.01). La separación cromatográfica se realizó en una columna de fase reversa C18 de acero inoxidable (150 mm x 4,6 mm i.d., tamaño de partícula 5 µm; Luna-Phenomenex, Torrance, CA, USA) conectada a una pre-columna C18 de acero inoxidable (20 mm x 4,6 mm i.d., tamaño de partícula 5 µm, Luna-Phenomenex, Torrance, CA, USA). La fase móvil (acetonitrilo: metanol: H<sub>2</sub>O, 1:1:4, V/V/V) se pasó a un flujo de 1,5 ml/min. El límite de detección fue de 1 ng/g. Además, se analizó una solución estándar de AFB<sub>1</sub> pura (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y se construyó una curva de calibración (concentración de AFB<sub>1</sub> vs. área de los picos) a partir de soluciones testigos de esta AFB<sub>1</sub> de concentraciones en un rango de 5 – 100 ng/ml.

### 3.5. Análisis de cepas aisladas de ensayos a campo

#### 3.5.1. Evaluación de la capacidad aflatoxicogénica

Aquellas cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* aisladas tanto de suelo como de grano de maíz fueron evaluadas por HPLC respecto a su capacidad de producir AFB<sub>1</sub> siguiendo la metodología de Alaniz Zanon y col. (2013), Horn y col. (1996) y Horn y Dorner, (1999). De cada uno de los tratamientos se analizaron 10 cepas, seleccionadas al azar y provenientes de placas de DRBC diferentes, exceptuando aquellos tratamientos en donde se aisló un número inferior a 10, en los cuales se evaluó la capacidad toxicogénica de la totalidad de las cepas aisladas. A partir de cada cepa de *A. flavus* desarrollada en AEM, se realizaron suspensiones de esporas (10<sup>5</sup> esporas/ml) en agua peptonada 0,1%, que luego se utilizaron para inocular viales con 1 ml de caldo para producción de AFs a pH 5,9 ajustado con HCl. Los cultivos se incubaron a 28 ± 1°C durante 7 días en oscuridad. Una vez terminado el tiempo de incubación, se retiró y descartó el micelio. Al medio de cultivo restante en el vial se le agregó 1 ml de cloroformo. Se agitó 30 seg en vórtex, se recuperó la fase clorofórmica en un tubo Eppendorf y se evaporó hasta sequedad a temperatura ambiente.

### 3.5.2. Análisis de aflatoxinas por HPLC

Tanto los extractos obtenidos de las muestras de granos de maíz como aquéllos obtenidos a partir de cada una de las cepas de *A. flavus* fueron analizados por HPLC como se explica en el punto 4.4.3.

### 3.5.3. Análisis de Grupos de Compatibilidad Vegetativa

#### 3.5.3.1. Generación de mutantes de las cepas recuperadas

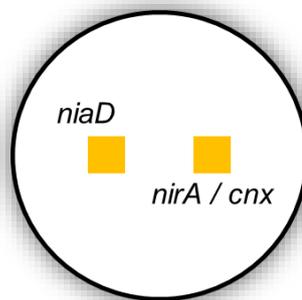
A partir de cepas de *A. flavus* en las que no se detectó producción de AFB<sub>1</sub>, aisladas de las muestras de suelo (pre-inoculación y al momento de la cosecha) y de las muestras de granos de maíz, como así también de las cepas AFCHG2 y ARG5/30, se generaron mutantes en agar Czapek – Clorato al 2,5 ó 3% a fin de determinar el porcentaje de cepas de *A. flavus* recuperadas correspondientes a los GCVs de las cepas potencialmente biocontroladoras aplicadas en los ensayos a campo. Para esto se realizaron suspensiones de esporas en agar semi-sólido a partir de las cepas desarrolladas en AEM. Con estas suspensiones se sembraron en 10 puntos y al menos por triplicado, placas de Petri con agar Czapek con la adición de clorato de potasio (Bayman y Cotty, 1991 b). Las placas se incubaron a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  y los márgenes de las colonias con crecimiento restringido fueron examinados periódicamente hasta detectar sectores de crecimiento rápido con escaso micelio, indicadores de una mutación. Los extremos de estas hifas de diferentes colonias fueron transferidos a placas con Agar MM que se incubaron a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 4 – 5 días y luego se conservaron a  $4^\circ\text{C}$  hasta su fenotipificación.

#### 3.5.3.2. Fenotipificación de las mutantes obtenidas

Las mutantes obtenidas se repicaron en medios de fenotipificación para determinar el tipo de mutación generada, de acuerdo a la metodología propuesta por Papa (1986). En dichos medios, el NaNO<sub>3</sub>, única fuente de nitrógeno del agar Czapek – Dox (control negativo), fue remplazado por NaNO<sub>2</sub>, hipoxantina o tartrato de amonio (control positivo). Las placas se incubaron en estufa a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 5 – 7 días. Los tipos de mutantes fueron: *niaD* (incapaz de utilizar nitrato), *nirA* (incapaz de utilizar nitrato y nitrito), y *cnx* (incapaz de utilizar nitrato e hipoxantina).

### 3.5.3.3. Ensayos de autocomplementación y de complementación

Para realizar los ensayos de autocomplementación y seleccionar un par de mutantes complementarias de cada cepa en estudio se emplearon 3 – 4 mutantes *nit* de cada una de las cepas: 2 *niaD* y 1 – 2 *nirA* y/o *cnx*, dependiendo de la cantidad y tipo de mutantes obtenidas. En una placa de Petri conteniendo agar MM se enfrentaron dos mutantes de una misma cepa (una *niaD* y una *nirA* o *cnx*) (**Fig. 14**). Las placas se incubaron a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  durante al menos 7 días y se controló el desarrollo diariamente.



**Figura 14.** Esquema de siembra de los ensayos de autocomplementación y complementación. La distancia entre la siembra de las mutantes fue de aproximadamente 15 mm.

Para aquellas cepas cuyas mutantes pre-seleccionadas no resultaron autocomplementarias, se repitió el ensayo de autocomplementación enfrentando nuevas mutantes. Una vez establecida la autocomplementación para dos mutantes de cada una de las cepas, este par de mutantes se enfrentó en agar MM a un par complementario de las cepas potencialmente biocontroladoras AFCHG2 y/o ARG5/30, del mismo modo descrito para los ensayos de autocomplementación. Estas placas se incubaron durante 7 – 15 días a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , y luego del periodo de incubación se identificó la compatibilidad / incompatibilidad de estas cepas según la presencia / ausencia, respectivamente, de una zona de crecimiento tipo salvaje donde los micelios de cada mutante entran en contacto. Es decir, se determinó la pertenencia o no a los GCVs de los que forman parte las dos cepas potencialmente biocontroladoras, de las cepas aisladas de los diferentes tratamientos del ensayo a campo de la localidad de Espinillos. Este análisis de GCVs se realizó únicamente para las cepas provenientes de este ensayo, ya que en el estudio realizado en la localidad de Achiras se presentaron diversos factores que afectaron negativamente el estudio, como será explicado en el apartado 4.5.

Finalmente, se calculó de manera independiente el porcentaje de cepas pertenecientes a los GCVs aplicados, provenientes de las muestras de suelo previo a la inoculación con los bioformulados, de las muestras de suelo recolectadas al momento de la cosecha, y de las muestras de granos de maíz.

### 3.6. Análisis estadísticos

Los datos correspondientes a las poblaciones fúngicas fueron transformados a logaritmo en base diez previo al análisis de varianza (ANOVA). Los tests de separación o comparación de medias utilizados fueron el test de LSD Fisher o el test de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Los datos de porcentajes de infección de granos de maíz de los distintos tratamientos con cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* se evaluaron mediante análisis de varianza, usando el test de Fisher como método de separación de medias ( $P < 0,05$ ) (InfoStat, 2010, Universidad Nacional de Córdoba) (Di Rienzo y col., 2018).

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---





## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Obtención de los bioformulados

Se obtuvieron 3 kg de cada uno de los bioformulados (simples y mixto) en los cuales se determinó el recuento de *A. flavus* por gramo de producto final (UFC/g). Cada bioformulado se analizó por triplicado y se calculó un promedio de los recuentos, los cuales se muestran en la **Tabla 1**. Tanto en los dos inóculos simples (AFCHG2 y ARG5/30) como en el inóculo mixto (AFCHG2 + ARG5/30), los recuentos fueron del orden de  $10^8$  UFC/g. En base al resultado obtenido fue posible realizar comparaciones confiables en las determinaciones de los distintos parámetros evaluados durante el desarrollo del trabajo.

**Tabla 1.** Valores promedio de los recuentos de *Aspergillus flavus* de cada inoculante.

Bioformulado	Recuento (UFC/g)
Inóculo simple (AFCHG2)	$2,15 \times 10^8$
Inóculo mixto (AFCHG2 + ARG5/30)	$3,25 \times 10^8$
Inóculo simple (ARG5/30)	$4,80 \times 10^8$

### 4.2. Recuento fúngico y aislamiento de *Aspergillus* sección *Flavi* en muestras de suelo

Como se mencionó en la metodología (apartado 3.3), se realizó un primer muestreo de suelo antes de la aplicación del bioformulado y un segundo muestreo al momento de la cosecha. Las muestras fueron analizadas de igual manera. Finalizado el periodo de incubación se observaron los resultados expresándolos UFC/g. La **Fig. 15** muestra una imagen del crecimiento fúngico luego de 7 días de incubación a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ .



**Figura 15.** Muestra de suelo sembrada en el medio de cultivo DRBC luego de 7 días de incubación a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ .

En la **Tabla 2** se muestran los recuentos fúngicos totales (promedios) de cada tratamiento en los distintos momentos de muestreo del ensayo realizado en el campo de Espinillos. Se observa que en las parcelas destinadas a la inoculación con el bioformulado simple a base de la cepa ARG5/30 (parcela E3) se obtuvo el mayor recuento fúngico total ( $6,59 \times 10^5$  UFC/g de suelo), seguido por las parcelas destinadas al tratamiento con el inoculante simple a base de la cepa AFCHG2 (parcela E1;  $4,32 \times 10^5$  UFC/g de suelo), y finalmente los controles (parcela EC;  $2,22 \times 10^5$  UFC/g de suelo) y las parcelas destinadas al tratamiento con el inóculo mixto a base de las cepas AFCHG2 + ARG5/30 (parcela E2;  $1,77 \times 10^5$  UFC/g de suelo). A partir del análisis de los resultados se observaron diferencias estadísticamente significativas entre todas las parcelas, excepto entre EC y E2 pre-inoculación. En todas las parcelas el recuento de hongos totales en las muestras de suelo fue del orden de  $10^5$  UFC/g. Si bien se esperaba que al momento de la cosecha el recuento aumentara en las parcelas tratadas debido a la aplicación exógena de cepas de *A. flavus*, se observó dicho incremento solamente en las parcelas tratadas con el inóculo simple a base de la cepa AFCHG2, con el inóculo mixto con AFCHG2 + ARG5/30 y en las parcelas control (37,57%, 71,59% y 10,12%, respectivamente) y disminuyó un 71,47% en el tratamiento con el inóculo simple a base de ARG5/30. Sin embargo, se observó que estos recuentos fueron del orden de  $10^5$  UFC/g, al igual que en el muestreo pre-inoculación. Comparando los recuentos fúngicos promedio al momento de la cosecha, se muestra que entre E1 y E2 no hubo diferencia estadísticamente significativa, como tampoco entre E3 y EC ( $P < 0,05$ ).

**Tabla 2.** Promedio del recuento fúngico total de las muestras de suelo pre-inoculación y al momento de la cosecha en el ensayo realizado en Espinillos.

Parcela	Bioformulados	Recuento promedio pre-inoculación (UFC/g)*	Recuento promedio al momento de la cosecha (UFC/g)*
E1	AFCHG2	4,32×10 <sup>5</sup> b	6,92×10 <sup>5</sup> b
E2	AFCHG2 + ARG5/30	1,77×10 <sup>5</sup> a	6,23×10 <sup>5</sup> b
E3	ARG5/30	6,59×10 <sup>5</sup> c	1,88×10 <sup>5</sup> a
EC	Sin inocular	2,22×10 <sup>5</sup> a	2,47×10 <sup>5</sup> a

\*Los valores expresados son el promedio de 6 sub-muestras con 2 repeticiones cada una.

EC: parcela control campo Espinillos.

Las letras distintas (a-d) indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) dentro de cada columna, según el test de Fisher.

Los datos de recuento de hongos totales en las muestras de suelo provenientes del campo de Achiras se presentan en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Promedio del recuento fúngico total de las muestras de suelo pre-inoculación y al momento de la cosecha en el ensayo realizado en Achiras.

Parcela	Bioformulados	Recuento promedio pre-inoculación (UFC/g)*	Recuento promedio al momento de la cosecha (UFC/g)*
A1	AFCHG2	4,01×10 <sup>5</sup> a	5,04×10 <sup>4</sup> a
A2	AFCHG2 + ARG5/30	3,78×10 <sup>5</sup> a	6,41×10 <sup>4</sup> a
A3	ARG5/30	3,55×10 <sup>5</sup> a	4,18×10 <sup>4</sup> a
AC	Sin inocular	3,99×10 <sup>5</sup> a	4,05×10 <sup>4</sup> a

\*Los valores expresados son el promedio de 6 sub-muestras con 2 repeticiones cada una.

AC: parcela control campo Achiras.

Las letras distintas (a-d) indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) dentro de cada columna, según el test de Fisher.

