

- 2017 -



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Carrera de Ciencias Biológicas

“Efecto de compuestos orgánicos volátiles verdes sobre el crecimiento de *Fusarium verticillioides* y acción del trans-2-hexen-1-ol sobre su insecto vector, *Sitophilus zeamais*”

**Cátedra de Química Orgánica, FCEFN-UNC- IMBIV-
CONICET y el Área de Aromas y Pigmentos (ICTA-
FCEFN-UNC)**

Tesinista: Brito, Vanessa Daniela

Firma:.....

Director: Pizzolitto, Romina Paola

Firma:.....

TRIBUNAL EXAMINADOR

Nombre/s y Apellido:.....

Firma:.....

Nombre/s y Apellido:.....

Firma:.....

Nombre/s y Apellido:.....

Firma:.....

Calificación:.....

Fecha:.....

Agradecimientos

- A Julio, por aceptar que forme parte de su laboratorio y pueda llevar a cabo la última parte y más importante de mi carrera.
- A mi directora, Romina, por aceptar dirigir mi tesina, por su paciencia, su entusiasmo y generosidad. Gracias por brindarme no solo su conocimiento sino también su cariño.
- A Laura, por enseñarme desinteresadamente, ayudarme a crecer en lo profesional y por brindarme un trato afectuoso.
- A mis compañeros de laboratorio, gracias por ofrecerme apoyo constante y un cálido ambiente en el que compartimos valiosas mañanas y tardes. En este período de aprendizaje han sido un ejemplo de vocación, esfuerzo, motivación y dedicación.
- A mis padres, Amalia y Ricardo, por el amor, las enseñanzas, por darme la posibilidad de elegir la carrera que me gustaba y apoyarme en mis decisiones. Gracias por darme la libertad que necesito para encontrar mi propio camino.
- A mis hermanos Juan Manuel y Carola. Gracias por las críticas más duras, las sonrisas cómplices, las palabras acertadas, las miradas que dicen todo.
- A mis tíos y primos, que desde chica ocupan un lugar muy importante en mi vida.
- A mi ahijado, que me llena de alegría día a día y saca mi niña interna en cada momento.
- A mis amigos de la facultad por los momentos compartidos día a día y especialmente por las tardes de mates, estudio y extensas charlas. Gracias por mostrarme que nada es imposible cuando los tienes a tu lado y te dirigen una sonrisa.

- A mis amigas de Alta Gracia, por su apoyo constante, sus consejos e inolvidables momentos compartidos. Gracias por ser esa parte tan importante en mi vida y que me permitieron crecer como persona.
- A la Universidad Nacional de Córdoba, y especialmente a la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales por brindarme el espacio y las herramientas para llevar a cabo mi carrera.
- A CONICET, FONCyT, SECyT-UNC por el apoyo económico.
- Al ICTA por el uso de las instalaciones.
- A mi tribunal de tesina por todas las críticas constructivas aportadas.

A todos, ¡muchas gracias!

INDICE

TRIBUNAL EXAMINADOR.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
INDICE.....	6
RESUMEN.....	8
PALABRAS CLAVES.....	10
INTRODUCCIÓN.....	10
OBJETIVO GENERAL.....	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
HIPÓTESIS.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS	
Estudio del efecto de compuestos orgánicos volátiles sobre el crecimiento de <i>Fusarium verticillioides</i>	
Productos químicos.....	19
Cepa fúngica.....	20
Medio y condiciones de cultivo.....	20
Evaluación del crecimiento y análisis estadístico.....	21
Análisis del efecto de Trans-2-hexen-1-ol sobre <i>Fusarium verticillioides</i> y su insecto vector, <i>Sitophilus zeamais</i>, en un sistema abierto, húmedo y con presencia de granos de maíz.	
Cría de insectos.....	23
Recolección de material vegetal.....	23
Ensayo.....	24
Parámetros medidos	
Determinación de peso seco del grano de maíz.....	25
Porcentaje de mortalidad en insecto.....	25
Determinación del porcentaje de infección fúngica en grano de maíz.....	25
Determinación del porcentaje de infección fúngica en insecto.....	25
Extracción y cuantificación de ergosterol en maíz.....	26
Determinación de la biosíntesis de FB ₁	27
Análisis Estadístico.....	28
RESULTADOS	
Estudio del efecto de compuestos orgánicos volátiles sobre el crecimiento de <i>Fusarium verticillioides</i>	29

Análisis del efecto de Trans-2-hexen-1-ol sobre *Fusarium verticillioides* y su insecto vector, *Sitophilus zeamais*, en un sistema abierto, húmedo y con presencia de granos de maíz.

Determinación de peso seco del grano de maíz.....	34
Porcentaje de mortalidad en insecto.....	35
Determinación del porcentaje de infección fúngica en grano de maíz.....	36
Determinación del porcentaje de infección fúngica en insecto.....	38
Extracción y cuantificación de ergosterol en maíz.....	39
Determinación de la biosíntesis de FB ₁	40
DISCUSIÓN.....	42
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

Resumen

Actualmente se conoce los riesgos ambientales y a la salud que generan los pesticidas sintéticos, por tal motivo es necesario buscar alternativas naturales para combatir las plagas que dañan los cultivos y producen importantes pérdidas económicas. *Sitophilus zeamais* y *Fusarium verticillioides* son dos plagas que interaccionan entre si y atacan al maíz almacenado. En el presente trabajo se estudió el efecto fungicida de diez compuestos orgánicos volátiles (COVs) verdes, sobre *Fusarium verticillioides* M3125, en cultivo en placa con agar Czapek-Dox. Si bien todos los compuestos ensayados mostraron actividad sobre el desarrollo fúngico, geraniol, nerol, isovaleraldehído y linalool presentaron mayor actividad antimicótica afectando significativamente a los parámetros de crecimiento de *F. verticillioides*. A partir de los resultados del ensayo e investigaciones previas sobre el efecto insecticida de COVs verdes en *S. zeamais*, se seleccionó el trans-2-hexen-1-ol para evaluar su efecto sobre *Fusarium verticillioides* y su insecto vector, *Sitophilus zeamais*, en un sistema abierto, húmedo y con presencia de granos de maíz. Para este ensayo se determinó diferencia de peso seco del grano de maíz, porcentaje de infección fúngica en grano de maíz, porcentaje de infección fúngica en insecto, porcentaje de mortalidad en insecto, biomasa fúngica a través de la cuantificación de ergosterol y biosíntesis de fumonisina B₁. El trans-2-hexen-1-ol debido a su actividad antifúngica contra *F. verticillioides* M3125 y el efecto sobre la mortalidad en el insecto vector, *S. zeamais*, evitó también la aparición de fumonisina B₁ (FB₁), la dispersión de las esporas y la ruptura de granos en un sistema que se aproxima al procedimiento real de almacenamiento de maíz:

el silo. El trans-2-hexen-1-ol es una potencial herramienta para controlar dos importantes plagas del maíz de una manera más natural, constituyendo una alternativa a los fungicidas sintéticos.

Palabras claves: maíz, *Fusarium verticillioides*, *Sitophilus zeamais*, compuestos orgánicos volátiles.

Introducción

Actualmente *Zea mays* es uno de los alimentos básicos más importantes del mundo (Ranum et al., 2014), y es el cereal con el mayor volumen de producción (FAO, 2006). Argentina es el segundo exportador de maíz en el mundo (INDEC, 2015), y este cultivo es primordial en términos de producción de granos (SAGPyA, 2009). Sin embargo, una importante parte de la producción anual de maíz se pierde por el ataque de hongos e insectos (Zunino et al., 2015), los cuales causan daños sustanciales a los cereales.

Este cereal puede ser colonizado por distintas comunidades de hongos durante la cosecha y/o el almacenamiento (Etcheverry et al., 1999, Nesci et al., 2008), reduciendo la calidad y cantidad de granos. Los hongos del género *Fusarium*, se encuentran generalmente sobre los desechos vegetales y plantas de cultivos en todo el mundo (Marasas et al., 1984; Summerell et al., 2003). Este género fúngico es económicamente importante debido a su capacidad de infectar y causar la destrucción de tejidos en cultivos importantes tales como maíz, trigo y otros cultivos de granos (Figura 1).



Figura 1: Granos de maíz infectados por hongos del genero *Fusarium*. (Fuente: <http://bmeditores.mx/sinergia-entre-fumonisina-b1-las-enfermedades-respiratorias-en-cerdos/>).

La especie *Fusarium verticillioides*, no solo es la principal causante de la descomposición de la espiga de maíz en Argentina (Chulze et al., 2000), sino también es productora de metabolitos secundarios tóxicos llamados micotoxinas, en cultivos y en silos de almacenamiento. Las micotoxinas son consideradas un factor de riesgo al tener efectos negativos sobre animales y además, generan considerables pérdidas económicas (Cano et al., 2016).

