



Universidad Nacional de Córdoba  
Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Escuela Para Graduados



**ESTRATEGIAS DE MANEJO DE *Aspergillus flavus* Y  
*Penicillium* spp. PARA LA REDUCCIÓN DE LOS NIVELES DE  
MICOTOXINAS EN MAÍZ**

**Ing. Agr. Boris Xavier Camiletti**

**Tesis  
Para optar al Grado Académico de  
Doctor en Ciencias Agropecuarias**

**Córdoba, 2018**

**ESTRATEGIAS DE MANEJO DE *Aspergillus flavus* Y *Penicillium* spp. PARA LA  
REDUCCIÓN DE LOS NIVELES DE MICOTOXINAS EN MAÍZ**

**Ing. Agr. Boris X. Camiletti**

**Comisión Asesora de Tesis**

**Director:** Dra. María de la Paz Giménez Pecci

**Codirector:** Dr. Enrique I. Lucini

**Asesor:** Dr. Rubén H. Olmedo

**Tribunal Examinador de Tesis**

Dr. Daniel A. Presello

Dra. Romina Pizzolitto

Dr. Rubén H. Olmedo

**Presentación Formal Académica**

2 de marzo de 2018

Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Universidad Nacional de Córdoba

## Agradecimientos

Al terminar el presente trabajo, creo que es una buena oportunidad para expresar mi gratitud hacia aquellas personas que han permitido que mi tesis concluya de la mejor manera. Durante estos 5 años me han ayudado a formarme en el terreno profesional pero más importante aún, en lo personal.

En primer lugar, quisiera agradecer a mi codirector Dr. Enrique I. Lucini por haberme abierto las puertas de su equipo de trabajo. Desde el primer día en que me acerque con mis inquietudes demostraste predisposición a pesar de que no nos conocíamos personalmente. Muchas gracias por despertar en mí el interés como investigador y por crear una atmósfera de trabajo muy a gusto. Me complace decir que después de todo estos años de trabajo en conjunto hemos establecido una amistad que supera la relación profesional.

También me gustaría agradecer a mi directora Dra. María de la Paz Giménez Pecci por sus consejos y su buen humor en todos los momentos. Gracias por hacerme sentir importante dentro del grupo “enfermedades de maíz” y por permitirme descubrir a la fitopatología como algo motivador.

A mi asesor Dr. Rubén H. Olmedo, muchas gracias por todo el conocimiento transmitido en el mundo de los aceites esenciales.

Quisiera agradecer al Dr. N. Rubén Grosso por siempre considerarme parte de su grupo de trabajo. Muchas gracias por toda tu ayuda.

Agradezco inmensamente a mis compañeras de trabajo, ante todo por su amistad y por haberme instruido dentro del laboratorio. Patricia Quiroga y Mariana Larrauri muchas gracias por toda su ayuda desde los inicios. Agradezco a Paula, Anto y Ceci R., por su apoyo y sobre todo por la paciencia. Judith y Ceci P., nos conocemos hace poco pero espero que nuestra amistad prospere. A mi amigo y compañero de doctorado Pablo, muchas gracias por todo.

A mis compañeros de la cátedra de Microbiología Agrícola que me han recibido muy bien desde el primer día en que me incorporé como docente. Carolina Merlo Y Carolina Vázquez muchas gracias por el apoyo y sobre todo por la paciencia.

A mis compañeros del IPAVE-INTA, Fernanda, Mariana, Javier y Jorge, muchas gracias por su apoyo y buena onda. Agradezco especialmente a la Dra. Karina Torrico por su paciencia durante todas las horas de trabajo compartidas. Muchas gracias por toda tu ayuda.

Quiero agradecer al Dr. Julio Zygadlo y a todo su equipo de trabajo por su predisposición y colaboración en numerosos aspectos.

Durante mi estadía en la UC Davis conocí a investigadores que me ayudaron incondicionalmente en lo profesional y en lo personal. Quiero agradecer especialmente a mi

director de pasantía, Dr. Themis J. Michailides, por todo su apoyo, por invitarme a conocer su laboratorio y por ayudarme a conseguir los fondos para la realización de mi pasantía. Agradezco inmensamente al Dr. Juan Moral por todo el conocimiento transmitido más allá de aquel relacionado a lo laboral.

Finalmente, agradecer a mi soporte fundamental, que supone mi familia, en especial a mis padres, hermanos y mi abuela Irene. Agradezco a mi abuela Sara que, a pesar que te fuiste antes que todo esto comenzara, aún te siento muy presente. Claudia, te agradezco por ser mi compañera de vida y por hacerme mejor persona cada día. Gracias por tu apoyo incondicional en todas mis decisiones ¡Te amo mucho!

## **Dedicatoria**

*A Claudia y Antonio, por traer tanta felicidad a mi vida.*

## RESUMEN

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cultivos más importantes de Argentina, sembrado en nueve regiones (I a IX) con diferentes condiciones ambientales. En la última década, las regiones I y IV han desarrollado un marcado incremento en el área sembrada. Los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* incluyen patógenos prevalentes causantes de la “podredumbre de la espiga”. Si bien el rendimiento es afectado, también se produce una pérdida de calidad de grano debido a la presencia de micotoxinas. En algunas campañas agrícolas, la industria húmeda del maíz ha rechazado más del 30% de los granos provenientes directamente de campos de las regiones I y IV por posible contaminación con aflatoxinas (AF). *Aspergillus flavus* es considerado el principal agente causal de esta contaminación, pero también produce ácido ciclopiazónico (CPA), de alta toxicidad para humanos y animales. En otros países, existen productos comerciales para el biocontrol de aflatoxinas a campo, formulados con aislados atoxigénicos de *A. flavus*. Los aceites esenciales (AEs) sintetizados por plantas aromáticas poseen demostrada actividad antifúngica y se consideran seguros para el ambiente. El objetivo de este trabajo de tesis fue identificar potenciales agentes de biocontrol nativos y AEs efectivos para el manejo de *A. flavus* y *Penicillium* spp. Para alcanzar este objetivo se realizó: (a) Identificación de los géneros fúngicos presentes en espigas cultivadas en las regiones I y IV en dos campañas agrícolas; (b) caracterización de la población nativa de *A. flavus* e identificación de aislados atoxigénicos con habilidad competitiva; (c) determinación de los principales componentes de los AEs de orégano, menta, suico, laurel, romero y aguaribay cultivados en Argentina; (d) evaluación de la actividad antifúngica de los AEs contra cepas nativas de *A. flavus* y *Penicillium* spp.; estudio del efecto oxidativo en lípidos como modo de acción; (e) estudio de interacciones entre los AEs y con fungicida sintético para el control de *A. flavus* y *P. minioluteum*. *Fusarium* fue el género con mayor incidencia y severidad, seguido por *Penicillium* y *Aspergillus*. *A. flavus* estuvo presente en ambas regiones estudiadas, la mayoría de sus aislados ( $n=83$ ) no formaron esclerocios, 30% produjo AFs, 84% CPA y sólo 16% fueron atoxigénicos. Entre los no productores de AF, se registraron dos grupos de compatibilidad vegetativa mayoritarios. Los aislados AS03145 y AS04322 redujeron más del 70% el contenido de micotoxinas en granos de maíz, clasificándose como potenciales agentes de biocontrol. Los compuestos bioactivos en los AEs fueron: timol en orégano, mentol en menta, eucaliptol en laurel y romero, limoneno en suico y aguaribay. El AE de orégano presentó la mejor actividad antifúngica. Los AEs de menta, laurel y suico también fueron eficaces para el control de los hongos estudiados. La oxidación de lípidos fue marcada en suico, moderada en laurel y menta mientras que no se detectó en orégano. Las interacciones sinérgicas más marcadas se observaron en combinaciones de orégano con suico, laurel y mentas, posiblemente debido a su diferente modo de acción. Todos los AEs tuvieron efecto aditivo con el fungicida sintético. *A. flavus* se encuentra presente en granos de maíz desde el cultivo con alta capacidad para producir toxinas. Aislados atoxigénicos nativos mostraron características aptas para agentes de biocontrol. Los AEs se presentan como una herramienta para el control de *A. flavus* y pueden ser utilizados en aplicaciones a campo o en poscosecha. Esta práctica también contribuiría al control de *Penicillium* spp.

Palabras clave: aflatoxinas, ácido ciclopiazónico, sinergismo, control natural, biocontrol.

## ABSTRACT

Maize (*Zea mays* L.) is one of the main crops in Argentina, widely grown in nine regions (I – IX) under different agro-ecological conditions. In regions I and IV, the area planted with maize has greatly increased. The fungal genus *Aspergillus* and *Penicillium* are prevalent in spoilage of maize. In addition to the yield loss, this fungal species cause crop quality loss by the presence of mycotoxins. In Argentina, maize industry rejected more than 30% of kernels for possible contamination with aflatoxins (AF). *Aspergillus flavus* is considered as the major prominent species associated with this contamination but also can produce cyclopiazonic acid (CPA) which is highly toxic for both human and animal health. There are commercial products for biocontrol of aflatoxins, formulated with atoxigenic isolates of *A. flavus*. Essential oils (AEs) are natural compounds with demonstrated antifungal activity. The goal of this thesis was to identify potential native biocontrol agents and to control *Aspergillus flavus* and *Penicillium* spp. using AEs. The experiments were: (a) identification of the main fungal genus present in maize ears grown in regions I and IV; (b) characterization of the native *A. flavus* population and identification of potential biocontrol agents; (c) determination of major components in essential oil of oregano, mint, suico, bay, rosemary and aguaribay; (d) assessment of antifungal activity of AEs against *Aspergillus* y *Penicillium* spp; study of lipid oxidation as mechanism of action; (e) study of interactions between AEs and chemical fungicide. *Fusarium* was the fungal genera with the highest incidence and severity, followed by *Penicillium* and *Aspergillus*. *Aspergillus flavus* was isolated from ears grown in both regions and most of the isolates did not produce sclerotia. A 30% of the strains produced AF and 84% of them produced CPA. Only 16% of the isolates were determined as atoxigenic. Two major vegetative compatibility groups VCGs were identified within the non-aflatoxigenic population. The strains AS03145 and AS04322 reduce the content of mycotoxins more than 70% and are presented as potential biocontrol agents. The bioactive compounds in AEs were: thymol in oregano, menthol in mint, eucalyptol in bay and rosemary, limonene in suico and aguaribay. Oregano presented the best antifungal activity. Suico, mint and bay were also efficient to control the studied fungi. Suico showed a remarkable lipid oxidation, while mint and bay had a moderate effect. This effect was not observed in oregano. Synergistic interactions were observed in combinations of oregano with suico, mint and bay due to their different mechanisms of action. All the AEs had additive effect with the pesticide. *A. flavus*, among other fungi, is present in maize ears with a high capacity to produce mycotoxins. Native atoxigenic strains can be used as biocontrol agents. AEs are presented as natural strategy to control *A. flavus* in field or during the postharvest period. This tool would also control *Penicillium* spp.

Key words: aflatoxin, cyclopiazonic acid, synergism, natural control, biocontrol.

## TABLA DE CONTENIDO

Agradecimientos.....	iii
Dedicatoria.....	v
RESUMEN .....	vi
ABSTRACT.....	vii
TABLA DE CONTENIDO .....	viii
LISTA DE TABLAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvii
CAPÍTULO 1 .....	1
INTRODUCCIÓN .....	1
LA PLANTA DE MAÍZ.....	2
EL GRANO DE MAÍZ.....	3
PRODUCCIÓN Y CONSUMO MUNDIAL DE MAÍZ.....	3
PRODUCCIÓN Y DESTINO DEL MAÍZ EN ARGENTINA.....	5
PODREDUMBRE DE LA ESPIGA DEL MAÍZ.....	8
GÉNEROS <i>Aspergillus</i> y <i>Penicillium</i> .....	9
<i>Aspergillus flavus</i> Y SUS MICOTOXINAS .....	12
BIOCONTROL DE AFLATOXINAS .....	16
ACEITES ESENCIALES .....	18
HIPÓTESIS .....	21
OBJETIVO GENERAL.....	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
BIBLIOGRAFÍA .....	22
CAPÍTULO 2 .....	26
AISLAMIENTO DE <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Penicillium</i> spp. A PARTIR DE LA MICROBIOTA PRESENTE EN ESPIGAS DE MAÍZ.....	26
INTRODUCCIÓN.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS .....	29
SOLUCIÓN DE MICRONUTRIENTES PARA LA ELABORACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.....	29
MEDIOS DE CULTIVO PARA AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS .....	29
MUESTREO.....	32
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LA MICROBIOTA NATURAL PRESENTE EN ESPIGAS DE MAÍZ .....	34
IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> Y DE ESPECIES DE <i>Penicillium</i> .....	34
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> .....	37

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	39
MICROBIOTA PRESENTE EN ESPIGAS DE MAÍZ.....	39
INCIDENCIA Y SEVERIDAD DE <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> .....	41
AISLAMIENTO DE <i>Penicillium</i> spp.....	45
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> .....	46
CONCLUSIONES.....	48
BIBLIOGRAFÍA .....	49
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>52</b>
<b>CARACTERIZACIÓN DE CEPAS NATIVAS DE <i>Aspergillus flavus</i> PRESENTES EN ESPIGAS DE MAÍZ E IDENTIFICACIÓN DE POTENCIALES AGENTES DE BIOCONTROL.....</b>	<b>52</b>
INTRODUCCIÓN.....	52
MATERIALES Y MÉTODOS.....	56
MATERIAL VEGETAL .....	56
REACTIVOS PARA LA DETERMINACIÓN DE MICOTOXINAS .....	56
SOLUCIONES PARA LA ELABORACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO .....	56
MEDIOS DE CULTIVO PARA LA CARACTERIZACIÓN DE <i>Aspergillus flavus</i> .....	57
OBTENCIÓN DE CULTIVOS MONOSPÓRICOS Y PREPARACIÓN DE INÓCULO .....	61
PRODUCCIÓN DE ESCLEROCIOS EN CONDICIONES DE LABORATORIO.....	63
PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS EN MEDIO DE CULTIVO.....	63
PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS EN GRANOS DE MAÍZ.....	64
IDENTIFICACIÓN DE CEPAS NO PRODUCTORAS DE AFLATOXINAS .....	66
PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CICLOPIAZÓNICO EN MEDIO DE CULTIVO Y EN GRANOS DE MAÍZ.....	66
GRUPOS DE COMPATIBILIDAD VEGETATIVA .....	67
PATRONES DE AMPLIFICACIÓN DEL <i>CLUSTER</i> DE AFLATOXINAS .....	69
HABILIDAD COMPETITIVA DE AISLADOS ATOXIGÉNICOS .....	69
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	70
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	72
PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS Y CARACTERIZACIÓN DE ESCLEROCIOS .....	72
PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CICLOPIAZÓNICO .....	76
GRUPOS DE COMPATIBILIDAD VEGETATIVA .....	79
PATRONES DE AMPLIFICACIÓN DEL <i>CLUSTER</i> DE AFLATOXINAS .....	82
HABILIDAD COMPETITIVA DE AISLADOS ATOXIGÉNICOS .....	84
CONCLUSIONES.....	87
BIBLIOGRAFÍA .....	88
<b>CAPÍTULO 4 .....</b>	<b>92</b>
<b>COMPOSICIÓN QUÍMICA DE ACEITES ESENCIALES DE ESPECIES CULTIVADAS EN LA PROVINCIA DE CÓRDOBA.....</b>	<b>92</b>
INTRODUCCIÓN.....	92
MATERIALES Y MÉTODOS.....	94

MATERIAL VEGETAL .....	94
EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES Y SU RENDIMIENTO .....	94
COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES .....	95
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	96
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	97
RENDIMIENTO EN ACEITE ESENCIAL.....	97
COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES .....	98
CONCLUSIONES .....	110
<b>CAPÍTULO 5 .....</b>	<b>114</b>
<b>ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y MECANISMOS DE ACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES CONTRA <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Penicillium spp.</i> .....</b>	<b>114</b>
INTRODUCCIÓN.....	114
MATERIALES Y MÉTODOS.....	117
ACEITES ESENCIALES .....	117
AISLADOS FÚNGICOS.....	117
SOLUCIONES.....	117
MEDIOS DE CULTIVO .....	118
PROPAGACIÓN DE CEPAS Y PREPARACIÓN DEL INÓCULO FÚNGICO .....	118
ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA MEDIANTE MACRODILUCIÓN .....	118
ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA MEDIANTE MICRODILUCIÓN.....	119
DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIONES FUNGICIDAS E INHIBITORIAS MÍNIMAS.....	120
EFECTO OXIDATIVO DE LOS ACEITES ESENCIALES SOBRE LÍPIDOS DE MEMBRANA.....	121
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	121
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	123
ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	123
COMPARACIÓN ENTRE LAS METODOLOGÍAS APLICADAS PARA EVALUAR ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.....	129
EFECTO DE LOS ACEITES ESENCIALES SOBRE LÍPIDOS DE MEMBRANA ...	130
ANÁLISIS DE CONGLOMERADOS.....	134
CONCLUSIONES.....	136
BIBLIOGRAFÍA .....	137
<b>CAPÍTULO 6 .....</b>	<b>141</b>
<b>INTERACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES ENTRE SÍ Y CON FUNGICIDA SINTÉTICO PARA EL CONTROL DE <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Penicillium minioluteum.</i> 141</b>	<b>141</b>
INTRODUCCIÓN.....	141
MATERIALES Y MÉTODOS .....	144
ACEITES ESENCIALES .....	144
AISLADOS FÚNGICOS.....	144
FUNGICIDA SINTÉTICO.....	144
ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE COMBINACIONES ENTRE ACEITES ESENCIALES.....	144

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE COMBINACIONES ENTRE ACEITES ESENCIALES Y FUNGICIDA SINTÉTICO .....	144
ACTIVIDAD SINÉRGICA, ADITIVA O ANTAGÓNICA DE LAS COMBINACIONES .....	145
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	146
RESULTADOS .....	147
INTERACCIÓN ENTRE ACEITES ESENCIALES CONTRA <i>Aspergillus flavus</i> .....	147
INTERACCIÓN ENTRE ACEITES ESENCIALES CONTRA <i>Penicillium minioluteum</i> .....	152
INTERACCIÓN ENTRE ACEITES ESENCIALES Y FUNGICIDA SINTÉTICO PARA EL CONTROL DE <i>A. flavus</i> .....	155
INTERACCIÓN ENTRE ACEITES ESENCIALES Y FUNGICIDA SINTÉTICO PARA EL CONTROL DE <i>P. minioluteum</i> .....	158
DISCUSIÓN .....	160
CONCLUSIONES .....	163
BIBLIOGRAFÍA .....	164
<b>PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DE LA TESIS.....</b>	<b>171</b>
<b>FINANCIAMIENTO UTILIZADO PARA LA REALIZACIÓN DE LA TESIS .....</b>	<b>171</b>
<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>172</b>
Origen geográfico, caracterización de esclerocios, grupo de compatibilidad vegetativa y perfil toxigénico de los aislados nativos de <i>Aspergillus flavus</i> .....	172
<b>ANEXO 2 .....</b>	<b>175</b>
Interacción de aceites esenciales entre sí y con fungicida sintético para el control de <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Penicillium minioluteum</i> .....	175

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1. Producción mundial de maíz y principales países productores. ....	5
Tabla 2.1. Condiciones climáticas en las regiones maiceras en el período de floración durante las campañas analizadas.....	32
Tabla 2.2. Incidencia y severidad de los géneros fúngicos más frecuentes <i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i> y <i>Aspergillus</i> , presentes en espigas de maíz en dos regiones maiceras (I y IV) de Argentina durante las campañas 2012/2013 y 2013/2014. ....	39
Tabla 2.3. Severidad de <i>Aspergillus flavus</i> en espigas de maíz colectadas durante la campaña 2012/2013 y 2013/2014 en dos regiones maiceras argentinas.....	43
Tabla 2.4. Distribución geográfica de los aislados de <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> obtenidos durante las campañas 2012/2013 y 2013/2014 en dos regiones maiceras argentinas.....	44
Tabla 3.1. Aislados nativos de <i>Aspergillus flavus</i> obtenidos a partir de espigas de maíz cultivadas en dos regiones maiceras (I y IV) durante las campañas 2012/2013, 2013/2014 y 2014/2015. ....	62
Tabla 3.2. Clasificación según características fenotípicas de los mutantes obtenidos a partir de los aislados no aflatoxigénicos de <i>Aspergillus flavus</i> presentes en espigas de maíz en las regiones I y IV durante las campañas 2012/13, 2013/14 y 2014/15.....	68
Tabla 3.3. Producción de micotoxinas y caracterización de esclerocios de 27 aislados aflatoxigénicos de <i>Aspergillus flavus</i> presentes en espigas de maíz en las regiones I y IV durante las campañas 2012/13, 2013/14 y 2014/15. ....	75
Tabla 3.4. Grupos de compatibilidad vegetativa y producción de ácido ciclopiazónico en 56 aislados no productores de aflatoxina presentes en espigas de maíz en las regiones maiceras I y IV durante las campañas 2012/13, 2013/14 y 2014/15. ....	78
Tabla 3.5. Patrones de amplificación de <i>cluster</i> de aflatoxinas en aislados atoxigénicos de <i>Aspergillus flavus</i> nativos de Argentina. ....	83
Tabla 3.6. Producción de micotoxinas y porcentajes de reducción de ácido ciclopiazónico (CPA) y aflatoxina B <sub>1</sub> (AFB <sub>1</sub> ) en coinoculaciones de granos de maíz con aislados toxicogénicos y atoxicogénicos de <i>Aspergillus flavus</i> .....	86
Tabla 4.1. Rendimiento en aceite esencial de las plantas aromáticas.....	98
Tabla 4.2. Porcentajes relativos de los principales compuestos presentes en los aceites esenciales de tres especies de orégano de acuerdo a su orden de elusión en CG-EM.....	99
Tabla 4.3. Porcentajes relativos de los principales compuestos presentes en los aceites esenciales de dos variedades de menta de acuerdo a su orden de elusión en CG-EM.....	102
Tabla 4.4. Porcentajes relativos de los principales compuestos presentes en el aceite esencial de Laurel de acuerdo a su orden de elusión en CG-EM. ....	105

Tabla 4.5. Porcentajes relativos de los principales compuestos presentes en el aceite esencial de Romero de acuerdo a su orden de elusión en CG-EM.....	107
Tabla 4.6. Porcentajes relativos de los principales compuestos presentes en el aceite esencial de Aguaribay de acuerdo a su orden de elusión en CG-EM.....	109
Tabla 5.1. Concentración fungicida mínima ( $\mu\text{L L}^{-1}$ ) de los aceites esenciales contra <i>A. flavus</i> y <i>Penicillium</i> spp.....	128
Tabla 5.2. Regresiones lineales y valores de concentración inhibitoria mínima ( $\mu\text{L L}^{-1}$ ) de los aceites esenciales contra <i>A. flavus</i> y <i>Penicillium</i> spp. ....	128
Tabla 5.3. Porcentajes de inhibición del crecimiento para las concentraciones fungicidas mínimas ( $\mu\text{L L}^{-1}$ ) de aceites esenciales contra <i>A. flavus</i> y <i>P. minioluteum</i> de acuerdo a las dos metodologías aplicadas.....	130
Tabla 5.4. Valores de hidroperóxidos ( $\text{meq O}_2 \text{kg}^{-1}$ ) para los lípidos de membrana en los hongos estudiados.....	132
Tabla 6.1 Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales de orégano contra <i>Aspergillus flavus</i> según método aditivo y de Abbott. ....	148
Tabla 6.2. Combinaciones de aceite esencial de orégano con mentas, suico y laurel con actividad sinérgica contra <i>Aspergillus flavus</i> según método aditivo y de Abbott.....	149
Tabla 6.3. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales de menta, suico y laurel contra <i>Aspergillus flavus</i> según método aditivo y de Abbott. ....	152
Tabla 6.4. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales de orégano y mentas contra <i>Penicillium minioluteum</i> según método aditivo y de Abbott.....	154
Tabla 6.5. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales de orégano, suico y laurel contra <i>Penicillium minioluteum</i> según método aditivo y de Abbott.....	155
Tabla 6.6. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales y el fungicida sintético contra <i>Aspergillus flavus</i> según método aditivo y de Abbott.....	156
Tabla 6.7. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales y el fungicida sintético contra <i>Penicillium minioluteum</i> según método aditivo y de Abbott.....	158

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Estructura de la planta de maíz ( <i>Zea mays</i> L.). A: espiga con granos de maíz; B: espiga de maíz durante la floración (flor femenina); C: panoja (flor masculina).....	4
Figura 1.2. Mapa de la República Argentina indicando las regiones maiceras (I a IX) de acuerdo a INTA (1997).....	7
Figura 1.3. Espigas de maíz con diferentes grados de severidad de podredumbre de la espiga. Santiago de Estero, 2014.....	9
Figura 1.4. Imagen en microscopio del conidióforo de <i>Aspergillus candidus</i> . A: estipe; B: vesícula; C: métulas; D: fiálides; E: conidios. Imagen extraída de Pitt y Hocking (2009). .....	11
Figura 1.5. Microscopía electrónica mostrando la estructura de un <i>Penicillus</i> en <i>Penicillium</i> spp. A: estipe; B: fiálides; C: conidios. Imagen extraída de Pitt y Hocking (2009). .....	12
Figura 1.6. Estructura química de las principales aflatoxinas. AFB <sub>1</sub> : aflatoxina B <sub>1</sub> ; AFB <sub>2</sub> : aflatoxina B <sub>2</sub> ; AFG <sub>1</sub> : aflatoxina G <sub>1</sub> ; AFG <sub>2</sub> : aflatoxina G <sub>2</sub> . .....	15
Figura 1.7. Estructura química del ácido ciclopiazónico (CPA). .....	15
Figura 1.8. Producto comercial <i>Aspergillus flavus</i> AF36. A: antes de la esporulación. B: después de la esporulación. Imagen provista por Dr. Themis J. Michailides (Universidad de California-Davis, Estados Unidos). .....	18
Figura 1.9. Estructura química de algunos terpenos presentes en aceites esenciales. ....	20
Figura 1.10. Estructura química de algunos compuestos aromáticos presentes en aceites esenciales. ....	20
Figura 2.1. Puntos de colección de muestras de espigas de maíz en las regiones maiceras estudiadas, de acuerdo a INTA (1997). .....	33
Figura 2.2 Esquema de inoculación para la identificación de especies del género <i>Aspergillus</i> . .....	36
Figura 2.3. Esquema de inoculación para la identificación de especies del género <i>Penicillium</i> . 1 y 2: aislados con características morfológicas correspondientes a <i>Penicillium</i> . .....	36
Figura 2.4. Colonia con características similares a <i>Aspergillus flavus</i> aislada en medio de cultivo DRBC a partir de granos de maíz colectados y conservados en su espiga. ....	41
Figura 2. 5. Colonia de <i>Aspergillus flavus</i> en medio de cultivo MEA (izquierda) y AFPA (derecha) obtenida de granos de maíz colectados y mantenidos en su espiga. ....	45
Figura 2. 6. Colonias de <i>P. minioluteum</i> (izquierda) y <i>P. olsonii</i> (derecha) en medio agar Czapeck extracto de levadura. ....	46
Figura 2.7. Gel de electroforesis exhibiendo los productos de la PCR. M: marcador molecular (100 pb ADN Ladder); +: <i>A. flavus</i> 114116 (control positivo); -: <i>A. niger</i> (control negativo); 44, 46, 50 y 118: <i>A. flavus</i> aislados de la región I; 70, 71, 74, 76, 78, 94, 99, 100, 109 y 119: <i>A. flavus</i> aislados de la región I. ....	47

Figura 3.1. Aislado de <i>Aspergillus flavus</i> en medio de cultivo YES (tres réplicas) después del periodo de incubación.....	64
Figura 3.2. Aislado de <i>Aspergillus flavus</i> cultivado en granos de maíz para la determinación de aflatoxinas.....	65
Figura 3.3. Formación de heterocarión en la zona de interacción entre dos mutantes diferentes de un mismo aislado de <i>Aspergillus flavus</i> en medio agar almidón (AMD).....	68
Figura 3.4. Histogramas de frecuencia para aislados de <i>A. flavus</i> productores de micotoxinas presentes en espigas de maíz en las regiones I y IV durante las campañas 2012/2013, 2013/2014 y 2014/2015. (A) Aflatoxina B <sub>1</sub> ; (B) ácido ciclopiazónico.....	76
Figura 3.5. Mutante <i>niaD</i> <sup>-</sup> en medio de cultivo HYP (A), NIT (B) y CZ (C).....	81
Figura 3.6. Ensayo de complementación para aislados de <i>Aspergillus flavus</i> en medio de cultivo agar almidón. A y B: tester 1 y tester 2 para el VCG AM5. C: mutante obtenido a partir del aislado AS04001 perteneciente al VCG AM5.....	81
Figura 3.7. Gel de electroforesis visualizando productos de PCR para los marcadores de las regiones AC08 (897 pb) y AC09 (736 pb) del cluster de aflatoxinas y el control interno (115 pb) en aislados nativos de <i>Aspergillus flavus</i> . A: Marcador de peso molecular; B: AS00019; C: AS05739; D: AS03802; E: AS11108; F: AS12012; G: AS04001; H: AS10816; I: AS00001.....	84
Figura 4.1. Destilador tipo Clevenger para la obtención de aceite esencial.....	95
Figura 4.2. Porcentajes relativos de los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales de las tres variedades de oréganos estudiadas (Cordobés, Mendocino y Compacto). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las variedades de acuerdo al test LSD de Fisher ( $P < 0,05$ ).....	100
Figura 4.3. Estructura química de los principales componentes del aceite esencial de orégano.....	101
Figura 4.4. Estructura química de los principales componentes del aceite esencial de menta.....	103
Figura 4.5. Estructura química de los componentes del aceite esencial de suico.....	104
Figura 4.6. Estructura química de los dos compuestos mayoritarios en el aceite esencial de laurel.....	106
Figura 4.7. Estructura química de los tres compuestos mayoritarios en el aceite esencial de romero.....	108
Figura 4.8. Estructura química de los principales componentes del aceite esencial de aguaribay.....	109
Figura 5.1. Actividad antifúngica del aceite esencial de Orégano Cordobés (OCor) contra <i>A. flavus</i> AS0001. A: Control; B: OCor 800 $\mu\text{L}^{-1}$ .....	124
Figura 5.2. Valores de hidroperóxidos ( $\text{meq O}_2 \text{ kg}^{-1}$ ) para <i>Aspergillus flavus</i> (A: AS00001; B: CCC 116-83) después de 72 hs de incubación con aceites esenciales: Control (sin	

agregado de aceite esencial), OCor (*Origanum vulgare* ssp *hirtum*), OMen (*Origanum x majoricum*), OCom (*Origanum vulgare* ssp. *Vulgare*), Su (*Tagetes minuta*), Mi (*Mentha x piperita* var. *Vulgaris Sole*), Mp (*Mentha x piperita*), La (*Laurus nobilis*), Ro (*Rosmarinus officinalis*) and Ag (*Schinus molle*). Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a Test de DGC ( $P < 0.05$ ). ..... 133

Figura 5.3. Valores de hidroperóxidos (meq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>) para *P. minioluteum* (A) y *P. oxalicum* (B) después de 72 hs de incubación con aceites esenciales: Control (sin agregado de aceite esencial), OCor (*Origanum vulgare* ssp *hirtum*), OMen (*Origanum x majoricum*), OCom (*Origanum vulgare* ssp. *Vulgare*), Su (*Tagetes minuta*), Mi (*Mentha x piperita* var. *Vulgaris Sole*), Mp (*Mentha x piperita*), La (*Laurus nobilis*), Ro (*Rosmarinus officinalis*) and Ag (*Schinus molle*). Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a Test de DGC ( $P < 0.05$ ). ..... 133

Figura 5.4. Dendograma elaborado a partir del análisis de conglomerados y agrupamiento de los aceites esenciales de acuerdo a su efecto sobre los hongos estudiados. OCor (*Origanum vulgare* ssp *hirtum*), OMen (*Origanum x majoricum*), OCom (*Origanum vulgare* ssp. *Vulgare*), Su (*Tagetes minuta*), Mi (*Mentha x piperita* var. *Vulgaris Sole*), Mp (*Mentha x piperita*), La (*Laurus nobilis*), Ro (*Rosmarinus officinalis*) and Ag (*Schinus molle*). ..... 135

Figura 6.1. Efecto resultante de las combinaciones entre los aceites esenciales contra *Aspergillus flavus* de acuerdo al método Abbott. O: *Origanum x majoricum* + *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* + *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* clon; M: *Mentha x piperita* var. *Vulgaris Sole* + *Mentha x piperita*; S: *Tagetes minuta*; L: *Laurus nobilis*. ..... 147

Figura 6.2. Efecto resultante de las combinaciones entre los aceites esenciales contra *Penicillium minioluteum* de acuerdo al método Abbott. O: *Origanum x majoricum* + *Origanum vulgare* ssp *vulgare* + *Origanum vulgare* ssp *hirtum* clon; M: *Mentha x piperita* var. *Vulgaris Sole* + *Mentha x piperita*; S: *Tagetes minuta*; L: *Laurus nobilis*. ..... 153

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C: grados centígrados.

$\alpha$ : alfa.

$\beta$ : beta.

$\beta_0$ : ordenada al origen.

$\beta_1$ : pendiente de la recta.

$\gamma$ : gamma.

$\mu\text{g g}^{-1}$ : microgramos por gramo.

$\mu\text{L}$ : microlitros.

$\mu\text{L L}^{-1}$ : microlitros por litro.

$\mu\text{m}$ : micrómetros.

(E): isómero cis.

(Z): isómero trans.

AA: agar agua.

AE: aceite esencial.

AC: análisis de conglomerados.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

AFB<sub>1</sub>: aflatoxina B<sub>1</sub>.

AFB<sub>2</sub>: aflatoxina B<sub>2</sub>.

AFG<sub>1</sub>: aflatoxina G<sub>1</sub>.

AFG<sub>2</sub>: aflatoxina G<sub>2</sub>.

AFPA: Agar *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*.

Ag: Schinus molle L. (aguaribay).

AMD: almidón agar.

ANOVA: análisis de la varianza.

AS: agar semisólido.

ATP: adenosina trifosfato.

C<sub>x</sub>: número de carbonos.

CG-EM: cromatografía gaseosa y espectrometría de masas.  
CFM: concentración fungicida mínima.  
CIM: concentración inhibitoria mínima.  
cm: centímetro.  
CMA: Agar harina de maíz.  
*cnx*: mutantes incapaces de utilizar hipoxantina y nitrato.  
CPA: ácido ciclopiazónico.  
c.s.p.: cantidad suficiente para.  
CYA: Agar Czapek Extracto de Levadura.  
CY20S: Agar Czapek Extracto de Levadura 20% Sacarosa.  
CZ: Agar Czapek dox.  
dATP: Desoxiadenosina trifosfato.  
dCTP: Deoxicitidina trifosfato.  
dGTP: Deoxiguanosina trifosfato.  
DG18: Agar diclorán glicerol 18%.  
DMSO: dimetil sulfóxido.  
dNTP: desoxirribonucleótido trifosfato.  
dTTP: desoxitimidina trifosfato.  
DRBC: diclorán rosa de bengala.  
EOR: especie reactiva del oxígeno.  
EPA: Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos.  
F: fungicida sintético.  
FID: detector de ionización de llama.  
g: gravedad.  
g: gramo.  
G25N: Agar Nitrato 25% Glicerol.  
HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia.  
hs: horas.  
HYP: hipoxantina agar.  
IA: índice de Abbott.

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.  
IR: índice de retención.  
L: aislados de *A. flavus* productores de esclerocios tipo L.  
La: *Laurus nobilis* L. (laurel).  
LP: Lixiviado de papa y glucosa.  
MEA: Agar extracto de malta.  
meq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>: miliequivalentes de oxígeno por kilogramo.  
Mi: *Mentha x piperita* L. var. *Vulgaris Sole* (menta inglesa).  
mL: mililitro.  
mm: milímetros.  
mM: milimolar.  
min: minuto.  
Mp: *Mentha x piperita* L. (menta Pehuajó).  
MSD: espectrómetro de masas.  
MTT: 3-4(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio.  
MTT-formazán: forma reducida del MTT.  
*n*: numero muestral.  
n°/cm<sup>2</sup>: número por centímetro cuadrado.  
NA: nitrito agar.  
ng g<sup>-1</sup>: nanogramos por gramo.  
*niaD*: mutantes incapaces de utilizar nitrato.  
*nirA*: mutantes incapaces de utilizar nitrito y nitrato.  
*nit*: mutantes.  
nM: nanomoles.  
NP: aislados de *A. flavus* no productores de esclerocios.  
o: orto.  
OCom: *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* (orégano compacto).  
OCor: *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* clon (orégano cordobés).  
OMen: *Origanum x majoricum* Cambess. (orégano mendocino).  
*P*: p-valor.

pb: pares de bases.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PDA: papa glucosado agar.

pH: potencial de hidrógeno.

PAC: Patron de amplificación del cluster de aflatoxinas.

PIC: porcentaje de inhibición del crecimiento.

PICE: porcentaje de inhibición del crecimiento esperado.

PICO: porcentaje de inhibición del crecimiento observado experimentalmente.

*r*: coeficiente de correlación.

R<sup>2</sup>: nivel de significancia.

Ro: *Rosmarinus officinalis* L. (romero).

RPMI: medio RPMI-1640.

S: aislados de *A. flavus* productores de esclerocios tipo S.

SEL: medio de selección.

SMN: servicio meteorológico nacional de la República Argentina.

Su: *Tagetes minuta* L. (suico).

TLC: cromatografía en capa delgada.

Tr: tiempo de retención.

v/p: volumen/peso.

UNC: Universidad Nacional de Córdoba.

VCA: análisis de compatibilidad vegetativa.

VCG: grupos de compatibilidad vegetativa.

VHP: valor de hidroperóxido.

YES: extracto de levadura y sacarosa.

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los tres cultivos más importantes en Argentina. Es el insumo clave de una creciente variedad de industrias, que abarcan desde su uso como alimento humano y forraje en producción de carne o leche, hasta su procesamiento industrial, cuyo producto final es bebida, alimento o biocombustible (MAIZAR, 2013).

Bajo ciertas condiciones ambientales, el maíz puede ser infectado por los hongos causales de la “podredumbre de la espiga”. En esta enfermedad, el proceso de infección toma lugar principalmente en dos periodos durante el desarrollo del cultivo. El primero y más importante, ocurre mediante colonización de los estigmas durante la floración del cultivo, más precisamente en estado fisiológico R1. En madurez, el cultivo permanece vulnerable a la contaminación, momento en el cuál un segundo periodo de contaminación puede ocurrir (Cotty *et al.*, 2008; Presello y Botta, 2004). Además de la pérdida de rendimiento, esta enfermedad disminuye la calidad de grano por la presencia de micotoxinas. Estos patógenos tienen la capacidad de crecer en condiciones de baja disponibilidad de agua, pudiendo continuar su crecimiento y síntesis de micotoxinas durante el almacenamiento de los granos (Presello y Botta, 2004). Dentro de estos patógenos, *Aspergillus flavus* ha recibido una gran atención debido a la alta toxicidad de sus micotoxinas, en especial las aflatoxinas. En el año 2011, la industria húmeda argentina del maíz registró un rechazo promedio del 30% de las partidas de grano provenientes de lotes con estrés hídrico, por posible contaminación con estas micotoxinas (reunión efectuada entre MINCyT Córdoba, IPA VE-CIAP-INTA, ARCOR SAIC y CEPROCOR, Córdoba, 2012).

Una forma muy empleada para controlar los hongos del maíz es el control químico. Las aplicaciones frecuentes de fungicidas sintéticos provocan una presión de selección que resulta en el predominio de razas resistentes de los patógenos y en el consecuente incremento de las dosis utilizadas para su control (Gullino *et al.*, 2000). En general, estos

productos presentan una lenta tasa de degradación, alta persistencia en suelo, acumulación en napas de agua y existen evidencias de que su uso provoca reducciones en las tasas de multiplicación de los hongos benéficos (Sosa-Gomez *et al.*, 2003). Considerando los posibles daños ambientales y a la salud humana, la demanda de productos con nulo residuo de fitoterápicos crece en el mundo y el uso de fungicidas se recomienda en caso de que no existan otras estrategias de manejo de la enfermedad o como parte de un programa integrado (Reis *et al.*, 2002).

Actualmente se buscan alternativas de manejo de enfermedades que minimicen el impacto ambiental negativo de los fungicidas sintéticos. En Estados Unidos y algunos países de África existen productos comerciales (*A. flavus* AF36 y afla-guard®) para el biocontrol de aflatoxinas en maíz que son utilizados durante el desarrollo del cultivo como parte de las prácticas agronómicas habituales. Este insumo es aplicado directamente en el suelo, entre el estado de crecimiento V7 y la aparición de los estigmas. El objetivo principal de esta práctica es evitar la colonización de los estigmas por parte de aislados de *Aspergillus flavus* productores de aflatoxinas (Mehl *et al.*, 2012). Otra alternativa es el empleo de aceites esenciales (AEs), compuestos naturalmente elaborados por las plantas con el fin de protegerse de plagas y enfermedades. Estas sustancias son consideradas seguras para el medioambiente y el consumo humano. Los AEs han sido probados con éxito sobre numerosos hongos fitopatógenos (Camiletti *et al.*, 2016; Passone y Etcheverry, 2014; Gadban, 2011; Lucini, 2004). Debido a sus propiedades antimicrobianas, los AEs han sido aplicados para la conservación poscosecha de alimentos (Asensio, 2013; Saharkhiz *et al.*, 2012; Bluma y Etcheverry, 2008).

## **LA PLANTA DE MAÍZ**

Desde el punto de vista botánico, el maíz pertenece a la familia de las poáceas siendo una planta anual, de gran porte (1,2 a 3 m de alto) y con un extenso sistema radicular. Es una especie de polinización cruzada con flores femeninas (espiga) y masculinas (panoja) ubicadas en partes diferentes de una misma planta (Figura 1.1). El grano se desarrolla en la espiga que se presenta comúnmente en forma única en una planta. Los granos pueden presentarse de diferentes colores como colorado o morado, pero principalmente son de color amarillo (FAO, 1992).

La planta de maíz puede definirse como un sistema metabólico en el cuál el producto final es principalmente almidón depositado en órganos especializados, constituyendo los granos de maíz. El desarrollo de la planta de maíz puede separarse en dos estados fisiológicos (FAO, 1992):

1. Estado vegetativo: desarrollo y diferenciación de los diferentes tejidos hasta el momento que aparecen los estigmas en la flor masculina.
2. Estado reproductivo: comienza con la fertilización de la estructura femenina en la cual se desarrollarán los granos y termina con la senescencia de la planta.

La morfología o arquitectura de la planta ha sufrido la presión de la selección que ha resultado en una gran variabilidad en el número de hojas, altura de planta, posición de la espiga, número de espigas por planta, ciclo de maduración, tipo de grano, número de fila de granos y número de granos, entre otras características. Los principales componentes del rendimiento incluyen el número y el peso de los granos (FAO, 1992).

## **EL GRANO DE MAÍZ**

Los granos de maíz, ubicados en la espiga, se desarrollan a través de los productos de fotosíntesis, absorción radicular del agua y otros metabolitos sintetizados por la planta. La espiga puede contener de 300 a 1000 granos dependiendo del número de filas como así también del largo y diámetro de la mazorca. El grano de maíz es botánicamente definido como una cariopsis con cuatro estructuras principales: pericarpio (5-6%), aleurona (2-3%), endosperma (80-85%) y germoplasma (10-12%) (FAO, 1992).

## **PRODUCCIÓN Y CONSUMO MUNDIAL DE MAÍZ**

El maíz es cultivado mundialmente, aunque con diferencias entre países para superficie sembrada y rendimiento. Se estima que la producción mundial de este cultivo alcanzará los 1.049 millones de toneladas durante la campaña 2016/2017. La Tabla 1.1 presenta los principales países productores de maíz en el mundo, donde Estados Unidos, China y Brasil cosechan el 63, 21 y 9% de la producción total (USDA, 2017b). El destino final de los granos es exportación, alimentación de animales, consumo humano o industrialización para la producción de etanol.

En cuanto a consumo humano, los países del África y Centro América representan los mayores consumos con valores de 328 y 267 g/persona/día, respectivamente (Ranum *et al.*, 2014).

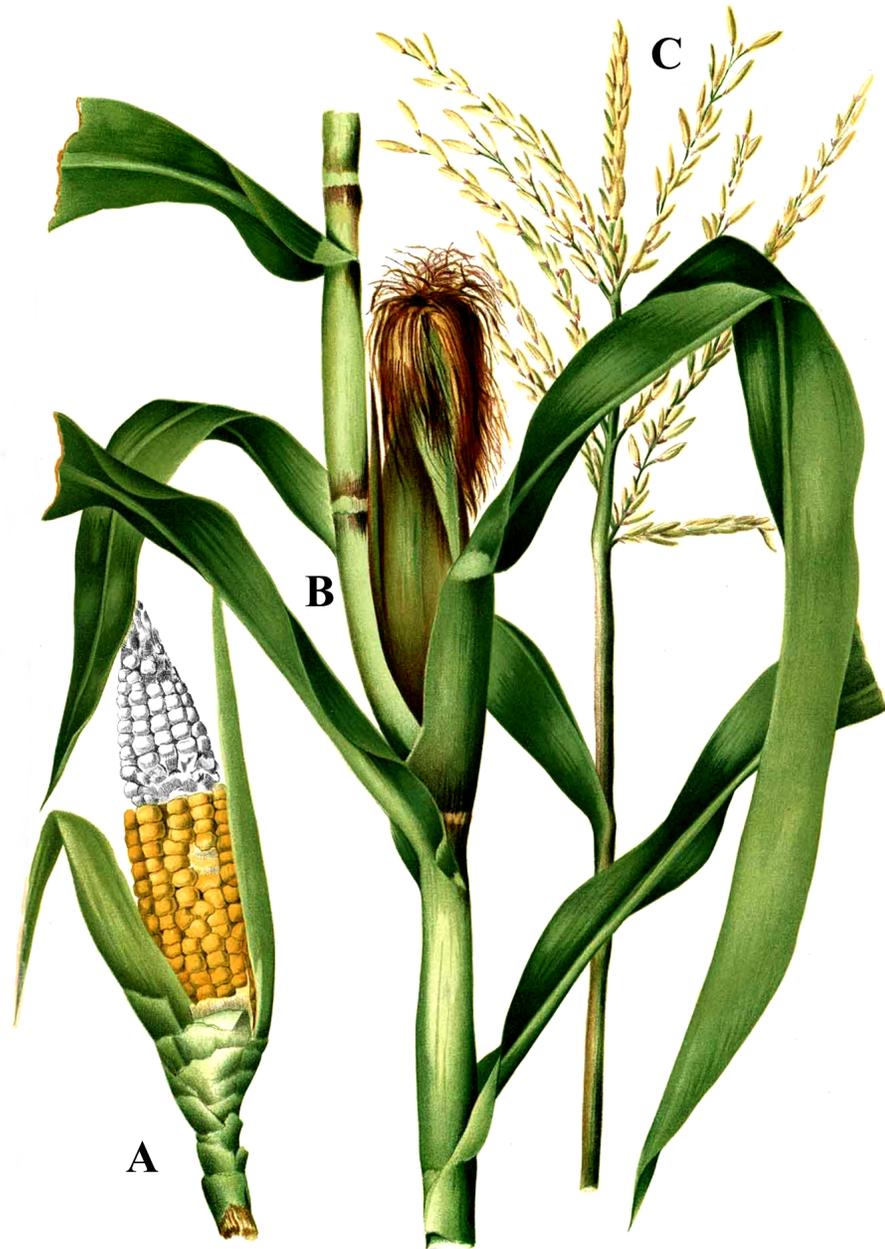


Figura 1.1. Estructura de la planta de maíz (*Zea mays* L.). A: espiga con granos de maíz; B: espiga de maíz durante la floración (flor femenina); C: panoja (flor masculina). Ilustración extraída de Blanco (1837).

Tabla 1.1. Producción mundial de maíz y principales países productores.

País	Producción de maíz (millones de toneladas)		
	2014/2015	2015/2016	2016/2017
Argentina	29,750	29,000	37,500
Brasil	85,00	67,000	91,500
Canadá	11,487	13,559	13,200
China	215,646	224,632	219,554
Etiopía	7,235	5,050	6,300
Unión Europea	75,734	58,410	60,295
India	24,170	22,570	26,000
Indonesia	9,000	10,500	10,200
México	25,480	25,971	26,000
Nigeria	7,515	7,000	7,200
Filipinas	7,671	6,970	7,900
Rusia	11,325	13,168	15,500
Serbia	7,700	6,000	7,500
Sudáfrica	10,629	8,214	14,600
Ucrania	28,450	23,333	28,000
Estados Unidos	361,091	616,348	664,464
Otros	97,701	94,971	93,215
Total	1.015,584	961,854	1.049,246

## PRODUCCIÓN Y DESTINO DEL MAÍZ EN ARGENTINA

La producción argentina de maíz hasta mediados de la década del 90 promediaba 10 millones de toneladas; pero a partir de la campaña 1996/97 comienza a experimentar un constante crecimiento, pasando de una tasa anual de crecimiento del 3,3% a una del 8,8% (MAIZAR, 2013). Actualmente se pronostica un record para la producción de este cultivo en nuestro país, que alcanzaría una producción total de 39 millones de toneladas durante la campaña 2017/2018 (USDA, 2017a).

La superficie sembrada con maíz en Argentina alcanza los 5 millones de hectáreas, distribuidas en nueve regiones (Figura 1.2) con diferentes condiciones agro-ecológicas a lo largo del país (INTA, 1997). La producción se centra principalmente en las regiones VI, VIII, IX y

zona este de las regiones IV y VII, que juntas constituyen la “región núcleo”. Estas regiones concentran el 70% de la superficie total de maíz sembrado en el país, y contribuyen con el 77% de la producción nacional. El resto de las regiones donde se produce maíz se conocen como “regiones marginales”, en la cual se vienen verificando una serie de factores que están beneficiando la producción de maíz en esta zona. El mejoramiento genético de la semillas permitió la expansión del cultivo a zonas más frías, secas, y menos fértiles que desembocaron en el desarrollo de nuevas tecnologías para estas regiones (MAIZAR, 2013).

El principal destino del maíz argentino es la exportación; por lo tanto, dada la incidencia del costo de los fletes, la producción de maíz se concentra principalmente en aquellas provincias que están más cerca de los puertos (MAIZAR, 2013). Del total producido, cerca del 65% es exportado a más de 150 países, generando 4.000 millones de dólares por año. Los principales compradores de maíz argentino son Vietnam, Egipto, Algeria, Malasia y Sudáfrica, contabilizando esto un 57% del total exportado. Estos hechos hacen que Argentina sea el segundo exportador más importante del mundo. La ventana de exportación para el maíz argentino ha cambiado significativamente en los último cinco años. El maíz temprano se cosecha en los meses de marzo-abril, mientras que la cosecha de maíz tardío se realiza durante los meses de junio-julio (USDA, 2017a).

En cuanto al consumo interno, estimado en 11 millones de toneladas para la campaña 2017/2018, la principal demanda proviene del sector industrial (USDA, 2017a). Hoy en día se está incrementando aceleradamente la demanda nacional de alimentos balanceados por el sector pecuario. Es así que, en el 2012 el destino de la producción de maíz fue liderado por la ganadería bovina de carne, seguida por la avicultura, la lechería y la ganadería porcina. Este sector demanda casi el 90% del maíz destinado a consumo interno mientras que el resto es utilizado para molienda húmeda y seca. La producción de biocombustible ha tomado un rol relevante en la cadena industrial de maíz. Es importante resaltar que, aunque en muy pocos casos, el maíz es consumido por la unidad familiar como alimento (MAIZAR, 2013).

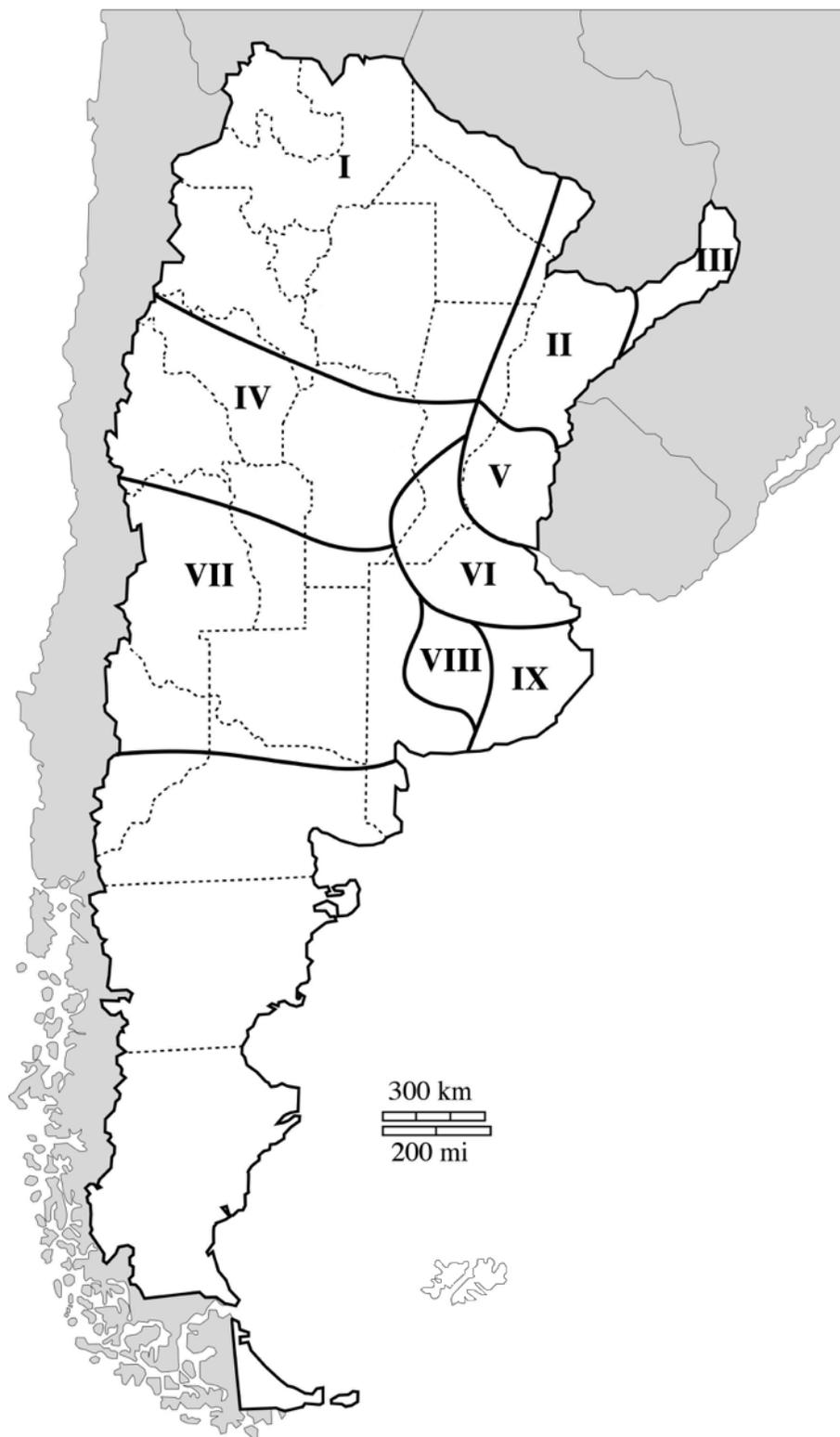


Figura 1.2. Mapa de la República Argentina indicando las regiones maiceras (I a IX) de acuerdo a INTA (1997).

## PODREDUMBRE DE LA ESPIGA DEL MAÍZ

El cultivo de maíz puede ser afectado por enfermedades que se agrupan en dos clases: las infecciosas y las no infecciosas. Las primeras son aquellas causadas por hongos, bacterias, virus y nematodos, mientras que las segundas son causadas por exceso o deficiencia de nutrientes, altas o bajas temperaturas, alcalinidad o acidificación del suelo, entre otras causas (Shurtleff, 1980). Dentro del tipo infeccioso, se encuentran las enfermedades conocidas como “podredumbres de la espiga” causadas por hongos. Varios estudios han demostrado que los géneros prevalentes son *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp (Presello y Botta, 2004). Las espigas afectadas presentan proliferación de micelio que varía en color e intensidad dependiendo del hongo que esté produciendo la infección (Figura 1.3). La mayoría de estos patógenos son de tipo necrótrofo, con bajo nivel de especificidad, pudiendo proliferar tanto en tejido vegetales vivos como en restos orgánicos (rastrojo) o directamente en el suelo (Presello y Botta, 2004).

El proceso de infección se encuentra influenciado por diversos factores biológicos, como la interacción entre los patógenos fúngicos y el daño por insectos, o físicos como la temperatura, actividad agua y presencia de fungicidas químicos. El ciclo de las podredumbres de espiga comienza a partir de esporas sexuales o asexuales que pasaron el invierno en cultivos invernales o en rastrojo. Las esporas son transportadas mediante agentes abióticos (viento, impacto de las gotas de lluvia) y bióticos (insectos, pájaros) hacia la espiga de maíz donde encuentran dos vías principales de entrada; los estigmas en floración y las heridas en los granos en desarrollo. La colonización de los estigmas ocurre con mayor intensidad luego de la polinización y puede prolongarse hasta la senescencia de los mismos. Una vez que los estigmas han sido colonizados, las hifas pueden crecer a través de ellos y llegar al grano. Generalmente estos hongos no invaden a través del pericarpio sano de los granos, pero cuando se encuentran heridas a través de las chalas, unos pocos granos pueden ser colonizados y comenzar la infección (Presello y Botta, 2004).

Los granos afectados por la enfermedad presentan una menor densidad que los granos normales y en algunos casos se observa una pérdida total de los mismos con el consecuente

impacto en el rendimiento. Presello y Botta (2004) señalaron una reducción promedio de 1,25 g/planta por cada unidad de incremento del porcentaje de espiga infectada. Estas enfermedades afectan tanto la productividad como la calidad del grano debido a la presencia de metabolitos secundarios tóxicos para humanos y animales, denominados micotoxinas. Las principales micotoxinas en maíz son las producidas por *Fusarium* spp. (fumonisinas, tricotecenos, zearalenonas), *Aspergillus* spp. (aflatoxinas, ácido ciclopiazónico, ocratoxinas) y *Penicillium* spp. (ocratoxina, citrimina) (Garrido *et al.*, 2012; Pitt y Hocking, 2009).



Figura 1.3. Espigas de maíz con diferentes grados de severidad de podredumbre de la espiga. Santiago de Estero, 2014.

## **GÉNEROS *Aspergillus* y *Penicillium***

El género fúngico *Aspergillus* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza e incluye más de 200 especies. Su prevalencia, facilidad para ser cultivado en medio de cultivo e importancia económica han llevado a que sea uno de los géneros fúngicos más estudiados. Su dispersión ocurre principalmente mediante esporas que pueden viajar con el viento a distancias que dependen de las condiciones climáticas. Cuando una espora se deposita sobre una superficie (sólida o líquida) bajo condiciones ambientales adecuadas de temperatura y humedad, se

produce la germinación. Las especies pertenecientes a este género se caracterizan por producir enzimas para la degradación de almidón, celulosa, pectinas y otros polímeros (Bennett, 2010). Debido a esto, pueden crecer sobre un rango amplio de sustratos naturales tales como maderas, textiles, cemento y medicamentos entre otros (Pitt y Hocking, 2009). Los alimentos destinados a humanos y animales constituyen una excelente fuente nutricional para el crecimiento de *Aspergillus* (Bennett, 2010). Existen muy pocos alimentos o commodities en los cuales *Aspergillus* no sea aislado frecuentemente (Pitt y Hocking, 2009).

Las especies del género *Penicillium* son los causantes más comunes de deterioro de alimentos frescos como frutas y vegetales en las zonas de clima templado. Este género es el más diverso en términos de número de especies y rango de hábitat. Se han caracterizado aproximadamente 200 especies de las cuales 70 son de interés y significancia en los alimentos y de ellas, 30 son de incidencia amplia. La mayoría de las especies son ubicuas y saprófitas oportunistas, crecen en una gran variedad de ambientes con fuentes de carbono y condiciones fisicoquímicas diversas. Si bien son hongos típicos de suelo, también contaminan los vegetales en descomposición y crecen en hábitat seco, tales como semillas, madera, cuero, textiles, etc. Además, algunos miembros de este género están asociados a la producción de alimentos de consumo humano como quesos y embutidos fermentados, dándole al producto el aroma, el sabor y una apariencia característica (Pitt y Hocking, 2009).

*Aspergillus* compite con los géneros *Penicillium* y *Fusarium* por la dominancia dentro de la población fúngica alrededor del mundo. *Aspergillus* ha perdido la diversidad que posee *Penicillium*, pero posee la habilidad para crecer a altas temperaturas o baja disponibilidad de agua. Usualmente *Aspergillus* crece más rápidamente que *Penicillium*, pero necesita más tiempo para producir esporas. Resulta apropiado indicar que *Penicillium* domina en zonas templadas mientras que *Aspergillus* lo hace en zonas tropicales. *Aspergillus* se encuentra más abundantemente entre las latitudes 26°N y 35°S (Pitt y Hocking, 2009).

Desde el punto de vista morfológico, los miembros del género *Aspergillus* se caracterizan por formación de conidióforos (Figura 1.4), en los cuáles largos estipes terminan en una forma “globosa” denominada vesícula. Las vesículas pueden ser esféricas o ligeramente elongadas.

Sobre estas estructuras, se disponen las fiálides o métulas y fiálides, siendo comúnmente encontradas en forma simultáneas. Los conidios (esporas) se formar a partir de las fiálides. En cuanto a *Penicillium*, los conidios se producen en una estructura denominada “Penicillus” (Figura 1.5) que consiste en fiálides o células similares con conidios en cadenas. Las fiálides pueden estar unidas directamente al estipe o en forma de cadena (Pitt y Hocking 2009).

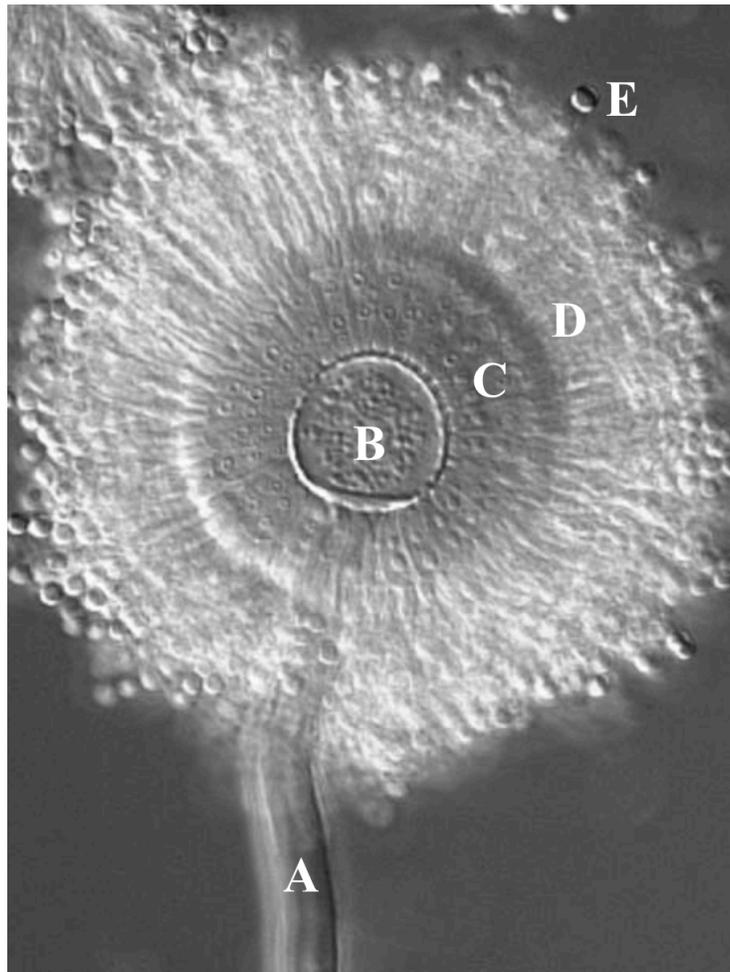


Figura 1.4. Imagen en microscopio del conidióforo de *Aspergillus candidus*. A: estipe; B: vesícula; C: métulas; D: fiálides; E: conidios. Imagen extraída de Pitt y Hocking (2009).

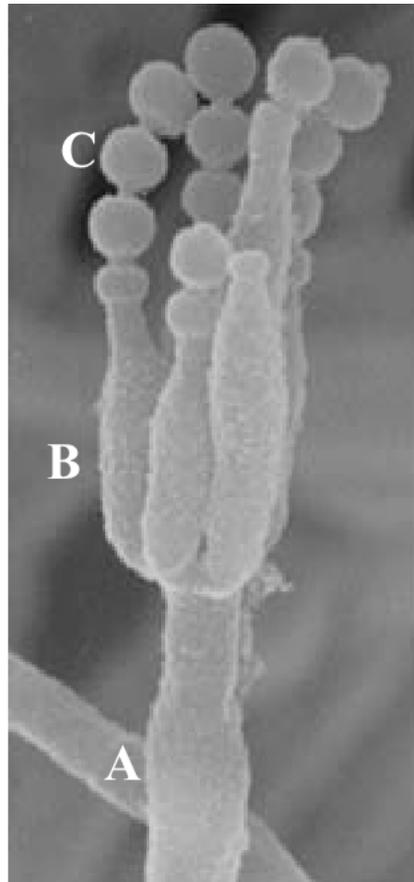


Figura 1.5. Microscopía electrónica mostrando la estructura de un *Penicillium* en *Penicillium* spp. A: estipe; B: fialides; C: conidios. Imagen extraída de Pitt y Hocking (2009).

## ***Aspergillus flavus* Y SUS MICOTOXINAS**

Un número pequeño de especies pertenecientes al género *Aspergillus* se encuentran asociadas a plantas, dónde compiten directamente con otros géneros como *Fusarium* y *Penicillium*. Entre estas especies se encuentra *Aspergillus flavus*, capaz de contaminar productos agropecuarios primarios en el campo, durante la cosecha, en almacenamiento o durante su procesado industrial (Diener *et al.*, 1987). La presencia de *A. flavus* ha sido reportada en números cultivos como algodón, frutos secos, higos, maíz y maní entre otros (Donner *et al.*, 2015; Doster *et al.*, 2014; Perrone *et al.*, 2007; Diener, 1989).

En general, estudios ecológicos indican que *A. flavus* tiene la capacidad de crecer en sustratos con actividad agua entre 0,76 y 0,98. En cuanto a la temperatura, esta especie crece en un rango entre 15 y 45°C, con un óptimo de 30°C (Pitt y Hocking, 2009; Giorni, 2007).

*Aspergillus flavus* y otras especies de la sección *Flavi* como *A. parasiticus* y *A. fumigatus*, producen metabolitos secundarios tóxicos denominados aflatoxinas (Figura 1.6). Estas micotoxinas incluyen un grupo de 20 metabolitos químicamente relacionados, de los cuáles cuatro tipos mayoritarios han sido identificados como B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> (Wu *et al.*, 2013). Estas micotoxinas recibieron su nombre de acuerdo al color de la fluorescencia emitida bajo luz ultravioleta a 365 nm en técnicas cromatográficas, siendo B por “blue” y G por “Green” (Hartley *et al.*, 1963). Otros tipos de aflatoxinas, denominadas aflatoxina M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>, han sido hallados en leche producida por vacas lecheras alimentadas con suplementos contaminados con a aflatoxina B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>, respectivamente (van Egmond, 1989). Las aflatoxinas poseen una gran estabilidad térmica, con temperaturas de degradación entre 237 y 306 °C (Kabak, 2009). La presencia de aflatoxinas en productos de origen animal es explicado por la contaminación del alimento para ganado con estas micotoxinas (Peraica y Domijan, 2001).

El perfil de aflatoxinas sintetizada puede ser utilizado para la identificación de ciertas especies. En general, *A. flavus* produce aflatoxina del tipo B, mientras que *A. parasiticus* produce los cuatro tipos mayoritarios de aflatoxina. Sin embargo, se han reportados casos de aislados de *A. flavus* que producen simultáneamente aflatoxina G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> en adición a las del tipo B (Perrone *et al.*, 2014). Estos aislados han sido colectados en Argentina, Tailandia y Australia aunque su taxonomía exacta permanece sin definirse (Perrone *et al.*, 2014; Donner *et al.*, 2009; Vaamonde *et al.*, 2003). La capacidad para producir aflatoxinas presenta una gran variabilidad entre los aislados de *A. flavus*, con algunos de ellos produciendo mayores cantidades que otros. Dentro de esta variabilidad también se encuentran los aislados que no producen ningún tipo de aflatoxinas y que son denominados como “no aflatoxigénicos” (Cotty *et al.*, 2008).

La presencia de aflatoxinas en alimentos tiene importancia debido a su alta toxicidad. Estas sustancias, especialmente la aflatoxina B<sub>1</sub>, son agentes hepatocarcinógenos que inducen tumores en el hígado en animales y humanos (Wang and Tang, 2004). Por ejemplo, maíces

altamente contaminados han sido implicados en aflatoxicosis agudas ocurridas en los años 1981 y 2004 en Kenia (Strosnider *et al.*, 2006). La Agencia Internacional para Investigación en Cáncer, ha clasificado a las aflatoxinas dentro de la Clase 1 (más peligrosa), como agentes carcinogénicos (IARC, 1993). Actualmente, el maíz posee un límite máximo de aflatoxinas totales para su comercialización, aunque varía entre países (Wu, 2015). Por ejemplo, la Unión Europea establece este límite en  $4 \text{ ng g}^{-1}$  mientras que, en Argentina la normativa permite hasta  $20 \text{ ng g}^{-1}$  de aflatoxinas totales (ANMAT, 2017; Wu, 2015).