El recuento de hongos filamentosos totales en las muestras de suelo pre-inoculación, en el ensayo realizado en Achiras fue similar entre las cuatro parcelas destinadas a los distintos tratamientos, y los recuentos fueron del orden de 10<sup>5</sup> UFC/g de suelo. El mayor recuento fue el obtenido en las parcelas destinadas al tratamiento con el inóculo simple a base de la cepa AFCHG2 (parcela A1; 4,01×10<sup>5</sup> UFC/g de suelo), luego el de las parcelas control (parcela AC; 3,99×10<sup>5</sup> UFC/g de suelo), después el de las parcelas destinadas al tratamiento con el inóculo mixto con AFCHG2 + ARG5/30 (parcela A2; 3,78×10<sup>5</sup> UFC/g de suelo) y por último el de las parcelas destinadas al tratamiento con el inóculo simple a base de la cepa ARG5/30 (parcela A3; 3,55×10<sup>5</sup>

UFC/g de suelo). Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Los recuentos obtenidos en los tratamientos y en el control en el momento de la cosecha, fueron de un orden menor ( $10^4$  UFC/g de suelo) a los obtenidos en las muestras pre-inoculación y no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ellos. El recuento fúngico de las parcelas A1, A2, A3 y AC al momento de la cosecha disminuyó un 87,43%, 83,04%, 88,23% y 89,85%, respectivamente. Esta disminución puede ser consecuencia de los fenómenos meteorológicos que sufrió el cultivo en este campo (sequía, granizo y helada) y de la presencia de una maleza invasiva. Otro factor que podría haber generado tal situación es la posible existencia en el suelo de sustancias capaces de inhibir el desarrollo de distintos tipos de microorganismos. Algunos ejemplos de esto son la posible presencia de metales pesados como el cadmio (Cd) o de sustancias que provocan distintos grados de alcalinidad y acidez en los suelos agrícolas (Vig y col., 2003; Rousk y col., 2009). Dichos compuestos posiblemente se encontraban en el suelo pudiendo haber provenido de distintas fuentes: agroquímicos aplicados durante la campaña del maíz o bien residuos de agroquímicos de distinta naturaleza empleados durante el cultivo antecesor, metabolitos vegetales y/o fúngicos liberados como consecuencia de la interacción entre la planta de maíz y agentes causales de enfermedades, entre otros. Sin embargo, estos parámetros no fueron evaluados durante el desarrollo de este trabajo ya que estos no estaban contemplados entre los objetivos del mismo.

En ambos campos los recuentos fúngicos totales promedio antes de la aplicación de los bioformulados fueron del mismo orden ( $10^5$  UFC/g de suelo). No sucedió lo mismo al momento de la cosecha, ya que se observó que en Espinillos hubo mayor recuento fúngico total en todos los tratamientos y control en comparación con las muestras de suelo de las muestras del ensayo realizado en Achiras. Esta diferencia puede deberse a las condiciones meteorológicas a las que se enfrentó cada uno de los cultivos y a una posible variación en la composición original de los suelos. En estudios previos Barros y col. (2006 b) llevaron a cabo investigaciones en campos comerciales destinados a la siembra de maní en la región centro-Sur de la provincia de Córdoba, observando recuentos fúngicos totales del orden de  $10^4$  UFC/g, al igual que lo observado en el ensayo de Achiras. Actualmente una de las prácticas agrícolas convencionales que aporta grandes beneficios es la rotación de cultivos de maní, maíz, sorgo o trigo, dependiendo de la región agrícola (INTA, 2014). En otro trabajo desarrollado por Alaniz Zanon y col. (2016) se evaluó la densidad fúngica total en un campo de maní en Tartagal, provincia de Salta, durante los años 2014 y 2015, antes de la aplicación de los inoculantes y al momento de la cosecha. Tanto en 2014 como en 2015 se obtuvieron recuentos del orden de  $10^4$  UFC/g de suelo recolectado antes de la inoculación y al

momento de la cosecha. Estos resultados también coinciden con los obtenidos en el presente trabajo, a pesar de tratarse de un cultivo y una zona agroecológica diferente.

Además de evaluar los recuentos de hongos filamentosos totales, en cada una de estas muestras se analizó la abundancia de *Aspergillus* sección *Flavi*. En la **Tabla 4** se detallan estos resultados para las muestras de suelo de cada tratamiento y controles en los distintos momentos de muestreo, en ambos campos. Debido al escaso número de colonias de *Aspergillus* sección *Flavi* encontradas, los datos se expresan como número de colonias observadas y no como recuento expresado en UFC/g suelo.

**Tabla 4.** Abundancia de *Aspergillus* sección *Flavi* en suelo pre-inoculación y al momento de la cosecha en las muestras obtenidas de los ensayos realizados en Espinillos y Achiras.

Parcela	Bioformulados	Espinillos		Achiras	
		N° colonias A.s.F.* pre-inoculación	N° colonias A.s.F.* momento de la cosecha	N° colonias A.s.F.* pre-inoculación	N° colonias A.s.F.* momento de la cosecha
1	AFCHG2	2 a	235 c	2 a	15 b
2	AFCHG2 + ARG5/30	11 c	49 b	3 a	117 d
3	ARG5/30	5 b	36 a	2 a	95 c
C	Sin inocular	10 c	34 a	1 a	4 a

\*A.s.F.: *Aspergillus* sección *Flavi*.

C: parcela control.

Las letras distintas (a-d) indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) dentro de cada columna, según el test de Fisher.

En las muestras del ensayo realizado en Espinillos se observaron en total 28 colonias de *Aspergillus* sección *Flavi* previo a la aplicación de los bioformulados. De este total, la mayor proporción (39,29%) se halló en las parcelas destinadas al inoculante mixto a base de las cepas AFCHG2 + ARG5/30 (parcela 2), un 35,71% fue encontrado en las parcelas control, un 17,86%, en las parcelas destinadas a ser tratadas con el inoculante simple a base de ARG5/30 (parcela 3) y el 7,14% restante, en las parcelas destinadas al inoculante simple a base de la cepa AFCHG2 (parcela 1), observando diferencias estadísticamente significativas entre las parcelas destinadas a ser tratadas con los diferentes bioformulados. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las muestras de la parcela 2 y las de la parcela control. Como ya se mencionó, previo a la inoculación, las parcelas destinadas al inóculo simple formulado con la cepa ARG5/30 (tratamiento 3) mostraron en promedio los recuentos fúngicos totales más altos,  $6,59 \times 10^5$  UFC/g. Estos datos no coinciden con la distribución de *Aspergillus* sección *Flavi* en este campo previo a la realización del ensayo, donde las muestras de las parcelas con mayor abundancia fueron aquéllas destinadas al

tratamiento 2 (inóculo mixto) y al control. Por lo tanto, considerando los resultados de la abundancia de *Aspergillus* sección *Flavi* en las muestras de las distintas parcelas previo a la aplicación de los tratamientos, se observa que la distribución de las especies fúngicas, al menos las pertenecientes a *Aspergillus* sección *Flavi* no era homogénea en el campo en el que se llevó a cabo el ensayo, y que un recuento fúngico total no necesariamente refleja la abundancia de *Aspergillus* sección *Flavi*.

Por otra parte, en las muestras de suelo del ensayo realizado en Espinillos recolectadas al momento de la cosecha se encontró, tal como se esperaba, mayor cantidad de colonias de *Aspergillus* sección *Flavi* respecto al momento inicial (total de 354 colonias). El 66,38% de estas colonias se observó en las parcelas tratadas con el inóculo simple a base de AFCHG2 (tratamiento 1), el 13,84%, en las parcelas donde se aplicó el inóculo mixto a base de AFCHG2 + ARG5/30 (tratamiento 2), el 10,17%, en las parcelas tratadas con el inóculo simple a base de ARG5/30 (tratamiento 3) y el 9,60% restante, en las parcelas sin tratar. Comparando los resultados obtenidos en el tratamiento 3 con aquéllos del control, se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas respecto a la abundancia de *Aspergillus* sección *Flavi*. No obstante, sí se observan diferencias significativas entre las parcelas tratadas con los distintos bioformulados.

Como se detalla en la **Tabla 2**, al momento de la cosecha, las parcelas en las que se aplicó el inóculo simple a base de la cepa AFCHG2 (tratamiento 1) mostraron en promedio los recuentos fúngicos totales más altos,  $6,92 \times 10^5$  UFC/g, seguidos de los obtenidos en las parcelas tratadas con el inóculo mixto (tratamiento 2). Estos datos coinciden con los de abundancia de *Aspergillus* sección *Flavi*, ya que en estos dos tratamientos fue donde se obtuvieron las mayores proporciones de este género fúngico.

No obstante, la escasa abundancia de cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* encontrada en las muestras de suelo en este ensayo no implica que al momento de la cosecha o posterior a éste, el nivel de contaminación con AFs en grano sea bajo, ya que, la incidencia de AFs se debe no sólo a la presencia de especies fúngicas toxicogénicas sino también a que las condiciones meteorológicas sean propicias para la síntesis de estas micotoxinas (Cole y col., 1995). Además, puede ocurrir que este bajo número de cepas presentes en el ecosistema sean productoras de altos niveles de AFs, por lo que, sumado a condiciones predisponentes, podría existir una elevada contaminación (Moore y col., 2011).

Comparando ambos momentos de muestreo en el ensayo a campo llevado a cabo en Espinillos, se muestra que el número de colonias encontradas de *Aspergillus* sección *Flavi* fue superior en todos los tratamientos y en el control al momento de la cosecha que en el muestreo previo a la aplicación de los bioformulados. El mayor aumento

ocurrió en las parcelas inoculadas con el bioformulado simple a base de la cepa AFCHG2 (tratamiento 1; 99,15%), seguido por las parcelas tratadas con el inoculante simple constituido por ARG5/30 (tratamiento 3; 86,11%), las parcelas inoculadas con el bioformulado mixto (tratamiento 2; 77,57%) y por último el control sin tratar (70,59%). Este aumento detectado en la cantidad de cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* aisladas de muestras de suelo era esperable, principalmente en las parcelas tratadas, ya que estos tratamientos consistieron en la incorporación al suelo de cepas de *A. flavus* exógenas. En las muestras de suelo pre-inoculación las parcelas destinadas al bioformulado mixto a base de AFCHG2 + ARG5/30 (tratamiento 2), mostraron entre un 9,09 – 81,82% más de cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* que las demás parcelas; al momento de la cosecha esta diferencia no se mantuvo. En este último momento, las parcelas tratadas con el inoculante simple a base de AFCHG2 (tratamiento 1) mostraron entre un 79,15 – 85,53% más de cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* que las demás parcelas.

En el campo situado en Achiras, la cantidad de cepas pertenecientes a *Aspergillus* sección *Flavi* previo a la aplicación del bioformulado fue de sólo 8 aislamientos, tal como se muestra en la **Tabla 4**. Debido a que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las diversas parcelas, se puede determinar que la distribución de cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* fue homogénea en este campo, al igual que los recuentos promedio de hongos totales detallados en la **Tabla 3**.

Como era de esperar, al momento de la cosecha, en el campo cercano a la localidad de Achiras, se aisló mayor cantidad de cepas de *Aspergillus* sección *Flavi*, con un total de 231 aislamientos. En las parcelas tratadas con el inoculante mixto a base de las cepas AFCHG2 + ARG5/30 (tratamiento 2) se halló un 50,67% de cepas de esta sección, el 41,13% se aisló de las parcelas en donde se aplicó el inoculante simple a base de la cepa ARG5/30 (tratamiento 3), el 6,49%, de las parcelas tratadas con el inoculante simple con AFCHG2 (tratamiento 1) y el 1,73% restante se aisló de las parcelas control. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre todas las parcelas evaluadas.

En todos los tratamientos y en el control al momento de la cosecha en el campo de Achiras hubo un aumento en el número de cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* aisladas, con respecto al muestreo previo a la aplicación del bioformulado. En las parcelas inoculadas con el bioformulado simple a base de ARG5/30 (tratamiento 3) se encontró un 97,89% más de cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* que al momento pre-inoculación, en las parcelas tratadas con el inoculante mixto a base de AFCHG2 + ARG5/30 (tratamiento 2), un 97,44% más, en las parcelas inoculadas con el bioformulado simple a base de AFCHG2 (tratamiento 1), un 86,67% más, y en el control,

un 75% más. Independientemente del análisis estadístico, se observa que las parcelas destinadas al inóculo mixto (tratamiento 2) mostraron mayor abundancia de *Aspergillus* sección *Flavi* tanto en el muestreo previo a la aplicación de los tratamientos, como al momento de la cosecha.

Como se observa en la **Tabla 4**, la abundancia general de *Aspergillus* sección *Flavi* tanto en suelo pre-inoculación como al momento de la cosecha es más elevado en el campo de Espinillos que en Achiras. Antes de la aplicación del bioformulado, en el campo cercano a la localidad de Espinillos se aisló un 71,43% más de cepas que en el campo de Achiras. En el segundo muestreo, al momento de la cosecha, esta diferencia disminuyó a 34,75%. En el muestreo realizado al momento de la cosecha se observó que en Espinillos se aisló mayor cantidad de cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* en las parcelas inoculadas con el bioformulado simple a base de AFCHG2 (tratamiento 1), y en Achiras, como se mencionó anteriormente, la mayor proporción se aisló de las parcelas tratadas con el inoculante mixto a base de AFCHG2 + ARG5/30 (tratamiento 2). Estos resultados demuestran que en el campo de Espinillos el inoculante con la cepa AFCHG2 colonizó mejor el suelo que los demás tratamientos. Si bien en el campo de Achiras el inoculante mixto presentó mayor colonización del suelo, este bioformulado está compuesto en un 50% de la cepa AFCHG2, por lo que podría inferirse que esta capacidad de colonizar el suelo se debió a la presencia de esta cepa potencialmente biocontroladora.