Muchas cepas de *F. verticillioides* producen fumonisinas (FBs) (Voss et al., 2007), una de las micotoxinas más importantes que causan efectos tóxicos en la salud humana y animal (Gong et al., 2009; Pitt et al., 2013). Las FBs son hepatotóxicas en la mayoría de las especies animales (Nelson et al., 1993). La fumonisina B₁ (FB₁) (figura 2) es generalmente el miembro más abundante de la familia de las micotoxinas producidas principalmente por *F. verticillioides* (Leslie et al., 1992) y *Fusarium proliferatum*. Desde el punto de vista toxicológico, FB₁ es la micotoxina más estudiada, conociéndose que causa enfermedades en animales tales como leucoencefalomalacia en caballos, cambios morfológicos testiculares y reducción de la fertilidad en conejos (Ewuola y Egbunike, 2010). Además, FB₁ tiene propiedades inmunotóxicas, neurotóxicas, hepatotóxicas, nefrotóxicas y cancerígenas (Stockmann- Juvala y Savolainen, 2008). Las Fumonisinas han sido clasificadas por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, 2002) como sustancias de la Clase 2B, es decir, posiblemente carcinógenas para los seres humanos, debido a que el consumo de productos contaminados parece estar relacionado con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de esófago y defectos en la formación de tubos neurales embrionarios. Muchas encuestas mundiales

redondos, cuatro manchas rojizas en los élitros y alas funcionales (Sharifi y Mills, 1971) (Figura 3). La hembra de *S. zeamais* con su aparato bucal excava un orificio en el grano, dentro del cual deposita un huevo, y luego lo cubre con un tapón mucilaginoso. Durante su ciclo de vida una hembra puede depositar de 300 a 550 huevos (Artemio et al., 2002). No todos los orificios excavados se utilizan para la oviposición; algunos están abandonados y otros se expanden como agujeros de alimentación (Campbell et al., 2002). El desarrollo del insecto dentro del grano, reduce la calidad y el valor comercial del maíz.



Figura 3: *Sitophilus zeamais*, Individuo adulto. (Fuente: http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/eafrinet/maize_pests/key/maize_pests/Media/Html/Sitophilus_zeamais_Motschulsky_1855_-_Maize_Weevil.htm).

Aunque las nuevas tecnologías han generado un incremento importante en la producción de diferentes alimentos, la actividad destructiva de numerosas plagas tales como hongos, malezas e insectos ejercen una fuerte presión en la disminución de los rendimientos de la producción agrícola. Con el arribo de los plaguicidas químicos sintéticos, se logró controlar parcialmente a las plagas durante un lapso de tiempo importante, pero su aplicación intensiva y continua llevó al desarrollo de resistencia en muchas áreas alrededor del mundo (Perez-Mendoza, 1999; Araújo et al., 2011; Boyer et al., 2012). Con el fin de superar este problema, se utilizan concentraciones cada vez mas altas de estos

agentes químicos, aumentando el riesgo por residuos tóxicos en los productos. Además los pesticidas sintéticos generan problemas de salud en la población humana y dañan el ambiente al traerle inconvenientes como la degradación de suelos, contaminación de aguas subterráneas, etc. (Gupta y Dikshit, 2010). Independientemente de sus beneficios, es evidente que los plaguicidas son sustancias químicas deliberadamente tóxicas, creadas para interferir algún sistema biológico en particular y que carecen de selectividad (OMS, 1993), afectando simultáneamente, y en mayor o menor grado, tanto a la «especie blanco» como a otros seres vivos, entre ellos el hombre (Briggs et al., 1992; OMS, 1993).

Frente a este problema con los actuales agentes pesticidas, hay un interés mundial en el desarrollo de estrategias alternativas, para controlar la calidad de los granos almacenados, que incluyen el desarrollo o la búsqueda de nuevas sustancias químicas amigables con el ambiente. Una alternativa a la aplicación de pesticidas sintéticos es la utilización de moléculas a partir de fuentes naturales para la preservación de los granos (Isman et al., 2006), las cuales pueden usarse de manera segura debido a su reducida toxicidad en mamíferos y restringida persistencia en el ambiente (Seiber et al., 2014).

Para protegerse de los organismos plagas, las plantas han desarrollado un arsenal de defensas químicas (Cardoza et al., 2002, Rasmann et al., 2005, Vikram et al., 2005). Las plantas emiten muchos de sus metabolitos secundarios como compuestos orgánicos volátiles (COVs), los cuales tienen efectos sobre diferentes organismos (Dudareva et al. 2006). Los COVs verdes pueden tener una amplia gama de actividades biológicas. Recientemente, numerosos informes sobre compuestos volátiles desarrollan sus potenciales

actividades antifúngicas, insecticidas, herbicidas y nematocidas (Wang y Dorn, 2003; Mercier y Smilanick 2005; Gu et al., 2007; Kai et al., 2007; Liu et al., 2008; Zhao et al., 2011). Los COVs además de reducir significativamente el crecimiento de hifas fúngicas (Alvarez-Castellanos et al., 2001), producen cambios morfológicos en las colonias miceliales. Estas variaciones incluyen falta de esporulación, pérdida de pigmentación y desarrollo anormal de conidióforos (Arras y Usai, 2001; Guynot et al., 2003).

Los aceites esenciales y sus componentes principales, los monoterpenos, son la clase más prometedora de productos naturales que puede utilizarse como agentes más seguros para el control de plagas y enfermedades. En la actualidad varias publicaciones informaron que algunos aceites esenciales causan una reducción en la producción de fumonisina por *F. verticillioides* (López et al. 2004; Velluti et al., 2004), y las propiedades de estos aceites esenciales se atribuyen principalmente a monoterpenos (Lambert et al., 2001). Además, estos compuestos dan a las plantas sus propiedades olorosas únicas debido a sus bajos puntos de ebullición. Los monoterpenos incluyen alcoholes y aldehídos, entre otros. Las propiedades pesticidas naturales de algunos monoterpenos los hacen útiles como potenciales agentes de control de plagas alternativos, así como buenos compuestos para el desarrollo de pesticidas seguros, efectivos y totalmente biodegradables. En muchas investigaciones se demostró las importantes propiedades insecticidas, herbicidas, fungicidas y bactericidas de los monoterpenos (Marei et al., 2012).

Se conoce que algunos aldehídos tienen actividad insecticida (Aharoni et al., 1979; Hubert et al, 2008), acaricida y afectan al crecimiento de algunos hongos como *Aspergillus carbonarius* y *F. proliferatum* (Santino et al., 2005; Mita, 2007).

En reemplazo de los plaguicidas que se usan actualmente, se proponen los bioalcoholes como una alternativa para la conservación de los granos. El monoterpeno geraniol mostró efecto fungistático y fungicida contra *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Geotrichum candidum* (Marei et al., 2012) y *Aspergillus flavus* (Mahmoud et al., 1994). Bioensayos antifúngicos revelaron que citronelol inhibe fuertemente el crecimiento micelial de varios patógenos a una dosis de tratamiento baja e induce anomalías morfológicas miceliales (Zhao et al., 2011).

En la actualidad, el uso de plaguicidas, incluyendo insecticidas, fungicidas, herbicidas, etc., para proteger los cultivos contra las plagas, es necesario para aumentar el rendimiento y las pérdidas de calidad de los cultivos (Fernando, 2006). Los COVs provenientes de plantas, son considerados plaguicidas de mínimo riesgo para la salud humana (Epa, 2015) y tienen funciones muy amplias.

Objetivo general

- Evaluar el efecto de compuestos orgánicos volátiles verdes sobre el crecimiento de *Fusarium verticillioides* y la acción del trans-2-hexen-1-ol sobre su insecto vector, *Sitophilus zeamais*.

Objetivos específicos

- Estudiar el efecto de diez monoterpenos (ocho alcoholes y dos aldehídos) producidos por el metabolismo de plantas, sobre el crecimiento de *F. verticillioides*.
 - Analizar el efecto del trans-2-hexen-1-ol sobre *F. verticillioides* y *S. zeamais*, en un sistema abierto y con presencia de granos de maíz, representando un sistema real de almacenamiento de granos: el silo.
1. Identificar posibles pérdidas resultantes de la acción de *S. zeamais* y *F. verticillioides*, mediante la cuantificación de la diferencia de peso seco del grano de maíz.
 2. Determinar porcentaje de infección fúngica en granos de maíz.
 3. Medir porcentaje de infección fúngica en insectos.
 4. Determinar porcentaje de mortalidad en insecto.
 5. Evaluar biomasa fúngica, mediante la cuantificación de ergosterol en grano de maíz.
 6. Medición de la biosíntesis de FB₁.

Hipótesis de trabajo

- Los COVs verdes ensayados afectan el crecimiento de *F. verticillioides*, disminuyendo su propagación.
- El compuesto seleccionado en base a datos experimentales de esta investigación y otras realizadas en el grupo de trabajo, aumenta la mortalidad de *S. zeamais*, manteniendo constante el peso seco de los granos de maíz y el transporte de esporas de *F. verticillioides*, lo que disminuye el porcentaje de granos e insectos infectados por el hongo.
- La cantidad de ergosterol y de FB₁ disminuye debido a que el COV verde seleccionado inhibe el crecimiento de *F. verticillioides* y evita el transporte de sus esporas por medio del insecto vector, *S. zeamais*.