*A. flavus* puede producir simultáneamente ácido ciclopiazónico (CPA; Figura 1.7), otro tipo de micotoxina con efecto tóxico demostrado (Perrone *et al.*, 2014; Vaamonde *et al.*, 2003). Este metabolito es un ácido indol-tetrámico que produce un amplio rango de efectos adversos en animales de ganado. Los efectos incluyen entre otros, necrosis en hígado, convulsiones y lesiones en el miocardio entre otros (Cullen *et al.*, 1988; Lomax *et al.*, 1984). El consumo de mijo contaminado con CPA ha sido indicado como la causa de envenenamiento en humanos, denominado como “envenenamiento de Kodua” (Rao y Husain, 1985). Sin embargo, existen estudios con resultados divergentes en cuanto a la mutagenicidad del CPA (Soreson *et al.*, 1984; Wehner *et al.*, 1978).

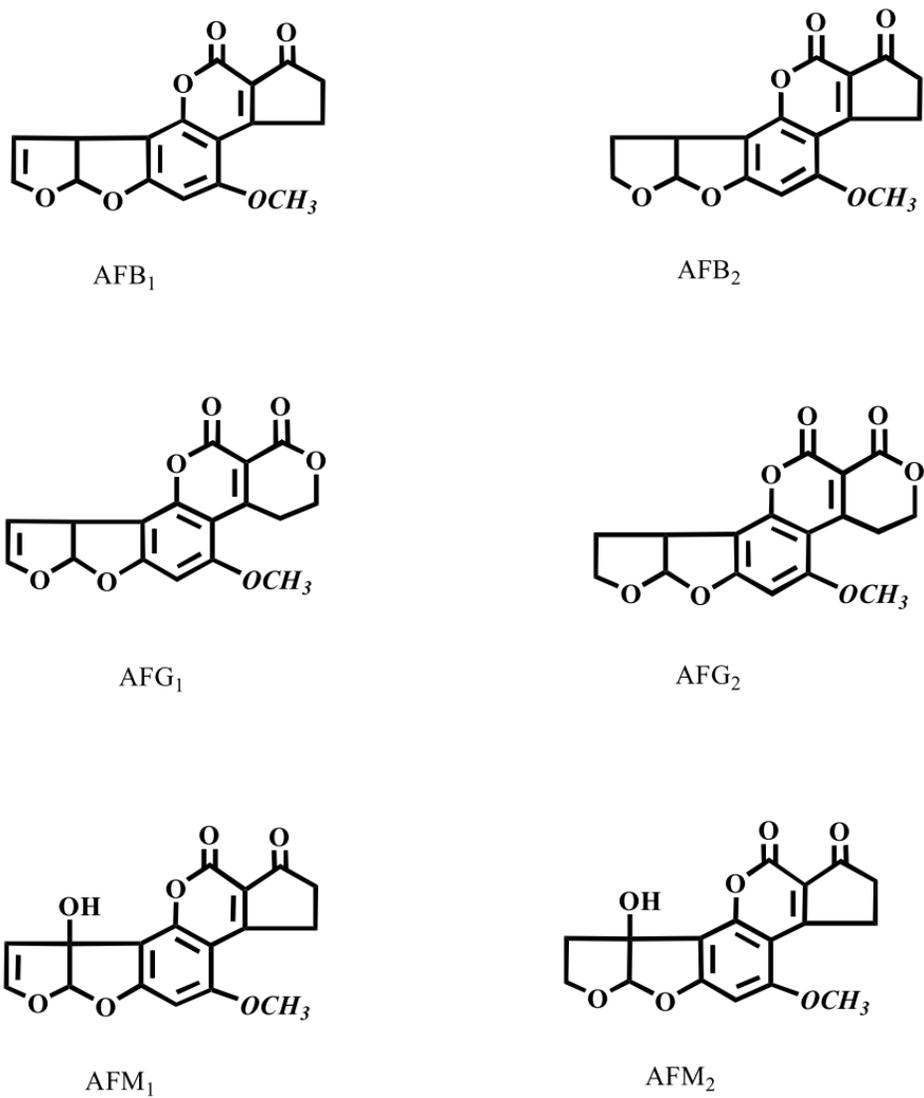


Figura 1.6. Estructura química de las principales aflatoxinas. AFB<sub>1</sub>: aflatoxina B<sub>1</sub>; AFB<sub>2</sub>: aflatoxina B<sub>2</sub>; AFG<sub>1</sub>: aflatoxina G<sub>1</sub>; AFG<sub>2</sub>: aflatoxina G<sub>2</sub>.

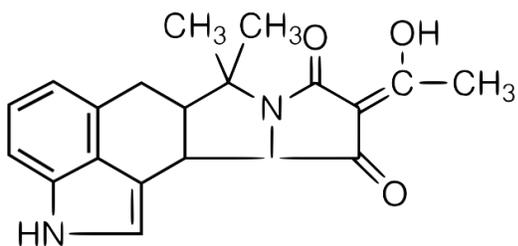


Figura 1.7. Estructura química del ácido ciclopiazónico (CPA).

## BIOCONTROL DE AFLATOXINAS

*Aspergillus flavus* contamina una gran variedad de cultivos en números países alrededor del mundo, afectando la calidad de los mismos debido a la presencia de aflatoxinas. En un determinado sustrato, la biosíntesis de aflatoxinas por parte de este patógeno es regulada por la presencia simultánea de otros aislados fúngicos. Este fenómeno ha sido estudiado y utilizado para el desarrollo de estrategias de biocontrol que permitan reducir la contaminación con aflatoxinas. Esta tecnología utiliza cepas no aflatoxigénicas como agentes de biocontrol dirigidos a minimizar la contaminación con esta micotoxina. Estudios sobre la etiología de la contaminación determinaron que algunos miembros de esta especie no solo son incapaces de biosintetizar aflatoxina, sino que también pueden ser utilizados como una herramienta para reducir su presencia en los cultivos (Cotty *et al.*, 2008).

Dos observaciones fueron centrales para iniciar el desarrollo de esta herramienta de biocontrol. La primera resultó de investigaciones sobre el proceso de infección, donde se concluyó que la patogenicidad y la habilidad de un aislado para ramificar en el tejido del hospedante no dependen de la habilidad para producir micotoxinas (Cotty, 1989). Por lo tanto, la habilidad para producir aflatoxinas de un aislado de *A. flavus* no se relaciona con su éxito a la hora de colonizar un cultivo y, en teoría, los aislados que no producen esta micotoxina puede ser competidores efectivos contra los aislados toxigénicos (Bayman y Cotty, 1993). El segundo aspecto observado fue que la comunidad fúngica residente en una zona puede diferir considerablemente en cuanto a su potencial toxigénico respecto de otra población ubicada en otra área (Cotty, 1997). De acuerdo a esto, existen comunidades con bajo potencial toxigénico y el potencial para producir aflatoxinas puede ser reducido mediante prácticas agronómicas. Si el potencial toxigénico de una comunidad fúngica residente en una determinada área es reducido, el grado de contaminación de un cultivo también lo es (Cotty *et al.*, 2008).

Hasta el momento, el biocontrol con aislados no aflatoxigénicos se presenta como la única herramienta comercialmente efectiva para reducir el contenido de aflatoxinas en los cultivos. Las bases científicas de esta tecnología fueron sentadas en los Estados Unidos, donde dos genotipos no aflatoxigénicos se encuentran registrados por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de dicho país (Bandyopadhyay *et al.*, 2016). *Aspergillus flavus* AF36,

desarrollado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, fue el primer producto registrado y actualmente es aplicado en cultivos de algodón, almendra, maíz, higo y pistacho (Donner *et al.*, 2015; Doster *et al.*, 2014; Mehl *et al.*, 2012). El otro producto registrado en la EPA es afla-guard®, producido y distribuido por Syngenta, para su utilización en cultivos maíz y maní (Dorner, 2004). El momento apropiado para la aplicación del producto varía de acuerdo al cultivo, siendo el estado de desarrollo V7 para el maíz. La cepa se aplica a través de un soporte sólido, siendo granos de trigo en *A. flavus* AF36 (Figura 1.8) y cebada en afla-guard®. El soporte sólido provee los nutrientes necesarios para la esporulación y dispersión bajo condiciones adecuadas de humedad (Cotty y Mellon, 2006). El mecanismo de acción más importante para esta estrategia es el desplazamiento de los aislados toxigénicos a lo largo del agroecosistema y, en consecuencia, la reducción de infecciones por parte de estos aislados (Cotty *et al.*, 2008).

En el caso de *A. flavus*, la reproducción sexual es heterotálica y ocurre entre aislados que posean diferente mecanismo molecular de apareamiento, el cuál puede ser del tipo *MATI-1* o *MATI-2* (Ramirez-prado *et al.*, 2008). Estudios recientes en condiciones de laboratorio determinaron que este proceso origina diversidad en el perfil toxigénico de los aislados. En Argentina casi la totalidad de los aislados (98%) pertenecen al tipo *MATI-1* mientras que, por ejemplo, en Estados Unidos *MATI-1* y *MATI-2* presentan la misma frecuencia (Moore *et al.*, 2013). Si este proceso fuera viable en condiciones naturales, la aplicación de agentes de biocontrol similares genéticamente a la población local limitaría la recombinación sexual y la aparición de nuevos aislados toxigénicos (Atehnkeng *et al.*, 2016). Además, los aislados nativos se consideran mejor adaptados y poseen mejor habilidad competitiva, lo que resulta en una mayor eficacia (Bandyopadhyay *et al.*, 2016; Mehl y Cotty, 2010; Cotty *et al.*, 2008). Debido a esto, esta tecnología se encuentra bajo desarrollo en varias regiones del mundo y para numerosos cultivos (Alaniz Zanon *et al.*, 2016; Bandyopadhyay *et al.*, 2016; Mauro *et al.*, 2015).



Figura 1.8. Producto comercial *Aspergillus flavus* AF36. A: antes de la esporulación. B: después de la esporulación. Imagen provista por Dr. Themis J. Michailides (Universidad de California-Davis, Estados Unidos).

## ACEITES ESENCIALES

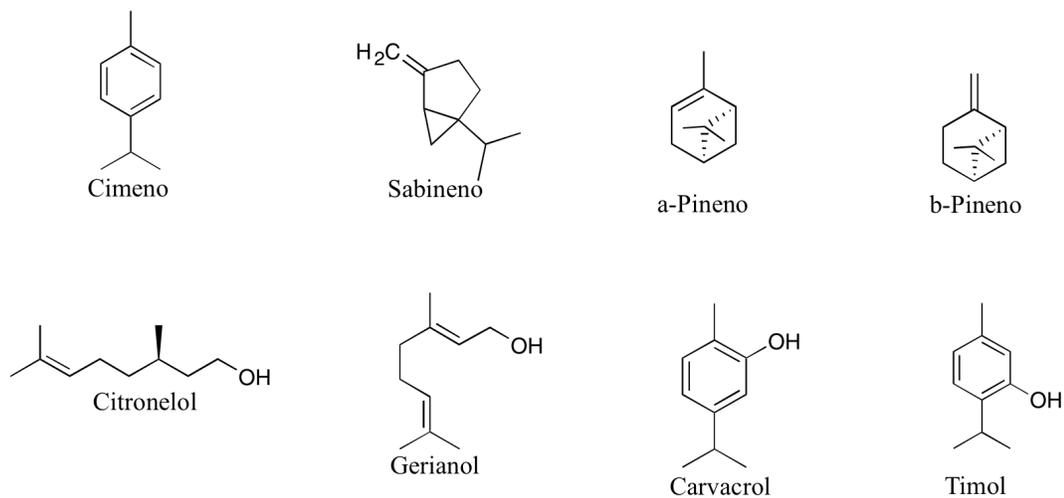
Los AEs son compuestos naturales complejos, volátiles, caracterizados por un fuerte olor y producidos por plantas aromáticas como metabolitos secundarios (Bakkali *et al.*, 2008). Para su extracción, existen diferentes metodologías que pueden incluir dióxido de carbono líquido o microondas, pero principalmente se obtienen por hidrodestilación en sistemas que pueden ser de alta o baja presión (Asensio, 2013; Bakkali *et al.*, 2008).

La composición química de los AE se caracteriza por ser mezclas complejas que pueden tener entre 20 y 60 componentes en diferentes concentraciones. En general, se presentan con dos o tres compuestos mayoritarios (20 al 60%) y otros que se presentan en cantidades pequeñas o trazas. Los componentes incluyen dos grupos de distinto origen biosintético. El primero compuesto de terpenos y terpenoides, y el segundo de compuestos alifáticos y aromáticos, todos

caracterizados por su bajo peso molecular. Los terpenos poseen diferentes estructuras químicas y propiedades. Estos compuestos están conformados a partir de combinaciones de varias unidades de cinco carbonos (C<sub>5</sub>), llamadas isoprenos. Los principales terpenos son los monoterpenos (C<sub>10</sub>) y sesquiterpenos (C<sub>15</sub>) (Figura 1.9), pero también existen hemiterpenos (C<sub>5</sub>), triterpenos (C<sub>30</sub>) y tetraterpenos (C<sub>40</sub>). Si un terpeno contiene oxígeno, es denominado terpenoide. Los compuestos aromáticos son derivados del fenilpropano y ocurren con menos frecuencia que los terpenos (Figura 1.10). Este grupo comprende aldehídos, alcoholes, fenoles entre otros grupos funcionales (Bakkali *et al.*, 2008).

Los AEs de especies aromáticas han sido estudiados principalmente desde un punto de vista de la química del aroma y fragancia. Su principal uso en los alimentos es para contribuir a aromatizar y mejorar sensorialmente los productos. Sus componentes son productos naturales considerados no peligrosos para la salud humana, y que actualmente se le atribuyen importantes propiedades funcionales, lo cual resulta atractivo para los consumidores (Singh y Majumdar, 1999). Otros estudios han remarcado la propiedad antibacteriana (Asensio, 2013; Moosavy *et al.*, 2008) y antifúngica (Gadban, 2011; Lucini, 2004) de los AEs. Su principal mecanismo de acción es a nivel de las membranas celulares, donde interfieren procesos vitales como la ósmosis, la síntesis de esteroides y de fosfolípidos (Montes-Belmont, 2009; Lucini *et al.*, 2006). Los AEs han sido probados con éxito sobre numerosos hongos fitopatógenos como una alternativa al uso de fungicidas sintéticos (Camiletti *et al.*, 2016; Passone y Etcheverry, 2014; Gonçalves *et al.*, 2012; Lucini *et al.*, 2006). La protección de cultivos con aceites esenciales se considera segura para la salud y el ambiente a causa de su muy baja toxicidad para mamíferos (DL50 > 2g kg<sup>-1</sup>), el uso de cantidades muy pequeñas del orden de los miligramos, son fotolábiles, se oxidan por exposición al aire, son fácilmente degradados por los microorganismos y no persisten en el agua y suelos (Isman, 2000).

## Monoterpenos



## Sesquiterpenos

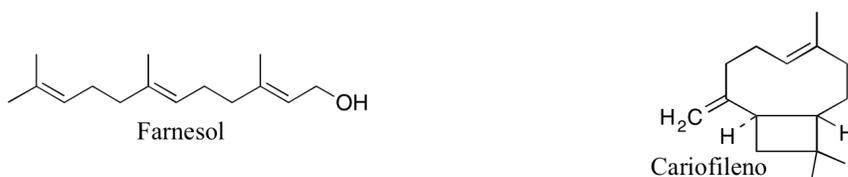


Figura 1.9. Estructura química de algunos terpenos presentes en aceites esenciales.

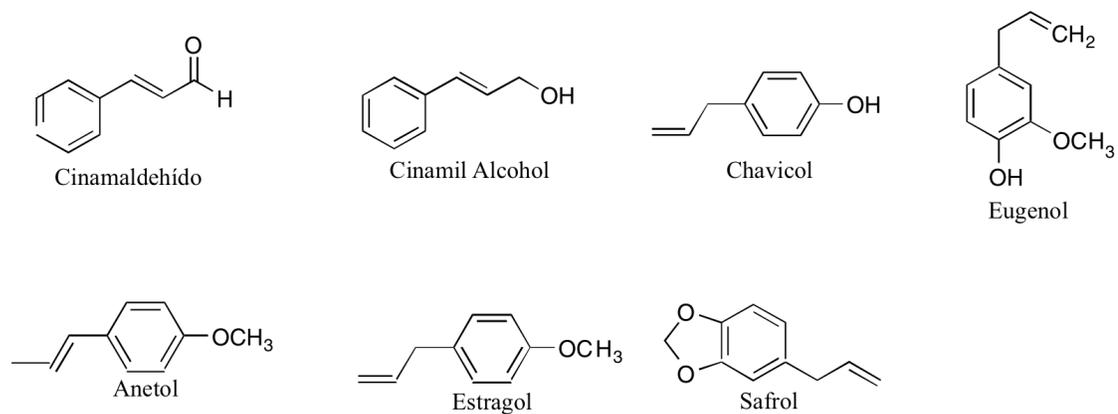


Figura 1.10. Estructura química de algunos compuestos aromáticos presentes en aceites esenciales.

## **HIPÓTESIS**

Los aceites esenciales son efectivos para el control de *A. flavus* y *Penicillium spp.*

Existen aislados atoxigénicos de *A. flavus* presentes en espigas de maíz con potencial para ser utilizados como agentes de biocontrol.

## **OBJETIVO GENERAL**

Generar conocimiento para el desarrollo de herramientas de manejo de hongos toxigénicos basadas en la aplicación de aceites esenciales y agentes de biocontrol.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Aislar la microbiota general a partir de espigas de maíz. Identificar morfológicamente aislados nativos de *A. flavus* y *Penicillium spp.* Identificar molecularmente los aislados de *A. flavus*.
2. Caracterizar cepas nativas de *A. flavus* mediante producción de micotoxinas, esclerocios y variabilidad genética. Evaluar la habilidad competitiva de los aislados atoxigénicos y estudiar posibles deleciones génicas en el *cluster* para la biosíntesis de aflatoxinas.
3. Obtener aceites esenciales a partir de plantas aromáticas cultivadas en Córdoba y determinar su composición química.
4. Evaluar la actividad antifúngica de los aceites esenciales contra *A. flavus* y *Penicillium spp.* Determinar el efecto de los aceites esenciales sobre lípidos de membrana.
5. Evaluar la combinación de aceites esenciales entre sí y con fungicida sintético para el control de *A. flavus* y *Penicillium spp.* Determinar su efecto sinérgico, aditivo o antagónico de las mezclas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alaniz Zanon M. S., Barros G. G. and Chulze S. N. 2016. Non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* as potential biocontrol agents to reduce aflatoxin contamination in peanuts harvested in Northern Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* 231: 63–68.
- ANMAT. 2017. Código Alimentario Argentino. Capítulo III. Publicado en internet, disponible en [http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas\\_alimentos\\_caa.asp](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp).
- Asensio C. M. 2013. Variedades de orégano como conservante antimicrobiano, antioxidante y de las propiedades sensoriales de alimentos: queso cottage, ricota y aceite de oliva. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, 228 pp.
- Atehnkeng J., Donner M., Ojiambo P. S., Ikotun B., Augusto J., Cotty P. J. and Bandyopadhyay R. 2016. Environmental distribution and genetic diversity of vegetative compatibility groups determine biocontrol strategies to mitigate aflatoxin contamination of maize by *Aspergillus flavus*. *Microb. Biotechnol.* 9: 75–88.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. and Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils. *Food Chem. Toxicol.* 46: 446–75.
- Bandyopadhyay R., Akande A., Mutegi C., Atehnkeng J., Kaptoge L. and Senghor A. L. 2016. Biological control of aflatoxins in Africa : current status and potential challenges in the face of climate change. *World Mycotoxin J.* 9: 771–789.
- Bayman P. and Cotty P. J. 1993. Genetic diversity in *Aspergillus flavus*: association with aflatoxin production and morphology. *Can. J. Bot.* 71: 23–31.
- Bennett J. W. 2010. An overview of the genus *Aspergillus*. En: *Aspergillus* molecular Biology and Genomics. Machida, M. and Gomi, K. (eds.). Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp. 1–17.
- Blanco F. M. 1845. Flora de Filipinas. Sanchez M. Publishing, Manila, Filipinas, 619 pp.
- Bluma R. V and Etcheverry M. G. 2008. Application of essential oils in maize grain: impact on *Aspergillus* section *Flavi* growth parameters and aflatoxin accumulation. *Food Microbiol.* 25: 324–34.
- Camiletti B. X., Asensio C. M., Gadban L. C., Pecci M. de la P. G., Conles M. Y. and Lucini E. I. 2016. Essential oils and their combinations with iprodione fungicide as potential antifungal agents against withe rot (*Sclerotium cepivorum* Berk) in garlic (*Allium sativum* L.) crops. *Ind. Crops Prod.* 85: 117–124.
- Cotty P. J. 1997. Aflatoxin-producing potential of communities of *Aspergillus* section *Flavi* from cotton producing areas in the United States. *Mycol. Res.* 101: 698–704.
- Cotty P. J. 1989. Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology* 79: 808–814.
- Cotty P. J. and Mellon J. E. 2006. Ecology of aflatoxin producing fungi and biocontrol of aflatoxin contamination. *Mycotoxin Res.* 22: 110–117.
- Cotty P. J., Probst C. and Jaime-garcia R. 2008. Etiology and management of aflatoxin contamination. En: *Mycotoxins: Detection methods, management, public health and agricultural trade*. Leslie, J. F., Bandyopadhyay, R., and Visconti, A. (eds.). CABI, Oxfordshire, UK, pp. 287–299.
- Cullen J. M., Wilson M., Hagler W. M., Ort J. F. and Cole R. J. 1988. Histologic lesions in broiler chicks given cyclopiazonic acid orally. *Am. J. Vet. Res.* 49: 728—731.

- Diener U. L. 1989. Preharvest aflatoxin contamination of peanuts, corn and cottonseed. En: Biodeterioration Research 2. O'Rear, C. E. and Llewellyn, G. C. (eds.). Plenum Press, New York, pp. 217–244.
- Diener U. L., Cole R. J., Sanders T. H., Payne G. A., Lee L. S. and Klich M. A. 1987. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. Annu. Rev. Phytopathol. 25: 249–270.
- Donner M., Atehnkeng J., Sikora R. a., Bandyopadhyay R. and Cotty P. J. 2009. Distribution of *Aspergillus* section *Flavi* in soils of maize fields in three agroecological zones of Nigeria. Soil Biol. Biochem. 41: 37–44.
- Donner M., Lichtemberg P. S. F., Doster M., Picot A., Cotty P. J., Puckett R. D. and Michailides T. J. 2015. Community structure of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in major almond-producing areas of California, United States. Plant Dis. 99: 1161–1169.
- Dorner J. W. 2004. Biological Control of aflatoxin contamination of crops. J. Toxicol. 23: 425–450.
- Doster M. A., Cotty P. J. and Michailides T. J. 2014. Evaluation of the atoxigenic *Aspergillus flavus* strain AF36 in Pistachio Orchards. Plant Dis. 98: 948–956.
- FAO. 1992. Miase in human nutrition. FAO, Roma, Italia, 160 pp.
- Gadban L. 2011. Determinación de la actividad sinérgica antifúngica del aceite esencial de *Tagetes filifolia* Lag. y fungicidas sintéticos sobre *Colletotrichum truncatum* (Schw.) Andrus & Moore y *Trichoderma harzianum* Rifai. Tesis Magister. Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina, 108 pp.
- Garrido C. E., Hernández Pezzani C. and Pacin a. 2012. Mycotoxins occurrence in Argentina's maize (*Zea mays* L.), from 1999 to 2010. Food Control 25: 660–665.
- Giorni P. 2007. Impact of environmental and plant factors on *Aspergillus* Section *Flavi*. Tesis Doctoral. Cranfield University, Cranfield, UK, 268 pp.
- Gonçalves M. J., Tavares A. C., Cavaleiro C., Cruz M. T., Lopes M. C., Canhoto J. and Salgueiro L. 2012. Composition, antifungal activity and cytotoxicity of the essential oils of *Seseli tortuosum* L. and *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum* (Samp.) M. Laínz from Portugal. Ind. Crops Prod. 39: 204–209.
- Gullino M. L., Leroux P. and Smith C. M. 2000. Uses and challenges of novel compounds for plant disease control. Crop Prot. 19: 1–11.
- Hartley R. D., Nesbitt B. F. and O'Kelly J. 1963. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. Nature 198: 1056–1058.
- IARC. 1993. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC, Lyon, France, 599 pp.
- INTA. 1997. Guía practica para el cultivo de maíz. INTA Ediciones, Buenos Aires, Argentina, 221 pp.
- Isman M. B. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. Crop Prot. 19: 603–608.
- Kabak B. 2009. The fate of mycotoxins during thermal food processing. J. Sci. Food Agric. 89: 549–554.
- Lomax L. G., Cole R. J. and Dorner J. W. 1984. The toxicity of cyclopiazonic acid in weaned Pigs. 21: 418–424.
- Lucini E. I. 2004. Cambios en la composición lipídica del micelio de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary y *Sclerotium cepivorum* Berk por acción de terpenos. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, 114 pp.
- Lucini E. I., Zunino M. P., Lopez M. L. and Zygadlo J. A. 2006. Effect of monoterpenes on lipid

- composition and sclerotial development of *Sclerotium cepivorum* Berk. J. Phytopathol. 154: 441–446.
- MAIZAR. 2013. La cadena de maíz y las oportunidades para desarrollo en la Argentina. MAIZAR, Buenos Aires, Argentina, 144 pp.
- Mauro A., Battilani P. and Cotty P. J. 2015. Atoxigenic *Aspergillus flavus* endemic to Italy for biocontrol of aflatoxins in maize. BioControl 60: 125–134.
- Mehl H. L. and Cotty P. J. 2010. Variation in competitive ability among isolates of *Aspergillus flavus* from different vegetative compatibility groups during maize infection. Phytopathology 100: 150–9.
- Mehl H. L., Jaime R., Callicott K. A., Probst C., Garber N. P., Ortega-Beltran A., Grubisha L. C. and Cotty P. J. 2012. *Aspergillus flavus* diversity on crops and in the environment can be exploited to reduce aflatoxin exposure and improve health. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1273: 7–17.
- Montes-Belmont R. 2009. Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. Rev. Mex. Micol. 29: 1–15.
- Moore G. G., Elliott J. L., Singh R., Horn B. W., Dorner J. W., Stone E. A., Chulze S. N., Barros G. G., Naik M. K., Wright G. C., Hell K. and Carbone I. 2013. Sexuality generates diversity in the aflatoxin gene cluster : Evidence on a Global Scale. PLOS Pathog 9 (8).
- Moosavy M.-H., Basti A. A., Misaghi A., Salehi T. Z., Abbasifar R., Mousavi H. A. E., Alipour M., Razavi N. E., Gandomi H. and Noori N. 2008. Effect of *Zataria multiflora* Boiss essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in a food model system and on the bacterial cell membranes. Food Res. Int. 41: 1050–1057.
- Passone M. A. and Etcheverry M. 2014. Antifungal impact of volatile fractions of *Peumus boldus* and *Lippia turbinata* on *Aspergillus* section *Flavi* and residual levels of these oils in irradiated peanut. Int. J. Food Microbiol. 168–169: 17–23.
- Peraica M. and Domijan A. M. 2001. Contamination of food with mycotoxins and human health. Achives Ind. Hyg. Toxicol. 52: 23–35.
- Perrone G., Gallo A. and Logrieco A. F. 2014. Biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in Europe in relation to the management of aflatoxin risk. Front. Microbiol. 5: 1–5.
- Perrone G., Susca A., Cozzi G., Ehrlich K., Varga J., Frisvad J. C., Meijer M., Noonim P., Mahakamchanakul W. and Samson R. A. 2007. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. Stud. Mycol. 59: 53–66.
- Pitt J. I. and Hocking A. D. 2009. Fungi and Food Spoilage, Third Edit. Springer, New York, USA, 519 pp.
- Presello D. y Botta G. 2004. Podredumbres de espiga de maíz y micotoxinas asociadas. IDIA XXI 6: 152–157.
- Ramirez-prado J. H., Moore G. G., Horn B. W. and Carbone I. 2008. Characterization and population analysis of the mating-type genes in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Fungal Genet. Biol. 45: 1292–1299.
- Ranum P., Peña-Rosas J. P. and Garcia-Casal M. N. 2014. Global maize production, utilization, and consumption. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1312: 105–112.
- Rao B. L. and Husain A. 1985. Presence of cyclopiazon acid in kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*) causing kodua poisoning in man and its production by associated fungi. Mycopathologia 89: 177–180.
- Reis E. M., Casa R. T. and Carmona M. 2002. Elementos para el manejo de enfermedades. En:

- Agroecología - El camino hacia una agricultura sustentable. Sarandón, S. J. (ed.). Ediciones Científicas Americanas, La Plata, Argentina, pp. 275–308.
- Saharkhiz M. J., Motamedi M., Zomorodian K., Pakshir K., Miri R. and Hemyari K. 2012. Chemical composition, antifungal and antibiofilm activities of the essential oil of *Mentha piperita* L. ISRN Pharm. 2012: 718645.
- Shurtleff M. C. 1980. Compendium of corn disease. American Phytopathological Society, St. Paul, USA, 105 pp.
- Singh S. and Majumdar D. K. 1999. Evaluation of the gastric antiulcer activity of fixed oil of *Ocimum sanctum* (Holy Basil). J. Ethnopharmacol. 65: 13–19.
- Soreson W. G., Tucker J. D. and Simpson J. P. 1984. Mutagenicity of tetramic mycotoxin cyclopiazonic acid. Appl. Environ. Microbiol. 47: 1355.
- Sosa-Gomez D. R., Delpin K. E., Moscardi F. and Nozaki M. 2003. The impact of fungicides on *Nomurea rileyi* (Farlow) Samson epizootics and populations of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), on soybean. Neotrop. Entomol. 32: 287–291.
- Strosnider H., Azziz-Baumgartner E., Banziger M., R.V. B., Breiman R., Brune M. N., DeCock K., Dilley A., Groopman J., Hell K., Henry S. H., Jeffers D., Jolly C., Jolly P., Kibata G. N., Lewis L., Liu X., Luber G. and McCoy L. 2006. Workgroup report: public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. Environ. Health Perspect. 114: 1898–1903.
- USDA. 2017a. Argentina: grain and feed annual. Publicado en internet, disponible en <https://www.fas.usda.gov/data/argentina-grain-and-feed-annual-2>.
- USDA. 2017b. World Markets and Trade. Publicado en internet, disponible en <https://www.fas.usda.gov/data/grain-world-markets-and-trade>.
- Vaamonde G., Patriarca A., Fernández Pinto V., Comerio R. and Degrossi C. 2003. Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *Flavi* from different substrates in Argentina. Int. J. Food Microbiol. 88: 79–84.
- van Egmond H. P. 1989. Aflatoxin M1: occurrence, toxicity, regulation. In: Mycotoxins in dairy products. van Egmond, H. P. (ed.). Elsevier, London, UK, pp. 11–55.
- Wang J. and Tang L. 2004. Epidemiology of aflatoxin exposure and human liver cancer. Toxin Rev. 23: 249–271.
- Wehner F. C., Thiel P. G., Rensburg S. J. and Demasius I. . 1978. Mutagenicity to *Salmonella typhimurium* of some *Aspergillus* and *Penicillium* mycotoxins. Mutat. Res. 58: 193.
- Wu F. 2015. Global impacts of aflatoxin in maize: trade and human health. World Mycotoxin J. 8: 137–142.
- Wu F., Stacy S. L. and Kensler T. W. 2013. Global risk assessment of aflatoxins in maize and peanuts: Are regulatory standards adequately protective? Toxicol. Sci. 135: 251–259.

## CAPÍTULO 2

# AISLAMIENTO DE *Aspergillus flavus* y *Penicillium* spp. A PARTIR DE LA MICROBIOTA PRESENTE EN ESPIGAS DE MAÍZ

## INTRODUCCIÓN

La expansión de la frontera agrícola y ganadera en Argentina es uno de los factores que explican el aumento de productividad y crecimiento económico del sector rural argentino (Viglizzo *et al.*, 2012). El uso de nuevas tecnologías en labranza y semillas de maíz permitió la expansión del cultivo a zonas más calientes, menos fértiles y más secas, lo que derivó en el desarrollo de insumos específicos para estas zonas. Estas zonas se describen como inestables y se caracterizan por la alta frecuencia de estrés hídrico, térmico o una combinación de ambas. Si bien la superficie sembrada con maíz se ha incrementado marcadamente durante la última década, dicho crecimiento no ha sido parejo en todas las regiones. Las regiones comprendidas en la zona “núcleo” han desarrollado incrementos alrededor del 50%. Sin embargo, los mayores crecimientos han sido obtenidos en las “regiones marginales” más frágiles como las regiones I y IV donde se han registrado incrementos del 250 y 172%, respectivamente (MAIZAR, 2013).

Los hongos causantes de la podredumbre de la espiga infectan la espiga de maíz principalmente durante el período de floración, con una mayor intensidad después de la polinización, y hasta la senescencia de los estigmas (Presello y Botta, 2004). En Argentina, este período se extiende de diciembre a marzo dependiendo de la región, fecha de siembra y genotipo empleado (Cirilo, 2004). La podredumbre de la espiga afecta el rendimiento del cultivo, pero también a la calidad del grano debido a las micotoxinas que pueden sintetizar los hongos. Entre los patógenos fúngicos que contaminan la espiga de maíz, las especies del género *Fusarium* son aisladas frecuentemente, siendo predominantes *F. verticillioides* y *F. graminearum* (Presello y Botta, 2004; Etcheverry *et al.*, 1999). Las especies del género *Penicillium* como *P. olsonii*, *P. citrinum*, *P. oxalicum* y *P. minioluteum* también han sido reportadas debido a su incidencia en granos de maíz (Mahmoud *et al.*, 2013; Burgess *et al.*, 1981). La presencia de género *Aspergillus* en espigas de maíz ha recibido particular atención debido a que ciertas especies del

género son capaces de sintetizar aflatoxinas. De acuerdo a la mayoría de los estudios publicados, *A. flavus* y *A. parasiticus* son las especies más comúnmente implicadas como agentes causales en la contaminación de cultivos con aflatoxinas (Perrone *et al.*, 2014a; Mauro *et al.*, 2013; Pitt y Hocking, 2009; Cotty *et al.*, 2008; Giorni *et al.*, 2007).

Las regiones maiceras I y IV de la zona agrícola centro-norte del país se caracterizan por las altas temperaturas durante cultivo de maíz, acompañadas por períodos de sequía en algunos años (SMN, 2015). La incidencia de *A. flavus* en espigas de maíz aumenta marcadamente en cultivos bajo estas condiciones ambientales (Bhatnagar-Mathur *et al.*, 2015). La existencia de hongos en espigas de maíz al momento de la cosecha se presenta como una inquietud por parte del sector agrícola. Esta problemática ha sido estudiada considerando principalmente el género fúngico *Fusarium* debido a su gran incidencia en espigas de maíz cultivados en la zona “núcleo” (Presello *et al.*, 2007; Presello *et al.*, 2008; Farnochi *et al.*, 2005). En esta misma zona, la presencia de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* ha sido reportada tanto en granos de maíz como en los agroecosistemas (Nesci *et al.*, 2006; Nesci y Etcheverry, 2002).

La correcta identificación del agente causal y el conocimiento sobre la incidencia de los principales patógenos presentes en las espigas, es de gran importancia para un manejo efectivo de la enfermedad. Algunas especies de *Aspergillus* son muy similares y la identificación al nivel de especie mediante características morfológicas requiere de gran experiencia (Gherbawy y Voigt, 2010). Por lo tanto, la identificación del patógeno resulta más sólida si se comparan estas características respecto al ADN fúngico. La identificación molecular de patógenos ha sido indicada como una herramienta de alta confiabilidad para confirmar la identificadas previamente por características morfológicas (Iheanacho *et al.*, 2014). Otros autores (Devi *et al.*, 2013) reportaron el desarrollo de marcadores que diferencian adecuadamente *A. flavus* de otras especies del mismo género mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Sin embargo, estos cebadores no han sido probados hasta el momento en cepas nativas aisladas de cultivos argentinos.

Con la finalidad de desarrollar estrategias de manejo para maíz cultivado en la región I y IV, los objetivos de este capítulo fueron: conocer la composición de la población fúngica

presente en espigas de maíz, determinar la incidencia y severidad de los principales géneros fúngicos, aislar cepas nativas de *A. flavus* y especies del género *Penicillium* causales de la podredumbre de la espiga de maíz en la región agrícola centro-norte de la Argentina.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **SOLUCIÓN DE MICRONUTRIENTES PARA LA ELABORACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO**

- Concentrado Czapek

NaNO <sub>3</sub> .....	30 g
KCl.....	5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	5 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,1 g
Agua destilada c.s.p.....	100 mL

### **MEDIOS DE CULTIVO PARA AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS**

- Dicloran Rosa de Bengala (DRBC)

Glucosa.....	10 g
Peptona .....	5 g
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K.....	1 g
SO <sub>4</sub> Mg.7H <sub>2</sub> O.....	0,5 g
Agar.....	15 g
Rosa de Bengala.....	25 mg
Diclorán.....	2 mg
Cloranfenicol.....	100 mg
Agua destilada c.s.p.....	1000 mL

- Diclorán Glicerol 18% agar (DG18)

Glucosa.....	10 g
Peptona.....	5 g
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K.....	1 g

SO<sub>4</sub>Mg.7H<sub>2</sub>O.....0,5 g  
Glicerol.....220 g  
Diclorán.....2 mg  
Cloranfenicol.....100 mg  
Agar.....15g  
Agua destilada c.s.p.....1000 mL

▪ *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* agar (AFPA)

Peptona de carne.....10 g  
Extracto de malta.....20 g  
Citrato férrico amoniacal.....0,5 g  
Cloranfenicol.....100 mg  
Dicloran.....2 mg  
Agar.....15 g  
Agua destilada c.s.p.....1000 mL

▪ Extracto de Malta Agar (MEA)

Extracto de malta.....20 g  
Peptona.....1 g  
Agar.....20 g  
Glucosa.....20 g  
Agua destilada c.s.p.....1000 mL.

▪ Czapek Extracto de Levadura Agar (CYA)

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....1 g  
Extracto de levadura.....5 g  
Concentrado Czapek.....10 mL  
Sacarosa.....30 g  
Agar.....15 g

Agua destilada c.s.p.....1000 mL

- Czapek Extracto de Levadura 20% Sacarosa Agar (CY20S)

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....1 g  
Concentrado Czapek.....10 mL  
Extracto de levadura.....5 g  
Sacarosa.....200 g  
Agar.....15 g  
Agua destilada c.s.p.....1000 mL

- Nitrato 25% Glicerol Agar (G25N)

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....0.75 g  
Concentrado Czapek.....7.5 mL  
Extracto de malta.....3.7 g  
Glicerol.....250 g  
Agar.....12 g  
Agua destilada c.s.p.....750 mL

- Lixiviado de papa y glucosa (LP)

Infusión de papa a partir de 200g.....100 mL  
Glucosa.....20 g  
Agua destilada c.s.p.....1000 mL  
pH= 4,5.

- Agar semisólido (AS)

Agar.....1g.  
Agua destilada c.s.p.....1000 mL

- Buffer TAE (1x)

Tris.....4,84 g  
 Ácido acético glacial.....1,14 mL  
 EDTA 500mM (pH 8,0).....2 mL  
 Agua destilada c.s.p.....1000 mL

## MUESTREO

Un total de 37 muestras de diferentes cultivares comerciales de maíz fueron colectadas de las regiones maiceras Argentinas I y IV (INTA, 1997) durante la campaña 2012/2013 y 2013/2014 (Figura 2.1). La región I se encuentra ubicada aproximadamente entre las latitudes 20 y 30° S, con temperaturas máximas promedio de 30 a 34°C durante el período de floración. La región IV se encuentra aproximadamente entre las latitudes 30° 00' y 34° 00' S, donde las temperaturas máximas promedio varían entre 26 y 30°C durante el mismo periodo. Ambas regiones se encuentran localizadas entre las longitudes 62 y 67° O con un régimen histórico de precipitaciones que promedia los 475 mm para el período de floración del maíz (INTA, 2016). Las condiciones meteorológicas variaron marcadamente entre las campañas analizadas (Tabla 2.1) de acuerdo a los datos registrados por INTA (2016). Un total de diez espigas por muestra fueron elegidas al azar inmediatamente antes de la cosecha. Las muestras fueron transportadas en bolsas de papel y secadas dentro de las bolsas en estufa de aire forzada (38°C, 72 hs) para lograr niveles de humedad en grano por debajo del 12%. Las espigas fueron almacenadas a 4°C hasta su posterior análisis (Oliveira Rocha *et al.*, 2012; Smart *et al.*, 1990).

Tabla 2.1. Condiciones climáticas en las regiones maiceras en el período de floración durante las campañas analizadas.

Campaña	Temperatura (°C) <sup>a</sup>				Precipitación (mm) <sup>b</sup>	
	Máxima		Mínima		I	IV
	I	IV	I	IV		
2012/2013	37.5	31.3	21.8	16.3	134.8	279.9
2013/2014	35.8	33.3	21.6	17.8	719.6	455.5

<sup>a</sup> Medias obtenidas a partir de datos registrados para el período diciembre-marzo.

<sup>b</sup> Precipitación total registrada durante el período diciembre-marzo.

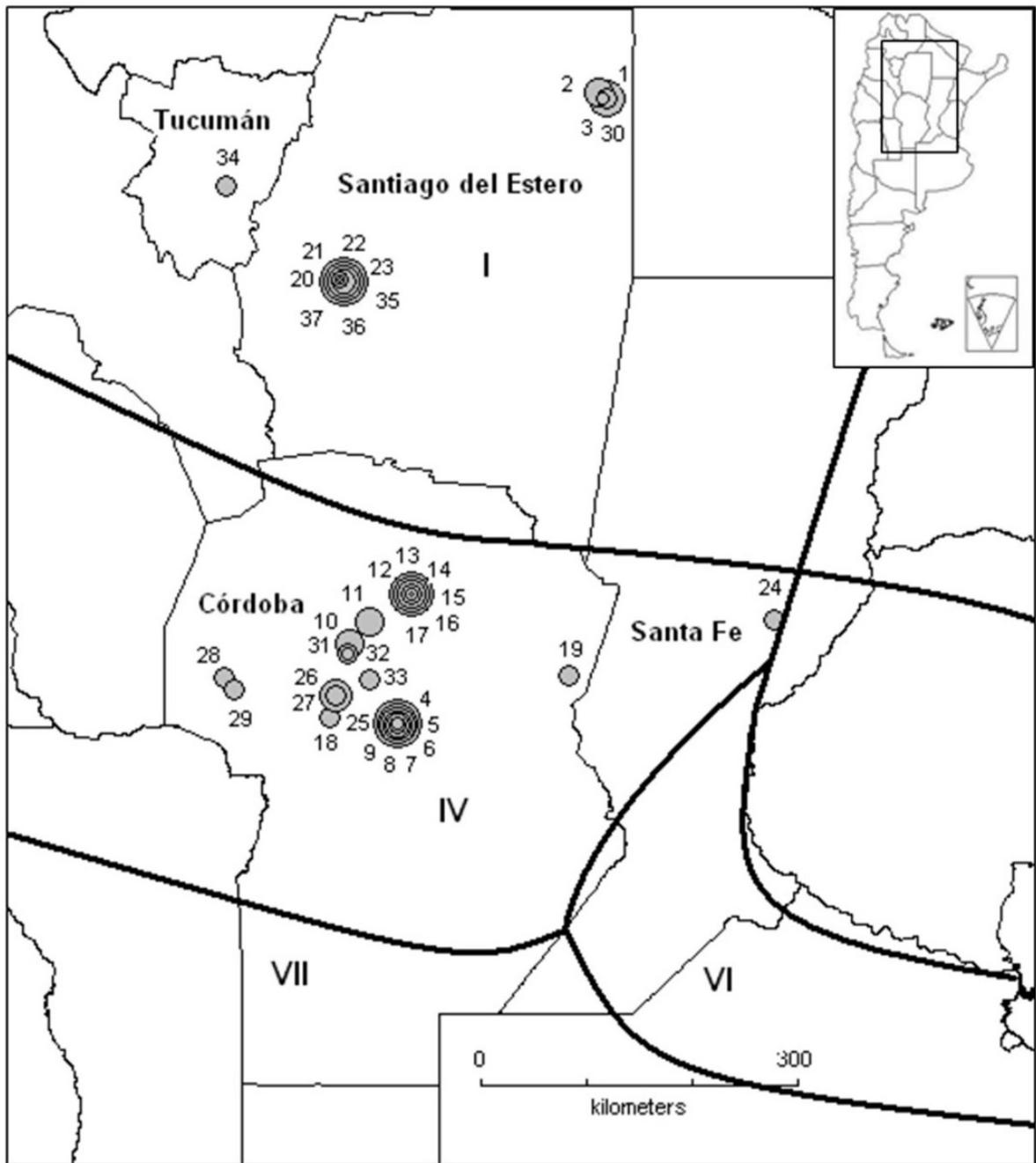


Figura 2.1. Puntos de colección de muestras de espigas de maíz en las regiones maiceras estudiadas, de acuerdo a INTA (1997).

## **AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LA MICROBIOTA NATURAL PRESENTE EN ESPIGAS DE MAÍZ**

La microbiota general presente a campo como infección interna en los granos de maíz fue analizada mediante la técnica de plaqueo directo (Pitt and Hocking, 2009). Las espigas fueron trilladas manualmente y los granos (200 granos/muestra) desinfectados superficialmente por inmersión en solución de hipoclorito de sodio al 1%, seguido por un triple lavado en agua destilada estéril. Cada muestra fue analizada en dos medios de cultivo con diferente actividad de agua: DRBC y DG18. Un total de 10 placas de Petri fueron preparadas para cada medio de cultivo y sembradas con 10 granos cada una. Las muestras fueron incubadas a  $25 \pm 2$  °C en oscuridad por 7 días. Luego del período de incubación, las placas fueron examinadas en lupa y se registró el número de granos con colonias fúngicas exhibiendo características morfológicas consistentes con los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (Perrone *et al.*, 2014b; Pitt and Hocking, 2009). Los resultados para cada género fueron expresados como incidencia (porcentaje de muestras infectadas) y severidad (porcentaje de granos infectados).

Las actividades fueron realizadas bajo la dirección de la Dra. Karina Magnoli en el Laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto.

### **IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE *Aspergillus* sección *Flavi* Y DE ESPECIES DE *Penicillium*.**

Esporas de colonias con características morfológicas similares a *A. flavus* o *A. parasiticus* fueron transferidas y sub-cultivadas en medio MEA a  $25 \pm 2$  °C en oscuridad por 7 días para su posterior identificación (Nesci y Etcheverry, 2002). Las colonias fueron identificadas siguiendo el esquema de inoculación propuesto por Klich (2002). Para ello, a partir de cada colonia, se realizó una suspensión de esporas en AS para ser utilizada como inóculo. Placas de Petri fueron preparadas con medio de cultivo CYA, CY20S y MEA e inoculadas en tres puntos equidistantes entre sí y del borde de la placa. Las temperaturas de incubación fueron 25 y  $37 \pm 2$  °C, como se indica en la Figura 2.1. Una placa adicional con medio AFPA fue agregada al ensayo para cada aislado. Las especies *A. flavus* y *A. parasiticus* generan un reverso

característico de color anaranjado en este medio (Pitt y Hocking, 2009). Todas las placas fueron observadas a los 7 días. Las características macroscópicas observadas fueron: color y diámetro de la colonia; color del micelio; presencia/ausencia de esclerocios; presencia/ausencia de cleistotecios; color del reverso; presencia de exudados. Las características microscópicas observadas fueron: presencia/ausencia de fialides y/o métulas en el conidióforo; longitud y rugosidad del estipe; diámetro y forma de los conidios. Una vez elaborado un perfil con características morfológicas, se procedió a la identificación a nivel de especie utilizando la clave taxonómica para la identificación de especies del género *Aspergillus* elaborada por Klich (2002).

Dos colonias con características morfológicas similares a *Penicillium* fueron subcultivadas en medio MEA. La suspensión de esporas se preparó en AS y se utilizó para inocular placas de Petri con medio MEA, CYA y G25N, como se describió previamente. Las temperaturas de incubación fueron 5, 25 y  $37 \pm 2$  °C por un periodo de 7 días de incubación. El esquema de inoculación utilizado (Figura 2.3) permite identificar dos colonias simultáneamente (Pitt y Hocking, 2009). Se observaron características macroscópicas como diámetro, tipo y color del reverso de la colonia, color de los conidios, presencia/ausencia de exudados y presencia/ausencia de pigmentos solubles. Las características microscópicas observadas fueron: tipo de ramificación de conidióforo, longitud relativa de las fialides y/o métulas, número de métulas por estipe, forma de las fialides, longitud y textura del estipe y diámetro, textura y tamaño de los conidios. La identificación a nivel de especie se determinó mediante la clave de identificación propuesta para el género *Penicillium* de Pitt y Hocking (2009).

La identificación de los aislados fúngicos se realizó bajo la dirección de la Dra. Karina Magnoli en el Laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto.

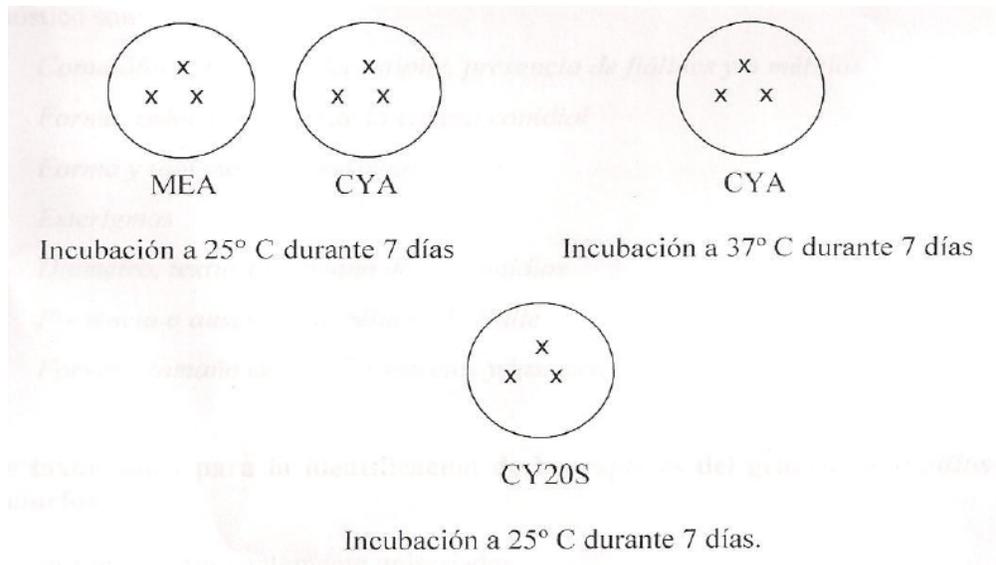


Figura 2.2 Esquema de inoculación para la identificación de especies del género *Aspergillus*.

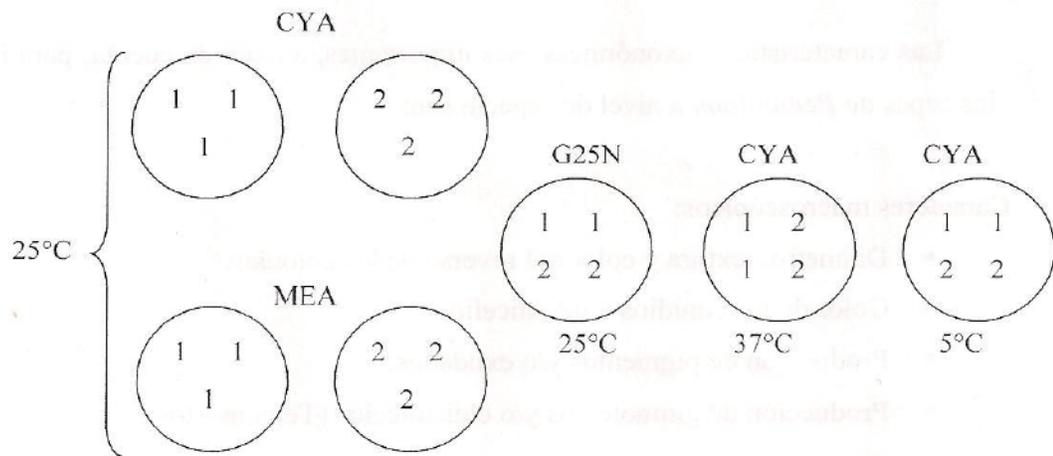


Figura 2.3. Esquema de inoculación para la identificación de especies del género *Penicillium*. 1 y 2: aislados con características morfológicas correspondientes a *Penicillium*.

## IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Aspergillus* sección *Flavi*

**Extracción de ADN.** Se prepararon frascos Erlenmeyers (250 mL) con 100 mL de medio de cultivo LP e inoculados con una suspensión de esporas preparada a partir de cultivos previamente crecidos ( $30 \pm 2$  °C, oscuridad, 7 días). Los frascos fueron sellados con Parafilm® para permitir intercambio gaseoso y colocados en un agitador (ARCANO TS 1000) a 250 rpm dentro de una cámara de cultivo a  $30 \pm 2$  °C durante 48 horas. El micelio obtenido se colectó por filtrado a través de un filtro Whatman N° 1, enjuagado tres veces con agua destilada y almacenado en forma liofilizada a -40 °C (Devi *et al.*, 2013). El ADN fue extraído de acuerdo al protocolo indicado por Doyle y Doyle (1990). Como control negativo se utilizó un aislado de *A. niger* obtenido de espigas de maíz mientras que como control positivo se utilizó la cepa *A. flavus* CCC116-83 provista por el Centro de Referencia de Micología de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (Universidad Nacional de Rosario). Se agregó al experimento un control adicional con un aislado de *A. parasiticus*, miembro de la sección *Flavi*, con el objetivo de evaluar si los primers propuestos pueden distinguir entre estas dos especies.

**Primers y condiciones de PCR.** Todos los aislados fueron analizados con la siguiente secuencia de nucleótidos: Asp fl, 5'-CCCGTGAAGTTGCCAGGT-3'; Asp r2, 5'-GTCGTTTGGTGAGTGGGAA-3' (Devi *et al.*, 2013). Todos los reactivos fueron comprados de Promega (Madison, WI, USA). Para cada reacción individual, se mezcló 1 µL (concentración final 20-100 ng de ADN/µL) de solución de ADN con 24 µL de una solución compuesta por 5µL de buffer de reacción 5x Green GoTaq®, 0,5 µL de mezcla de dNTP (10 nM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 µL de la solución con los primers (2,5 µM), 1 µL de enzima polimerasa GoTaq®, y 16,5 µL de agua libre de nucleasas. La reacción de PCR fue llevada a cabo en un termociclador, de acuerdo a Devi *et al.* (2013), con las siguientes condiciones: un ciclo a 94 °C por 4 min, 40 ciclos a 94 °C por 1 min, 62°C por 1 min, 72°C por 1,5 min, con una extensión final a 72 °C por 11 min. Los productos de PCR fueron revelados por electroforesis en 1% de agarosa en buffer TAE. El tamaño molecular de los mismos fue estimado utilizando el marcador "DNA ladder" de 100 pb.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados fueron analizados usando el software estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2014). Análisis de la varianza (ANOVA) fue utilizado para calcular las medias y diferencias significativas fueron detectadas utilizando LSD test de Fisher ( $P < 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### MICROBIOTA PRESENTE EN ESPIGAS DE MAÍZ

Se evaluó la ocurrencia de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* en 37 muestras de granos de maíz (Tabla 2.2). El género *Fusarium* mostró la incidencia y la severidad más alta en ambas regiones maiceras estudiadas. La metodología desarrollada puede haber favorecido el aislamiento de este género ya que la mayoría de las especies de *Fusarium* presentan una temperatura óptima de 25 °C (Pitt y Hocking, 2009). Aun así, la predominancia de *Fusarium* en granos de maíz fue reportada previamente con una severidad del 50% en diferentes genotipos cultivados en la región I durante la campaña 2011/2012 (Aguaysol *et al.*, 2013). Similares resultados pero con una severidad menor, cercana al 30%, han sido reportados en granos de maíz almacenados (Mahmoud *et al.*, 2013; Burgess *et al.*, 1981). La severidad de *Fusarium* no mostró diferencias significativas entre las regiones y campañas estudiadas (Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Incidencia y severidad de los géneros fúngicos más frecuentes *Fusarium*, *Penicillium* y *Aspergillus*, presentes en espigas de maíz en dos regiones maiceras (I y IV) de Argentina durante las campañas 2012/2013 y 2013/2014.

Campaña	Región I				Región IV			
	Incidencia <sup>y</sup>	Severidad <sup>z</sup>			Incidencia <sup>y</sup>	Severidad <sup>z</sup>		
		Media	Mediana	Rango		Media	Mediana	Rango
<b><i>Fusarium</i></b>								
2012/2013	100,0	58,4a	61,1	29,0-98,0	100,0	60,7a	75,0	4,0-95,5
2013/2014	100,0	72,1a	59,0	50,0-100,0	100,0	72,5a	70,5	32,0-100,0
<b><i>Penicillium</i></b>								
2012/2013	75,0	6,1b *	1,0	0,0-35,5	100,0	33,0a *	25,5	1,0-69,5
2013/2014	100,0	24,7a	22,0	11,0-47,0	87,5	20,2a	19,5	0,0-51,0
<b><i>Aspergillus</i></b>								
2012/2013	100,0	10,7a	4,0	0,5-48,0	100,0	13,5a	10,6	0,5-61,0
2013/2014	20,0	1,0b	0,0	0,0-5,1	25,0	0,5b	0,0	0,0-2,0

<sup>y</sup> Incidencia: porcentaje de muestras infectadas (n=25 en la región I; n=12 en la región IV)

<sup>z</sup> Severidad: porcentaje de granos infectados (n=200). Misma letra dentro de una misma columna para las variables dependientes indican diferencias no significativas entre las campañas analizadas para cada género fúngico (P<0,05); (\*) indica que las diferencias entre las regiones fueron significativas (P<0,05).

El género fúngico *Penicillium* también mostró una remarcable incidencia, siendo el segundo más frecuente, como previamente indicó Etcheverry *et al.* (1999) para maíz cultivado en otra región maicera. En la región I, la severidad fue significativamente más alta (P<0,05) en

la campaña 2013/2014 en comparación con la campaña posterior. Sin embargo, estas diferencias significativas no se observaron en la región maicera IV para las mismas campañas. El género *Penicillium* ha sido mencionado como uno de los géneros fúngicos prevalentes en granos de maíz y sorgo, con severidades entre el 13 y 15% (Mahmoud *et al.*, 2013). Altas severidades (67%) de *Penicillium* han sido reportado también en granos de maíz comercializados en Argentina (Etcheverry *et al.*, 1999).

Infecciones en espiga con *Aspergillus* fueron observadas en este estudio (Figura 2.4), sin diferencias significativas entre regiones maiceras. Sin embargo, la severidad de este género fúngico fue significativamente ( $P < 0,05$ ) más alta durante la campaña 2012/2013 que en la campaña posterior, registrándose en la primera campaña niveles de severidad hasta el 48 y 61% para las regiones I y IV, respectivamente. En granos almacenados, valores de severidad de hasta el 60% han sido reportados para el género *Aspergillus*, de acuerdo a un estudio realizado en Argentina (Etcheverry *et al.*, 1999). Estudios en granos de maíz no procesado y comercializado localmente en Nigeria revelaron una severidad del 70,4%, similar a la informada por Etcheverry *et al.* (1999) (Atehnkeng *et al.*, 2008).

Todas las muestras fueron también analizadas para detectar la presencia de otros géneros fúngicos, registrándose *Absidia*, *Alternaria*, *Basipetospora*, *Bispora*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Nigrospora*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Ulocladium* y *Verticillium*, con severidades que variaron entre 1 y 2%. Especies de los géneros *Alternaria*, *Cladosporium* y *Trichoderma*, han sido indicados como parte de la población fúngica presente naturalmente en suelo precosecha de maíz en la región IV (Nesci *et al.*, 2006). La existencia de *Trichoderma* en el econicho del cultivo de maíz podría indicar la presencia de especies con potencial uso para el biocontrol de *A. flavus* (Atehnkeng *et al.*, 2008). *Eurotium* spp. ha sido aislado comunmente en granos de maíz almacenado, mientras que *Ulocladium* y *Absidia* se han registrado con baja severidad, menor al 1%, en granos de maíz almacenado (Pitt y Hocking, 2009). Los mismos autores aislaron *Nigrospora* y *Rhizopus* a partir de granos almacenados en Tailandia y Filipinas, con severidad del 2% (Pitt y Hocking, 2009). El presente trabajo constituye, hasta donde se conoce, el primer reporte para el aislamiento de especies de *Bispora*, *Basipetospora* y *Verticillium* en espigas de maíz cultivadas en Argentina.



Figura 2.4. Colonia con características similares a *Aspergillus flavus* aislada en medio de cultivo DRBC a partir de granos de maíz colectados y conservados en su espiga.

### **INCIDENCIA Y SEVERIDAD DE *Aspergillus* sección *Flavi***

En la Tabla 2.3 se presenta la información respecto al aislamiento de *Aspergillus* sección *Flavi* a partir de espigas de maíz cultivadas en dos regiones maiceras durante dos campañas de cultivo. Se detectó contaminación con *A. flavus* en 27 de las 37 muestras colectadas en ambas campañas y regiones maiceras (Figura 2.5). La incidencia y severidad de esta especie fúngica varió significativamente entre las campañas analizadas. Todas las muestras ( $n=24$ ) colectadas de diferentes zonas durante la campaña 2012/2013 estuvieron infectadas con *A. flavus*. La severidad de la infección varió de 0,5 a 48% (mediana = 0,5%) en muestras provenientes de la región I. En la región IV, la severidad tuvo un rango entre 0,5 y 3,5% (mediana = 1,5%). Los valores medios obtenidos fueron de 8,3 y 1,4% en las regiones I y IV, respectivamente. Solamente 3 muestras de un total de 13 colectadas durante la campaña 2013/2014 estuvieron contaminadas con *A. flavus*. Las severidades obtenidas son similares a aquellas reportadas en granos de maíz cultivados en Illinois (USA), donde las contaminaciones con *A. flavus* mostraron una media de 2% (Wicklow *et al.*, 1998). La variación en severidad obtenida corresponde a las diferencias en precipitación entre los periodos de cultivo analizados. En la campaña 2012/2013, las regiones I

y IV registraron precipitaciones por debajo del promedio histórico de 475 mm para el periodo de floración del cultivo (Tabla 2.1). El proceso de infección por parte de *Aspergillus* es favorecido por períodos de sequía acompañados por altas temperaturas durante el desarrollo del cultivo (Cotty *et al.*, 2008). Estudios previos sobre la población fúngica presentes en granos de maíz indicaron que la infección con *A. flavus* también varía de acuerdo a las condiciones climáticas en las regiones agro-ecológicas, con severidades entre el 14 y 70% (Atehnkeng *et al.*, 2008). Serias infecciones de maíz con *A. flavus* han sido observadas en Tailandia y Filipinas, con incidencias que alcanzaron al 100% de los granos (Pitt y Hocking, 2009). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas para la incidencia o severidad ( $P=0,421$  y  $P=0,311$ , respectivamente) de esta especie fúngica entre las regiones maiceras argentinas bajo estudio.

Un total de 66 aislados fueron obtenidos durante las campañas 2012/2013 y 2013/2014 (Tabla 2.4). Solamente una de las colonias aisladas fue identificada morfológicamente como *A. parasiticus*. Este resultado revela la presencia de esta especie en la muestra número 13 (región IV, campaña 2012/2013) con una severidad de 0,5%, además de la severidad de 2% observada para *A. flavus*. La baja prevalencia de *A. parasiticus* en espigas de maíz ha sido reportada previamente. Atehnkeng *et al.* (2008) estudiaron la presencia de esta especie en espigas de maíz cultivadas en varias regiones productivas de Nigeria e indicaron una proporción relativa entre el 0,2 y 1,1% entre todos los aislados identificados. Un estudio similar realizado en Italia determinó que aproximadamente el 7% de todos los aislados obtenidos fueron identificados como *A. parasiticus* (Giorni *et al.*, 2007). Los estudios publicados que indicaron a *A. flavus* y *A. parasiticus* como las especies comúnmente involucradas en la contaminación con aflatoxinas también reportaron que *A. flavus* es, por lejos, la más prevalente en maíz (Perrone *et al.*, 2014b; Cotty *et al.*, 2008).

Tabla 2.3. Severidad de *Aspergillus flavus* en espigas de maíz colectadas durante la campaña 2012/2013 y 2013/2014 en dos regiones maiceras argentinas.

Muestra	Campaña	Región <sup>a</sup>	Localidad <sup>b</sup>	Genotipo	Característica	Severidad <sup>c</sup>		
1	2012/2013	I	Sachayoj	DS 120 PW	Subtropical	0,5		
2				DS 120 PW	Subtropical	2,1		
3				DK 747 VT3P	Templado	48,0		
20			La Abrita	P 1780HR	Templado	0,5		
21				P 3115H	Subtropical	0,5		
22				DK 747 VT3P	Templado	6,5		
23				P 30F35HR	Subtropical	0,5		
4				IV	Manfredi	P 2053YR	Templado	2,0
5						Desconocido	Desconocido	0,5
6		P 1780HR	Templado			1,0		
7		P 1780HR	Templado			1,0		
8		AX 852 MGRR	Templado			2,0		
9		AX 852 MGRR	Templado			1,5		
10		Gral. Paz	DK 747 VT3P			Templado	1,0	
11			Jesús María			SPS 2756 TD Max	Templado	3,5
12			Cañada de			ACA 468 MGRR2	Templado	1,5
13		Luque	LT 632 VT3P MGRR2			Templado	2,0	
14			Desconocido	Desconocido	1,0			
15			DM 2749MGRR2	Subtropical	2,0			
16	DS 120 PW		Subtropical	1,5				
17	DK 747 VT3 Pro		Templado	2,0				
18	Despeñaderos		AG 9008 TD Max	Subtropical	0,5			
19			Pampa de Pocho	MC 210	Subtropical	0,5		
24	2013/2014	I	Videla	Desconocido	Desconocido	1,0		
30			Sachayoj	DK 747 VT3P	Templado	0,0		
34			Leales	NK 138 TD MAX	Tropical	0,0		
35			La Abrita	P 1780HR	Templado	0,0		
36		IV	Manfredi	P 3115H	Subtropical	5,0		
37				P 30F35HR	Subtropical	0,0		
25				P 31Y05HR	Templado	0,0		
26			Altos Fierro	DS 510 PW	Templado	1,0		
27				DS 510 PW	Templado	0,0		
28			Pampa de Pocho	LT 611 MGRR2	Templado	0,0		
29				P 31Y05HR	Templado	2,0		
31				Juárez Célman	DK 747VT3 Pro	Templado	0,0	
32			Capilla de los Remedios	DK 747 MGRR2	Templado	0,0		
33				SW 5148, 5160, 5147	Tropical	0,0		

<sup>a</sup> I y IV: regiones maiceras en Argentina.

<sup>b</sup> Localidad más cercana al lote productivo.

<sup>c</sup> Severidad: porcentaje de granos infectados ( $n = 200$ ).

Tabla 2.4. Distribución geográfica de los aislados de *Aspergillus* sección *Flavi* obtenidos durante las campañas 2012/2013 y 2013/2014 en dos regiones maiceras argentinas.

Campaña	Región <sup>a</sup>	Provincia	Localidad <sup>b</sup>	Número de aislados	
				<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>
2012/2013	I	Santiago del Estero	Sachayoj	5	-
			La Abrita	15	-
	IV	Córdoba	Cañada de Luque	17	1
			General Paz	1	-
			Manfredi	16	-
			Jesús María	6	-
			Pampa de Pocho	1	-
	Santa Fe	Videla	2	-	
2013/2014	IV	Córdoba	Altos Fierro	2	-

<sup>a</sup> I y IV: regiones maiceras en Argentina.

<sup>b</sup> Localidad más cercana al lote productivo.

Los insectos, el rastrojo y el suelo de los agro-ecosistemas han sido reportados como fuente de inóculo debido a que contienen una gran cantidad de esporas de *Aspergillus* (Nesci *et al.*, 2006; Nesci y Etcheverry, 2002a). El proceso de contaminación de las espigas con *Aspergillus* sección *Flavi* puede dividirse en dos fases de acuerdo a la maduración del cultivo. La primera fase ocurre mediante colonización de la espiga a través del canal estilar expuesto durante la floración del cultivo. La segunda fase sucede posterior a la maduración del cultivo, donde el cultivo permanece vulnerable a la contaminación. Condiciones de altas temperaturas y períodos de sequía actúan a favor de la primera fase mientras que temperaturas elevadas acompañadas de alta humedad favorecen la segunda fase (Cotty *et al.*, 2008). El impacto de cada fase en el contenido final de aflatoxinas permanece sin ser establecido. En el caso de *Fusarium*, se considera que la primera fase posee un rol más importante en la contaminación con fumonisinas (Moschini *et al.*, 2017).