En un estudio realizado en maní durante la campaña 2011, en dos campos situados en la provincia de Córdoba (Los Molles y Las Acequias), el recuento de hongos pertenecientes a *Aspergillus* sección *Flavi* previo a la inoculación de los bioformulados, mostró valores en un rango de 500 y 1400 UFC/g. En estos ensayos, al momento de la cosecha, la abundancia de *Aspergillus* sección *Flavi* en las muestras de suelo fue significativamente mayor en las parcelas tratadas respecto de las parcelas control (Alaniz Zanon, 2016). Si bien la abundancia de *Aspergillus* sección *Flavi* determinada en el presente trabajo fue menor al informado por Alaniz Zanon (2016), en ambos casos se observa que la densidad de *Aspergillus* sección *Flavi* fue mayor al momento de la cosecha que al principio del ensayo.

#### **4.3. Evaluación del porcentaje de infección de los granos de maíz con *Aspergillus* sección *Flavi* y aislamiento de cepas**

De los ensayos realizados en las dos localidades (Espinillos y Achiras) se analizaron 200 granos de maíz cosechado de cada una de las parcelas de cada

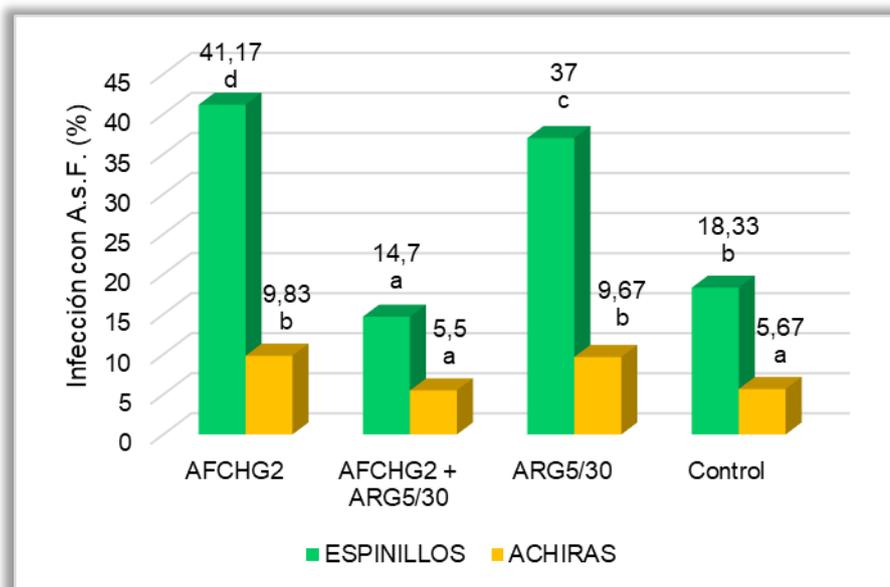
tratamiento, y se evaluó el porcentaje de infección con *Aspergillus* sección *Flavi* (Fig. 16).



**Figura 16.** Granos de maíz desinfectados superficialmente y sembrados en el medio de cultivo DRBC, incubado durante 7 días a  $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

En el **Gráfico 1**, se muestran los porcentajes de infección correspondientes a ambos ensayos.

**Gráfico 1.** Porcentajes de infección de los granos de maíz con *Aspergillus* sección *Flavi* en las muestras obtenidas de los ensayos en Espinillos y Achiras.



A.s.F: *Aspergillus* sección *Flavi*.

Las parcelas tratadas con AFCHG2, AFCHG2 + ARG5/30, ARG5/30 y la parcela control sin inocular, corresponden a los tratamientos 1, 2, 3 y C, respectivamente. Las letras distintas (a-d) indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) en cada uno de los ensayos, según el test de Fisher.

En cuanto al análisis de la población de *Aspergillus* sección *Flavi* recuperada de los granos de maíz a cosecha, los resultados del ensayo realizado en Espinillos no fueron los que se esperaban. Se observaron diferencias significativas en la colonización de los granos entre todos los tratamientos. En las parcelas inoculadas con el bioformulado mixto a base de AFCHG2 + ARG5/30 (tratamiento 2) se obtuvo menor porcentaje de infección con *Aspergillus* sección *Flavi* que en las parcelas control sin aplicación de inóculo exógeno. Una posible explicación de este resultado podría atribuirse a alguna falla en el momento de la aplicación del inóculo, por ejemplo, efecto de factores externos como ráfagas de viento, humedad relativa del ambiente, etc. Las parcelas inoculadas con los bioformulados simples presentaron una proporción significativamente mayor de granos infectados con *Aspergillus* sección *Flavi*, respecto de la parcela control, siendo a su vez los granos de las parcelas tratadas con el inoculante simple a base de AFCHG2 (tratamiento 1), los de mayor porcentaje de infección (41,17%), como se muestra en el **Gráfico 1**.

Los granos de maíz de las parcelas tratadas con el inoculante simple a base de la cepa AFCHG2 (tratamiento 1) del campo de Achiras presentaron un 9,83% de infección con *Aspergillus* sección *Flavi*, seguido por los granos de las parcelas inoculadas con el bioformulado simple a base de la cepa ARG5/30 (tratamiento 3) que exhibieron un 9,67% de infección. El porcentaje de infección de los granos de maíz de las parcelas inoculadas con el inoculante mixto a base de AFCHG2 + ARG5/30 (tratamiento 2; 5,5%) fue menor al de los granos de las parcelas control (**Gráfico 1**). En este campo no hubo diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento 1 y el 3, y entre el 2 y el control, pero sí hubo diferencias significativas entre las primeras dos parcelas mencionadas (1 y 3) y las demás (2 y control).

Los porcentajes de infección de los granos de maíz de cada uno de los tratamientos y del control con *Aspergillus* sección *Flavi* en el campo de Achiras fueron menores a los obtenidos en los respectivos tratamientos realizados en el campo cercano a la localidad de Espinillos. En otras palabras, en lo referido a los bioformulados aplicados a campo, en el ensayo llevado a cabo en Espinillos se logró un mayor porcentaje de infección con las cepas de los inoculantes tanto simples como mixto. En ambos campos las muestras de granos correspondientes a las parcelas tratadas con los inóculos mixtos a base de AFCHG2 + ARG5/30 (tratamiento 2) presentaron porcentajes de infección inferiores a los determinados para cada uno de los tratamientos a base de las cepas que los constituían, aplicados de manera independiente. Los resultados demuestran entonces, que las cepas de *A. flavus* evaluadas interactúan entre sí en el ecosistema favoreciendo o dificultando la invasión de los granos de maíz, dependiendo de cada caso, y que evidentemente, las formulaciones simples logran una infección de

los granos mayor que la formulación mixta, por lo que hasta el momento, serían mejores candidatos como agentes de control biológico.

En un estudio realizado también en Espinillos pero en cultivo de maní en la campaña 2013/2014, el porcentaje de infección de granos con *Aspergillus* sección *Flavi* en la parcela no tratada fue de 6,75%, menor al obtenido en el presente trabajo (18,33%). En las parcelas tratadas con la misma tasa de inóculo que el aplicado en el presente trabajo para la cepa AFCHG2, el porcentaje de infección de granos con *Aspergillus* sección *Flavi* fue de 8,66%, mientras que en el presente trabajo nuevamente se obtuvo un valor mayor, de 41,17% (Alaniz Zanon, 2016).

Dorner y col. (1999) propusieron que el uso de inoculantes a base de una cepa no aflatoxicogénica aplicados en el suelo podría proporcionar un mejor control biológico en cultivos con fruto hipógeo como el maní, debido a que en este caso el suelo cumple un rol fundamental como fuente de inóculo para la infección fúngica y producción de AFs. Por el contrario, en el cultivo como el maíz la fuente de inóculo principal es el aire. Sin embargo, los resultados obtenidos demuestran que de las cepas de *A. flavus* no toxicogénicas en estudio son capaces de alcanzar la infección de los granos de maíz, por lo que el suelo también constituye una fuente de inóculo importante de *A. flavus* para cultivos de fruto aéreo como el maíz. Por lo tanto, la aplicación de un bioformulado a base de cepas no toxicogénicas en suelos sería una estrategia favorable para reducir la población de *A. flavus* toxicogénicos en granos de maíz.

#### 4.4. Evaluación de la capacidad aflatoxicogénica de las cepas de *Aspergillus flavus* aisladas de los ensayos a campo

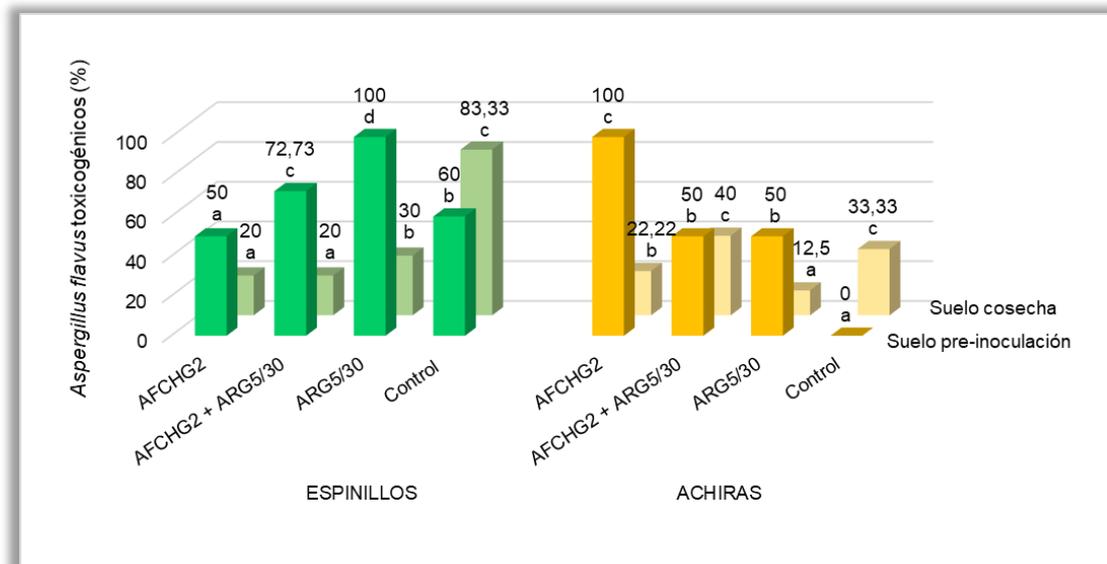
Aquellas cepas identificadas como *Aspergillus flavus* (**Fig. 17**) aisladas tanto de suelo como de granos de maíz, fueron evaluadas por HPLC para determinar su capacidad de producir AFs.



Figura 17. Cepas de *Aspergillus flavus* en medio MEA.

Los resultados obtenidos de la capacidad aflatoxicogénica de las cepas aisladas de muestras de suelo de los ensayos de Espinillos y de Achiras se representan en el **Gráfico 2**.

**Gráfico 2.** Capacidad aflatoxicogénica de las cepas de *Aspergillus flavus* aisladas de las muestras de suelo pre-inoculación y al momento de la cosecha de los ensayos realizados en los campos de Espinillos y de Achiras.



Las parcelas tratadas con AFCHG2, AFCHG2 + ARG5/30, ARG5/30 y la parcela control sin inocular, corresponden a los tratamientos 1, 2, 3 y C, respectivamente.

Las letras distintas (a-d) indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) en cada uno de los ensayos, según el test de Fisher.

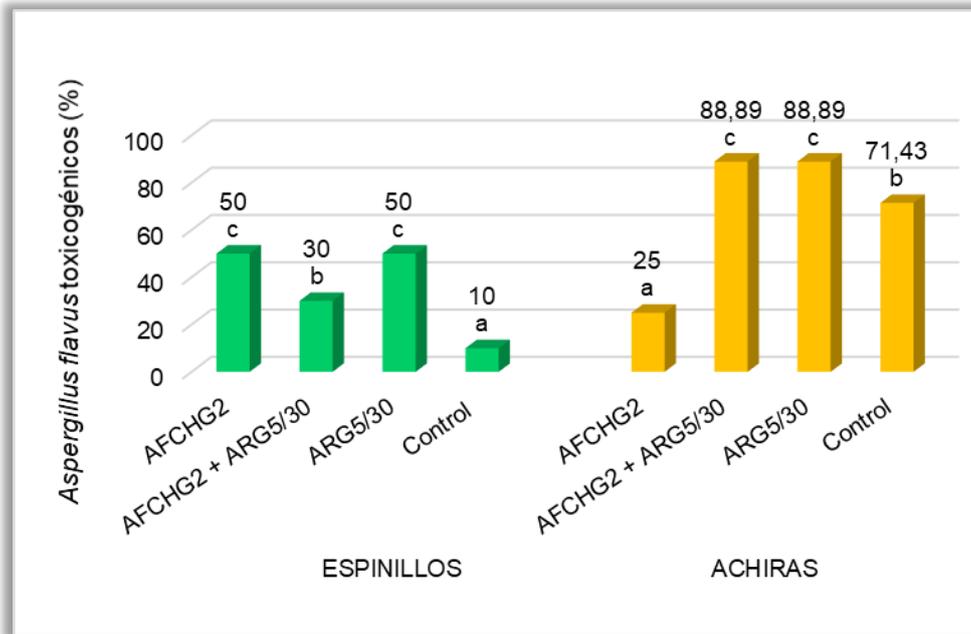
Respecto a la aflatoxicogenicidad de la población de *A. flavus* aislada de suelo del campo de Espinillos antes de la aplicación de los bioformulados, se observó en todas las parcelas, un alto porcentaje de cepas productoras de AFs. Los porcentajes de cepas

aflatoxicogénicas encontradas en cada una de las parcelas oscilaron entre 50 y 100% (**Gráfico 2**). Debido a la baja frecuencia de aislamiento de *Aspergillus* sección *Flavi* a partir de las muestras de suelo pre-inoculación (**Tabla 4**), durante el desarrollo de la experiencia se presentó la dificultad de aislar un número de cepas lo suficientemente representativo para determinar la proporción de individuos aflatoxicogénicos en el campo. Sin embargo, el número de datos obtenidos se consideran adecuados para un *screening* general. La recuperación de cepas productoras de AFs fue significativamente diferente en todas las parcelas, encontrándose el porcentaje más bajo en aquella destinada a la aplicación del tratamiento con la cepa AFCHG2 (tratamiento 1) y el más alto en la parcela destinada al tratamiento con el inoculante a base de la cepa ARG5/30 (tratamiento 3).