Materiales y métodos

1. Estudio del efecto de compuestos orgánicos volátiles sobre el crecimiento de *Fusarium verticillioides*

1.1. Productos químicos

Los compuestos se adquirieron en Sigma Aldrich (Buenos Aires, Argentina).

Los compuestos orgánicos volátiles utilizados en los bioensayos fueron: trans-3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ol (Geraniol, 98%); cis-3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ol (Nerol, 99%); 3-Methylbutanal, 3-Methylbutyraldehyde (Isovaleraldehído, 97%); 2-Methylpropanal, 2-Methylpropionaldehyde (Isobutiraldehído, 99%); trans-2-Hexen-1-ol (Trans-2-Hexen-1-ol, 97%); cis-2-Hexen-1-ol (Cis-2-Hexen-1-ol, 95%); trans-3-Hexen-1-ol (Trans-3-Hexen-1-ol, 97%); cis-3-Hexen-1-ol (Cis-3-Hexen-1-ol, 98%), 3,7-Dimethyl-1,6-octadien-3-ol (Linalool, 97%) y 3,7-Dimethyl-6-octen-1-ol (citronellol, 98%) (Figura 4).

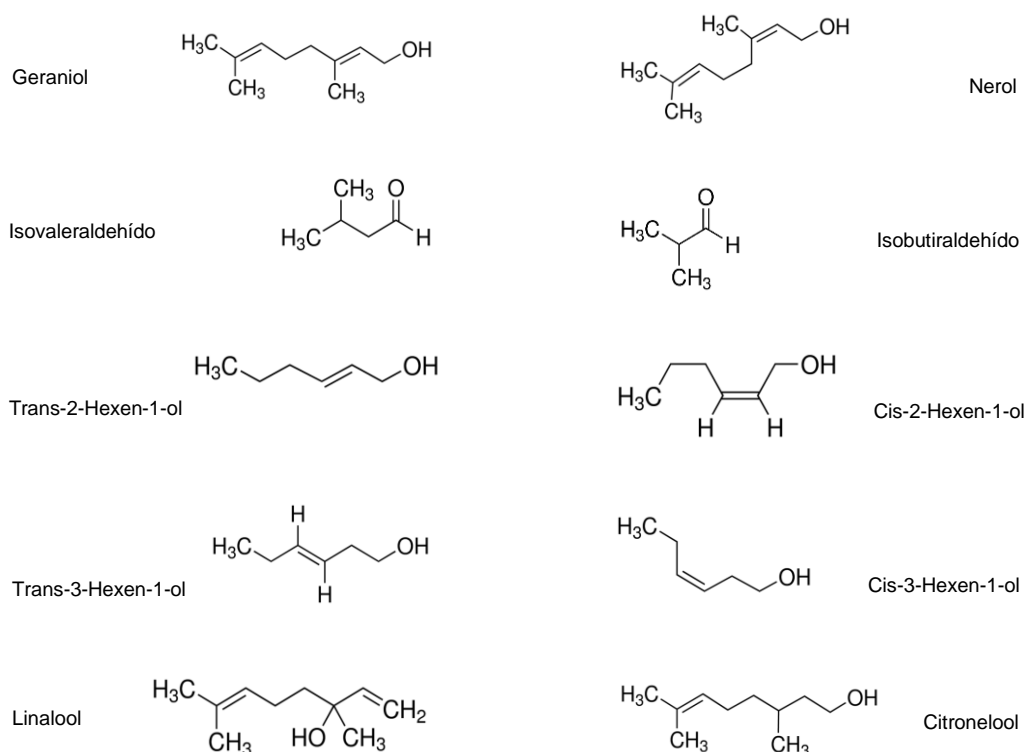


Figura 4: Estructura de compuestos orgánicos volátiles utilizados

1.2. Cepa fúngica

La cepa fúngica utilizada en las experiencias fue *Fusarium verticillioides* M-3125, proporcionada por el Dr. Robert Proctor (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Servicio de Investigación Agrícola, Centro Nacional de Investigación de Utilización Agrícola, Peoria, IL, EE.UU.). Se aisló de maíz en California y es una cepa productora de fumonisina (Leslie, 2006).

1.3. Medio y condiciones de cultivo

El inóculo se preparó cultivando *F. verticillioides* M3125 sobre agar Czapek-Dox durante 7 días a 25 °C en placas de Petri, para obtener cultivos fuertemente esporulados. Se añadió agua destilada estéril a las placas y se obtuvo una suspensión de conidios. Después de homogeneizar se contó la suspensión usando una cámara de Neubauer, ajustándose a la concentración de $1,6 \times 10^6$ conidios/ml. Para evaluar la actividad antifúngica de los COVs

verdes se determinó el crecimiento radial de la colonia (figura 5), de acuerdo a la metodología propuesta por Neri et al. (2007). Para ello, se utilizó medio de cultivo Czapek-Dox agar en placas de Petri (85 mm). Las placas se inocularon centralmente con 10 μ l de la suspensión de conidios. En la tapa de cada cápsula de Petri, se colocó papel de aluminio y papel de filtro, cuyo tamaño fue equivalente al diámetro de la placa. En este último se colocaron los compuestos volátiles separadamente, a diferentes concentraciones, 0,033; 0,066; 0,130; 0,270; 0,530; 1,060; 2,120 y 4,240 mM (expresados como mM por volumen de la placa de Petri). En los tratamientos control no se le añadió ningún compuesto al papel de filtro. Las placas se incubaron a 28 °C hasta que el crecimiento radial completó la placa. Todos los tratamientos se repitieron tres veces.



Figura 5: crecimiento radial de la colonia de *Fusarium verticillioides* M3125.

1.4. Evaluación del crecimiento y análisis estadístico

La actividad de los COVs verdes se determinó evaluando el crecimiento fúngico. Se midió diariamente dos diámetros perpendiculares de las colonias en crecimiento (mm) hasta que la colonia cubrió por completo la placa. El área de la colonia se determinó a través de la fórmula: πr^2 . Los radios de las colonias se representaron en función del tiempo y se aplicó regresión lineal para obtener la tasa de crecimiento como la pendiente de la recta. El efecto de cada compuesto químico en la fase de latencia para el crecimiento, está definida

como el tiempo (días) en el que cada colonia alcanza 5 mm de diámetro (Pizzolitto et al., 2015).

El porcentaje de inhibición se representó frente a la concentración de cada compuesto respecto al control, a los cinco días de incubación. Se calculó la concentración inhibitoria mínima (CIM, concentración más baja de los compuestos a los que no se observa crecimiento fúngico) por interpolación en la regresión lineal mencionada anteriormente. Los valores de los parámetros p y R^2 se utilizaron para comprobar la validez del análisis de regresión.

Se probaron los supuestos de Normalidad y Homogeneidad de varianzas para cada variable utilizada.

A partir del área de crecimiento de la colonia fúngica se realizó un análisis de la varianza paramétrico (ANAVA) por bloque, y la comparación entre los diferentes tratamientos con respecto al control se realizó utilizando el test de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (prueba DGC), (Di Rienzo, 2002). Los resultados con valores $p < 0,05$ son considerados significativamente diferentes al control.

Las comparaciones entre los diferentes tratamientos se realizaron utilizando el porcentaje de inhibición. Se llevó a cabo según análisis de la varianza no paramétrica, Kruskal Wallis. Los resultados con valores $p < 0,05$ son considerados significativamente diferentes al control.

El análisis de las tasas de crecimiento y fase de latencia con respecto al control se realizaron mediante un análisis de la varianza por bloque, test de Tuckey ($p < 0.05$).

Todos los análisis se realizaron con el software InfoStat Professional 2010 p (Di Rienzo et al., 2010).

2. Análisis del efecto de Trans-2-hexen-1-ol sobre *Fusarium verticillioides* y su insecto vector, *Sitophilus zeamais*, en un sistema abierto, húmedo y con presencia de granos de maíz.

2.1 Insectos

En los ensayos se utilizaron *Sitophilus zeamais* (Motschulsky), criados en Córdoba, Argentina. Los insectos se mantuvieron fuera de la exposición a insecticidas. La cría de insectos se llevó a cabo bajo temperatura y humedad controladas (28 °C y 60%-70%) (FAO, 1974) en oscuridad y en granos de maíz enteros en recipientes sellados. Se utilizaron gorgojos adultos sin diferenciación de sexo y edad.

Previo al desarrollo del ensayo, los insectos seleccionados se sometieron a un proceso de limpieza superficial, por inmersión en hipoclorito de sodio-agua (75%-25%) durante 15 segundos y posteriormente en la misma solución mas diluida (50%-50%) durante 30 segundos.