Los resultados obtenidos en este estudio confirman la colonización en precosecha de los granos de maíz cultivados en las regiones maiceras I y IV. Las especies fúngicas *A. flavus* y *A. parasiticus* poseen la capacidad de crecer en condiciones con baja disponibilidad de agua, multiplicándose durante la poscosecha de los granos (Presello y Botta, 2004). Como resultado, altas severidades (15 – 84%) de esta especie fueron reportados en granos almacenados en Argentina (Sepúlveda y Piontelli, 2005). Otro estudio indicó que la población de *Aspergillus* presentes en granos de maíz almacenados estuvo compuesta por *A. flavus* (78%) y *A. parasiticus* (22%) (Etcheverry *et al.*, 1999). Si bien en este estudio no se analizaron granos almacenados, es importante considerar que la contaminación de granos de maíz con micotoxinas podría acentuarse después de ser cosechados.

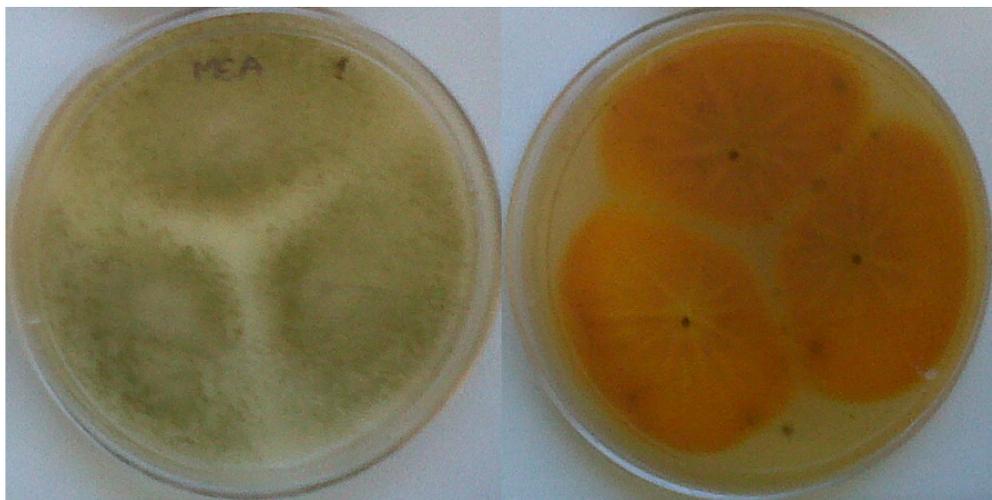


Figura 2. 5. Colonia de *Aspergillus flavus* en medio de cultivo MEA (izquierda) y AFPA (derecha) obtenida de granos de maíz colectados y mantenidos en su espiga.

### **AISLAMIENTO DE *Penicillium* spp.**

Dos colonias de características similares a *Penicillium* fueron elegidas al azar de las muestras e identificadas como *P. minioluteum* (AP003) y *P. olsonii* (AP004), respectivamente (Figura 2.6). *P. olsonii* ha sido indicado como parte de la microbiota presente en granos de maíz y hasta el momento no ha sido reportada por producir toxinas (Pitt y Hocking, 2009). Por otro

lado, estudios en granos de maíz cultivados en Argentina indicaron a *P. minioluteum* como la especie predominante dentro del género *Penicillium*, con una frecuencia del 25% (Etcheverry *et al.*, 1999). Contrariamente, su frecuencia disminuye al 5% en la población de *Penicillium* presente en el suelo (Nesci *et al.*, 2006). Ciertos metabolitos sintetizados por *P. minioluteum*, como los denominados minioluteumides, son tóxicos frente a células humanas aunque su riesgo para la salud humana es considerado bajo (Ngokpol *et al.*, 2015).

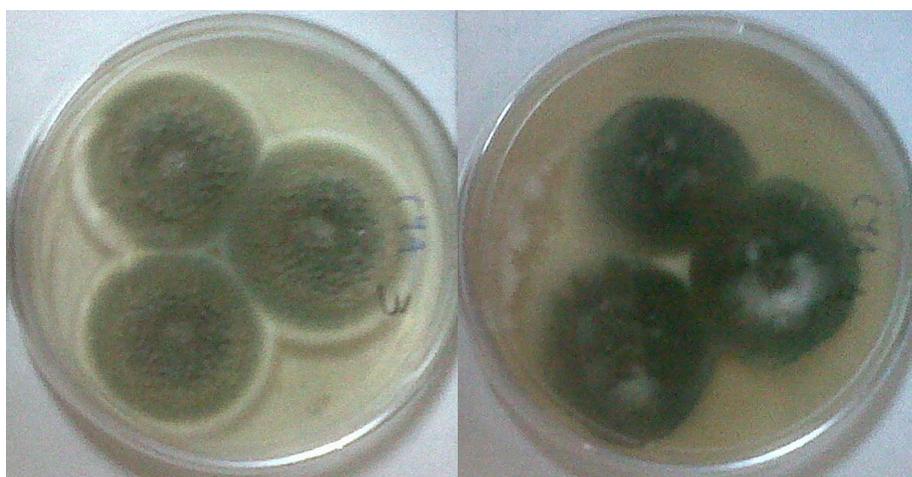


Figura 2. 6. Colonias de *P. minioluteum* (izquierda) y *P. olsonii* (derecha) en medio agar Czapeck extracto de levadura.

## **IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Aspergillus* sección *Flavi***

Los aislados nativos de *Aspergillus* sección *Flavi* fueron identificados utilizando los cebadores propuestos por Devi *et al.* (2013). Un total de 65 aislados, previamente identificados morfológicamente como *A. flavus*, fueron incluidos en las reacciones de PCR. La PCR produjo una amplificación característica de 490 pb (Figura 2.7) en 62 de los aislados nativos, como así también en el control positivo. Además, también se observó esta banda para el aislado de *A. parasiticus*. El control negativo (*A. niger*) y cuatro de los aislados nativos no mostraron la amplificación característica. La secuencia analizada codifica para la proteína dominante

HAPTase\_c característica de *A. flavus* (Wang *et al.*, 2012). Sin embargo, la PCR utilizando este juego de primers no fue capaz de diferenciar entre esta especie y *A. parasiticus*, en los aislados locales. Resultados similares fueron obtenidos por otros autores (Iheanacho *et al.*, 2014), quienes diseñaron un juego de primers para identificación de *A. flavus* y *A. parasiticus*, sin poder diferenciarlas entre sí debido al similar tamaño molecular de sus amplificaciones. Estas especies fúngicas, ambas pertenecientes a la sección *Flavi*, son similares morfológicamente (White, 1999). Numerosos aislados previamente identificados como *A. flavus* han sido reasignados a *A. parasiticus* (Hesseltine *et al.*, 1970). Sin embargo, este ensayo de PCR fue exitoso para diferenciar estas especies pertenecientes a la sección *Flavi* de otras especies del género *Aspergillus* comúnmente presentes en espigas de maíz. La identificación molecular se presenta como el método más confiable para confirmar la identidad de una especie fúngica y se ha convertido en la herramienta más rápida para identificación de hongos (Iheanacho *et al.*, 2014).

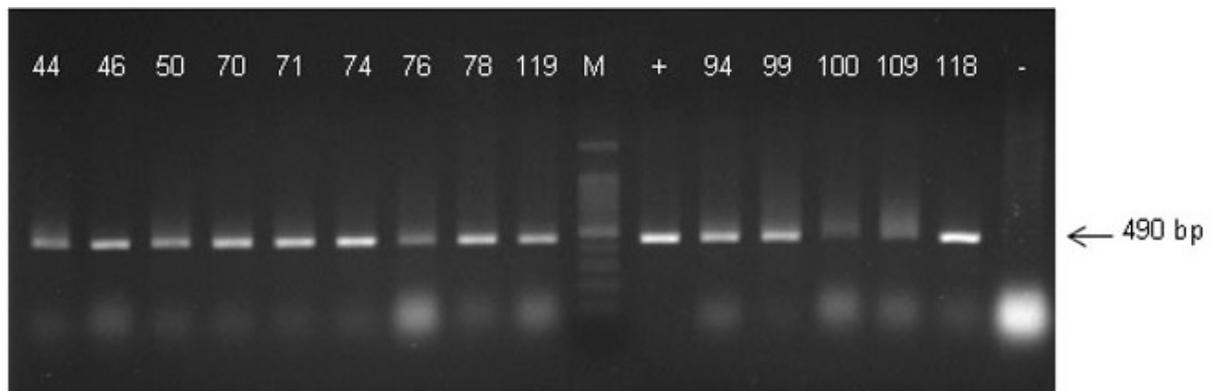


Figura 2.7. Gel de electroforesis exhibiendo los productos de la PCR. M: marcador molecular (100 pb ADN Ladder); +: *A. flavus* 114116 (control positivo); -: *A. niger* (control negativo); 44, 46, 50 y 118: *A. flavus* aislados de la región I; 70, 71, 74, 76, 78, 94, 99, 100, 109 y 119: *A. flavus* aislados de la región I.

## CONCLUSIONES

- Las espigas de maíz cultivadas en las regiones maiceras I y IV son propensas a la degradación fúngica, incluyendo a *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* como los géneros predominantes.
- Se reporta por primera vez la presencia de especies de *Bispora*, *Basipetospora* y *Verticillium* en espigas de maíz cultivadas en Argentina.
- La contaminación de granos de maíz con *Aspergillus* sección *Flavi*, como así también con los otros géneros fúngicos estudiados, comienza en precosecha.
- La especie *A. flavus* representa casi la totalidad (98,4%;  $n=66$ ) de los aislados pertenecientes a la sección *Flavi* presente en espigas de maíz. Un solo aislado fue identificado como *A. parasiticus*.
- La incidencia y severidad de *A. flavus* no muestra diferencias entre las zonas estudiadas a pesar de sus diferencias en las temperaturas máximas promedio históricas durante el período de cultivo.
- Durante la campaña 2012/2013, el 100% de los lotes de maíz muestreados al azar en las regiones I y IV presentaron espigas infectadas por *A. flavus*.
- La incidencia de *A. flavus* varió entre las campañas analizadas, siendo significativamente mayor en la campaña donde las precipitaciones fueron menores al promedio.
- Las especies *P. minioluteum* y *P. oxalicum* forman parte de la población de *Penicillium* presente en espigas de maíz.
- Se propone el test molecular desarrollado por Devi *et al.* (2013) como herramienta para identificar a las especies de la sección *Flavi*.
- Debido a las conclusiones mencionadas anteriormente, las estrategias para el manejo de patógenos fúngicos y sus micotoxinas en granos de maíz deben orientarse a evitar la colonización fúngica de la espiga durante el cultivo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aguaysol N. C., Gonzalez V., De Lisi V., Rezkinov S., Stegmayer, C.A. Henriquez D. y Ploper L. D. 2013. Incidencia de *Fusarium verticilloides* y *Fusarium graminearum* en granos de híbridos comerciales de maíz, cosechados en la campaña 2011/2012 en seis localidades de las provincias de Tucumán y Salta. EEAOC Publ. Espec. 46: 63–69.
- Atehnkeng J., Ojiambo P. S., Donner M., Ikotun T., Sikora R. A., Cotty P. J. and Bandyopadhyay R. 2008. Distribution and toxigenicity of *Aspergillus* species isolated from maize kernels from three agro-ecological zones in Nigeria. Int. J. Food Microbiol. 122: 74–84.
- Bhatnagar-Mathur P., Sunkara S., Bhatnagar-Panwar M., Waliyar F. and Sharma K. K. 2015. Biotechnological advances for combating *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in crops. Plant Sci. 234: 119–132.
- Burgess L. W., Dodman R. L., Pont W. and Mayers P. 1981. *Fusarium* diseases of wheat, maize and grain sorghum in Eastern Australia. En: *Fusarium: Diseases, biology and taxonomy*. Nelson, P. E., Toussoun, T. A., and Cook, R. J. (eds.). The Pennsylvania State University Press, Pennsylvania, pp. 64–76.
- Cirilo A. G. 2004. Fecha de siembra y rendimiento en maíz. IDIA XXI 4: 122–127.
- Cotty P. J., Probst C. and Jaime-garcia R. 2008. Etiology and management of aflatoxin contamination. En: *Mycotoxins: Detection methods, management, public health and agricultural trade*. Leslie, J. F., Bandyopadhyay, R., and Visconti, A. (eds.). CABI, Oxfordshire, UK, pp. 287–299.
- Devi T. P., Prabhakaran N., Kamil D., Borah J. L. and Alemayehu G. 2013. Development of SCAR marker for specific detection of *Aspergillus flavus*. African J. Microbiol. Res. 7: 783–790.
- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M. y Robledo C. W. 2014. InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Doyle J. J. and Doyle J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13–15.
- Etcheverry M., Nesci A., Barros G., Torres A. and Chulze S. 1999. Occurrence of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxin B1 in corn genotypes and corn meal in Argentina. Mycopathologia 147: 37–41.
- Farnochi M. C., Torres A. M., Magan N. and Chulze S. N. 2005. Effect of antioxidants and competing mycoflora on *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* populations and fumonisin production on maize grain. J. Stored Prod. Res. 41: 211–219.
- Gherbawy Y. and Voigt K. 2010. Molecular Identification of Fungi. Springer, New York, USA, 501 pp.
- Giorni P., Magan N., Pietri A., Bertuzzi T. and Battilani P. 2007. Studies on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in northern Italy. Int. J. Food Microbiol. 113: 330–338.
- Hesseltine C. W., Shotwell O. L., Smith M., Ellis J. J., Vandegrift E. and Shannon G. 1970. Production of various aflatoxins by strains of the *Aspergillus flavus* series. En: *Toxic Microorganisms: Mycotoxins, Botulism*. Herzberg, M. (ed.). UJNR, Washington, pp. 202–210.
- Iheanacho H. E., Njobeh P. B., Dutton F. M., Steenkamp P. a, Steenkamp L., Mthombeni J. Q., Daru B. H. and Makun A. H. 2014. Morphological and molecular identification of filamentous *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* isolated from compound feeds

- in South Africa. *Food Microbiol.* 44: 180–4.
- INTA. 1997. *Guía práctica para el cultivo de maíz*. INTA Ediciones, Buenos Aires, Argentina, 221 pp.
- INTA. 2016. *Sistema de Información y Gestión Agrometeorológica*. Instituto de Clima y Agua - INTA. Publicado en internet, disponible en <http://siga2.inta.gov.ar>.
- Klich M. A. 2002. *Identification of common Aspergillus species*. Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, 116 pp.
- Mahmoud M. A., Al-Othman M. R. and Abd El-Aziz A. R. 2013. Mycotoxigenic fungi contaminating corn and sorghum grains in Saudi Arabia. *Pakistan J. Bot.* 45: 1831–1839.
- MAIZAR. 2013. *La cadena de maíz y las oportunidades para desarrollo en la Argentina*. MAIZAR, Buenos Aires, Argentina, 144 pp.
- Mauro A., Battilani P., Callicott K. A., Giorni P., Pietri A. and Cotty P. J. 2013. Structure of an *Aspergillus flavus* population from maize kernels in northern Italy. *Int. J. Food Microbiol.* 162: 1–7.
- Moschini R. C., Martínez M. I., Presello D., Ferraguti F., Cristos D. y Rojas D. Análisis del efecto de las condiciones meteorológicas en precosecha sobre la acumulación de fumonisina en granos de maíz. *Rev. Investig. Agropecu*, en prensa.
- Nesci A., Barros G., Castillo C. and Etcheverry M. 2006. Soil fungal population in preharvest maize ecosystem in different tillage practices in Argentina. *Soil Tillage Res.* 91: 143–149.
- Nesci A. and Etcheverry M. 2002a. *Aspergillus* section *Flavi* populations from field maize in Argentina. *Lett. Appl. Microbiol.* 34: 343–348.
- Nesci A. and Etcheverry M. 2002b. *Aspergillus* section *Flavi* populations from field maize in Argentina. *Lett. Appl. Microbiol.* 34: 343–348.
- Ngokpol S., Suwakulsiri W., Sureram S., Lirdpramongkol K., Aree T., Wiyakrutta S., Mahidol C., Ruchirawat C. and Kittakoop P. 2015. Drimane sesquiterpene-conjugated amino acids from a marine isolate of the fungus *Talaromyces minioluteus* (*Penicillium Minioluteum*). *Mar. Drug* 13: 3567 - 3580.
- Oliveira Rocha L., Reis G. M., Braghini R., Kobashigawa E., de Araújo J. and Corrêa B. 2012. Characterization of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from corn grains of different geographic origins in Brazil. *Eur. J. Plant Pathol.* 132: 353–366.
- Perrone G., Gallo A. and Logrieco A. F. 2014 a. Biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in Europe in relation to the management of aflatoxin risk. *Front. Microbiol.* 5: 1–5.
- Perrone G., Haidukowski M., Stea G., Epifani F., Bandyopadhyay R., Leslie J. F. and Logrieco A. 2014 b. Population structure and aflatoxin production by *Aspergillus* Sect. *Flavi* from maize in Nigeria and Ghana. *Food Microbiol.* 41: 52–59.
- Pitt J. I. and Hocking A. D. 2009. *Fungi and Food Spoilage*. Springer, New York, 519 pp.
- Presello D. A., Botta G., Iglesias J. and Eyharabide G. H. 2008. Effect of disease severity on yield and grain fumonisin concentration of maize hybrids inoculated with *Fusarium verticillioides*. *Crop Prot.* 27: 572–576.
- Presello D. A., Iglesias J., Botta G. and Eyharabide G. H. 2007. Severity of *Fusarium* ear rot and concentration of fumonisin in grain of Argentinian maize hybrids. *Crop Prot.* 26: 852–855.
- Presello D. y Botta G. 2004. Podredumbres de espiga de maíz y micotoxinas asociadas. *IDIA XXI* 6: 152–157.
- Sepúlveda C. y Piontelli E. 2005. Poblaciones de *Aspergillus* en semillas de maíz y soja de

- importación Argentina: énfasis en la sección *Flavi*. Bol. Micol. 20: 41–55.
- SMN. 2015. Atlas climático del Servicio Meteorológico Nacional. Publicado en internet, disponible en <http://smn.gov.ar>.
- Smart M. G., Wicklow D. T. and Caldwell R. W. 1990. Pathogenesis in *Aspergillus* ear rot of maize: Light microscopy of fungal spread from wounds. Phytopathology 80: 1287–1294.
- Viglizzo E. F., Carreño L. V., Pereyra H., F. R., Clatt J., Pincén D. y Jobbaghy E. G. 2012. Dinámica de la frontera agropecuaria y cambio tecnológico. En: Expansión de la frontera agropecuaria en Argentina y su impacto ecológico-ambiental. Viglizzo, E. F. y Jobbágy, E. (eds.). INTA Ediciones, Buenos Aires, Argentina, pp. 106.
- Wang Z., Yan S., Liu C., Chen F. and Wang T. 2012. Proteomic analysis reveals an aflatoxin-triggered immune response in cotyledons of *Arachis hypogaea* infected with *Aspergillus flavus*. J. Proteome Res. 11: 2739–2753.
- White D. G. 1999. Compendium of corn diseases. APS Press, St. Paul, 75 pp.
- Wicklow D. T., Mcalpin C. E. and Platis C. E. 1998. Characterization of the *Aspergillus flavus* population within an Illinois maize field. Mycol. Res. 102: 263–268.

## CAPÍTULO 3

# CARACTERIZACIÓN DE CEPAS NATIVAS DE *Aspergillus flavus* PRESENTES EN ESPIGAS DE MAÍZ E IDENTIFICACIÓN DE POTENCIALES AGENTES DE BIOCONTROL

## INTRODUCCIÓN

En Argentina, el maíz tiene múltiples destinos después de su cosecha, que incluyen la exportación y la industrialización (MAIZAR, 2013). El grano de maíz es susceptible a la contaminación con aflatoxinas, tanto en precosecha como en poscosecha. La presencia de estas micotoxinas dificulta su comercialización (Presello *et al.*, 2007; Presello *et al.*, 2008; Presello y Botta, 2004). Actualmente, la normas para la comercialización del grano de maíz establecen un máximo entre 4 y 20 ng g<sup>-1</sup> como límite máximo para el contenido total de aflatoxinas debido a su alta toxicidad. Sin embargo, existen investigadores que cuestionan estos estándares y sugieren disminuir el límite permitido para una mejor protección de la salud humana (Wu *et al.*, 2013). En el año 2011, la industria húmeda del maíz registró un rechazo del 30% de las partidas de grano provenientes de zonas con estrés hídrico por posible contaminación con aflatoxinas (reunión efectuada entre MINCyT, IPAVE-CIAP-INTA, ARCOR SAIC y CEPROCOR, 2012).

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios sintetizados por varias especies pertenecientes a la sección *Flavi* del género *Aspergillus*. Entre ellas, *A. flavus* es considerada a nivel mundial como la principal responsable de la contaminación de maíz con aflatoxina B<sub>1</sub>. Generalmente, este patógeno produce aflatoxinas tipo B (B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>), pero algunos aislados atípicos han sido reportados por producir simultáneamente las del tipo G (G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>) (Perrone *et al.*, 2014a). Las especies de *Aspergillus* producen estructuras denominadas esclerocios que consisten en masas de hifas oscuras y firmes (Klich, 2007). De acuerdo al tamaño de estas estructuras, los aislados de *A. flavus* han sido tradicionalmente clasificados en dos clases: cepas S, que producen una gran cantidad de esclerocios con tamaño inferior a 400 µm y cepas L, que producen pocos esclerocios con diámetro superior a 400 µm (Cotty, 1989). Una tercera clase de

cepa, cuyo aislados no produjeron esclerocios en condiciones de laboratorio (NP), ha sido reportada en las regiones I y IV de nuestro país y en Italia (Giorni, 2007; Barros *et al.*, 2006; Pildain *et al.*, 2004; Novas y Cabral, 2002). Los aislados de *A. flavus* también varían en cuanto a la producción de aflatoxinas, con algunas cepas produciendo grandes cantidades de estas sustancias, mientras que otras no las producen y han sido denominadas como “no aflatoxigénicas” (Bayman y Cotty, 1993; Mauro *et al.*, 2013). Asociaciones entre la clase de cepa y la producción de aflatoxinas ha sido ampliamente estudiada, pero con resultados contrastantes (Bennett, 2010). Además de las aflatoxinas, los aislados de *A. flavus* pueden o no sintetizar simultáneamente CPA, micotoxina tóxica para animales y humanos (Cullen *et al.*, 1988; Rao y Husain, 1985).

La relación entre aislados tóxicos y atóxicos en una población de *A. flavus* en una determinada área es importante para determinar el riesgo de contaminación con micotoxinas en los cultivos. Igual de relevante es cuantificar la cantidad de micotoxinas que pueden producir los aislados tóxicos. Una baja frecuencia de aislados altamente productores de micotoxinas pueden jugar un rol más importante en la contaminación con aflatoxinas que una alta frecuencia de aislados con baja producción de micotoxina (Cotty *et al.*, 2008). Diversos medios de cultivos sintéticos, líquidos o sólidos, han sido utilizados tradicionalmente para evaluar la capacidad de producir aflatoxinas que poseen los aislados (Perrone *et al.*, 2014b; Ortega-Beltran *et al.*, 2014; Vaamonde *et al.*, 2003; Cotty, 1989). La correlación entre los resultados obtenidos en medios de cultivo y en granos de maíz es materia de estudio desde que Probst y Cotty (2012) observaron una pobre a moderada correlación entre ambos sustratos. Hasta donde se conoce, el efecto del sustrato en la producción de CPA no ha sido estudiado.

El uso de cepas no aflatoxigénicas de *A. flavus* como agentes de biocontrol de aflatoxinas es una práctica agronómica común en numerosos cultivos comerciales (Bandyopadhyay *et al.*, 2016; Doster *et al.*, 2014; Mehl *et al.*, 2012). La aplicación de estos productos disminuyen la concentración de aflatoxinas sin incrementar la severidad del patógeno en el cultivo (Cotty y Bayman, 1993). Los aislados de *A. flavus* pueden ser subdivididos genéticamente mediante análisis de compatibilidad vegetativa (VCA). En condiciones de laboratorio, dos aislados diferentes que poseen alelos idénticos a lo largo del loci *het* pueden formar un heterocarion con

intercambio genético en la zona de interacción entre sus hifas. Si esto ocurre, se determina que ambos aislados pertenecen al mismo grupo de compatibilidad vegetativa (VCG). En una determinada población de *A. flavus*, conocer la diversidad genética mediante VCG y su distribución ambiental facilita la identificación de potenciales agentes de biocontrol e incrementa su eficacia (Atehnkeng *et al.*, 2016). Se considera que los VCGs están compuestos por miembros de un mismo linaje clonal que comparten ciertas características fenotípicas y de patogenicidad, como la habilidad para producir aflatoxinas o la adaptabilidad a un determinado nicho ecológico (Jaime-García y Cotty, 2006; Pildain *et al.*, 2004; Leslie, 1993). Las poblaciones de *A. flavus* están compuestas por numerosos VCGs, cuyas frecuencias relativas varían respecto a los cultivos, regiones y campañas (Mehl *et al.*, 2012). En un agroecosistema, aumentar la frecuencia de VCGs no aflatoxigénicos a lo largo de los años ayuda a disminuir la contaminación con aflatoxina debido al desplazamiento de los aislados toxigénicos, fenómeno denominado exclusión competitiva (Atehnkeng *et al.*, 2016; Mehl *et al.*, 2012; Cotty *et al.*, 2008). Asimismo, agentes de biocontrol que pertenecen a un VCGs ampliamente distribuido resultan efectivos al momento de realizar una aplicación a escala regional (Atehnkeng *et al.*, 2016).

Diversos mecanismos moleculares pueden ser responsables de la pérdida de producción de aflatoxinas en aislados de *A. flavus* (Chang *et al.*, 2005; Ehrlich *et al.*, 2004). La biosíntesis de aflatoxinas es regulada por más de 25 genes ubicados en un *cluster* que posee un tamaño entre 65 y 70 kb (Yu *et al.*, 2004). Callicott y Cotty (2015) desarrollaron pares de cebadores específicos que permiten monitorear deleciones en este *cluster* utilizando reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos cebadores fueron desarrollados para 16 regiones espaciadas aproximadamente cada 5 kb, abarcando el *cluster* de genes para la biosíntesis de aflatoxinas y otras regiones involucradas en la producción de esta micotoxina. La presencia o ausencia de estas regiones es denominada como patrón de amplificación del *cluster* (PAC). Esta metodología ha sido utilizada para estudiar deleciones génicas en poblaciones de *A. flavus* nativas de Estados Unidos y México (Ortega-Beltrán *et al.*, 2016; Callicott y Cotty, 2015).

Los objetivos de este capítulo fueron evaluar la producción de aflatoxinas y CPA de las cepas de *A. flavus* aisladas de espigas de maíz y el efecto del sustrato utilizado; estudiar la diversidad genética entre los aislados no productores de aflatoxina en busca de VCGs

predominantes en espigas de maíz para identificar aislados atoxigénicos como posibles agentes de biocontrol; estudiar posibles deleciones en el *cluster* de genes para la síntesis de aflatoxinas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **MATERIAL VEGETAL**

Se utilizaron granos de maíz (cultivar BH8551 RR) provistos por BH genetics (Ganado, TX, USA).

### **REACTIVOS PARA LA DETERMINACIÓN DE MICOTOXINAS**

Los estándares para aflatoxina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> y el CPA fueron obtenidos de Sigma-Aldrich al igual que todas las soluciones de grado HPLC (metanol, cloruro de metilo, acetona, cloroformo, agua).

### **SOLUCIONES PARA LA ELABORACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO**

- Solución salina/Tween

NaCl .....0,85 g  
Tween 80.....0,50 mL  
Agua destilada c.s.p.....100 mL

- Rosa de Bengala

Rosa de Bengala.....0,5 g  
Ethanol 100%.....30 mL  
Agua destilada c.s.p.....100 mL

- A&M micronutrientes

MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O.....0,11 g  
(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O\*.....0,5 g  
ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O..... 17,6 g  
Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O..... 0,7 g

CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O.....0,3 g  
Agua destilada c.s.p.....1000 mL

\* pH = 2,5.

- Buffer de lisis

Tris.....182 mg  
EDTA.....186 mg  
Agua.....40 mL  
SDS\* 10%.....5 mL

\*El SDS no puede ser autoclavado. Disolver el Tris y el EDTA en agua y ajustar el pH a 8,0. Alcanzar un volumen final de 45 mL y autoclavar por 60 min a 121°C. Agregar el SDS.

- Acetato de amonio 4M

NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO.....24,67 g  
Agua estéril\*.....80 mL

\*Esterilizar mediante filtro previamente autoclavado. Almacenar en heladera.

- Buffer TAE (1x)

Tris.....4,84 g  
Ácido acético glacial.....1,14 mL  
EDTA 500mM (pH 8,0).....2 mL  
Agua destilada c.s.p.....1000 mL

## **MEDIOS DE CULTIVO PARA LA CARACTERIZACIÓN DE *Aspergillus flavus***

- Agar Agua (AA)

Agar.....15 g  
Agua destilada c.s.p.....1000 mL  
pH=7,0

- Agar papa glucosado (PDA)

Papa glucosado agar.....39 g  
Agua destilada c.s.p.....1000 mL

- Agar Czapek Dox (CZ)

Sucrose.....30 g  
NaNO<sub>3</sub>.....3 g  
KCl.....0,5 g  
MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.....0,5 g  
FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.....0,01 g  
PO<sub>4</sub>HK<sub>2</sub>.....1 g  
Agar.....15 g  
Agua destilada c.s.p.....1000 mL  
pH=7,3

- Agar harina de maíz (CMA)

Harina de maíz agar\*.....17 g  
Agua destilada c.s.p.....1000 mL

\*Difco™ #211132

- Extracto de levadura y sacarosa (YES)

Extracto de levadura.....2 g  
Sacarosa.....15 g  
Agua destilada c.s.p.....1000 mL

- Medio de selección (SEL)

Sacarosa.....30 g  
NaNO<sub>3</sub>.....3 g  
PO<sub>4</sub>HK<sub>2</sub>.....0,5 g

PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K.....	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,5 g
KCl.....	0,5 g
KClO <sub>3</sub> .....	25 g
Rosa de Bengala.....	10 mL
A&M micronutrientes.....	1 mL
Agar.....	20 g
Agua destilada c.s.p.....	1000 mL

pH= 7

- Medio MIT

Sacarosa.....	30 g
NaNO <sub>3</sub> .....	3 g
PO <sub>4</sub> HK <sub>2</sub> .....	0,5 g
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K.....	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,5 g
KCl.....	0,5 g
KClO <sub>3</sub> .....	15 g
A&M micronutrientes.....	1 mL
Agar.....	20 g
Agua destilada c.s.p.....	1000 mL

pH= 6,5

- Agar 5/2

V-8™ jugo.....	50 mL
Agua destilada c.s.p.....	1000 mL
Agar.....	20 g

- Agar hipoxantina (HYP)

Sacarosa.....	50 g
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K.....	10 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	2 g
A&M micronutrientes.....	1 mL
Hipoxantina.....	0,2 g
Agar.....	20 g
Agua destilada c.s.p.....	1000 mL

pH= 5,5

- Agar Nitrito (NA)

Sacarosa.....	50 g
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K.....	10 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	2 g
NaNO <sub>2</sub> .....	0,5 g
A&M micronutrientes.....	1 mL
Agar.....	20 g
Agua destilada c.s.p.....	1000 mL

pH= 5,5

- Agar Almidón (AMD)

Dextrosa.....	36 g
Almidón soluble*.....	20 g
NaNO <sub>3</sub> .....	3 g
PO <sub>4</sub> HK <sub>2</sub> .....	0,5 g
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K.....	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	2 g
KCl.....	0,5 g
A&M micronutrientes.....	1 mL
Agar.....	20 g

Agua destilada c.s.p.....1000 mL

pH= 6

\*Agregado junto con el agar, con el pH regulado.

## **OBTENCIÓN DE CULTIVOS MONOSPÓRICOS Y PREPARACIÓN DE INÓCULO**

Un total de 83 aislados de *A. flavus* nativos obtenidos desde espigas de maíz colectadas al azar en lotes de las regiones maiceras I y IV durante las campañas 2012/2013, 2013/2014 y 2014/2015 (Tabla 3.1) fueron incluidos en este estudio empleando la metodología descrita en el capítulo 2 de esta tesis. Para obtener cultivos monospóricos, se prepararon diluciones seriadas para cada aislado a partir de cultivos puros previamente crecidos en PDA ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , oscuridad, 7 días). La concentración más diluida fue utilizada para sembrar placas de Petri con medio AA para ser incubadas a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 72 hs, en oscuridad. Luego de la incubación, un único conidio germinado fue seleccionado bajo estereomicroscopio (Bausch & Lomb, USA) y transferido con un ansa “en punta” a placas de Petri con medio PDA. Los aislados fueron incubados a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 7 días, en oscuridad. Los conidios de los nuevos cultivos fueron transferidos a frascos de color caramelo de 20 mL con agua destilada estéril (5 mL) y su concentración fue ajustada a  $1 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  utilizando una cámara de Neubauer. Las suspensiones obtenidas fueron almacenadas a  $4^\circ\text{C}$  en oscuridad (de Rodríguez *et al.*, 2011). Las esporas de los cultivos monospóricos obtenidos se mantuvieron en glicerol al 25% a  $-80^\circ\text{C}$  para una conservación a largo plazo. La obtención de cultivos monospóricos es importante para comparar características moleculares y los metabolitos sintetizados entre aislados, permitiendo además una repetibilidad de los resultados (Choi *et al.*, 1999).

Todos los experimentos detallados en este capítulo fueron realizados bajo la dirección del Dr. Themis J. Michailides en el laboratorio de *Plant Pathology* de la Universidad de California – Davis, Estados Unidos.

Tabla 3.1. Aislados nativos de *Aspergillus flavus* obtenidos a partir de espigas de maíz cultivadas en dos regiones maiceras (I y IV) durante las campañas 2012/2013, 2013/2014 y 2014/2015.

Región	Provincia	Localidad*	Campaña	Aislados			
I	Santiago del Estero	Sachayoj	2012/2013	AS10202	AS03802		
				AS10302	AS04001		
				AS10402	AS00018		
			2014/2015	AS05254	AS02257		
				La Abrita	2012/2013	AS11821	AS04722
						AS04222	AS04822
		AS04322	AS05122				
		AS04522	AS05322				
		AS05022	AS04122				
		AS05222	AS04422				
		AS11622	AS04622				
		AS00019	AS04922				
		AS11623					
		AS04755	AS01153				
AS01756	AS04848						
AS03145	AS05544						
IV	Tucumán Córdoba	Bandera	2014/2015	AS04755	AS01153		
			2014/2015	AS01756	AS04848		
		Quimilí	2014/2015	AS03145	AS05544		
			2014/2015	AS03145	AS05544		
		Leales	2013/2014	AS03326	AS03426		
			2014/2015	AS06659			
		Altos Fierro	Cañada de Luque	2012/2013	AS03917	AS12114	
					AS07517	AS12214	
				AS07417	AS11215		
				AS07617	AS11415		
				AS12012	AS11515		
				AS09913	AS10616		
				AS10013	AS10816		
				AS09813	AS10516		
				AS04050			
				AS12410			
		General Paz	2012/2013	AS12306	AS12707		
			2012/2013	AS12506	AS12909		
		Manfredi	Cañada de Luque	2012/2013	AS12606	AS13009	
					AS07704	AS07804	
				AS12807	AS08004		
				AS11108	AS08105		
AS00001	AS02808						
AS07604	AS08508						
AS08608							
2014/2015	AS06441			AS06240			
2012/2013	AS09611			AS08711			
	AS08811			AS09311			
	AS09011	AS09411					
AS09511							
2014/2015	AS05639	AS05739					
Pampa de Pocho	2012/2013	AS10919					
	2012/2013	AS07424	AS07024				
Santa Fe	Videla	2012/2013	AS07424	AS07024			

\* Localidad más cercana al lote.

## **PRODUCCIÓN DE ESCLEROCIOS EN CONDICIONES DE LABORATORIO**

Se evaluó la capacidad de producir esclerocios para cada cepa, como así también el número y tamaño de los mismos bajo condiciones controladas de laboratorio. Placas de Petri con medio CZ fueron inoculadas centralmente con 10  $\mu$ L de suspensión de esporas e incubadas a  $30 \pm 2$  °C en oscuridad, durante 21 días. Los esclerocios fueron recuperados en 5 mL de solución salina Tween mediante raspado la superficie de la placa. La suspensión resultante fue filtrada a través de un filtro Whatman N° 2. Para calcular el número de esclerocios, éstos fueron dispersados sobre una cuadrícula (10 x 10 mm) marcada en la parte superior de una placa de Petri y se realizaron observaciones bajo estereomicroscopio. Un total de 20 esclerocios fueron elegidos al azar y sus diámetros fueron determinados en un microscopio (Zeiss, Germany) (Novas y Cabral, 2002). Los aislados de *A. flavus* fueron clasificados como morfotipos L (diámetro promedio > 400  $\mu$ m) o S (diámetro promedio < 400  $\mu$ m) (Cotty, 1989). Aquellos aislados que no produjeron esclerocios luego del período de incubación, fueron sembrados en medio CMA y granos de maíz estériles bajo las mismas condiciones para inducir la producción de esta estructura de resistencia. Finalmente, aquellos aislados que no produjeron esclerocios bajo ninguna de las condiciones mencionadas, fueron determinados como no productores (NP) (Novas y Cabral, 2002).

## **PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS EN MEDIO DE CULTIVO**

Todos los aislados de *A. flavus* fueron evaluados por su capacidad de producir aflatoxinas en medio de cultivo mediante cromatografía en capa delgada (TLC). Los experimentos fueron realizados en viales (20 mL) con 5 mL de medio de cultivo YES y sellados con tapa de goma para permitir el intercambio gaseoso. El medio de cultivo fue sembrado asépticamente con 100  $\mu$ L de suspensión de esporas. Los tratamientos fueron incubados a  $30 \pm 2$  °C en oscuridad, durante 7 días (Figura 3.1). Se agregaron 3 mL de acetona para detener el crecimiento del hongo y los viales fueron colocados en oscuridad a temperatura ambiente por 1 hora para permitir la liberación de las micotoxinas contenidas en el micelio. Se adicionaron 5 mL de cloruro de metilo, 5 mL de agua destilada, se agitaron manualmente y se pusieron nuevamente en reposo. Después de una hora, se tomó 1,5 mL de la capa inferior, se transfirió a viales color caramelo (2

mL) y se los dejó evaporar completamente en una campana. El residuo seco obtenido fue resuspendido en metanol:agua (70:30) y filtradas a través de un filtro de nylon (2  $\mu$ m, VWR, USA). Los extractos fueron almacenados a -20 °C en oscuridad hasta su análisis. Las muestras (4  $\mu$ L) fueron depositadas con micropipeta en placas de TLC (Silicagel 60, Merk, Alemania) junto a los estándares de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> (Sigma Aldrich, USA). Las placas fueron reveladas en cloroformo:acetona (88:12) durante 40 minutos. La presencia de aflatoxinas se visualizó bajo luz ultravioleta ( $\lambda=365$  nm) y se cuantificó mediante densitometría de fluorescencia en un equipo "CAMAG TLC scanner 3" (Muttentz, Switzerland), utilizando el software winCATS 1. 4. 2 (Ortega-Beltran *et al.*, 2014; Probst y Cotty, 2012). Se utilizaron curvas de calibración calculadas previamente a partir de diferentes concentraciones de soluciones estándares.

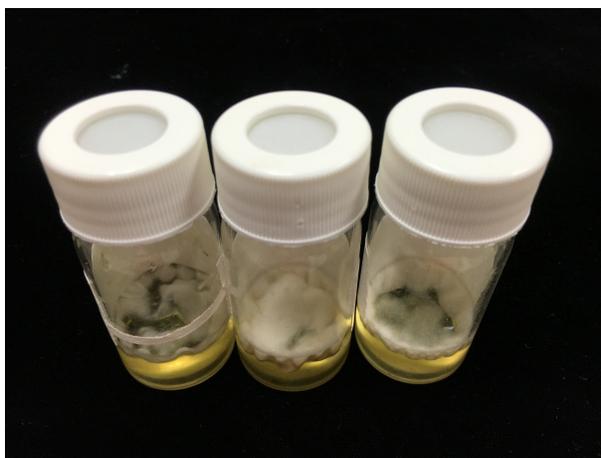


Figura 3.1. Aislado de *Aspergillus flavus* en medio de cultivo YES (tres réplicas) después del periodo de incubación.

## **PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS EN GRANOS DE MAÍZ**

Todos los aislados fueron también evaluados por su capacidad de producción de aflatoxinas en granos de maíz. Los experimentos se llevaron a cabo en frascos Erlenmeyer (250 mL) preparados con 10 g de maíz no dañado y autoclavados a 121 °C durante 1 hora. Un set representativo de granos fue colocado en placas de Petri con medio PDA e incubado a  $30 \pm 2$  °C en oscuridad por 7 días, con el objetivo de evaluar la efectividad de la esterilización y confirmar

la ausencia de contaminante fúngicos. El contenido de humedad de los granos fue determinado con un equipo MT-PRO (John Deere, IL, USA) y ajustado a 25% con agua destilada estéril conteniendo  $1 \times 10^6$  conidios. Los frascos fueron sellados con AirOtop™ (Thomson Instrument Company) para permitir el intercambio gaseoso y colocados en cubetas de plástico con 2 cm de agua para mantener en contenido de humedad. Los tratamientos fueron incubados a  $30 \pm 2$  °C en oscuridad durante 7 días (Figura 3.2). Al final del período de incubación, se agregaron 50 mL de metanol:agua (70:30) a cada frasco y se homogeneizó el contenido en un molinillo Waring Blendor (Conair corporation, USA). La mezcla fue filtrada en embudo con papel de filtro 415 (VWR, USA) y 2 mL se guardaron en viales color caramelo (2 mL) a  $-20$  °C hasta su análisis (Probst y Cotty, 2012). Las aflatoxinas fueron detectadas y cuantificadas como se describió previamente (TLC).

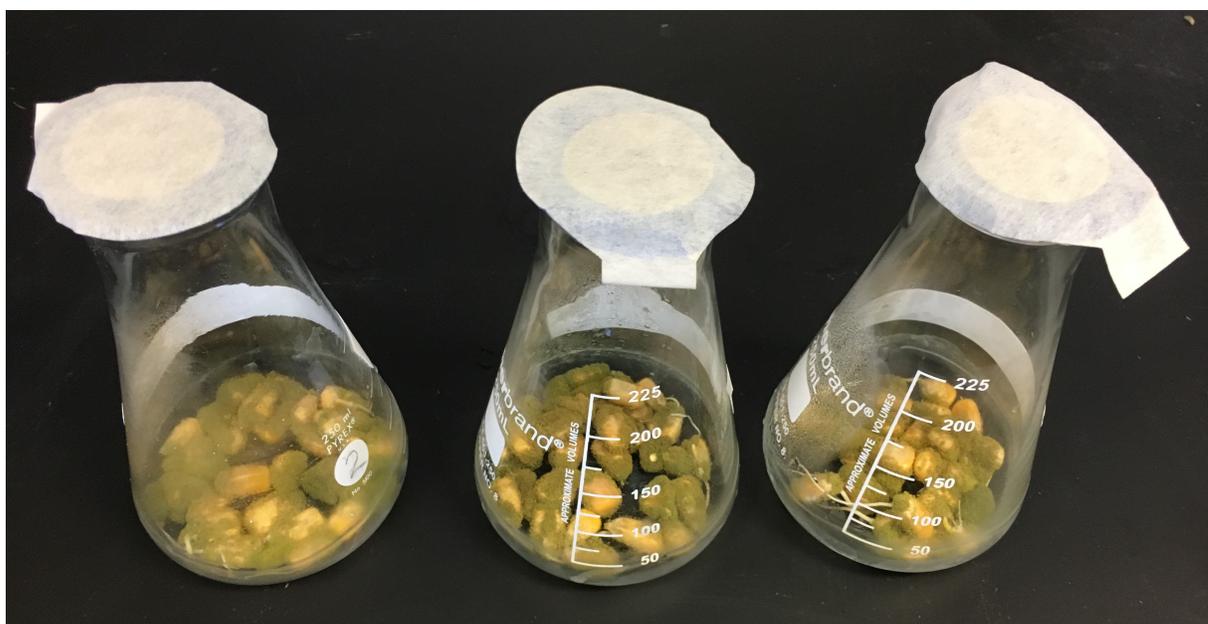


Figura 3.2. Aislado de *Aspergillus flavus* cultivado en granos de maíz para la determinación de aflatoxinas.

## **IDENTIFICACIÓN DE CEPAS NO PRODUCTORAS DE AFLATOXINAS**

Las muestras en las que no se detectó aflatoxinas mediante TLC fueron evaluadas por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en un equipo HP serie 1050. Las separaciones cromatográficas se realizaron en columna C18 Nova Pack<sup>®</sup> (100 x 3,9 mm; 4 μm tamaño de partícula). La fase móvil utilizada fue metanol:agua (70:30) a velocidad de flujo de 0,8 mL min<sup>-1</sup>. Las aflatoxinas fueron detectadas utilizando un detector de fluorescencia programado con longitudes de onda a 360 y 440 nm para excitación y emisión, respectivamente. Se utilizó un reactor fotolítico, acoplado inmediatamente después de la columna, para incrementar la sensibilidad del detector por derivatización fotolítica. El análisis cuantitativo se realizó mediante normalización del área de los picos. Se elaboró una curva de calibración a partir de las áreas obtenidas para diferentes concentraciones de estándares de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>. Los límites de detección estuvieron por debajo de 1 ng g<sup>-1</sup>. Cuando no se detectaron aflatoxinas mediante esta técnica, el aislado fue clasificado como no aflatoxigénico (Doster *et al.*, 2014).

## **PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CICLOPIAZÓNICO EN MEDIO DE CULTIVO Y EN GRANOS DE MAÍZ**

Los aislados de *A. flavus* fueron evaluados por su capacidad para producir ácido ciclopiazónico (CPA) en medio de cultivo y granos de maíz y analizar su coocurrencia con las aflatoxinas. Las muestras analizadas estuvieron compuestas por los mismos extractos utilizados para evaluar la producción de aflatoxinas. La eficiencia del método de extracción para esta micotoxina fue del 51%. La producción de CPA fue analizada mediante HPLC en un aparato Agilent serie 1100 (Agilent technology, CA, USA) equipado con un detector por red de diodos (280 nm), inyector de muestras automático, bomba cuaternaria y una columna tipo C18 ZORBAX Eclipse Plus (100 x 4,6 mm, 3,5 μm tamaño de partícula) mantenida a una temperatura de 50 °C. La fase móvil consistió de metanol: sulfato de zinc 4 mM (50:50; pH 3,5) a una velocidad de flujo de 0,8 mL min<sup>-1</sup>. El volumen de inyección fue de 50 μL para cada muestra. El análisis cuantitativo se realizó mediante normalización del área de los picos y se cuantificó utilizando una curva de calibración calculada a partir de diferentes concentraciones de estándar. Las muestras fueron consideradas positivas cuando se detectó un pico con similar

espectro y tiempo de retención al del estándar (Motta y Soares, 2000). El límite de detección que permitió obtener un espectro identificable fue 20 ng g<sup>-1</sup>.

## **GRUPOS DE COMPATIBILIDAD VEGETATIVA**

La variabilidad genética presente en cepas no productoras de aflatoxinas se estudió mediante análisis de compatibilidad vegetativa (VCA). Los mutantes (*nit*) fueron obtenidos en placas de Petri con medio de cultivo SEL inoculadas centralmente con 8 µL de solución de esporas (1x10<sup>6</sup> conidios mL<sup>-1</sup>), incubadas a 30 ± 2 °C en oscuridad, hasta la aparición de micelio con un patrón de crecimiento “ralo y expansivo”. Se recuperaron al menos cuatro *nits* por cada aislado, a partir de estos sectores resistentes al clorato, y se transfirieron a medio MIT durante 3 días para la estabilización de los mismos. Posteriormente, fueron subcultivados en medio 5-2 para obtener soluciones de esporas. El fenotipo de los mutantes se determinó de acuerdo al crecimiento normal (+) o “ralo y expansivo” (-) en medios de cultivo CZ, HYP y NA (Tabla 3.2). Los mutantes fueron identificados como *niaD* (incapaces de utilizar nitrato), *nirA* (incapaces de utilizar nitrito y nitrato) y *cnx* (incapaces de utilizar hipoxantina y nitrato) (Mauro *et al.*, 2013; Pildain *et al.*, 2004).

Los experimentos de compatibilidad se desarrollaron en medio de cultivo AMD. Inicialmente, se evaluó la autocompatibilidad entre mutantes de un mismo aislado. La compatibilidad fue identificada como una línea de crecimiento normal donde el micelio de los dos mutantes a evaluar entran en contacto (Figura 3.3) (Cotty y Taylor, 2003). Todos los mutantes fueron evaluados entre sí para formar los grupos de compatibilidad vegetativa (VCG). El índice de diversidad, calculado como el cociente entre el número de VCGs obtenidos y el número de aislados, fue utilizado para expresar la diversidad entre los aislados de *A. flavus* no productores de aflatoxinas (Mauro *et al.*, 2013).

Tabla 3.2. Clasificación según características fenotípicas de los mutantes obtenidos a partir de los aislados no aflatoxigénicos de *Aspergillus flavus* presentes en espigas de maíz en las regiones I y IV durante las campañas 2012/13, 2013/14 y 2014/15.

Tipo de crecimiento <sup>a</sup>			Tipo de mutante
CZ *	NA *	HYP *	
-	+	-	<i>cnx</i>
-	+	+	<i>niaD</i> <sup>-</sup>
-	-	+	<i>nirA</i> <sup>-</sup>

<sup>a</sup> (+): crecimiento normal, igual al tipo silvestre; (-): crecimiento ralo y expansivo.

\*CZ: Agar Czapeck Dox, NA: Agar nitrito, HYP: Agar hipoxantina.

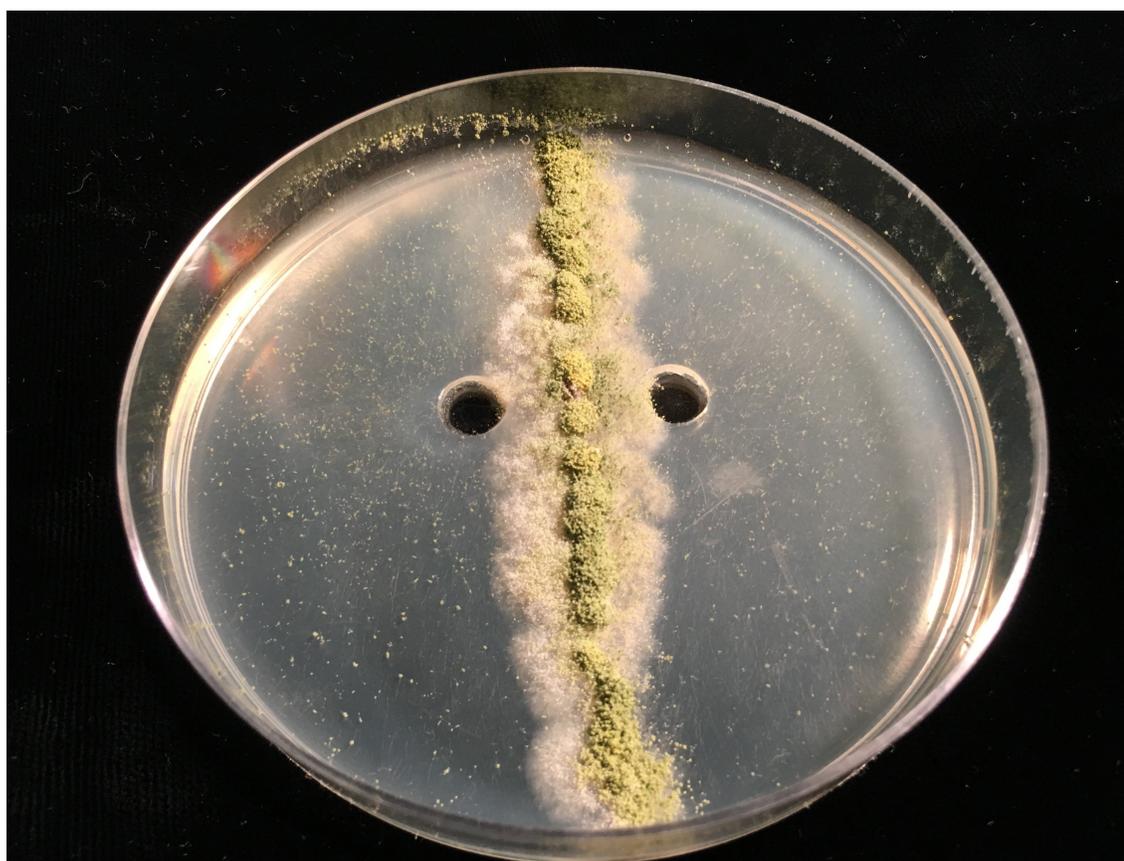


Figura 3.3. Formación de heterocarión en la zona de interacción entre dos mutantes diferentes de un mismo aislado de *Aspergillus flavus* en medio agar almidón (AMD).

## **PATRONES DE AMPLIFICACIÓN DEL *CLUSTER* DE AFLATOXINAS**

El *cluster* de genes responsables de la biosíntesis de aflatoxinas se estudió en busca de deleciones que resulten en la incapacidad de producir esta micotoxina en aislados nativos de *A. flavus*. El *cluster* fue investigado siguiendo la metodología propuesta por Callicott y Cotty, (2015) y utilizada por Ortega-Beltran *et al.* (2016). El ADN se obtuvo a partir de colonias previamente cultivadas en 5/2 agar durante 7 días a 30°C en oscuridad. A cada placa se le agregaron 1,2 mL de solución salina/Tween para suspender las esporas mediante raspado de la superficie del agar con un hisopo estéril. La suspensión obtenida fue transferida a tubos Eppendorf (1,5 mL) y centrifugada a 8000 g durante 5 min, eliminando el sobrenadante. Las esporas fueron resuspendidas en 450 µL de buffer de lisis y colocadas en baño de agua a 60°C durante 1 h, agitando después de los primeros 30 min. Las muestras fueron nuevamente centrifugadas a 14000 g durante 30 min y 370 µL del sobrenadante fueron transferidos a un nuevo tubo. El ADN fue precipitado mediante agregado del mismo volumen de acetato de amonio (4M) y purificado con etanol (740 mL). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando los cebadores SC01, IC01, AC01, AC02, AC03, AC04, AC05, AC06, AC07, AC08, AC09, AC10, AC11, AC12, AC13, IC02 y un control interno, desarrollados por Callicott y Cotty (2015). Estos cebadores amplifican marcadores para el *cluster* de aflatoxinas y regiones cercanas que intervienen en la biosíntesis. Para cada reacción se mezclaron 10 nmol L<sup>-1</sup> de cada cebador, 1 × AccuPower PCR PreMix (Bioneer, Alameda, CA) y 20 ng de ADN en volumen final de 25 µL. Las muestras se colocaron en termociclador programado de la siguiente manera: 1 min a 94°C; 30 ciclos de 30 s a 94°C, 90 s a 62°C, 90 s at 72°C; con una elongación final de 10 min a 72°C. Los productos de la PCR fueron revelados en agarosa 1% en buffer TAE 1x.

## **HABILIDAD COMPETITIVA DE AISLADOS ATOXIGÉNICOS**

Los ocho aislados atoxigénicos miembro de los dos VCG mayoritarios fueron incluidos en el experimento mientras que aquellos autoincompatibles fueron excluidos. Se seleccionaron dos aislados toxigénicos (AS08811 y AS05322) con diferente origen geográfico. Todos los aislados atoxigénicos fueron evaluados individualmente por su habilidad para reducir la cantidad de aflatoxina B<sub>1</sub> y CPA sintetizada por los aislados tóxicos. Los granos de maíz fueron

esterilizados mediante inmersión en hipoclorito de sodio (10%) por 2 min, con posterior inmersión en etanol (70%) por otros 2 min. Una vez desinfectados, los granos fueron secados en una cabina de seguridad biológica durante 1 h y colocados en Erlenmeyers (250 mL) en una cantidad de 10 g. Los tratamientos fueron inoculados simultáneamente ( $10^5$  conidios por Erlenmeyer) con suspensión de esporas de un aislado tóxicogénico y uno atoxicogénicos. Los controles positivos y negativos fueron inoculaciones independientes con aislado toxigénico o atoxicogénico, respectivamente. El contenido de humedad fue ajustado como se describió previamente. El agente de biocontrol *A. flavus* AF36 (origen Estados Unidos) fue incluido en el análisis para comparar su desempeño con respecto al de los aislados nativos de Argentina, coinoculando separadamente con cada uno de los aislados toxogénicos. Los tratamientos fueron sellados como se indicó previamente e incubados a 30°C por 7 días en oscuridad (Mauro *et al.*, 2015; Probst *et al.*, 2011). Las micotoxinas fueron extraídas y analizadas por TLC de acuerdo a la metodología detallada anteriormente.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la producción de esclerocios, cada aislado fue cultivado en tres repeticiones. Los experimentos para evaluar la producción de micotoxinas se realizaron con 3 réplicas y se repitieron dos veces. Los datos de cada tratamiento se combinaron luego de corroborar la homogeneidad de las varianzas para el error experimental mediante el test F. Los datos fueron transformados a raíz cuadrada previo al análisis para homogeneizar la varianza de los tratamientos. Las medias para cada tratamiento fueron obtenidas mediante análisis de la varianza (ANOVA;  $P < 0,005$ ). Con el objetivo de evitar un solapamiento extensivo entre los tratamientos, las diferencias significativas fueron detectadas utilizando la prueba DGC de acuerdo a Di Rienzo *et al.* (2002), método que utiliza un análisis de *cluster* para identificar grupos de medias que muestran un solapamiento sustancial en las pruebas tradicionales de comparación. Diferencias significativas entre los tratamientos durante los ensayos de coinoculación y en el número de esclerocios fueron detectadas mediante test LSD de Fisher. La relación entre la producción de aflatoxinas y CPA, como así también entre los sustratos utilizados, se determinó mediante análisis de correlación de Pearson. Para comparar la

producción de micotoxinas entre aislados y la influencia de la región se utilizaron los datos obtenidos de los ensayos en granos de maíz. El análisis de los datos se realizó utilizando el software estadístico InfoStat, versión 2014 (Di Rienzo *et al.*, 2014).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS Y CARACTERIZACIÓN DE ESCLEROCIOS

Los 83 aislados de *A. flavus* fueron evaluados por su capacidad toxigénica en medio de cultivo y en granos de maíz. Aquellos aislados que produjeron aflatoxinas, en uno o en ambos sustratos, fueron clasificados como "aflatoxigénicos" (Tabla 3.3). La aflatoxina sintetizada por los aislados fue del tipo B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>, pero sólo se cuantificó la primera debido a su mayor toxicidad (Cotty *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos concuerdan con bibliografía previa donde se indica que los aislados de *A. flavus* producen aflatoxinas del tipo B (Perrone *et al.*, 2014a; Mehl *et al.*, 2012; Cotty 1989). No se detectó la producción simultánea de aflatoxina G<sub>1</sub> o G<sub>2</sub> por parte de los aislados estudiados. Aislados atípicos que producen ambos tipos de aflatoxina han sido reportados en Argentina y países de Africa (Probst *et al.* 2012; Pildain *et al.*, 2004; Vaamonde *et al.*, 2003). Pildain *et al.* (2008) propone a estos aislados como una nueva especie pero su designación taxonómica permanece sin ser definida (Perrone *et al.*, 2014a).

Considerando todos los aislados, 32% ( $n=83$ ) demostró capacidad para producir aflatoxina B<sub>1</sub>. Teniendo en cuenta solamente los aislados que produjeron esta micotoxina, 61% ( $n=27$ ) produjeron esclerocios. Solamente dos aislados productores de aflatoxina fueron identificados como morfotipo S, cuya habilidad para producir aflatoxina B<sub>1</sub> fue similar a aquellos aislados aflatoxigénicos identificados como L o NP ( $P=0,5112$ ). Los aislados tipo S generalmente producen concentraciones mayores de aflatoxina que los aislados tipo L o NP (Mehl y Cotty, 2008). Los resultados obtenidos en este estudio indican que los aislados tipo S no son agentes causales importantes en la contaminación de espigas de maíz. Mehl *et al.* (2012) señalaron que los aislados tipo S están más adaptados al medioambiente del suelo, desde son aislados frecuentemente. Resultados similares se obtuvieron para una población de *A. flavus* presente en espigas de maíces cultivados en Italia, donde solo 1 de 70 aislados fue caracterizado como morfología tipo S (Giorni *et al.*, 2007). Estudios previos indicaron aislados tipo L como predominantes en una población de *A. flavus* presente en granos de maíz en diferentes regiones agro-ecológicas de Nigeria donde, al igual que en este trabajo, la incidencia de aislados

aflatoxigénicos fue menor al 40 % (Atehnkeng *et al.*, 2008). La predominancia de aislados tipo L en poblaciones de *A. flavus* es usualmente asociada a una mayor frecuencia de aislados atoxicogénicos con posibilidad de ser explotados como agentes de biocontrol (Mauro *et al.*, 2013; Cotty, 1989).

En ambas regiones predominaron los aislados no productores de aflatoxina (Anexo 1). Aunque el porcentaje de cepas toxigénicas fue significativamente ( $P=0,016$ ) mayor en la región IV (41%,  $n=52$ ), en comparación con la región I (19%,  $n=31$ ), la habilidad de las cepas para producir esta micotoxina no estuvo influenciada por la región agroecológica ( $P=0,1537$ ). La habilidad para producir micotoxinas puede variar ampliamente de acuerdo al origen geográfico de los aislados y sus condiciones ambientales (Perrone *et al.*, 2014; Vaamonde *et al.*, 2003). Sin embargo, se considera que los genotipos de *A. flavus* se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, razón por la cual, la habilidad para producir micotoxinas puede no diferir entre regiones cercanas (Bayman y Cotty, 1993).

Los aislados aflatoxigenicos produjeron en promedio cantidades significativamente ( $P < 0,001$ ) más altas de aflatoxina B<sub>1</sub> en el tejido hospedante. La producción de esta micotoxina tuvo una media de 13,633 y 4,040  $\mu\text{g g}^{-1}$  en granos de maíz y medio de cultivo, respectivamente. La producción de aflatoxina B<sub>1</sub> en ambos sustratos presentó una moderada correlación ( $r=0,42$ ;  $P<0,001$ ). La cantidad de aflatoxina sintetizada es influenciada por el sustrato utilizado (Perrone *et al.*, 2014a). Probst and Cotty (2012) señalaron resultados similares, con menores cantidades de aflatoxinas en medio de cultivo sintético y una baja correlación ( $r=0,32$ ) entre las metodologías. Los aislados nativos que produjeron grandes cantidades de aflatoxina en medio de cultivo, no fueron altamente tóxicos en granos de maíz, como también indicaron Probst y Cotty (2012). Los aislados varían en tipo y cantidad de enzimas hidrolíticas que producen para colonizar el tejido del hospedante, lo que resulta en una mejor adaptación y diferente capacidad para producir aflatoxinas (Mehl y Cotty, 2008; Mellon *et al.*, 2007).

En medio de cultivo, la variabilidad entre los aislados aflatoxigenicos permitió que sean clasificados en tres grupos de acuerdo a su habilidad para producir aflatoxinas (Tabla 3.3). Esta variabilidad fue menor en granos de maíz y los aislados fueron clasificados en dos grupos. Los

aislados con baja producción de aflatoxinas ( $4,82 \mu\text{g g}^{-1}$ ) se presentaron con mayor frecuencia (44,4 %) dentro de la población de *A. flavus* presente en espigas de maíz (Figura 3.4). La producción de aflatoxina varía entre miembros de una misma población, con algunos aislados produciendo cantidades mucho mayores de aflatoxina que otros. Como resultado, el contenido de aflatoxina en el tejido de los granos de maíz puede variar desde  $10 \text{ ng g}^{-1}$  a billones de  $\text{ng g}^{-1}$  (Cotty *et al.*, 2008).

Medio de cultivo líquido como sustrato para la producción de aflatoxinas mostró menos sensibilidad y se detectaron un total de siete falsos negativos. Estos aislados produjeron desde  $0,538$  a  $16,841 \mu\text{g g}^{-1}$  de aflatoxina B<sub>1</sub> cuando fueron inoculados en granos de maíz. A pesar de esto, esta metodología podría ser útil para determinar la proporción de cepas aflatoxigénicas en una población de *A. flavus*.

Por otro lado, el número de esclerocios producidos no estuvo relacionado a la producción de aflatoxina ( $P=0,4465$ ). Todos los aislados identificados como no aflatoxigénicos no produjeron estas estructuras de resistencia en condiciones de laboratorio y fueron clasificados como NP. Este tipo de aislado fue previamente reportado y caracterizado para poblaciones de *A. flavus* presentes en maní (Novas y Cabral, 2002). Aislados de *A. flavus* no productores de esclerocios han sido reportados como predominantes en espigas de maíz, representando 71% de la población total (Giorni *et al.*, 2007). Otros autores (Nesci y Etcheverry, 2002; Zummo y Scott, 1990) destacaron que *A. flavus* posee gran habilidad para sobrevivir en el rastrojo después de la cosecha, pudiendo ser la principal fuente de inóculo para este tipo de aislados.

Tabla 3.3. Producción de micotoxinas y caracterización de esclerocios de 27 aislados aflatoxigénicos de *Aspergillus flavus* presentes en espigas de maíz en las regiones I y IV durante las campañas 2012/13, 2013/14 y 2014/15.

Aislado	Esclerocios <sup>x</sup>			AFB <sub>1</sub> (µg g <sup>-1</sup> ) <sup>y</sup>		CPA (µg g <sup>-1</sup> ) <sup>z</sup>	
	n°/cm <sup>2</sup>	Diámetro (µm)	tipo	maíz	YES*	maíz	YES*
AS11623	15,7 c	822,06	L	1,003 b	1,403 c	6,098 b	0,470 b
AS04722	120,6 b	477,68	L	8,614 b	0,251 c	8,138 a	0,954 a
AS04822	37,5 c	492,49	L	16,841 b	ND	10,147 a	3,958 a
AS05122	154,5 a	303,64	S	11,982 b	ND	14,305 a	0,372 b
AS05322	21,2 c	688,75	L	3,390 b	ND	5,799 b	4,214 a
AS04922	-	-	NP	0,538 b	ND	2,909 b	ND
AS10013	10,6 c	935,07	L	19,717 b	3,611 b	8,724 a	0,470 b
AS10516	18,0 c	614,69	L	9,916 b	4,408 b	ND	0,488 b
AS10919	105,3 b	770,22	L	2,408 b	ND c	1,618	0,266 b
AS09611	2,5 c	1046,09	L	2,782 b	0,780 c	ND	0,261 b
AS09813	35,2 c	570,26	L	3,985 b	0,169 c	4,075 b	0,265 b
AS02808	4,2 c	585,07	L	2,409 b	0,889 c	ND	0,138 b
AS07604	194,6 a	203,66	S	26,552 a	1,689 b	14,265 a	0,696 a
AS07804	23,1 c	625,80	L	27,119 a	10,834 b	0,043 b	0,295 b
AS08004	18,6 c	470,28	L	34,786 a	2,024 b	5,342 b	0,405 b
AS08811	19,8 c	625,80	L	11,104 b	1,157 c	21,674 a	0,207 b
AS09011	18,5 c	581,37	L	5,337 b	1,501 b	ND	0,198 b
AS08105	-	-	NP	1,808 b	ND	1,676 b	0,035 b
AS08508	-	-	NP	25,906 a	1,249 c	ND	0,194 b
AS08608	-	-	NP	21,941 a	14,260 a	ND	0,229 b
AS08711	-	-	NP	25,025 a	2,903 b	ND	0,786 b
AS09311	-	-	NP	15,480 b	22,030 a	ND	0,291 b
AS09411	-	-	NP	1,081 b	ND	8,329 a	0,278 b
AS09511	-	-	NP	13,570 b	0,645 c	ND	0,151 b
AS11215	-	-	NP	10,963 b	1,143 c	ND	0,444 b
AS11415	-	-	NP	14,190 b	2,845 b	2,355 b	1,166 b
AS11515	-	-	NP	8,829 b	1,650 c	2,185 b	0,510 b

<sup>x</sup> (-) = no se observaron esclerocios. Los aislados S y L producen esclerocios con diámetro promedio <400 y>400 µm, respectivamente. NP indica que los aislados no produjeron esclerocios en condiciones de laboratorio.

<sup>y</sup> Valores medios (n=6) de AFB<sub>1</sub>(aflatoxina B<sub>1</sub>) en una misma columna (maíz o medio) no compartiendo la misma letra, indica diferencias significativas entre los aislados (ANOVA, DCG test, α 0.05), en base a los datos transformados. ND= no detectado.

<sup>z</sup> Valores medios (n=6) de CPA (ácido ciclopiazónico) en una misma columna (maíz o medio de cultivo) no compartiendo la misma letra, indica diferencias significativas entre los aislados (ANOVA, DCG test, α 0.05), en base a los datos transformados. ND= no detectado.

\*YES = medio de cultivo extracto de levadura y sacarosa.