Al momento de la cosecha en las muestras del ensayo realizado en Espinillos (**Gráfico 2**) se observa que la recuperación de cepas aflatoxicogénicas aisladas de suelo disminuyó en todas las parcelas inoculadas respecto al momento previo a la inoculación. En las parcelas tratadas con el inoculante simple a base de la cepa AFCHG2 (tratamiento 1), las inoculadas con el bioformulado mixto a base de AFCHG2 + ARG5/30 (tratamiento 2), y las tratadas con el inoculante simple a base de ARG5/30 (tratamiento 3), los porcentajes de cepas productoras de AFs disminuyeron un 60, 72,5 y 70%, respectivamente, en comparación con los resultados obtenidos del muestreo pre-inoculación. El porcentaje de cepas aflatoxicogénicas en las parcelas control al momento de la cosecha fue superior a los demás porcentajes de todas las parcelas tratadas. Además se observó un aumento del 28% en la recuperación de cepas toxicogénicas en la parcela control al momento de la cosecha respecto al suelo evaluado para esta misma parcela al inicio del ensayo. A partir de estos resultados, se infiere que las cepas potencialmente biocontroladoras, utilizadas en las formulaciones de los inoculantes, fueron capaces de competir con las cepas de *A. flavus* nativas y colonizar el suelo, ganando nutrientes esenciales y el sitio de infección, y desfavoreciendo el desarrollo de las cepas toxicogénicas nativas.

Los resultados obtenidos de la capacidad aflatoxicogénica de las cepas de *A. flavus* aisladas de granos de maíz de los ensayos realizados en los campos de Espinillos y de Achiras, se representan en el **Gráfico 3**.

**Gráfico 3.** Capacidad aflatoxicogénica de las cepas de *Aspergillus flavus* aisladas de las muestras de grano de los ensayos realizados en los campos de Espinillos y de Achiras.



Las parcelas tratadas con AFCHG2, AFCHG2 + ARG5/30, ARG5/30 y la parcela control sin inocular, corresponden a los tratamientos 1, 2, 3 y C, respectivamente. Las letras distintas (a-d) indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) en cada uno de los ensayos, según el test de Fisher.

Respecto a las muestras de los granos de maíz obtenidos en el ensayo de Espinillos provenientes del control sin inocular mostraron un porcentaje de cepas aflatoxicogénicas significativamente menor (10%) que en aquellas muestras de los demás tratamientos (30 – 50%) (**Gráfico 3**). La mayor recuperación de cepas de *A. flavus* productoras de AFs se observó en los granos correspondientes a los tratamientos con los inóculos simples (tratamiento 1 y 3, 50%). El bioformulado mixto a base de las cepas AFCHG2 + ARG5/30 (tratamiento 2) mostró un 30% de cepas productoras de AFs.

Comparando los niveles de cepas toxicogénicas obtenidos al comienzo del ensayo (muestreo pre-inoculación) en suelo y los niveles de cepas toxicogénicas en granos (**Gráfico 2 y 3**), al final del ensayo de Espinillos, se observa que en las parcelas tratadas con el inóculo simple a base de la cepa ARG5/30 (tratamiento 3) y las tratadas con el inóculo mixto (tratamiento 2), este porcentaje disminuye un 50 y 58,75%, respectivamente, mientras que en el tratamiento con el inóculo simple a base de la cepa AFCHG2 (tratamiento 1) el porcentaje de cepas aflatoxicogénicas al inicio y al final del ensayo se mantuvo igual. Esta disminución del porcentaje de infección con cepas toxicogénicas en los tratamientos con el inóculo mixto AFCHG2 + ARG5/30 y con el inóculo simple ARG5/30 podría deberse a que no todas las cepas aflatoxicogénicas aisladas en el suelo pre-inoculación tienen la capacidad de infectar los granos de maíz.

Una posible causa de esto es el efecto biocontrolador de estos formulados, es decir que las cepas aplicadas en los bioformulados compiten con las cepas nativas toxicogénicas impidiéndoles infectar los granos.

Respecto a las muestras de suelo del campo de Achiras en el momento previo a la aplicación de los bioformulados, no se observa una distribución homogénea de cepas aflatoxicogénicas entre todas las parcelas (**Gráfico 2**). En este momento de muestreo, en las parcelas destinadas al tratamiento con el inóculo simple AFCHG2 (tratamiento 1) se encontró que el 100% de las cepas de *A. flavus* aisladas fueron productoras de AFs, en las parcelas destinadas al inóculo mixto (tratamiento 2) y en aquellas destinadas al inóculo simple a base de ARG5/30 (tratamiento 3) se encontró que el 50% de las cepas aisladas e identificadas como *A. flavus* fueron productoras de AFs. En la parcela control no se recuperaron cepas aflatoxicogénicas. Al momento de la cosecha, en las muestras de suelo, se observó un desplazamiento de las cepas toxicogénicas en aquellas parcelas inoculadas. En las parcelas tratadas con el inoculante simple a base de la cepa AFCHG2 (tratamiento 1) el porcentaje se redujo un 77,78%, en las parcelas inoculadas con el bioformulado simple a base de la cepa ARG5/30 (tratamiento 3) el porcentaje se redujo un 75% y en las parcelas tratadas con el inoculante mixto a base de las cepas AFCHG2 + ARG5/30 (tratamiento 2) solamente se redujo un 20%. A su vez, los porcentajes de cepas toxicogénicas obtenidos en las parcelas inoculadas con los bioformulados simples (**Gráfico 2**), fueron menores al encontrado en la parcela control. Por el contrario, la parcela inoculada con el bioformulado mixto mostró un porcentaje de cepas aflatoxicogénicas mayor al observado en el control. Esto puede atribuirse a que en estas dos parcelas la distribución de cepas toxicogénicas al inicio del ensayo era desigual. Sin embargo, considerando los datos obtenidos al momento del primer muestreo para la aplicación del bioformulado mixto y para la parcela control, los resultados son razonables ya que en el primer caso, el porcentaje de cepas toxicogénicas disminuye posiblemente por efecto de las cepas potencialmente biocontroladoras. En el control se observa un incremento debido tal vez a alguna fuente de inóculo del propio ecosistema, que logró colonizar el suelo sin la presencia de una cepa biocontroladora como competidora. El hecho de que existan diferencias significativas en el porcentaje de cepas toxicogénicas aisladas de suelo al momento de la cosecha podría deberse, por un lado a que la carga de cepas toxicogénicas inicial era diferente entre las parcelas, y por otro lado, al comportamiento diferencial de cada una de las cepas no toxicogénicas evaluadas de manera independiente o combinadas en el inóculo mixto. Cuando las cepas potencialmente biocontroladoras se aplican juntas (inoculante mixto), no tienen la misma capacidad para colonizar el suelo y/o infectar granos, y competir con las cepas de *A. flavus* toxicogénicas nativas.

En cuanto al análisis de los granos de maíz del campo de Achiras se observa que a pesar de que hubo un bajo porcentaje de infección con *Aspergillus* sección *Flavi* (**Gráfico 1**) en todos los tratamientos e incluso en las parcelas control, los porcentajes de cepas aflatoxicogénicas fueron altos, excepto en las parcelas tratadas con el inóculo simple a base de AFCHG2 (tratamiento 1), que presentó un 25% de cepas aflatoxicogénicas. Del total de las cepas de *A. flavus* aisladas de granos de las parcelas tratadas con el inóculo simple a base de ARG5/30 (tratamiento 3) y de las parcelas tratadas con el inóculo mixto a base de AFCHG2 + ARG5/30 (tratamiento 2) un 88,89% fueron aflatoxicogénicas, en cada caso. Los granos de las parcelas control presentaron un 71,43% de cepas aflatoxicogénicas (**Gráfico 3**). No era de esperar que en los granos en los que se aplicó una o dos cepas no toxicogénicas potencialmente biocontroladoras (tratamientos 2 y 3), el porcentaje de aislamiento de cepas toxicogénicas fuese mayor que en el control. Sin embargo, este resultado puede asociarse a la carga inicial de inóculo de cepas toxicogénicas en el suelo. Por otra parte, comparando los tres tratamientos ensayados, se observa que la aplicación de la cepa AFCHG2 de manera individual (tratamiento 1) mostró granos infectados con un nivel de cepas productoras de AFs significativamente menor al observado para el control, a pesar de que el porcentaje de cepas toxicogénicas aisladas de suelo inicialmente era elevado. Por lo tanto, se podría inferir que la cepa AFCHG2 es capaz entonces, de colonizar el suelo, competir con cepas toxicogénicas nativas y lograr infectar granos de maíz, impidiendo que cepas productoras de AFs infecten antes este sustrato. En otras palabras, hasta esta instancia, el bioformulado en base a la cepa AFCHG2 sería el mejor candidato como agente de control biológico para el control de AFs en cultivo de maíz.

En términos generales, en ambos campos al momento de la cosecha, el porcentaje de cepas de *A. flavus* aflatoxicogénicas aisladas de suelo de las parcelas tratadas fueron menores a los porcentajes de cepas de *A. flavus* productoras de AFs encontradas en esas mismas parcelas al momento previo a la aplicación de los bioformulados. Además, el porcentaje de cepas aflatoxicogénicas en suelo de los controles aumentó en el momento de la cosecha, respecto al muestreo de suelo inicial en ambos ensayos. Una diferencia observada entre ambos campos al momento de la cosecha fue que en el ensayo de Espinillos, la parcela control (sin inocular) presentó un porcentaje significativamente mayor de cepas toxicogénicas en comparación con las parcelas tratadas. En el ensayo de Achiras, en las muestras de suelo al momento de la cosecha, la parcela control presentó un porcentaje significativamente mayor de cepas productoras de AFs que las parcelas inoculadas con ambas cepas potencialmente biocontroladoras de manera independiente (tratamiento 1 y 3), pero sin diferencias significativas respecto a la parcela inoculada con el bioformulado mixto (tratamiento 2).

En cuanto al porcentaje de cepas de *A. flavus* productoras de AFs en granos de maíz, se observa que el comportamiento de las cepas atoxicogénicas evaluadas no fue el mismo en ambos campos ensayados. Los resultados obtenidos podrían atribuirse a la gran influencia de los distintos factores meteorológicos o bien de otras variables que no son posibles de controlar durante la realización de un ensayo a campo. Cabe destacar que, si bien ambos campos están situados en la misma provincia de Córdoba, las condiciones climáticas varían mucho de una región a otra.

Respecto a los niveles de producción de AFs de las cepas de *A. flavus* aisladas de las muestras de suelo al inicio de estos ensayos, en Espinillos los niveles promedio fueron: 3,9 ng/ml para la parcela destinada al bioformulado a base de la cepa AFCHG2, 886,23 ng/ml para la parcela destinada a la aplicación del inóculo mixto, 535,18 ng/ml en la parcela destinada al tratamiento con el inóculo simple a base de la cepa ARG5/30, y 42,92 ng/ml para las parcelas control. Al momento de la cosecha, en las muestras de suelo del campo de Espinillos estos valores fueron los siguientes: en las parcelas tratadas con el inoculante simple a base de la cepa potencialmente biocontroladora AFCHG2, el promedio de concentración de AFs de las cepas aflatoxicogénicas encontrado fue de 3,56 ng/ml; en aquéllas tratadas con el bioformulado mixto a base de las cepas AFCHG2 + ARG5/30, de 2,73 ng/ml; en aquéllas inoculadas con el inóculo simple a base de la cepa ARG5/30, de 2,48 ng/ml; y por último el de las cepas aisladas de las parcelas control fue de 267,83 ng/ml. En las muestras de granos de maíz de Espinillos las cepas aflatoxicogénicas aisladas de las parcelas inoculadas con el bioformulado simple AFCHG2 tuvieron la capacidad de producir AFs a una concentración promedio de 64,85 ng/ml, las cepas de *A. flavus* aisladas de las parcelas inoculadas con el bioformulado mixto produjeron AFs a un nivel promedio de 2048,22 ng/ml, las tratadas con el inoculante simple ARG5/30 tuvieron la capacidad de producir AFs a una concentración promedio de 5019,59 ng/ml, mientras que en las parcelas control la producción media fue de 3304,89 ng/ml.