2.2 Material vegetal

Los granos de *Zea mays L.* se obtuvieron del programa de mejoramiento de la Estación Experimental Manfredi (INTA). Las plantas de maíz crecieron libres de insecticidas. En este punto se contó con la colaboración de la Dra. María José Martínez, Coordinadora del Proyecto Cereales. El material se conservó en envases cerrados y secos a una temperatura de -4 °C y una humedad relativa (HR) de 65%-75%.

Los granos de maíz utilizados en el ensayo fueron autoclavados a 120 °C durante 20 min.

2.3 Ensayo

Se realizaron siete tratamientos con cinco réplicas cada uno (Tabla 1). En los frascos se colocaron 50 g de maíz, 8 ml de agua estéril, 0,5 ml de inóculo fúngico (se procedió como se detalló en el punto 1.3) y veinte insectos, según correspondía al tratamiento. El trans-2-hexen-1-ol a una concentración de 2,120 mM, se colocó en un papel de filtro (6 cm de diámetro) colgando de un hilo, dentro de frascos de 250 ml color caramelo. La abertura de cada frasco fue sellada con tapones de gasa y se cubrieron con papel aluminio para evitar fugas de gas. Los frascos se incubaron a 28 °C. Los días de incubación fueron 28, determinado por el tiempo requerido para la medición de fumonisina (ver 2.4.6).

Tabla 1: Tratamientos realizados para el estudio del efecto de trans-2-hexen-1-ol sobre *Fusarium verticillioides* y su insecto vector, *Sitophilus zeamais*, en un sistema abierto y con presencia de granos de maíz

Grupo	Tratamientos	
	Sin Compuesto	Con compuesto
1	Maíz	-
2	Maíz + <i>F. verticillioides</i>	Maíz + <i>F. verticillioides</i>
3	Maíz + <i>S. zeamais</i>	Maíz + <i>S. zeamais</i>
4	Maíz + <i>F. Verticillioides</i> + <i>S. zeamais</i>	Maíz + <i>F. verticillioides</i> + <i>S. zeamais</i>

2.4 Parámetros medidos

Después de la incubación durante 28 días, se abrieron los frascos para llevar a cabo los distintos procedimientos desarrollados posteriormente.

2.4.1. Determinación de peso seco del grano de maíz

Los granos de maíz del ensayo se esterilizaron en autoclave durante 20 min a 120 °C y se secó en estufa a 60 °C hasta alcanzar peso constante. Todas las muestras fueron nuevamente pesadas con el fin de identificar posibles pérdidas resultantes de la acción de los gorgojos y el desarrollo fúngico.

2.4.2. Porcentaje de mortalidad en insecto.

Se contaron los insectos que sobrevivieron al período del ensayo. Los sobrevivientes se colocaron en frascos estériles y se llevaron a congelación a -20 °C, para el posterior análisis de los insectos infectados con hongos.

2.4.3. Determinación del porcentaje de infección fúngica en grano de maíz

Se seleccionaron aleatoriamente 10 granos de maíz por cada muestra y se desinfectaron por inmersión en hipoclorito de sodio al 2% durante 3 min y se lavaron tres veces con agua destilada estéril. A continuación, se sembraron directamente en placas de Petri con agar Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC), recomendado para el aislamiento de hongos de sustratos con alta actividad de agua (Beti et al., 1995, Pitt y Hocking, 1997). Todas las placas se incubaron a 25 °C durante 7 días. Los resultados se expresaron como el porcentaje de granos infectados con hongos en relación con el número total de granos sembrados.

2.4.4. Determinación del porcentaje de infección fúngica en insecto

Todos los insectos se sembraron en placas de Petri con agar Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC), incubándose a 25 °C durante 7 días.

Posteriormente se contó el número de insectos que a su alrededor desarrollaron colonias fúngicas.

2.4.5. Extracción y cuantificación de ergosterol en maíz

El ergosterol es el principal esteroide componente de la pared de los hongos (Weete, 2012), por lo que este componente de membrana puede utilizarse como indicador de contaminación por estos microorganismos (Seitz et al., 1977).

El análisis de ergosterol se realizó siguiendo la metodología propuesta por Young (1995) con algunas modificaciones. Se suspendieron las muestras de granos de maíz del ensayo (100 mg) en 2 ml de metanol, se trataron con 0,5 ml de hidróxido de sodio (2 M) y se cerraron herméticamente con una tapa de rosca revestida con Teflón. Los tubos de ensayo se colocaron dentro de botellas de plástico de 500 ml taponadas con rosca y se sellaron herméticamente. Las botellas se colocaron en microondas doméstico a 2450 MHz y 750 W, potencia máxima, y se calentaron a 50% de potencia durante 20 s, dos veces. Una vez frías las muestras, se retiraron los tubos de las botellas plásticas externas. Luego, se extrajo con hexano (2 ml aproximadamente). Los extractos de hexano se evaporaron a sequedad y después se resuspendieron en metanol (1 ml) antes del análisis por cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

Las concentraciones de ergosterol se determinaron mediante HPLC, usando Perkin Elmer equipado con un detector UV ajustado a 282 nm.

Se utilizó una columna de fase reversa C18 (diámetro interno de 150 - 4,6 mm y tamaño de partícula de 5 µm). La fase móvil fue acetonitrilo/metanol (80:20),

a un caudal de 1,8 ml / min. La confirmación de ergosterol se realizó mediante una comparación de los tiempos de retención con el patrón externo y mediante coinyección con un patrón. La cuantificación de ergosterol se realizó a través de una comparación de las áreas de los picos de las muestras con las áreas de los patrones.

2.4.6. Determinación de la biosíntesis de FB₁

Después de la incubación durante 28 días, 10 g de maíz autoclavado y seco se trituraron finamente. Para la extracción de la FB₁ se agregaron 30 ml de agua destilada agitando el polvo y agua durante 2 h. Luego, se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 min. Posteriormente, 1 ml del sobrenadante se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 min. Se tomaron 500 µL del sobrenadante y se diluyó con acetonitrilo (500 µL). El extracto acuoso se centrifugó nuevamente a 14.000 rpm durante 10 min. La cuantificación de los extractos diluidos se realizó siguiendo la metodología propuesta por Shephard et al. (1990). Las muestras se analizaron mediante HPLC Perkin Elmer, equipado con un detector de fluorescencia. Las condiciones de la corrida cromatográfica fueron: fase móvil: metanol:fosfato de sodio di-hidrogenado 0.1M (75:25 v/v) a pH 3.35 (ajustado con ácido ortofosfórico); columna de fase reversa C18 (diámetro interno de 150- 4,6 mm y tamaño de partícula de 5 µm) detector de fluorescencia: λ excitación 335 nm, λ emisión 440 nm; con un flujo de 1,5 ml/min.

Se realizó una curva de calibración con patrones de FB₁ (Sigma-Aldrich). La cuantificación de la toxina se obtuvo por comparación de las áreas de los patrones con las muestras, las mismas fueron derivatizadas previo a la

inyección: 50 μ l de muestra + 200 μ l de solución derivatizante [ortoftaldehído (OPA) 40 mg, 0.1 M tetraborato de sodio 5 ml, 2-mercaptoetanol 50 μ l, metanol 1ml]. Se agitó la muestra con la solución derivatizante durante 30 segundos en vortex, se dejó reposar en oscuridad durante 3 min y se inyectó en el HPLC para su cuantificación.

2.5. Análisis estadístico

Se probaron los supuestos de Normalidad y Homogeneidad de varianzas para cada variable utilizada. Los datos obtenidos fueron sujetos a un análisis de varianza paramétrico (ANOVA) y prueba de comparación múltiple de Tukey con el software estadístico InfoStat Professional 2010 p (Di Rienzo et al., 2010).

Los resultados con valores P de 0,05 se consideraron significativamente diferentes.

Resultados

Actividad antifúngica de los COVs verdes

El efecto antifúngico de los COVs verdes sobre *F. verticillioides* M3125 se llevó a cabo en un rango de concentración entre 0,033 y 4,240 mM. Si bien todos los compuestos presentaron efecto sobre el crecimiento fúngico, geraniol fue el más activo seguido por nerol, isovaleraldehído y linalool, con valores de CIM: 0,22 mM, 0,43 mM, 0,46 mM y 0,92 mM respectivamente (Tabla 2). La inhibición del crecimiento fúngico fue dependiente de la concentración en la mayoría de los compuestos, con excepción del trans-3-hexen-1-ol que entre 0,033 mM y 0,530 mM se observó un porcentaje de inhibición estable.