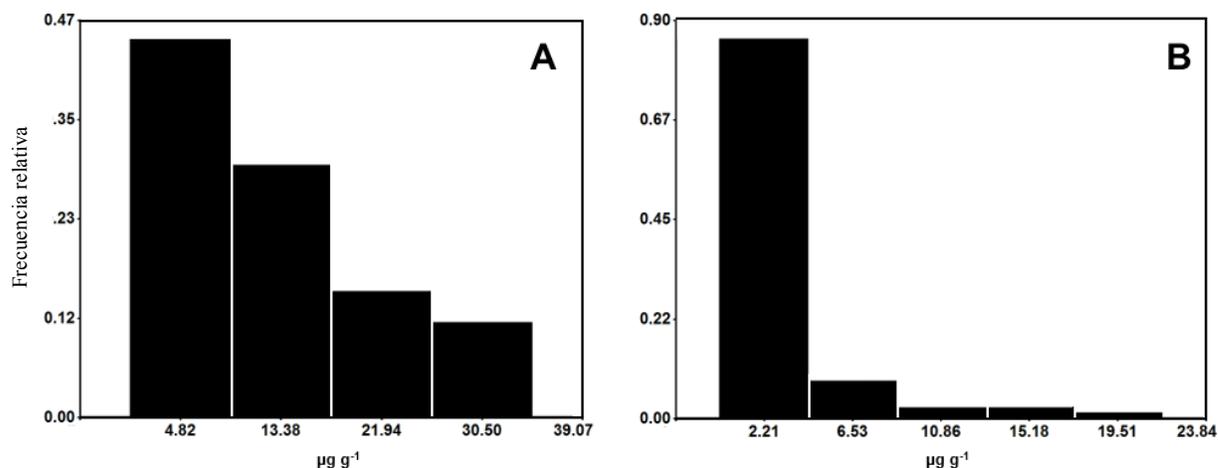


Figura 3.4. Histogramas de frecuencia para aislados de *A. flavus* productores de micotoxinas presentes en espigas de maíz en las regiones I y IV durante las campañas 2012/2013, 2013/2014 y 2014/2015. (A) Aflatoxina B<sub>1</sub>; (B) ácido ciclopiazónico.

## PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CICLOPIAZÓNICO

Se evaluó la habilidad para producir CPA por parte de todos los aislados nativos, con el objetivo de estudiar la contaminación de espigas maíz con cepas de *A. flavus* productoras de ambas micotoxinas (Tabla 3.3 y 3.4). Aquellos aislados que no produjeron aflatoxina ni CPA, fueron considerados como “atoxigénicos” (Tabla 3.4). Solamente 16% de los aislados no produjo ninguna de las micotoxinas analizadas y fueron clasificados como atoxigénicos. Este bajo porcentaje de aislados atóxicogénicos se debe principalmente a que un alto porcentaje de los mismos produjeron CPA (Anexo 1). Resultados similares se obtuvieron en Italia, donde un elevado porcentaje (61%) de aislados de *A. flavus* fueron reportados como productores de esta micotoxina dentro de la población presente en espigas de maíz (Giorni *et al.*, 2007). Por otro lado, también han sido reportado altos porcentajes (73-94%) de cepas productoras de CPA como parte de la microbiota natural presente en maní, trigo y soja cultivada en Argentina (Vaamonde *et al.*, 2003). La producción de CPA es un dato importante en la inocuidad de maíz desde que se determinó que el agente de biocontrol *A. flavus* AF36 incrementa los niveles de esta micotoxina en maíz inoculado a campo (Abbas *et al.*, 2011).

No se detectaron diferencias significativas entre cepas de diferente región agroecológica ( $P=0,2124$ ) mientras que los aislados con baja producción de CPA (2,21 µg g<sup>-1</sup>) fueron los más

frecuentes (77,4 %; Figura 3.4). Giorni *et al.* (2007) indicó resultados similares, donde solo 20% de los aislados de *A. flavus* supero esta media para la producción de CPA. Actualmente se desconoce el efecto de la exposición prolongada a bajas concentraciones de esta micotoxina sobre la salud humana (Chang y Ehrlich, 2011). Debido a esto, los resultados obtenidos en este trabajo evidencian la necesidad de estudiar los niveles de CPA en granos de maíz cultivados en las regiones I y IV.

La producción de esta micotoxina tuvo un comportamiento similar al de aflatoxina B<sub>1</sub>, presentando valores medios más altos en granos de maíz (2,21 µg g<sup>-1</sup>) en comparación con medio de cultivo (1,165 µg g<sup>-1</sup>). Hasta donde se conoce, este trabajo constituye el primer estudio sobre de producción de CPA en diferentes sustratos.

Los resultados obtenidos en este trabajo también sugieren la posibilidad de co-ocurrencia de aflatoxinas y CPA en maíz cultivado en las regiones I y IV. Todos los aislados aflatoxigénicos produjeron simultáneamente CPA con valores medios de 7,62 µg g<sup>-1</sup> en granos de maíz y 1,83 µg g<sup>-1</sup> en medio de cultivo. En general, la cantidad de CPA fue significativamente menor que de aflatoxina B<sub>1</sub> en maíz (7,62 µg g<sup>-1</sup> CPA vs 13,63 µg g<sup>-1</sup> aflatoxina) como así también en medio de cultivo (1,83 µg g<sup>-1</sup> CPA vs 4,04 µg g<sup>-1</sup> aflatoxina). Estos resultados coinciden con datos reportados por otros autores, quienes indicaron que la mayoría de los aislados de *A. flavus* producen cantidad significativamente más altas de aflatoxina que CPA (Astoreca *et al.*, 2014; Horn *et al.*, 1996). Sin embargo, el aislado AS09411 tuvo un comportamiento opuesto. Aislados con estas características fueron hallados frecuentemente en poblaciones de *A. flavus* de suelo cultivado con maní en Argentina (Barros *et al.*, 2006).

Dentro del grupo de aislados que no produjeron aflatoxinas, el 76,7% de los mismo produjo CPA. En granos de maíz, la media para esta micotoxina fue significativamente menor para estos aislados en comparación con aquellos que produjeron simultáneamente aflatoxina B<sub>1</sub> (1.973 ± 0.75 µg g<sup>-1</sup> vs 7.620 ± 0.93 µg g<sup>-1</sup>, respectivamente). Esta diferencia no fue significativa en medio de cultivo.

Tabla 3.4. Grupos de compatibilidad vegetativa y producción de ácido ciclopiazónico en 56 aislados no productores de aflatoxina presentes en espigas de maíz en las regiones maiceras I y IV durante las campañas 2012/13, 2013/14 y 2014/15.

VCG <sup>y</sup>	Aislado	CPA ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) <sup>z</sup>		
		Medio YES*	maíz	
AM1	AS10302	ND	0,968 b	
	AS10402	ND	1,805 b	
	AS11821	ND	0,752 b	
	AS04222	ND	4,981 a	
	AS04522	ND	0,896 b	
	AS05022	0,6562 a	1,514 b	
	AS05222	0,0189 b	2,653 b	
	AS12114	0,286 a	ND	
	AS12214	ND	7,528 a	
	AS12306	ND	2,616 b	
	AS12410	ND	1,742 b	
	AS12506	0,034 b	ND	
	AS12606	0,032 b	ND	
	AS12707	0,033 b	2,767 b	
	AS12909	ND	2,936 b	
	AS13009	0,096 b	ND	
	AS03917	ND	2,156 b	
	AS05639	0,172 b	2,230 b	
	AS06659	ND	0,953 b	
	AS07517	0,144 b	1,035 b	
	AS07617	ND	1,506 b	
	AS07704	ND	2,216	
	AS10616	0,437 a	4,060 a	
	AS05739	ND	ND	
	AS04322	ND	ND	
	AS03145	ND	ND	
	AS03802	ND	ND	
	AS04050	ND	ND	
	AM2	AS12807	0,050 b	1,343 b
	AM3	AS00019	ND	0,804 b
AM4	AS11108	0,981 a	ND	
AM5	AS11622	0,0213 b	1,972 b	
	AS04122	ND	2,161 b	
	AS04422	ND	0,548 b	
	AS04622	ND	0,503 b	
	AS04755	ND	2,877 b	
	AS00018	0,136 b	ND	
	AS10816	ND	1,542	

Tabla 3.4. Grupos de compatibilidad vegetativa y producción de ácido cyclopiazónico en 56 aislados no productores de aflatoxina presentes en espigas de maíz en las regiones maiceras I y IV durante las campañas 2012/13, 2013/14 y 2014/15. Continuación.

VCG <sup>y</sup>	Aislado	CPA ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) <sup>z</sup>	
		Medio YES*	maíz
AM5	AS03326	ND	1.376 b
	AS03426	ND	1.262 b
	AS06441	0.050 b	0.671 b
	AS07417	ND	1.724 b
	AS07424	ND	2.688 b
	AS09913	0.380 a	1.679 b
	AS12012	ND	ND
	AS04001	ND	ND
	AS10202	ND	ND
AM6	AS00001	ND	1.230 b
NA	AS01153	0.414 a	0.729 b
	AS01756	0.033 b	ND
	AS04848	0.033 b	0.961 b
	AS05254	ND	ND
	AS05544	ND	ND
	AS06240	ND	ND
	AS02257	ND	ND
	AS07024	ND	ND

<sup>y</sup>NA= No disponible debido a autoincompatibilidad. VCG= grupo de compatibilidad vegetativa.

<sup>z</sup> CPA= ácido cyclopiazónico. Medias (n=6) en una misma columna no compartiendo la misma letra indican diferencias significativas de acuerdo al test DGC ( $P < 0.05$ ) en base a datos transformados. ND= no detectado.

\*YES= medio de cultivo extracto de levadura y sacarosa.

## GRUPOS DE COMPATIBILIDAD VEGETATIVA

Los aislados no productores de aflatoxinas fueron clasificados en grupos de compatibilidad vegetativa (VCG) (Tabla 3.4). Un total de 8 aislados fueron excluidos del análisis debido a que no mostraron autocompatibilidad. Esta incompatibilidad ha sido previamente reportada para otros aislados de *A. flavus* (Mauro *et al.*, 2013; Novas y Cabral, 2002) y otras especies fúngicas (Correll, 1991). Se obtuvieron un total de 256 mutantes para los 48 aislados restantes a partir de sectores resistentes al clorato. Los mutantes fueron clasificados de acuerdo a su fenotipo, siendo 51,7% *niaD* (Figura 3.5), 41,0% *nirA* y 7,14% *cnx*. El tipo de mutación en genes implicados en la asimilación del nitrógeno se presentan comúnmente en diferentes frecuencias (Bayman, 1991). Nuestros resultados concuerdan con bibliografía previa que postula

a *niaD* como la mutación más predominante y al mutante *cnx* como el más difícil de obtener (Novas y Cabral, 2002; Bayman, 1991). El mecanismo por el cual estas diferencias ocurren no ha sido investigado aún. Sin embargo, se presume que el tamaño físico de los genes puede influenciar, haciendo más susceptible a un locus que a otro (Klittich y Leslie, 1988).

Como se mencionó anteriormente, la compatibilidad en los ensayos de complementación se identificó como una línea de crecimiento normal en la zona de interacción (Figura 3.6). Los aislados analizados se agruparon en seis VCG que fueron nombrados con el prefijo en inglés AM por “Argentine maize”, seguido por un número progresivo en orden de aparición. Cuatro de estos VCG estuvieron compuestos por un solo aislado. En consecuencia, se obtuvieron dos VCG mayoritarios (AM1 y AM5) con frecuencias del 58 y 35% respectivamente. Estos VCG mayoritarios estuvieron presentes en ambas regiones analizadas con diferencias no significativas entre ambas. Similares resultados fueron reportados para granos de maíz cultivado en Luisiana (USA), donde dos VCG mayoritarios agruparon el 88% de los aislados de *A. flavus* (Sweany *et al.*, 2011). Por el contrario, una población de 57 aislados de *A. flavus* contaminando granos de maíz en Italia fueron agrupados en 25 VCGs, con un índice de diversidad de 0,43 (Mauro *et al.*, 2013). El índice de diversidad obtenido para la población nativa de Argentina de aislados de *A. flavus* no productores de aflatoxina fue menor, siendo 0,12. Estudios previos postulan una especialización por nicho, basado en que un mismo VCG puede presentar diferentes frecuencias entre poblaciones de suelo y granos de maíz aisladas de un mismo ambiente (Sweany *et al.*, 2011). Nuestros resultados sugieren que algunos aislados se han especializado en infectar granos de maíz, tal como indicó Sweany *et al.* (2011).

Todas las cepas productoras de aflatoxinas fueron probadas como miembros de estos dos grupos mayoritarios, siendo todas incompatibles. Este resultado permite sugerir que los VCG AM1 y AM5 están compuestos únicamente por aislados no productores de aflatoxinas por lo que sus miembros podrían ser potenciales agentes de biocontrol. En general, se considera que miembros de un mismo VCG comparten la producción o no de aflatoxina (Mauro *et al.*, 2013; Cotty *et al.*, 2008). Sin embargo, estos grupos estuvieron compuestos por aislados que produjeron CPA como así también por aislados atoxigénicos. Este trabajo constituye el primer estudio para la relación entre VCG y la producción de CPA. La falta de asociación para la

producción de CPA entre aislados de un mismo VCGs, indica que no todos sus miembros son clones, como reportó Leslie (1993) o que algunos aislados han acumulado diferencias fenotípicas mediante mutaciones pero continúan permaneciendo a un mismo VCG (Correll, 1991).

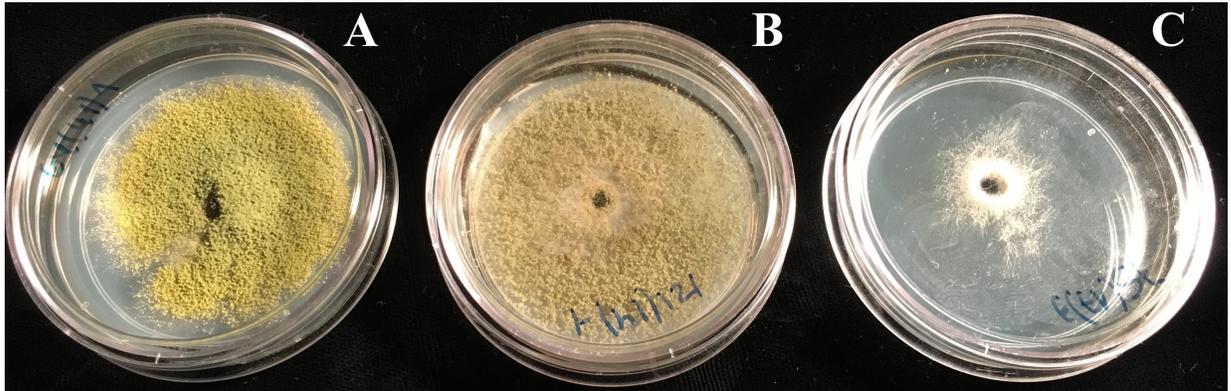


Figura 3.5. Mutante *niaD*<sup>-</sup> en medio de cultivo HYP (A), NIT (B) y CZ (C).

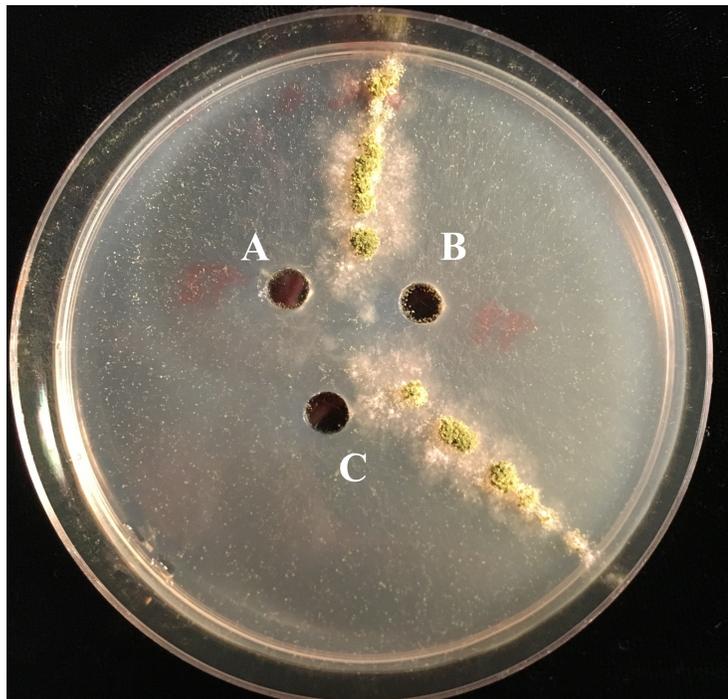


Figura 3.6. Ensayo de complementación para aislados de *Aspergillus flavus* en medio de cultivo agar almidón. A y B: tester 1 y tester 2 para el VCG AM5. C: mutante obtenido a partir del aislado AS04001 perteneciente al VCG AM5.

## PATRONES DE AMPLIFICACIÓN DEL *CLUSTER* DE AFLATOXINAS

Se estudió el *cluster* de genes asociados a la biosíntesis de aflatoxinas en busca de posibles deleciones que resulten en la incapacidad para producir aflatoxina en aislados pertenecientes a diferentes VCGs (Tabla 3.5). Se obtuvieron amplificaciones para los 16 pares de cebadores en el aislado toxigénico AS08608, utilizado como control positivo, como así también para todos los aislados atoxigénicos pertenecientes a los VCG mayoritarios (AM1 y AM5). Todas las regiones estudiadas también fueron detectadas para los aislados AS11108 y AS00001 pertenecientes a los VCG AM4 y AM6, respectivamente. Sorprendentemente, ninguna de las amplificaciones fue observada para el aislado AS00019 (Figura 3.7). Dos de los cinco aislados con VCG desconocido mostraron deleciones, mientras que los otros tres amplificaron todas las regiones estudiadas. Similares PACs fueron observados para miembros pertenecientes de un mismo VCG.

Conocer las modificaciones moleculares que provocan la atoxigenicidad en *A. flavus* es una herramienta útil para rastrearla después de ser aplicada en un agroecosistema, como así también para evaluar su estabilidad a lo largo de los años (Callicott y Cotty, 2015). Existen diversos mecanismos moleculares que generan esta condición. La cepa utilizada como ingrediente activo en el producto comercial *A. flavus* AF36 posee un polimorfismo de nucleótido simple en uno de los genes ubicados en el *cluster* asociado a la biosíntesis de aflatoxinas. Este cambio resulta en un gen defectuoso necesario para la biosíntesis de aflatoxinas (Ehrlich y Cotty, 2004). Por otro lado, afla-guard<sup>®</sup> es formulado a partir de un aislado donde el *cluster* de genes para la síntesis de aflatoxina se encuentra completamente eliminado (Chang *et al.*, 2005). También han sido reportados aislados donde una o varias deleciones dentro del *cluster* de genes explican la incapacidad de estos aislados para sintetizar aflatoxinas (Mauro *et al.*, 2013).

Tabla 3.5. Patrones de amplificación de *cluster* de aflatoxinas en aislados atoxigénicos de *Aspergillus flavus* nativos de Argentina.

Aislado	VCG <sup>a</sup>	Regiones del <i>cluster</i> <sup>b</sup>															
		SC	IC01	AC01	AC02	AC03	AC04	AC05	AC06	AC07	AC08	AC09	AC10	AC11	AC12	AC13	IC02
AS00019	AM3																
AS02257	NA																
AS06240	NA																
AS12807	AM2																
AS05739	AM1																
AS03802	AM1																
AS04322	AM1																
AS04050	AM1																
AS03145	AM1																
AS11108	AM4																
AS12012	AM5																
AS04001	AM5																
AS10816	AM5																
AS03326	AM5																
AS10202	AM5																
AS00001	AM6																
AS05254	NA																
AS05544	NA																
AS07024	NA																
AS08608	TOX																

<sup>a</sup> VCG= Grupos de compatibilidad vegetativa. NA= no disponible. TOX= aislado productor de aflatoxinas.

<sup>b</sup> Casillero gris o blanco indica presencia o ausencia de las amplificaciones, respectivamente.

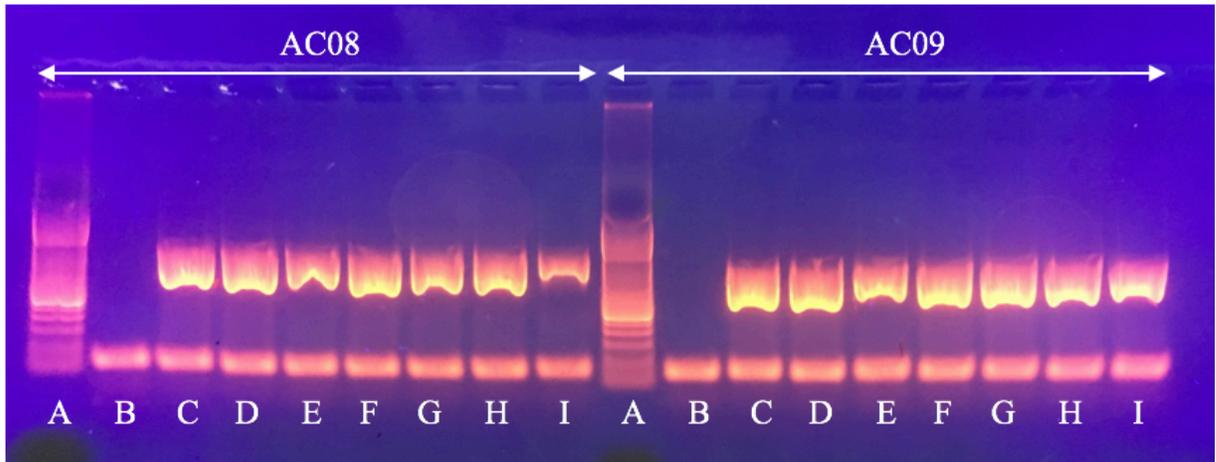


Figura 3.7. Gel de electroforesis visualizando productos de PCR para los marcadores de las regiones AC08 (897 pb) y AC09 (736 pb) del cluster de aflatoxinas y el control interno (115 pb) en aislados nativos de *Aspergillus flavus*. A: Marcador de peso molecular; B: AS00019; C: AS05739; D: AS03802; E: AS11108; F: AS12012; G: AS04001; H: AS10816; I: AS00001.

### HABILIDAD COMPETITIVA DE AISLADOS ATOXIGÉNICOS

Los experimentos fueron llevados a cabo utilizando las cepas productoras de micotoxinas (aflatoxina B<sub>1</sub> y CPA) AS05322 y AS08811 elegidas al azar como representantes de las regiones I y IV, respectivamente. Los ocho aislados atoxigénicos causaron significativas reducciones en la cantidad aflatoxina B<sub>1</sub> y CPA sintetizada por los aislados toxigénicos (Tabla 3.6). En promedio, los miembros del VCG AM1 causaron reducciones de aflatoxina B<sub>1</sub> significativamente más altas ( $P < 0,001$ ) que los miembros del VCG AM5 ( $72,82 \pm 10,7\%$  vs  $65,68 \pm 13,6\%$ , respectivamente). Dentro del VCG AM1, las mayores reducciones ( $P < 0,001$ ) en aflatoxina B<sub>1</sub> las alcanzaron los aislados AS03145 (78-83%) y AS04322 (78-79%). Para ciertos aislados atoxigénicos, la exclusión competitiva es suficiente para explicar la reducción en el contenido de aflatoxinas durante la coinfección (Mehl *et al.*, 2012). En otros aislados, mecanismos aún desconocidos proveen reducciones adicionales en el contenido de aflatoxinas que varían entre 10 y 20% (Mehl y Cotty, 2010).

No se observó una correlación significativa entre las reducciones de ambas micotoxinas ( $r = -0,224$ ;  $P = 0,411$ ). Las reducciones en el contenido de aflatoxina B<sub>1</sub> y CPA alcanzadas por los aislados AS03145 y AS04322 fueron similares entre los aislados toxigénicos. El aislado

AF36 mostró reducciones en aflatoxina B<sub>1</sub> pero no fue efectivo para disminuir la contaminación con CPA en gran medida.

La prevención de la contaminación con aflatoxinas basada en la aplicación de cepas atoxigénicas como agentes de biocontrol en cultivos comerciales ha sido utilizada con éxito por más de una década en varias regiones de los Estados Unidos (Cotty *et al.*, 2008). Esta estrategia se encuentra actualmente bajo desarrollo a lo largo del mundo y para numerosos cultivos (Mauro *et al.*, 2015; Doster *et al.*, 2014; Mehl *et al.*, 2012). Los potenciales agentes de biocontrol obtenidos en este estudio (AS03145 y AS04322) mostraron reducciones en el contenido de aflatoxina B<sub>1</sub> similares a las reportadas para aislados en Kenia (Probst *et al.*, 2011), Italia (Mauro *et al.*, 2015) y Estados Unidos (Mehl y Cotty, 2010). Ambos aislados fueron efectivos contra los dos aislados tóxicos (AS08811 y AS05322), lo que indica su posible utilidad en ambas regiones de origen de los aislados, tal como se observó en Italia (Mauro *et al.*, 2015).

Los aislados AS01022, AS12012, y AS04001 (VCG AM5) causaron reducciones en el contenido micotoxinas, aunque menores si se los compara con aquellos miembros del VCG AM1. Sin embargo, ambos VCGs se encuentran ampliamente distribuido en las regiones I y IV, según se determinó anteriormente. Los aislados atoxicogénicos que pertenecen a VCGs ampliamente distribuidos son considerados mejores competidores debido a una mayor adaptabilidad al medioambiente (Atehnkeng *et al.*, 2016). Más importante aún, la mezcla de agentes de biocontrol pertenecientes a diferente VCG pueden resultar en interacciones sinérgicas que potencien su efecto, logrando mayores reducciones en el contenido de micotoxinas y asegurando una mayor permanencia en las regiones a lo largo de los años (Mehl *et al.*, 2012; Probst *et al.*, 2011).

De acuerdo a la mayoría de los estudios, los aislados atoxigénicos son elegidos como potenciales agentes de biocontrol por su habilidad competitiva. Para evaluar este carácter se considera únicamente la reducción en el contenido de aflatoxinas (Mauro *et al.*, 2015; Mehl y Cotty, 2010; Cotty *et al.*, 2008). En este trabajo, también se provee de información sobre la reducción en el contenido de CPA, con similares resultados a los registrados para aflatoxina B<sub>1</sub>.

Tabla 3.6. Producción de micotoxinas y porcentajes de reducción de ácido ciclopiazónico (CPA) y aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) en coinoculaciones de granos de maíz con aislados toxicogénicos y atoxicogénicos de *Aspergillus flavus*.

VCG <sup>x</sup>	Aislado	CPA <sup>y, z</sup>				AFB <sub>1</sub> <sup>y, z</sup>			
		AS08811		AS05322		AS08811		AS05322	
		μg g <sup>-1</sup>	R	μg g <sup>-1</sup>	R	μg g <sup>-1</sup>	R	μg g <sup>-1</sup>	R
AM1	AS03145	8,71	71,38 a	12,58	73,54 bc	4,03	83,43 a	1,34	78,33 a
	AS04322	8,14	74,73 a	15,64	72,41 bc	4,83	79,63 a	1,29	78,83 a
	AS03802	10,49	68,14 a	23,34	59,86 d	8,65	63,56 cd	2,20	63,95 bc
	AS04050	9,37	69,21 a	15,66	67,06 bcd	9,54	60,76 cd	2,50	59,71 bc
	AS05739	7,90	75,86 a	18,51	68,16 bcd	5,61	76,45 ab	1,62	73,50 ab
AM5	AS01022	12,11	64,64 a	18,26	72,54 bcd	6,05	73,65 abc	1,50	74,97 ab
	AS12012	8,74	71,28 a	1,43	96,99 a	9,67	60,25 cd	2,86	53,84 c
	AS04001	8,08	75,45 a	14,05	77,90 b	7,63	67,68 bc	2,12	65,34 bc
-	AF36	37,70	0,00 a	32,30	32,05 e	10,86	55,33 d	1,85	70,14 abc

<sup>x</sup> VCG= Grupo de compatibilidad vegetativa. (-): desconocido.

<sup>y</sup> Porcentaje de reducción de micotoxinas (R) = [1-(micotoxina total en la coinoculación/micotoxina total en las inoculaciones con aislado toxigénico)] × 100.

<sup>z</sup> AS08811: aislados de *A. flavus* colectado en Jesús María, campaña 2012/2013 (sequía). AS05322: aislado de *A. flavus* colectado en La Abrita, campaña 2012/2013 (sequía). Medias en una misma columna no compartiendo la misma letra indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD de Fisher ( $P < 0.05$ ).

## CONCLUSIONES

- Entre los aislados de *A. flavus* presentes en espigas de maíz, el 84% produjo ácido ciclopiazónico y el 28% produjo simultáneamente aflatoxina. No se detectaron aislados que sinteticen únicamente aflatoxinas.
- Los aislados que producen las mayores cantidades de micotoxinas en grano de maíz no necesariamente conservan esta característica en medio de cultivo.
- La producción de micotoxinas en medio de cultivo se presenta como una metodología apropiada para identificar aislados productores mientras que la cuantificación de las mismas debe realizarse en granos de maíz.
- El presente trabajo sugiere que los aislados con morfología tipo L y NP en condiciones de laboratorio son los principales responsables de contaminación con aflatoxina y ácido ciclopiazónico en granos de maíz.
- El número de esclerocios producido por los aislados no se relaciona a la cantidad de aflatoxina B<sub>1</sub> sintetizada.
- La capacidad para producir micotoxinas por parte de los aislados de *A. flavus* no estuvo asociada a las regiones agro-ecológicas estudiadas.
- Se detectó escasa diversidad genética entre los aislados, con seis grupos de compatibilidad vegetativa y un índice de diversidad de 0,12.
- La presencia de dos grupos de compatibilidad vegetativa predominantes entre los aislados de *A. flavus* no productores de aflatoxina podría ser indicadora de su especialización para infectar espigas de maíz.
- Los aislados atoxigénicos AS03145 y AS04322 presentes en espigas de maíz en el centro-norte del país se determinaron como altamente competitivos frente a cepas toxigénicas y que podrían ser utilizados como agentes de biocontrol.
- Los posibles agentes de biocontrol pertenecen a un grupo de compatibilidad vegetativa ampliamente distribuido en las dos regiones estudiadas, lo que permitiría una aplicación a gran escala en ambas áreas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbas H. K., Zablotowicz R. M., Horn B. W., Phillips N. A., Johnson B. J., Jin X. and Abel C. A. 2011. Comparison of major biocontrol strains of non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* for the reduction of aflatoxins and cyclopiazonic acid in maize. *Food Addit. Contam.* 28: 198–208.
- Astoreca A., Vaamonde G., Dalcero A., Marin S. and Ramos A. 2014. Abiotic factors and their interactions influence on the co-production of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid by *Aspergillus flavus* isolated from corn. *Food Microbiol.* 38: 276–283.
- Atehnkeng J., Donner M., Ojiambo P. S., Ikotun B., Augusto J., Cotty P. J. and Bandyopadhyay R. 2016. Environmental distribution and genetic diversity of vegetative compatibility groups determine biocontrol strategies to mitigate aflatoxin contamination of maize by *Aspergillus flavus*. *Microb. Biotechnol.* 9: 75–88.
- Atehnkeng J., Ojiambo P. S., Ikotun T., Sikora R. A., Cotty P. J. and Bandyopadhyay R. 2008. Evaluation of atoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* as potential biocontrol agents for aflatoxin in maize. *Food Addit. Contam.* 25: 1264–1271.
- Bandyopadhyay R., Akande A., Mutegi C., Atehnkeng J., Kaptoge L. and Senghor A. L. 2016. Biological control of aflatoxins in Africa : current status and potential challenges in the face of climate change. *World Mycotoxin J.* 9: 771–789.
- Barros G. G., Torres A. M., Rodriguez M. I. and Chulze S. N. 2006. Genetic diversity within *Aspergillus flavus* strains isolated from peanut-cropped soils in Argentina. *Soil Biol. Biochem.* 38: 145–152.
- Bayman P. 1991. Vegetative compatibility and genetic diversity in the *Aspergillus flavus* population of a single field.
- Bayman P. and Cotty P. J. 1993. Genetic diversity in *Aspergillus flavus*: association with aflatoxin production and morphology. *Can. J. Bot.* 71: 23–31.
- Bennett J. W. 2010. An overview of the genus *Aspergillus*. En: *Aspergillus molecular Biology and Genomics*. Machida, M. and Gomi, K. (eds.). Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp. 1–17.
- Callicott K. A. and Cotty P. J. 2015. Method for monitoring deletions in the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* with multiplex PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 60: 60–65.
- Chang P. and Ehrlich K. C. 2011. Cyclopiazonic acid biosynthesis by *Aspergillus flavus*. *Toxin Rev.* 30: 79 - 89.
- Chang P., Horn B. W. and Dorner J. W. 2005. Sequence breakpoints in the aflatoxin biosynthesis gene cluster and flanking regions in nonaflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. *Fungal Genet. Biol.* 42: 914–923.
- Choi Y., Hyde K. D. and Ho W. H. Single spore isolation of fungi. *Fungal Divers.* 3: 29 - 38.
- Correll J. C. 1991. The relationship between formae speciales, races, and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*.
- Cotty P. J. 1989. Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology* 79: 808–814.
- Cotty P. J. and Bayman P. 1993. Competitive exclusion of toxigenic strains of *Aspergillus flavus* by an atoxigenic strain. *Phytopathology* 83: 1283–1287.
- Cotty P. J., Probst C. and Jaime-garcia R. 2008. Etiology and management of aflatoxin

- contamination. En: *Mycotoxins: Detection methods, management, public health and agricultural trade*. Leslie, J. F., Bandyopadhyay, R., and Visconti, A. (eds.). CABI, Oxfordshire, UK, pp. 287–299.
- Cotty P. J. and Taylor D. R. 2003. Influence of complementation medium composition on vegetative compatibility analyses of *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 93.
- Cullen J. M., Wilson M., Hagler W. M., Ort J. F. and Cole R. J. 1988. Histologic lesions in broiler chicks given cyclopiazonic acid orally. *Am. J. Vet. Res.* 49: 728–731.
- de Rodríguez D. J., García R. R., Castillo F. D. H., González C. N. A., Galindo a. S., Quintanilla J. a. V. and Zuccolotto L. E. M. 2011. In vitro antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan Desert plants against postharvest fruit fungi. *Ind. Crops Prod.* 34: 960–966.
- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M. y Robledo C. W. 2014. InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Di Rienzo J. A., Guzman A. W. and Casanoves F. 2002. A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *J. Agric. Biol. Environ. Stat.* 7: 129–142.
- Doster M. A., Cotty P. J. and Michailides T. J. 2014. Evaluation of the atoxigenic *Aspergillus flavus* Strain AF36 in Pistachio Orchards. *Plant Dis.* 98: 948–956.
- Ehrlich K. C., Chang P., Yu J. and Cotty P. J. 2004. Aflatoxin biosynthesis cluster gene *cypA* is required for G aflatoxin formation. *Appl Environ Microbiol* 70: 6518–6524.
- Ehrlich K. C. and Cotty P. J. 2004. An isolate of *Aspergillus flavus* used to reduce aflatoxin contamination in cottonseed has a defective polyketide synthase. *Appl Microbiol Biotechnol* (2004) 65: 473–478.
- Giorni P. 2007. Impact of environmental and plant factors on *Aspergillus* section *Flavi*. Tesis Doctoral. Cranfield University, Cranfield, UK, 268 pp.
- Giorni P., Magan N., Pietri A., Bertuzzi T. and Battilani P. 2007. Studies on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in northern Italy. *Int. J. Food Microbiol.* 113: 330–338.
- Horn B. W., Greene R. L., Sobolev V. S., Dorner J. W. and Powell J. H. 1996. Association of morphology and mycotoxin production with vegetative compatibility groups in *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, and *A. tamaraii*. *Mycologia* 88: 574–587.
- Jaime-Garcia R. and Cotty P. J. 2006. Spatial relationships of soil texture and crop rotation to *Aspergillus flavus* community structure in south Texas. *Phytopathology* 96: 599–607.
- Klich M. A. 2007. Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycoscience* 48: 71–80.
- Klittich C. and Leslie J. F. 1988. Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). *Genetics* 118: 417–423.
- Leslie J. F. 1993. Fungal vegetative compatibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31: 127–150.
- MAIZAR. 2013. La cadena de maíz y las oportunidades para desarrollo en la Argentina. MAIZAR, Buenos Aires, Argentina, 144 pp.
- Mauro A., Battilani P., Callicott K. A., Giorni P., Pietri A. and Cotty P. J. 2013. Structure of an *Aspergillus flavus* population from maize kernels in northern Italy. *Int. J. Food Microbiol.* 162: 1–7.
- Mauro A., Battilani P. and Cotty P. J. 2015. Atoxigenic *Aspergillus flavus* endemic to Italy for biocontrol of aflatoxins in maize. *BioControl* 60: 125–134.
- Mehl H. L. and Cotty P. J. 2008. Variability in competitive ability among *Aspergillus flavus*

- vegetative compatibility groups during maize infection. *Phytopathology* 98: S103–S103.
- Mehl H. L. and Cotty P. J. 2010. Variation in competitive ability among isolates of *Aspergillus flavus* from different vegetative compatibility groups during maize infection. *Phytopathology* 100: 150–9.
- Mehl H. L., Jaime R., Callicott K. A., Probst C., Garber N. P., Ortega-Beltran A., Grubisha L. C. and Cotty P. J. 2012. *Aspergillus flavus* diversity on crops and in the environment can be exploited to reduce aflatoxin exposure and improve health. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1273: 7–17.
- Mellon J. E., Cotty P. J. and Dowd M. K. 2007. *Aspergillus flavus* hydrolases: Their roles in pathogenesis and substrate utilization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77: 497–504.
- Motta S. and Soares L. M. V. 2000. Simultaneous determination of tenuazonic and cyclopiazonic acids in tomato products. *Food Chemistry* 71: 111–116.
- Nesci A. and Etcheverry M. 2002. *Aspergillus* section *Flavi* populations from field maize in Argentina. *Lett. Appl. Microbiol.* 34: 343–348.
- Novas M. and Cabral D. 2002. Association of mycotoxin and sclerotia production with compatibility groups in *Aspergillus flavus* from peanut in Argentina. *Plant Dis.* 86: 215–219.
- Ortega-Beltran A., Grubisha L. C., Callicott K. A. and Cotty P. J. 2016. The vegetative compatibility group to which the US biocontrol agent *Aspergillus flavus* AF36 belongs is also endemic to Mexico. *J. Appl. Microbiol.* 120: 986–998.
- Ortega-Beltran A., Jaime R. and Cotty P. J. 2014. Aflatoxin-producing fungi in maize field soils from sea level to over 2000 masl: A three year study in Sonora, Mexico. *Fungal Biol.* 119: 191–200.
- Perrone G., Gallo A. and Logrieco A. F. 2014a. Biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in Europe in relation to the management of aflatoxin risk. *Front. Microbiol.* 5: 1–5.
- Perrone G., Haidukowski M., Stea G., Epifani F., Bandyopadhyay R., Leslie J. F. and Logrieco A. 2014b. Population structure and aflatoxin production by *Aspergillus* section *Flavi* from maize in Nigeria and Ghana. *Food Microbiol.* 41: 52–59.
- Pildain M. B., Frisvad J., Vaamonde G., Cabral D., Varga J. and Samson R. 2008. Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 725 - 735.
- Pildain M. B., Vaamonde G. and Cabral D. 2004. Analysis of population structure of *Aspergillus flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic origin, mycotoxin and sclerotia production. *Int. J. Food Microbiol.* 93: 31–40.
- Presello D. A., Botta G., Iglesias J. and Eyharabide G. H. 2008. Effect of disease severity on yield and grain fumonisin concentration of maize hybrids inoculated with *Fusarium verticillioides*. *Crop Prot.* 27: 572–576.
- Presello D. A., Iglesias J., Botta G. and Eyharabide G. H. 2007. Severity of *Fusarium* ear rot and concentration of fumonisin in grain of Argentinian maize hybrids. *Crop Prot.* 26: 852–855.
- Presello D. y Botta G. 2004. Podredumbres de espiga de maíz y micotoxinas asociadas. *IDIA XXI* 6: 152–157.
- Probst C., Bandyopadhyay R., Price L. E. and Cotty P. J. 2011. Isolates to reduce aflatoxin contamination of maize in Kenya. *Plant Dis.* 95: 212–218.
- Probst C. and Cotty P. J. 2012. Relationships between in vivo and in vitro aflatoxin production: Reliable prediction of fungal ability to contaminate maize with aflatoxins. *Fungal Biol.*

116: 503–510.

- Probst C., Callicott K. and Cotty P. J. 2012. Deadly strains of Kenyan *Aspergillus* are distinct from other aflatoxin producers. *Eur. J. Plant Pathol.* 132:419–429.
- Rao B. L. and Husain A. 1985. Presence of cyclopiazon acid in kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*) causing “kodua poisoning” in man and its production by associated fungi. *Mycopathologia* 89: 177–180.
- Sweany R. R., Damann K. E. and Kaller M. D. 2011. Comparison of soil and corn kernel *Aspergillus flavus* populations: evidence for niche specialization. *Phytopathology* 101: 952–959.
- Vaamonde G., Patriarca A., Fernández Pinto V., Comerio R. and Degrossi C. 2003. Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *Flavi* from different substrates in Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 79–84.
- Wu F., Stacy S. L. and Kensler T. W. 2013. Global risk assessment of aflatoxins in maize and peanuts: Are regulatory standards adequately protective? *Toxicol. Sci.* 135: 251–259.
- Yu J., Chang P., Ehrlich K. C., Cary J. W., Bhatnagar D., Cleveland T. E., Payne G. a, Linz J. E., Woloshuk C. P., Bennett W. and Bennett J. W. 2004. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1253–1262.
- Zummo N. and Scott G. E. 1990. Relative aggressiveness of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on maize in Mississippi. *Plant Dis.* 74: 978–981.

## CAPÍTULO 4

# COMPOSICIÓN QUÍMICA DE ACEITES ESENCIALES DE ESPECIES CULTIVADAS EN LA PROVINCIA DE CÓRDOBA

## INTRODUCCIÓN

En Argentina se producen anualmente cerca de 8.000 toneladas de plantas aromáticas. El área de producción se estima en 38.000 hectáreas, comprendiendo cultivo a campo y bajo cubierta. Las provincias más importantes son Buenos Aires, Mendoza y Entre Ríos (Corradi *et al.*, 2005).

Los oréganos pertenecen al grupo de las hierbas aromáticas, siendo las más utilizadas, principalmente como condimento. Desde el punto de vista botánico, las especies de oréganos corresponden al género *Origanum*, que incluye más de 70 especies, subespecies, variedades e híbridos (Kintzios, 2002). En Argentina, el orégano es el cultivo de plantas aromáticas más importante, no sólo por la demanda de consumidores, sino también por la superficie cultivada (11% del total de aromáticas producidas). Las principales zonas de producción se encuentran en la provincia de Córdoba (25%), Mendoza (50%) y San Juan (15%) (Corradi *et al.*, 2005). Las variedades más importantes de orégano cultivadas en Argentina son el Mendocino, Compacto y Cordobés (Asensio, 2013).

Las mentas comprenden un grupo de especies del género *Mentha*, pertenecientes a la familia de las Lamiáceas. La parte aérea de la planta contiene AE con varios componentes que comúnmente se utilizan en la industria farmacéutica, alimenticia, cosmética y otras afines. El AE de menta es principalmente producido en Argentina, China y Estados Unidos (Verma *et al.*, 2010). Dentro de la producción de plantas aromática argentinas, la menta es la segunda en importancia abarcando el 10% del total de superficie sembrada (Corradi *et al.*, 2005).

*Tagetes minuta* L. es una planta nativa de Sudamérica, aunque se ha dispersado en todo el mundo. En Argentina, es una planta muy abundante conocida vulgarmente como “suico”. Esta especie crece naturalmente desde la primavera y desaparece en el comienzo del invierno,

habiendo desarrollado completamente su ciclo de vida. Su aceite esencial es muy utilizado en la industria del perfume y como saborizante (Chamorro *et al.*, 2008; Gil *et al.*, 2000).

El laurel (*Laurus nobilis* L.) y el romero (*Rosmarinus officinalis* L.) se cultivan en Argentina debido a su uso como condimento y a otras propiedades de sus aceites esenciales. El laurel es una especie nativa de la región mediterránea y cultivada en numerosos países con clima moderado a subtropical. Esta especie es comúnmente utilizada como condimento pero también se utiliza como medicamento debido a sus propiedades medicinales (Boulila *et al.*, 2015). En Argentina, la zona de plantación del cultivo de Laurel se encuentra en las provincias de Buenos Aires y Salta (Di Leo Lira *et al.*, 2009).

El romero es una especie aromática muy común, utilizada como condimento. Su aceite es utilizado como fragancia y en aromaterapia. En nuestro país, el romero se cultiva principalmente en Buenos Aires y Catamarca (Mizrahi *et al.*, 1991).

El aguaribay (*Schinus molle* L.) es un árbol nativo de Sudamérica, perteneciente a la familia de las Anacardiáceas. Su uso ornamental ha permitido su introducción en otras regiones del mundo. En la cocina tradicional, sus frutos son comúnmente conocidos como “pimienta rosa” y son utilizados como reemplazo de la pimienta negra o para preparar bebidas (Martins *et al.*, 2014).

Muchos estudios indican que la composición química de los AEs varía de acuerdo a la especie, el año, la parte que se utiliza, la región donde se cultivan y las condiciones climáticas (Asensio, 2013; Chamorro *et al.*, 2008; Arnold *et al.*, 2000; Gil *et al.*, 2000; Fiorini *et al.*, 1997). El objetivo del capítulo fue determinar la composición de los AEs obtenidos de material vegetal de plantas aromáticas cultivadas en la provincia de Córdoba.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIAL VEGETAL

Todas las muestras estuvieron compuestas por hojas secas de nueve plantas aromáticas:

- (a) *Origanum x majoricum* Cambess. “Orégano Mendocino” (OMen).
- (b) *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* “Orégano Compacto” (OCom).
- (c) *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* clon “Orégano Cordobés” (OCor).
- (d) *Mentha x piperita* L. var. *Vulgaris Sole* “Menta Inglesa” (Mi).
- (e) *Mentha x piperita* L. “Menta Pehuajó” (Mp).
- (f) *Tagetes minuta* L. “Suico” (Su).
- (g) *Laurus nobilis* L. “Laurel” (La).
- (h) *Rosmarinus officinalis* L. “Romero” (Ro).
- (i) *Schinus molle* L. “Aguaribay” (Ag).

El material fue colectado durante el periodo de cultivo del año 2013 de la Estación Experimental de la Facultad de Ciencias Agropecuarias (UNC), Córdoba, Argentina.

### EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES Y SU RENDIMIENTO

Los AEs se obtuvieron por hidrodestilación de parte aéreas secas durante 2 horas en un destilador de tipo Clevenger (Figura 4.1). Los AEs obtenidos fueron secados sobre sulfato de sodio anhidro y se almacenaron en viales de color ámbar (20 mL) a -20°C hasta su posterior análisis (Asensio, 2013). El rendimiento para cada AE fue calculado de acuerdo con el volumen obtenido y el peso del material, y se expresó como porcentaje volumen/peso (% v/p).



Figura 4.1. Destilador tipo Clevenger para la obtención de aceite esencial.

## COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES

Los AE fueron analizados mediante cromatografía gaseosa y espectrometría de masas (CG-EM) en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Clarus 600 (Shelton, Connecticut, Estados Unidos) acoplado a un espectrómetro de masas (MSD) y un detector de ionización de llama (FID). Los compuestos fueron separados en una columna capilar DB-5 (30 m, 0.25 mm ID, 0.25  $\mu\text{m}$  film). La fase móvil fue gas Helio a una velocidad de flujo de 0,9  $\text{mL min}^{-1}$ . La temperatura de inyección fue fijada en 250°C. La rampa de temperatura en la columna fue de 10°C  $\text{min}^{-1}$  y finalmente se mantuvo a 220°C por 7 min. La temperatura para el detector de

ionización de llama (FID) se estableció en 300°C y para el MSD se fijó a 280°C. El espectro de masas fue adquirido a un rango de  $m/z$  de 35 a 450. Los compuestos fueron identificados comparando su tiempo de retención (Tr) con espectro de masas con bibliografía previa (Adams, 1995) y bibliotecas de espectros de masas NIST (versión 3.0). El análisis cuantitativo se realizó mediante normalización del área de los picos y los resultados se expresaron como porcentajes relativos.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los AEs se analizaron en tres repeticiones para determinar su rendimiento y composición química. Sobre los datos obtenidos, se realizaron los siguientes cálculos estadísticos (Di Rienzo *et al.*, 2014):

- Determinación de medias y desvíos estándar.
- Análisis de la Varianza (ANOVA) y test de LSD de Fisher ( $\alpha = 0,05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### RENDIMIENTO EN ACEITE ESENCIAL

Los rendimientos obtenidos para cada AE se presentan en la tabla 4.1. Entre las especies de orégano, el mayor rendimiento observado fue para OCor y OMen. Resultados similares fueron indicados para variedades de orégano cultivadas en las provincias de Córdoba y Neuquén en Argentina (Asensio, 2013). Rendimientos superiores (cercaos al 5% ) han sido reportados para variedades de orégano donde el material destilado estuvo compuesto por hojas y flores cosechadas a partir de plantas fertilizadas foliarmente (Dordas, 2009).

En cuanto a las variedades de AE de menta, la diferencia en rendimiento observada fue significativa y Mp presentó un mayor rendimiento que Mi. Estudios previos indicaron que el rendimiento de Mp varía ampliamente, con valores registrados entre 1.63 y 2.53%, dependiendo del momento de cosecha y temperatura de secado de las muestras (Rohloff *et al.*, 2005). Debido a esto, se han reportado diferentes rendimientos para Mp con valores entre 1.33 y 3.70% en China, Estados Unidos y Turquía (Esetlíllí *et al.*, 2015; Aflatuni, 2005).

El rendimiento obtenido para Ro fue similar al obtenido por Ojeda-Sana *et al.* (2013), quienes señalaron un rendimiento de 2,28% para un fenotipo de hoja ancha y 2,58% para el fenotipo de hoja angosta. El Ag tuvo un rendimiento semejante al de Ro, superior al 1% reportado en trabajos previos (Martins *et al.*, 2014).

El Su obtuvo un rendimiento medio del 2,8%, superando ampliamente el rendimiento del 1,2% indicado para esta AE obtenido de material cultivado en otras regiones de Argentina (Gil *et al.*, 2000). Estos resultados concuerdan con análisis previos para Su cultivado en África, que señalaron un rendimiento máximo del 1,52% para este AE (Tankeu *et al.*, 2013).

El menor rendimiento en AE fue para La, con un valor del 1.29%. Sin embargo, este resultado es mayor al 0,9% indicado por Di Leo Lira *et al.* (2009) para La obtenido de material seco cultivado en otras regiones de Argentina.

Tabla 4.1. Rendimiento en aceite esencial de las plantas aromáticas.

Aceite esencial	Rendimiento (% v/p) <sup>z</sup>
Orégano	
Cordobés	3,30 a
Mendocino	3,15 a
Compacto	2,20 b
Menta	
Inglesa	2,38 b
Pehuajó	3,22 a
Romero	2,70 b
Aguaribay	2,60 b
Suico	2,80 b
Laurel	1,29 c

<sup>z</sup> Letras diferentes en la columna indican diferencias significativas entre los rendimientos de acuerdo al test LSD de Fisher ( $P < 0,05$ ).

## COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES

**Oréganos.** Se identificaron un total de 32 componentes que representaron más del 90% de los AEs obtenidos a partir de las tres variedades de orégano (Tabla 4.2). Diferencias significativas entre los porcentajes relativos de sus compuestos mayoritarios (Figura 4.3), se presentan en la Figura 4.2. OCor y OMen presentaron una composición química similar con (Z)-sabineno hidrato, timol,  $\gamma$ -terpineno, 4-ol-terpineno y o-cimeno como compuestos mayoritarios. Sin embargo, se observaron diferencias significativas para algunos de sus componentes principales: OMen presentó mayor cantidad de (Z)-sabineno hidrato y o-cimeno, mientras que OCor tuvo mayor cantidad de timol. Por otro lado, en OCom se determinaron como componentes principales o-cimeno, 4-ol-terpineno, cis- $\beta$ -terpineol,  $\gamma$ -terpineno y timol. Asensio (2013) estudió la composición química de estos AE obtenidos de oréganos cultivados en Córdoba (Argentina), indicando los mismos compuestos mayoritarios con porcentaje relativos similares. Dambolena *et al.* (2010) indicó que los componentes principales de los AE de oréganos argentinos son los monoterpenos (Z)-sabineno hidrato (27,77 - 36,77%) y timol (17,77 - 30,77%), seguido por cantidades más pequeña de terpineno (3,13-4,63%), limoneno (2,1-3,6%), (E)-sabineno hidrato (1,43-3,37%), 4-ol-terpineno (3.23-5.3%), y carvacrol (traza-3,57%). OMen presentó la mayor cantidad de (Z)-sabineno hidrato, mientras que OCom presentó la menor proporción de este componente. Otros estudios señalaron a los compuestos

Tabla 4.2. Porcentajes relativos de los principales compuestos presentes en los aceites esenciales de tres especies de orégano de acuerdo a su orden de elusión en CG-EM.

Compuesto	IR <sup>a</sup>	Porcentajes relativos (%) <sup>b</sup>					
		OCor <sup>c</sup>		OMen <sup>c</sup>		OCom <sup>c</sup>	
1-R- $\alpha$ -Pineno	937	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,51	± 0,01
$\alpha$ -Pineno	939	0,75	± 0,01	0,63	± 0,01	0,00	± 0,00
Camfeno	954	0,41	± 0,01	0,12	± 0,01	0,00	± 0,00
Sabineno	977	3,91	± 0,04	4,52	± 0,04	1,66	± 0,01
Morillol	978	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	1,40	± 0,02
$\beta$ -Pineno	980	1,36	± 0,01	1,03	± 0,01	1,14	± 0,01
$\beta$ -Mirceno	992	1,80	± 0,02	1,67	± 0,01	0,00	± 0,00
$\alpha$ -Terpineno	1018	2,63	± 0,03	3,03	± 0,03	3,10	± 0,01
o-Cimeno	1020	5,15	± 0,06	7,84	± 0,07	14,33	± 0,04
$\beta$ -Felandreno	1031	1,86	± 0,02	1,96	± 0,02	3,74	± 0,01
(E)- $\beta$ -Ocimeno	1040	2,77	± 0,03	1,63	± 0,01	0,00	± 0,00
$\gamma$ -Terpineno	1063	7,12	± 0,08	7,59	± 0,07	9,12	± 0,02
(E)-Sabineno hidrato	1071	3,31	± 0,04	3,47	± 0,03	0,00	± 0,00
(Z)-Sabineno hidrato	1068	23,03	± 0,25	28,33	± 0,29	1,81	± 0,01
Terpinoleno	1084	0,82	± 0,01	0,98	± 0,01	1,45	± 0,01
(E)- $\beta$ -Terpineol	1144	0,40	± 0,01	0,44	± 0,01	10,46	± 0,03
Borneol	1170	1,47	± 0,02	0,42	± 0,01	0,00	± 0,00
4-ol-Terpineno	1181	6,20	± 0,07	6,66	± 0,06	12,55	± 0,03
$\alpha$ -Terpineol	1192	2,34	± 0,03	2,01	± 0,02	3,35	± 0,01
Timol metil eter	1235	0,27	± 0,01	1,09	± 0,01	0,69	± 0,01
Anisole	1244	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	2,13	± 0,01
Carvacrol metil eter	1247	1,30	± 0,01	1,66	± 0,01	0,00	± 0,00
Linalool acetato	1258	1,07	± 0,01	1,82	± 0,02	0,00	± 0,00
Timol	1290	18,66	± 0,20	12,18	± 0,11	9,44	± 0,03
Carvacrol	1301	0,21	± 0,01	1,82	± 0,02	5,61	± 0,01
$\beta$ -Cariofileno	1425	2,82	± 0,03	2,18	± 0,02	1,99	± 0,01
D-Germacreno	1486	1,23	± 0,01	0,30	± 0,01	0,00	± 0,01
Biciclogermacreno	1500	1,72	± 0,02	1,55	± 0,01	0,00	± 0,00
$\beta$ -Bisaboleno	1511	0,73	± 0,01	0,23	± 0,01	1,21	± 0,01
$\delta$ -Cadineno	1527	0,06	± 0,01	0,03	± 0,00	0,69	± 0,01
Espatuleno	1576	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	1,92	± 0,01
Oxido de Cariofileno	1588	0,37	± 0,01	0,30	± 0,01	1,77	± 0,01
<b>Total</b>		<b>93,77</b>		<b>95,50</b>		<b>90,97</b>	

<sup>a</sup> IR: índice de retención.

<sup>b</sup> Números en negrita resaltan los compuestos mayoritarios. Compuestos con porcentaje relativo menor a 0,5% en las tres variedades fueron excluidos del análisis.

<sup>c</sup> OCor (*Origanum vulgare* ssp *hirtum*), OCom (*Origanum vulgare* L. ssp. *Vulgare*) y OMen (*Origanum x majoricum*).

fenólicos, timol y carvacrol, en porcentajes similares (35 y 32%, respectivamente) como componentes principales de OCor cultivado en Europa (Kulisic *et al.*, 2004). En este trabajo, el AE de OCor presentó la mayor cantidad de timol (18,6%) pero con trazas de carvacrol (0,21%). La variedad argentina de orégano analizada con la mayor cantidad de carvacrol fue OCom (5,6%).

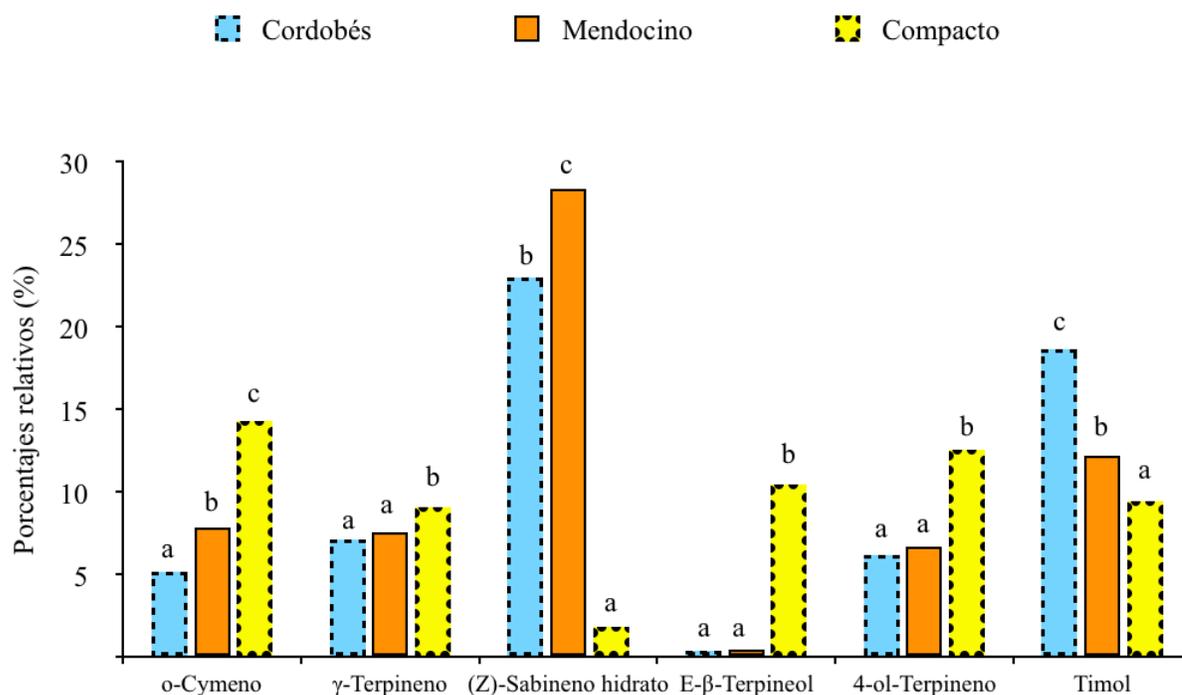


Figura 4.2. Porcentajes relativos de los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales de las tres variedades de oréganos estudiadas (Cordobés, Mendocino y Compacto). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las variedades de acuerdo al test LSD de Fisher ( $P < 0,05$ ).

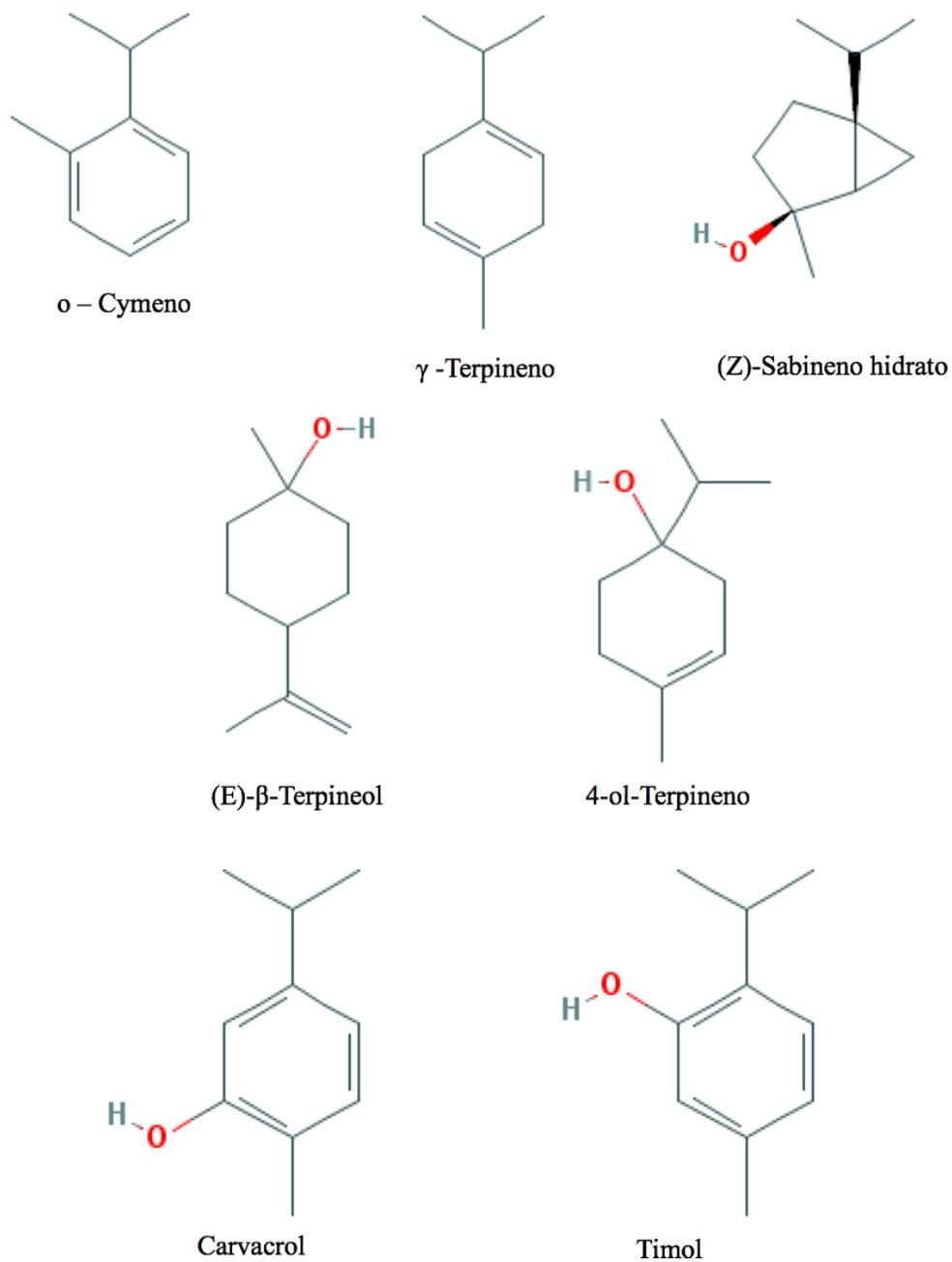


Figura 4.3. Estructura química de los principales componentes del aceite esencial de orégano.

**Mentas.** La composición química de las mentas fue caracterizada por la predominancia de monoterpenos oxigenados (87,2 en Mi y 87,4% en Mp). Sin embargo, se detectaron diferencias significativas entre las dos variedades para cada componente (Tabla 4.3). Diferentes variedades de menta han sido caracterizados por la predominancia de este tipo de monoterpenos en sus AEs, con porcentajes variando del 54,4 al 94,2% (Zheljazkov y Astatkie, 2012). El mentol y la mentona (Figura 4.4) se presentaron con concentraciones marcadamente superiores, siendo el 66,7% y 68,5% del total en Mi y Mp, respectivamente. Estos dos monoterpenos fueron descritos como predominantes en AE de Mp, con una concentración del 42,8% para el mentol y del 10,9% para la mentona (Zheljazkov y Astatkie, 2012). Otros autores (Verma *et al.*, 2010) indicaron que la edad del cultivo influye en el contenido de mentol en el AE, que puede variar

Tabla 4.3. Porcentajes relativos de los principales compuestos presentes en los aceites esenciales de dos variedades de menta de acuerdo a su orden de elusión en CG-EM.

Compuesto	IR <sup>y</sup>	Porcentajes relativos (%) <sup>z</sup>	
		Mi	Mp
1-R- $\alpha$ -Pinoeno	937	0,00 a	0,56 b
Sabineno	977	0,00 a	0,48 b
$\beta$ -Pinoeno	980	0,81 a	0,83 a
$\beta$ -Mirceno	992	0,00 a	0,20 b
Limoneno	1031	0,86 a	3,14 b
Eucaliptol	1033	6,21 b	4,36 a
(E)- $\beta$ -Terpineol	1144	1,78 b	0,00 a
Linalool	1098	0,00 a	0,21 b
Mentona	1154	23,22 a	31,68 b
Isomentona	1164	8,08 b	4,71 a
Mentol	1173	43,85 b	36,88 a
Isomentol	1182	3,58 a	2,51 b
Pulegona	1237	1,46 a	5,15 b
Piperitona	1282	0,87 a	1,91 b
Mentol acetato	1294	0,00 a	0,27 b
Isomentol acetato	1298	4,56 a	4,91 a
$\beta$ -Bourboneno	1384	0,00 a	0,28 b
$\beta$ -Cariofileno	1425	1,48 b	0,18 a
D-Germacreno	1486	1,05 b	0,16 a
(E)-Nerodiol	1534	0,26 b	0,00 a
Total		98,07	98,40

<sup>y</sup> IR: índice de retención.

<sup>z</sup> Letras diferentes para una misma fila indican diferencias significativas entre los componentes de acuerdo al test LSD de Fisher ( $P < 0,05$ ). Compuestos con porcentaje relativo menor a 0,2% en las dos variedades fueron excluidos del análisis.

de 34,2 a 43,1%. La mentona también es influenciada por este factor, con porcentajes variando de 3,4 a 33,7% (Verma *et al.*, 2010).

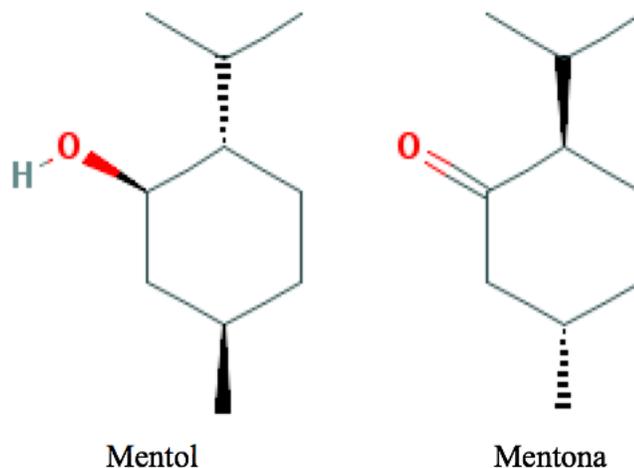


Figura 4.4. Estructura química de los principales componentes del aceite esencial de menta.

**Suico.** Este AE presentó el perfil más simple en su composición entre todos los estudiados, con siete compuestos identificados (Figura 4.5): verbenona (52,78%), (Z)- $\beta$ -ocimeno (18,59%), (E)-tagetona (18,47%), (Z)-tageona (3,31%), limoneno (3,08%), piperitenona (1,86%) y espatulenol (1,91%). Estos resultados concuerdan con trabajos previos (Saha *et al.*, 2012; Chamorro *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2006), donde 5 a 7 componentes constituyeron el perfil químico completo de Su. Los quimiotipos de Su también varían de acuerdo a que parte de la planta es utilizada para destilación y su estado de crecimiento (Chamorro *et al.*, 2008). Dihidrotagetona (42,9%) y (Z)-tagetona (16,8%) han sido indicados como compuestos mayoritarios en AE obtenido a partir de hojas, mientras que  $\beta$ -ocimeno (45,4%) y (E)-tageona (25,0%) fueron prevalentes en AE obtenido a partir de flores. En muestras obtenidas a partir de material cultivado en Argentina, los compuestos más importantes fueron Dihidrotagetona, (Z)- $\beta$ -ocimeno y (Z)-tageona con diferentes porcentajes relativos de acuerdo a su origen geográfico (Gil *et al.*, 2000).