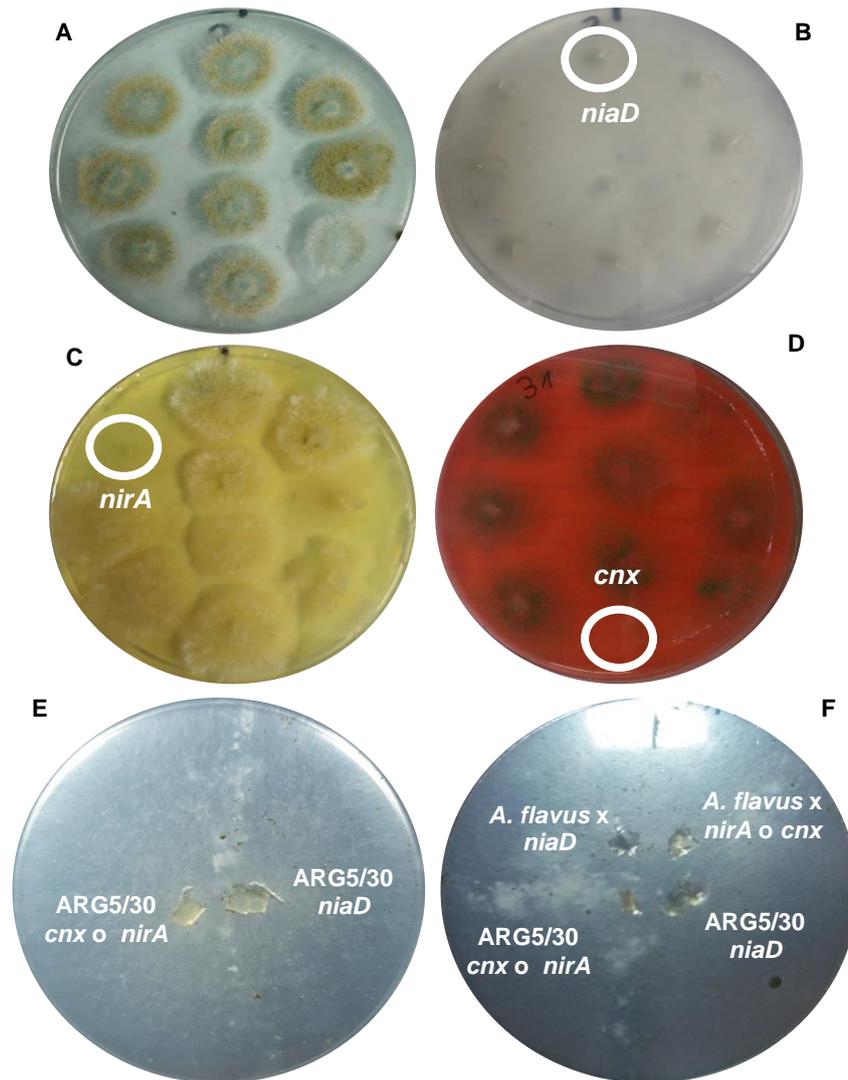
Las cepas de *A. flavus* aflatoxicogénicas aisladas de suelo pre-inoculación del campo de Achiras, produjeron menor cantidad de AFs que las aisladas en el mismo momento en las muestras del campo de Espinillos. En las parcelas destinadas al tratamiento con el inóculo simple a base de la cepa AFCHG2 las cepas aflatoxicogénicas produjeron en promedio 26,98 ng/ml de AFs; aquéllas aisladas en las parcelas destinadas al inóculo mixto a base de AFCHG2 + ARG5/30 produjeron 10,01 ng/ml de AFs; las aisladas de las parcelas destinadas al tratamiento con el inóculo simple a base de ARG5/30 produjeron en promedio 3,30 ng/ml. En este análisis no se encontraron cepas aflatoxicogénicas en la parcela control, como se indicó anteriormente en el **Gráfico 2**. Al momento de la cosecha, respecto a los niveles de producción de AFs de

las cepas de *A. flavus* aisladas de las muestras de suelo del campo de Achiras, los niveles promedio fueron: 2,02 ng/ml para la parcela destinada al bioformulado a base de la cepa AFCHG2, 1,64 ng/ml para la parcela destinada a la aplicación del inóculo mixto, 3405,45 ng/ml en la parcela destinada al tratamiento con el inóculo simple a base de la cepa ARG5/30, y 2269,53 ng/ml para las parcelas control. Respecto a las cepas aflatoxicogénicas aisladas de granos en el ensayo de Achiras, las cepas de *A. flavus* aisladas de la parcela tratada con el inóculo simple a base de la cepa AFCHG2 produjeron una concentración promedio de AFs de 10,34 ng/ml, las aisladas en las parcelas tratadas con el bioformulado mixto, de 920,26 ng/ml, las aisladas de las parcelas inoculadas con el bioformulado simple ARG5/30, de 687,98 ng/ml, y las cepas aisladas de granos de las parcelas control, produjeron una concentración de AFs de 50,07 ng/ml.

#### 4.5. Análisis de Grupos de Compatibilidad Vegetativa

El segundo estudio de monitoreo de las cepas potencialmente biocontroladoras aplicadas en los ensayos a campo fue el análisis de grupos de compatibilidad vegetativa (GCVs). Debido a la magnitud de este ensayo, a los resultados anteriores y a que las condiciones meteorológicas y del cultivo en Achiras no fueron las habituales de la zona respecto a caída de granizo y heladas, e incluso la presencia de malezas poco frecuentes, se seleccionó el ensayo de Espinillos como único campo a evaluar en esta instancia.

Las cepas AFCHG2 y ARG5/30 pertenecen a un mismo GCV que incluye únicamente cepas no toxicogénicas (Barros y col., 2006 a). Todas las cepas de *A. flavus* evaluadas en este análisis (33 cepas) presentaron colonias con las características típicas de “sectoreo” alrededor del punto de siembra en la placa de Petri con agar Czapek con la adición de clorato de potasio, aproximadamente entre los 7 y los 12 días de incubación. Se logró generar al menos dos o tres mutantes *nit* autocomplementarias solamente de 21 cepas, ya que las demás cepas sólo generaron mutantes *niaD*, incluso bajo concentraciones diferentes de clorato de potasio. La **Fig. 18** muestra un ejemplo de la fenotipificación de las mutantes obtenidas (**A – D**), la selección de *testers* para ser utilizados en los cruzamientos con mutantes de otras cepas (**E**), y dichos cruzamientos entre mutantes obtenidas a partir de diferentes cepas (**F**). En esta misma figura (parte **E**), se observan dos mutantes de ARG5/30 que autocomplementan, por lo que fueron empleadas como *testers* en los ensayos de complementación posteriores.



**Figura 18.** Análisis de los grupos de compatibilidad vegetativa. A, B, C y D: medios de fenotipificación de mutantes. **A:** agar tartrato, **B:** Cz (mutantes *niaD*), **C:** agar nitrito (mutante *nirA*), **D:** agar hipoxantina (mutantes *cnx*), **E:** selección de mutantes (*nirA* o *cnx*, *niaD*) (*testers*) de ARG5/30 en medio mínimo para los cruzamientos con mutantes de otras cepas, **F:** cruzamientos entre mutantes de distintas cepas en medio mínimo (ARG5/30 *cnx* o *nirA*, ARG5/30 *niaD*, una mutante *niaD* de una cepa de *A. flavus* y una mutante *cnx* o *nirA* de esa misma cepa de *A. flavus*).

En total se obtuvieron 286 mutantes de las cepas seleccionadas para llevar a cabo el análisis de GCV, de las cuales el 81,47% (233 mutantes) fueron *niaD*, el 13,29% (38) fueron *nirA*, y el 5,24% (15 cepas) resultó ser *cnx*. Únicamente 13 de las 33 cepas en análisis produjeron mutantes *cnx*. Dado que el tipo de mutantes *cnx* generalmente proporciona reacciones de complementación más evidentes al ser enfrentada a una mutante *niaD* (Correll y col., 1987), para estas 13 cepas se seleccionaron estas mutantes *cnx* en vez de las *nirA* para los ensayos de auto-complementación. Sin embargo, las mutantes *cnx* se logran recuperar con baja frecuencia en *A. flavus* (Bayman y Cotty, 1991 a). Todas las cepas que formaron mutantes complementarios fueron denominadas mutantes autocompatibles.

La proporción de cada tipo de mutante *nit* obtenida en el presente trabajo coincide con los resultados obtenidos por Barros y col., 2006 b (81% *niaD*, 14% *nirA*, 5% *cnx*) y aquéllos obtenidos por Alaniz Zanon y col., 2016 (76,2% *niaD*, 20,3% *nirA* y 3,4% *cnx*). A pesar de que aún no se conoce bien el mecanismo por el cual las proporciones de mutantes *nit* son desiguales, se cree que podría existir alguna relación con el tamaño físico de los genes involucrados o bien con el hecho de que algunos *loci* sean más susceptibles a mutaciones (Barros y col., 2006 b).

De acuerdo a los ensayos de complementación, se observó que ninguna de las cepas de *A. flavus* no toxicogénicas aisladas de suelo al inicio del ensayo a campo fueron compatibles vegetativamente con las cepas biocontroladoras, mientras que al momento de la cosecha, el 60% de las cepas evaluadas pertenecieron a este GCV aplicado en el campo. En la parcela tratada con el inóculo simple a base de la cepa AFCHG2 (tratamiento 1) un 75% de las cepas pertenecieron al mismo GCV que la cepa aplicada. En la parcela tratada con el inóculo mixto (tratamiento 2) el 33,33% de las cepas no toxicogénicas recuperadas pertenecieron al mismo GCV que las cepas AFCHG2 y ARG5/30 incluidas en el bioformulado. Finalmente, en la parcela tratada con el bioformulado simple a base de la cepa ARG5/30, el 80% de las cepas aisladas estuvieron incluidas en el mismo GCV que la cepa aplicada.

Los resultados obtenidos en el presente estudio fueron favorables, ya que antes de la aplicación de los bioformulados, al momento inicial del ensayo, las cepas de *A. flavus* no toxicogénicas aisladas de suelo pertenecían a otros GCV diferentes al de las cepas potencialmente biocontroladoras evaluadas. Tras la aplicación de los inóculos al suelo, se observó un aumento en el número de cepas recuperadas pertenecientes al GCV aplicado. Mediante este tipo de monitoreo, se pudo confirmar que la disminución en los porcentajes de cepas productoras de AFs aisladas de suelo al momento de la cosecha en el campo de Espinillos (**Gráfico 2**), o dicho de otro modo, el aumento de la proporción de cepas no aflatoxicogénicas, se debe a la adición de las cepas AFCHG2 y ARG5/30 aplicadas individualmente o como inóculo mixto. Es decir, las cepas no toxicogénicas encontradas a campo son clones de las mismas cepas aplicadas en el ensayo. Nuevamente, se puede inferir que estas cepas potencialmente biocontroladoras compiten con las cepas toxicogénicas de *A. flavus* residentes del suelo, y reducen el riesgo de contaminación con AFs en los granos de maíz, desplazando a las cepas de *A. flavus* aflatoxicogénicas nativas.

#### 4.6. Detección y cuantificación de aflatoxinas en granos de maíz

A partir de las muestras de maíz recolectadas de los tratamientos y los controles de los ensayos realizados en ambos campos, se evaluó la incidencia de AFB<sub>1</sub> en los granos. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 5**.

**Tabla 5.** Incidencia natural de aflatoxina B<sub>1</sub> en los granos de maíz.

Tratamiento	Bioformulados	Concentración final de AFB <sub>1</sub> (ng/g de maíz)*	
		Espinillos	Achiras
1	AFCHG2	ND	ND
2	AFCHG2 + ARG5/30	ND	ND
3	ARG5/30	ND	ND
C	Sin inocular	10,92	ND

\*El valor informado de concentración final de AFB<sub>1</sub> es el promedio de 6 determinaciones.

C: control.

ND: no detectado (límite de detección: 1 ng/g).

En el ensayo de Espinillos solamente los granos recolectados de las parcelas control presentaron contaminación natural con AFB<sub>1</sub>. Considerando que el límite de detección de la técnica fue de 1 ng/g de maíz para AFB<sub>1</sub>, en ninguno de los tratamientos se observaron niveles detectables de esta micotoxina. Esto podría atribuirse a que las cepas potencialmente biocontroladoras utilizadas en los bioformulados lograron competir con las cepas de *A. flavus* nativas aflatoxicogénicas, posiblemente desplazándolas e impidiendo que contaminaran los granos de maíz. Los datos presentados y discutidos en los incisos anteriores sustentan este resultado. Las AFs detectadas en los controles provienen de cepas nativas de *A. flavus* y/o *A. parasiticus* toxicogénicas que no compitieron con las cepas biocontroladoras no aflatoxicogénicas, ya que en estas parcelas no se aplicó ninguno de los bioformulados. En el campo de Achiras no se detectó contaminación natural con AFs en los granos de maíz en ninguna de las parcelas tratadas ni de los controles sin inocular. Este resultado podría deberse a que las condiciones meteorológicas en este campo no fueron predisponentes para la producción de AFs por parte de las cepas toxicogénicas nativas.

En un estudio previo realizado en Argentina por Alaniz Zanon y col. (2013) en un campo de maní situado en la localidad de Las Acequias se detectaron reducciones de un 71% en los niveles de AFs, utilizando también la cepa AFCHG2. En años posteriores, en Tartagal (provincia de Salta) se observó una reducción aún mayor de la contaminación con AFs en maní, de alrededor del 86%. En este último estudio, los

inóculos más efectivos fueron aquéllos basados en la combinación de cepas no toxicogénicas de *A. flavus*. Las cepas acá utilizadas fueron: AFCHG2, AR27 y ARG100 (Alaniz Zanon y col., 2016). Respecto a otros estudios realizados en maíz, un bioformulado a base de la cepa ARG5/30, mostró una reducción de AFs en maíz del 59% en un ensayo de competencia *in situ* (Alaniz Zanon y col., 2018). En un estudio similar, Mehl y Cotty (2010) evaluaron la capacidad competitiva de diferentes GCVs y observaron una reducción de AFs en los granos de maíz del 57 – 88%. Además, Atehnkeng y col. (2008 b) demostraron una reducción de AFs del 70 – 99% al co-inocular una cepa no aflatoxicogénica con una aflatoxicogénica. La agresividad, la capacidad de infección y la capacidad de prevenir la contaminación del grano con AFs pueden estar influenciadas no sólo por el huésped sino también por las características intrínsecas de cada cepa (Horn y Dorner, 1999; Horn, 2005 b).