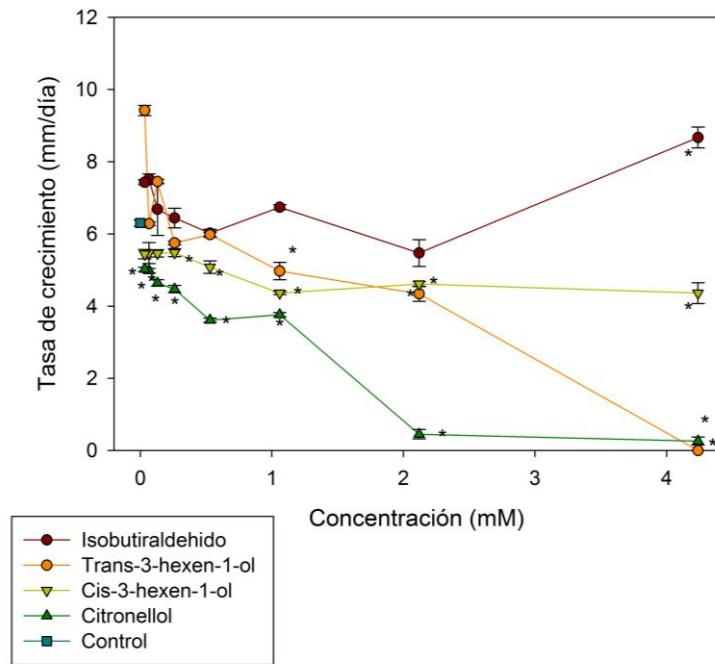
El efecto de los compuestos sobre los parámetros de crecimiento fúngico se muestran en las Figuras 6, 7 y 8. Los resultados revelaron que dichos parámetros se vieron afectados dependiendo de los compuestos y la concentración aplicada. A medida que se incrementó la concentración de los compuestos, la tasa de crecimiento disminuyó (Figura 6A, 7A y 8A) y la fase de latencia aumentó (Figura 6B, 7B y 8B). El compuesto más activo fue geraniol, mostrando una inhibición total del crecimiento a valores superiores a 0,260 mM. Es necesario tener en cuenta que las figuras 6, 7 y 8 presentan gráficos cuyos ejes están en distintas escalas, presentados de esta manera para poder realizar una mejor observación de los parámetros de crecimiento de *F. verticillioides* para cada compuesto a cada concentración ensayada.

Tabla 2: Actividad antifúngica de compuestos orgánicos volátiles contra la cepa *Fusarium verticillioides* M3125

Compuesto	CIM ¹ (mM)	Inhibición ² (%) ± DE							
		4,240 mM	2,120 mM	1,060 mM	0,530 mM	0,260 mM	0,130 mM	0,066 mM	0,033 mM
Geraniol	0,22	100 ± 0 ^{*a}	100 ± 0 ^{*a}	100 ± 0 ^{*a}	100 ± 0 ^{*a}	100 ± 0 ^{*a}	96,77 ± 0,15 ^{*d}	80,56 ± 0,99 ^{*h}	55,83 ± 1,26 ^{*j}
Nerol	0,43	100 ± 0 ^{*a}	100 ± 0 ^{*a}	100 ± 0 ^{*a}	100 ± 0 ^{*a}	98,93 ± 0,15 ^{*c}	84,44 ± 1,76 ^{*g}	67,54 ± 4,20 ^{*j}	60,83 ± 2,84 ^{*j}
Isovaleraldehido	0,56	100 ± 0 ^{*a}	100 ± 0 ^{*a}	100 ± 0 ^{*a}	100 ± 0 ^{*a}	36,51 ± 6,51 ^{*k}	25,87 ± 2,25 ^{*m}	22,08 ± 4,12 ^{*n}	18,80 ± 2,55 ^{*o}
Isobutiraldehido	4,66	90,81 ± 0,78 ^{*e}	63,21 ± 5,06 ^{*j}	37,83 ± 4,73 ^{*k}	34,72 ± 3,01 ^{*l}	24,55 ± 11,23 ^{*l}	28,82 ± 9,96 ^{*m}	18,65 ± 6,97 ^{*o}	18,65 ± 6,97 ^{*o}
Trans-2-hexen-1-ol	1,68	100 ± 0 ^{*a}	100 ± 0 ^{*a}	95,43 ± 1,47 ^{*d}	87,92 ± 1,34 ^{*f}	68,72 ± 2,07 ^{*j}	52,28 ± 0,51 ^{*k}	57,39 ± 2,00 ^{*j}	24,84 ± 1,96 ^{*n}
Cis-2-hexen-1-ol	1,92	100 ± 0 ^{*a}	100 ± 0 ^{*a}	80,25 ± 3,54 ^{*h}	62,34 ± 3,63 ^{*j}	51,40 ± 2,60 ^{*k}	50,89 ± 1,66 ^{*k}	31,04 ± 5,54 ^{*m}	29,85 ± 3,76 ^{*m}
Trans-3-hexen-1-ol	2,20	100 ± 0 ^{*a}	100 ± 0 ^{*a}	61,76 ± 2,66 ^{*j}	38,66 ± 0 ^{*k}	31,02 ± 6,15 ^{*m}	39,81 ± 1,15 ^{*k}	38,19 ± 5,80 ^{*k}	27,78 ± 3,30 ^{*m}
Cis-3-hexen-1-ol	1,82	100 ± 0 ^{*a}	100 ± 0 ^{*a}	97,09 ± 0,64 ^{*c}	28,48 ± 3,95 ^{*m}	27,46 ± 1,58 ^{*m}	14,84 ± 3,92 ^{*p}	13,73 ± 0,99 ^{*p}	10,80 ± 4,60 ^{*q}
Linalool	0,92	100 ± 0 ^{*a}	100 ± 0 ^{*a}	100 ± 0 ^{*a}	83,58 ± 2,90 ^{*g}	56,37 ± 2,53 ^{*j}	34,63 ± 0,87 ^{*l}	15,97 ± 4,52 ^{*p}	9,08 ± 1,77 ^{*q}
Citronellol	3,00	99,91 ± 0 ^{*b}	99,94 ± 0,05 ^{*b}	98,55 ± 0,13 ^{*c}	98,47 ± 0,23 ^{*c}	98,77 ± 0,25 ^{*c}	92,12 ± 2,33 ^{*e}	76,19 ± 3,02 ^{*i}	52,71 ± 6,07 ^{*k}

¹CIM: concentración inhibitoria mínima. ²El porcentaje de inhibición fue determinado a los 5 días de incubación. Los valores fueron expresados en media ± desvío estándar. *Indica diferencia significativa con respecto al control según análisis de la varianza por bloque, test de comparación DCG (p < 0.05). Todas las comparaciones por parejas se usaron para comparar los promedios entre rangos de tratamientos. Los valores de inhibición con letras iguales corresponden a tratamientos que no presentan diferencias significativas, según análisis de la varianza no paramétrica, Kruskal Wallis (p < 0.05). Los experimentos se realizaron por triplicado.

A)



B)

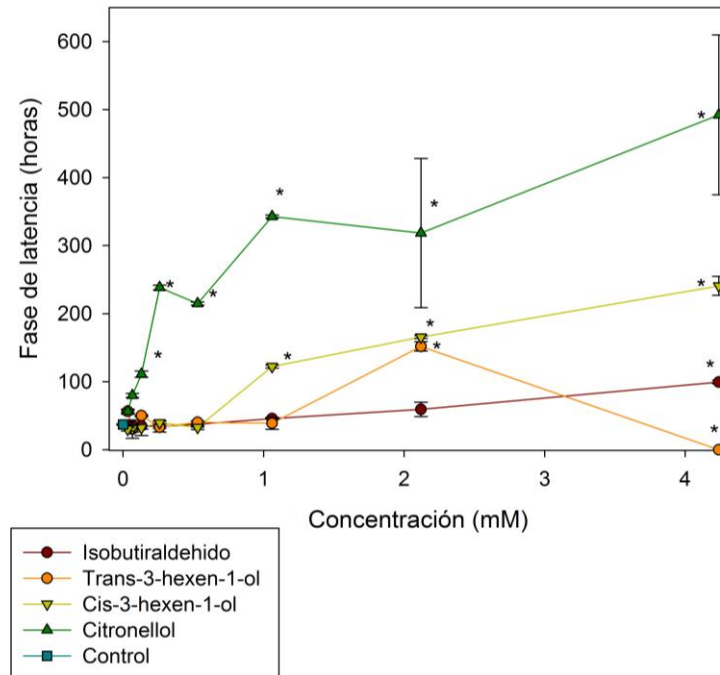
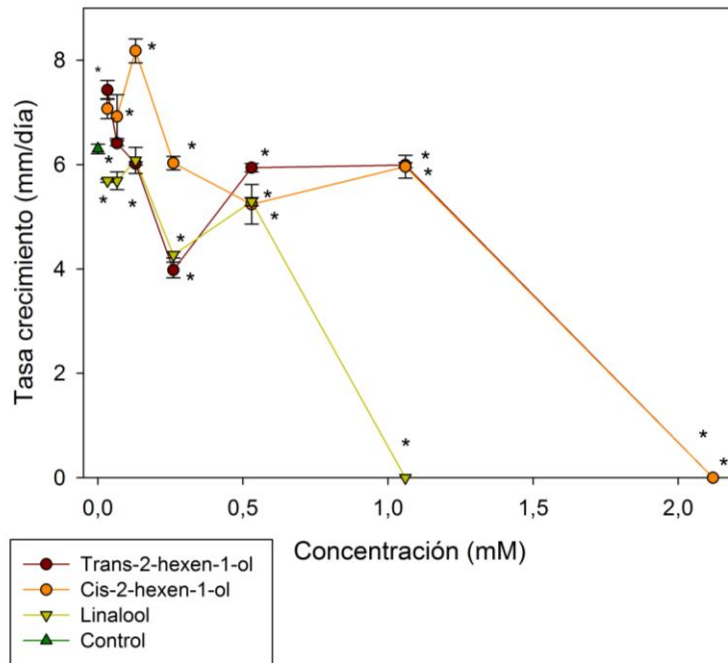


Figura 6: Efectos de los compuestos isobutiraldehído, trans-3-hexen-1-ol, cis-3-hexen-1-ol y citronellol sobre la tasa de crecimiento (A) y la fase de latencia (B) de la cepa *F. verticillioides* M3125. Tratamientos con * muestran diferencias significativas con respecto al control según análisis de la varianza por bloque, test de Tuckey ($p < 0.05$).