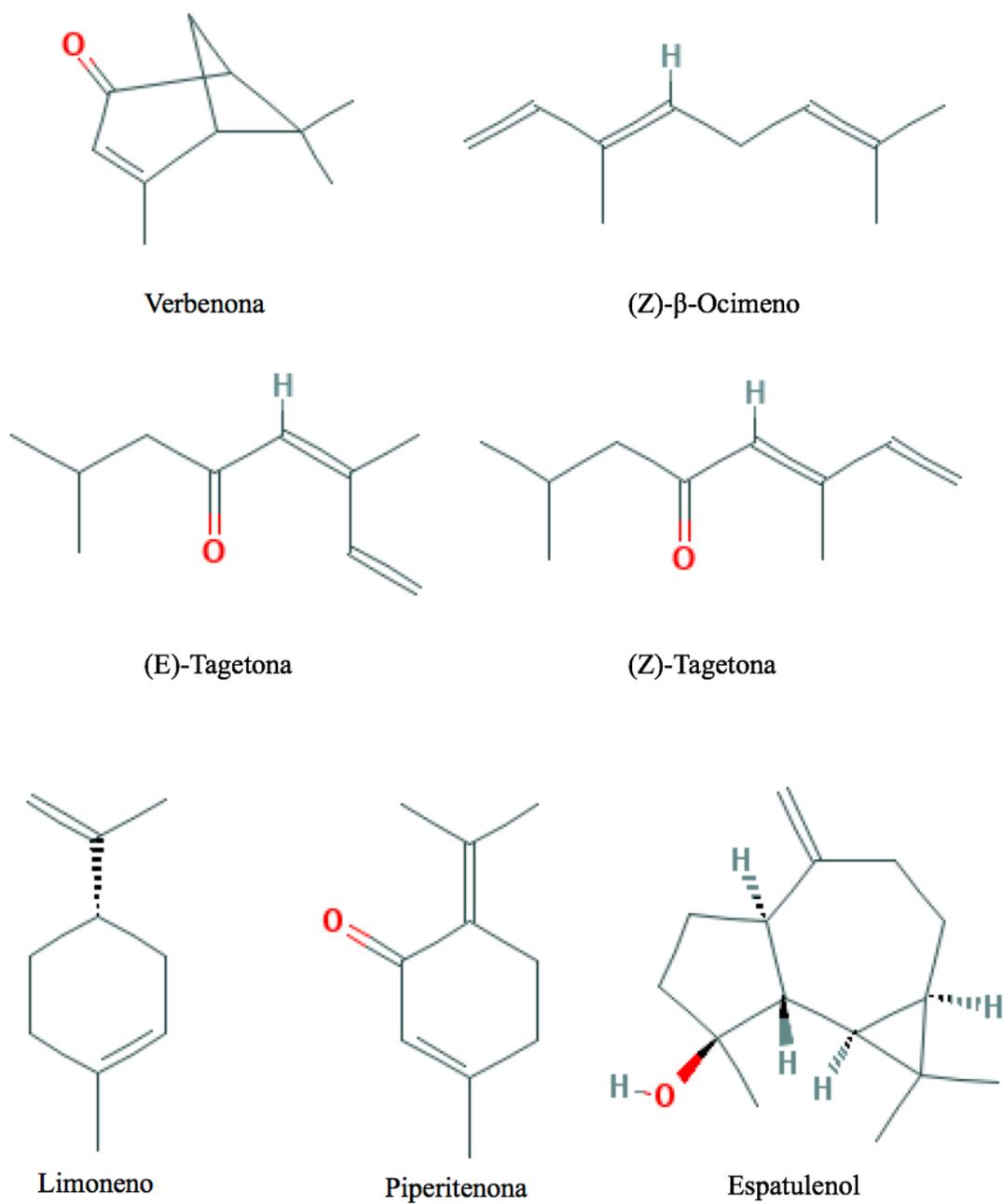


Figura 4.5. Estructura química de los componentes del aceite esencial de suico.

**Laurel.** Se identificaron un total 19 compuestos en la composición química de La (Tabla 4.4). Los monoterpenos oxigenados representaron la fracción predominante, siendo el 70,0 % del AE. El compuesto mayoritario fue el monoterpeno eucaliptol (Figura 4.6). La presencia de este monoterpeno como compuesto principal en La coincide con datos reportados para material vegetal cultivado en Argentina (Di Leo Lira *et al.*, 2009). Porcentajes similares de este componente también fueron indicados para AE obtenido a partir de plantas cultivadas en otras partes del mundo (Da Silveira *et al.*, 2014; Fiorini *et al.*, 1997). El linalool (Figura 4.6) fue el segundo compuesto más importante, como también se indicó en estudios previos (Da Silveira *et al.*, 2014; Di Leo Lira *et al.*, 2009). Otros autores (Fiorini *et al.*, 1997) indicaron  $\alpha$ -terpineol y metileugenol como compuestos significantes pero no mayoritarios, con concentraciones del 18 y 11%, respectivamente. Es importante destacar que la concentración de los compuestos

Tabla 4.4. Porcentajes relativos de los principales compuestos presentes en el aceite esencial de Laurel de acuerdo a su orden de elusión en CG-EM.

Compuestos	IR <sup>a</sup>	Porcentajes relativos (%) <sup>b</sup>
1-R- $\alpha$ -pineno	937	0,37 $\pm$ 0,04
$\alpha$ -Pineno	939	3,59 $\pm$ 0,11
Camfeno	954	0,31 $\pm$ 0,03
$\beta$ -Pineno	979	3,29 $\pm$ 0,52
$\beta$ -Mirceno	991	0,90 $\pm$ 0,01
3-Careno	1011	0,47 $\pm$ 0,01
$\alpha$ -Terpineno	1018	0,55 $\pm$ 0,02
m-Cimeno	1023	0,27 $\pm$ 0,01
Eucaliptol	1033	42,23 $\pm$ 0,15
$\gamma$ -Terpineno	1062	0,80 $\pm$ 0,01
(Z)-Sabineno hidratado	1068	2,04 $\pm$ 0,02
Terpinoleno	1084	0,39 $\pm$ 0,03
Linalool	1098	15,19 $\pm$ 0,11
$\alpha$ -Terpineol	1189	3,72 $\pm$ 0,03
Terpineno 4 - acetato	1340	8,91 $\pm$ 0,09
$\beta$ -Terpinil acetato	1348	0,68 $\pm$ 0,02
Eugenol	1356	0,70 $\pm$ 0,02
$\beta$ -Elemeno	1375	0,45 $\pm$ 0,01
Metileugenol	1401	5,46 $\pm$ 0,06
Total		90,32

<sup>a</sup> IR: índice de retención.

<sup>b</sup> Compuestos con porcentaje relativo menor a 0,2% en las dos variedades fueron excluidos del análisis.

mayoritarios en este AE presenta variaciones según si se analizan hojas, tallo o flores (Fiorini *et al.*, 1997).

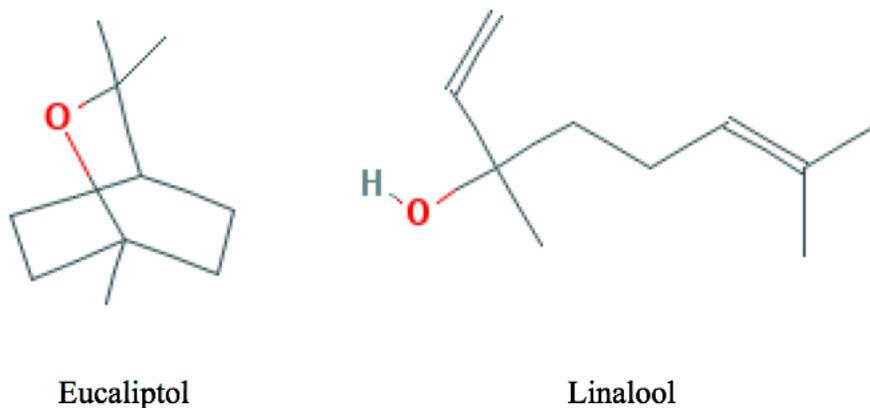


Figura 4.6. Estructura química de los dos compuestos mayoritarios en el aceite esencial de laurel.

**Romero.** Los resultados para la composición química de Ro se presentan en la Tabla 4.5. Un total de 19 compuestos representaron el 98% del AE. Los porcentajes relativos indican eucaliptol,  $\beta$ -mirceno y camfor como compuestos principales (Figura 4.7). Estos tres terpenos fueron reportados con porcentajes similares en Ro extraído de plantas cultivadas en Argentina (Ojeda-Sana *et al.*, 2013). Otros autores indicaron que el contenido de eucaliptol y camfor varían ampliamente de acuerdo al método de extracción del AE (Boutekedjiret *et al.*, 2003). El perfil químico del AE de Ro típicamente presenta  $\alpha$ -pineno, eucaliptol y camfor como componentes principales, asociados a cantidades variables de otros compuestos, como camfeno y borneol (Fu *et al.*, 2007; Baratta *et al.*, 1998). Ro con cantidades superiores en  $\beta$ -mirceno han sido reportados en Argentina (Ojeda-Sana *et al.*, 2013) y Brasil (Porte *et al.*, 2000; Dellacassa *et al.*, 1999).

Tabla 4.5. Porcentajes relativos de los principales compuestos presentes en el aceite esencial de Romero de acuerdo a su orden de elusión en CG-EM.

Compuesto	IR <sup>a</sup>	Porcentaje relativo (%) <sup>b</sup>
$\alpha$ -Pinoeno	933	5,58 $\pm$ 0,08
camfeno	952	2,53 $\pm$ 0,04
$\beta$ -Pinoeno	980	0,78 $\pm$ 0,01
$\beta$ -Mirceno	991	20,17 $\pm$ 0,30
$\alpha$ -Terpinoeno	1018	2,39 $\pm$ 0,04
$\beta$ - cimeno	1020	4,42 $\pm$ 0,07
Eucaliptol	1033	24,34 $\pm$ 0,36
$\gamma$ -Terpinoeno	1059	1,81 $\pm$ 0,03
Linalool	1098	1,93 $\pm$ 0,03
Camfor	1143	13,98 $\pm$ 0,21
Pinocamfeno	1152	0,97 $\pm$ 0,01
Isoborneol	1156	1,76 $\pm$ 0,03
4-ol-Terpinoeno	1177	2,15 $\pm$ 0,03
$\alpha$ - Terpinoeol	1189	3,35 $\pm$ 0,05
Verbenona	1204	3,31 $\pm$ 0,05
Bornil acetato	1285	0,57 $\pm$ 0,01
Carvacrol	1298	3,15 $\pm$ 0,05
$\beta$ - Cariofileno	1418	3,84 $\pm$ 0,06
$\alpha$ - Cariofileno	1454	0,88 $\pm$ 0,01
Total		98,00

<sup>a</sup>IR: índice de retención.

<sup>b</sup> Compuestos con porcentaje relativo menor a 0,2% en las dos variedades fueron excluidos del análisis

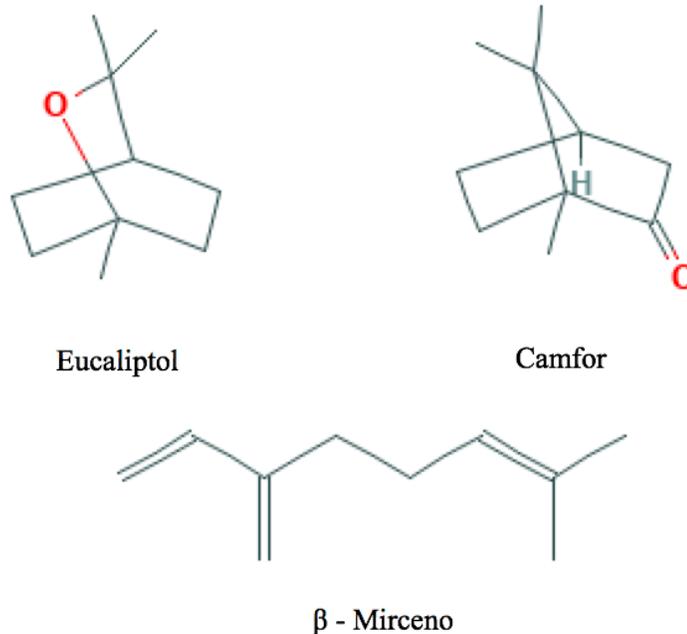


Figura 4.7. Estructura química de los tres compuestos mayoritarios en el aceite esencial de romero.

**Aguaribay.** Los resultados del análisis cromatográfico de Ag se resumen en la Tabla 4.6. Los compuestos con los porcentajes mayores fueron dihidroxi-isocalamendiol,  $\alpha$ -felandreno, limoneno y elemol (Figura 4.8). Bibliografía previa (Díaz *et al.*, 2008) sobre este AE evidenciaron una alta variabilidad en su composición química, dependiendo de la región geográfica donde se colecta el material vegetal. Las mayores diferencias se encontraron para AE de Centroamérica, donde los terpenos  $\alpha$ -pineno y  $\beta$ -pineno representaron más del 55% de AE (Díaz *et al.*, 2008). En Sudamérica, AE obtenido en Brasil fue caracterizado por altos porcentajes de sabineno (51,74%) y limoneno (16,91%), pero también con una cantidad importante de biciclogermancreno (18,12%) (Santos *et al.*, 2009). Por el contrario, este último compuesto fue indicado como el componente mayoritario (29,20%) en AE obtenido de material vegetal cultivado en Uruguay (Rossini *et al.*, 1996). Los resultados obtenidos coinciden parcialmente con AE de Ag cultivado en Europa, donde  $\alpha$ -felandreno y limoneno fueron mayoritarios con porcentajes relativos 25,91 y 11,78%, respectivamente (Martins *et al.*, 2014).

Tabla 4.6. Porcentajes relativos de los principales compuestos presentes en el aceite esencial de Aguaribay de acuerdo a su orden de elusión en CG-EM.

Compuesto	IR <sup>a</sup>	Porcentaje relativo (%) <sup>b</sup>
Triciclono	926	1,35 ± 0,02
1R- $\alpha$ -Pinoeno	937	5,00 ± 0,07
Camfeno	952	8,10 ± 0,11
Sabineno	973	1,27 ± 0,02
$\beta$ -Pinoeno	980	3,79 ± 0,05
$\beta$ -Mirceno	991	1,01 ± 0,01
$\alpha$ -Felandreno	1005	14,20 ± 0,19
o-Cimeno	1020	1,20 ± 0,02
Limoneno	1031	13,60 ± 0,18
Anetol	1289	2,39 ± 0,03
$\beta$ -Elemeno	1375	0,76 ± 0,01
$\beta$ -Cariofileno	1418	0,77 ± 0,01
D-Germacreno	1486	2,26 ± 0,03
Elixeno	1514	1,05 ± 0,01
$\delta$ -Cadineno	1524	3,10 ± 0,04
Elemol	1547	10,76 ± 0,15
D-Germacreno 4-ol	1574	2,37 ± 0,03
Dihidroxi-isocalamendiol	1593	18,66 ± 0,25
$\gamma$ -Eudesmol	1630	2,56 ± 0,03
t Muurolol	1642	1,06 ± 0,01
$\beta$ -Eudesmol	1649	2,17 ± 0,03
Total		97,43

<sup>a</sup> IR: índice de retención.

<sup>b</sup> Compuestos con porcentaje relativo menor a 0,2% en las dos variedades fueron excluidos del análisis

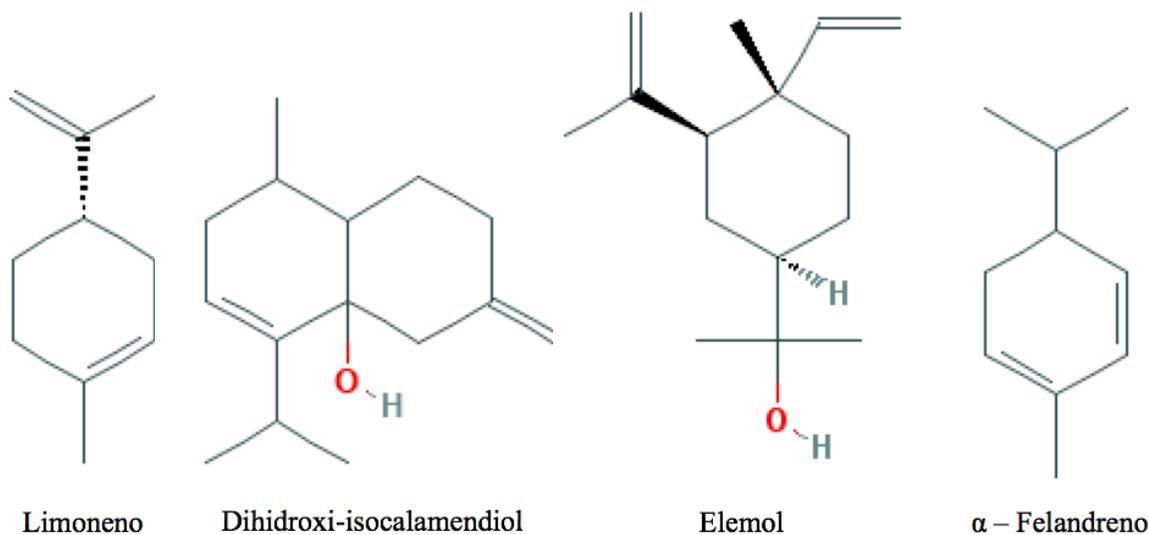


Figura 4.8. Estructura química de los principales componentes del aceite esencial de aguaribay.

## CONCLUSIONES

- Los aceites esenciales de las variedades de orégano presentan diferente rendimiento y composición química. La variedad Cordobés es la que presenta mayor contenido de timol y la variedad Compacto el menor rendimiento.
- Las variedades de menta presentan diferente rendimiento. Aunque se identificaron los mismos componentes en composición, estos presentaron diferencias significativas. El mentol y mentona fueron los compuestos ampliamente mayoritarios en ambas variedades cultivadas en Córdoba.
- El aceite esencial de suico presenta un rendimiento medio, con una composición química más simple respecto a los otros estudiados.
- El aceite esencial de laurel presentó el menor rendimiento en AE con una composición química similar a las reportadas previamente.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adams R. P. 1995. Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy. Allured Publishing, Carol Stream, 804 pp.
- Aflatuni A. 2005. The yield and essential oil content of mint (*Mentha* ssp.) in Northern Ostrobothnia. Oulu University Press, Oulu, Finland, 50 pp.
- Arnold N., Bellomaria B. and Valentini G. 2000. Composition of the essential oil of three different species of origanum in the eastern mediterranean. J. Essent. Oil Res. 12: 192–196.
- Asensio C. M. 2013. Variedades de orégano como conservante antimicrobiano, antioxidante y de las propiedades sensoriales de alimentos: queso cottage, ricota y aceite de oliva. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, 228 pp.
- Baratta M. T., Dorman H. J. D., Deans S. G., Biondi D. M. and Ruberto G. 1998. Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. J. Essent. Oil Res. 10: 618–627.
- Boulila A., Hassen I., Haouari L., Mejri F., Amor I. Ben, Casabianca H. and Hosni K. 2015. Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from bay leaves (*Laurus nobilis* L.). Ind. Crops Prod. 74: 485–493.
- Boutekdjiret C., Bentahar F., Belabbes R. and Bessiere J. M. 2003. Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation. Flavour Fragr. J. 18: 481–484.
- Chamorro E. R., Ballerini G., Sequeira A. F., Velasco G. A. and Zalazar M. F. 2008. Chemical composition of essential oil from *Tagetes minuta* L. leaves and flowers. J. Argentine Chem. Soc. 96: 80–86.
- Corradi P., del Río J. A., Eleicegui G. and Zorraquín T. 2005. Aromáticas. En: Agroalimentos Argentinos II. Torello, P. (ed.). AACREA, Buenos Aires, Argentina, pp. 223–230.
- Da Silveira S. M., Luciano F. B., Fronza N., Cunha A., Scheuermann G. N. and Vieira C. R. W. 2014. Chemical composition and antibacterial activity of *Laurus nobilis* essential oil towards foodborne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7°C. LWT - Food Sci. Technol. 59: 86–93.
- Dambolena J. S., Zunino M. P., Lucini E. I. and Olmedo R. H. 2010. Total phenolic content, radical scavenging properties and essential oil composition of *Origanum* species from different populations. J. Agric. Food Chem. 58: 1115–1120.
- Dellacassa E., Lorenzo D., Moyna P., Frizzo C. D., Serafini L. A. and Dugo P. 1999. *Rosmarinus officinalis* L. (Labiatae) essential oils from the south of Brazil and Uruguay. J. Essent. Oil Res. 11: 27–30.
- Di Leo Lira P., Retta D., Tkacik E., Ringuelet J., Coussio J. D., van Baren C. and Bandoni A. L. 2009. Essential oil and by-products of distillation of bay leaves (*Laurus nobilis* L.) from Argentina. Ind. Crops Prod. 30: 259–264.
- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M. y Robledo C. W. 2014. InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Díaz C., Quesada S., Brenes O., Aguilar G. and Ciccio J. F. 2008. Chemical composition of *Schinus molle* essential oil and its cytotoxic activity on tumour cell lines. Nat. Prod. Res. 22: 1521–1534.
- Dordas C. 2009. Foliar application of calcium and magnesium improves growth, yield, and

- essential oil yield of oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*). Ind. Crops Prod. 29: 599–608.
- Esetlilı B. Ç., Çobanoğlu Ö., Tepecik M., Öztürk B. and Anaç D. 2015. Yield, essential nutrients and essential oils of peppermint (*Mentha x piperita* L.) grown under organic farming conditions. J. Agric. Fac. Uludag Univ. 29: 29–36.
- Fiorini C., Fouraste I., David B. and Bessiere J. M. 1997. Composition of the flower, leaf and stem essential oils from *Laurus nobilis* L. 12: 1996–1998.
- Fu Y., Zu Y., Chen L., Shi X., Wang Z., Sun S. and Efferth T. 2007. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. Phyther. Res. 21: 989–994.
- Gil A., Ghersa C. M. and Leicach S. 2000. Essential oil yield and composition of *Tagetes minuta* accessions from Argentina. Biochem. Syst. Ecol. 28: 261–274.
- Kintzios S. E. 2002. Introduction: Profile of the multifaceted prince of the herbs. En: Oregano: The genera *Origanum* and *Lippia*. Kintzios, S. E. (ed.). Taylor & Francis, London, UK, pp. 3–8.
- Kong J.-O., Lee S.-M., Moon Y.-S., Lee S.-G. and Ahn Y.-J. 2006. Nematicidal activity of plant essential oils against *Bursaphelenchus xylophilus* (nematoda: *Aphelenchoididae*). J. Asia. Pac. Entomol. 9: 173–178.
- Kulicic T., Radonic A., Katalinic V. and Milos M. 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. Food Chem. 85: 633–640.
- Martins M. D. R., Arantes S., Candeias F., Tinoco M. T. and Cruz-Morais J. 2014. Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. J. Ethnopharmacol. 151: 485–492.
- Mizrahi I., Juarez M. A., Bandoni A. L. and Udaondo V. 1991. Essential oil of *Rosmarinus officinalis* growing in Argentina. J. Essent. Oil Res. 3: 11–15.
- Ojeda-Sana A. M., van Baren C. M., Elechosa M. a., Juárez M. a. and Moreno S. 2013. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. Food Control 31: 189–195.
- Porte A., Godoy R. L. de O., Lopes D., Koketsu M., Gonçalves S. L. and Torquillo H. S. 2000. Essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) from Rio de Janeiro, Brazil. J. Essent. Oil Res. 12: 577–580.
- Rohloff J., Dragland S., Mordal R. and Iversen T. J. 2005. Effect of harvest time and drying method on biomass production, essential oil yield and quality of peppermint (*Mentha × piperita* L.). J. Agric. Food Chem. 53: 4143–4148.
- Rossini C., Menéndez P., Dellacassa E. and Moyna P. 1996. Essential oils from leaves of *Schinus molle* and *S. lentiscifolius* of Uruguayan origin. J. Essent. Oil Res. 8: 71–73.
- Saha S., Walia S., Kundu A., Kumar B. and Joshi D. 2012. Antifungal acetylinic thiophenes from *Tagetes minuta*: Potential biopesticide. J. Appl. Bot. Food Qual. 85: 207–211.
- Santos A. C. A. dos, Rossato M., Agostini F., Serafini L. A., Santos P. L. dos, Molon R., Dellacassa E. and Moyna P. 2009. Chemical composition of the essential oils from leaves and fruits of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi from southern Brazil. J. Essent. Oil Res. 21: 16–25.
- Tankeu S. Y., Vermaak I., Viljoen A. M., Sandasi M. and Kamatou G. P. P. 2013. Essential oil variation of *Tagetes minuta* in South Africa – A chemometric approach. Biochem. Syst. Ecol. 51: 320–327.
- Verma R., Rahman L., Verma E., Chauhan A., Yadav A. and Singh A. 2010. Essential oil

composition of menthol mint (*Mentha arvensis* L.) and peppermint (*Mentha piperita* L.) cultivars at different stages of plant growth from Kumaon region of western Himalaya. Open Access J. Med. Aromat. Plants 1: 13–18.

Zheljazkov V. D. and Astatkie T. 2012. Distillation waste water can modify peppermint (*Mentha* × *piperita* L.) oil composition. Ind. Crop. Prod. 36: 420–426.

## CAPÍTULO 5

# ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y MECANISMOS DE ACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES CONTRA *Aspergillus flavus* y *Penicillium spp.*

## INTRODUCCIÓN

Los AEs poseen en la actualidad un amplio rango de aplicaciones. La mayoría de ellos son utilizados tradicionalmente como fragancias en perfumería y como saborizantes en la industria alimenticia (Kalemba y Kunicka, 2003). Recientemente, estos compuestos naturales han recibido interés debido a sus propiedades insecticidas, antifúngicas, antimicrobianas y antioxidantes (López *et al.*, 2014; Asensio, 2013; Bassolé y Juliani, 2012; Gonçalves *et al.*, 2012). En consecuencia, pesticidas basados en AEs se presentan como una alternativa natural para la protección de los cultivos (Kalemba y Kunicka, 2003).

Numerosos AEs han sido estudiados en busca de actividad antifúngica contra patógenos fúngicos de interés agropecuario. En trabajos previos, la utilización de AEs fue indicada como eficiente para el control de *Colletotrichum truncatum* y *Sclerotium cepivorum* Berk (Camiletti *et al.*, 2016; Gadban, 2011; Lucini *et al.*, 2006). Por otro lado, se ha demostrado que los géneros fúngicos *Aspergillus* y *Penicillium* poseen sensibilidad frente a estos compuestos naturales (Avila-Sosa *et al.*, 2012; Kocić-Tanackov *et al.*, 2012; Bluma *et al.*, 2008; Kalemba y Kunicka, 2003). Los AEs que presentan una buena actividad antifúngica contra *A. flavus* no solo afectan su crecimiento, sino que también reducen la cantidad de aflatoxinas sintetizada (Bluma *et al.*, 2008). La susceptibilidad de un microorganismo depende de sí mismo y de las propiedades del AE (Kalemba y Kunicka, 2003). Además, la capacidad antifúngica de los AEs se encuentra asociada a sus compuestos mayoritarios, presentes en concentraciones que varían del 20 al 70% (Bakkali *et al.*, 2008). Los monoterpenos con grupos funcionales oxigenados han sido caracterizados por su fuerte actividad antifúngica (Abbaszadeh *et al.*, 2014; Dambolena *et al.*, 2008)

Para evaluar la actividad antifúngica de un compuesto existen diversas metodologías que pueden ser clasificadas en dos grupos: convencionales o no convencionales. Evaluar la actividad antifúngica de los AEs presenta cierta dificultad debido a su complejidad, volatilidad e insolubilidad en agua. Dentro de las técnicas convencionales se encuentra la macrodilución de los AEs en medio de cultivo (Kalemba y Kunicka, 2003). Inicialmente el medio utilizado era solidificado mediante el agregado de agar, pero posteriormente los caldos de cultivo tomaron relevancia debido a la mejor dispersión del AE (Gadban, 2011; Lucini, 2004; Kalemba y Kunicka, 2003). En esta metodología, el crecimiento del hongo se evalúa visualmente y la concentración fungicida mínima se define como la mínima concentración de AE que inhibe completamente el crecimiento fúngico (Kalemba y Kunicka, 2003). Posteriormente, las técnicas de microdilución surgieron como una alternativa de gran aceptación entre los investigadores (Abbaszadeh *et al.*, 2014; Rashed *et al.*, 2014; Asensio, 2013; Ghasemian *et al.*, 2012; Tangarife-Castaño *et al.*, 2011). Las principales ventajas son las significantes reducciones en la cantidad de compuesto natural requerido para los ensayos y la simplicidad para realizar experimentos a gran escala (Hadacek y Greger, 2000). Una de estas técnicas se basa en la utilización del indicador redox 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT), cuya forma reducida puede ser medida espectrofotométricamente. El MTT es reducido por una célula viva, metabólicamente activa y es independiente de la proliferación celular (Hadacek y Greger, 2000; Meletiadis *et al.*, 2000). Esta metodología ha sido utilizada para hongos filamentosos evidenciando una alta correlación con los métodos basados en la macrodilución (Meletiadis *et al.*, 2000).

Existen diversos mecanismos de acción descritos para los AEs, dentro de los cuales se encuentra la coagulación del citoplasma y el daño en lípidos o proteínas. Si la membrana celular se encuentra afectada se produce una salida de las macromoléculas presentes en el citoplasma, provocando la lisis celular (Bakkali *et al.*, 2008). El modo de acción de los agentes antimicrobianos depende de la disposición de la membrana celular que posea el microorganismo (Kalemba y Kunicka, 2003). Algunos terpenos con actividad antifúngica actúan como surfactantes a nivel de las membranas celulares, aumentando la fluidez y permeabilidad de las mismas. Sin embargo, este efecto varía de acuerdo al terpeno y al patógeno fúngico utilizado

(Lucini, 2004). Otros AEs afectan la mitocondria de las células y desencadenan una marcada oxidación de los lípidos, entre otras moléculas (Bakkali *et al.*, 2008).

Los objetivos del capítulo fueron evaluar la actividad antifúngica de los AEs contra *Aspergillus flavus* y *Penicillium* spp. y estudiar su efecto oxidante como posible mecanismo de acción.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ACEITES ESENCIALES

Se utilizaron los aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación de acuerdo al procedimiento descrito en el capítulo IV.

### AISLADOS FÚNGICOS

Se utilizaron los siguientes aislados fúngicos:

- (a) *Aspergillus flavus* AS00001 aislado de espigas de maíz.
- (b) *Aspergillus flavus* CCC116-83 provisto por el Centro de Referencia Micológica de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (Universidad Nacional de Rosario).
- (c) *Penicillium minioluteum* AP003 aislado de espigas de maíz.
- (d) *Penicillium oxalicum* 083296 provisto por el departamento de Micología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas.

### SOLUCIONES

- Solución salina/tween 80

NaCl .....0,85 g  
Tween 80.....0,50 mL  
Agua destilada c.s.p.....100 mL

- Solución de MTT

Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide\*...5 mg  
Agua destilada estéril c.s.p.....1 mL

\*Sigma Aldrich M2128

- Solución de tiocianato de hierro (II)

BaCl<sub>2</sub> 32,7 mM: FeSO<sub>4</sub> 36 mM (1:1)...0,5 mL  
NH<sub>4</sub>SCN 3,94 M.....0,5 mL

Metanol:cloroformo (1:1).....49 mL

## **MEDIOS DE CULTIVO**

- Papa glucosado agar (PDA)

Papa glucosado agar.....39 g  
Agua destilada c.s.p.....1000 mL

- Lixiviado de papa y glucosa (LP)

Infusión de papa a partir de 200g.....100 mL  
Glucosa.....20 g  
Agua destilada c.s.p.....1000 mL  
pH: 4,5.

- Medio RPMI-1640 (RPMI)

Medio RPMI\*.....2 g  
Agua destilada c.s.p.....100 mL

\*Sigma Aldrich R8755

## **PROPAGACIÓN DE CEPAS Y PREPARACIÓN DEL INÓCULO FÚNGICO**

Placas de Petri con medio de cultivo PDA fueron inoculadas centralmente con 8  $\mu$ L de una solución de esporas ( $1 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ). Los hongos fueron incubados en cámara de cultivo durante 10 días a  $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  en oscuridad.

## **ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA MEDIANTE MACRODILUCIÓN**

Placas de Petri estériles, de 9 cm de diámetro, fueron preparadas con 20 mL de medio de cultivo LP previamente esterilizado. Los AE fueron diluidos en etanol y agregados al medio de cultivo hasta alcanzar las concentraciones finales deseadas (Lucini *et al.*, 2006). La concentración final de etanol nunca fue superior al 1%, mientras que el volumen de AE y etanol

agregado nunca superó los 0,2 mL. Las placas fueron inoculadas con un disco de agar de 5 mm de diámetro colectado de la periferia de la colonia fúngica. Se incluyeron controles sin agregado de AE como así también con el agregado de etanol para confirmar la ausencia de efecto inhibitorio del mismo sobre el crecimiento del hongo. Los tratamientos fueron incubados en cámara de cultivo a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 10 días en oscuridad (Lucini, 2004). Las cepas *A. flavus* CCC116-83 y *P. oxalicum* fueron incluidas junto a las aisladas en maíz, como cepas de referencia.

Una vez concluido el período de incubación, se midió el diámetro de crecimiento del micelio con una regla en dos direcciones perpendiculares y se obtuvo el promedio de ambos. La actividad antifúngica para las diferentes concentraciones de los AE probados se expresó en términos de porcentaje de inhibición de crecimiento del micelio (PIC) de acuerdo a la siguiente fórmula (Kordali *et al.*, 2008):

$$\text{PIC} = [ (C-T)/C ] \times 100 \quad (\text{ec. 5.1})$$

donde *C* corresponde a la media ( $n=3$ ) calculada para el diámetro del control (mm), y *T* indica la media ( $n=3$ ) obtenida para el diámetro del tratamiento (mm).

## **ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA MEDIANTE MICRODILUCIÓN**

La actividad antifúngica de los AE contra *A. flavus* AS00001 y *P. minioluteum* AP003 fue simultáneamente evaluada mediante técnica colorimétrica en microdilución. Este ensayo utiliza el indicador redox MTT de color amarillo pálido en estado oxidado, pero que presenta un color púrpura oscuro en su forma reducida (MTT-formazán). Esta reacción es llevada a cabo por la acción de las deshidrogenasas mitocondriales activas en las células vivas (Kuhn *et al.*, 2003). La técnica fue llevada a cabo según la metodología propuesta por Meletiadis *et al.* (2000), con algunas modificaciones. Para este ensayo, los AEs fueron disueltos en dimetil sulfóxido (DMSO). Los volúmenes correspondientes para lograr concentraciones finales deseadas fueron transferidos a tubos Eppendorf con base plana de 2 mL de capacidad, utilizando una jeringa de

vidrio (HAMILTON® 8030) con rango de trabajo de 1 a 10 µL. El medio de cultivo RPMI fue agregado a los tubos hasta lograr un volumen final de 490 µL. Como inóculo, se agregó 10 µL de una suspensión de esporas ( $1 \times 10^6$  conidios mL<sup>-1</sup>) alcanzando un volumen final de trabajo de 500 µL. Se incluyeron tratamientos sin el agregado de aceite esencial como control. Los tubos fueron incubados a  $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  en cámara de cultivo por 48 horas. Posteriormente, 25 µL de solución MTT fueron agregados a cada tubo y se continuó la incubación por 24 horas. Una vez terminada la incubación, los tubos fueron centrifugados a 13.000 rpm por 5 min en una MiniSpin (Eppendorf® 22331) para obtener el MTT-formazán como precipitado. El colorante fue liberado del interior de las células y disuelto mediante agregado de 500 µL de DMSO, seguido por agitación en vortex (VELP®). Los tubos fueron nuevamente centrifugados, como se describió previamente, para eliminar los restos de células. Se midió la absorbancia a 550 nm de las soluciones en un espectrofotómetro Hewlett Packard™ HP 8452 A (Palo Alto, CA, USA). Los resultados de los tratamientos y controles fueron afectados por la absorbancia del blanco, que consistió en tubos no inoculados. El PIC, que correspondió a la cantidad de MTT no convertido en MTT-formazán, se calculó de acuerdo a la ecuación:

$$\text{PIC} = [ (AC-AT)/AC ] \times 100 \quad (\text{ec. 5.2})$$

dónde *AC* corresponde a la media ( $n=6$ ) de la absorbancia para el control, mientras que *AT* indica la media ( $n=6$ ) obtenida para la absorbancia de los tratamientos.

## **DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIONES FUNGICIDAS E INHIBITORIAS MÍNIMAS**

Los AEs fueron evaluados en concentraciones escalonadas cada 100 ppm. La concentración inhibitoria mínima (CIM) fue establecida como la mínima concentración de aceite esencial con el cual se logra un PIC igual al 50%. La concentración fungicida mínima (CFM) fue definida como la concentración más baja de AE que permite alcanzar un PIC igual o superior al 90% (Kalemba y Kunicka, 2003; Meletiadis *et al.*, 2000). Estos criterios fueron fijados para ambas metodologías.

## **EFEECTO OXIDATIVO DE LOS ACEITES ESENCIALES SOBRE LÍPIDOS DE MEMBRANA**

Se evaluó el efecto oxidativo de los AEs sobre los lípidos de membrana como posible mecanismo de acción, siguiendo la metodología propuesta por Dalsgaard *et al.* (2010). Placas de Petri fueron preparadas con medio de cultivo líquido LP e inoculadas como se describió previamente en este capítulo. Las placas se incubaron a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 7 días en oscuridad. Los AEs fueron diluidos en etanol y agregados al medio de cultivo en sus respectivas CFM. Placas sin el agregado de AE fueron utilizadas como tratamiento control. Las placas fueron agitadas levemente e incubadas nuevamente por 72 horas. Al final del período de incubación, el micelio obtenido fue pesado y mezclado con 5 mL de agua destilada en un homogeneizador (SMT PA92) por 45 s. Para extraer los lípidos, se agregaron 10 mL de metanol:cloroformo (1:1). La mezcla obtenida fue agitada y filtrada a través de papel de filtro estándar para separar los restos de micelio. La solución fue posteriormente centrifugada a 10.000 g durante 10 min y 1 mL de la fase de cloroformo se transfirió a tubo de ensayos para ser mezclados con 1 mL de tiocianato de hierro (II). Esta solución fue preparada en acordancia con el estándar IDF, 74A:1991, modificado por Østdal *et al.* (2000). Finalmente, se midió la absorbancia de las soluciones a 500 nm en un espectrofotómetro Hewlett Packard<sup>TM</sup> HP8452A (Palo Alto, CA, USA). Los valores de hidroperóxidos (VHP) fueron determinados en base a una curva de calibración calculada a partir de concentración 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 y 20,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de hierro (III).

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados fueron analizados usando el software estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2014). Los experimentos de hidroperóxidos y actividad antifúngica en macrodilución se realizaron en dos repeticiones con tres replicas cada una. Los ensayos de microdilución se realizaron con cinco réplicas y se repitieron dos veces. Los datos para cada prueba fueron combinados después de corroborar la homogeneidad de varianzas del error experimental mediante el "F test". Análisis de la varianza (ANOVA) fue utilizado para calcular las medias para cada tratamiento. Diferencias significativas entre los tratamientos fueron detectadas

mediante el test de DGC ( $\alpha = 0.05$ ). Los datos de VHP fueron transformados a raíz cuadrada para disminuir la varianza. La mínima concentración de AE que inhibió el crecimiento del hongo en un 50% (CIM) fue determinada utilizando regresión lineal a partir de concentraciones con efecto antifúngico (Marei *et al.*, 2012). La correlación entre las metodologías empleadas para evaluar actividad antifúngica fue resuelta mediante análisis de correlación de Parsons. Grupos de AEs con similar comportamiento fueron obtenidos mediante análisis de conglomerados (AC). La similitud de los tratamientos fue calculada en base a distancia Euclídea y los grupos con similares características fueron obtenidas mediante el método "average linkage". Los VHP se compararon entre géneros fúngicos y entre aislados de un mismo género mediante Prueba T de Student.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS ACEITES ESENCIALES

La actividad antifúngica de los AEs contra *A. flavus* y *Penicillium* spp. fue evaluada de acuerdo a su CFM y CIM (Tablas 5.1 y 5.2).

**Orégano.** Los AEs de orégano presentaron la mejor actividad antifúngica, con diferencias entre las variedades. Para OCor y OMen, una concentración de 800  $\mu\text{L L}^{-1}$  fue suficiente para inhibir completamente el crecimiento de los hongos estudiados (Figura 5.1). Las CIMs calculadas para estos AEs variaron entre 200 y 650  $\mu\text{L L}^{-1}$ . De acuerdo a los resultados obtenidos para las CFM y CIM, no se encontró un AE de orégano que posea una mejor actividad antifúngica relativa contra todos los patógenos fúngicos.

Numerosos estudios han demostrado el efecto inhibitorio de AEs de orégano sobre el crecimiento de microorganismos contaminantes de alimentos (Asensio, 2013; Kocić-Tanackov *et al.*, 2012; Lambert *et al.*, 2001). Estos aceites esenciales fueron reportados como eficientes para el control de otras especies del género *Aspergillus* (*A. niger*, *A. carbonarius* y *A. wentii*), con CFMs cercanas a los 2000  $\mu\text{L L}^{-1}$  (Kocić-Tanackov *et al.*, 2012). En Argentina, estudios previos sobre el efecto de AE de orégano contra *A. flavus* indicaron un PIC del 100% para una concentración de 1000  $\mu\text{L L}^{-1}$  (Bluma *et al.*, 2008). Contrariamente, otros estudios reportaron una CFM menor (200  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) para este AE contra la misma especie fúngica (Viuda-Martos *et al.*, 2007). En cuanto a *Penicillium*, existe bibliografía que indica que el AE de orégano afecta el crecimiento radial y producción de esporas en especies de este género fúngico (Daferera *et al.*, 2000; Akgul y Kivanc, 1988). En estos estudios, se indicó que una concentración de 250  $\mu\text{L L}^{-1}$  resulta suficiente para inhibir completamente el crecimiento de *P. digitatum* (Daferera *et al.*, 2000).

Diferencias entre variedades, como así también entre aceites de diferentes procedencias, pueden ser explicadas debido a diferencias en su composición química. La mayoría de los investigadores concuerdan que los monoterpenos timol y carvacrol son los compuestos asociados a la actividad antifúngica del AE de orégano (Viuda-Martos *et al.*, 2008; Daferera *et*

*al.*, 2000; Akgul y Kivanc, 1988). Estos compuestos fenólicos han sido reconocidos como compuestos activos eficientes contra *A. flavus* y *Penicillium* spp. (Abbaszadeh *et al.*, 2014). Sin embargo, se ha reportado que AEs de orégano con mayor concentración de timol en su composición poseen mejor actividad antifúngica (Kocić-Tanackov *et al.*, 2012; Viuda-Martos *et al.*, 2008). Debido a esto, la mayoría de los autores concuerdan en que el timol posee una mejor eficiencia que carvacrol para el control de patógenos fúngicos (Abbaszadeh *et al.*, 2014; Pérez-Alfonso *et al.*, 2012; Akgul y Kivanc, 1988). En este estudio, OCor presentó la mayor cantidad de timol en su composición (Capítulo 4) pero esta diferencia no se tradujo en una mejor actividad antifúngica respecto OCom y OMen.

El efecto de los terpenos sobre el crecimiento de microorganismos ha sido evaluado a fin de identificar los componentes responsables de una determinada actividad biológica. Sin embargo, estos investigadores concluyeron que la efectividad de los componentes individualmente es menor a la de los AEs, indicando un posible efecto sinérgico entre todos los constituyentes (Abbaszadeh *et al.*, 2014; Mishra *et al.*, 2013; Bassolé y Juliani, 2012).

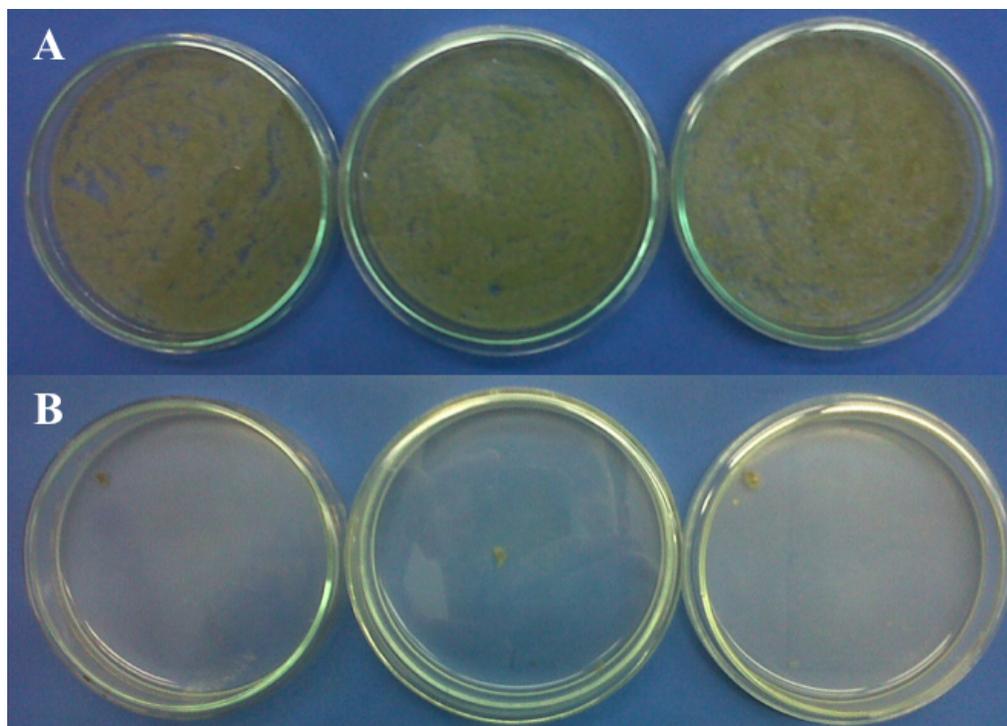


Figura 5.1. Actividad antifúngica del aceite esencial de Orégano Cordobés (OCor) contra *A. flavus* AS0001. A: Control; B: OCor 800  $\mu\text{l L}^{-1}$ .

**Mentas.** Ambos AEs presentaron una moderada actividad antifúngica y resultaron efectivos para el control de los hongos estudiados (Tabla 5.1). En general, Mi demostró una mejor actividad antifúngica que Mp (CFMs menores). Esto puede estar relacionado a su mayor contenido de mentol (alcohol secundario) en su composición química (Capítulo 4). Este terpeno posee numerosas propiedades biológicas y es indicado como el responsable la actividad antifúngica de los AEs de menta (Kamatou *et al.*, 2013). El mentol ha sido resaltado por su eficiencia para inhibir completamente el crecimiento de *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. y *Rhizophus* spp. (Abbaszadeh *et al.*, 2014). Asimismo, la mentona (una cetona) también ha sido destacada por su actividad antifúngica, aunque menor a la del mentol (Dambolena *et al.*, 2008). Este terpeno se presentó con mayor proporción en Mp (Capítulo 4). Varios investigadores (Dambolena *et al.*, 2008; Lucini, 2004; Bassole *et al.*, 2003; Kurita y Koike, 1982) han descripto un orden de mayor a menor actividad antifúngica de los terpenos asociada a grupos funcionales, siendo: fenoles, alcoholes, cetonas/aldehídos, ésteres e hidrocarburos. La menor eficiencia de los AEs de menta respecto a los AEs de orégano puede ser explicada debido a que el timol posee una fuerte actividad antifúngica (CFMs menores) debido a su naturaleza fenólica (Marei *et al.*, 2012; Dambolena *et al.*, 2008; Lucini *et al.*, 2006). Por otro lado, resulta importante destacar que la actividad antifúngica de estos compuestos mayoritarios también se encuentre modulada por los compuestos en menor cantidad (Bakkali *et al.*, 2008).

**Suico.** De acuerdo a los resultados obtenidos, Su fue eficiente para el control de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* spp. con una actividad antifúngica similar a la de las mentas (Tabla 5.1). Este AE no afectó el crecimiento de los hongos en concentraciones por debajo de los 1500  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Además, se observó una marcada diferencia entre las CFM para los aislados de *A. flavus* (2300 y 3800  $\mu\text{L L}^{-1}$  para CCC116-83 y AS00001, respectivamente), como así también para las especies del género *Penicillium* (*P. oxalicum* = 1700  $\mu\text{L L}^{-1}$ ; *P. minioluteum* = 2500  $\mu\text{L L}^{-1}$ ).

El AE de Su ha sido acreditado con numerosas propiedades, incluyendo actividad antibacteriana e insecticida (Cestari *et al.*, 2004; Senatore *et al.*, 2004). En cuanto a su actividad

antifúngica, Bii *et al.* (2000) evaluaron este AE en una concentración de 1000  $\mu\text{L L}^{-1}$  contra ocho géneros fúngicos, logrando PIC entre 5 y 30%. Otros autores reportaron la actividad antifúngica de Su argentino contra los géneros fúngicos *Sclerotium* y *Colletorichum* con CFMs entre 3000 y 5000  $\mu\text{L L}^{-1}$  (Zygadlo *et al.*, 1994). Dentro de su composición química, el limoneno ha sido caracterizado por su fuerte actividad antifúngica y es considerado uno de los monoterpenos más eficientes (Marei *et al.*, 2012; Dambolena *et al.*, 2008). Hasta el momento, los compuestos mayoritarios en la composición química de AE de Su no han sido evaluados individualmente por su actividad antifúngica.

**Laurel.** Otro AE efectivo para el control de los hongos estudiados fue La, con CFMs máximas de 3200  $\mu\text{L L}^{-1}$ . El eucaliptol posee marcada actividad antifúngica y se representa como el componente con mayor proporción en La. Este monoterpeno fue indicado como eficiente para el control de *S. cepivorum* en una concentración de 1200  $\mu\text{L L}^{-1}$  (Lucini *et al.*, 2006). Por otro lado, el eucaliptol fue indicado como eficiente para el control de *P. digitatum* y *A. niger*, como así también para *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp. (Marei *et al.*, 2012). Este AE ha sido probado con éxito para la elaboración de biofilms con actividad antifúngica contra especies del género *Candida* (Peixoto *et al.*, 2017). Además, La fue reportado como una alternativa eficiente para el control de *S. cepivorum* en cultivos de ajo en Argentina (Camiletti *et al.*, 2016). El eugenol, presente en este AE a baja concentración (0,7%), posee una marcada actividad antifúngica sobre *A. flavus* (Mishra *et al.*, 2013). Su poder antifúngico fue determinado como diez veces superior al del eucaliptol, según indicaron Mishra *et al.* (2013).

**Romero y Aguaribay.** Estos AEs no afectaron el crecimiento de los hongos estudiados en las concentraciones evaluadas. EL eucaliptol estuvo presente en el AE de Ro pero con una concentración menor al AE de La (24,3 vs 42,2%). Estudios previos indicaron una MFC de 10.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  contra *A. niger* para un aceite esencial de Ro con un porcentaje similar de eucaliptol en su composición. (Fu *et al.*, 2007). Otros autores señalaron que AE de Ro inhibe completamente el crecimiento de *A. parasiticus* a una concentración de 3000  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Sin embargo, este AE tuvo una composición química diferente, con limoneno como componente principal (Rasooli *et al.*, 2008). El AE de Ro también tuvo otros dos compuestos con demostrada

actividad antifúngica, mirceno y camfor, pero que poseen una menor actividad antifúngica relativa contra *Aspergillus* y *Penicillium* (Marei *et al.*, 2012). El limoneno, uno de los principales componentes en Ag, demostró actividad antifúngica contra *A. flavus* (Singh *et al.*, 2010). Por lo tanto, podría esperarse que el AE de Ag cultivado en Argentina posea actividad antifúngica, pero a una concentración superior a las evaluadas. La actividad antifúngica de Ag de similar composición química contra *Aspergillus*, *Fusarium* y *Rhizophus*, fue reportada en estudios previos con CFMs superiores a 10000  $\mu\text{L L}^{-1}$  (Martins *et al.*, 2014).

Tabla 5.1. Concentración fungicida mínima ( $\mu\text{L L}^{-1}$ ) de los aceites esenciales contra *A. flavus* y *Penicillium* spp.

Hongos	Aceites esenciales								
	OCor <sup>a</sup>	OMen <sup>a</sup>	OCom <sup>a</sup>	Su <sup>b</sup>	Mi <sup>a</sup>	Mp <sup>a</sup>	La <sup>a</sup>	Ag <sup>a</sup>	Ro <sup>a</sup>
<i>A. flavus</i> (CCC116-83)	600	800	1000	2300	1800	3000	3200	>5500	>5000
<i>A. flavus</i> (AS00001)	800	700	1000	3800	3000	3200	3200	>5500	>5000
<i>P. oxalicum</i> (083296)	500	600	700	1700	1800	2300	2400	>5500	>5000
<i>P. minioluteum</i> (AP003)	600	300	600	2500	2300	2300	3200	>5500	>5000

<sup>a</sup> OCor (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*), OCom (*Origanum vulgare* L. ssp. *Vulgare*), OMen (*Origanum x majoricum*), Mi (*Mentha x piperita* L. var. *Vulgaris Sole*), Mp (*Mentha x piperita*), Su (*Tagetes minuta* L.), La (*Laurus nobilis* L.), Ro (*Rosmarinus officinalis*) and Ag (*Schinus molle*).

Tabla 5.2. Regresiones lineales y valores de concentración inhibitoria mínima ( $\mu\text{L L}^{-1}$ ) de los aceites esenciales contra *A. flavus* y *Penicillium* spp.

AE <sup>b</sup>	Hongos															
	<i>A. flavus</i> (CCC116-83)				<i>A. flavus</i> (AS00001)				<i>P. oxalicum</i> (083296)				<i>P. minioluteum</i> (AP003)			
	CIM <sup>a</sup>	$\beta_0^a$	$\beta_1^a$	R <sup>2a</sup>	CIM <sup>a</sup>	$\beta_0^a$	$\beta_1^a$	R <sup>2a</sup>	CIM <sup>a</sup>	$\beta_0^a$	$\beta_1^a$	R <sup>2a</sup>	CIM <sup>a</sup>	$\beta_0^a$	$\beta_1^a$	R <sup>2a</sup>
OCor <sup>b</sup>	450	-75,0	0,28	0,91	650	-189,0	0,37	0,90	350	-6,37	0,16	0,72	400	-54,7	0,25	0,76
OMen <sup>b</sup>	450	2,0	0,10	0,94	550	-96,5	0,26	0,83	450	-11,5	0,14	0,89	200	-16,8	0,36	0,89
OCom <sup>b</sup>	550	13,6	0,07	0,62	650	-52,91	0,15	0,89	400	-2,64	0,13	0,89	500	-8,38	0,12	0,73
Su <sup>b</sup>	2150	-52,1	0,05	0,77	3700	-1280,3	0,36	0,60	1600	-652,7	0,44	0,92	2400	-365,9	0,18	0,70
Mi <sup>b</sup>	1450	-15,2	0,04	0,61	2800	-136,5	0,07	0,73	1300	-13,3	0,05	0,7	2200	-433,3	0,22	0,60
Mp <sup>b</sup>	2800	-551,5	0,21	0,92	2850	-286,6	0,12	0,89	2050	-148,6	0,10	0,68	2050	-379,7	0,21	0,92
La <sup>b</sup>	2700	-171,7	0,08	0,84	2700	-226,6	0,10	0,80	2100	-304,9	0,17	0,94	2800	-280,1	0,12	0,90

<sup>a</sup> CIM (Concentración Inhibitoria Mínima), Regresión lineal:  $Y = \beta_0 + \beta_1 X$ ; dónde  $Y$  = variable dependiente (CIM);  $\beta_0$  = constante que es igual al valor de  $Y$  cuando  $X=0$ ;  $\beta_1$  = coeficientes de  $X$ ;  $X$  = variable independiente (porcentaje de inhibición del crecimiento).

<sup>b</sup> OCor (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*), OCom (*Origanum vulgare* ssp. *Vulgare*), OMen (*Origanum x majoricum*), Mi (*Mentha x piperita* var. *Vulgaris Sole*), Mp (*Mentha x piperita*), Su (*Tagetes minuta*) y La (*Laurus nobilis*).

## COMPARACIÓN ENTRE LAS METODOLOGÍAS APLICADAS PARA EVALUAR ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Se determinó el PIC para las CFM de AEs mediante técnica de microdilución y se compararon los resultados obtenidos (Tabla 5.3). No se encontraron diferencias significativas entre los métodos para las CFM probadas, a excepción de Mp contra *A. flavus*, donde se necesitaron 3400  $\mu\text{L L}^{-1}$  del AE para lograr una inhibición del crecimiento superior al 90%. Además, se evaluaron otras cuatro concentraciones de cada AE (20, 40, 60 y 80% de su respectiva CFM) y se calculó la correlación entre las metodologías aplicadas. Ambas técnicas demostraron una alta correlación ( $r = 0.88$ ;  $n=210$ ;  $P < 0.0001$ ) entre los resultados obtenidos.

La utilización de la sal MTT en técnicas de microdilución ha sido investigada como una alternativa para evaluar la susceptibilidad de hongos filamentosos frente a posibles agentes antifúngicos (Ghasemian *et al.*, 2012; Meletiadis *et al.*, 2000; Jahn *et al.*, 1995; Jahn *et al.*, 1996). Clancy y Nguyen (1997) emplearon esta técnica para determinar la CFM del fungicida sintético fluconazole contra 101 especies de los géneros *Candida* y *Cryptococcus*. Estos resultados se compararon con aquellos obtenidos por macrodilución, observando un 94% de similitud entre las CFMs (Clancy y Nguyen, 1997). Otros autores (Meletiadis *et al.*, 2000), determinaron las CFMs para otros fungicidas sintéticos contra *Aspergillus* spp y *Fusarium* spp, indicando que el porcentaje de similitud entre las dos técnicas analizadas varió con el género fúngico (97 vs 87%, respectivamente). El MTT se basa en la actividad metabólica del micelio y no directamente en el crecimiento del mismo. Por lo tanto, dosis de agentes antifúngicos inferiores a la CFM pueden afectar el metabolismo celular provocando una menor reducción del MTT, incluso cuando la biomasa no es afectada (Meletiadis *et al.*, 2000).

Tabla 5.3. Porcentajes de inhibición del crecimiento para las concentraciones fungicidas mínimas ( $\mu\text{L L}^{-1}$ ) de aceites esenciales contra *A. flavus* y *P. minioluteum* de acuerdo a las dos metodologías aplicadas.

AE <sup>y</sup>	<i>A. flavus</i> (AS0001)			<i>P. minioluteum</i> (AP003)		
	Concentración <sup>z</sup>	Macro <sup>z</sup>	Micro <sup>z</sup>	Concentración <sup>z</sup>	Macro <sup>z</sup>	Micro <sup>z</sup>
OCor	800	100,0 a	95,5 a	600	100,0 a	93,4 a
OMen	700	100,0 a	95,8 a	300	100,0 a	95,8 a
OCom	1000	100,0 a	92,0 a	600	100,0 a	95,6 a
La	3200	100,0 a	94,6 a	3200	100,0 a	91,1 a
Mi	3000	100,0 a	96,7 a	2300	100,0 a	97,2 a
Mp	3200	100,0 a	85,2 b	2300	100,0 a	99,1 a
Su	3800	100,0 a	99,8 a	2500	100,0 a	92,4 a

<sup>y</sup> AE (aceite esencial), OMen (*Origanum x majoricum*), OCor (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*), OCom (*Origanum vulgare* ssp. *Vulgare*), La (*Laurus nobilis*), Mi (*Mentha x piperita* var. *Vulgaris Sole*), Mp (*Mentha x piperita*) y Su (*Tagetes minuta*).

<sup>z</sup> Concentración: refiere a la concentración fungicida mínima determinada por técnica convencional de macrodilución; Macro: resultado obtenido mediante técnica de macrodilución; Micro: resultados obtenidos mediante técnica colorimétrica de microdilución. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al Test de DGC ( $P < 0.05$ ).

## EFFECTO DE LOS ACEITES ESENCIALES SOBRE LÍPIDOS DE MEMBRANA

Los VHP del micelio de los hongos después de 72 hs de incubación con las CFMs de cada AE se presentan en la Tabla 5.4 y en las Figuras 5.2 y 5.3. Los valores obtenidos dependieron del género fúngico estudiado ( $P < 0.001$ ), como así también de los AE estudiados ( $P < 0.001$ ). En cuanto a la especie *A. flavus*, las cepas mostraron un comportamiento similar con diferencias no significativas entre ambas ( $P = 0,9334$ ). Los lípidos de membrana de estas cepas resultaron severamente oxidados por Su, mostrando los VHP más altos. Mi, Mp, y La presentaron una moderada actividad oxidante sobre esta especie fúngica. En ambos aislados, Mp presento VHPs significativamente más altos que Mi. Los AEs de orégano mostraron VHP similares al control, al igual que Ro y Ag que no poseen actividad antifúngica en concentraciones debajo de  $5000 \mu\text{L L}^{-1}$ .

En cuanto a las especies del género *Penicillium*, los VHP obtenidos para los AE estuvieron influenciados por la especie fúngica ( $P = 0,021$ ). En *P. oxalicum*, el VHP más alto fue para Su mientras que Mi, Mp y La presentaron moderada actividad oxidante. En cuanto a *P.*

*minioluteum*, La presento el VHP más alto, seguido por Su. Sorprendentemente, el AE de Ro demostró una significativa oxidación de los lípidos. Los VHP obtenidos para Mi y Mp no presentaron diferencias significativas respecto del control. Otros investigadores (Kalemba y Kunicka, 2003) señalaron que el efecto antimicrobiano de los AEs es influenciado por la configuración que posee la membrana celular del microorganismo.

En las células eucariotas, la mitocondria produce naturalmente especies de oxígeno reactivo (EORs) tales como el anión superóxido y peróxido de hidrógeno, aunque en baja concentración. En condiciones normales, estos productos reaccionan con el hierro celular para generar productos intermediarios. Una alta concentración de EORs daña fuertemente el ADN mitocondrial y, en consecuencia, inhibe la expresión de las proteínas transportadoras que evitan la acumulación de estas especies. Los AEs tienen la capacidad de penetrar a través de las membrana celular y membranas citoplasmáticas debido a su naturaleza lipofílica. Esto resulta en una permeabilización y desorganización de las mismas, con un daño especial en la membrana mitocondrial. La mitocondria, mediante cambios en el flujo de electrones en la cadena transportadora, genera una alta concentración de EORs que no pueden ser transportados y provocan la oxidación de lípidos de membrana (Bakkali *et al.*, 2008).

Los AEs incluyen compuestos antioxidantes en su composición como terpenoides y compuestos fenólicos. La propiedad antioxidante de los AEs y sus compuestos ha sido ampliamente estudiada y verificada mediante métodos físicos-químicos (Olmedo *et al.*, 2012; Olmedo *et al.*, 2014; Nakatani, 2000; Ruberto y Baratta, 2000). En particular, los compuestos fenólicos han sido sugeridos como conservantes naturales en alimentos debido a su capacidad antioxidante (Asensio, 2013). Sin embargo, algunos compuestos fenólicos de los AEs pueden ser oxidados en contacto con EORs, produciendo radicales fenoxilos muy reactivos que oxidan proteínas y ADN, generando nuevas EORs (Bakkali *et al.*, 2008).

Otros efectos citotóxicos de los AEs han sido estudiados como posibles mecanismos de acción. Algunos monoterpenos constituyentes de AEs fueron reportados por su daño a nivel de membrana celular que provoca una salida de macromoléculas y lisis celular (Bakkali *et al.*, 2008; Lucini, 2004). Otros estudios indicaron que compuestos tales como los alcoholes fenólicos y los

aldehídos detienen la producción de proteínas de membranas o enzimas (Kalemba y Kunicka, 2003). En bacterias, el AE de orégano y sus componentes carvacrol y timol han sido indicados como permeabilizadores de membrana, provocando un agotamiento del ATP (Oussalah *et al.*, 2006; Lambert *et al.*, 2001). Otros estudios señalaron que este mismo AE daña la membrana plasmática, afectando la homeostasis del pH y el equilibrio iónico (Lambert *et al.*, 2001). Investigaciones con bacterias indicaron que algunos AE coagulan el citoplasma, siendo este su mecanismo de acción (Bakkali *et al.*, 2008).

Tabla 5.4. Valores de hidroperóxidos (meq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>) para los lípidos de membrana en los hongos estudiados.

AE <sup>a</sup>	Hongos <sup>b</sup>			
	<i>A. flavus</i> (AS00001)	<i>A. flavus</i> (CCC116-83)	<i>P. minioluteum</i> (AP003)	<i>P. oxalicum</i> (083296)
OMen	0,0286 ± 0,006	0,0180 ± 0,001	0,0257 ± 0,002	0,0465 ± 0,022
OCor	0,0208 ± 0,007	0,0180 ± 0,008	0,0184 ± 0,002	0,0280 ± 0,007
OCom	0,0169 ± 0,002	0,0156 ± 0,001	0,0340 ± 0,032	0,0649 ± 0,006
Su	0,3633 ± 0,001	0,3426 ± 0,021	0,0750 ± 0,036	0,1323 ± 0,006
Mi	0,0489 ± 0,018	0,0848 ± 0,032	0,0255 ± 0,024	0,1029 ± 0,007
Mp	0,1617 ± 0,024	0,1590 ± 0,014	0,0195 ± 0,006	0,0985 ± 0,006
La	0,0795 ± 0,004	0,0688 ± 0,020	0,1139 ± 0,015	0,0973 ± 0,010
Ro	0,0239 ± 0,030	0,0136 ± 0,002	0,0658 ± 0,005	0,0404 ± 0,006
Ag	0,0223 ± 0,012	0,0168 ± 0,002	0,0301 ± 0,007	0,0329 ± 0,006
Control	0,0179 ± 0,011	0,0122 ± 0,006	0,0274 ± 0,003	0,0337 ± 0,004

<sup>a</sup> AE (aceite esencial), OMen (*Origanum x majoricum*), OCor (*Origanum vulgare* spp. *hirtum*), OCom (*Origanum vulgare* spp. *Vulgare*), Su (*Tagetes minuta*), Mi (*Mentha x piperita* var. *Vulgaris Sole*), Mp (*Mentha x piperita*), La (*Laurus nobilis*), Ro (*Rosmarinus officinalis*) and Ag (*Schinus molle*). Control: sin agregado de aceite esencial.

<sup>b</sup> Valores medios acompañados del error estándar.

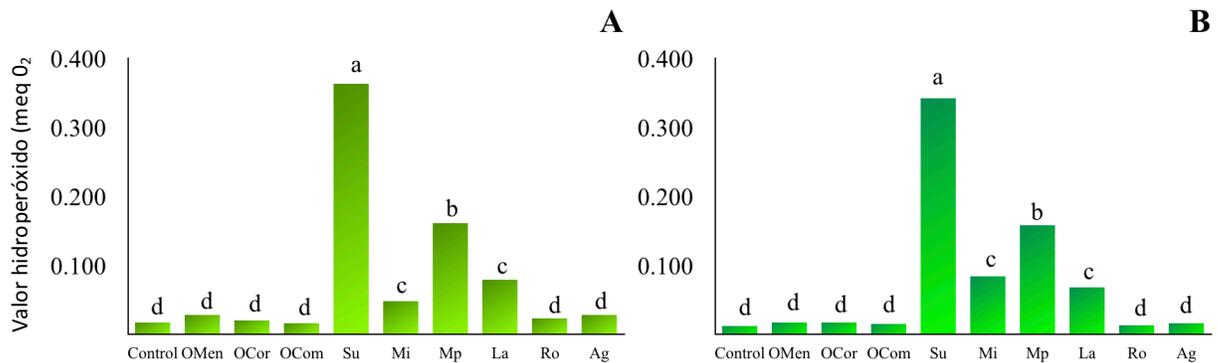


Figura 5.2. Valores de hidroperóxidos (meq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>) para *Aspergillus flavus* (A: AS00001; B: CCC 116-83) después de 72 hs de incubación con aceites esenciales: Control (sin agregado de aceite esencial), OCor (*Origanum vulgare* spp. *hirtum*), OMen (*Origanum x majoricum*), OCom (*Origanum vulgare* spp. *Vulgare*), Su (*Tagetes minuta*), Mi (*Mentha x piperita* var. *Vulgaris Sole*), Mp (*Mentha x piperita*), La (*Laurus nobilis*), Ro (*Rosmarinus officinalis*) and Ag (*Schinus molle*). Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a Test de DGC ( $P < 0.05$ ).

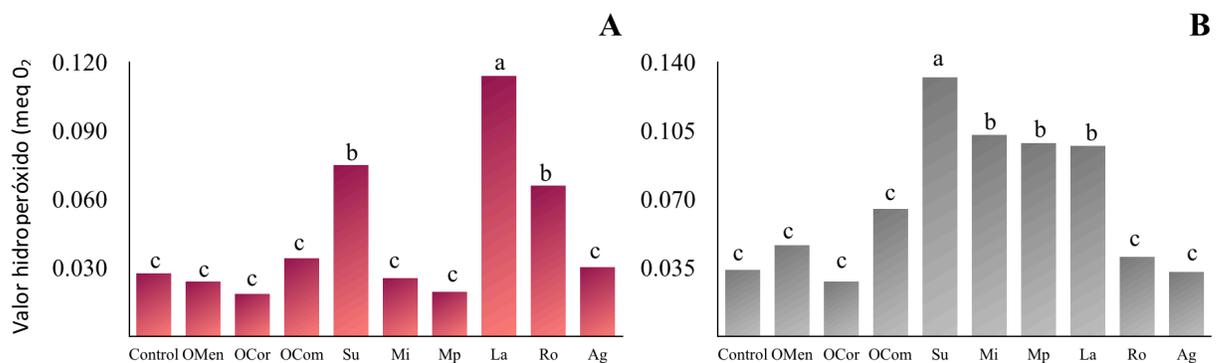


Figura 5.3. Valores de hidroperóxidos (meq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>) para *P. minioluteum* (A) y *P. oxalicum* (B) después de 72 hs de incubación con aceites esenciales: Control (sin agregado de aceite esencial), OCor (*Origanum vulgare* spp. *hirtum*), OMen (*Origanum x majoricum*), OCom (*Origanum vulgare* spp. *Vulgare*), Su (*Tagetes minuta*), Mi (*Mentha x piperita* var. *Vulgaris Sole*), Mp (*Mentha x piperita*), La (*Laurus nobilis*), Ro (*Rosmarinus officinalis*) and Ag (*Schinus molle*). Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a Test de DGC ( $P < 0.05$ ).