En un estudio realizado por Dorner y col. (1999) se probó la misma estrategia de control biológico en maíz durante 4 años, logrando reducciones de AFs de hasta 87% cuando se aplicó una combinación de cepas no toxicogénicas de *A. flavus* y *A. parasiticus* aplicadas al suelo.

Abbas y col. (2006) llevaron a cabo un estudio sobre biocontrol de AFs en maíz por inoculación con cepas no aflatoxicogénicas de *A. flavus*. El estudio fue realizado a campo durante 4 años (2001 – 2004), en Estados Unidos. La inoculación con la cepa no aflatoxicogénica K49 redujo los niveles de AFs en maíz en un 58 y 76% en 2001 y 2002, respectivamente, en relación con los controles no inoculados, mientras que el porcentaje de AFs en maíz en las parcelas inoculadas con la cepa no aflatoxicogénica CT3, se redujo en un 86 y 61% en 2001 y 2002, respectivamente, en relación con los controles sin inocular. En 2001, el porcentaje de AFs en maíz de las parcelas inoculadas con la cepa aflatoxicogénica F3W4 fue 188% más que el porcentaje de AFs en el maíz de las parcelas no inoculadas, mientras que en 2002 los niveles de AFs en los granos de maíz de las parcelas inoculadas con F3W4 y el de los granos de maíz de las parcelas control, fueron similares. Tanto en 2001 como en 2002, los niveles de AFs en maíz de las parcelas inoculadas con el inóculo mixto (CT3 + K49 + F3W4) fueron más bajos que los obtenidos en las parcelas inoculadas con la cepa aflatoxicogénica sola. En 2003 y 2004, cuando hubo bajos niveles de infección natural por AFs, en las parcelas inoculadas con F3W4 los niveles de AFs aumentaron. El maíz de las parcelas inoculadas con mezclas de K49 o CT3 con F3W4 tenía porcentajes más bajos de AFs, 65 y 94%, respectivamente, en comparación con F3W4 solo. Los niveles de AFs en el maíz de las parcelas inoculadas con una mezcla de K49 y F3W4 fueron más bajos que los de las parcelas inoculadas con una mezcla de cepas CT3 y F3W4, lo que indica que K49 es quizás un competidor más agresivo que CT3.

En un estudio realizado a campo en Estados Unidos entre 2007 y 2009, para evaluar la competitividad de cepas no aflatoxicogénicas de *A. flavus* potencialmente biocontroladoras de AFs en maíz, los resultados demostraron que la cepa no aflatoxicogénica K49 desplazó efectivamente a las cepas toxicogénicas a diversas concentraciones o combinaciones. La reducción de AFs en maíz fue mayor en los granos de la parcela inoculada con la cepa no aflatoxicogénica K49 y de la parcela inoculada con la cepa no aflatoxicogénica NRRL 21882 en comparación con los granos de la parcela inoculada con la cepa no aflatoxicogénica AF36. Cuando se co-inocularon las cepas K49 y NRRL 21882 con K54 y F3W4 (cepas productoras de AFs), los niveles de AFs se redujeron 83 – 98%, respectivamente. En contraste, AF36 redujo los niveles de AFs en un 20% con F3W4 y 93% con K54. Estos resultados, indican, como lo mencionado en el párrafo anterior, que la cepa K49 podría ser efectiva para reducir los niveles de AFs en el maíz. La cepa NRRL 21882 también logra reducir las AFs, con lo que ambas cepas pueden utilizarse para biocontrol (Abbas y col., 2011 b).

En otro estudio, en Nigeria, llevado a cabo por Atehnkeng y col. (2008 a), se evaluó la reducción de AFs en maíz en experimentos de competencia en granos y en estudios de campo, utilizando como inóculo cepas de *A. flavus* atoxicogénicas y otra toxicogénica. Los resultados obtenidos en cuanto a los niveles de AFs en maíz, fueron una reducción de entre 70,1 y 99,9%.

El porcentaje de reducción de la acumulación de AFs en el presente trabajo fue del 100% en el ensayo llevado a cabo en Espinillos. Comparando este resultado con los porcentajes de reducción mencionados en párrafos anteriores, se observa que es el más elevado, siendo un resultado favorable.

Considerando que previo a la realización del ensayo a campo en Achiras, no se detectó la presencia de cepas productoras de AFs en las parcelas control (**Gráfico 2**), era lógico esperar que no se detectara contaminación con AFs en los granos de la misma parcela al momento de la cosecha. Esto, sumado a que las condiciones meteorológicas no resultaron ser favorables para dicha contaminación.



# CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

---





## 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

### 5.1. Conclusiones

En el presente trabajo se lograron preparar y evaluar bioformulados a base de inóculos simples y de un inóculo mixto, constituidos por las cepas de *Aspergillus flavus* no aflatoxicogénicas nativas de la provincia de Córdoba AFCHG2 y ARG5/30. Se llevaron a cabo ensayos a campo en cultivo de maíz, a partir de los cuales se concluye lo siguiente:

- Los tres bioformulados ensayados lograron colonizar el suelo de los campos donde se realizaron los ensayos, observándose esto en el aumento en el número de colonias de *Aspergillus* sección *Flavi* aisladas en el suelo al momento de la cosecha respecto a las aisladas de las muestras de suelo pre-inoculación.
- En relación a los porcentajes de infección de los granos cosechados con *Aspergillus* sección *Flavi* observados en las muestras de ambos campos, con las formulaciones simples se obtuvo una infección de los granos mayor que con la formulación mixta (AFCHG2 + ARG5/30). Es decir, las cepas de *A. flavus* evaluadas interactuarían entre sí en el ecosistema favoreciendo o dificultando la invasión de los granos de maíz.
- Las cepas de *A. flavus* no aflatoxicogénicas utilizadas en las formulaciones de los tres bioformulados fueron capaces de competir con las cepas de *A. flavus* nativas y colonizar el suelo, logrando desplazar las cepas aflatoxicogénicas nativas en suelo. Esto se confirma a través de los porcentajes de cepas de *A. flavus* toxicogénicas encontradas al momento de la cosecha.
- El monitoreo a través de los grupos de compatibilidad vegetativa (GCVs) fue útil para confirmar el desplazamiento de las cepas toxicogénicas por las no toxicogénicas. Se confirma así que el aumento en los porcentajes de las cepas no aflatoxicogénicas aisladas de suelo al momento de la cosecha en el campo de Espinillos, se debe a la adición de las cepas AFCHG2 y ARG5/30 aplicadas en inóculos simples o mixto. Entonces, se infiere que las cepas no toxicogénicas de *A. flavus* encontradas a campo serían clones de las mismas cepas aplicadas en el ensayo.
- La tasa de inóculo aplicado al suelo (20 kg/ha) fue suficiente para generar dicho desplazamiento.
- En el ensayo llevado a cabo en Espinillos, se observó que los bioformulados evaluados lograron desplazar a las cepas aflatoxicogénicas nativas también en

los granos de maíz, ya que los porcentajes de *A. flavus* toxicogénicos en los granos de maíz, en general disminuyeron en comparación con los porcentajes obtenidos al inicio del ensayo. Sería interesante realizar repeticiones de estos análisis.

- Si únicamente se tuviera en cuenta el ensayo de Espinillos, donde las condiciones meteorológicas y del cultivo fueron las habituales para la zona, podría inferirse que los tres bioformulados evaluados sería buenos candidatos como agentes de control biológico de aflatoxinas en maíz, observando un 100% de reducción de la acumulación de AFB<sub>1</sub> en los tres tratamientos. Sin embargo, considerando los resultados obtenidos en ambos campos, y los porcentajes de cepas de *A. flavus* productoras de toxinas en las muestras de granos y de suelo al momento de la cosecha, el bioformulado simple a base de la cepa AFCHG2 fue el más efectivo para desplazar a las cepas toxicogénicas nativas de los campos, por lo que resulta de interés para ser empleado como agente de control biológico.

## 5.2. Perspectivas futuras

- En estudios futuros podría evaluarse el efecto de la aplicación de estos bioformulados sobre el microbioma presente en el suelo y en los granos de maíz, ya que muchos de los microorganismos del suelo cumplen roles benéficos para el cultivo y sería interesante conocer la interacción de dicho microbioma con los agentes de control biológico en base a cepas no toxicogénicas.
- En ensayos a campo posteriores podría analizarse la composición química del suelo ya que estos datos aportarían información relevante para una interpretación más completa de los resultados que se obtengan.

# BIBLIOGRAFÍA

---





## 6. BIBLIOGRAFÍA

### Páginas de internet:

- 1) [http://www.intagro.com/mapas/arg\\_maiz.asp](http://www.intagro.com/mapas/arg_maiz.asp) Última fecha de acceso: 12/12/19
- Abbas, H. K., Accinelli, C., Thomas Shier, W. 2017. Biological control of aflatoxin contamination in US crops and the use of bioplastic formulations of *Aspergillus flavus* biocontrol strains to optimize application strategies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 65 (33): 7081 – 7087. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b01452.
  - Abbas, H. K., Weaver, M. A., Horn, B. W., Carbone, I., Monacell, J. T., Shier, W. T. 2011 (a). Special double issue - *Aspergillus*, aflatoxins, cyclopiazonic acid and biological control of aflatoxins. Selection of *Aspergillus flavus* isolates for biological control of aflatoxins in corn. *Toxin Reviews*. 30 (2-3): 59 – 70.
  - Abbas, H. K., Wilkinson, J. R., Zablutowicz, R. M., Accinelli, C., Abel, C. A., Bruns, H. A., Weaver, M. A. 2009. Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. *Toxin Reviews*. 28 (2 – 3): 142 – 153.
  - Abbas, H. K., Zablutowicz, R. M., Bruns, H. A., Abel, C. 2006. Biocontrol of aflatoxin in corn by inoculation with non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. *Biocontrol Science and Technology*. 16 (5): 437 – 449.
  - Abbas, H. K., Zablutowicz, R. M., Horn, B. W., Phillips, N. A., Johnson, B. J., Jin, X., Abel, C. A. 2011 (b). Comparison of major biocontrol strains of non aflatoxigenic *Aspergillus flavus* for the reduction of aflatoxins and cyclopiazonic acid in maize. *Food Additives and Contaminants*. 28 (2): 198 – 208.
  - Abbas, H. K., Zablutowicz, R. M., Weaver, M. A., Horn, B. W., Xie, W., Shier, W. T. 2004. Comparison of cultural and analytical methods for determination of aflatoxin production by Mississippi Delta *Aspergillus* isolates. *Canadian Journal of Microbiology*. 50 (3): 193 – 199.
  - Accinelli, C., Abbas, H. K. 2011. New perspectives for the application of bioplastic materials in the biocontrol of *Aspergillus flavus* in corn. *Toxin Reviews*. 30 (2 – 3): 71 – 78.
  - Accinelli, C., Abbas, H. K., Vicari, A., Shier, W. T. 2014. Aflatoxin contamination of corn under different agro-environmental conditions and biocontrol applications. *Crop Protection*. 63: 9 – 14.
  - Adivitiya D. V. K., Babbal A., Khasa, Y. P. 2017. Capítulo 24: *Microbes as Biocontrol Agents*. *Probiotics and Plant Health*, 507 – 552. doi:10.1007/978-981-10-3473-2\_28
  - Alaniz Zanon, M. S. 2016. Reducción de la entrada de aflatoxinas en la cadena agroalimentaria maní. Biocontrol basado en la exclusión competitiva. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Río Cuarto.
  - Alaniz Zanon, M. S., Barros, G. G., Chulze, S. N. 2016. Non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* as potential biocontrol agents to reduce aflatoxin contamination in peanuts harvested in Northern Argentina. *International Journal of Food Microbiology*. 231: 63 – 68.

- 
- Alaniz Zanon, M. S., Chiotta, M. L., Gaj-Merlera, G., Barros, G., Chulze, S. N. 2013. Evaluation of potential biocontrol agent for aflatoxin in Argentinean peanuts. *International Journal of Food Microbiology*. 162 (3): 220 – 225.
  - Alaniz Zanon, M. S., Clemente, M. P., Chulze, S. N. 2018. Characterization and competitive ability of non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolated from the maize agro-ecosystem in Argentina as potential aflatoxin biocontrol agents. *International Journal of Food Microbiology*. 277: 58 – 63.
  - Andrade, F. H., Cirilo, A. G., Uhart, S. A., Otegui M. A. 1996. *Ecofisiología del cultivo de maíz*. Balcarce, Buenos Aires. Editorial: La Barrosa.
  - ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 07/2011. Febrero 2011.
  - AOAC, 2000. International Official Methods of Analysis. Gaithers-burg, MD, USA. Official Method, 990.33.
  - APS, The American Phytopathological Society. 2002. Disponible en: <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/biocontrol.aspx>.
  - Atehnkeng, J., Ojiambo, P. S., Cotty, P. J., Bandyopadhyay, R. 2014. Field efficacy of a mixture of atoxigenic *Aspergillus flavus* Link: Fr vegetative compatibility groups in preventing aflatoxin contamination in maize (*Zea mays* L.). *Biocontrol Control*. 72: 62 – 70.
  - Atehnkeng, J., Ojiambo, P. S., Donner, M., Ikotun, T., Sikora, R. A., Cotty, P. J., Bandyopadhyay, R. 2008 (b). Distribution and toxigenicity of *Aspergillus* species isolate from maize kernels from three afro-ecological zones in Nigeria. *International Journal of Food Microbiology*. 122 (1 – 2): 74 – 84.
  - Atehnkeng, J., Ojiambo, P. S., Ikotun, T., Sikora, R. A., Cotty, P. J., Bandyopadhyay, R. 2008 (a). Evaluation of atoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* as potential biocontrol agents for aflatoxin in maize. *Food Additives & Contaminants*. 25 (10): 1264 – 1271.
  - Barros, G. G., Chiotta, M. L., Torres, A. M., Chulze, S. N. 2006 (a). Genetic diversity in *Aspergillus parasiticus* population from the peanut agroecosystem in Argentina. *Letters in Applied Microbiology*. 42: 560 – 566.
  - Barros, G. G., Torres, A. M., Chulze, S. N. 2005. *Aspergillus flavus* population isolated from soil of Argentina's peanut growing region. Sclerotia production and toxigenic profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85 (14): 2349 – 2353.
  - Barros, G. G., Torres, A. M., Rodriguez, M. I., Chulze, S. N. 2006 (b). Genetic diversity within *Aspergillus flavus* strains isolated from peanut-cropped soils in Argentina. *Soil Biology & Biochemistry*. 38 (1): 145 – 152.
  - Bashan, Y., Gonzalez, L. E. 1999. Long-term survival of the plant-growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in dry alginate inoculants. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51 (2): 262 – 266.
  - Battilani, P., Barbano, C., Piva, G. 2008. Aflatoxin B<sub>1</sub> contamination in maize related to the aridity index in North Italy. *World Mycotoxins Journal*. 1 (4): 449 – 456.