A)



B)

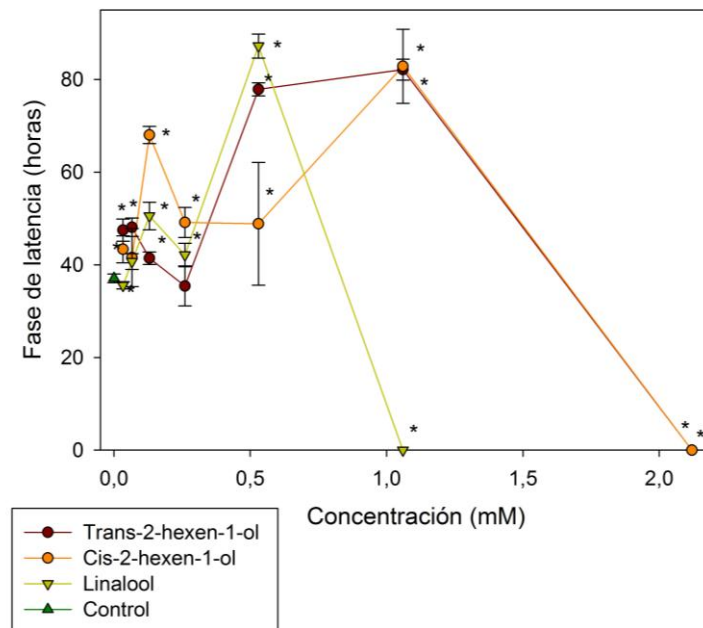
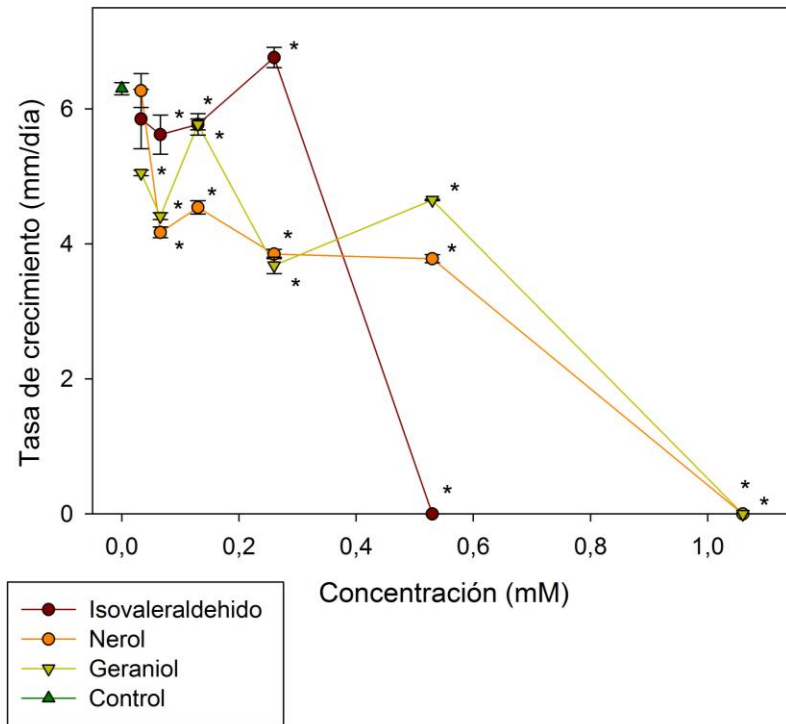


Figura 7: Efectos de los compuestos trans-2-hexen-1-ol, cis-2-hexen-1-ol y linalool sobre la tasa de crecimiento (A) y la fase de latencia (B) de la cepa *F. verticillioides* M3125. Tratamientos con * muestran diferencias significativas respecto al control según análisis de la varianza por bloque, test de Tuckey ($p < 0.05$).

A)



B)

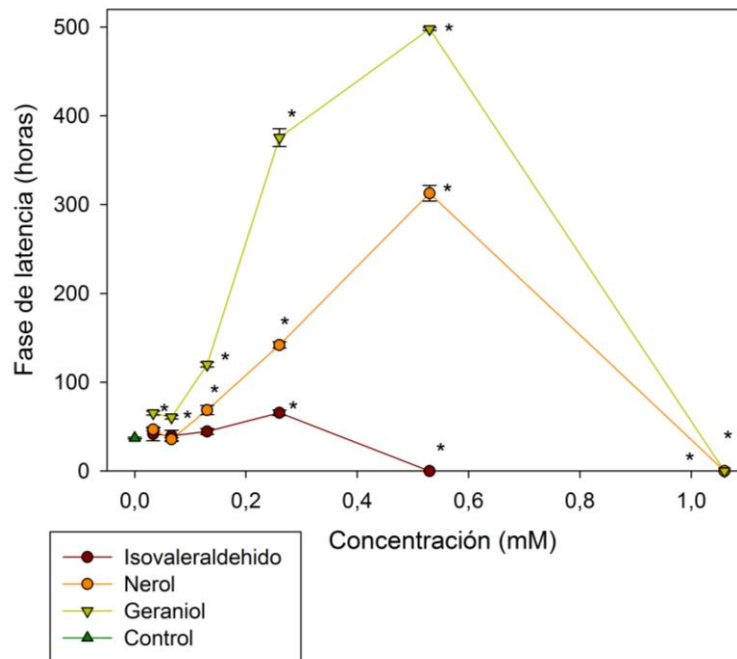


Figura 8: Efectos de los compuestos isovaleraldehído, nerol y geraniol sobre la tasa de crecimiento (A) y la fase de latencia (B) de la cepa *F. verticillioides* M3125. Tratamientos con * muestran diferencias significativas respecto al control según análisis de la varianza por bloque, test de Tuckey ($p < 0.05$).

Análisis del efecto de Trans-2-hexen-1-ol sobre *Fusarium verticillioides* y su insecto vector, *Sitophilus zeamais*, en un sistema abierto, húmedo y con presencia de granos de maíz.

En base a los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antifúngica en el presente trabajo y del efecto insecticida de los COVs verdes reportados por Calvimonte (2016), se seleccionó a trans-2-hexen-1-ol a una concentración de 2,120 mM para llevar a cabo el ensayo sobre *F. verticillioides* M3125 y su insecto vector, *S. zeamais*. Si bien otros compuestos mostraron mayor inhibición fúngica a dosis mas bajas, el trans-2-hexen-1-ol presentó tanto efecto fungicida como insecticida a una dosis inferior.

1. Pérdida de peso seco del grano de maíz

Durante los 28 días de ensayo, la presencia de *S. zeamais* no generó diferencias significativas en la pérdida de peso seco del grano de maíz ($5,17\% \pm 0,28$), mientras que el tratamiento con *F. verticillioides* provocó un incremento en el pérdida de peso ($17,47\% \pm 7,87$). La reducción del peso seco de maíz se acrecentó con la presencia insecto-hongo ($26,17\% \pm 4,37$). Por otro lado, la presencia de trans-2-hexen-1-ol (2,120 mM) redujo la pérdida de peso seco a los siguientes valores: $0,27\% \pm 1,70$; $0,24\% \pm 1,59$ y $1,68\% \pm 1,03$, para los tratamientos hongo, insecto e insecto-hongo, respectivamente (Figura 9).