## **ANÁLISIS DE CONGLOMERADOS**

Los resultados correspondientes al AC de los AE utilizados para el control de los hongos se presentan como dendograma (Figura 5.4). Los valores de CFM y VHP se utilizaron como variables dependientes. Se obtuvieron cuatro grupos: Grupo 1, conformado por los AE de Ag y Ro; Grupo 2, conformado por los AEs de menta y La; Grupo 3, conformado por las variedades de orégano; Grupo 4, conformado únicamente por el AE de Su. Los resultados indican que los AE de Mi, Mp y La poseen similar actividad antifúngica y oxidación en lípidos de membrana. Resultados similares fueron obtenidos para los AE de oréganos. El AE de Su, conformando su propio grupo, indica que posee un comportamiento diferenciado, con una actividad antifúngica causando una gran oxidación en los lípidos de membrana en los hongos estudiados.

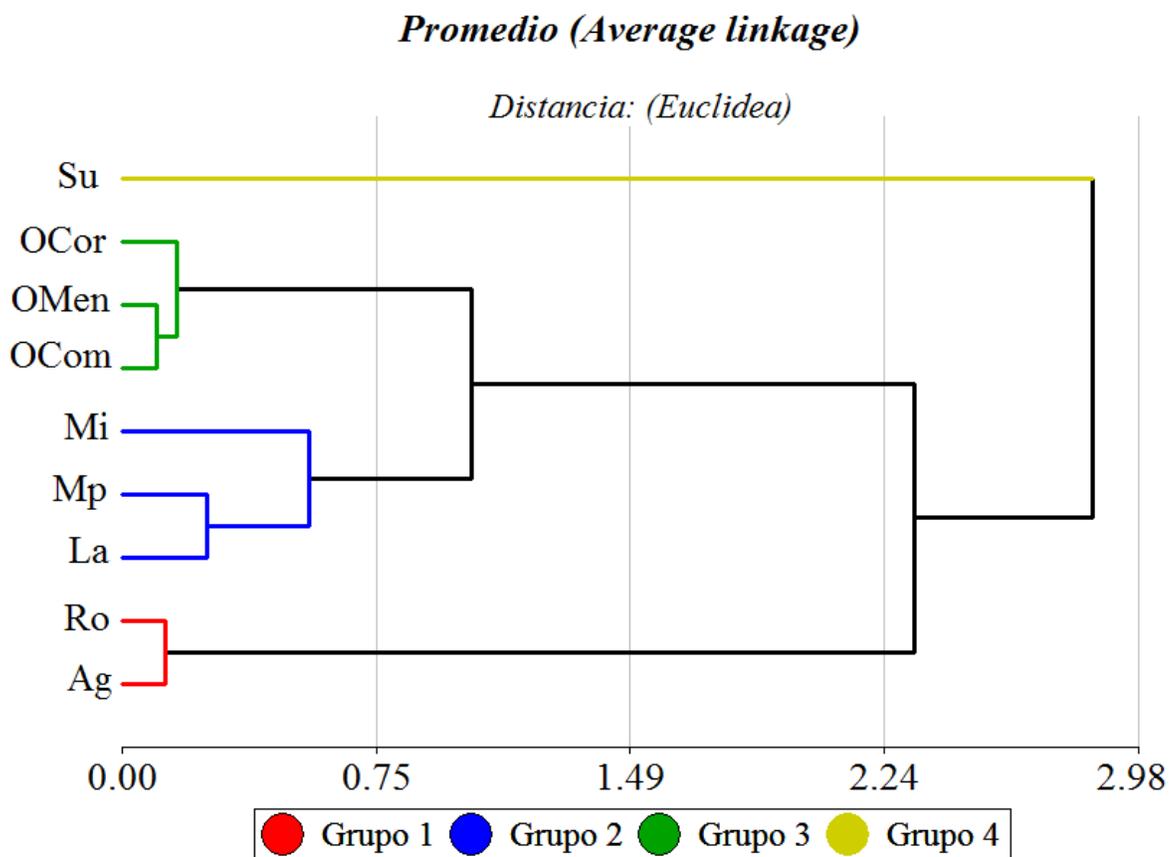


Figura 5.4. Dendrograma elaborado a partir del análisis de conglomerados y agrupamiento de los aceites esenciales de acuerdo a su efecto sobre los hongos estudiados. OCor (*Origanum vulgare* sspp *hirtum*), OMen (*Origanum x majoricum*), OCom (*Origanum vulgare* sspp. *Vulgare*), Su (*Tagetes minuta*), Mi (*Mentha x piperita* var. *Vulgaris Sole*), Mp (*Mentha x piperita*), La (*Laurus nobilis*), Ro (*Rosmarinus officinalis*) and Ag (*Schinus molle*).

## CONCLUSIONES

- La actividad antifúngica de los aceites esenciales varía de acuerdo a la especie fúngica, como así también entre cepas de una misma especie.
- La técnica de microdilución empleada se presenta como una metodología apropiada para evaluar actividad antifúngica de manera rápida y eficaz.
- La alta correlación observada entre las metodologías indica que el crecimiento del micelio depende de su estado metabólico.
- Los aceites esenciales de suico, laurel y menta presentan una moderada actividad antifúngica.
- Los aceites esenciales de orégano presentan la mejor actividad antifúngica, aunque su mecanismo de acción parecería estar poco relacionado a la oxidación de lípidos de membrana.
- La oxidación de lípidos es parte del mecanismo de acción de los aceites esenciales de laurel y menta.
- El mecanismo de acción del aceite esencial de suico está altamente relacionado a la oxidación de lípidos de membrana.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbaszadeh S., Sharifzadeh A., Shokri H., Khosravi a R. and Abbaszadeh A. 2014. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *J. Mycol. Med.* 24: e51–e56.
- Akgul A. and Kivanc M. 1988. Inhibitory effects of selected Turkish spices and oregano components on some foodborne fungi. *Int. J. Food Microbiol.* 6: 263–268.
- Asensio C. M. 2013. Variedades de orégano como conservante antimicrobiano, antioxidante y de las propiedades sensoriales de alimentos: queso cottage, ricota y aceite de oliva. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, 228 pp.
- Avila-Sosa R., Palou E., Jiménez Munguía M. T., Nevárez-Moorillón G. V., Navarro Cruz A. R. and López-Malo A. 2012. Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. *Int. J. Food Microbiol.* 153: 66–72.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. and Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils. *Food Chem. Toxicol.* 46: 446–75.
- Bassolé I. H. N. and Juliani H. R. 2012. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules* 17: 3989–4006.
- Bassole I. H. N., Ouattara A. S., Nebie R., Ouattara C. A. T., Kabore Z. I. and Traore S. A. 2003. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. *Phytochemistry* 62: 209–212.
- Bii C. C., Siboe G. M. and Mibey R. K. 2000. Plant essential oils with promising antifungal activity. *East Afr. Med. J.* 77: 319–322.
- Bluma R., Amaiden M. R., Daghero J. and Etcheverry M. 2008. Control of *Aspergillus* section *Flavi* growth and aflatoxin accumulation by plant essential oils. *J. Appl. Microbiol.* 105: 203–214.
- Camiletti B. X., Asensio C. M., Gadban L. C., Pecci M. de la P. G., Conles M. Y. and Lucini E. I. 2016. Essential oils and their combinations with iprodione fungicide as potential antifungal agents against withe rot (*Sclerotium cepivorum* Berk) in garlic (*Allium sativum* L.) crops. *Ind. Crops Prod.* 85: 117–124.
- Cestari I. M., Sarti S. J., Waib C. M. and Castello Branco A. J. 2004. Evaluation of the potential insecticide activity of *Tagetes minuta* (Asteraceae) essential oil against the head lice *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). *Neotrop. Entomol.* 33: 805–807.
- Clancy C. J. and Nguyen M. H. 1997. Comparison of a photometric method with standardized methods of antifungal susceptibility testing of yeasts. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2878–2882.
- Daferera D. J., Ziogas B. N. and Polissiou M. G. 2000. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2576–2581.
- Dalsgaard T., Sørensen J., Bakman M., Vognsen L., Nebel C., Albrechtsen R. and Nielsen J. H. 2010. Light-induced protein and lipid oxidation in cheese: Dependence on fat content and packaging conditions. *Dairy Sci. Technol.* 90: 565–577.
- Dambolena J. S., López A. G., Cánepa M. C., Theumer M. G., Zygadlo J. A. and Rubinstein H. R. 2008. Inhibitory effect of cyclic terpenes (limonene, menthol, menthone and thymol) on *Fusarium verticillioides* MRC 826 growth and fumonisin B1 biosynthesis. *Toxicon* 51: 37–44.

- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M. y Robledo C. W. 2014. InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Fu Y., Zu Y., Chen L., Shi X., Wang Z., Sun S. and Efferth T. 2007. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phyther. Res.* 21: 989–994.
- Gadban L. 2011. Determinación de la actividad sinérgica antifúngica del aceite esencial de *Tagetes filifolia* Lag. y fungicidas sintéticos sobre *Colletotrichum truncatum* (Schw.) Andrus & Moore y *Trichoderma harzianum* Rifai. Tesis Magister. Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina, 108 pp.
- Ghasemian E., Naghoni A., Tabaraie B. and Tabaraie T. 2012. In vitro susceptibility of filamentous fungi to copper nanoparticles assessed by rapid XTT colorimetry and agar dilution method. *J. Mycol. Med.* 22: 322–328.
- Gonçalves M. J., Tavares A. C., Cavaleiro C., Cruz M. T., Lopes M. C., Canhoto J. and Salgueiro L. 2012. Composition, antifungal activity and cytotoxicity of the essential oils of *Seseli tortuosum* L. and *Seseli montanum* ssp. *peixotoanum* (Samp.) M. Láinz from Portugal. *Ind. Crops Prod.* 39: 204–209.
- Hadacek F. and Greger H. 2000. Testing of antifungal natural products: Methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochem. Anal.* 11: 137–147.
- Jahn B., Martin E., Stueben A., Bhakdi S., Jahn B., Martin E. and Stueben A. 1995. Susceptibility testing of *Candida albicans* and *Aspergillus* species by a simple microtiter menadione-augmented 3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl-2H-tetrazolium bromide assay. *J. Clin. Microbiol.* 33: 661–667.
- Jahn B., Stueben A. and Bhakdi S. 1996. Colorimetric susceptibility testing for *Aspergillus fumigatus*: Thiazolyl)-2,5-Diphenyl-2H-tetrazolium bromide and alamar blue tests. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2039–2041.
- Kalemba D. and Kunicka A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10: 813–829.
- Kamatou G. P. P., Vermaak I., Viljoen A. M. and Lawrence B. M. 2013. Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties. *Phytochemistry* 96: 15–25.
- Kocić-Tanackov S., Dimić G., Tanackov I., Pejin D., Mojović L. and Pejin J. 2012. The inhibitory effect of oregano extract on the growth of *Aspergillus* spp. and on sterigmatocystin biosynthesis. *Food Sci. Technol.* 49: 14–20.
- Kordali S., Cakir A., Ozer H., Cakmakci R., Kesdek M. and Mete E. 2008. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresour. Technol.* 99: 8788–8795.
- Kuhn D. M., Balkis M., Chandra J., Mukherjee P. K. and Ghannoum M. A. 2003. Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. *J. Clin. Microbiol.* 41: 506–508.
- Kurita N. and Koike S. 1982. Synergistic antimicrobial effect of sodium chloride and essential oil components. *Agric. Biol. Chem.* 46: 159–165.
- Lambert R. J., Skandamis P. N., Coote P. J. and Nychas G. J. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91: 453–62.
- López A., Castro S., Andina M. J., Ures X., Munguía B., Llabot J. M., Elder H., Dellacassa E., Palma S. and Domínguez L. 2014. Insecticidal activity of microencapsulated *Schinus molle*

- essential oil. *Ind. Crops Prod.* 53: 209–216.
- Lucini E. I. 2004. Cambios en la composición lipídica del micelio de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary y *Sclerotium cepivorum* Berk por acción de terpenos. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, 114 pp.
- Lucini E. I., Zunino M. P., Lopez M. L. and Zygadlo J. A. 2006. Effect of Monoterpenes on lipid composition and sclerotial development of *Sclerotium cepivorum* Berk. *J. Phytopathol.* 154: 441–446.
- Marei G. I. K., Abdel Rasoul M. a. and Abdelgaleil S. a. M. 2012. Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pestic. Biochem. Physiol.* 103: 56–61.
- Martins M. D. R., Arantes S., Candeias F., Tinoco M. T. and Cruz-Morais J. 2014. Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. *J. Ethnopharmacol.* 151: 485–492.
- Meletiadiis J., Meis J. F. G. M., Mouton J. W. and Donnelly J. P. 2000. Comparison of NCCLS and 3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazolium bromide (MTT). Methods of *in vitro* susceptibility testing of filamentous fungi and development of a new simplified method. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2949–2954.
- Mishra P., Singh P., Prakash B., Kedia A., Kishore N. and Chanotiya C. S. 2013. Assessing essential oil components as plant-based preservatives against fungi that deteriorate herbal raw materials. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 80: 16–21.
- Nakatani N. 2000. Phenolic antioxidants from herbs and spices. *Biofactors* 13: 141–6.
- Olmedo R. H., Nepote V. and Grosso N. R. 2012. Aguaribay and cedron essential oils as natural antioxidants in oil-roasted and salted peanuts. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 89: 2195–2205.
- Olmedo R., Nepote V. and Grosso N. R. 2014. Antioxidant activity of fractions from oregano essential oils obtained by molecular distillation. *Food Chem.* 156: 212–9.
- Østdal H., Andersen H. J. and Nielsen J. H. 2000. Antioxidative activity of urate in bovine milk. *J. Agric. Food Chem.* 48: 5588–5592.
- Oussalah M., Caillet S. and Lacroix M. 2006. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 69: 1046–1055.
- Peixoto L. R., Rosalen P. L., Ferreira G. L. S., Freires I. A., de Carvalho F. G., Castellano L. R. and de Castro R. D. 2017. Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. *Arch. Oral Biol.* 73: 179–185.
- Pérez-Alfonso C. O., Martínez-Romero D., Zapata P. J., Serrano M., Valero D. and Castillo S. 2012. The effects of essential oils carvacrol and thymol on growth of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* involved in lemon decay. *Int. J. Food Microbiol.* 158: 101–106.
- Rashed K., Ćirić A., Glamočlija J. and Soković M. 2014. Antibacterial and antifungal activities of methanol extract and phenolic compounds from *Diospyros virginiana* L. *Ind. Crops Prod.* 59: 210–215.
- Rasooli I., Fakoor M. H., Yadegarinia D., Gachkar L., Allameh A. and Rezaei M. B. 2008. Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. *Int. J. Food Microbiol.* 122: 135–9.
- Ruberto G. and Baratta M. T. 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry* 69: 167–174.
- Senatore F., Napolitano F., Mohamed M. A. H., Harris P. J. C., Mnkeni P. N. S. and Henderson J.

2004. Antibacterial activity of *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) essential oil with different chemical composition. *Flavour Fragr. J.* 19: 574–578.
- Singh P., Shukla R., Prakash B., Kumar A., Singh S., Mishra P. K. and Dubey N. K. 2010. Chemical profile, antifungal, antiaflatoxicogenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, dl-limonene. *Food Chem. Toxicol.* 48: 1734–1740.
- Tangarife-Castaño V., Correa-Royero J., Zapata-Londoño B., Durán C., Stanshenko E. and Mesa-Arango A. C. 2011. Anti-*Candida albicans* activity, cytotoxicity and interaction with antifungal drugs of essential oils and extracts from aromatic and medicinal plants. *Infectio* 15: 160–167.
- Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernández-López J. and Pérez-Álvarez J. 2008. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control* 19: 1130–1138.
- Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernandez-Lopez J. and Pérez-Álvarez J. A. 2007. Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. *J. food Saf.* 27: 91–101.
- Zygadlo J., Guzman C. A. and Grosso N. R. 1994. Antifungal properties of the leaf oils of *Tagetes minuta* L. and *Tagetes filifolia* Lag. *J. Essent. Oil Res.* 6: 617–621.

## CAPÍTULO 6

# INTERACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES ENTRE SÍ Y CON FUNGICIDA SINTÉTICO PARA EL CONTROL DE *Aspergillus flavus* y *Penicillium minioluteum*.

## INTRODUCCIÓN

Los AEs son una fuente viable de antifúngicos naturales pero, en general, su actividad contra los hongos patógenos es más leve que la de las drogas sintéticas comerciales (Pyun y Shin, 2006). La combinación entre AEs se investiga en busca de interacciones que permitan potenciar su desempeño en el control de microorganismos (Kalemba y Kunicka, 2003). La administración combinada de aceites esenciales y productos sintéticos se investiga para aumentar la eficiencia de los primeros, reducir las dosis de los segundos y evitar el desarrollo de resistencia en patógenos (Camiletti *et al.*, 2016; Gadban, 2011; Lim y Shin, 2008; Pyun y Shin, 2006; Giordani *et al.*, 2004).

Cuando dos agentes antimicrobianos se combinan en una mezcla ocurren interacciones cuyos efectos pueden ser (Davidson y Parish, 1989):

- *Aditivos*: la actividad antimicrobiana de un compuesto no aumenta ni disminuye en presencia del otro.
- *Sinérgicos*: la actividad antimicrobiana de un compuesto mejora en presencia de un segundo compuesto.
- *Antagónicos*: la actividad antimicrobiana de un compuesto se reduce en presencia de otro.

Determinar la existencia de aditividad, sinergismo o antagonismo requiere conocer la actividad antimicrobiana de cada agente individual, su efecto combinado y que este último sea respectivamente igual, mayor o menor que el esperado para la mezcla (Kosman y Cohen, 1996).

A pesar de la larga historia de uso de las mezclas, sigue ausente un concepto de sinergismo o antagonismo universalmente aceptado y la principal discordancia ocurre en la definición del “efecto esperado de la mezcla”. Para algunos autores se trata simplemente de la suma de los efectos de los componentes individuales (Gisi, 1991; Barry, 1976); mientras que para otros, este valor debe ser calculado con fórmulas matemáticas de acuerdo con una teoría específica de acción conjunta de los componentes de la mezcla bajo el supuesto de ausencia de sinergismo o antagonismo (Davidson y Parish, 1989; Abbott, 1925). En ambos casos se concuerda que la actividad de la mezcla debe ser medida experimentalmente, comparada con el cálculo de la actividad esperada para finalmente estimar el grado de interacción (Kosman y Cohen, 1996). Una vez conocidos los efectos individuales y combinados de los compuestos, la acción conjunta puede ser evaluada y caracterizada como sinérgica, aditiva o antagónica en base a un modelo de referencia, a través de diferentes métodos (Gadban, 2011).

El método aditivo es utilizado para el caso de acciones similares de los componentes de la mezcla y estima el efecto inhibitorio esperado de la misma a partir de las dosis individuales de sus componentes. Esto se compara luego con la inhibición observada experimentalmente, es decir el efecto inhibitorio real de la mezcla. Cuando el efecto inhibitorio observado de la mezcla es mayor, igual o menor al esperado, se considera que hay sinergismo, aditividad o antagonismo respectivamente (Kosman y Cohen, 1996).

El método de Abbott (1925) usualmente se aplica en busca de interacciones sinérgicas para mezclas cuyos componentes producen efectos de diferente modo, afectando distintas actividades fisiológicas o sistemas vitales en el organismo blanco. Fue desarrollado originalmente para insecticidas, pero se utiliza ampliamente para fungicidas. Es un modelo que estima la supervivencia de una población después de la exposición a una mezcla como el producto entre las proporciones que sobreviven a la exposición de cada agente individual. Si el cociente entre la eficacia observada experimentalmente y la eficacia esperada de la mezcla es mayor a 1,5, entonces la interacción entre los componentes es sinérgica (Kosman y Cohen, 1996; Gisi, 1991).

Actualmente existen escasos productos comerciales para el control de *Aspergillus* spp. y

*Penicillium* spp. Uno de ellos es MAXIM<sup>®</sup> Evolution (Rizobacter, Argentina), curasemilla sistémico y de contacto formulado con tres ingredientes activos: fludioxonil, metalaxil y tiabendazol. Este producto asegura el control de patógenos tanto en el suelo como en el almacenaje de las semillas (Munkvold, 2009). El metalaxil es un compuesto fungicida eficiente contra especies pertenecientes a la clase oomicota, por lo que no afecta el crecimiento de las especies fúngicas utilizadas en este trabajo (Schwinn y Staub, 1995). Por su parte, el tiabendazol no afecta el crecimiento *Aspergillus* spp. y solo algunas especies del género *Penicillium* han sido reportadas como susceptibles (Lopez-Garcia *et al.*, 2003). El fludioxonil es un fenilpirrol, clase de fungicidas no sistémicos y de amplio espectro (Gehmann *et al.*, 1990). De acuerdo a trabajo previos, este ingrediente activo afecta el crecimiento micelial y la germinación de conidios tanto en especies de *Aspergillus* como en aquellas pertenecientes al género *Penicillium* (Santos *et al.*, 2011; Errampalli, 2004). Tradicionalmente, el fludioxonil ha sido utilizado como tratamiento en semillas para el control de patógenos del suelo (Duan *et al.*, 2013; Solorzano y Malvick, 2011; Mueller *et al.*, 1999). En los últimos años, este compuesto a comenzado a ser investigado bajo el desarrollo de nuevas formulaciones en spray destinadas al control de enfermedades fúngicas (Duan *et al.*, 2013).

El objetivo de este capítulo fue determinar combinaciones entre AEs con interacción sinérgica que potencien su efecto y combinaciones de AEs con fungicida sintético cuya interacción aditiva o sinérgica permita una potencial disminución de la dosis necesaria del pesticida químico.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **ACEITES ESENCIALES**

Se utilizaron los aceites esenciales con actividad antifúngica demostrada en el capítulo 4.

### **AISLADOS FÚNGICOS**

Se utilizaron los siguientes aislados obtenidos de espigas de maíz cultivadas en la región I:

(a) *Aspergillus flavus* AS0001.

(b) *Penicillium minioluteum* AP003.

### **FUNGICIDA SINTÉTICO**

Se utilizó el fungicida sintético MAXIM<sup>®</sup> Evolution (Rizobacter, Argentina) formulado con fludioxonil (4-(2,2-Difluoro-1,3-benzodioxol-4-il)-1H-pirrole-3-carbonitrilo) al 2,5%.

### **ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE COMBINACIONES ENTRE ACEITES ESENCIALES**

Se evaluó el efecto antifúngico resultante de la mezcla de diferentes concentraciones de AEs. Este experimento se desarrolló mediante la técnica colorimétrica del MTT, previamente descrita en el capítulo 5. Se evaluaron todas las posibles combinaciones entre los AEs de acuerdo a las siguientes concentraciones: 20, 40, 60 y 80% de sus respectivas CFMs (Capítulo 5). Los AEs fueron diluidos en DMSO y agregados a tubos Eppendorf hasta lograr las concentraciones finales deseadas. Tratamientos con la CFM de cada AE fueron incluidos en el ensayo como control positivo. Se evaluaron un total de 378 tratamientos.

### **ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE COMBINACIONES ENTRE ACEITES ESENCIALES Y FUNGICIDA SINTÉTICO**

En primer lugar, se determinó la CFM para el fungicida sintético mediante la técnica de microdilución (MTT) descrita en el capítulo 5. Esta misma metodología se utilizó luego para evaluar la actividad antifúngica resultante de las combinaciones de AEs y fungicida (20, 40, 60

y 80% de sus respectivas CFMs). El fungicida sintético fue diluido en agua destilada estéril para alcanzar las concentraciones finales de trabajo deseadas. Tratamientos con la CFM de cada uno de los compuestos evaluados fueron incluidos en el ensayo y se evaluaron un total de 126 tratamientos.

## ACTIVIDAD SINÉRGICA, ADITIVA O ANTAGÓNICA DE LAS COMBINACIONES

Una vez calculados las medias de PIC para cada tratamiento, se determinó la actividad sinérgica, aditiva o antagónica utilizando dos metodologías diferentes:

1. **Método aditivo:** Los PIC para cada una de las dosis individuales (*i*) de los compuestos (*a* y *b*) a analizar se sumaron para obtener un PIC esperado para cada uno de los tratamientos combinados ( $PICE_{ai+bi}$ ):

$$PICE_{ai+bi} = PIC_{ai} + PIC_{bi} \quad (\text{ec. 6.1})$$

El  $PICE_{ai+bi}$  se comparó estadísticamente con el PIC obtenido experimentalmente para la mezcla de dichas dosis ( $PICO_{ai+bi}$ ). Se determinó sinergismo cuando el  $PICO_{ai+bi}$  fue mayor al  $PICE_{ai+bi}$ ; aditividad cuando no hubo diferencia entre ambos y antagonismo cuando  $PICO_{ai+bi}$  fue menor al  $PICE_{ai+bi}$  (Gadban, 2011; Kosman and Cohen, 1996).

2. **Método de Abbott:** se calculó el PIC esperado ( $PICE_{ai+bi}$ ) de acuerdo la siguiente fórmula:

$$PICE_{ai+bi} = PIC_{ai} + PIC_{bi} - [(PIC_{ai} \times PIC_{bi}) / 100] \quad (\text{ec. 6.2})$$

donde  $PIC_{ai}$  y  $PIC_{bi}$  corresponden a los PIC para las dosis individuales (*i*) de los compuestos *a* y *b*, respectivamente. El efecto de las combinaciones fue designado de acuerdo al índice Abbott (IA), calculado como:

$$IA = PICO_{ai+bi} / PICE_{ai+bi} \quad (\text{ec. 6.3})$$

donde  $PICO_{ai+bi}$  indica el PIC obtenido experimentalmente para la combinación de dichos compuestos (*a* y *b*).

Efecto sinérgico fue determinado para un IA mayor a 1,5; aditivo para un IA entre 0,5 y 1,5; antagónico cuando el IA fue menor a 0,5 (Kosman y Cohen, 1996).

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados fueron analizados mediante el software estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2014). Los experimentos se realizaron en dos repeticiones, con cinco replicas cada una. Los datos para cada tratamiento fueron combinados después de corroborar la homogeneidad de varianzas del error experimental mediante el "F test". Las medias para cada tratamiento fueron obtenidas mediante análisis de la varianza (ANOVA). Se utilizó test LSD de Fisher ( $P < 0.05$ ) para detectar diferencias significativas entre los tratamientos para el método aditivo.

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos para cada una de las combinaciones analizadas se encuentran detallados en el Anexo 2. Aquellos más significativos se presentarán y discutirán en este capítulo.

### INTERACCIÓN ENTRE ACEITES ESENCIALES CONTRA *Aspergillus flavus*

Todos los AEs fueron mezclados entre sí y en todas las combinaciones posibles en busca de interacciones sinérgicas que potencien el efecto antifúngico de los mismos contra *A. flavus*. El efecto sinérgico fue predominante cuando se combinaron AEs de orégano con suico y laurel, mientras que en el resto de las combinaciones predominó el efecto aditivo (Figura 6.1).

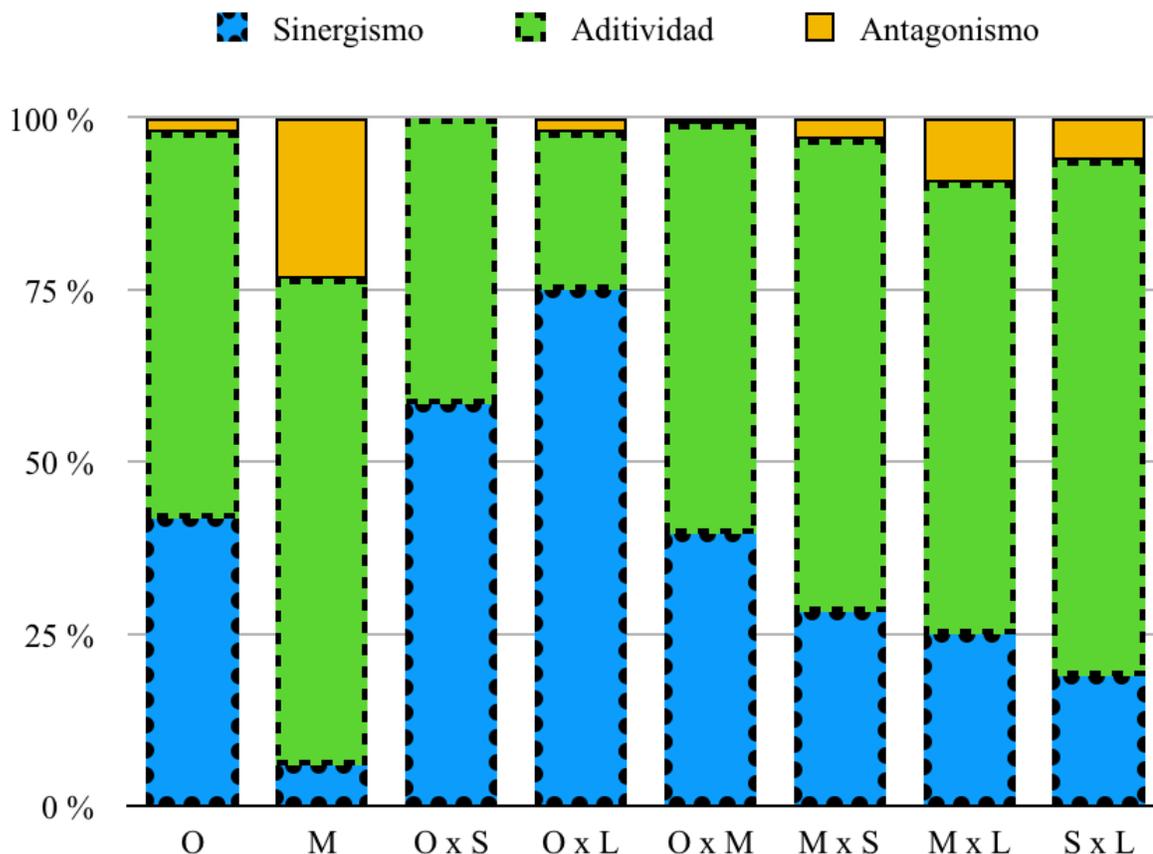


Figura 6.1. Efecto resultante de las combinaciones entre los aceites esenciales contra *Aspergillus flavus* de acuerdo al método Abbott. O: *Origanum x majoricum* + *Origanum vulgares* ssp. *vulgare* + *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* clon; M: *Mentha x piperita* var. *Vulgaris* Sole + *Mentha x piperita*; S: *Tagetes minuta*; L: *Laurus nobilis*.

**Interacción entre variedades orégano.** Diferentes concentraciones de OCom, OCor y OCom se combinaron en busca de interacciones sinérgicas para las variedades de orégano (Tabla 6.1). La mayoría de las combinaciones presentaron una interacción sinérgica, dentro de las cuales un total de ocho combinaciones inhibieron completamente el crecimiento fúngico. Sin embargo, es posible que estas combinaciones hallan superado la CFM esperada debido a que estos AEs poseen similar composición química y un marcado efecto fungicida en concentraciones inferiores a la CFM.

Tabla 6.1 Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales de orégano contra *Aspergillus flavus* según método aditivo y de Abbott.

A		B		PICO <sup>z</sup>	Método aditivo *			Método Abbott *			
AE <sup>x</sup>	% <sup>y</sup>	AE <sup>x</sup>	% <sup>y</sup>		PICE <sup>z</sup>	Efecto	PICE <sup>z</sup>	IA <sup>z</sup>	Efecto		
OMen	80	OCom	20	99,0	a	66,23	b	<b>sinergismo</b>	64,27	1,54	<b>sinergismo</b>
	60		80	98,8	a	74,17	b	<b>sinergismo</b>	60,42	1,64	<b>sinergismo</b>
	60		60	92,2	a	50,62	b	<b>sinergismo</b>	45,58	2,02	<b>sinergismo</b>
	60		40	73,3	a	47,14	b	sinergismo	43,39	1,69	sinergismo
	40		20	33,2	a	20,24	a	aditividad	19,71	1,69	sinergismo
	20		60	45,5	a	21,02	b	sinergismo	20,01	2,27	sinergismo
	20		20	50,2	a	10,51	b	sinergismo	10,28	4,89	sinergismo
OMen	60	OCor	40	100	a	42,22	b	<b>sinergismo</b>	50,36	1,99	<b>sinergismo</b>
	60		20	79,5	a	38,72	b	sinergismo	42,40	1,88	sinergismo
	20		80	95,9	a	43,29	b	<b>sinergismo</b>	59,15	1,62	<b>sinergismo</b>
	20		40	52,4	a	12,62	b	sinergismo	27,03	1,94	sinergismo
	20		20	41,1	a	9,12	b	sinergismo	15,33	2,69	sinergismo
OCor	80	OCom	20	99,8	a	66,2	b	<b>sinergismo</b>	64,3	1,54	<b>sinergismo</b>
	60		80	98,8	a	74,2	b	<b>sinergismo</b>	60,4	1,64	<b>sinergismo</b>
	60		60	92,2	a	50,6	b	<b>sinergismo</b>	45,6	2,02	<b>sinergismo</b>
	60		40	73,3	a	47,1	b	sinergismo	43,4	1,69	sinergismo
	40		20	33,2	a	20,2	a	aditividad	19,7	1,69	sinergismo
	20		60	45,5	a	21,0	b	sinergismo	20,0	2,27	sinergismo
	20		20	50,2	a	10,5	b	sinergismo	10,3	4,89	sinergismo

<sup>x</sup>AE: aceite esencial; OCor (*Origanum vulgare* ssp *hirtum*), OMen (*Origanum x majoricum*), OCom (*Origanum vulgare* ssp. *Vulgare*).

<sup>y</sup> %: porcentaje de la CFM para cada aceite esencial.

<sup>z</sup> PICO: Porcentaje de inhibición del crecimiento observado; PICE: Porcentaje de inhibición del crecimiento esperado; IA: Índice de Abbott. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas según test LSD de Fisher ( $P < 0.05$ ).

\* Palabras en negrita indican combinaciones sinérgicas que inhibieron completamente el crecimiento del hongo.

**Interacción entre variedades de menta.** Diferentes concentraciones de Mi y Mp se combinaron entre sí para evaluar el tipo de interacción resultante (Anexo 2). Las interacciones obtenidas resultaron en su mayoría del tipo aditivo, lo cual puede ser explicado debido a la similitud de sus composiciones químicas (capítulo 4). Únicamente la combinación entre 20%

de Mi y 60% de Mp presentó una interacción sinérgica aunque sin inhibir completamente el desarrollo del hongo.

**Interacción de las variedades de orégano con mentas, suico y laurel.** Los AEs de orégano se combinaron en las concentraciones mencionadas para evaluar su interacción con otros AEs (Anexo 2). Aquellas combinaciones con interacción sinérgica se presentan en la Tabla 6.2. Las tres variedades orégano (OCor, OCom y OMen) presentaron interacciones sinérgicas cuando se combinaron con aceites esenciales de Su y La. Un total de 25 combinaciones entre estos AEs permitió controlar completamente el crecimiento de *A. flavus*. Si bien se encontraron interacciones sinérgicas en combinaciones de Mi y Mp con OCom, OMen, OCor; solo una de estas mezclas (Mi 40% + OMen 60%) fue eficaz para inhibir completamente el crecimiento del hongo.

Tabla 6.2. Combinaciones de aceite esencial de orégano con mentas, suico y laurel con actividad sinérgica contra *Aspergillus flavus* según método aditivo y de Abbott.

A		B		PICO <sup>z</sup>	Método aditivo *			Método Abbott *					
AE <sup>x</sup>	% <sup>y</sup>	AE <sup>x</sup>	% <sup>y</sup>		PICE <sup>z</sup>	Efecto	PICE <sup>z</sup>	IA <sup>z</sup>	Efecto				
OMen	80	Su	20	100,0	a	64,1	b	<b>sinergismo</b>	63,5	1,57	<b>sinergismo</b>		
			40	85,1	a	42,5	b	sinergismo	40,4	2,10	sinergismo		
	60		20	100,0	a	38,0	b	<b>sinergismo</b>	37,6	2,66	<b>sinergismo</b>		
			40	82,6	a	62,5	b	sinergismo	54,7	1,51	sinergismo		
			40	71,3	a	22,6	b	sinergismo	21,6	3,29	sinergismo		
OMen	60	La	40	84,7	a	60,8	b	sinergismo	52,0	1,63	sinergismo		
			60	93,7	a	38,4	b	<b>sinergismo</b>	37,9	2,47	<b>sinergismo</b>		
			40	91,3	a	68,7	b	<b>sinergismo</b>	59,9	1,52	<b>sinergismo</b>		
			40	60	100,0	a	59,9	b	<b>sinergismo</b>	52,6	2,23	<b>sinergismo</b>	
	40			40	75,7	a	40,9	b	sinergismo	36,8	2,06	sinergismo	
				20	80	100,0	a	59,0	b	<b>sinergismo</b>	55,2	1,81	<b>sinergismo</b>
				20	60	100,0	a	50,2	b	<b>sinergismo</b>	47,0	2,13	<b>sinergismo</b>
				20	40	74,1	a	31,2	b	sinergismo	29,4	2,52	sinergismo
OCom	80	Su	80	78,9	b	100,0	a	antagonismo	85,6	0,92	aditividad		
			80	60	97,5	a	82,5	b	<b>sinergismo</b>	64,5	1,51	<b>sinergismo</b>	
			80	40	98,00	a	42,7	b	<b>sinergismo</b>	40,6	2,41	<b>sinergismo</b>	
	80			20	99,1	a	38,2	b	<b>sinergismo</b>	37,8	2,62	<b>sinergismo</b>	
				60	40	78,0	a	19,1	b	sinergismo	18,4	4,25	sinergismo
				60	20	75,1	a	14,6	b	sinergismo	14,5	5,19	sinergismo
				40	60	91,6	a	55,5	b	<b>sinergismo</b>	50,9	1,80	<b>sinergismo</b>
				40	40	64,5	a	15,6	b	sinergismo	15,1	4,28	sinergismo
				40	20	49,2	a	11,1	b	sinergismo	11,0	4,46	sinergismo
20	60	81,5	a	48,5	b	sinergismo	47,1	1,73	sinergismo				

Tabla 6.2. Combinaciones de aceite esencial de orégano con mentas, suico y laurel con actividad sinérgica contra *Aspergillus flavus* según método aditivo y de Abbott. Continuación.

A		B		PICO <sup>z</sup>	Método aditivo *			Método Abbott *				
AE <sup>x</sup>	% <sup>y</sup>	AE <sup>x</sup>	% <sup>y</sup>		PICE <sup>z</sup>	Efecto		PICE <sup>z</sup>	IA <sup>z</sup>	Efecto		
Ocom	20	La	40	58,4	a	8,6	b	sinergismo	8,4	6,93	sinergismo	
	20		20	38,3	a	4,1	b	sinergismo	4,1	9,41	sinergismo	
	80		60	100,0	a	79,9	b	<b>sinergismo</b>	64,0	1,56	<b>sinergismo</b>	
	80		40	100,0	a	60,9	b	<b>sinergismo</b>	52,1	1,92	<b>sinergismo</b>	
	80		20	89,8	a	38,6	b	sinergismo	38,1	2,36	sinergismo	
	60		80	99,5	a	65,2	b	<b>sinergismo</b>	58,2	1,71	<b>sinergismo</b>	
	60		60	92,5	a	56,4	b	<b>sinergismo</b>	50,6	1,83	<b>sinergismo</b>	
	60		40	69,7	a	37,4	b	sinergismo	34,1	2,04	sinergismo	
	60		20	48,3	a	15,0	b	sinergismo	14,8	3,25	sinergismo	
	40		80	95,4	a	61,7	b	<b>sinergismo</b>	56,5	1,69	<b>sinergismo</b>	
	40		60	77,8	a	52,9	b	sinergismo	48,6	1,60	sinergismo	
	40		40	78,9	a	33,9	b	sinergismo	31,5	2,51	sinergismo	
	20		80	90,0	a	54,7	b	<b>sinergismo</b>	53,1	1,70	<b>sinergismo</b>	
	20		40	54,1	a	26,9	b	sinergismo	26,1	2,07	sinergismo	
Ocor	20	Su	20	39,1	a	4,5	b	sinergismo	4,5	8,71	sinergismo	
	80		40	99,9	a	61,4	b	<b>sinergismo</b>	58,3	1,71	<b>sinergismo</b>	
	80		20	100,0	a	56,9	b	<b>sinergismo</b>	56,3	1,79	<b>sinergismo</b>	
	60		40	80,1	a	49,6	b	sinergismo	47,2	1,70	sinergismo	
	60		20	86,4	a	45,1	b	sinergismo	44,7	1,93	sinergismo	
	40		60	88,4	a	66,6	b	sinergismo	57,0	1,55	sinergismo	
	40		40	57,6	a	26,7	b	sinergismo	25,5	2,26	sinergismo	
	40		20	48,2	a	22,2	b	sinergismo	22,0	2,20	sinergismo	
	20		60	81,0	a	53,9	b	sinergismo	50,1	1,62	sinergismo	
	20		40	65,5	a	14,0	b	sinergismo	13,6	4,83	sinergismo	
	20		20	55,1	a	9,6	b	sinergismo	9,5	5,82	sinergismo	
	80		60	100,0	a	79,9	b	<b>sinergismo</b>	64,0	1,56	<b>sinergismo</b>	
	80		40	100,0	a	60,9	b	<b>sinergismo</b>	52,1	1,92	<b>sinergismo</b>	
	80		20	89,8	a	38,6	b	sinergismo	38,1	2,36	sinergismo	
Ocor	60	80	99,5	a	65,2	b	<b>sinergismo</b>	58,2	1,71	<b>sinergismo</b>		
	60	60	92,5	a	56,4	b	<b>sinergismo</b>	50,6	1,83	<b>sinergismo</b>		
	60	40	69,7	a	37,4	b	sinergismo	34,1	2,04	sinergismo		
	60	20	48,3	a	15,0	b	sinergismo	14,8	3,25	sinergismo		
	40	80	95,4	a	61,7	b	<b>sinergismo</b>	56,5	1,69	<b>sinergismo</b>		
	40	60	77,8	a	52,9	b	sinergismo	48,6	1,60	sinergismo		
	40	40	78,9	a	33,9	b	sinergismo	31,5	2,51	sinergismo		
	20	80	90,0	a	54,7	b	<b>sinergismo</b>	53,1	1,70	<b>sinergismo</b>		
	20	40	54,1	a	26,9	b	sinergismo	26,1	2,07	sinergismo		
	Mi	20	Ocom	20	39,1	a	4,5	b	sinergismo	4,5	8,71	sinergismo
		40		80	87,5	a	49,1	b	sinergismo	44,7	1,96	sinergismo
		40		60	68,7	a	25,6	b	sinergismo	23,9	2,87	sinergismo
		40		40	79,8	a	22,1	b	sinergismo	20,9	3,82	sinergismo
		40		20	49,8	a	15,1	b	sinergismo	14,7	3,39	sinergismo
20		60		70,8	a	14,6	b	sinergismo	14,5	4,89	sinergismo	
20		40		70,6	a	11,1	b	sinergismo	11,0	6,40	sinergismo	
20		20		9,8	a	4,1	a	aditividad	4,1	2,40	sinergismo	

Tabla 6.2. Combinaciones de aceite esencial de orégano con mentas, suico y laurel con actividad sinérgica contra *Aspergillus flavus* según método aditivo y de Abbott. Continuación.

A		B		PICO <sup>z</sup>	Método aditivo *			Método Abbott *			
AE <sup>x</sup>	% <sup>y</sup>	AE <sup>x</sup>	% <sup>y</sup>		PICE <sup>z</sup>	Efecto	PICE <sup>z</sup>	IA <sup>z</sup>	Efecto		
Mi	60	Omen	20	89,8	a	61,9	b	sinergismo	57,8	1,55	sinergismo
	40		60	92,9	a	49,0	b	<b>sinergismo</b>	44,5	2,09	<b>sinergismo</b>
	40		40	55,4	a	29,1	b	sinergismo	27,0	2,05	sinergismo
	40		20	75,1	a	19,4	b	sinergismo	18,5	4,07	sinergismo
	20		60	74,8	a	38,0	b	sinergismo	37,6	1,99	sinergismo
	20		40	75,2	a	18,1	b	sinergismo	18,0	4,19	sinergismo
	20		20	52,8	a	8,4	b	sinergismo	8,3	6,33	sinergismo
Mi	40	OCor	60	87,5	a	56,1	b	sinergismo	50,8	1,72	sinergismo
	40		40	49,9	a	33,1	b	sinergismo	30,6	1,63	sinergismo
	40		20	69,7	a	20,5	b	sinergismo	19,5	3,58	sinergismo
	20		60	69,4	a	45,1	b	sinergismo	44,7	1,55	sinergismo
	20		40	69,8	a	22,2	b	sinergismo	22,0	3,18	sinergismo
	20		20	47,4	a	9,6	b	sinergismo	9,46	5,00	sinergismo
Mp	60	OMen	20	70,9	a	48,8	a	Sinergismo	45,7	1,55	sinergismo
	40		40	57,9	a	32,2	b	sinergismo	29,6	1,96	sinergismo
	20		60	67,2	a	39,0	b	sinergismo	38,3	1,75	sinergismo
Mp	20	OCor	40	31,8	a	19,2	b	sinergismo	18,8	1,69	sinergismo
	40		60	81,1	a	59,1	b	Sinergismo	52,5	1,55	Sinergismo
	40		40	51,6	a	36,2	b	Sinergismo	33,0	1,56	Sinergismo
	40		20	62,5	a	23,6	b	Sinergismo	22,3	2,81	Sinergismo
Mp	20	OCom	80	87,0	a	57,9	b	Sinergismo	56,8	1,53	Sinergismo
	60		20	69,2	a	44,5	b	Sinergismo	43,2	1,60	Sinergismo
	40		80	82,9	a	52,2	a	Sinergismo	46,6	1,78	Sinergismo
	40		60	74,7	a	28,6	b	Sinergismo	26,6	2,81	Sinergismo
	40		40	63,7	a	25,2	b	Sinergismo	23,6	2,70	Sinergismo
	40		20	50,4	a	18,1	b	Sinergismo	17,7	2,85	Sinergismo
	20		80	77,3	a	39,2	b	Sinergismo	38,4	2,01	Sinergismo
	20		60	81,5	a	15,6	b	Sinergismo	15,3	5,31	Sinergismo
20	40	24,5	a	12,1	b	Sinergismo	11,9	2,05	Sinergismo		
20	20	47,6	a	5,1	b	Sinergismo	5,0	9,44	Sinergismo		

<sup>x</sup>AE: aceite esencial; OCor (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*), OCom (*Origanum vulgare* L. ssp. *Vulgare*), OMen (*Origanum x majoricum*), Mi (*Mentha x piperita* L. var. *Vulgaris* Sole), Mp (*Mentha x piperita*), Su (*Tagetes minuta* L.) y La (*Laurus nobilis* L.).

<sup>y</sup> %: porcentaje de la CFM para cada aceite esencial.

<sup>z</sup> PICO: Porcentaje de inhibición del crecimiento observado; PICE: Porcentaje de inhibición del crecimiento esperado; IA: Índice de Abbott. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas según test LSD de Fisher ( $P < 0.05$ ).

\* Palabras en negrita indican combinaciones sinérgicas que inhibieron completamente el crecimiento del hongo.

**Interacción de las variedades de mentas con suico y laurel.** Un total de 19 combinaciones entre los AEs estudiados presentaron una interacción sinérgica (Tabla 6.3). Sin embargo, una sola combinación (Mp 40% + La 60%) fue capaz de inhibir completamente el crecimiento de *A. flavus*.

Tabla 6.3. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales de menta, suico y laurel contra *Aspergillus flavus* según método aditivo y de Abbott.

A		B		PICO <sup>z</sup>	Método aditivo *		Método Abbott *				
AE <sup>x</sup>	% <sup>y</sup>	AE <sup>x</sup>	% <sup>y</sup>		PICE <sup>z</sup>	Efecto	PICE <sup>z</sup>	IA <sup>z</sup>	Efecto		
Mi	40	Su	40	58,5	a	17,4	b	sinergismo	16,8	3,48	sinergismo
	40		20	52,5	a	12,9	b	sinergismo	12,8	4,10	sinergismo
	20		60	70,5	a	46,3	b	sinergismo	45,9	1,54	sinergismo
	20		40	65,6	a	6,4	b	sinergismo	6,4	10,20	sinergismo
	20		20	59,1	a	2,0	b	sinergismo	2,0	29,67	sinergismo
Mi	40	La	40	55,8	a	35,7	b	sinergismo	32,9	1,70	sinergismo
	40		20	56,8	a	13,4	b	sinergismo	13,2	4,30	sinergismo
	20		40	48,9	a	24,8	b	sinergismo	24,5	2,00	sinergismo
	20		20	12,9	a	2,4	b	sinergismo	1,0	13,13	sinergismo
Mp	40	Su	40	84,8	a	26,5	b	sinergismo	19,7	4,31	sinergismo
	20		60	73,1	a	50,4	b	sinergismo	46,5	1,57	sinergismo
	20		40	76,2	a	10,5	b	sinergismo	7,4	10,31	sinergismo
Mp	40	La	60	99,1	a	63,8	b	<b>sinergismo</b>	51,4	1,93	<b>sinergismo</b>
	40		40	74,6	a	44,8	b	sinergismo	35,2	2,12	sinergismo
	20		80	86,5	a	56,6	b	sinergismo	52,6	1,65	sinergismo
	20		20	25,7	a	6,5	b	sinergismo	3,4	7,53	sinergismo
La	40	Su	40	68,2	a	44,8	b	sinergismo	27,9	2,44	sinergismo
	20		60	62,9	a	47,8	a	aditividad	46,2	1,36	sinergismo
	20		40	68,0	a	28,8	b	sinergismo	6,8	9,95	sinergismo

<sup>x</sup>AE: aceite esencial; Mi (*Mentha x piperita* L. var. *Vulgaris* Sole), Mp (*Mentha x piperita*), Su (*Tagetes minuta* L.) y La (*Laurus nobilis* L.).

<sup>y</sup> %: porcentaje de la CFM para cada aceite esencial.

<sup>z</sup> PICO: Porcentaje de inhibición del crecimiento observado; PICE: Porcentaje de inhibición del crecimiento esperado; IA: Índice de Abbott. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas según test LSD de Fisher ( $P < 0.05$ ).

\* Palabras en negrita indican combinaciones sinérgicas que inhibieron completamente el crecimiento del hongo.

## INTERACCIÓN ENTRE ACEITES ESENCIALES CONTRA *Penicillium minioluteum*

Todos los AEs fueron mezclados entre sí y en todas las combinaciones posibles en busca de interacciones sinérgicas que potencien su efecto antifúngico contra *P. minioluteum*. El efecto aditivo fue predominante cuando se combinaron la mayoría de los AEs, mientras que se observaron algunos pocos casos de sinergismo en mezclas de oréganos con suico, laurel y menta (Figura 6.2).

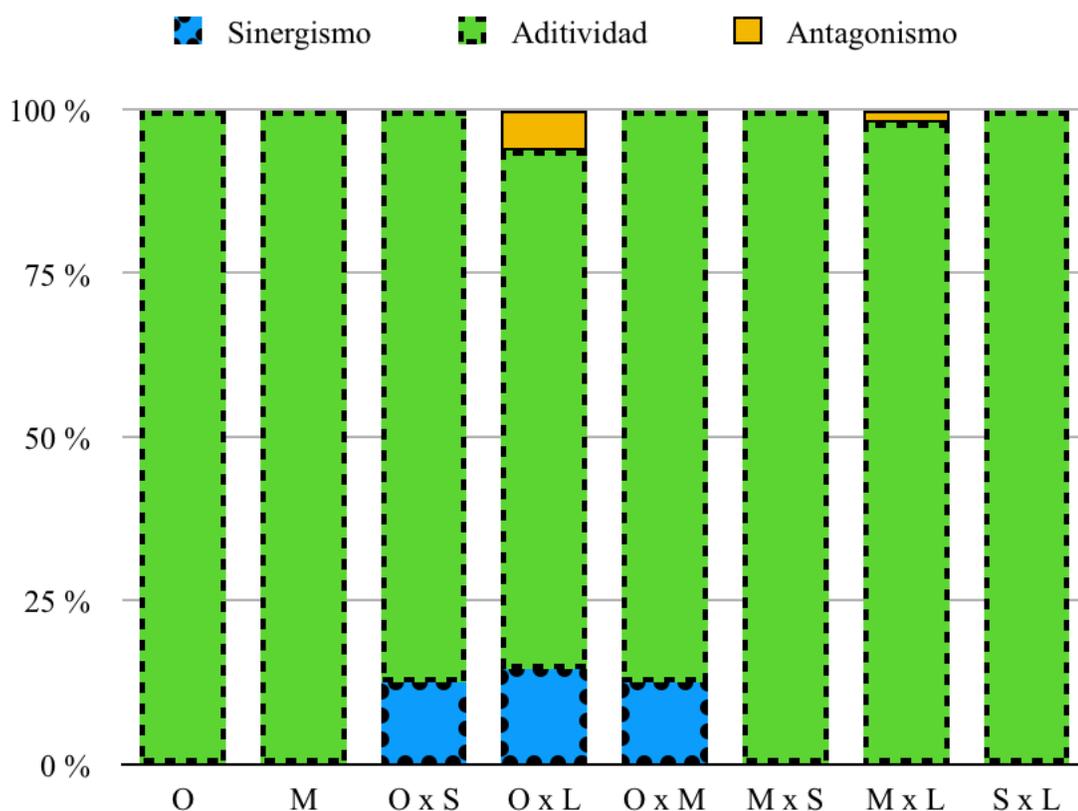


Figura 6.2. Efecto resultante de las combinaciones entre los aceites esenciales contra *Penicillium minioluteum* de acuerdo al método Abbott. O: *Origanum x majoricum* + *Origanum vulgares* ssp *vulgare* + *Origanum vulgare* ssp *hirtum* clon; M: *Mentha x piperita* var. *Vulgaris* Sole + *Mentha x piperita*; S: *Tagetes minuta*; L: *Laurus nobilis*.

**Interacción entre aceites esenciales de orégano y mentas.** Los AEs de las tres variedades de oréganos se combinaron entre sí, al igual que las mentas, en busca de interacciones que mejoren la actividad antifúngica contra *P. minioluteum* (Anexo 2). No se observaron interacciones del tipo sinérgicas con control total del crecimiento del hongo, clasificándose en su mayoría como efecto aditivo. Sin embargo, cuando se combinaron los AEs de menta con los de orégano, se observó sinergismo en 12 combinaciones (Tabla 6.4). Dentro de estas interacciones sinérgicas, sólo dos combinaciones no inhibieron completamente el control de *P. minioluteum*.

Tabla 6.4. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales de orégano y mentas contra *Penicillium minioluteum* según método aditivo y de Abbott.

A		B		PICO <sup>z</sup>	Método aditivo *			Método Abbott *			
AE <sup>x</sup>	% <sup>y</sup>	AE <sup>x</sup>	% <sup>y</sup>		PICE <sup>z</sup>	Efecto	PICE <sup>z</sup>	IA <sup>z</sup>	Efecto		
Mi	20	OMen	20	75,2	a	40,5	b	Sinergismo	40,5	1,81	Sinergismo
Mi	40	OCor	20	100,0	a	66,5	b	<b>Sinergismo</b>	60,6	1,65	<b>Sinergismo</b>
	20		40	99,0	a	80,0	b	<b>Sinergismo</b>	64,0	1,55	<b>Sinergismo</b>
	20		20	100,0	a	51,1	b	<b>Sinergismo</b>	46,8	2,14	<b>Sinergismo</b>
Mi	40	OCom	20	100,0	a	66,5	b	<b>Sinergismo</b>	64,9	1,54	<b>Sinergismo</b>
	20		20	88,7	a	51,1	b	Sinergismo	52,6	1,69	Sinergismo
OMen	20	Mp	40	100,0	a	56,9	b	<b>Sinergismo</b>	56,3	1,78	<b>Sinergismo</b>
	20		20	100,0	a	41,5	b	<b>Sinergismo</b>	41,0	2,44	<b>Sinergismo</b>
OCor	20	Mp	40	100,0	a	66,5	b	<b>Sinergismo</b>	60,6	1,66	<b>Sinergismo</b>
	20		20	100,0	a	51,1	b	<b>Sinergismo</b>	46,8	2,22	<b>Sinergismo</b>
OCom	20	Mp	40	99,1	a	76,3	b	<b>Sinergismo</b>	64,9	1,53	<b>Sinergismo</b>
	20		20	100,0	a	60,9	b	<b>Sinergismo</b>	52,6	1,90	<b>Sinergismo</b>

<sup>x</sup> AE: aceite esencial; OCor (*Origanum vulgare* ssp *hirtum*), OCom (*Origanum vulgare* L. ssp. *Vulgare*), OMen (*Origanum x majoricum*), Mi (*Mentha x piperita* L. var. *Vulgaris Sole*) y Mp (*Mentha x piperita*).

<sup>y</sup> %: porcentaje de la CFM para cada aceite esencial.

<sup>z</sup> PICO: Porcentaje de inhibición del crecimiento observado; PICE: Porcentaje de inhibición del crecimiento esperado; IA: Índice de Abbott. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas según test LSD de Fisher ( $P < 0.05$ ).

\* Palabras en negrita indican combinaciones sinérgicas que inhibieron completamente el crecimiento del hongo.

**Interacción de los aceites esenciales de orégano con suico y laurel.** Las mezclas de AEs donde se observó sinergismo se presentan en la Tabla 6.5. Dentro de estas combinaciones, seis demostraron capacidad para controlar completamente el crecimiento del hongo. OCom en combinación con Su, como así también OCor en combinación con Su y La, inhibieron 100% a *P. minioluteum* debido a la interacción sinérgica.

Tabla 6.5. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales de orégano, suico y laurel contra *Penicillium minioluteum* según método aditivo y de Abbott.

A		B		PICO <sup>z</sup>	Método aditivo *			Método Abbott *			
AE <sup>x</sup>	% <sup>y</sup>	AE <sup>x</sup>	% <sup>y</sup>		PICE <sup>z</sup>	Efecto	PICE <sup>z</sup>	IA <sup>z</sup>	Efecto		
OMen	20	Su	60	83,8	a	53,9	b	Sinergismo	53,4	1,57	Sinergismo
	20		20	79,1	a	44,0	b	Sinergismo	43,6	1,82	Sinergismo
OMen	20	La	60	89,0	a	51,3	b	Sinergismo	50,8	1,75	Sinergismo
	20		40	75,4	a	47,3	b	Sinergismo	46,9	1,61	Sinergismo
OCom	20	Su	40	100,0	a	71,4	b	<b>Sinergismo</b>	60,9	1,64	<b>Sinergismo</b>
OCor	20	Su	40	100,0	a	61,6	b	<b>Sinergismo</b>	56,1	1,84	<b>Sinergismo</b>
	20		20	98,4	a	53,7	b	<b>Sinergismo</b>	49,1	2,00	<b>Sinergismo</b>
OCor	40	La	40	100,0	a	85,9	b	<b>Sinergismo</b>	67,6	1,61	<b>Sinergismo</b>
	20		80	100,0	a	75,8	b	<b>Sinergismo</b>	68,9	1,66	<b>Sinergismo</b>
	20		60	84,8	a	60,9	b	Sinergismo	55,6	1,53	Sinergismo
	20		40	100,0	a	57,0	b	<b>Sinergismo</b>	52,1	2,24	<b>Sinergismo</b>
	20		20	83,5	a	56,2	b	Sinergismo	51,3	1,63	Sinergismo

<sup>x</sup> AE: aceite esencial; OCor (*Origanum vulgare* ssp *hirtum*), OCom (*Origanum vulgare* L. ssp. *Vulgare*), OMen (*Origanum x majoricum*), Su (*Tagetes minuta* L.) y La (*Laurus nobilis* L.).

<sup>y</sup> %: porcentaje de la CFM para cada aceite esencial.

<sup>z</sup> PICO: Porcentaje de inhibición del crecimiento observado; PICE: Porcentaje de inhibición del crecimiento esperado; IA: Índice de Abbott. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas según test LSD de Fisher ( $P < 0.05$ ).

\* Palabras en negrita indican combinaciones sinérgicas que inhibieron completamente el crecimiento del hongo.

**Interacción de los aceites esenciales de mentas, suico y laurel.** Todas las interacciones resultantes de las combinaciones posibles entre Mi, Mp, Su y La, fueron determinadas como Aditividad de acuerdo al método Abbott, y como antagonismo y aditividad de acuerdo al método aditivo (Anexo 2).

## INTERACCIÓN ENTRE ACEITES ESENCIALES Y FUNGICIDA SINTÉTICO PARA EL CONTROL DE *A. flavus*

Los AEs en todas sus concentraciones se combinaron con diferentes concentraciones de fungicida sintético en busca de interacciones aditivas o sinérgicas que permitan reducir la dosis requerida del pesticida (Anexo 2). La CFM del fungicida sintético para *A. flavus* fue determinada en 100  $\mu\text{L L}^{-1}$ . La tabla 6.6 indica todas aquellas combinaciones con aditividad o sinergismo en algún método. Se encontraron un total de 40 posibles combinaciones que permitieron un control total de *A. flavus*. El AE de OMen presentó la mayor cantidad de interacciones aditivas.

Tabla 6.6. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales y el fungicida sintético contra *Aspergillus flavus* según método aditivo y de Abbott.

F <sup>x</sup>	AE <sup>x</sup>	PICO <sup>z</sup>			Método aditivo *			Método Abbott *		
% <sup>y</sup>	% <sup>y</sup>				PICE <sup>z</sup>	Efecto		PICE <sup>z</sup>	IA <sup>z</sup>	Efecto
40	Su	40	73,9	a	75,7	a	Aditividad	71,8	1,03	Aditividad
40		80	100,0	a	100,0	a	<b>Aditividad</b>	93,2	1,11	<b>Aditividad</b>
60		20	78,2	a	72,0	a	Aditividad	71,1	1,10	Aditividad
60		40	92,7	a	76,3	a	<b>Aditividad</b>	72,4	1,28	<b>Aditividad</b>
60		60	91,1	a	100,0	a	<b>Aditividad</b>	84,0	1,08	<b>Aditividad</b>
60		80	100,0	a	100,0	a	<b>Aditividad</b>	93,3	1,18	<b>Aditividad</b>
80		20	78,2	a	77,0	a	Aditividad	76,1	1,03	Aditividad
80		40	98,9	a	81,3	a	<b>Aditividad</b>	77,1	1,28	<b>Aditividad</b>
80	60	97,6	a	100,0	a	<b>Aditividad</b>	86,8	1,12	<b>Aditividad</b>	
80	80	98,4	a	100,0	a	<b>Aditividad</b>	94,5	1,04	<b>Aditividad</b>	
40	La	80	88,3	b	100,0	a	Antagonismo	85,6	1,03	Aditividad
60		20	100,0	a	72,2	b	<b>Sinergismo</b>	71,2	1,42	<b>Aditividad</b>
60		40	100,0	a	94,5	a	<b>Aditividad</b>	77,7	1,32	<b>Aditividad</b>
60		60	95,2	a	100,0	a	<b>Aditividad</b>	83,3	1,14	<b>Aditividad</b>
60		80	98,6	a	100,0	a	<b>Aditividad</b>	85,8	1,15	<b>Aditividad</b>
80		20	100,0	a	77,2	b	<b>Sinergismo</b>	76,1	1,36	<b>Aditividad</b>
80		40	97,3	a	99,5	a	<b>Aditividad</b>	81,5	1,19	<b>Aditividad</b>
80		60	96,7	a	100,0	a	<b>Aditividad</b>	86,1	1,12	<b>Aditividad</b>
80	80	84,0	a	100,0	a	Aditividad	88,3	0,95	Aditividad	
20	Mi	20	60,0	a	55,9	a	Aditividad	55,2	1,09	Aditividad
20		40	89,0	a	66,6	b	Sinergismo	60,1	1,48	Aditividad
20		60	95,6	a	100,0	a	<b>Aditividad</b>	79,4	1,20	<b>Aditividad</b>
20		80	90,0	a	100,0	a	<b>Aditividad</b>	90,9	0,99	<b>Aditividad</b>
40		20	100,0	a	71,4	b	<b>Sinergismo</b>	70,5	1,49	<b>Aditividad</b>
40		40	95,0	a	82,1	a	<b>Aditividad</b>	73,7	1,29	<b>Aditividad</b>
40		60	100,0	a	100,0	a	<b>Aditividad</b>	86,4	1,16	<b>Aditividad</b>
60		20	94,2	a	72,0	b	<b>Sinergismo</b>	71,1	1,32	<b>Aditividad</b>
60	40	100,0	a	82,7	a	<b>Aditividad</b>	74,3	1,35	<b>Aditividad</b>	
60	60	100,0	a	100,0	a	<b>Aditividad</b>	86,7	1,15	<b>Aditividad</b>	
60	80	100,0	a	100,0	a	<b>Aditividad</b>	94,1	1,06	<b>Aditividad</b>	
80	20	100,0	a	77,0	a	<b>Aditividad</b>	76,1	1,31	<b>Aditividad</b>	
80	40	100,0	a	87,7	a	<b>Aditividad</b>	78,7	1,29	<b>Aditividad</b>	
80	60	100,0	a	100,0	a	<b>Aditividad</b>	89,0	1,22	<b>Aditividad</b>	
80	80	87,2	a	100,0	a	Aditividad	95,1	0,92	Aditividad	
20	Mp	20	45,0	a	56,1	a	Aditividad	55,3	0,81	Aditividad
20		40	74,0	a	64,7	a	Aditividad	59,2	1,25	Aditividad
20		60	80,6	a	100,0	a	Aditividad	77,1	1,04	Aditividad
40		20	90,0	a	71,6	a	<b>Aditividad</b>	70,6	1,28	<b>Aditividad</b>
40		40	80,0	a	80,2	a	Aditividad	73,2	1,09	Aditividad
40		60	85,0	a	100,0	a	Aditividad	84,9	1,00	Aditividad
60		20	79,2	a	72,2	a	Aditividad	71,2	1,11	Aditividad
60		40	85,4	a	80,8	a	Aditividad	73,7	1,16	Aditividad
60	60	85,0	a	100,0	a	Aditividad	85,2	1,00	Aditividad	
60	80	85,0	a	100,0	a	Aditividad	89,8	0,95	Aditividad	
80	20	85,0	a	77,2	a	Aditividad	76,1	1,12	Aditividad	

Tabla 6.6. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales y el fungicida sintético contra *Aspergillus flavus* según método aditivo y de Abbott. Continuación.

F <sup>x</sup>	AE <sup>x</sup>	PICO <sup>z</sup>			Método aditivo *			Método Abbott *		
% <sup>y</sup>	% <sup>y</sup>				PICE <sup>z</sup>	Efecto		PICE <sup>z</sup>	IA <sup>z</sup>	Efecto
80		40	86,4	a	85,8	a	Aditividad	78,2	1,10	Aditividad
80		60	93,7	a	100,0	a	<b>Aditividad</b>	87,8	1,07	<b>Aditividad</b>
20	OMen	20	61,6	a	62,1	a	Aditividad	58,0	1,06	Aditividad
20		40	67,9	a	71,8	a	Aditividad	62,4	1,09	Aditividad
40		20	74,0	a	77,6	a	Aditividad	72,4	1,02	Aditividad
40		40	80,2	a	87,3	a	Aditividad	75,3	1,07	Aditividad
40		60	94,6	a	100,0	a	<b>Aditividad</b>	81,2	1,16	<b>Aditividad</b>
40		80	90,0	a	100,0	a	<b>Aditividad</b>	89,0	1,01	<b>Aditividad</b>
60		20	99,7	a	78,2	b	<b>Sinergismo</b>	72,9	1,37	<b>Aditividad</b>
60		40	100,0	a	87,9	a	<b>Aditividad</b>	75,8	1,35	<b>Aditividad</b>
60		60	98,6	a	100,0	a	<b>Aditividad</b>	81,6	1,21	<b>Aditividad</b>
60		80	98,4	a	100,0	a	<b>Aditividad</b>	89,2	1,10	<b>Aditividad</b>
80		20	100,0	a	83,2	a	<b>Aditividad</b>	77,6	1,35	<b>Aditividad</b>
80		40	100,0	a	92,9	a	<b>Aditividad</b>	79,9	1,32	<b>Aditividad</b>
80		60	100,0	a	100,0	a	<b>Aditividad</b>	84,8	1,21	<b>Aditividad</b>
80		80	99,3	a	100,0	a	<b>Aditividad</b>	91,1	1,09	<b>Aditividad</b>
20	OCom	20	43,7	a	57,8	a	Aditividad	56,1	0,78	Aditividad
20		40	67,1	a	64,8	a	Aditividad	59,3	1,13	Aditividad
20		60	59,4	a	68,3	a	Aditividad	60,8	0,98	Aditividad
20		80	90,4	a	91,8	a	<b>Aditividad</b>	71,5	1,26	<b>Aditividad</b>
40		20	63,8	a	73,3	a	Aditividad	71,1	0,90	Aditividad
40		60	74,7	a	83,8	a	Aditividad	74,2	1,01	Aditividad
60		20	56,1	a	73,9	a	Aditividad	71,7	0,78	Aditividad
60		40	73,7	a	80,9	a	Aditividad	73,7	1,00	Aditividad
60		60	71,0	a	84,4	a	Aditividad	74,7	0,95	Aditividad
60		80	93,8	a	100,0	a	<b>Aditividad</b>	81,6	1,15	<b>Aditividad</b>
80		20	84,6	a	78,9	a	Aditividad	76,5	1,11	Aditividad
80		40	88,4	a	85,9	a	Aditividad	78,2	1,13	Aditividad
80		60	99,6	a	89,4	a	<b>Aditividad</b>	79,1	1,26	<b>Aditividad</b>
80		80	100,0	a	100,0	a	<b>Aditividad</b>	84,8	1,21	<b>Aditividad</b>
20	OCor	20	44,2	a	56,11	a	Aditividad	55,3	0,80	Aditividad
20		40	55,1	a	61,83	a	Aditividad	57,9	0,95	Aditividad
20		80	77,8	a	86,23	a	Aditividad	69,0	1,13	Aditividad
40		20	74,5	a	71,6	a	Aditividad	70,6	1,06	Aditividad
40		40	55,2	a	77,32	a	Aditividad	72,3	0,76	Aditividad
40		60	71,0	a	87,66	a	Aditividad	75,4	0,94	Aditividad
60		20	89,6	a	72,21	a	Aditividad	71,2	1,26	Aditividad
60		40	90,0	a	77,93	a	<b>Aditividad</b>	72,9	1,23	<b>Aditividad</b>
60		60	91,8	a	88,27	a	<b>Aditividad</b>	75,9	1,21	<b>Aditividad</b>
60		80	99,6	a	100	a	<b>Aditividad</b>	80,0	1,25	<b>Aditividad</b>
80		20	83,5	a	77,23	a	Aditividad	76,1	1,10	Aditividad
80		40	85,8	a	82,95	a	Aditividad	77,5	1,11	Aditividad
80		60	91,5	a	93,29	a	<b>Aditividad</b>	80,0	1,14	<b>Aditividad</b>
80		80	99,5	a	100	a	<b>Aditividad</b>	83,4	1,19	<b>Aditividad</b>

<sup>x</sup> AE: aceite esencial; OCor (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*), OCom (*Origanum vulgare* L. ssp. *Vulgare*), OMen (*Origanum x majoricum*), Mi (*Mentha x piperita* L. var. *Vulgaris Sole*), Mp (*Mentha x piperita*), Su (*Tagetes minuta* L.) y La (*Laurus nobilis* L.). F: fungicida sintético (Fludioxonil).