- Battilani, P., Camardo Leggieri, M., Rossi, V., Giorni, P. 2013. AFLA-maize, a mechanistic model for *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin B<sub>1</sub> contamination in maize. *Computers and Electronics in Agriculture*. 94: 38 – 46.
- Battilani, P., Logrieco, A. F. 2014. Global risk maps for mycotoxins in wheat and maize. En: Leslie, J. F., Logrieco, A. F. 2014. *Mycotoxin Reduction in Grain Chains: a practical guide* Wiley-Blackwell, Oxford, UK, pp. 309 – 326.
- Bayman, P., Cotty, P. J. 1991 (a). Improved media for selecting nitratennonutilizing mutants in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*. 83 (3): 311 – 316.
- Bayman, P., Cotty, P. J. 1991 (b). Vegetative compatibility and genetic diversity in the *Aspergillus flavus* population of a single field. *Canadian Journal Botany*. 69 (8): 1707 – 1711.
- Bebbler, D. P., Gurr, S. J. 2015. Crop-destroying fungal and oomycete pathogens challenge food security. *Fungal Genetics and Biology*. 74: 62 – 64.
- Bebbler, D. P., Holmes, T., Gurr, S. J. 2014. The global spread of crop pests and pathogens. *Global Ecology and Biogeography*. 23 (23): 1398 – 1407.
- Bebbler, D. P., Ramotowski, M. A. T., Gurr, S. J. 2013. Crop pests and pathogens move poleward in a warming world. *Nature Climate Change*. 3 (11): 985 – 988.
- Bennett, J. W. 2010. An overview of the genus *Aspergillus*. *Aspergillus Molecular Biology and Genomics*. 1: 1 – 17.
- Bennett, J. W., Kale, S., Yu, J. 2007. Aflatoxins: Background, toxicology, and molecular biology. *Infectious Disease: Foodborne Diseases*. 13: 355 – 373.
- Bennett, J. W., Klich, M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Review*. 16: 497 – 516.
- Bezerra da Rocha, M. E., da Chagas Oliveira Freire, F., Feitosa Maia, F. E., Florindo Guedes, M. I., Rondina, D. 2014. Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*. 36 (1): 159 – 165.
- Blout, W. P. 1961. Turkey “X” disease. *Turkeys*. 9: 52, 55 – 58, 61, 77.
- Brockwell, J., Bottomley, P.J. 1995. Recent advances in inoculants technology and prospects for the future. *Soil Biology and Biotechnology*. 27 (4 – 5): 683 – 697.
- Broggi, L. E., Pacin, A. M., Gasparovic, A., Sacchi, C., Rothermel, A., Gallay, A. 2007. Natural occurrence of aflatoxins, deoxynivalenol, fumonisins and zearalenone in maize from Entre Rios Province, Argentina. *Mycotoxin Research*. 23 (2): 59 – 64.
- Broggi, L. E., Resnik, S. L., Pacin, A. M., González, H. H. L., Cano, G., Taglieri, D. 2002. Distribution of fumonisins in dry-milled corn fractions in Argentina. *Food Additives and Contaminants*. 19 (5): 465 – 469.
- Brown, R. L., Cotty, P. J., Cleveland, T. E. 1991. Reduction in aflatoxin content of maize by atoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Protection*. 54 (8): 623 – 626.
- Bruns, H. A., Abbas, H. K. 2006. Planting date effects on Bt and non-Bt corn in the mid-south USA. *Agronomy Journal*. 98 (1): 100 – 106.
- Burges, H. D., Burrell, N. D. 1964. Cooling of bulk grain in the British climate to control storage insects and to improve keeping quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 15 (1): 32 – 50.

- Butt, T. Q., Copping, L. G. 2000. Fungal biological control agents. *Pesticide Outlook*. 11 (5): 186 – 191.
- CAST, Council for Agricultural Science and Technology. 2003. *Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems*. Task Force Report N° 139. Ames: IOWA, USA.
- Chulze, S. N., Bertinetti, C., Dalcero, A., Etcheverry, M., Farnochi, C., Torres, A. M., Rizzo, I., Varsavsky, E. 1989. Incidence of aflatoxin, zearalenone, and deoxynivalenol on corn in Argentina. *Mycotoxin Research*. 5 (1): 9 – 12.
- Cole, R. J., Dorner, J., Holbrook, C. 1995. Advances in mycotoxin elimination and resistance. En: *Advances in Peanut Science* (Pattee, H.E., Stalker, H.T., eds.). American Peanut Research and Education Society, Inc., Stillwater, AZ, USA. pp. 456 – 474.
- Correll, J. C., Klittich, C. J. R., Leslie, J. F. 1987. Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use of vegetative compatibility test. *Phytopathology*. 77: 1640 – 1646.
- Cotty, P.J. 1989. Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology*. 79: 808 – 814.
- Cotty, P.J. 1994. Influence of field application of an atoxigenic strain of *Aspergillus flavus* on the populations of *Aspergillus flavus* infecting cotton bolls and on aflatoxin content of cottonseed. *Phytopathology*. 84: 1270 – 1277.
- Cove, D.J. 1976. Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*: The selection and characterization of chlorate resistant mutants. *Heredity*. 36 (2): 191 – 203.
- Daigle, D. J., Cotty, P. J. 1995. Formulating atoxigenic *Aspergillus flavus* for field release. *Biocontrol Science and Technology*. 5 (2): 175 – 184.
- Daigle, D. J., Cotty, P. J. 1997. The effect of sterilization, pH, filler and spore inoculum concentration on the preparation of alginate pellets. *Biocontrol Science and Technology*. 7 (1): 3 – 10.
- Detroy, R. W., Lillehoj, E. B., Ciegler, A. 1971. Aflatoxin and related compounds. Disponible en: *Microbial Toxins, Vol. VI: Fungal Toxins* (Ciegler, A., Kadis, S., Aji, S. J., eds), Academic, New York, pp. 3 – 178.
- Di Rienzo J, Casanoves F, Balzarina M, Gonzalez L, Tablada M, Robledo C. (2018) Infostat versión 2018. Centro de Transferencia Infostat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. <http://www.infostat.com.ar>.
- Donner, M., Atehnkeng, J., Sikora, R.A., Bandyopadhyay, R., Cotty, P.J. 2010. Molecular characterization of atoxigenic strains for biological control of aflatoxins in Nigeria. *Food Additives and Contaminants (Part A)*. 27 (5): 576 – 590.
- Dorner, J. W. 2008. Management and prevention of mycotoxins in peanuts. *Food Additives and Contaminants (Part A)*. 25 (2): 203 – 208.
- Dorner, J. W., Cole, R. J., Wicklow, D. T. 1999. Aflatoxin reduction in corn through field application of competitive fungi. *Journal of Food Protection*. 62 (6): 650 – 656.
- Driehuis, F., Oude-Elferink, S. J. 2000. The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. *Veterinary Quarterly*. 22 (4): 212 – 216.

- DuPont Pioneer. 2015. Maíz: Crecimiento y desarrollo. Disponible en: [https://www.pioneer.com/CMRoot/International/Latin\\_America\\_Central/Chile/Servicios/Informacion\\_tecnica/Corn\\_Growth\\_and\\_Development\\_Spanish\\_Version.pdf](https://www.pioneer.com/CMRoot/International/Latin_America_Central/Chile/Servicios/Informacion_tecnica/Corn_Growth_and_Development_Spanish_Version.pdf)
- EC (European Commission). Commission Regulation (EU) No 165/2010. Amending Regulation (EC) N° 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. Febrero 2010.
- Ehrlich, K. C., Chang, P. K., Yu, J., Cotty, P. J. 2004. Aflatoxin biosynthesis cluster gene *cypA* is required for G aflatoxin formation. *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (11): 6518 – 6524.
- Ehrlich, K. C., Montalbano, B. G., Cotty, P. J. 2007. Analysis of single nucleotide polymorphisms in three genes shows evidence for genetic isolation of certain *Aspergillus flavus* vegetative compatibility groups. *FEMS Microbiology Letters*. 268 (2): 231 – 236.
- Ehrlich, K. C., Moore, G. G., Mellon, J. E., Bhatnagar, D. 2015. Challenges facing the biological control strategy for eliminating aflatoxin contamination. *World Mycotoxin Journal*. 8 (2): 225 – 233.
- FADA, Fundación Agropecuaria para el Desarrollo de Argentina. Enero, 2019. Maíz 360°: Análisis de Argentina y el mundo. Disponible en: <http://fundacionfada.org/informes/maiz-360-analisis-de-argentina-y-el-mundo/>. Última fecha de acceso: 12/12/19.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2003. Manual sobre la aplicación del sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas. Estudio FAO Alimentación y Nutrición (73). Disponible en: <http://www.fao.org/3/y1390s/y1390s00.htm#Contents>. Última fecha de acceso: 12/12/19.
- Forgacs, J. 1962. Mycotoxicoses – the neglected diseases. *Feedstuffs*. 34: 124 – 134.
- Fravel, D. R. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*. 43 (1): 337 – 359.
- Frisvad, J. C., Samson, R. A., Smedsgaard, J. 2004. *Emericella astellata*, a new producer of aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and sterigmatocystin. *Letters in Applied Microbiology*. 38 (5): 440 – 445.
- Garrido, C. E., Hernández Pezzani, C., Pacin, A. 2012. Mycotoxins occurrence in Argentina's maize (*Zea mays* L.) from 1999 to 2010. *Food Control*. 25 (2): 660 – 665.
- Gams, W., Christensen, M., Onions, A. H., Pitt, J. I., Samson, R. A. 1985. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. En: *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*, Samson, R. A., and Pitt, J. I., eds. (New York, USA: Plenum Press), pp. 55 – 62.
- Gregory, P. J., Johnson, S. N., Newton, A. C., Ingram, J. S. I. 2009. Integrating pests and pathogens into the climate change/food security debate. *Journal of Experimental Botany*. 60 (10): 2827 – 2838.
- Giorni, P., Pietri, A., Magan, N., Battilani, P. 2009. Control of the development of *Aspergillus flavus* in maize during post-harvest. *Tecnica Molitoria*. 60 (3): 261 – 267.

- González, H. H. L., Martínez, E. J., Pacin, A. M., Resnik, S. L., Sydenham, E. W. 1999. Natural co-occurrence of fumonisins, deoxynivalenol, zearalenone and aflatoxins in field trial corn in Argentina. *Food Additives and Contaminants*. 16 (12): 565 – 569.
- Goto, T., Wicklow, D. T., Ito, Y. 1996. Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by a sclerotium-producing *Aspergillus tamarii* strain. *Applied and Environmental Microbiology*. 62 (11): 4036 – 4038.
- Grubisha, L. C., Cotty, P. J. 2010. Genetic isolation among sympatric vegetative compatibility groups of the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. *Molecular Ecology*. 19 (2): 269 – 280.
- Horn, B. W. 2005 (a). Ecology and population biology of aflatoxigenic fungi in soil. En: Abbas HK, editor. *Aflatoxin and food safety*. Boca Raton, FL: Taylor and Francis. pp 95 – 116.
- Horn, B. W. 2005 (b). Colonization of wounded peanut seeds by soil fungi: selectivity for species from *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycologia*. 97 (1): 202 – 217.
- Horn, B. W. 2007. Biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in the United States: A review. *Food Additives and Contaminants*. 24 (10): 1088 – 1101.
- Horn, B. W., Dorner, J. W. 1998. Soil populations of *Aspergillus* species from section *Flavi* along a transect through peanut-growing regions of the United States. *Mycologia*. 90 (5): 767 – 776.
- Horn, B. W., Dorner, J. W. 1999. Regional differences in production of aflatoxin B<sub>1</sub> and cyclopiazonic acid by soil isolates of *Aspergillus flavus* along a transect within the United States. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (4): 1444 – 1449.
- Horn, B. W., Greene, R. L., Dorner, J. W. 1995. Effect of corn and peanut cultivation on soil populations of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in Southwestern Georgia. *Applied Environmental Microbiology*. 61 (7): 2472 – 2475.
- Horn, B. W., Greene, R. L., Sobolev, V. S., Dorner, J. W., Powell, J. H., Layton, R. C. 1996. Association of morphology and mycotoxin production with vegetative compatibility groups in *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *A. tamari*. *Mycologia*. 88 (4): 574 – 587.
- Houbraken, J., Vries, R. P., Samson, R. A. 2014. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Advances in Applied Microbiology*. 86: 199 – 249.
- Hubka, V., Nováková, A., Kolarik, M., Jurjevic, Z., Peterson, S. W. 2015. Revision of *Aspergillus* section *Flavipedes*: seven new species and proposal of section *Jani* sect. Nov. *Mycologia*: 107 (1): 169 – 208.
- IARC, International Agency for Research on Cancer. 1993. Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to human. IARC, Lyon, France. 56: 257 – 263.
- INTA. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 2015. Bases para el manejo del cultivo de maíz. Disponible en: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta\\_bases\\_para\\_el\\_manejo\\_de\\_maiz\\_reglon\\_100-2\\_2.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_bases_para_el_manejo_de_maiz_reglon_100-2_2.pdf). Última fecha de acceso: 12/12/19.