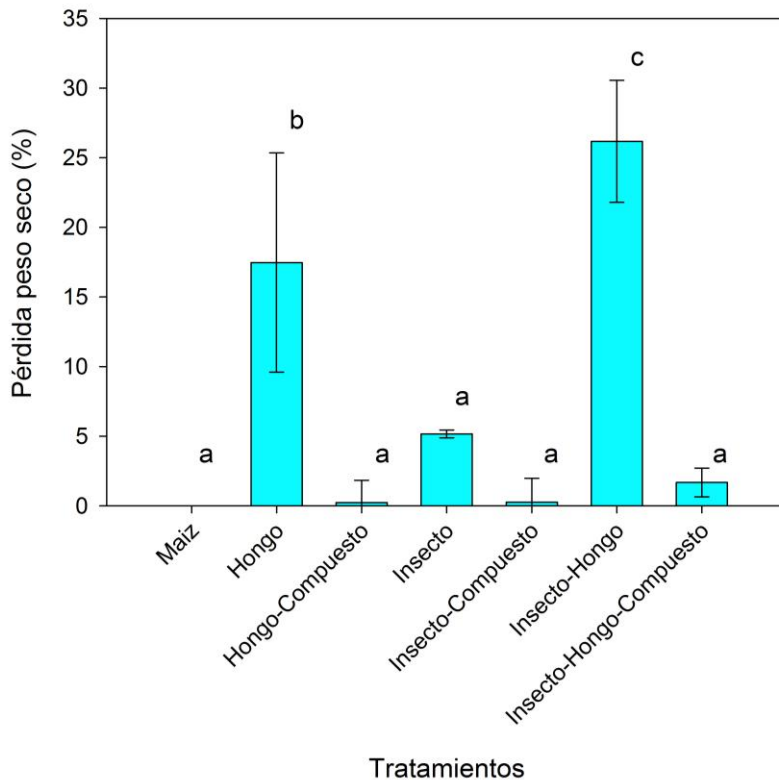


Figura 9: Porcentaje de pérdida de peso seco de grano de maíz. Los resultados fueron expresados como media \pm desvío estándar. Los tratamientos con diferentes letras son significativamente diferentes de acuerdo con el test de comparación Tuckey ($p < 0,05$). Los experimentos se realizaron por quintuplicado.

2. Porcentaje de mortalidad de *S. zeamais*

Transcurridos los 28 días del ensayo la mortalidad del insecto fue de un $36\% \pm 6,52$, mientras que el COV aumentó de manera significativa el porcentaje de mortalidad de *S. zeamais* a $61\% \pm 5,48$. En la presencia de insecto-hongo, *S. zeamais* sufrió un incremento en su mortalidad ($54\% \pm 6,52$), la cual se vio aún más acrecentada en presencia del COV ($85\% \pm 10$). (Figura 10).

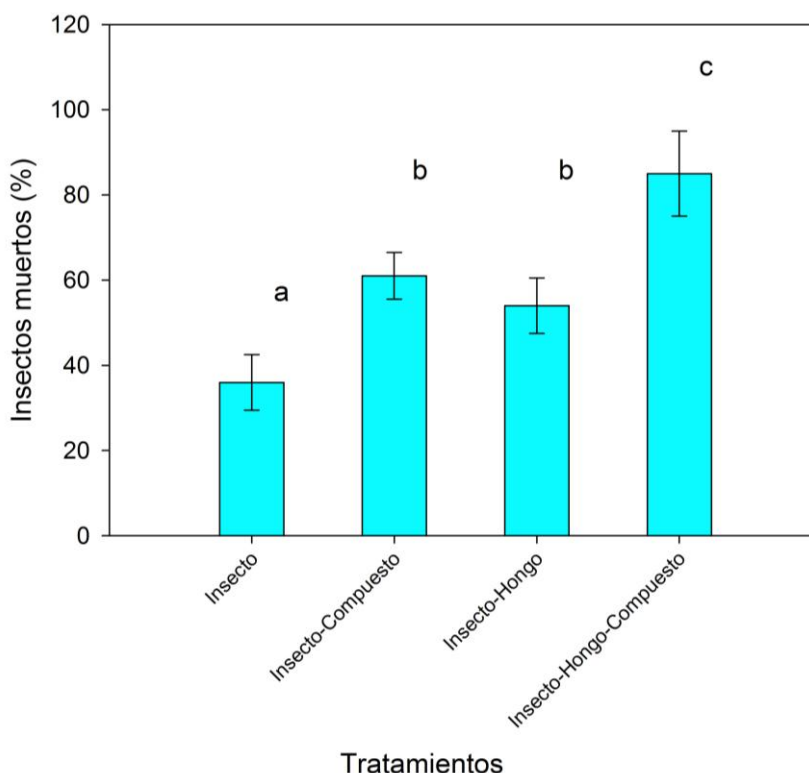


Figura 10: Porcentaje de mortalidad de *S. zeamais*. Los resultados fueron expresados como la media \pm desvío estándar. Los tratamientos con diferentes letras son significativamente diferentes de acuerdo con test de comparación Tuckey ($p < 0,05$). Los experimentos se realizaron por quintuplicado.

3. Infección fúngica de granos de maíz

Como se observa en la Figura 11, al analizarse la contaminación fúngica de los granos de maíz, el $76\% \pm 5,48$ de los granos fueron infectados con *F. verticillioides* en el tratamiento con hongo, mientras que la presencia de *S. zeamais* elevó al 100% la infección de los granos en los tratamientos hongo-insecto (Figura 12A). Si bien los individuos de *S. zeamais* sufrieron una desinfección superficial antes del ensayo, el tratamiento insecto también presentó un notable porcentaje de infección del grano ($54\% \pm 5,48$). Mientras que la presencia de trans-2-hexen-1-ol disminuyó a valores nulos el porcentaje de infección fúngica en granos (Figura 12B).

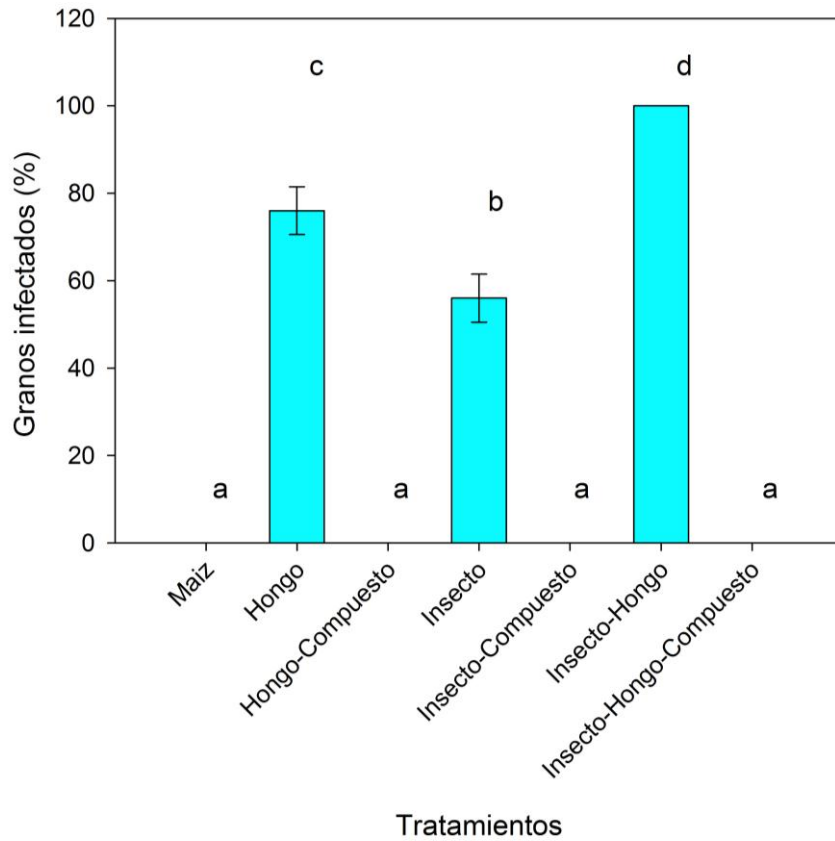


Figura 11: Porcentaje de granos infectados por *F. verticillioides*. Los resultados fueron expresados como la media \pm desvío estándar. Los tratamientos con diferentes letras son significativamente diferentes de acuerdo con test de comparación Tuckey ($p < 0,05$). Los experimentos se realizaron por quintuplicado.

A)



B)



Figura 12: Placas de Petri con agar Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) luego de siete días de incubación. A) infección fúngica en granos de maíz del tratamiento insecto-hongo. B) infección fúngica en granos de maíz del tratamiento insecto-hongo-compuesto.

4. Infección fúngica en insecto

A pesar de que los individuos de *S. zeamais* fueron desinfectados superficialmente previo al ensayo, presentaron un considerable porcentaje de infección fúngica ($66\% \pm 11,40$). Tal porcentaje aumentó ($100\% \pm 0$) en la presencia insecto-hongo (Figura 14A). El compuesto logró reducir a cero el porcentaje de infección fúngica en la superficie de *S. zeamais* (Figura 14B). Los porcentajes de infección fúngica en insecto se muestran en la Figura 13.