<sup>y</sup> %: porcentaje de la CFM para cada aceite esencial y el fungicida sintético.

<sup>z</sup> PICO: Porcentaje de inhibición del crecimiento observado; PICE: Porcentaje de inhibición del crecimiento esperado; IA: Índice de Abbott. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas según test LSD de Fisher ( $P < 0.05$ ).

\* Palabras en **negrita** indican combinaciones sinérgicas o aditivas que inhibieron completamente el crecimiento del hongo.

## INTERACCIÓN ENTRE ACEITES ESENCIALES Y FUNGICIDA SINTÉTICO PARA EL CONTROL DE *P. minioluteum*

La CFM del fungicida sintético para *P. minioluteum* fue determinada en 200  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Se evaluaron todas las combinaciones del fungicida sintético con todos los AEs para el control de *P. minioluteum* (Anexo 2). En general, se observaron menos combinaciones con aditividad y sólo 10 de ellas inhibieron completamente el control de *P. minioluteum* (Tabla 6.7).

Tabla 6.7. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales y el fungicida sintético contra *Penicillium minioluteum* según método aditivo y de Abbott.

F <sup>x</sup> % <sup>y</sup>	AE <sup>x</sup> % <sup>y</sup>	PICO <sup>z</sup>	Método aditivo *				Método Abbott *			
			PICE <sup>z</sup>	Efecto	PICE <sup>z</sup>	IA <sup>z</sup>	Efecto			
20	Su	20	25,6	a	23,0	a	Antagonismo	21,7	1,18	Aditividad
20		40	48,0	a	40,2	a	Aditividad	36,6	1,31	Aditividad
20		60	53,6	a	57,2	a	Aditividad	51,3	1,04	Aditividad
20		80	65,6	a	61,9	a	Aditividad	55,3	1,19	Aditividad
40		20	43,8	a	63,5	a	Aditividad	58,3	0,75	Aditividad
80	La	80	93,4	a	100,0	a	Aditividad	88,0	1,06	Aditividad
20		20	24,1	b	54,07	a	Antagonismo	48,6	0,50	Aditividad
20		40	41,3	a	55,55	a	Aditividad	49,9	0,83	Aditividad
20		60	46,7	a	66,23	a	Aditividad	59,1	0,79	Aditividad
20		80	91,1	a	100	a	<b>Aditividad</b>	92,0	0,99	<b>Aditividad</b>
20	Mi	20	1,0	b	39,28	a	Antagonismo	35,8	0,03	Antagonismo
80		80	91,1	a	100	a	<b>Aditividad</b>	92,0	0,99	<b>Aditividad</b>
20	Mp	20	11,4	b	39,28	a	Antagonismo	11,4	0,42	Antagonismo
80		80	95,9	a	100	a	<b>Aditividad</b>	95,9	1,03	<b>Aditividad</b>
20	OMen	20	22,8	a	22,43	a	Aditividad	21,2	1,07	Aditividad
20		80	94,2	a	100	a	Aditividad	89,1	1,06	Aditividad
40		20	56,0	a	62,86	a	Aditividad	58,0	0,97	Aditividad
40		80	88,1	a	100	a	Aditividad	94,2	0,94	Aditividad
60		40	60,5	a	100	a	Aditividad	86,0	0,70	Aditividad
60		60	91,2	a	100	a	<b>Aditividad</b>	91,3	1,00	<b>Aditividad</b>
60		80	91,2	a	100	a	<b>Aditividad</b>	95,2	0,96	<b>Aditividad</b>
80		40	66,7	b	100	a	Aditividad	91,4	0,73	Aditividad
80		60	57,3	b	100	a	Aditividad	94,7	0,61	Aditividad
80		80	93,0	a	100	a	<b>Aditividad</b>	97,1	0,96	<b>Aditividad</b>
20	OCom	20	31,4	a	45,65	a	Aditividad	41,3	0,76	Aditividad
20		60	62,1	a	79,34	a	Aditividad	70,5	0,88	Aditividad

Tabla 6.7. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales y el fungicida sintético contra *Penicillium minioluteum* según método aditivo y de Abbott. Continuación.

F <sup>x</sup>	AE <sup>x</sup>	PICO <sup>z</sup>			Método aditivo *			Método Abbott *		
% <sup>y</sup>	% <sup>y</sup>				PICE <sup>z</sup>	Efecto		PICE <sup>z</sup>	IA <sup>z</sup>	Efecto
20		80	88,4	a	100	a	Aditividad	89,1	0,99	Aditividad
40		80	85,8	a	100	a	Aditividad	94,2	0,91	Aditividad
80		20	89,6	a	100	a	Aditividad	84,2	1,06	Aditividad
80		60	100,0	a	100	a	<b>Aditividad</b>	92,0	1,09	<b>Aditividad</b>
80		<b>80</b>	<b>100,0</b>	<b>a</b>	<b>100</b>	<b>a</b>	Aditividad	<b>97,1</b>	<b>1,03</b>	Aditividad
20	OCor	20	59,0	a	23,09	b	Sinergismo	21,8	2,71	Sinergismo
40		20	45,4	a	63,52	a	Aditividad	58,3	0,78	Aditividad
40		60	84,7	a	100	a	Aditividad	84,5	1,00	Aditividad
60		40	74,7	a	100	a	Aditividad	82,5	0,91	Aditividad
60		60	96,9	a	100	a	<b>Aditividad</b>	87,2	1,11	<b>Aditividad</b>
60		80	95,7	a	100	a	<b>Aditividad</b>	88,7	1,08	<b>Aditividad</b>
80		40	95,4	a	100	a	<b>Aditividad</b>	89,2	1,07	<b>Aditividad</b>
80		60	100,0	a	100	a	<b>Aditividad</b>	92,1	1,18	<b>Aditividad</b>

<sup>x</sup> AE: aceite esencial; OCor (*Origanum vulgare* ssp *hirtum*), OCom (*Origanum vulgare* L. ssp. *Vulgare*), OMen (*Origanum x majoricum*), Mi (*Mentha x piperita* L. var. *Vulgaris* Sole), Mp (*Mentha x piperita*), Su (*Tagetes minuta* L.) y La (*Laurus nobilis* L.). F: fungicida sintético (Fludioxonil).

<sup>y</sup> %: porcentaje de la CFM para cada aceite esencial y el fungicida sintético.

<sup>z</sup> PICO: Porcentaje de inhibición del crecimiento observado; PICE: Porcentaje de inhibición del crecimiento esperado; IA: Índice de Abbott. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas según test LSD de Fisher ( $P < 0.05$ ).

\* Palabras en negrita indican combinaciones sinérgicas o aditivas que inhibieron completamente el crecimiento del hongo.

## DISCUSIÓN

Los AEs son productos naturales en donde se encuentran mezclados numerosos componentes con propiedades múltiples (Bassolé y Juliani, 2012). Todos los AEs fueron combinados en diferentes concentraciones entre sí y evaluados para el control de *A. flavus* y *P. minioluteum*. Las combinaciones tuvieron efecto sinérgico, aditivo o antagónico, dependiendo del AE y de su concentración. Cuando se combinaron entre sí los diferentes tipos de orégano, al igual que las mentas, la interacción resultó mayoritariamente del tipo aditivo, con algunos casos de sinergismo. Por el contrario, interacciones sinérgicas fueron frecuentemente observadas cuando se combinaron los AEs de diferentes especies. En general, se determinó sinergismo principalmente en combinaciones de oréganos con suico y laurel para el caso de *A. flavus*. En el control de *P. minioluteum*, también se obtuvo este tipo de efecto en combinaciones de orégano con mentas en adición a los descriptos anteriormente.

El mecanismo de acción relacionado a la actividad antifúngica permitió diferenciar a los AEs en grupos, como se describió previamente (Capítulo 5). La oxidación de lípidos de la membrana juega un rol importante en suico, laurel y mentas, pero no en oréganos. En este aspecto, la mayor diferencia se observó entre los AEs de oréganos y suico. Por lo tanto, la marcada interacción entre estos dos AEs puede ser explicada por su diferente mecanismo de acción. La actividad biológica de un determinado componente puede estar modulado por otras moléculas que pueden influir en la penetración celular y su posterior distribución dentro de la misma (Bakkali *et al.*, 2008). Ciertos monoterpenos han demostrado su capacidad para atravesar la membrana plasmática por difusión pasiva, romper puentes de hidrógenos, fuerzas hidrofóbicas y electrostáticas que contienen y acomodan las proteínas. Como resultado la membrana celular cambia su conformación, aumentando su fluidez y permeabilidad (Bakkali *et al.*, 2008; Lucini, 2004). Lucini (2004) estudió el efecto de monoterpenos sobre la membrana de hongos filamentosos, concluyendo que su propiedad surfactante no es la única causa de su acción letal. Considerando esto, otros autores (Pei *et al.*, 2009) han hipotetizado que aquellos componentes de AEs que actúan sobre la membrana celular facilitan la penetración de otros componentes cuyo blanco se encuentra en el interior celular.

Interacciones sinérgicas para potenciar propiedades biológicas han sido investigadas en combinaciones de AEs, como así también en mezclas de AEs con otros componentes individuales (Goñi *et al.*, 2009; Fu *et al.*, 2007; Kalembe y Kunicka, 2003). El efecto bactericida de ciertos AEs se ha potenciado como resultado de su combinación (Goñi *et al.*, 2009). Ciertas combinaciones entre los AEs de romero y clavo fueron reportados por tener actividad sinérgica contra bacterias y levaduras (Fu *et al.*, 2007). Nikkhah *et al.* (2017) demostraron el efecto sinérgico entre AEs de canela, romero y tomillo contra hongos filamentosos.

Bassolé y Juliani (2012) se han enfocado en la interacción entre monoterpenos fenólicos (timol, carvacrol) y fenilpropanoides (eugenol). Otros autores (Mishra *et al.*, 2013) evaluaron la interacción entre varios componentes bioactivos presentes en los AEs estudiados (Capítulo 4), en busca de potenciar su efecto antifúngico. Combinaciones de timol + mentol, timol + eugenol y timol + eugenol + mentol fueron eficientes para control de *A. flavus*, demostrando una mayor actividad antifúngica respecto de su aplicación individual (Mishra *et al.*, 2013). Esto podría explicar el sinergismo observado cuando se realizaron combinaciones de AEs de orégano (timol) con mentas (mentol) y laurel (eugenol). Similares resultados fueron obtenidos por Hossain *et al.* (2016), quienes indicaron el efecto sinérgico entre AEs orégano y menta cultivados en Bélgica para el control de *A. flavus* y *P. chysogenum*. Por otro lado, la combinación de eugenol + mentol presentó una actividad antifúngica similar a la de sus dosis individuales (Mishra *et al.*, 2013). Este efecto aditivo fue determinado en las combinaciones entre mentas y laurel.

La eficacia de los compuestos naturales es menor que la de los fungicidas sintéticos, por lo que requieren de mayores dosis y aplicaciones más frecuentes (Montes-Belmont, 2009; Pyun y Shin, 2006; Isman, 2000). Estudiar la combinación de compuestos naturales con fungicidas u otros productos de origen sintético permite reconocer interacciones aditivas ó sinérgicas que posibilitan la reducción de las dosis de los pesticidas sin disminuir su capacidad inhibitoria (Camiletti *et al.*, 2016; Gadban, 2011; Thompson y Kreutrweiser, 2007; Pyun y Shin, 2006) Estas interacciones pueden ser utilizadas para disminuir la dosis de producto sintético aplicada a los cultivos, dentro de estrategias para reducir su impacto ambiental negativo (Thompson y Kreutrweiser, 2007). En este capítulo, se estudiaron las interacciones entre los AEs y el fungicida sintético cuyo ingrediente activo fue fludioxonil. Este compuesto químico posee como modo de

acción la inhibición de la fosforilación de la glucosa, lo que resulta en una inhibición del crecimiento micelial (PPDB, 2017). Mecanismos de acción específicos como este favorecen el desarrollo de resistencia, lo que también genera una necesidad de buscar opciones que suplementen su bioactividad (Sosa-Gomez *et al.*, 2003; Gullino *et al.*, 2000; Isman, 2000).

No se detectaron interacciones sinérgicas significativas entre los AEs y el fungicida sintético, siendo en su mayoría del tipo aditivo. Sin embargo, esto permitió mantener la capacidad antifúngica disminuyendo la dosis necesaria del pesticida. Todos los AEs presentaron combinaciones determinadas como aditividad. Algunos casos de antagonismo se manifestaron con la dosis más baja de fungicida sintético, como también indicó Gadban (2011). Existen estudios sobre combinaciones efectivas de AEs y fungicidas químicos para el control de patógenos fúngicos. Combinaciones aditivas de AE de *Tagete filifolia* con fungicidas de los grupos triazoles, benzimidazoles y estrobilurinas han permitido disminuir la cantidad necesaria de producto químico a utilizar contra *Colletotrichum* spp (Gadban, 2011). Aplicaciones a campo de mezcla de AE de laurel y el fungicida Iprodione con efecto aditivo han sido efectivas para el control de *Sclerotium* spp. en cultivos de ajo, logrando una reducción en la cantidad de pesticida aplicado (Camiletti *et al.*, 2016). Lucini (2004) indicó que ciertos monoterpenos incrementan la actividad fungicida del Iprodione (fungicida sintético) sobre *Sclerotium* sp. y *Sclerotinia* sp. debido a los cambios inducidos por estos compuestos naturales en la membrana plasmática. Cuando se trata de la combinación de un fungicida sintético y un aceite esencial, la ventaja radica en el menor impacto sobre la salud y el ambiente asociado al uso de un producto natural (Gadban, 2011).

La interacción entre dos compuestos dependió de las dosis empleada de cada uno, de sus mecanismos de acción, de la metodología empleada y de la sensibilidad de los organismos expuestos. Este aspecto fue señalado previamente por Gadban (2011), quien indicó que una misma mezcla de AE y fungicida sintético puede tener respuestas sinérgicas, aditivas y antagónicas sobre diferentes microorganismos y de acuerdo a la metodología utilizada.

## CONCLUSIONES

- Los aceites esenciales con diferentes mecanismos de acción se potencian cuando son combinados entre sí y pueden ser utilizados en forma conjunta.
- Los aceites esenciales de orégano combinados con menta, suico o laurel presentan interacciones sinérgicas que potencian el efecto antifúngico de la mezcla natural contra *A. flavus* y *P. minioluteum*.
- Los aceites esenciales estudiados pueden ser combinados con el fungicida sintético para disminuir la dosis requerida del mismo sin afectar la capacidad antifúngica.
- El tipo de interacción entre compuestos naturales depende de su concentración, modo de acción, microorganismo a controlar y metodología empleada.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbott W. S. 1925. A method of computing effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265–267.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. and Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils. *Food Chem. Toxicol.* 46: 446–75.
- Barry A. L. 1976. *The antimicrobial susceptibility test: Principles and practices.* Lea & Febi, Philadelphia, 236 pp.
- Bassolé I. H. N. and Juliani H. R. 2012. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules* 17: 3989–4006.
- Camiletti B. X., Asensio C. M., Gadban L. C., Pecci M. de la P. G., Conles M. Y. and Lucini E. I. 2016. Essential oils and their combinations with iprodione fungicide as potential antifungal agents against the rot (*Sclerotium cepivorum* Berk) in garlic (*Allium sativum* L.) crops. *Ind. Crops Prod.* 85: 117–124.
- Davidson P. M. and Parish M. E. 1989. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technol.* 43: 143–155.
- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M. y Robledo C. W. 2014. *InfoStat versión 2014.* Grupo InfoStat. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Duan Y., Ge C., Liu S., Chen C. and Zhou M. 2013. Effect of phenylpyrrole fungicide fludioxonil on morphological and physiological characteristics of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 106: 61–67.
- Errampalli D. 2004. Effect of fludioxonil on germination and growth of *Penicillium expansum* and decay in apple cvs. Empire and Gala. *Crop Prot.* 23: 811–817.
- Fu Y., Zu Y., Chen L., Shi X., Wang Z., Sun S. and Efferth T. 2007. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phyther. Res.* 21: 989–994.
- Gadban L. 2011. Determinación de la actividad sinérgica antifúngica del aceite esencial de *Tagetes filifolia* Lag. y fungicidas sintéticos sobre *Colletotrichum truncatum* (Schw.) Andrus & Moore y *Trichoderma harzianum* Rifai. Tesis Magister. Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina, 108 pp.
- Gehmann K., Nyfeler R., Leadbeater A. J., Nevill D. and Sozzi D. 1990. A new phenylpyrrole fungicide for broad-spectrum disease control. Brighton Crop Protection Conference on Pests and Diseases, Brighton, UK. pp. 369–376.
- Giordani R., Regli P., Kaloustian J., Mikail C., Abou L. and Portugal H. 2004. Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phyther. Res.* 18: 990–995.
- Gisi U. 1991. Sinergism between fungicides for control of *Phytophthora*. En: *Phytophthora*. Lucas, J. A., Shattock, D. S., and Cooke, L. R. (eds.). Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 361–372.
- Goñi P., López P., Sánchez C., Gómez-Lus R., Becerril R. and Nerín C. 2009. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chem.* 116: 982–989.
- Gullino M. L., Leroux P. and Smith C. M. 2000. Uses and challenges of novel compounds for plant disease control. *Crop Prot.* 19: 1–11.

- Hossain F., Follett P., Dang Vu K., Harich M., Salmieri S. and Lacroix M. 2016. Evidence for synergistic activity of plant-derived essential oils against fungal pathogens of food. *Food Microbiol.* 53: 24–30.
- Isman M. B. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot.* 19: 603–608.
- Kalemba D. and Kunicka A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10: 813–829.
- Kosman E. and Cohen Y. 1996. Procedures for calculating and differentiating synergism and antagonism in action of fungicide mixtures. *Phytopathology* 86: 1263–1272.
- Lim S. and Shin S. 2008. combined effects of the essential oil from with ketoconazole againsts *Candida* and *Trichophyton* species. *Nat. Prod. Sci.* 14: 1–2.
- Lopez-Garcia B., Veyrat A., Perez-Paya E., Gonzalez-Candelas L. and Marcos J. F. 2003. Comparison of the activity of antifungal hexapeptides and the fungicides thiabendazole and imazalil against postharvest fungal pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 89: 163–170.
- Lucini E. I. 2004. Cambios en la composición lipídica del micelio de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary y *Sclerotium cepivorum* Berk por acción de terpenos. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba, 114 pp.
- Mishra P., Singh P., Prakash B., Kedia A., Kishore N. and Chanotiya C. S. 2013. Assessing essential oil components as plant-based preservatives against fungi that deteriorate herbal raw materials. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 80: 16–21.
- Montes-Belmont R. 2009. Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Rev. Mex. Micol.* 29: 1–15.
- Mueller D. S., Hartman G. L. and Pedersen W. L. 1999. Development of sclerotia and apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* from infected soybean seed and its control by fungicide seed treatment. *Plant Dis.* 83: 1113–1115.
- Munkvold G. P. 2009. Seed pathology progress in academia and industry. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47: 285–311.
- Nikkhah M., Hashemi M., Habibi Najafi M. B. and Farhoosh R. 2017. Synergistic effects of some essential oils against fungal spoilage on pear fruit. *Int. J. Food Microbiol.* 257: 285–294.
- Pei R. S., Zhou F., Ji B. P. and Xu J. 2009. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved Method. *J. Food Sci.* 74: 379–383.
- PPDB. 2017. Pesticide Properties Data Base. Publicado en internet, disponible en <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/>.
- Pyun M. S. and Shin S. 2006. Antifungal effects of the volatile oils from *Allium* plants against *Trichophyton* species and synergism of the oils with ketoconazole. *Phytomedicine* 13: 394–400.
- Santos L., Marin S., Sanchis V. and Ramos A. J. 2011. In vitro effect of some fungicides on growth and aflatoxins production by *Aspergillus flavus* isolated from *Capsicum* powder. *Food Addit. Contam.* 28: 98–106.
- Schwinn F. and Staub T. 1995. Oomycetes fungicides. En: *Modern selective fungicides: Properties, applications, mechanisms of actions.* Lyr, H. (ed.). Gustav Fischer Verlag, New York, pp. 323–346.
- Solorzano C. D. and Malvick D. K. 2011. Effects of fungicide seed treatments on germination, population, and yield of maize grown from seed infected with fungal pathogens. *F. Crop. Res.* 122: 173–178.

- Sosa-Gomez D. R., Delpin K. E., Moscardi F. and Nozaki M. 2003. The impact of fungicides on *Nomurea rileyi* (Farlow) *Samson epizootics* and populations of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), on soybean. Neotrop. Entomol. 32: 287–291.
- Thompson D. G. and Kreutrweiser D. P. 2007. A review of the environmental fate and effects of natural “reduced-risk” pesticides in Canada. ACS Symp Ser 947: 245–274.

## CAPÍTULO 7

### CONCLUSIONES GENERALES

En el presente trabajo de tesis se estudió la contaminación de espigas de maíz con hongos productores de micotoxinas. Esto permitió evaluar posibles herramientas para su control con el objetivo final de disminuir el contenido de micotoxinas en los granos de maíz. Los resultados obtenidos sientan las bases para el desarrollo de nuevas estrategias destinadas a mejorar la calidad de los granos de maíz cultivados en la región centro-norte de Argentina (regiones I y IV).

El grano de maíz representa un insumo clave para la elaboración de alimentos cuyo destino es el consumo humano. La presencia de micotoxinas es fuertemente regulada debido a su alta toxicidad para la salud humana y a su estabilidad frente a las altas temperaturas. Recientemente, la industria húmeda maicera ha rechazado cerca el 30% de las entradas de granos provenientes de los lotes con estrés por posible contaminación con aflatoxinas. Si los granos que no superan los controles son utilizados para la alimentación del ganado, las micotoxinas pueden ser incorporadas a sus derivados.

En primer lugar, se realizó una caracterización de la población fúngica presente como infección interna en las espigas con especial énfasis en *Aspergillus* sección *Flavi* debido a la toxicidad de las aflatoxinas producidas por *A. flavus* y *A. parasiticus*. De este estudio se pueden resumir las siguientes conclusiones:

- La contaminación de los granos de maíz con hongos causantes de la podredumbre de la espiga comienza durante el desarrollo del cultivo.
- Todos los lotes ubicados en las regiones agrícolas I y IV presentan espigas infectadas internamente con patógenos fúngicos. Con un total de 13 géneros fúngicos identificados, los tres géneros prevalentes son *Fusarium*, *Penicillium* y *Aspergillus*. *A. flavus* frecuentemente coinfecta el cultivo de maíz junto con especies del género *Penicillium*.

- La alta severidad de los géneros prevalentes (hasta 100%) en granos de maíz cultivados en la campaña con escasas precipitaciones indica la presencia natural de inóculo fúngico y resalta la importancia de protección del grano durante el almacenamiento.
- La mayoría de los aislados de *A. flavus* presentes en espigas de maíz cultivadas en las región centro-norte de Argentina producen micotoxinas. El perfil toxigénico se caracteriza por la presencia simultánea de ácido ciclopiazónico y aflatoxina B<sub>1</sub>.
- La producción de micotoxinas por parte de los aislados de *A. flavus* influenciada por el sustrato empleado. El grano de maíz representa un mejor medio para identificar aislados toxigénicos y cuantificar la cantidad potencial de micotoxina que pueden producir.

La presencia de *A. flavus* en espigas de maíz determina que las estrategias de control deben ser enfocadas a evitar la colonización de los granos por parte de los aislados productores de micotoxinas (aflatoxinas y ácido ciclopiazónico) durante el desarrollo del cultivo. Como primera estrategia de control se identificaron aislados atoxigénicos y fueron caracterizados como potenciales agentes de biocontrol, concluyendo que:

- Los aislados atoxigénicos son parte de la población nativa de *A. flavus* presente en espigas de maíz. Sin embargo, se registran con baja frecuencia ya que la mayoría de los aislados tienen la capacidad de producir ácido ciclopiazónico.
- Existe baja diversidad genética entre los aislados de *A. flavus* no productores de aflatoxina presentes en espigas de maíz. Esto podría evidenciar una especialización por el nicho ecológico como han sugerido otros autores.
- Dos aislados atoxigénicos nativos (AS03145 y AS04322) poseen habilidad competitiva y podrían ser utilizados como agentes de biocontrol para reducir la contaminación con micotoxinas en granos de maíz. Estos aislados demostraron poseer habilidad competitiva superior a la del agente biológico utilizado en Estados Unidos en condiciones de laboratorio.
- Los potenciales agentes de biocontrol pertenecen a un grupo de compatibilidad vegetativa ampliamente distribuido, lo que permitiría aplicar el producto a gran escala en ambas regiones estudiadas.

Los aceites esenciales constituyen una fuente natural de productos con capacidad antifúngica y son adecuados para el consumo humano. Estas sustancias pueden ser utilizadas dentro de estrategias de control para patógenos fúngicos tanto en precosecha como en el almacenamiento de los granos. Aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas cultivadas en Córdoba fueron caracterizados y evaluados como antifúngicos contra *A. flavus* y *Penicillium* spp. Las conclusiones derivadas de este estudio fueron:

- Los aceites esenciales de orégano presentan un buen rendimiento en volumen colectado y poseen la mayor actividad antifúngica entre las especies evaluadas. La variedad influye en la composición química del aceite esencial y en su rendimiento, pero no se encuentra asociada a una variación en la capacidad antifúngica.
- La oxidación de lípidos constituye uno de los mecanismos de acción de algunos aceites esenciales, actuando marcadamente en el aceite esencial de suico.
- Algunas combinaciones de aceites esenciales con diferente mecanismo de acción resultan en interacciones sinérgicas que potencian la actividad antifúngica de los mismos. Estos antifúngicos naturales podrían utilizarse en poscosecha de maíz para controlar la contaminación de los patógenos estudiados y, por consiguiente, evitar el incremento en el contenido de micotoxinas.
- Los aceites esenciales estudiados en este trabajo presentan concentraciones fungicidas mínimas superiores a la de los fungicidas sintéticos. Ambos compuestos pueden ser combinados para su aplicación en condiciones de campo, aumentando su eficiencia y reduciendo la dosis necesaria a aplicar del pesticida.

Los resultados obtenidos sientan las bases para el desarrollo de estrategias de control de patógenos fúngicos y reducción del contenido de micotoxinas producidas por *A. flavus* y *Penicillium* spp. en granos y espigas de maíz. A partir de los resultados obtenidos, surgen las futuras líneas de investigación:

- La mayoría de los aislados de *A. flavus* no produjeron estructuras de resistencia. Conocer la forma de supervivencia de los aislados después de la cosecha del cultivo puede brindar información adicional a tener en cuenta para el control del patógeno.
- Los aislados seleccionados como potenciales agentes de biocontrol poseen el *cluster* de genes para la biosíntesis de aflatoxina completo. Determinar la modificación molecular responsable de atoxicidad brindará estabilidad a las cepas y permitirá desarrollar herramientas para su rastreo en aplicaciones a campo. Modificaciones de nucleótidos en los genes podrían explicar esta situación. Estos mismos aspectos deben ser estudiados para el *cluster* responsable de la síntesis de ácido ciclopiazónico.
- Se detectó una gran proporción de aislados de *A. flavus* capaz de sintetizar ácido ciclopiazónico en granos de maíz. Debido a esto, resulta necesario estudiar los niveles de esta micotoxina presente en granos comerciales destinados a consumo humano y animal. Futuros trabajos deberán enfocarse en determinar si esta micotoxina debe ser incluida en los controles reglamentarios para el comercio de granos de maíz.
- Es necesario estudiar la diversidad genética entre aislados no aflatoxigénicos de *A. flavus* presentes naturalmente en el suelo. Los resultados deberán ser comparados con aquellos determinados en este estudio a fin de confirmar si algunos aislados se han especializado en infectar espigas. Más importante aún es determinar si esto influye en la habilidad competitiva de los aislados atoxigénicos.
- Los aislados atoxigénicos determinados en este estudio como potenciales agentes de biocontrol deben ser evaluados en condiciones a campo en aplicaciones individuales o combinadas, comparando los resultados con los obtenidos para agentes de biocontrol comerciales.
- La aplicación a campo de los aceites esenciales se presenta como un desafío debido a su rápida volatilización. Combinaciones de estos compuestos con fungicidas sintéticos se presentan como una alternativa para aplicaciones en el cultivo, pero sus concentraciones deben ser ajustadas a las condiciones naturales.
- La aplicación de aceites esenciales en condiciones atmosféricas controladas puede ser una alternativa para el control de patógenos en almacenamiento. Sin embargo, es necesario realizar estudios complementarios para ajustar la concentración adecuada.

## **PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DE LA TESIS**

1. Boris X. Camiletti, Claudia M. Asensio, María de la Paz Giménez Pecci and Enrique I. Lucini. 2014. Natural control of corn post-harvest fungi *Aspergillus flavus* and *Penicillium* spp. using essential oils from plants grown in Argentina. *Journal of Food Science* 79 (12), M2499-506.
2. Boris X. Camiletti, Ada K. Torrico, M. Fernanda Maurino, Diego Cristos, Carina Magnoli, Enrique I. Lucini, María de la Paz Gimenez Pecci. 2017. Fungal screening and aflatoxin production by *Aspergillus* section *Flavi* isolated from pre-harvest maize ears grown in two Argentine regions. *Crop Protection* 92 (2017), 41 – 48.
3. Boris X. Camiletti, Juan Moral, Claudia M. Asensio, Ada Karina Torrico, Enrique I. Lucini, María de la Paz Giménez Pecci, and Themis J. Michailides. 2018. Characterization of Argentinian endemic *Aspergillus flavus* isolates and their potential use as biocontrol agents for mycotoxins in maize. *Phytopathology*. En prensa.

## **FINANCIAMIENTO UTILIZADO PARA LA REALIZACIÓN DE LA TESIS**

1. 2013-2018. Beca Interna Doctoral CONICET. Título: “Control de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* spp. en poscosecha de maíz mediante la aplicación de aceites esenciales”. Aprobado mediante Resolución N° 4355 de fecha 07 de diciembre de 2012.
2. 2016-2017. BEC.AR – Comisión Fulbright. Estadía Corta de Doctorado (9 meses). Programa de becas de formación en el exterior en Ciencia y Tecnología – Ministerio de modernización. Tema: “Characterization of Argentinian endemic *Aspergillus flavus* isolates and their potential use as biocontrol agents for mycotoxins in maize”. 5 de julio de 2016 al 1 de abril de 2017 en University of California - Davis. Director: PhD. Themis J. Michailides.
3. 2013-2016. Proyecto: “Identificación y desarrollo de protocolos para la detección de patógenos de importancia agrícola”. Financiado por INTA. Directora: Dra. Raquel Mercedes Haelterman. PNPV- 1135022.
4. 2013-2016. Proyecto: “Contaminación con micotoxinas en grano de cereales y oleaginosas en pre y poscosecha: identificación de situaciones de riesgo, desarrollo de pronósticos con base meteorológicas y de buenas prácticas de manejo, internalización territorial”. Financiado por INTA. Director: Dr. Ricardo Carlos Moschini. PNCYO 1127023.
5. 2014-2016. Proyecto: “Utilización de extractos de plantas nativas y cultivadas en la provincia de Córdoba para el control de hongos fitopatógenos”. Subsidiado por SECYT-UNC. Código 05/G588. Director: Dr. Enrique I Lucini. Resolución SECYT 203/14.

## **ANEXO 1**

**Origen geográfico, caracterización de esclerocios, grupo de compatibilidad vegetativa y perfil toxigénico de los aislados nativos de *Aspergillus flavus*.**

Tabla 1. Origen geográfico, caracterización de esclerocios, grupo de compatibilidad vegetativa y perfil toxigénico de los aislados nativos de *Aspergillus flavus* presentes en espigas de maíz en las regiones I y IV durante las campañas 2012/2013, 2013/2014 y 2014/2015.

Región <sup>v</sup>	Aislado	VCG <sup>w</sup>	Esclerocios <sup>x</sup>			AFB <sub>1</sub> (μg g <sup>-1</sup> ) <sup>y</sup>		CPA (μg g <sup>-1</sup> ) <sup>z</sup>	
			n°/cm <sup>2</sup>	Diámetro (μm)	tipo	maíz	YES*	maíz	YES*
I	AS11623	NI	15,71 c	822,06	L	1,003 b	1,403 c	6.098 b	0.470 b
I	AS04722	NI	120 b	477,68	L	8,614 b	0,251 c	8.138 a	0.954 a
I	AS04822	NI	37,5 c	492,49	L	16,841 b	ND	10.147 a	3.958 a
I	AS05122	NI	154,5 a	303,64	S	11,982 b	ND	14.305 a	0.372 b
I	AS05322	NI	21,22 c	688,75	L	3,390 b	ND	5.799 b	4.214 a
I	AS04922	NI	-	-	NP	0,538 b	ND	2.909 b	ND
I	AS10302	AM1	-	-	NP	ND	ND	0.968 b	ND
I	AS10402	AM1	-	-	NP	ND	ND	1.805 b	ND
I	AS11821	AM1	-	-	NP	ND	ND	0.752 b	ND
I	AS04222	AM1	-	-	NP	ND	ND	4.981 a	ND
I	AS04522	AM1	-	-	NP	ND	ND	0.896 b	ND
I	AS05022	AM1	-	-	NP	ND	ND	1.514 b	0.6562 a
I	AS05222	AM1	-	-	NP	ND	ND	2.653 b	0.0189 b
I	AS00019	AM3	-	-	NP	ND	ND	0.804 b	ND
I	AS11622	AM5	-	-	NP	ND	ND	1.972 b	0.0213 b
I	AS04122	AM5	-	-	NP	ND	ND	2.161 b	ND
I	AS04422	AM5	-	-	NP	ND	ND	0.548 b	ND
I	AS04622	AM5	-	-	NP	ND	ND	0.503 b	ND
I	AS04755	AM5	-	-	NP	ND	ND	2.877 b	ND
I	AS00018	AM5	-	-	NP	ND	ND	ND	0.136 b
I	AS01153	NA	-	-	NP	ND	ND	0.729 b	0.414 a
I	AS01756	NA	-	-	NP	ND	ND	ND	0.033 b
I	AS04848	NA	-	-	NP	ND	ND	0.961 b	0.033 b
I	AS05254	NA	-	-	NP	ND	ND	ND	ND
I	AS05544	NA	-	-	NP	ND	ND	ND	ND
I	AS02257	NA	-	-	NP	ND	ND	ND	ND
I	AS03145	AM1	-	-	NP	ND	ND	ND	ND
I	AS03802	AM1	-	-	NP	ND	ND	ND	ND
I	AS04322	AM1	-	-	NP	ND	ND	ND	ND
I	AS04001	AM5	-	-	NP	ND	ND	ND	ND
I	AS10202	AM5	-	-	NP	ND	ND	ND	ND
IV	AS10013	NI	10,67 c	935,07	L	19,717 b	3,611 b	8.724 a	0.470 b
IV	AS10516	NI	18,08 c	614,69	L	9,916 b	4,408 b	ND	0.488 b
IV	AS10919	NI	105,33b	770,22	L	2,408 b	ND c	1.618	0.266 b
IV	AS09611	NI	2,5 c	1046,09	L	2,782 b	0,780 c	ND	0.261 b
IV	AS09813	NI	35,25 c	570,26	L	3,985 b	0,169 c	4.075 b	0.265 b
IV	AS02808	NI	4,25 c	585,07	L	2,409 b	0,889 c	ND	0.138 b
IV	AS07604	NI	194,6 a	203,66	S	26,552 a	1,689 b	14.265 a	0.696 a
IV	AS07804	NI	23,17 c	625,80	L	27,119 a	10,834 b	0.043 b	0.295 b
IV	AS08004	NI	18,6 c	470,28	L	34,786 a	2,024 b	5.342 b	0.405 b
IV	AS08811	NI	19,88 c	625,80	L	11,104 b	1,157 c	21.674 a	0.207 b
IV	AS09011	NI	18,5 c	581,37	L	5,337 b	1,501 b	ND	0.198 b
IV	AS08105	NI	-	-	NP	1,808 b	ND	1.676 b	0.035 b
IV	AS08508	NI	-	-	NP	25,906 a	1,249 c	ND	0.194 b
IV	AS08608	NI	-	-	NP	21,941 a	14,260 a	ND	0.229 b
IV	AS08711	NI	-	-	NP	25,025 a	2,903 b	ND	0.786 b
IV	AS09311	NI	-	-	NP	15,480 b	22,030 a	ND	0.291 b

Tabla 1. Origen geográfico, caracterización de esclerocios, grupo de compatibilidad vegetativa y perfil toxigénico de los aislados nativos de *Aspergillus flavus* presentes en espigas de maíz en las regiones I y IV durante las campañas 2012/2013, 2013/2014 y 2014/2015. Continuación.

IV	AS09411	NI	-	-	NP	1,081 b	ND	8,329 a	0,278 b
IV	AS09511	NI	-	-	NP	13,570 b	0,645 c	ND	0,151 b
IV	AS11215	NI	-	-	NP	10,963 b	1,143 c	ND	0,444 b
IV	AS11415	NI	-	-	NP	14,190 b	2,845 b	2,355 b	1,166 b
IV	AS11515	NI	-	-	NP	8,829 b	1,650 c	2,185 b	0,510 b
IV	AS12114	AM1	-	-	NP	ND	ND	ND	0,286 a
IV	AS12214	AM1	-	-	NP	ND	ND	7,528 a	ND
IV	AS12306	AM1	-	-	NP	ND	ND	2,616 b	ND
IV	AS12410	AM1	-	-	NP	ND	ND	1,742 b	ND
IV	AS12506	AM1	-	-	NP	ND	ND	ND	0,034 b
IV	AS12606	AM1	-	-	NP	ND	ND	ND	0,032 b
IV	AS12707	AM1	-	-	NP	ND	ND	2,767 b	0,033 b
IV	AS12909	AM1	-	-	NP	ND	ND	2,936 b	ND
IV	AS13009	AM1	-	-	NP	ND	ND	ND	0,096 b
IV	AS03917	AM1	-	-	NP	ND	ND	2,156 b	ND
IV	AS05639	AM1	-	-	NP	ND	ND	2,230 b	0,172 b
IV	AS06659	AM1	-	-	NP	ND	ND	0,953 b	ND
IV	AS07517	AM1	-	-	NP	ND	ND	1,035 b	0,144 b
IV	AS07617	AM1	-	-	NP	ND	ND	1,506 b	ND
IV	AS07704	AM1	-	-	NP	ND	ND	2,216	ND
IV	AS10616	AM1	-	-	NP	ND	ND	4,060 a	0,437 a
IV	AS12807	AM2	-	-	NP	ND	ND	1,343 b	0,050 b
IV	AS11108	AM4	-	-	NP	ND	ND	ND	0,981 a
IV	AS10816	AM5	-	-	NP	ND	ND	1,542	ND
IV	AS03326	AM5	-	-	NP	ND	ND	1,376 b	ND
IV	AS03426	AM5	-	-	NP	ND	ND	1,262 b	ND
IV	AS06441	AM5	-	-	NP	ND	ND	0,671 b	0,050 b
IV	AS07417	AM5	-	-	NP	ND	ND	1,724 b	ND
IV	AS07424	AM5	-	-	NP	ND	ND	2,688 b	ND
IV	AS09913	AM5	-	-	NP	ND	ND	1,679 b	0,380 a
IV	AS00001	AM6	-	-	NP	ND	ND	1,230 b	ND
IV	AS06240	NA	-	-	NP	ND	ND	ND	ND
IV	AS07024	NA	-	-	NP	ND	ND	ND	ND
IV	AS04050	AM1	-	-	NP	ND	ND	ND	ND
IV	AS05739	AM1	-	-	NP	ND	ND	ND	ND
IV	AS12012	AM5	-	-	NP	ND	ND	ND	ND

<sup>v</sup> I y IV: regiones maiceras Argentina.

<sup>w</sup> VCG: grupo de compatibilidad vegetativa. NA: no asignado debido a autoincompatibilidad. NI: no investigado. AM1, AM2, AM3, AM4, AM5 y AM6 representan los VCGs establecidos.

<sup>x</sup> (-) = no se observaron esclerocios. Los aislados S y L producen esclerocios con diámetro promedio <400 y>400  $\mu$ m, respectivamente. NP indica que los aislados no produjeron esclerocios en condiciones de laboratorio.

<sup>y</sup> Valores medios (n=6) de AFB<sub>1</sub>(aflatoxina B<sub>1</sub>) en una misma columna (maíz o medio) no compartiendo la misma letra, indica diferencias significativas entre los aislados (ANOVA, DCG test,  $\alpha$  0.05), en base a los datos transformados. ND= no detectado.

<sup>z</sup> Valores medios (n=6) de CPA (ácido ciclopiazónico) en una misma columna (maíz o medio de cultivo) no compartiendo la misma letra, indica diferencias significativas entre los aislados (ANOVA, DCG test,  $\alpha$  0.05), en base a los datos transformados. ND= no detectado.

\*YES = medio de cultivo extracto de levadura y sacarosa.

## **ANEXO 2**

**Interacción de aceites esenciales entre sí y con fungicida sintético para el control de *Aspergillus flavus* y *Penicillium minioluteum*.**

## INTERACCIÓN ENTRE ACEITES ESENCIALES CONTRA *Aspergillus flavus*

Tabla 1. Actividad sinérgica, aditiva o antagonista entre aceites esenciales de orégano contra *Aspergillus flavus* según método aditivo y de Abbott.

A		B		PICO <sup>c</sup>	Método aditivo *		Método Abbott *				
AE <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>	AE <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>		PICE <sup>c</sup>	Efecto	PICE <sup>c</sup>	IA <sup>c</sup>	Efecto		
OMen	80	OCom	80	94,3	a	100,0	a	aditividad	76,83	1.23	aditividad
	80		60	96,9	a	76,74	b	sinergismo	68,15	1.42	aditividad
	80		40	86,8	a	73,26	a	aditividad	66,86	1.30	aditividad
	80		20	99,0	a	66,23	b	<b>sinergismo</b>	64,27	1.54	<b>sinergismo</b>
	60		80	98,8	a	74,17	b	<b>sinergismo</b>	60,42	1.64	<b>sinergismo</b>
	60		60	92,2	a	50,62	b	sinergismo	45,58	2.02	sinergismo
	60		40	73,3	a	47,14	b	sinergismo	43,39	1.69	sinergismo
	60		20	42,5	a	40,11	a	aditividad	38,96	1.09	aditividad
	40		80	48,7	a	54,30	a	aditividad	47,93	1.02	aditividad
	40		60	30,7	a	30,75	a	aditividad	28,42	1.08	aditividad
	40		40	30,7	a	27,27	a	aditividad	25,53	1.20	aditividad
	40		20	33,2	a	20,24	a	aditividad	19,71	1.69	sinergismo
	20		80	48,1	a	44,57	a	aditividad	41,82	1.15	aditividad
	20		60	45,5	a	21,02	b	sinergismo	20,01	2.27	sinergismo
	20		40	10,7	a	17,54	a	antagonismo	16,79	0.64	aditividad
	OMen		80	OCor	80	89,2	a	100.0	a	aditividad	85.06
80		60	96,5		a	76.24	b	sinergismo	81.07	1.19	aditividad
80		40	91.1		a	71.34	b	sinergismo	73.31	1.24	aditividad
80		20	65.2		a	67.84	a	aditividad	69.03	0.95	aditividad
60		80	84.6		a	72.89	a	aditividad	72.21	1.17	aditividad
60		60	94.6		a	47.12	b	sinergismo	64.79	1.46	aditividad
60		40	100		a	42.22	b	<b>sinergismo</b>	50.36	1.99	<b>sinergismo</b>
60		20	79.5		a	38.72	b	sinergismo	42.40	1.88	sinergismo
40		80	90.5		a	53.02	b	sinergismo	63.44	1.43	aditividad
40		60	73.0		a	27.25	b	sinergismo	53.68	1.36	aditividad
40		40	16.1		a	22.35	a	aditividad	34.70	0.47	antagonismo
40		20	12.8		a	18.85	a	aditividad	24.22	0.53	antagonismo
20		80	95.9		a	43.29	b	sinergismo	59.15	1.62	sinergismo
20		60	61.6		a	17.52	b	sinergismo	48.24	1.28	aditividad
20		40	52.4		a	12.62	b	sinergismo	27.03	1.94	sinergismo
OCor		80	OCom		80	94.3	a	100.0	a	aditividad	76.8
	80	60		96.9	a	76.7	b	sinergismo	68.1	1.42	aditividad
	80	40		86.8	a	73.3	a	aditividad	66.9	1.30	aditividad
	80	20		99.8	a	66.2	b	<b>sinergismo</b>	64.3	1.54	<b>sinergismo</b>
	60	80		98.8	a	74.2	b	<b>sinergismo</b>	60.4	1.64	<b>sinergismo</b>
	60	60		92.2	a	50.6	b	sinergismo	45.6	2.02	sinergismo
	60	40		73.3	a	47.1	b	sinergismo	43.4	1.69	sinergismo
	60	20		42.5	a	40.1	a	aditividad	39.0	1.09	aditividad
	40	80		48.7	a	54.3	a	aditividad	47.9	1.02	aditividad
	40	60		30.7	a	30.8	a	aditividad	28.4	1.08	aditividad

Tabla 1. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales de orégano contra *Aspergillus flavus* según método aditivo y de Abbott. Continuación.

40	40	30.7	a	27.3	a	aditividad	25.5	1.20	aditividad
40	20	33.2	a	20.2	a	aditividad	19.7	1.69	sinergismo
20	80	48.1	a	44.6	a	aditividad	41.8	1.15	aditividad
20	60	45.5	a	21.0	b	sinergismo	20.0	2.27	sinergismo
20	40	10.7	a	17.5	a	aditividad	16.8	0.64	aditividad
20	20	50.2	a	10.5	b	sinergismo	10.3	4.89	sinergismo

<sup>a</sup>AE: aceite esencial; OCor (*Origanum vulgare* ssp *hirtum*), OCom (*Origanum vulgare* L. ssp. *Vulgare*) y OMen (*Origanum x majoricum*).

<sup>b</sup> %: porcentaje de la CFM para cada aceite esencial.

<sup>c</sup> PICO: Porcentaje de inhibición del crecimiento observado; PICE: Porcentaje de inhibición del crecimiento esperado; IA: Índice de Abbott. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas según test LSD de Fisher ( $\alpha = 0.05$ ).

\* Palabras en negrita indican combinaciones sinérgicas que inhibieron completamente el crecimiento del hongo.

Tabla 2. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales de menta contra *Aspergillus flavus* según método aditivo y de Abbott.

A		B		PICO <sup>c</sup>	Método aditivo *			Método Abbott *			
AE <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>	AE <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>		PICE <sup>c</sup>	Efecto	PICE <sup>c</sup>	IA <sup>c</sup>	Efecto		
Mi	80	Mp	80	96.7	a	100.0	a	aditividad	94.19	1.03	aditividad
	80		60	100.0	a	100.0	a	aditividad	88.17	1.13	aditividad
	80		40	100.0	a	100.0	a	aditividad	82.85	1.21	aditividad
	80		20	90.0	a	84.8	a	aditividad	80.23	1.12	aditividad
	60		80	88.3	a	100.0	a	aditividad	86.89	1.02	aditividad
	60		60	54.2	b	100.0	a	antagonismo	73.31	0.74	aditividad
	60		40	58.2	b	75.5	a	antagonismo	61.30	0.95	aditividad
	60		20	60.5	a	59.5	a	aditividad	55.38	1.09	aditividad
	40		80	84.7	a	97.2	a	aditividad	86.89	0.97	aditividad
	40		60	70.6	a	73.1	a	aditividad	73.31	0.96	aditividad
	40		40	0.0	b	33.0	a	antagonismo	61.30	0.00	antagonismo
	40		20	0.0	b	17.0	a	antagonismo	55.38	0.00	antagonismo
	20		80	100.0	a	86.2	a	aditividad	71.50	1.40	aditividad
	20		60	89.4	a	62.2	b	sinergismo	41.99	2.13	sinergismo
	20		40	4.7	b	22.0	a	antagonismo	15.87	0.29	antagonismo
	20		20	1.5	b	6.0	a	antagonismo	2.99	0.49	antagonismo

<sup>a</sup>AE: aceite esencial; Mi (*Mentha x piperita* L. var. *Vulgaris Sole*), Mp (*Mentha x piperita*).

<sup>b</sup> %: porcentaje de la CFM para cada aceite esencial.

<sup>c</sup> PICO: Porcentaje de inhibición del crecimiento observado; PICE: Porcentaje de inhibición del crecimiento esperado; IA: Índice de Abbott. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas según test LSD de Fisher ( $\alpha = 0.05$ ).

\* Palabras en negrita indican combinaciones sinérgicas que inhibieron completamente el crecimiento del hongo.

Tabla 3. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales de orégano, mentas, suico y laurel contra *Aspergillus flavus* según método aditivo y de Abbott.

A		B		PICO <sup>c</sup>		Método aditivo		Método Abbott					
AE <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>	AE <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>			PICE <sup>c</sup>	Efecto	PICE <sup>c</sup>	IA <sup>c</sup>	Efecto			
OMen	80	Su	80	73.3	b	100.0	a	antagonismo	91.5	0.80	aditividad		
	80		60	99.9	a	100.0	a	aditividad	79.8	1.25	aditividad		
	80		40	94.5	a	68.6	b	sinergismo	65.1	1.45	aditividad		
	80		20	100.0	a	64.1	b	<b>sinergismo</b>	63.5	1.57	<b>sinergismo</b>		
	60		80	69.1	b	100.0	a	antagonismo	85.5	0.81	aditividad		
	60		60	68.4	a	82.4	a	aditividad	65.5	1.04	aditividad		
	60		40	85.1	a	42.5	b	sinergismo	40.4	2.10	sinergismo		
	60		20	100.0	a	38.0	b	<b>sinergismo</b>	37.6	2.66	<b>sinergismo</b>		
	40		80	79.3	a	94.2	a	aditividad	81.0	0.98	aditividad		
	40		60	82.6	a	62.5	b	sinergismo	54.7	1.51	sinergismo		
	40		40	71.3	a	22.6	b	sinergismo	21.6	3.29	sinergismo		
	40		20	20.8	a	18.1	a	aditividad	17.9	1.16	aditividad		
	20		80	76.9	a	84.5	a	aditividad	78.8	0.98	aditividad		
	20		60	74.0	a	52.8	b	antagonismo	49.4	1.50	aditividad		
	20		40	71.0	a	12.9	b	antagonismo	12.4	5.69	sinergismo		
	20		20	71.3	a	8.4	b	antagonismo	8.3	8.55	sinergismo		
	OMen		80	La	80	100.0	a	114.7	a	aditividad	82.1	1.25	aditividad
			80		60	85.9	a	105.9	a	aditividad	78.9	1.09	aditividad
			80		40	86.3	a	86.9	a	aditividad	71.9	1.20	aditividad
			80		20	79.3	a	64.6	a	aditividad	63.7	1.25	aditividad
60		80	94.0		a	88.6	a	aditividad	69.5	1.35	aditividad		
60		60	74.8		a	79.8	a	aditividad	64.0	1.17	aditividad		
60		40	84.7		a	60.8	b	sinergismo	52.0	1.63	sinergismo		
60		20	93.7		a	38.4	b	<b>sinergismo</b>	37.9	2.47	<b>sinergismo</b>		
40		80	91.3		a	68.7	b	<b>sinergismo</b>	59.9	1.52	<b>sinergismo</b>		
40		60	100.0		a	59.9	b	<b>sinergismo</b>	52.6	2.23	<b>sinergismo</b>		
40		40	75.7		a	40.9	b	sinergismo	36.8	2.06	sinergismo		
40		20	13.4		a	18.6	a	aditividad	18.3	0.73	aditividad		
20		80	100.0		a	59.0	b	<b>sinergismo</b>	55.2	1.81	<b>sinergismo</b>		
20		60	100.0		a	50.2	b	<b>sinergismo</b>	47.0	2.13	<b>sinergismo</b>		
20		40	74.1		a	31.2	b	sinergismo	29.4	2.52	sinergismo		
OCom		80	Su		80	78.9	b	100.0	a	antagonismo	85.6	0.92	aditividad
	80	60		97.5	a	82.5	b	<b>sinergismo</b>	64.5	1.51	<b>sinergismo</b>		
	80	40		98.00	b	42.7	a	<b>sinergismo</b>	40.6	2.41	<b>sinergismo</b>		
	80	20		99.1	a	38.2	a	<b>sinergismo</b>	37.8	2.62	<b>sinergismo</b>		
	60	80		73.5	b	90.7	a	antagonismo	80.2	0.92	aditividad		
	60	60		75.6	a	59.0	a	aditividad	52.8	1.43	aditividad		
	60	40		78.0	a	19.1	b	sinergismo	18.4	4.25	sinergismo		
	60	20		75.1	a	14.6	b	sinergismo	14.5	5.19	sinergismo		
	40	80		80.3	a	87.2	a	sinergismo	79.4	1.01	aditividad		
	40	60		91.6	a	55.5	b	<b>sinergismo</b>	50.9	1.80	<b>sinergismo</b>		
	40	40		64.5	a	15.6	b	sinergismo	15.1	4.28	sinergismo		
	40	20		49.2	a	11.1	b	sinergismo	11.0	4.46	sinergismo		
	20	80		80.6	b	80.2	a	aditividad	77.8	1.04	aditividad		
	20	60		81.5	a	48.5	b	sinergismo	47.1	1.73	sinergismo		

Tabla 3. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales de orégano, mentas, suico y laurel contra *Aspergillus flavus* según método aditivo y de Abbott. Continuación.

	20		40	58.4	a	8.6	b	sinergismo	8.4	6.93	sinergismo
	20		20	38.3	a	4.1	b	sinergismo	4.1	9.41	sinergismo
OCom	80	La	80	86.4	a	88.7	a	aditividad	69.6	1.24	aditividad
	80		60	100.0	a	79.9	b	<b>sinergismo</b>	64.0	1.56	<b>sinergismo</b>
	80		40	100.0	a	60.9	b	<b>sinergismo</b>	52.1	1.92	<b>sinergismo</b>
	80		20	89.8	a	38.6	b	sinergismo	38.1	2.36	sinergismo
	60		80	99.5	a	65.2	b	<b>sinergismo</b>	58.2	1.71	<b>sinergismo</b>
	60		60	92.5	a	56.4	b	<b>sinergismo</b>	50.6	1.83	<b>sinergismo</b>
	60		40	69.7	a	37.4	b	sinergismo	34.1	2.04	sinergismo
	60		20	48.3	a	15.0	b	sinergismo	14.8	3.25	sinergismo
	40		80	95.4	a	61.7	b	<b>sinergismo</b>	56.5	1.69	<b>sinergismo</b>
	40		60	77.8	a	52.9	b	sinergismo	48.6	1.60	sinergismo
	40		40	78.9	a	33.9	b	sinergismo	31.5	2.51	sinergismo
	40		20	20.2	a	11.6	a	aditividad	11.4	1.77	sinergismo
	20		80	90.0	a	54.7	b	<b>sinergismo</b>	53.1	1.70	<b>sinergismo</b>
	20		60	67.0	a	45.9	b	sinergismo	44.6	1.50	aditividad
	20		40	54.1	a	26.9	b	sinergismo	26.1	2.07	sinergismo
	20		20	39.1	a	4.5	b	sinergismo	4.5	8.71	sinergismo
OCor	80	Su	80	79.8	b	100.0	a	antagonismo	89.9	0.89	aditividad
	80		60	95.1	a	100.0	a	aditividad	75.9	1.25	aditividad
	80		40	99.9	a	61.4	b	<b>sinergismo</b>	58.3	1.71	<b>sinergismo</b>
	80		20	100.6	a	56.9	b	<b>sinergismo</b>	56.3	1.79	<b>sinergismo</b>
	60		80	71.5	a	10.0	b	sinergismo	87.2	0.82	aditividad
	60		60	73.0	a	89.5	a	aditividad	69.5	1.05	aditividad
	60		40	80.1	a	49.6	b	sinergismo	47.2	1.70	sinergismo
	60		20	86.4	a	45.1	b	sinergismo	44.7	1.93	sinergismo
	40		80	80.2	a	98.3	a	aditividad	82.0	0.98	aditividad
	40		60	88.4	a	66.6	b	sinergismo	57.0	1.55	sinergismo
	40		40	57.6	a	26.7	b	sinergismo	25.5	2.26	sinergismo
	40		20	48.2	a	22.2	b	sinergismo	22.0	2.20	sinergismo
	20		80	78.1	a	85.7	a	aditividad	79.1	0.99	aditividad
	20		60	81.0	a	53.9	b	sinergismo	50.1	1.62	sinergismo
	20		40	65.5	a	14.0	b	sinergismo	13.6	4.83	sinergismo
	20		20	55.1	a	9.6	b	sinergismo	9.5	5.82	sinergismo
OCor	80	La	80	86.4	a	88.7	a		69.6	1.24	aditividad
	80		60	100.0	a	79.9	b	<b>sinergismo</b>	64.0	1.56	<b>sinergismo</b>
	80		40	100.0	a	60.9	b	<b>sinergismo</b>	52.1	1.92	<b>sinergismo</b>
	80		20	89.8	a	38.6	b	sinergismo	38.1	2.36	sinergismo
	60		80	99.5	a	65.2	b	<b>sinergismo</b>	58.2	1.71	<b>sinergismo</b>
	60		60	92.5	a	56.4	b	sinergismo	50.6	1.83	sinergismo
	60		40	69.7	a	37.4	b	sinergismo	34.1	2.04	sinergismo
	60		20	48.3	a	15.0	b	sinergismo	14.8	3.25	sinergismo
	40		80	95.4	a	61.7	b	<b>sinergismo</b>	56.5	1.69	<b>sinergismo</b>
	40		60	77.8	a	52.9	b	sinergismo	48.6	1.60	sinergismo
	40		40	78.9	a	33.9	b	sinergismo	31.5	2.51	sinergismo
	40		20	20.2	a	11.6	a	aditividad	11.4	1.77	sinergismo
	20		80	90.0	a	54.7	b	<b>sinergismo</b>	53.1	1.70	<b>sinergismo</b>
	20		60	67.0	a	45.9	b	sinergismo	44.6	1.50	aditividad

Tabla 3. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales de orégano, mentas, suico y laurel contra *Aspergillus flavus* según método aditivo y de Abbott. Continuación.

	20		40	54.1	a	26.9	b	sinergismo	26.1	2.07	sinergismo
	20		20	39.1	a	4.5	b	sinergismo	4.5	8.71	sinergismo
Mi	80	OCom	80	77.7	b	100.0	a	antagonismo	87.3	0.89	aditividad
	80		60	80.3	a	93.4	a	aditividad	82.6	0.97	aditividad
	80		40	85.9	a	90.0	a	aditividad	81.9	1.05	aditividad
	80		20	85.3	a	82.9	a	aditividad	80.4	1.06	aditividad
	60		80	80.7	a	91.6	a	aditividad	71.4	1.13	aditividad
	60		60	78.8	a	68.1	a	aditividad	60.7	1.30	aditividad
	60		40	86.4	a	64.6	b	sinergismo	59.1	1.46	aditividad
	60		20	83.1	a	57.6	b	sinergismo	55.9	1.49	aditividad
	40		80	87.5	a	49.1	b	sinergismo	44.7	1.96	sinergismo
	40		60	68.7	a	25.6	b	sinergismo	23.9	2.87	sinergismo
	40		40	79.8	a	22.1	b	sinergismo	20.9	3.82	sinergismo
	40		20	49.8	a	15.1	b	sinergismo	14.7	3.39	sinergismo
	20		80	18.9	a	38.2	a	sinergismo	37.8	0.50	aditividad
	20		60	70.8	a	14.6	b	sinergismo	14.5	4.89	sinergismo
	20		40	70.6	a	11.1	b	sinergismo	11.0	6.40	sinergismo
	20		20	9.8	a	4.1	a	aditividad	4.1	2.40	sinergismo
Mi	80	OMen	80	73.1	b	100.0	a	antagonismo	92.6	0.79	aditividad
	80		60	84.3	b	100.0	a	antagonismo	87.3	0.97	aditividad
	80		40	70.1	b	97.0	a	antagonismo	83.3	0.84	aditividad
	80		20	72.5	b	87.2	a	antagonismo	81.3	0.89	aditividad
	60		80	64.9	b	100.0	a	antagonismo	83.2	0.78	aditividad
	60		60	67.9	b	91.5	a	antagonismo	71.3	0.95	aditividad
	60		40	81.6	a	71.6	a	aditividad	62.3	1.31	aditividad
	60		20	89.8	a	61.9	b	sinergismo	57.8	1.55	sinergismo
	40		80	69.5	a	75.1	a	aditividad	67.5	1.03	aditividad
	40		60	92.9	a	49.0	b	<b>sinergismo</b>	44.5	2.09	<b>sinergismo</b>
	40		40	55.4	a	29.1	b	sinergismo	27.0	2.05	sinergismo
	40		20	75.1	a	19.4	b	sinergismo	18.5	4.07	sinergismo
	20		80	71.0	a	64.1	a	aditividad	63.5	1.12	aditividad
	20		60	74.8	a	38.0	b	sinergismo	37.6	1.99	sinergismo
	20		40	75.2	a	18.1	b	sinergismo	18.0	4.19	sinergismo
	20		20	52.8	a	8.4	b	sinergismo	8.3	6.33	sinergismo
Mi	80	OCor	80	67.7	b	100.0	a	antagonismo	91.1	0.74	aditividad
	80		60	78.9	b	100.0	a	antagonismo	88.7	0.89	aditividad
	80		40	64.6	b	100.0	a	antagonismo	84.1	0.77	aditividad
	80		20	67.1	a	88.4	a	aditividad	81.5	0.82	aditividad
	60		80	59.5	b	100.0	a	sinergismo	79.9	0.74	aditividad
	60		60	62.5	b	98.6	a	antagonismo	74.5	0.84	aditividad
	60		40	76.2	b	75.7	a	antagonismo	64.1	1.19	aditividad
	60		20	84.4	a	63.0	b	sinergismo	58.4	1.45	aditividad
	40		80	64.1	a	67.8	a	aditividad	61.2	1.05	aditividad
	40		60	87.5	a	56.1	b	sinergismo	50.8	1.72	sinergismo
	40		40	49.9	a	33.1	b	sinergismo	30.6	1.63	sinergismo
	40		20	69.7	a	20.5	b	sinergismo	19.5	3.58	sinergismo
	20		80	65.6	a	56.9	a	aditividad	56.3	1.16	aditividad
	20		60	69.4	a	45.1	b	sinergismo	44.7	1.55	sinergismo

Tabla 3. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales de orégano, mentas, suico y laurel contra *Aspergillus flavus* según método aditivo y de Abbott. Continuación.

	20		40	69.8	a	22.2	b	sinergismo	22.0	3.18	sinergismo
	20		20	47.4	a	9.6	b	sinergismo	9.46	5.00	sinergismo
Mp	80	OMen	80	71.0	b	100.0	a	antagonismo	89.4	0.79	aditividad
	80		60	76.4	b	100.0	a	antagonismo	81.9	0.93	aditividad
	80		40	78.3	a	88.4	a	aditividad	76.1	1.03	aditividad
	80		20	73.0	a	78.6	a	aditividad	73.3	0.99	aditividad
	60		80	82.8	a	100.0	a	aditividad	78.4	1.06	aditividad
	60		60	74.9	a	78.4	a	aditividad	63.1	1.19	aditividad
	60		40	75.2	a	58.5	a	aditividad	51.4	1.46	aditividad
	60		20	70.9	a	48.8	a	Sinergismo	45.7	1.55	sinergismo
	40		80	80.8	a	78.2	a	aditividad	68.7	1.18	aditividad
	40		60	59.1	a	52.0	a	aditividad	46.5	1.27	aditividad
	40		40	57.9	a	32.2	b	sinergismo	29.6	1.96	sinergismo
	40		20	26.1	a	22.4	a	aditividad	21.3	1.22	aditividad
	20		80	67.6	a	65.1	a	aditividad	63.9	1.06	aditividad
	20		60	67.2	a	39.0	b	sinergismo	38.3	1.75	sinergismo
	20		40	31.8	a	19.2	b	sinergismo	18.8	1.69	sinergismo
	20		20	4.0	b	9.4	a	antagonismo	9.3	0.43	aditividad
Mp	80	OCor	80	76.0	b	100.0	a	antagonismo	87.3	0.87	aditividad
	80		60	63.1	b	100.0	a	antagonismo	83.9	0.75	aditividad
	80		40	65.6	b	92.4	a	antagonismo	77.3	0.85	aditividad
	80		20	77.4	a	79.8	a	aditividad	73.7	1.05	aditividad
	60		80	68.4	b	97.3	a	antagonismo	74.1	0.92	aditividad
	60		60	76.9	a	85.5	a	aditividad	67.2	1.14	aditividad
	60		40	48.6	a	62.6	a	aditividad	53.8	0.90	aditividad
	60		20	61.3	a	50.0	a	aditividad	46.4	1.32	aditividad
	40		80	55.4	a	70.9	a	aditividad	62.5	0.89	aditividad
	40		60	81.1	a	59.1	b	Sinergismo	52.5	1.55	Sinergismo
	40		40	51.6	a	36.2	b	Sinergismo	33.0	1.56	Sinergismo
	40		20	62.5	a	23.6	b	Sinergismo	22.3	2.81	Sinergismo
	20		80	87.0	a	57.9	b	Sinergismo	56.8	1.53	Sinergismo
	20		60	60.8	a	46.1	a	aditividad	45.2	1.34	aditividad
	20		40	11.2	a	23.2	a	aditividad	22.8	0.49	Antagonismo
	20		20	17.5	a	10.6	a	aditividad	10.4	1.69	Sinergismo
Mp	80	OCom	80	74.9	b	100.0	a	Antagonismo	81.9	0.91	aditividad
	80		60	81.9	a	84.8	a	aditividad	75.1	1.09	aditividad
	80		40	76.4	a	81.3	a	aditividad	74.1	1.03	aditividad
	80		20	87.1	a	74.3	a	aditividad	72.1	1.21	aditividad
	60		80	74.3	a	78.6	a	aditividad	63.2	1.18	aditividad
	60		60	73.5	a	55.0	a	aditividad	49.4	1.49	aditividad
	60		40	69.9	a	51.5	a	aditividad	47.3	1.48	aditividad
	60		20	69.2	a	44.5	b	Sinergismo	43.2	1.60	Sinergismo
	40		80	82.9	a	52.2	a	Sinergismo	46.6	1.78	Sinergismo
	40		60	74.7	a	28.6	b	Sinergismo	26.6	2.81	Sinergismo
	40		40	63.7	a	25.2	b	Sinergismo	23.6	2.70	Sinergismo
	40		20	50.4	a	18.1	b	Sinergismo	17.7	2.85	Sinergismo
	20		80	77.3	a	39.2	b	Sinergismo	38.4	2.01	Sinergismo
	20		60	81.5	a	15.6	b	Sinergismo	15.3	5.31	Sinergismo

Tabla 3. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales de orégano, mentas, suico y laurel contra *Aspergillus flavus* según método aditivo y de Abbott. Continuación.

20	40	24.5	a	12.1	b	Sinergismo	11.9	2.05	Sinergismo
20	20	47.6	a	5.1	b	Sinergismo	5.0	9.44	Sinergismo

<sup>a</sup>AE: aceite esencial; OCor (*Origanum vulgare* sspp *hirtum*), OCom (*Origanum vulgare* L. sspp. *Vulgare*), OMen (*Origanum x majoricum*), Mi (*Mentha x piperita* L. var. *Vulgaris Sole*), Mp (*Mentha x piperita*), Su (*Tagetes minuta* L.) y La (*Laurus nobilis* L.).

<sup>b</sup> %: porcentaje de la CFM para cada aceite esencial.

<sup>c</sup> PICO: Porcentaje de inhibición del crecimiento observado; PICE: Porcentaje de inhibición del crecimiento esperado; IA: Índice de Abbott. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas según test LSD de Fisher ( $\alpha = 0.05$ ).

\* Palabras en negrita indican combinaciones sinérgicas que inhibieron completamente el crecimiento del hongo.

Tabla 4. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales de menta, suico y laurel contra *Aspergillus flavus* según método aditivo y de Abbott.