- INTA. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 2014. Maní: rotar para minimizar el impacto sobre el suelo. Disponible en: <https://intainforma.inta.gob.ar/mani-rotar-minimiza-el-impacto-y-aumenta-el-rinde/>. Última fecha de acceso: 12/12/19.
- Ito, Y., Peterson, S. W., Wicklow, D. T., Goto, T. 2001. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycology Research*. 105 (2): 233 – 239.
- Jaime-Garcia, R., Cotty, P. J. 2004. *Aspergillus flavus* in soils and corn cobs in South Texas: Implications for management of aflatoxins in corn-cotton rotations. *Plant Disease*. 88 (12): 1366 – 1371.
- Jaime-Garcia, R., Cotty, P. J. 2006. Spatial distribution of *Aspergillus flavus* and its toxigenic strains on comercial cottonseed from south Texas and its relationship to aflatoxin contamination. *Plant Pathology*. 55 (3): 358 – 366.
- Jard, G., Liboz, T., Mathieu, F., Guyonvarc'h, A., Lebrihi, A. 2011. Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Additives and Contaminants*. 28 (11): 1590 – 1609.
- Jenkins, N. E., Heviefo, G., Langewald, J., Cherry, A. J., Lomer, C. J. 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News and Information*. 19 (1): 21 – 31.
- Kabak, B., Dobson, A. D. W., Var, I. 2006. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 46 (8): 593 – 619.
- Klich, M. A. 2002 (a). Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. *Mycologia*. 94 (1): 21 – 27.
- Klich, M. A. 2002 (b). Identification of Common *Aspergillus* Species. Centralbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
- Klich, M. A. 2007. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology*. 8 (6): 713 – 722.
- Klich, M. A., Cary, J. W., Beltz, S. B., Bennett, C. A. 2003. Phylogenetic and morphological analysis of *Aspergillus ochraceoroseus*. *Mycologia*. 95 (6): 1252 – 1260.
- Klich, M. A., Mullaney, E., Daly, C. B., Cary, J. W. 2000. Molecular and physiological aspects of aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis by *A. tamarii* and *A. ochraceoroseus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 53 (5): 605 – 609.
- Klich, M. A., Pitt, J.I. 1988. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *Aspergillus parasiticus* and other closely related species. *Transactions of the British Mycological Society*. 91 (1): 99 – 108.
- Kurtzman, C. P., Horn, B. W., Hesseltine, C. W. 1987. *Aspergillus nonius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Antonie Leeuwenhoek*. 53 (3): 147 – 158.
- Lagogianni, C. S., Tsitsigiannis, D. I. 2019. Effective biopesticides and biostimulants to reduce aflatoxins in maize fields. *Frontiers in Microbiology*. Volume 10, article 2645.

- 
- Leslie, J. F. 2004. International *Fusarium* Laboratory Workshop. Forestry and Agricultural Biotechnology Institute (FABI), Pretoria University, Sudáfrica.
  - Leung, M. C. K., Diaz-Llano, G., Smith, T. K. 2006. Mycotoxins in pet food: a review on worldwide prevalence and preventative strategies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54 (26): 9623 – 9635.
  - Lyn, M. E., Abbas, H. K., Zablutowicz, R. M., Johnson, B. J. 2009. Delivery systems for biological control agents to manage aflatoxin contamination of pre-harvest maize. *Food Additives and Contaminants*. 26 (3): 381 – 387.
  - Magan, N., Medina, A., Aldred, D. 2011. Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and posharvest. *Plant Pathology*. 60 (1): 150 – 163.
  - Medina, A., Mohale, S., Putra Samsudin, N. I., Rodriguez-Sixtos, A., Rodriguez, A., Magan, N. 2017. Biocontrol of mycotoxins: dynamics and mechanisms of action. *Food Mycology*. 17: 41 – 48.
  - Mehl, H. L., Cotty, P. J. 2009. Competitive interactions among isolates of *Aspergillus flavus* during maize infection. *Phytopathology*. 99 Suppl.: S82 – S83.
  - Mehl, H. L., Cotty, P. J., 2010. Variation in competitive ability among isolates of *Aspergillus flavus* from different vegetative compatibility groups during maize infection. *Phytopathology*. 100 (2): 150 – 159.
  - Mercosur/Gmc/Res. No 25/02. Reglamento Técnico Mercosur sobre Límites Máximos de Aflatoxinas Admisibles en Leche, Maní y Maíz. (Derogación de la Res. GMC No 56/94). 2002.
  - Moore, G. G., Beltz, S. B., Carbone, I., Ehrlich, K. C., Horn, B. W. 2011. The population dynamics of aflatoxigenic *Aspergilli*. *Aflatoxins – Biochemistry and Molecular Biology*. Editado por Dr. Ramon G. Guevara-Gonzalez. InTech. <https://www.intechopen.com/books/aflatoxins-biochemistry-and-molecular-biology/the-population-dynamics-of-aflatoxigenic-aspergilli>. Último acceso: 12/12/19.
  - Moreno, M. Á., González Alonso, I., Martín de Santos, R., García Lacarra, T. 2012. The importance of genus *Alternaria* in mycotoxins production and human diseases. *Nutrición Hospitalaria*. 27 (6): 1772 – 1781.
  - Olanya, O. M., Hoyos, G. M., Tiffany, L. H., McGee, D. C. 1997. Waste corn as a point of inoculum for *Aspergillus flavus* in the corn agroecosystem. *Plant Disease*. 81 (6): 576 – 581.
  - Ortas, L. 2008. El Cultivo del Maíz: Fisiología y Aspectos generales. Agrigan S.A. Boletín N° 7.
  - Orum, T. V., Bigelow, D. M., Nelson, M. R., Howell, D. R., Cotty, P. J. 1997. Spatial and temporal patterns of *Aspergillus flavus* strain composition and propagule density in Tuma Country, Arizona, soils. *Plant Disease*. 81 (8): 911 – 916.
  - Pacin, A. M., Broggi, L. E., Resnik, S. L., González H. H. L. 2001. Mycoflora and mycotoxins natural occurrence in corn from Entre Ríos Province, Argentina. *Mycotoxin Research*. 17 (1): 31 – 38.

- Pacin, A. M., Ciancio Bovier, E., González, H. H. L., Whitechurch, E. M., Martínez, E. J., Resnik, S. L. 2009. Fungal and fumonisins contamination in Argentine maize (*Zea mays* L.) silo bags. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57 (7): 2778 – 2781.
- Paliwal, R. L., Granados, G., Lafitte, H. R., Violic, A. D. 2001. El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponible en: <http://www.fao.org/3/X7650S/x7650s00.htm#toc>. Último acceso: 12/12/19.
- Papa, K. E. 1986. Heterokaryon incompatibility in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*. 78 (1): 98 – 101.
- Park, D. L., Lee, L. S., Price, R. L., Pohland, A. E. 1988. Review of the decontamination of aflatoxins by ammoniation: current status and regulation. *Journal Association of Official Analytical Chemists*. 71 (4): 685 – 703.
- Payne, G. A., Hagler, W. M., Adkins, C. R. 1998. Aflatoxin accumulation in inoculated ears of field-grown maize. *Plant Disease*. 72: 422 – 424.
- Pedrol H., Castellarín J., Salvagiotti F. 2003. Importancia del maíz en la rotación de los cultivos. EEA Oliveros INTA.
- Perrone, G., Gallo, A., Logrieco, A. F. 2014. Biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in Europe in relation to the management of aflatoxin risk. *Frontiers in Microbiology*. 5 (377): 1 – 5.
- Peterson, S. W. 2008. Phylogenetic analyses of *Aspergillus* species using DNA sequences from four *loci*. *Mycologia*. 100 (2): 205 – 226.
- Peterson, S. W., Ito, Y., Horn, B. W., Goto, T. 2001. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nonius*. *Mycologia*. 93 (4): 689 – 703.
- Pitt, J. I. 1996. What are mycotoxins? *Australian Mycotoxin Newsletter*. 7(4): 1.
- Pitt, J. I., Hocking, A. D. 1997. Fungi and food spoilage. CSIRO Division of Food Science and Technology Sydney Academic Press. Australia.
- Pitt, J. I., Hocking, A. D. 2009. Fungi and food spoilage. Springer. Third edition. Dordrecht, The Netherlands, p. 523.
- Piva, G., Battilani, P., Pietri, A. 2006. Emerging issues in southern Europe: aflatoxins in Italy. Disponible en: Barug, D., Bhatnager, D., Egmond, H. P. v., Kamp, J. W. v. d., Osenbruggen, W. A. V., Visconti, A. (Eds.). The mycotoxin factbook. Food & feed topics. Wageningen Academic Publishers. The Netherlands, pp. 139 – 153.
- Raj, H. G., Prasanna, H. R., Magee, P. N., Lotliker, P. D. 1986. Effect of purified rat and hamster hepatic glutathione S-transferases on the microsome mediated binding of aflatoxin B<sub>1</sub> to DNA. *Cancer Letters*. 33 (1): 1 – 9.
- Raper, K. B., Fennell, D. I. 1965. The genus *Aspergillus*. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Resnik, S., Neira, S., Pacin, A., Martinez, E., Apro, N., Latreite, S. 1996. A survey of the natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in Argentina field maize: 1983-1994. *Food Additives and Contaminants*. 13 (1): 115 – 120.
- Reverberi, M., Punelli, M., Smith, C. A., Zjalic, S., Scarpari, M., Scala, V., Cardinali, G., Aspite, N., Pinzari, F., Payne, G. A., Fabbri, A. A., Fanelli, C. 2013. How peroxisomes affect aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus*. *PLoS One*. 7 (10): 48097.

- 
- Ritchie, S., Hanway J. J. 1992. How a corn plant develops. Iowa State University Cooperative Extension Service.
  - Rousk, J., Brookes, P. C., Baath, E. 2009. Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. *Applied and Environmental Microbiology*. 75 (6): 1589 – 1596.
  - Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Susca, A., Tanney, J. B., Varga, J., Kocsube, S., Szigeti, G., Yaguchi, T., Frisvad, J. C. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*. 78: 141 – 173.
  - Sanchis, V., Magan, N. 2004. Environmental conditions affecting mycotoxins. En: N. Magan y M. Olsen (eds.), *Mycotoxins in Food*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 174 – 189.
  - Scheidegger, K. A., Payne, G. A. 2003. Unlocking the secrets behind secondary metabolism: a review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*. 22 (2 – 3): 423 – 459.
  - Schwarz, G., Mendel, R. R. 2006. Molybdenum cofactor biosynthesis and molybdenum enzymes. *Annual Review of Plant Biology*. 57 (1): 623 – 647.
  - Secretaría de Agroindustria de la Nación. 2019. Estimaciones agrícolas, informe semanal 28 de Marzo de 2019. Disponible en: [https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/estimaciones/\\_archivos/estimaciones/190000\\_2019/190300\\_Marzo/190321\\_Informe%20Mensual%2021%2003%2019.pdf](https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/estimaciones/_archivos/estimaciones/190000_2019/190300_Marzo/190321_Informe%20Mensual%2021%2003%2019.pdf). Último acceso: 12/12/19.
  - Sforza, S., Dall'asta, C., Marchelli, R. 2006. Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*. 25 (1): 54 – 76.
  - Solovey, M. M. S., 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 (8): 325 – 329.
  - Sydenham, E. W., Shephard, G. S., Thiel, P. G., Marasas, W. F. O., Rheeder, J. P., Peralta Sanhueza, C. E., González, H. H. L., Resnik, S. L. 1993. Fumonisins in Argentinian field-trial corn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41 (6): 891 – 895.
  - Tranier, M. S., Pognant-Gros, J., Quiroz, R., Aguilar González, C. N., Mateille, T., Roussos, S. 2014. Commercial biological control agents targeted against plant-parasitic root-knot nematodes. *Brazilian Archives of Biology and Technology, An International Journal*. 57 (6): 831 – 841.
  - Van Egmond, H. P., Jonker, M. A. 2004. Worldwide regulations on aflatoxins – the situation in 2002. *Journal of Toxicology – Toxin Reviews*. 23 (2 – 3): 273 – 293.
  - Vig, K., Megharaj, M., Sethunathan, N., Naidu, R. 2003. Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: a review. *Advances in Environmental Research*. 8 (1): 121 – 135.

- Williams, J. H., Phillips, T. D., Jolly, P. E., Stiles, J. K., Jolly, C. M., Aggarwal, D. 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 80 (5): 1106 – 1122.
- Wilson, D. M., Payne, G. A. 1994. Factors affecting *Aspergillus flavus* group infection and aflatoxin contamination of crops. En: *The Toxicology of Aflatoxins. Human Health, Veterinary and Agricultural Significance* (Eaton, D. L., Groopman, J. D., eds.), Academic, San Diego, pp. 309 – 325.
- Zorzete, P., Castro, R. S., Pozzi, C. R., Israel, A. L. M., Fonseca, H., Yanaguibashi, G., Correa, B. 2008. Relative populations and toxin production by *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* in artificially inoculated corn at various stages of development under field conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 88 (1): 48 – 55.

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