A		B		PICO <sup>c</sup>	Método aditivo *			Método Abbott *		
AE <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>	AE <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>		PICE <sup>c</sup>	Efecto	PICE <sup>c</sup>	IA <sup>c</sup>	Efecto	
Mi	80	Su	80	62.5	b	100	a antagonismo	95.4	0.66	aditividad
			60	59.0	b	100	a antagonismo	89.0	0.66	aditividad
	80	20	40	65.0	b	85.3	a antagonismo	80.9	0.80	aditividad
			20	55.2	a	80.8	a aditividad	80.0	0.69	aditividad
	60	80	80	60.3	b	100	a antagonismo	89.6	0.67	aditividad
			60	49.7	b	99.8	a antagonismo	75.1	0.66	aditividad
	60	40	80	60.2	a	59.9	a aditividad	57.0	1.06	aditividad
			20	31.0	a	55.4	a aditividad	54.9	0.56	aditividad
	40	80	80	51.8	b	89.0	a antagonismo	79.8	0.65	aditividad
			60	67.3	a	57.3	a aditividad	51.9	1.30	aditividad
	40	40	80	58.5	a	17.4	b sinergismo	16.8	3.48	sinergismo
			20	52.5	a	12.9	b sinergismo	12.8	4.10	sinergismo
	20	80	80	68.5	a	78.1	a aditividad	77.3	0.89	aditividad
			60	70.5	a	46.3	b sinergismo	45.9	1.54	sinergismo
20	40	80	65.6	a	6.4	b sinergismo	6.4	10.20	sinergismo	
		20	59.1	a	2.0	b sinergismo	2.0	29.67	sinergismo	
Mi	80	La	80	69.9	b	100.0	a antagonismo	90.2	0.77	aditividad
			60	36.8	b	100.0	a antagonismo	88.5	0.42	antagonismo
	80	40	80	77.0	b	100.0	a antagonismo	84.6	0.91	aditividad
			20	30.8	b	81.3	a antagonismo	80.1	0.38	antagonismo
	60	80	80	82.4	a	98.6	a aditividad	77.9	1.06	aditividad
			60	45.3	b	97.2	a antagonismo	73.9	0.61	aditividad
	60	40	80	87.7	a	78.2	a aditividad	65.3	1.34	aditividad
			20	65.3	a	55.9	a aditividad	55.1	1.18	aditividad
	40	80	80	77.2	a	56.1	b sinergismo	57.4	1.34	aditividad
			60	69.6	a	54.7	a aditividad	49.6	1.40	aditividad
	40	40	80	55.8	a	35.7	b sinergismo	32.9	1.70	sinergismo
			20	56.8	a	13.4	b sinergismo	13.2	4.30	sinergismo
	20	80	80	58.9	a	45.2	a aditividad	52.1	1.13	aditividad
			60	36.1	a	43.8	a aditividad	43.4	0.83	aditividad
20	40	80	48.9	a	24.8	b sinergismo	24.5	2.00	sinergismo	
		20	12.9	a	2.4	b sinergismo	1.0	13.13	sinergismo	

Tabla 4. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales de menta, suico y laurel contra *Aspergillus flavus* según método aditivo y de Abbott. Continuación.

Mp	80	Su	80	72.8	b	100.0	a	antagonismo	93.4	0.78	aditividad		
			60	81.8	a	100.0	a	aditividad	84.3	0.97	aditividad		
			40	86.2	a	90.7	a	aditividad	72.8	1.18	aditividad		
			20	100.0	a	86.2	a	aditividad	71.5	1.40	aditividad		
			80	58.1	b	100.0	a	antagonismo	86.6	0.67	aditividad		
			60	67.0	b	100.0	a	antagonismo	68.0	0.99	aditividad		
			40	65.4	b	66.7	a	antagonismo	44.6	1.47	aditividad		
			20	51.8	b	62.2	a	antagonismo	42.0	1.23	aditividad		
			80	57.7	b	98.1	a	antagonismo	80.5	0.72	aditividad		
			60	68.2	a	66.4	a	aditividad	53.6	1.27	aditividad		
		40	84.8	a	26.5	b	sinergismo	19.7	4.31	sinergismo			
		20	0.0	b	22.0	a	antagonismo	15.9	0.00	antagonismo			
		80	60.8	b	82.1	a	antagonismo	77.6	0.78	aditividad			
		60	73.1	a	50.4	b	sinergismo	46.5	1.57	sinergismo			
		40	76.2	a	10.5	b	sinergismo	7.4	10.31	sinergismo			
		20	0.0	b	6.0	a	antagonismo	3.0	0.00	antagonismo			
		Mp	80	La	80	91.9	a	100.0	a	aditividad	86.1	1.07	aditividad
					60	95.6	a	100.0	a	aditividad	83.5	1.14	aditividad
					40	100.0	a	100.0	a	aditividad	78.0	1.28	aditividad
					20	100.0	a	86.6	a	aditividad	71.6	1.40	aditividad
80	98.4				a	100.0	a	aditividad	71.6	1.37	aditividad		
60	100.0				a	100.0	a	aditividad	66.5	1.50	aditividad		
40	62.6				a	84.9	a	aditividad	55.3	1.13	aditividad		
20	22.2				b	62.6	a	antagonismo	42.2	0.53	aditividad		
80	83.5				a	72.6	a	aditividad	58.9	1.42	aditividad		
60	99.1				a	63.8	b	<b>sinergismo</b>	<b>51.4</b>	<b>1.93</b>	<b>sinergismo</b>		
40	74.6				a	44.8	b	sinergismo	35.2	2.12	sinergismo		
20	17.5				a	22.5	a	aditividad	16.2	1.08	aditividad		
80	86.5				a	56.6	b	sinergismo	52.6	1.65	sinergismo		
60	30.2				a	47.8	a	aditividad	43.9	0.69	aditividad		
40	5.8				b	28.8	a	antagonismo	25.3	0.23	antagonismo		
La	80				Su	20	25.7	a	6.5	b	sinergismo	3.4	7.53
		80	61.0	b		100.0	a	antagonismo	89.0	0.69	aditividad		
		60	62.8	b		100.0	a	antagonismo	73.7	0.85	aditividad		
		40	73.8	b		100.0	a	antagonismo	54.5	1.35	aditividad		
		20	69.3	a		86.6	a	aditividad	52.4	1.32	aditividad		
		80	50.1	b		100.0	a	antagonismo	86.9	0.58	aditividad		
		60	64.7	b		100.0	a	antagonismo	68.7	0.94	aditividad		
		40	64.2	b		84.9	a	sinergismo	45.9	1.40	aditividad		
		20	56.6	a		62.6	a	aditividad	43.4	1.30	aditividad		
		80	48.0	b		72.6	a	sinergismo	82.5	0.58	aditividad		
		60	56.5	a		63.8	a	aditividad	58.4	0.97	aditividad		
		40	68.2	a		44.8	b	sinergismo	27.9	2.44	sinergismo		
		20	15.0	a		22.5	a	aditividad	24.5	0.61	aditividad		
		80	55.2	a		56.6	a	aditividad	77.4	0.71	aditividad		
		60	62.9	a		47.8	a	aditividad	46.2	1.36	sinergismo		
		40	68.0	a		28.8	b	sinergismo	6.8	9.95	sinergismo		

Tabla 4. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales de menta, suico y laurel contra *Aspergillus flavus* según método aditivo y de Abbott. Continuación.

20	20	1.0	a	6.5	a	aditividad	2.4	0.41	antagonismo
<sup>a</sup> AE: aceite esencial; Mi ( <i>Mentha x piperita</i> L. var. <i>Vulgaris Sole</i> ), Mp ( <i>Mentha x piperita</i> ), Su ( <i>Tagetes minuta</i> L.) y La ( <i>Laurus nobilis</i> L.). <sup>b</sup> %: porcentaje de la CFM para cada aceite esencial. <sup>c</sup> PICO: Porcentaje de inhibición del crecimiento observado; PICE: Porcentaje de inhibición del crecimiento esperado; IA: Índice de Abbott. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas según test LSD de Fisher ( $\alpha = 0.05$ ). * Palabras en negrita indican combinaciones sinérgicas que inhibieron completamente el crecimiento del hongo.									

## INTERACCIÓN ENTRE ACEITES ESENCIALES CONTRA *Penicillium minioluteum*

Tabla 5. Interacción entre aceites esenciales de orégano contra *Penicillium minioluteum* de acuerdo al método aditivo y de Abbott.

A		B		PICO <sup>c</sup>		Método aditivo			Método Abbott				
AE <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>	AE <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>	PICE <sup>c</sup>	Efecto	PICE <sup>c</sup>	IA <sup>c</sup>	Efecto					
OCom	80	OCor	80	74.8	b	100.0	a	antagonismo	87.3	0.86	Aditividad		
	80		60	75.9	b	100.0	a	antagonismo	86.3	0.88	Aditividad		
	80		40	75.8	b	100.0	a	antagonismo	83.3	0.91	Aditividad		
	80		20	73.0	a	83.1	a	Aditividad	75.3	0.97	Aditividad		
	60		80	71.8	b	100.0	a	antagonismo	76.9	0.93	Aditividad		
	60		60	68.8	b	100.0	a	antagonismo	75.2	0.91	Aditividad		
	60		40	75.5	a	89.6	a	Aditividad	69.7	1.08	Aditividad		
	60		20	60.7	a	60.7	a	Aditividad	55.3	1.10	Aditividad		
	40		80	74.9	a	98.1	a	Aditividad	74.2	1.01	Aditividad		
	40		60	74.7	a	94.5	a	Aditividad	72.2	1.03	Aditividad		
	40		40	70.9	a	83.7	a	Aditividad	66.2	1.07	Aditividad		
	40		20	60.8	a	54.8	a	Aditividad	50.0	1.22	Aditividad		
	20		80	72.2	a	74.4	a	Aditividad	63.3	1.14	Aditividad		
	20		60	63.0	a	70.9	a	Aditividad	60.5	1.04	Aditividad		
	20		40	77.1	a	60.0	a	Aditividad	51.9	1.49	Aditividad		
	20		20	40.1	a	31.1	a	Aditividad	28.9	1.38	Aditividad		
	Com		80	OMen	80	91.2	a	100.0	a	Aditividad	91.8	0.99	Aditividad
			80		60	92.3	a	100.0	a	Aditividad	89.8	1.03	Aditividad
80		40	92.2		a	100.0	a	Aditividad	85.5	1.08	Aditividad		
80		20	89.3		a	72.4	a	Aditividad	72.4	1.23	Aditividad		
60		80	88.1		a	100.0	a	Aditividad	85.1	1.04	Aditividad		
60		60	85.2		a	100.0	a	Aditividad	81.4	1.05	Aditividad		
60		40	91.9		a	97.6	a	Aditividad	73.8	1.24	Aditividad		
60		20	67.0		a	50.0	a	Aditividad	50.0	1.34	Aditividad		
40		80	91.2		a	100.0	a	Aditividad	83.4	1.09	Aditividad		
40		60	91.1		a	107.0	a	Aditividad	79.3	1.15	Aditividad		
40		40	87.3		a	91.7	a	Aditividad	70.7	1.23	Aditividad		
40		20	47.2		a	44.1	a	Aditividad	44.1	1.07	Aditividad		
20		80	88.5		a	90.7	a	Aditividad	76.3	1.16	Aditividad		
20		60	79.3		a	83.3	a	Aditividad	70.5	1.13	Aditividad		
20		40	73.4		a	68.1	a	Aditividad	58.3	1.26	Aditividad		
20		20	30.4		a	20.5	a	Aditividad	20.5	1.49	Aditividad		
OCor		80	OMen		80	96.7	a	100.0	a	Aditividad	86.3	1.12	Aditividad
		80			60	97.8	a	100.0	a	Aditividad	82.9	1.18	Aditividad
	80	40		97.6	a	100.0	a	Aditividad	75.9	1.29	Aditividad		
	80	20		64.8	a	54.0	a	Aditividad	54.0	1.20	Aditividad		
	60	80		93.6	a	100.0	a	Aditividad	85.2	1.10	Aditividad		
	60	60		90.6	a	100.0	a	Aditividad	81.6	1.11	Aditividad		
	60	40		97.4	a	98.0	a	Aditividad	74.0	1.32	Aditividad		
	60	20		52.5	a	50.4	a	Aditividad	50.4	1.04	Aditividad		
	40	80		96.7	a	100.0	a	Aditividad	82.0	1.18	Aditividad		
	40	60		99.3	a	100.0	a	Aditividad	77.6	1.28	Aditividad		
	40	40		95.5	a	87.2	a	Aditividad	68.3	1.40	Aditividad		
	40	20		45.4	a	39.5	a	Aditividad	39.5	1.15	Aditividad		
	20	80		96.7	a	80.9	a	Aditividad	73.4	1.32	Aditividad		

Tabla 5. Interacción entre aceites esenciales de orégano contra *Penicillium minioluteum* de acuerdo al método aditivo y de Abbott. Continuación.

20	60	87.5	a	73.5	a	Aditividad	66.8	1.31	Aditividad
20	40	71.6	a	58.3	a	Aditividad	53.2	1.35	Aditividad
20	20	68.6	a	10.7	b	sinergismo	10.7	6.44	sinergismo

<sup>a</sup>AE: aceite esencial; OCor (*Origanum vulgare* ssp *hirtum*), OCom (*Origanum vulgare* L. ssp. *Vulgare*) y OMen (*Origanum x majoricum*).

<sup>b</sup> %: porcentaje de la CFM para cada aceite esencial.

<sup>c</sup> PICO: Porcentaje de inhibición del crecimiento observado; PICE: Porcentaje de inhibición del crecimiento esperado; IA: Índice de Abbott. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas según test LSD de Fisher ( $\alpha = 0.05$ ).

\* Palabras en negrita indican combinaciones sinérgicas que inhibieron completamente el crecimiento del hongo.

Tabla 6. Interacción entre aceites esenciales de menta contra *Penicillium minioluteum* de acuerdo al método aditivo y de Abbott.

A		B		PICO <sup>c</sup>	Método aditivo *			Método Abbott *			
AE <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>	AE <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>		PICE <sup>c</sup>	Efecto	PICE <sup>c</sup>	IA <sup>c</sup>	Efecto		
Mi	80	Mp	80	100.0	a	100.0	a	Aditividad	93.8	1.09	Aditividad
	80		60	100.0	a	100.0	a	Aditividad	93.2	1.11	Aditividad
	80		40	100.0	a	100.0	a	Aditividad	89.3	1.15	Aditividad
	80		20	100.0	a	100.0	a	Aditividad	85.3	1.17	Aditividad
	60		80	99.1	a	100.0	a	Aditividad	92.2	1.07	Aditividad
	60		60	96.1	a	100.0	a	Aditividad	91.6	1.05	Aditividad
	60		40	100.0	a	100.0	a	Aditividad	86.7	1.19	Aditividad
	60		20	88.0	a	100.0	a	Aditividad	81.8	1.08	Aditividad
	40		80	100.0	a	100.0	a	Aditividad	87.6	1.17	Aditividad
	40		60	100.0	a	100.0	a	Aditividad	86.5	1.18	Aditividad
	40		40	98.2	a	100.0	a	Aditividad	78.7	1.25	Aditividad
	40		20	88.1	a	90.1	a	Aditividad	71.0	1.24	Aditividad
	20		80	99.5	a	100.0	a	Aditividad	83.3	1.19	Aditividad
	20		60	90.2	a	100.0	a	Aditividad	81.9	1.10	Aditividad
	20		40	100.0	a	92.3	a	Aditividad	71.3	1.46	Aditividad
	20		20	71.3	a	74.7	a	Aditividad	60.8	1.17	Aditividad

<sup>a</sup>AE: aceite esencial; Mi (*Mentha x piperita* L. var. *Vulgaris Sole*), Mp (*Mentha x piperita*).

<sup>b</sup> %: porcentaje de la CFM para cada aceite esencial.

<sup>c</sup> PICO: Porcentaje de inhibición del crecimiento observado; PICE: Porcentaje de inhibición del crecimiento esperado; IA: Índice de Abbott. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas según test LSD de Fisher ( $\alpha = 0.05$ ).

\* Palabras en negrita indican combinaciones sinérgicas que inhibieron completamente el crecimiento del hongo.

Tabla.7. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales de orégano y mentas contra *Penicillium minioluteum* según método aditivo y de Abbott.

A		B		PICO <sup>c</sup>	Método aditivo *			Método Abbott *			
AE <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>	AE <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>		PICE <sup>c</sup>	Efecto	PICE <sup>c</sup>	IA <sup>c</sup>	Efecto		
Mi	80	OMen	80	100.0	a	100.0	a	Aditividad	93.4	0.77	Aditividad
	80		60	71.7	b	100.0	a	Antagonismo	91.7	0.95	Aditividad
	80		40	87.6	a	100.0	a	Aditividad	88.3	1.07	Aditividad
	80		20	94.7	a	77.7	a	Aditividad	77.7	1.22	Aditividad
	60		80	94.6	a	100.0	a	Aditividad	91.8	0.94	Aditividad

Tabla.7. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales de orégano y mentas contra *Penicillium minioluteum* según método aditivo y de Abbott. Continuación.

		60	60	86.0	a	100.0	a	Aditividad	89.7	0.93	Aditividad
		60	40	83.6	a	100.0	a	Aditividad	85.5	1.12	Aditividad
		60	20	95.4	a	72.3	b	Sinergismo	72.3	1.22	Aditividad
		40	80	87.9	a	100.0	a	Aditividad	86.9	0.94	Aditividad
		40	60	82.0	a	100.0	a	Aditividad	83.6	1.01	Aditividad
		40	40	84.6	a	100.0	a	Aditividad	76.9	1.24	Aditividad
		40	20	95.6	a	55.9	b	Sinergismo	55.9	1.68	Aditividad
		20	80	94.0	a	100.0	a	Aditividad	82.3	1.00	Aditividad
		20	60	81.9	a	100.0	a	Aditividad	77.9	1.07	Aditividad
		20	40	83.7	a	88.1	a	Aditividad	68.8	1.09	Aditividad
		20	20	75.2	a	40.5	b	Sinergismo	40.5	1.81	Sinergismo
Mi	Ocor	80	80	98.8	a	100.0	a	Aditividad	89.7	1.10	Aditividad
		80	60	83.5	a	100.0	a	Aditividad	88.9	0.94	Aditividad
		80	40	100.0	a	100.0	a	Aditividad	86.5	1.16	Aditividad
		80	20	96.1	a	88.4	a	Aditividad	80.1	1.20	Aditividad
		60	80	100.0	a	100.0	a	Aditividad	87.2	1.15	Aditividad
		60	60	100.0	a	100.0	a	Aditividad	86.3	1.16	Aditividad
		60	40	100.0	a	100.0	a	Aditividad	83.3	1.20	Aditividad
		60	20	100.0	a	83.0	a	Aditividad	75.3	1.33	Aditividad
		40	80	94.0	a	100.0	a	Aditividad	79.7	1.18	Aditividad
		40	60	90.7	a	100.0	a	Aditividad	78.1	1.16	Aditividad
		40	40	100.0	a	95.4	a	Aditividad	73.3	1.36	Aditividad
		40	20	100.0	a	66.5	b	<b>Sinergismo</b>	60.6	1.65	<b>Sinergismo</b>
		20	80	100.0	a	94.4	a	Aditividad	72.6	1.38	Aditividad
		20	60	95.9	a	90.9	a	Aditividad	70.5	1.36	Aditividad
		20	40	99.0	a	80.0	b	<b>Sinergismo</b>	64.0	1.55	<b>Sinergismo</b>
		20	20	100.0	a	51.1	b	<b>Sinergismo</b>	46.8	2.14	<b>Sinergismo</b>
Mi	Ocom	80	80	78.5	b	100.0	a	Antagonismo	93.9	0.84	Aditividad
		80	60	89.0	a	100.0	a	Aditividad	87.5	1.02	Aditividad
		80	40	100.0	a	100.0	a	Aditividad	88.9	1.17	Aditividad
		80	20	97.6	a	88.4	a	Aditividad	82.3	1.19	Aditividad
		60	80	94.8	a	100.0	a	Aditividad	92.4	1.03	Aditividad
		60	60	100.9	a	100.0	a	Aditividad	84.5	1.19	Aditividad
		60	40	96.6	a	100.0	a	Aditividad	86.2	1.12	Aditividad
		60	20	99.9	a	83.0	b	Sinergismo	78.0	1.28	Aditividad
		40	80	90.9	a	100.0	a	Aditividad	87.8	1.04	Aditividad
		40	60	81.1	a	100.0	a	Aditividad	75.3	1.08	Aditividad
		40	40	94.4	a	95.4	a	Aditividad	77.9	1.21	Aditividad
		40	20	100.0	a	66.5	b	<b>Sinergismo</b>	64.9	1.54	<b>Sinergismo</b>
		20	80	89.9	a	94.4	a	Aditividad	83.6	1.08	Aditividad
		20	60	83.0	a	90.9	a	Aditividad	66.7	1.24	Aditividad
		20	40	97.0	a	80.0	b	Sinergismo	70.2	1.38	Aditividad
		20	20	88.7	a	51.1	b	Sinergismo	52.6	1.69	Sinergismo
Omen	Mp	80	80	92.3	a	100.0	a	Aditividad	93.4	0.99	Aditividad
		80	60	92.9	a	100.0	a	Aditividad	91.8	1.01	Aditividad
		80	40	75.3	b	100.0	a	Antagonismo	86.9	0.87	Aditividad
		80	20	94.5	a	100.0	a	Aditividad	82.3	1.15	Aditividad

Tabla.7. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales de orégano y mentas contra *Penicillium minioluteum* según método aditivo y de Abbott. Continuación.

	60	80	88.0	a	100.0	a	Aditividad	91.7	0.96	Aditividad	
	60	60	91.7	a	100.0	a	Aditividad	89.7	1.02	Aditividad	
	60	40	94.3	a	100.0	a	Aditividad	83.6	1.13	Aditividad	
	60	20	90.2	b	100.0	b	Aditividad	77.9	1.16	Aditividad	
	40	80	84.1	a	100.0	a	Aditividad	88.3	0.95	Aditividad	
	40	60	86.7	a	100.0	a	Aditividad	85.5	1.01	Aditividad	
	40	40	96.1	a	100.0	a	Aditividad	76.9	1.25	Aditividad	
	40	20	92.3	a	88.1	a	Aditividad	68.8	1.34	Aditividad	
	20	80	84.3	a	78.7	a	Aditividad	77.9	1.08	Aditividad	
	20	60	91.0	a	73.3	a	Aditividad	72.6	1.25	Aditividad	
	20	40	100.0	a	56.9	b	<b>Sinergismo</b>	56.3	1.78	<b>Sinergismo</b>	
	20	20	100.0	a	41.5	b	<b>Sinergismo</b>	41.0	2.44	<b>Sinergismo</b>	
OCor	80	Mp	80	89.5	a	100	a	Aditividad	89.7	1.00	Aditividad
	80		60	90.1	a	100	a	Aditividad	87.2	1.03	Aditividad
	80		40	72.5	b	100	a	Aditividad	79.7	0.91	Aditividad
	80		20	91.6	a	94.41	a	Aditividad	72.6	1.26	Aditividad
	60		80	85.2	a	100	a	Aditividad	88.9	0.96	Aditividad
	60		60	88.8	a	100	a	Aditividad	86.3	1.03	Aditividad
	60		40	91.5	a	100	a	Aditividad	78.1	1.17	Aditividad
	60		20	87.3	a	90.87	a	Aditividad	70.5	1.24	Aditividad
	40		80	81.3	a	100	a	Aditividad	86.5	0.94	Aditividad
	40		60	83.8	a	100	a	Aditividad	83.3	1.01	Aditividad
	40		40	93.2	a	95.39	a	Aditividad	73.3	1.27	Aditividad
	40		20	89.4	a	79.99	a	Aditividad	64.0	1.40	Aditividad
	20		80	81.4	a	88.36	a	Aditividad	80.1	1.02	Aditividad
	20		60	88.2	a	82.95	a	Aditividad	75.3	1.17	Aditividad
	20		40	100.0	a	66.5	b	<b>Sinergismo</b>	60.6	1.66	<b>Sinergismo</b>
	20		20	100.0	a	51.1	b	<b>Sinergismo</b>	46.8	2.22	<b>Sinergismo</b>
OCom	80	Mp	80	93.3	a	100.0	a	Aditividad	93.9	0.99	Aditividad
	80		60	98.7	a	100.0	a	Aditividad	92.4	1.07	Aditividad
	80		40	90.6	a	100.0	a	Aditividad	87.8	1.03	Aditividad
	80		20	90.3	a	100.0	a	Aditividad	83.6	1.08	Aditividad
	60		80	83.9	a	100.0	a	Aditividad	88.9	0.94	Aditividad
	60		60	87.5	a	100.0	a	Aditividad	86.2	1.02	Aditividad
	60		40	90.1	a	100.0	a	Aditividad	77.9	1.16	Aditividad
	60		20	86.0	a	90.5	a	Aditividad	70.2	1.22	Aditividad
	40		80	79.9	a	100.0	a	Aditividad	87.5	0.91	Aditividad
	40		60	82.5	a	100.0	a	Aditividad	84.5	0.98	Aditividad
	40		40	91.9	a	100.0	a	Aditividad	75.3	1.22	Aditividad
	40		20	88.1	a	84.6	a	Aditividad	66.7	1.32	Aditividad
	20		80	80.1	a	98.2	a	Aditividad	82.3	0.97	Aditividad
	20		60	86.8	a	92.8	a	Aditividad	78.0	1.11	Aditividad
	20		40	99.1	a	76.3	b	<b>Sinergismo</b>	64.9	1.53	<b>Sinergismo</b>
	20		20	100.0	a	60.9	b	<b>Sinergismo</b>	52.6	1.90	<b>Sinergismo</b>

<sup>a</sup>AE: aceite esencial; OCor (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*), OCom (*Origanum vulgare* L. ssp. *Vulgare*), OMen (*Origanum x majoricum*), Mi (*Mentha x piperita* L. var. *Vulgaris* Sole), Mp (*Mentha x piperita*).

<sup>b</sup> %: porcentaje de la CFM para cada aceite esencial.

<sup>c</sup> PICO: Porcentaje de inhibición del crecimiento observado; PICE: Porcentaje de inhibición del crecimiento esperado; IA: Índice de Abbott. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas según test LSD de Fisher ( $\alpha = 0.05$ ).

\* Palabras en **negrita** indican combinaciones sinérgicas que inhibieron completamente el crecimiento del hongo.

Tabla 8. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales de orégano, suico y laurel contra *Penicillium minioluteum* según método aditivo y de Abbott.

A		B		PICO <sup>c</sup>	Método aditivo *		Método Abbott *				
AE <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>	AE <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>		PICE <sup>c</sup>	Efecto	PICE <sup>c</sup>	IA <sup>c</sup>	Efecto		
OMen	80	Su	80	76.2	b	100.0	a	Antagonismo	88.3	0.86	Aditividad
	80		60	73.1	b	100.0	a	Antagonismo	86.0	0.85	Aditividad
	80		40	81.8	a	100.0	a		85.4	0.96	Aditividad
	80		20	80.0	b	100.0	a	Antagonismo	83.0	0.96	Aditividad
	60		80	75.7	b	100.0	a	Antagonismo	85.4	0.89	Aditividad
	60		60	77.0	b	100.0	a	Antagonismo	82.5	0.93	Aditividad
	60		40	54.0	b	100.0	a	Antagonismo	81.8	0.66	Aditividad
	60		20	83.9	a	100.0	a	Aditividad	78.9	1.06	Aditividad
	40		80	80.5	a	100.0	a	Aditividad	79.4	1.01	Aditividad
	40		60	60.1	b	100.0	a	Antagonismo	75.3	0.80	Aditividad
	40		40	57.9	b	98.5	a	Antagonismo	74.3	0.78	Aditividad
	40		20	69.5	b	90.6	a	Antagonismo	70.2	0.99	Aditividad
	20		80	84.6	a	61.7	b	Sinergismo	61.1	1.38	Aditividad
	20		60	83.8	a	53.9	b	Sinergismo	53.4	1.57	Sinergismo
20	40	63.8	a	51.9	a	Aditividad	51.4	1.24	Aditividad		
20	20	79.1	a	44.0	b	Sinergismo	43.6	1.82	Sinergismo		
OMen	80	La	80	89.9	a	100.0	a	Aditividad	89.6	1.00	Aditividad
	80		60	62.6	b	100.0	a	Antagonismo	85.2	0.73	Aditividad
	80		40	47.2	b	100.0	a	Antagonismo	84.0	0.56	Aditividad
	80		20	61.4	b	100.0	a	Antagonismo	83.8	0.73	Aditividad
	60		80	64.6	b	100.0	a	Antagonismo	87.1	0.74	Aditividad
	60		60	37.5	b	100.0	a	Antagonismo	81.5	0.46	Antagonismo
	60		40	61.3	b	100.0	a	Antagonismo	80.1	0.77	Aditividad
	60		20	45.8	b	100.0	a	Antagonismo	79.8	0.57	Aditividad
	40		80	81.7	a	100.0	a	Aditividad	81.8	1.00	Aditividad
	40		60	59.9	b	97.9	a	Antagonismo	74.0	0.81	Aditividad
	40		40	87.0	a	94.0	a	Aditividad	71.9	1.21	Aditividad
	40		20	21.5	b	93.1	a	Antagonismo	71.5	0.30	Aditividad
	20		80	69.9	a	66.2	a	Aditividad	65.5	1.07	Aditividad
	20		60	89.0	a	51.3	b	Sinergismo	50.8	1.75	Sinergismo
20	40	75.4	a	47.3	b	Sinergismo	46.9	1.61	Sinergismo		
20	20	14.2	b	46.5	a	Antagonismo	46.1	0.31	Antagonismo		
OCom	80	Su	80	100.0	a	100.0	a	Aditividad	89.2	1.12	Aditividad
	80		60	95.4	a	100.0	a	Aditividad	87.0	1.10	Aditividad
	80		40	100.0	a	100.0	a	Aditividad	86.5	1.16	Aditividad
	80		20	81.8	a	100.0	a	Aditividad	84.3	0.97	Aditividad
	60		80	94.9	a	100.0	a	Aditividad	80.4	1.18	Aditividad
	60		60	92.8	a	100.0	a	Aditividad	76.5	1.21	Aditividad
	60		40	100.0	a	100.0	a	Aditividad	75.5	1.33	Aditividad
	60		20	72.5	a	93.0	a	Aditividad	71.5	1.01	Aditividad

Tabla 8. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales de orégano, suico y laurel contra *Penicillium minioluteum* según método aditivo y de Abbott. Continuación.

		40	80	99.5	a	100.0	a	Aditividad	78.0	1.27	Aditividad
		40	60	99.4	a	97.0	a	Aditividad	73.7	1.35	Aditividad
		40	40	93.2	a	95.0	a	Aditividad	72.6	1.28	Aditividad
		40	20	90.8	a	87.1	a	Aditividad	68.2	1.33	Aditividad
		20	80	97.8	a	81.2	a	Aditividad	68.7	1.42	Aditividad
		20	60	91.5	a	73.4	a	Aditividad	62.5	1.46	Aditividad
		20	40	100.0	a	71.4	b	<b>Sinergismo</b>	60.9	1.64	<b>Sinergismo</b>
		20	20	35.5	b	63.5	a	Antagonismo	54.7	0.65	Aditividad
Ocom	La	80	80	80.4	b	100.0	a	Antagonismo	90.4	0.89	Aditividad
		80	60	81.4	b	100.0	a	Antagonismo	86.3	0.94	Aditividad
		80	40	66.8	b	100.0	a	Antagonismo	85.2	0.78	Aditividad
		80	20	55.9	b	100.0	a	Antagonismo	85.0	0.66	Aditividad
		60	80	75.8	b	100.0	a	Antagonismo	82.6	0.92	Aditividad
		60	60	56.9	b	100.0	a	Antagonismo	75.1	0.76	Aditividad
		60	40	70.6	b	96.4	a	Antagonismo	73.2	0.97	Aditividad
		60	20	50.9	b	95.5	a	Antagonismo	72.8	0.70	Aditividad
		40	80	60.5	b	100.0	a	Antagonismo	80.5	0.75	Aditividad
		40	60	70.4	b	94.4	a	Antagonismo	72.2	0.98	Aditividad
		40	40	64.0	b	90.5	a	Antagonismo	70.0	0.91	Aditividad
		40	20	59.0	b	89.6	a	Antagonismo	69.6	0.85	Aditividad
		20	80	64.1	a	85.6	a	Aditividad	72.3	0.89	Aditividad
		20	60	66.2	a	70.7	a	Aditividad	60.4	1.10	Aditividad
		20	40	55.3	a	66.8	a	Aditividad	57.3	0.97	Aditividad
Ocor	Su	20	20	24.5	b	66.0	a	Antagonismo	56.7	0.43	Antagonismo
		80	80	84.0	a	100.0	a	Aditividad	81.9	1.03	Aditividad
		80	60	91.6	a	100.0	a	Aditividad	78.3	1.17	Aditividad
		80	40	92.6	a	104.9	a	Aditividad	77.4	1.20	Aditividad
		80	20	98.0	a	97.0	a	Aditividad	73.8	1.33	Aditividad
		60	80	87.1	a	100.0	a	Aditividad	80.5	1.08	Aditividad
		60	60	92.2	a	100.0	a	Aditividad	76.6	1.20	Aditividad
		60	40	88.5	a	100.0	a	Aditividad	75.7	1.17	Aditividad
		60	20	88.3	a	93.4	a	Aditividad	71.7	1.23	Aditividad
		40	80	87.6	a	100.0	a	Aditividad	76.2	1.15	Aditividad
		40	60	85.6	a	92.4	a	Aditividad	71.5	1.20	Aditividad
		40	40	94.8	a	90.5	a	Aditividad	70.3	1.35	Aditividad
		40	20	62.5	a	82.6	a	Aditividad	65.5	0.95	Aditividad
		20	80	75.6	a	71.4	a	Aditividad	64.9	1.17	Aditividad
		20	60	87.4	a	63.6	b	Sinergismo	57.9	1.51	Sinergismo
		20	40	103.2	a	61.6	b	<b>Sinergismo</b>	56.1	1.84	<b>Sinergismo</b>
		20	20	98.4	a	53.7	b	<b>Sinergismo</b>	49.1	2.00	<b>Sinergismo</b>
Ocor	La	80	80	74.3	b	100.0	a	Antagonismo	84.0	0.89	Aditividad
		80	60	96.6	a	100.0	a	Aditividad	77.1	1.25	Aditividad
		80	40	86.4	a	100.0	a	Aditividad	75.3	1.15	Aditividad
		80	20	86.9	a	99.5	a	Aditividad	74.9	1.16	Aditividad
		60	80	86.5	a	100.0	a	Aditividad	82.7	1.05	Aditividad
		60	60	78.0	b	100.0	a	Antagonismo	75.3	1.03	Aditividad
		60	40	97.6	a	96.8	a	Aditividad	73.4	1.33	Aditividad

Tabla 8. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales de orégano, suico y laurel contra *Penicillium minioluteum* según método aditivo y de Abbott. Continuación.

60	20	97.4	a	95.9	a	Aditividad	73.0	1.33	Aditividad
40	80	100.0	a	100.0	a	Aditividad	78.9	1.40	Aditividad
40	60	100.0	a	89.8	a	Aditividad	69.9	1.44	Aditividad
40	40	100.0	a	85.9	b	<b>Sinergismo</b>	67.6	1.61	<b>Sinergismo</b>
40	20	65.0	a	85.1	a	Aditividad	67.1	0.97	Aditividad
20	80	100.0	a	75.8	b	<b>Sinergismo</b>	68.9	1.66	<b>Sinergismo</b>
20	60	84.8	a	60.9	b	Sinergismo	55.6	1.53	Sinergismo
20	40	100.0	a	57.0	b	<b>Sinergismo</b>	52.1	2.24	<b>Sinergismo</b>
20	20	83.5	a	56.2	b	Sinergismo	51.3	1.63	Sinergismo

<sup>a</sup>AE: aceite esencial; OCor (*Origanum vulgare* ssp *hirtum*), OCom (*Origanum vulgare* L. ssp. *Vulgare*), OMen (*Origanum x majoricum*), Su (*Tagetes minuta* L.), La (*Laurus nobilis* L.).

<sup>b</sup> %: porcentaje de la CFM para cada aceite esencial.

<sup>c</sup> PICO: Porcentaje de inhibición del crecimiento observado; PICE: Porcentaje de inhibición del crecimiento esperado; IA: Índice de Abbott. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas según test LSD de Fisher ( $\alpha = 0.05$ ).

\* Palabras en negrita indican combinaciones sinérgicas que inhibieron completamente el crecimiento del hongo.

Tabla 9. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales de menta, Suico y laurel contra *Penicillium minioluteum* según método aditivo y de Abbott.

A		B		PICO <sup>c</sup>		Método aditivo *		Método Abbott *				
AE <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>	AE <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>			PICE <sup>c</sup>	Efecto	PICE <sup>c</sup>	IA <sup>c</sup>	Efecto		
Su	80	Mi	80	96.0	a	100.0	a	Aditividad	91.2	1.05	Aditividad	
			60	92.0	a	100.0	a	Aditividad	89.1	1.03	Aditividad	
	80	Mi	40	95.8	a	100.0	a	Aditividad	82.6	1.16	Aditividad	
			20	87.2	a	100.0	a	Aditividad	76.6	1.14	Aditividad	
	60	Mi	80	95.2	a	100.0	a	Aditividad	89.5	1.06	Aditividad	
			60	100.0	a	100.0	a	Aditividad	87.0	1.15	Aditividad	
	60	Mi	40	99.5	a	100.0	a	Aditividad	79.2	1.26	Aditividad	
			20	86.6	a	93.4	a	Aditividad	72.0	1.20	Aditividad	
	40	Mi	80	93.1	a	100.0	a	Aditividad	89.1	1.05	Aditividad	
			60	97.1	a	100.0	a	Aditividad	86.4	1.12	Aditividad	
	40	Mi	40	90.9	a	100.0	a	Aditividad	78.3	1.16	Aditividad	
			20	84.0	a	91.4	a	Aditividad	70.8	1.19	Aditividad	
	20	Mi	80	97.5	a	100.0	a	Aditividad	87.3	1.12	Aditividad	
			60	97.4	a	100.0	a	Aditividad	84.2	1.16	Aditividad	
	20	Mi	40	66.2	b	98.9	a	Antagonismo	74.8	0.88	Aditividad	
			20	51.9	b	83.5	a	Antagonismo	66.1	0.79	Aditividad	
	Su	80	Mp	80	93.6	a	100	a	Aditividad	89.0	1.05	Aditividad
				60	89.5	a	100	a	Aditividad	88.0	1.02	Aditividad
80		Mp	40	93.4	a	100	a	Aditividad	81.1	1.15	Aditividad	
			20	82.2	a	94.95	a	Aditividad	74.2	1.11	Aditividad	
60		Mp	80	92.8	a	100	a	Aditividad	86.8	1.07	Aditividad	
			60	97.8	a	100	a	Aditividad	85.6	1.14	Aditividad	
60		Mp	40	97.1	a	100	a	Aditividad	77.3	1.26	Aditividad	
			20	84.1	a	87.15	a	Aditividad	69.0	1.22	Aditividad	
40		Mp	80	90.7	a	100	a	Aditividad	86.2	1.05	Aditividad	
			60	94.6	a	100	a	Aditividad	85.0	1.11	Aditividad	

Tabla 9. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales de menta, Suico y laurel contra *Penicillium minioluteum* según método aditivo y de Abbott. Continuación.

		40	40	88.5	a	100	a	Aditividad	76.4	1.16	Aditividad
		40	20	84.0	a	85.16	a	Aditividad	67.7	1.24	Aditividad
		20	80	95.0	a	100	a	Aditividad	84.0	1.13	Aditividad
		20	60	95.0	a	100	a	Aditividad	82.6	1.15	Aditividad
		20	40	71.2	b	94.87	a	Antagonismo	72.6	0.98	Aditividad
		20	20	47.0	b	77.27	a	Antagonismo	62.5	0.75	Aditividad
La	Mp	80	80	91.5	a	100	a	Aditividad	90.2	1.01	Aditividad
		80	60	96.6	a	100	a	Aditividad	89.4	1.08	Aditividad
		80	40	95.2	a	100	a	Aditividad	83.2	1.14	Aditividad
		80	20	95.9	a	99.42	a	Aditividad	77.1	1.24	Aditividad
		60	80	93.5	a	100	a	Aditividad	86.1	1.09	Aditividad
		60	60	91.6	a	100	a	Aditividad	84.8	1.08	Aditividad
		60	40	93.7	a	100	a	Aditividad	76.1	1.23	Aditividad
		60	20	94.1	a	84.52	a	Aditividad	67.3	1.40	Aditividad
		40	80	87.9	a	100	a	Aditividad	85.0	1.03	Aditividad
		40	60	91.1	a	100	a	Aditividad	83.6	1.09	Aditividad
		40	40	88.0	a	98.19	a	Aditividad	74.2	1.19	Aditividad
		40	20	88.1	a	80.59	a	Aditividad	64.7	1.36	Aditividad
		20	80	89.1	a	100	a	Aditividad	84.7	1.05	Aditividad
		20	60	90.0	a	100	a	Aditividad	83.4	1.08	Aditividad
		20	40	75.8	b	97.37	a	Antagonismo	73.8	1.03	Aditividad
		20	20	41.8	b	79.77	a	Antagonismo	64.2	0.65	Aditividad
La	Mi	80	80	69.2	b	100.0	a	Antagonismo	92.2	0.75	Aditividad
		80	60	74.3	b	100.0	a	Antagonismo	90.4	0.82	Aditividad
		80	40	72.9	b	100.0	a	Antagonismo	84.6	0.86	Aditividad
		80	20	73.6	b	100.0	a	Antagonismo	79.3	0.93	Aditividad
		60	80	71.1	b	100.0	a	Antagonismo	88.9	0.80	Aditividad
		60	60	69.2	b	100.0	a	Antagonismo	86.2	0.80	Aditividad
		60	40	71.3	b	100.0	a	Antagonismo	78.0	0.91	Aditividad
		60	20	71.7	b	90.7	a	Antagonismo	70.4	1.02	Aditividad
		40	80	68.7	b	100.0	a	Antagonismo	88.0	0.78	Aditividad
		40	60	73.5	b	100.0	a	Antagonismo	85.1	0.86	Aditividad
		40	40	70.3	b	100.0	a	Antagonismo	76.3	0.92	Aditividad
		40	20	70.5	b	86.8	a	Antagonismo	68.0	1.04	Aditividad
		20	80	71.4	b	100.0	a	Antagonismo	87.9	0.81	Aditividad
		20	60	72.3	b	100.0	a	Antagonismo	84.9	0.85	Aditividad
		20	40	57.8	b	100.0	a	Antagonismo	75.9	0.76	Aditividad
La	Su	20	20	24.1	b	86.0	a	Antagonismo	67.6	0.36	Antagonismo
		80	80	91.5	a	100	a	Aditividad	90.2	1.01	Aditividad
		80	60	96.6	a	100	a	Aditividad	89.4	1.08	Aditividad
		80	40	95.2	a	100	a	Aditividad	83.2	1.14	Aditividad
		80	20	95.9	a	99.42	a	Aditividad	77.1	1.24	Aditividad
		60	80	93.5	a	100	a	Aditividad	86.1	1.09	Aditividad
		60	60	91.6	a	100	a	Aditividad	84.8	1.08	Aditividad
		60	40	93.7	a	100	a	Aditividad	76.1	1.23	Aditividad
		60	20	94.1	a	84.52	a	Aditividad	67.3	1.40	Aditividad
		40	80	87.9	a	100	a	Aditividad	85.0	1.03	Aditividad

Tabla 9. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales de menta, Suico y laurel contra *Penicillium minioluteum* según método aditivo y de Abbott. Continuación.

40	60	91.1	a	100	a	<b>Aditividad</b>	83.6	1.09	Aditividad
40	40	88.0	a	98.19	a	Aditividad	74.2	1.19	Aditividad
40	20	88.1	a	80.59	a	Aditividad	64.7	1.36	Aditividad
20	80	89.1	a	100	a	Aditividad	84.7	1.05	Aditividad
20	60	90.0	a	100	a	Aditividad	83.4	1.08	Aditividad
20	40	75.8	b	97.37	a	Antagonismo	73.8	1.03	Aditividad
20	20	41.8	b	79.77	a	Antagonismo	64.2	0.65	Aditividad

<sup>a</sup>AE: aceite esencial; Mi (*Mentha x piperita* L. var. *Vulgaris* Sole), Mp (*Mentha x piperita*), Su (*Tagetes minuta* L.) y La (*Laurus nobilis* L.).

<sup>b</sup> %: porcentaje de la CFM para cada aceite esencial.

<sup>c</sup> PICO: Porcentaje de inhibición del crecimiento observado; PICE: Porcentaje de inhibición del crecimiento esperado; IA: Índice de Abbott. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas según test LSD de Fisher ( $\alpha = 0.05$ ).

\* Palabras en negrita indican combinaciones sinérgicas que inhibieron completamente el crecimiento del hongo.

## INTERACCIÓN ENTRE ACEITES ESENCIALES Y FUNGICIDA SINTÉTICO PARA EL CONTROL DE *A. flavus*

Tabla 10. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales y el fungicida sintético contra *A. flavus* según método aditivo y de Abbott.

F % <sup>a</sup>	AE		PICO <sub>ai+bi</sub>		Método aditivo			Método Abbott		
	AE	% <sup>b</sup>			PICE	Efecto	PICE	IA	Efecto	
20	Su	20	32.5	b	55.9	a	Antagonismo	55.2	0.59	Aditividad
20		40	35.6	b	60.2	a	Antagonismo	57.2	0.62	Aditividad
20		60	63.8	b	100.0	a	Antagonismo	75.2	0.85	Aditividad
20		80	65.5	b	100.0	a	Antagonismo	89.6	0.73	Aditividad
40		20	45.3	b	71.4	a	Antagonismo	70.5	0.64	Aditividad
40		40	73.9	a	75.7	a	Aditividad	71.8	1.03	Aditividad
40		60	77.1	b	100.0	a	Antagonismo	83.7	0.92	Aditividad
40		80	100.0	a	100.0	a	<b>Aditividad</b>	93.2	1.11	<b>Aditividad</b>
60		20	78.2	a	72.0	a	Aditividad	71.1	1.10	Aditividad
60		40	92.7	a	76.3	a	<b>Aditividad</b>	72.4	1.28	<b>Aditividad</b>
60	60	91.1	a	100.0	a	<b>Aditividad</b>	84.0	1.08	<b>Aditividad</b>	
60	80	100.0	a	100.0	a	<b>Aditividad</b>	93.3	1.18	<b>Aditividad</b>	
80	20	78.2	a	77.0	a	Aditividad	76.1	1.03	Aditividad	
80	40	98.9	a	81.3	a	<b>Aditividad</b>	77.1	1.28	<b>Aditividad</b>	
80	60	97.6	a	100.0	a	<b>Aditividad</b>	86.8	1.12	<b>Aditividad</b>	
80	80	98.4	a	100.0	a	<b>Aditividad</b>	94.5	1.04	<b>Aditividad</b>	
20	La	20	11.3	b	56.1	a	Antagonismo	55.3	0.20	Antagonismo
20		40	38.4	b	78.4	a	Antagonismo	65.4	0.59	Aditividad
20		60	28.4	b	97.4	a	Antagonismo	74.0	0.38	Antagonismo
20		80	43.0	b	100.0	a	Antagonismo	78.1	0.55	Aditividad
40		20	46.6	b	71.6	a	Antagonismo	70.6	0.66	Aditividad
40		40	57.0	b	93.9	a	Antagonismo	77.2	0.74	Aditividad
40		60	18.3	b	100.0	a	Antagonismo	82.9	0.22	Aditividad
40		80	88.3	a	100.0	a	Aditividad	85.6	1.03	Aditividad
60		20	100.0	a	72.2	a	<b>Aditividad</b>	71.2	1.42	<b>Aditividad</b>
60		40	100.0	a	94.5	a	<b>Aditividad</b>	77.7	1.32	<b>Aditividad</b>
60	60	95.2	a	100.0	a	<b>Aditividad</b>	83.3	1.14	<b>Aditividad</b>	
60	80	98.6	a	100.0	a	<b>Aditividad</b>	85.8	1.15	<b>Aditividad</b>	
80	20	100.0	a	77.2	a	<b>Sinergismo</b>	76.1	1.36	<b>Aditividad</b>	
80	40	97.3	a	99.5	a	<b>Aditividad</b>	81.5	1.19	<b>Aditividad</b>	
80	60	96.7	a	100.0	a	<b>Aditividad</b>	86.1	1.12	<b>Aditividad</b>	
80	80	84.0	a	100.0	a	Aditividad	88.3	0.95	Aditividad	
20	Mi	20	60.0	a	55.9	a	Aditividad	55.2	1.09	Aditividad
20		40	89.0	a	66.6	b	Sinergismo	60.1	1.48	Aditividad
20		60	95.6	a	100.0	a	<b>Aditividad</b>	79.4	1.20	<b>Aditividad</b>
20		80	90.0	a	100.0	a	<b>Aditividad</b>	90.9	0.99	<b>Aditividad</b>
40		20	100.0	a	71.4	b	<b>Sinergismo</b>	70.5	1.49	<b>Aditividad</b>
40		40	95.0	a	82.1	a	<b>Aditividad</b>	73.7	1.29	<b>Aditividad</b>
40		60	100.0	a	100.0	a	<b>Aditividad</b>	86.4	1.16	<b>Aditividad</b>
40		80	77.0	b	100.0	a	Antagonismo	94.0	0.82	Aditividad
60		20	94.2	a	72.0	b	<b>Sinergismo</b>	71.1	1.32	<b>Aditividad</b>
60		40	100.4	a	82.7	a	<b>Aditividad</b>	74.3	1.35	<b>Aditividad</b>

Tabla 10. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales y el fungicida sintético contra *A. flavus* según método aditivo y de Abbott. Continuación.

60		60	100.0	a	100.0	a	<b>Aditividad</b>	86.7	1.15	<b>Aditividad</b>
60		80	100.0	a	100.0	a	<b>Aditividad</b>	94.1	1.06	<b>Aditividad</b>
80		20	100.0	a	77.0	a	<b>Aditividad</b>	76.1	1.31	<b>Aditividad</b>
80		40	100.0	a	87.7	a	<b>Aditividad</b>	78.7	1.29	<b>Aditividad</b>
80		60	100.0	a	100.0	a	<b>Aditividad</b>	89.0	1.22	<b>Aditividad</b>
80		80	87.2	a	100.0	a	Aditividad	95.1	0.92	Aditividad
20	Mp	20	45.0	a	56.1	a	Aditividad	55.3	0.81	Aditividad
20		40	74.0	a	64.7	a	Aditividad	59.2	1.25	Aditividad
20		60	80.6	a	100.0	a	Aditividad	77.1	1.04	Aditividad
20		80	75.0	b	100.0	a	Antagonismo	84.2	0.89	Aditividad
40		20	90.0	a	71.6	a	<b>Aditividad</b>	70.6	1.28	<b>Aditividad</b>
40		40	80.0	a	80.2	a	Aditividad	73.2	1.09	Aditividad
40		60	85.0	a	100.0	a	Aditividad	84.9	1.00	Aditividad
40		80	62.0	b	100.0	a	Antagonismo	89.6	0.69	Aditividad
60		20	79.2	a	72.2	a	Aditividad	71.2	1.11	Aditividad
60		40	85.4	a	80.8	a	Aditividad	73.7	1.16	Aditividad
60		60	85.0	a	100.0	a	Aditividad	85.2	1.00	Aditividad
60		80	85.0	a	100.0	a	Aditividad	89.8	0.95	Aditividad
80		20	85.0	a	77.2	a	Aditividad	76.1	1.12	Aditividad
80		40	86.4	a	85.8	a	Aditividad	78.2	1.10	Aditividad
80		60	93.7	a	100.0	a	<b>Aditividad</b>	87.8	1.07	<b>Aditividad</b>
80		80	72.2	b	100.0	a	Antagonismo	91.6	0.79	Aditividad
20	OMen	20	61.6	a	62.1	a	Aditividad	58.0	1.06	Aditividad
20		40	67.9	a	71.8	a	Aditividad	62.4	1.09	Aditividad
20		60	49.7	b	91.7	a	Antagonismo	71.4	0.70	Aditividad
20		80	71.4	b	100.0	a	Antagonismo	83.3	0.86	Aditividad
40		20	74.0	a	77.6	a	Aditividad	72.4	1.02	Aditividad
40		40	80.2	a	87.3	a	Aditividad	75.3	1.07	Aditividad
40		60	94.6	a	100.0	a	<b>Aditividad</b>	81.2	1.16	<b>Aditividad</b>
40		80	90.0	a	100.0	a	<b>Aditividad</b>	89.0	1.01	<b>Aditividad</b>
60		20	99.7	a	78.2	b	<b>Sinergismo</b>	72.9	1.37	<b>Aditividad</b>
60		40	100.0	a	87.9	a	<b>Aditividad</b>	75.8	1.35	<b>Aditividad</b>
60		60	98.6	a	100.0	a	<b>Aditividad</b>	81.6	1.21	<b>Aditividad</b>
60		80	98.4	a	100.0	a	<b>Aditividad</b>	89.2	1.10	<b>Aditividad</b>
80		20	100.0	a	83.2	a	<b>Aditividad</b>	77.6	1.35	<b>Aditividad</b>
80		40	100.0	a	92.9	a	<b>Aditividad</b>	79.9	1.32	<b>Aditividad</b>
80		60	100.0	a	100.0	a	<b>Aditividad</b>	84.8	1.21	<b>Aditividad</b>
80		80	99.3	a	100.0	a	<b>Aditividad</b>	91.1	1.09	<b>Aditividad</b>
20	OCom	20	43.7	a	57.8	a	Aditividad	56.1	0.78	Aditividad
20		40	67.1	a	64.8	a	Aditividad	59.3	1.13	Aditividad
20		60	59.4	a	68.3	a	Aditividad	60.8	0.98	Aditividad
20		80	90.4	a	91.8	a	<b>Aditividad</b>	71.5	1.26	<b>Aditividad</b>
40		20	63.8	a	73.3	a	Aditividad	71.1	0.90	Aditividad
40		40	56.9	b	80.3	a	Antagonismo	73.2	0.78	Aditividad
40		60	74.7	a	83.8	a	Aditividad	74.2	1.01	Aditividad
40		80	77.3	b	100.0	a	Antagonismo	81.2	0.95	Aditividad
60		20	56.1	a	73.9	a	Aditividad	71.7	0.78	Aditividad

Tabla 10. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales y el fungicida sintético contra *A. flavus* según método aditivo y de Abbott. Continuación.

60		40	73.7	a	80.9	a	Aditividad	73.7	1.00	Aditividad
60		60	71.0	a	84.4	a	Aditividad	74.7	0.95	Aditividad
60		80	93.8	a	100.0	a	<b>Aditividad</b>	81.6	1.15	<b>Aditividad</b>
80		20	84.6	a	78.9	a	Aditividad	76.5	1.11	Aditividad
80		40	88.4	a	85.9	a	Aditividad	78.2	1.13	Aditividad
80		60	99.6	a	89.4	a	<b>Aditividad</b>	79.1	1.26	<b>Aditividad</b>
80		80	100.0	a	100.0	a	<b>Aditividad</b>	84.8	1.21	<b>Aditividad</b>
20	OCor	20	44.2	a	56.11	a	Aditividad	55.3	0.80	Aditividad
20		40	55.1	a	61.83	a	Aditividad	57.9	0.95	Aditividad
20		60	48.1	b	72.17	a	Antagonismo	62.6	0.77	Aditividad
20		80	77.8	a	86.23	a	Aditividad	69.0	1.13	Aditividad
40		20	74.5	a	71.6	a	Aditividad	70.6	1.06	Aditividad
40		40	55.2	a	77.32	a	Aditividad	72.3	0.76	Aditividad
40		60	71.0	a	87.66	a	Aditividad	75.4	0.94	Aditividad
40		80	70.3	b	100	a	Antagonismo	79.6	0.88	Aditividad
60		20	89.6	a	72.21	a	Aditividad	71.2	1.26	Aditividad
60		40	90.0	a	77.93	a	<b>Aditividad</b>	72.9	1.23	<b>Aditividad</b>
60		60	91.8	a	88.27	a	<b>Aditividad</b>	75.9	1.21	<b>Aditividad</b>
60		80	99.6	a	100	a	<b>Aditividad</b>	80.0	1.25	<b>Aditividad</b>
80		20	83.5	a	77.23	a	Aditividad	76.1	1.10	Aditividad
80		40	85.8	a	82.95	a	Aditividad	77.5	1.11	Aditividad
80		60	91.5	a	93.29	a	<b>Aditividad</b>	80.0	1.14	<b>Aditividad</b>
80		80	99.5	a	100	a	<b>Aditividad</b>	83.4	1.19	<b>Aditividad</b>

<sup>a</sup>AE: aceite esencial; OCor (*Origanum vulgare* ssp *hirtum*), OCom (*Origanum vulgare* L. ssp. *Vulgare*), OMen (*Origanum x majoricum*), Mi (*Mentha x piperita* L. var. *Vulgaris Sole*), Mp (*Mentha x piperita*), Su (*Tagetes minuta* L.) y La (*Laurus nobilis* L.). F: fungicida sintético (Fludioxonil).

<sup>b</sup> %: porcentaje de la CFM para cada aceite esencial y el fungicida sintético.

<sup>c</sup> PICO: Porcentaje de inhibición del crecimiento observado; PICE: Porcentaje de inhibición del crecimiento esperado; IA: Índice de Abbott. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas según test LSD de Fisher ( $\alpha = 0.05$ ).

\* Palabras en negrita indican combinaciones sinérgicas o aditivas que inhibieron completamente el crecimiento del hongo.

## INTERACCIÓN ENTRE ACEITES ESENCIALES Y FUNGICIDA SINTÉTICO PARA EL CONTROL DE *Penicillium minioluteum*

Tabla 11. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales y el fungicida sintético contra *Penicillium minioluteum* según método aditivo y de Abbott.

F	AE		PICO <sup>c</sup>	Método aditivo			Método Abbott			
	AE <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>		PICE <sup>c</sup>	Efecto	PICE <sup>c</sup>	IA <sup>c</sup>	Efecto		
20	Su	20	25.6	a	23.0	a	Antagonismo	21.7	1.18	Aditividad
20		40	48.0	a	40.2	a	Aditividad	36.6	1.31	Aditividad
20		60	53.6	a	57.2	a	Aditividad	51.3	1.04	Aditividad
20		80	65.6	a	61.9	a	Aditividad	55.3	1.19	Aditividad
40		20	43.8	a	63.5	a	Aditividad	58.3	0.75	Aditividad
40		40	31.2	b	80.6	a	Antagonismo	66.2	0.47	Antagonismo
40		60	26.5	b	97.6	a	Antagonismo	74.1	0.36	Antagonismo

Tabla 11. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales y el fungicida sintético contra *Penicillium minioluteum* según método aditivo y de Abbott. Continuación.

40		80	53.8	b	100.0	a	Antagonismo	76.2	0.71	Aditividad
60		20	62.3	b	71.6	a	Antagonismo	65.7	0.95	Aditividad
60		40	43.2	b	88.8	a	Antagonismo	72.2	0.60	Aditividad
60		60	46.7	b	100.0	a	Antagonismo	78.6	0.59	Aditividad
60		80	71.0	b	100.0	a	Antagonismo	80.4	0.88	Aditividad
80		20	62.2	b	86.2	a	Antagonismo	78.9	0.79	Aditividad
80		40	78.3	b	100.0	a	Antagonismo	82.9	0.94	Aditividad
80		60	79.0	b	100.0	a	Antagonismo	86.9	0.91	Aditividad
80		80	93.4	a	100.0	a	Aditividad	88.0	1.06	Aditividad
20	La	20	24.1	b	54.07	a	Antagonismo	48.6	0.50	Aditividad
20		40	41.3	a	55.55	a	Aditividad	49.9	0.83	Aditividad
20		60	46.7	a	66.23	a	Aditividad	59.1	0.79	Aditividad
20		80	31.0	b	72.75	a	Antagonismo	64.8	0.48	Antagonismo
40		20	13.8	b	94.5	a	Antagonismo	72.6	0.19	Antagonismo
40		40	67.6	b	95.98	a	Antagonismo	73.3	0.92	Aditividad
40		60	64.2	b	100	a	Antagonismo	78.2	0.82	Aditividad
40		80	68.0	b	100	a	Antagonismo	81.2	0.84	Aditividad
60		20	26.5	b	100	a	Antagonismo	77.5	0.34	Antagonismo
60		40	65.5	b	100	a	Antagonismo	78.0	0.84	Aditividad
60		60	48.6	b	100	a	Antagonismo	82.1	0.59	Aditividad
60		80	12.3	b	100	a	Antagonismo	84.5	0.15	Antagonismo
80		20	16.4	b	100	a	Antagonismo	86.1	0.19	Antagonismo
80		40	37.1	b	100	a	Antagonismo	86.5	0.43	Antagonismo
80		60	64.1	b	100	a	Antagonismo	89.0	0.72	Aditividad
80		80	76.2	b	100	a	Antagonismo	90.5	0.84	Aditividad
20	Mi	20	1.0	b	39.28	a	Antagonismo	35.8	0.03	Antagonismo
20		40	19.8	b	71.01	a	Antagonismo	63.3	0.31	Antagonismo
20		60	21.6	b	72.03	a	Antagonismo	64.1	0.34	Antagonismo
20		80	48.4	b	78.99	a	Antagonismo	70.2	0.69	Aditividad
40		20	25.6	b	79.71	a	Antagonismo	65.8	0.39	Antagonismo
40		40	25.3	b	100	a	Antagonismo	80.4	0.31	Antagonismo
40		60	54.5	b	100	a	Antagonismo	80.9	0.67	Aditividad
40		80	62.6	b	100	a	Antagonismo	84.1	0.74	Aditividad
60		20	24.0	b	87.86	a	Antagonismo	71.9	0.33	Antagonismo
60		40	26.1	b	100	a	Antagonismo	83.9	0.31	Antagonismo
60		60	42.1	b	100	a	Antagonismo	84.3	0.50	Aditividad
60		80	57.1	b	100	a	Antagonismo	86.9	0.66	Aditividad
80		20	33.3	b	100	a	Antagonismo	82.7	0.40	Antagonismo
80		40	36.3	b	100	a	Antagonismo	90.1	0.40	Antagonismo
80		60	55.8	b	100	a	Antagonismo	90.3	0.62	Aditividad
80		80	91.1	a	100	a	<b>Aditividad</b>	92.0	0.99	<b>Aditividad</b>
20	Mp	20	11.4	b	39.28	a	Antagonismo	11.4	0.42	Antagonismo
20		40	22.4	b	71.01	a	Antagonismo	22.4	0.40	Antagonismo
20		60	22.8	b	72.03	a	Antagonismo	22.8	0.39	Antagonismo
20		80	49.5	b	78.99	a	Antagonismo	49.5	0.67	Aditividad
40		20	15.6	b	79.71	a	Antagonismo	15.6	0.25	Antagonismo
40		40	25.9	b	100	a	Antagonismo	25.9	0.34	Antagonismo

Tabla 11. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales y el fungicida sintético contra *Penicillium minioluteum* según método aditivo y de Abbott. Continuación.

40		60	61.1	b	100	a	Antagonismo	61.1	0.78	Aditividad
40		80	58.4	b	100	a	Antagonismo	58.4	0.68	Aditividad
60		20	30.5	b	87.86	a	Antagonismo	30.5	0.45	Antagonismo
60		40	21.9	b	100	a	Antagonismo	21.9	0.27	Antagonismo
60		60	51.4	b	100	a	Antagonismo	51.4	0.63	Aditividad
60		80	65.8	b	100	a	Antagonismo	65.8	0.74	Aditividad
80		20	43.5	b	100	a	Antagonismo	43.5	0.54	Aditividad
80		40	49.9	b	100	a	Antagonismo	49.9	0.57	Aditividad
80		60	65.6	b	100	a	Antagonismo	65.6	0.74	Aditividad
80		80	95.9	a	100	a	<b>Aditividad</b>	95.9	1.03	<b>Aditividad</b>
20	Omen	20	22.8	a	22.43	a	Aditividad	21.2	1.07	Aditividad
20		40	50.7	b	76.6	a	Antagonismo	68.1	0.75	Aditividad
20		60	65.9	b	90.6	a	Antagonismo	80.2	0.82	Aditividad
20		80	94.2	a	100	a	Aditividad	89.1	1.06	Aditividad
40		20	56.0	a	62.86	a	Aditividad	58.0	0.97	Aditividad
40		40	16.9	b	100	a	Antagonismo	83.0	0.20	Antagonismo
40		60	76.0	b	100	a	Antagonismo	89.5	0.85	Aditividad
40		80	88.1	a	100	a	Aditividad	94.2	0.94	Aditividad
60		20	23.9	b	71.01	a	Antagonismo	65.5	0.37	Antagonismo
60		40	60.5	a	100	a	Aditividad	86.0	0.70	Aditividad
60		60	91.2	a	100	a	<b>Aditividad</b>	91.3	1.00	<b>Aditividad</b>
60		80	91.2	a	100	a	<b>Aditividad</b>	95.2	0.96	<b>Aditividad</b>
80		20	86.2	a	85.61	a	Antagonismo	78.8	1.09	Aditividad
80		40	66.7	b	100	a	Aditividad	91.4	0.73	Aditividad
80		60	57.3	b	100	a	Aditividad	94.7	0.61	Aditividad
80		80	93.0	a	100	a	<b>Aditividad</b>	97.1	0.96	<b>Aditividad</b>
20	Ocom	20	31.4	a	45.65	a	Aditividad	41.3	0.76	Aditividad
20		40	39.0	b	72.61	a	Antagonismo	64.6	0.60	Aditividad
20		60	62.1	a	79.34	a	Aditividad	70.5	0.88	Aditividad
20		80	88.4	a	100	a	Aditividad	89.1	0.99	Aditividad
40		20	0.4	b	86.08	a	Antagonismo	68.7	0.01	Antagonism
40		40	76.8	b	100	a	Antagonismo	81.2	0.95	Aditividad
40		60	79.2	b	100	a	Antagonismo	84.3	0.94	Aditividad
40		80	85.8	a	100	a	Aditividad	94.2	0.91	Aditividad
60		20	42.0	b	94.23	a	Antagonismo	74.3	0.57	Aditividad
60		40	47.5	b	100	a	Antagonismo	84.5	0.56	Aditividad
60		60	52.7	b	100	a	Antagonismo	87.0	0.60	Aditividad
60		80	76.1	b	100	a	Antagonismo	95.2	0.80	Aditividad
80		20	89.6	a	100	a	Aditividad	84.2	1.06	Aditividad
80		40	79.9	b	100	a	Antagonismo	90.5	0.88	Aditividad
80		60	100.0	a	100	a	<b>Aditividad</b>	92.0	1.09	<b>Aditividad</b>
80		80	100.0	a	100	a	<b>Aditividad</b>	97.1	1.03	<b>Aditividad</b>
20	Ocor	20	59.0	a	23.09	b	Sinergismo	21.8	2.71	Sinergismo
20		40	33.1	b	67.4	a	Antagonismo	60.1	0.55	Aditividad
20		60	40.9	b	79.79	a	Antagonismo	70.8	0.58	Aditividad
20		80	49.5	b	83.82	a	Antagonismo	74.3	0.67	Aditividad
40		20	45.4	a	63.52	a	Aditividad	58.3	0.78	Aditividad

Tabla 11. Actividad sinérgica, aditiva o antagónica entre aceites esenciales y el fungicida sintético contra *Penicillium minioluteum* según método aditivo y de Abbott. Continuación.

40	40	74.0	b	100	a	Antagonismo	78.8	0.94	Aditividad
40	60	84.7	a	100	a	Aditividad	84.5	1.00	Aditividad
40	80	76.6	b	100	a	Antagonismo	86.3	0.89	Aditividad
60	20	27.7	b	71.67	a	Antagonismo	65.7	0.42	Aditividad
60	40	74.7	a	100	a	Aditividad	82.5	0.91	Aditividad
60	60	96.9	a	100	a	<b>Aditividad</b>	87.2	1.11	<b>Aditividad</b>
60	80	95.7	a	100	a	<b>Aditividad</b>	88.7	1.08	<b>Aditividad</b>
80	20	43.0	b	86.27	a	Antagonismo	78.9	0.55	Aditividad
80	40	95.4	a	100	a	<b>Aditividad</b>	89.2	1.07	<b>Aditividad</b>
80	60	100.0	a	100	a	<b>Aditividad</b>	92.1	1.18	<b>Aditividad</b>
80	80	92.8	b	100	a	Antagonismo	93.1	1.00	Aditividad

<sup>a</sup>AE: aceite esencial; OCor (*Origanum vulgare* sspp *hirtum*), OCom (*Origanum vulgare* L. sspp. *Vulgare*), OMen (*Origanum x majoricum*), Mi (*Mentha x piperita* L. var. *Vulgaris Sole*), Mp (*Mentha x piperita*), Su (*Tagetes minuta* L.) y La (*Laurus nobilis* L.). F: fungicida sintético (Fludioxonil).

<sup>b</sup> %: porcentaje de la CFM para cada aceite esencial y el fungicida sintético.

<sup>c</sup> PICO: Porcentaje de inhibición del crecimiento observado; PICE: Porcentaje de inhibición del crecimiento esperado; IA: Índice de Abbott. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas según test LSD de Fisher ( $\alpha = 0.05$ ).

\* Palabras en negrita indican combinaciones sinérgicas o aditivas que inhibieron completamente el crecimiento del hongo.