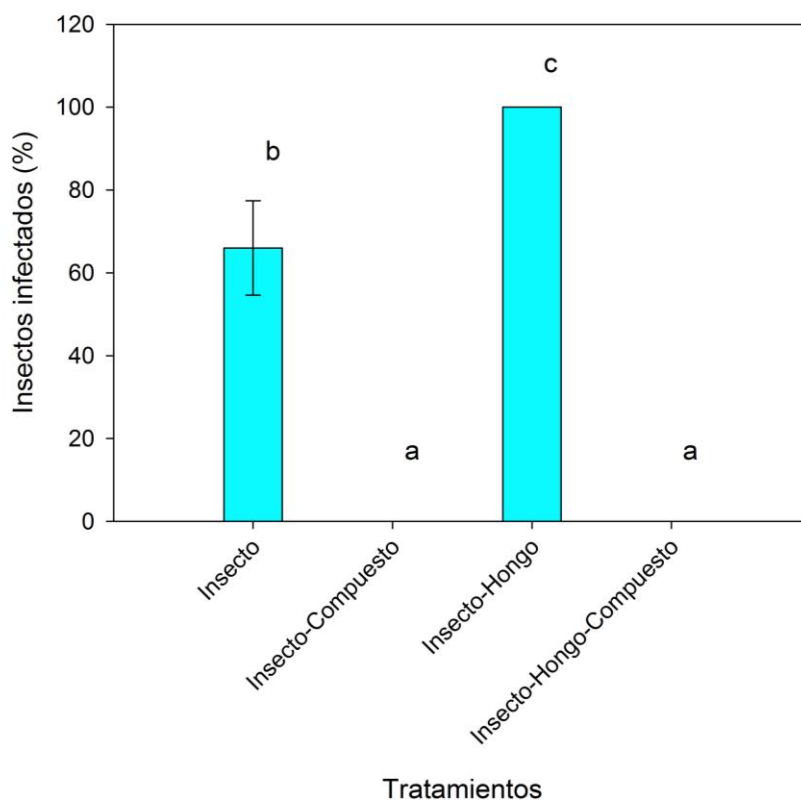


Figura 13: Porcentaje de *S. zeamais* infectados por *F. verticillioides*. Los resultados fueron expresados como la media \pm desvío estándar. Los tratamientos con diferentes letras son significativamente diferentes de acuerdo con test de comparación Tuckey ($p < 0,05$). Los experimentos se realizaron por quintuplicado.

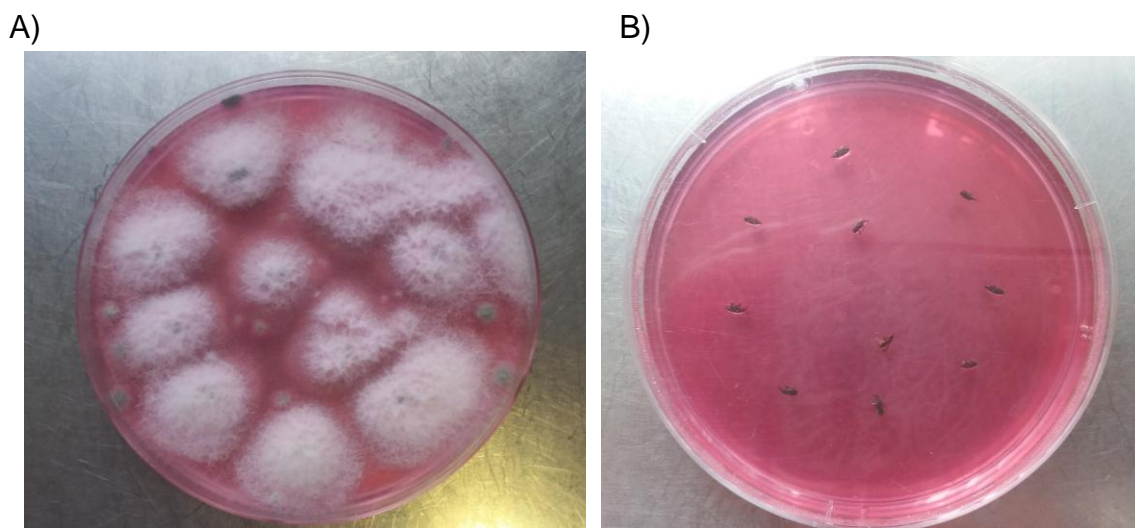


Figura 14: Placas de Petri con agar Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) luego de siete días de incubación. A) infección fúngica en *S. zeamais* del tratamiento insecto-hongo. B) infección fúngica en *S. zeamais* del tratamiento insecto-hongo-compuesto.

4. Cuantificación de ergosterol en granos de maíz

El ergosterol es un indicador de la biomasa fúngica, por tal motivo se llevó a cabo su cuantificación en los diferentes tratamientos. La presencia de insecto-hongo en los granos de maíz mostró un aumento en el contenido de ergosterol en relación a los tratamientos insecto y hongo individuales (Figura 15). Los valores obtenidos fueron $505,37 \mu\text{g/g} \pm 58,20$; $0,72 \mu\text{g/g} \pm 1,69$ y $379,62 \mu\text{g/g} \pm 96,16$, respectivamente. La presencia de trans-2-hexen-1-ol disminuyó la cantidad de ergosterol para los tratamientos insecto-hongo ($1,90 \mu\text{g/g} \pm 1,97$), insecto ($1,46 \mu\text{g/g} \pm 3,38$) y hongo ($8,00 \mu\text{g/g} \pm 6,19$), no mostrando diferencia significativa con el tratamiento control maíz ($21,40 \mu\text{g/g} \pm 15,18$).

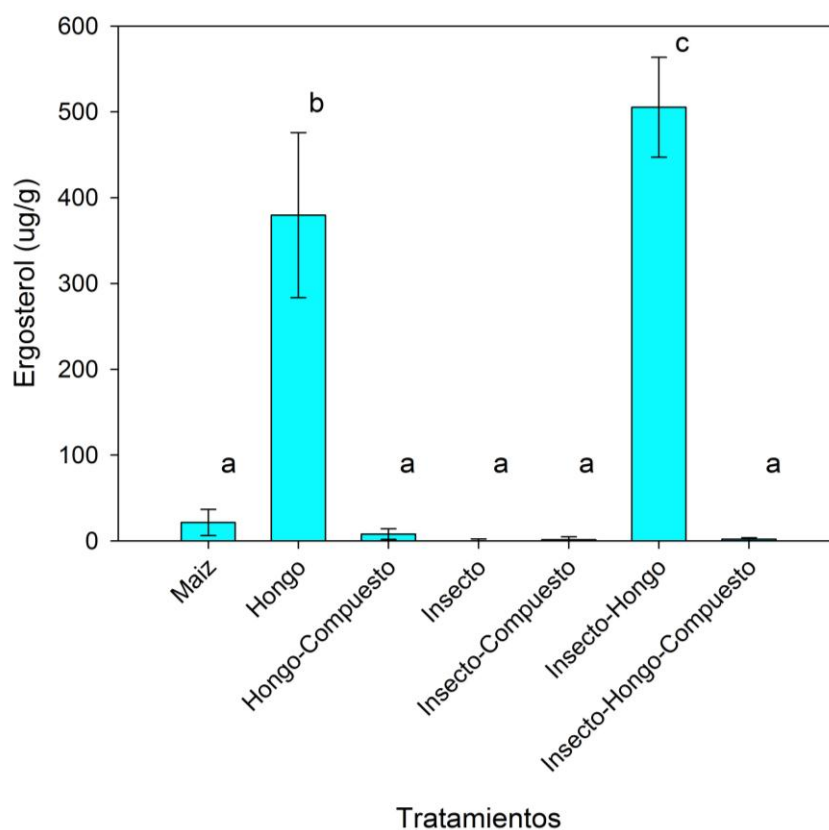


Figura 15: Cuantificación de ergosterol en maíz en los diferentes tratamientos. Los resultados fueron expresados como la media \pm desvío estándar. Los tratamientos con diferentes letras son significativamente diferentes de acuerdo con test de comparación Tuckey ($p < 0,05$). Los experimentos se realizaron por quintuplicado.

5. Cuantificación de la biosíntesis de FB₁.

Cuando se cuantificó la micotoxina, los tratamientos maíz e insecto no mostraron diferencias significativas en la cantidad de FB₁ $4,14 \mu\text{g/g} \pm 1,04$ y $4,35 \mu\text{g/g} \pm 0,68$, respectivamente. La presencia de insecto-hongo no incrementó los niveles de FB₁ en maíz ($28,31 \mu\text{g/g} \pm 4,91$) con respecto al tratamiento con hongo ($25,11 \mu\text{g/g} \pm 3,00$). En presencia del compuesto, la cantidad de FB₁ disminuyó a los niveles del tratamiento maíz. Los valores de FB₁ obtenidos fueron: $5,47 \mu\text{g/g} \pm 0,33$; $5,63 \mu\text{g/g} \pm 2,51$ y $4,95 \mu\text{g/g} \pm 0,09$ para los tratamientos hongo-compuesto, insecto-compuesto e insecto-hongo-compuesto, respectivamente (Figura 16).

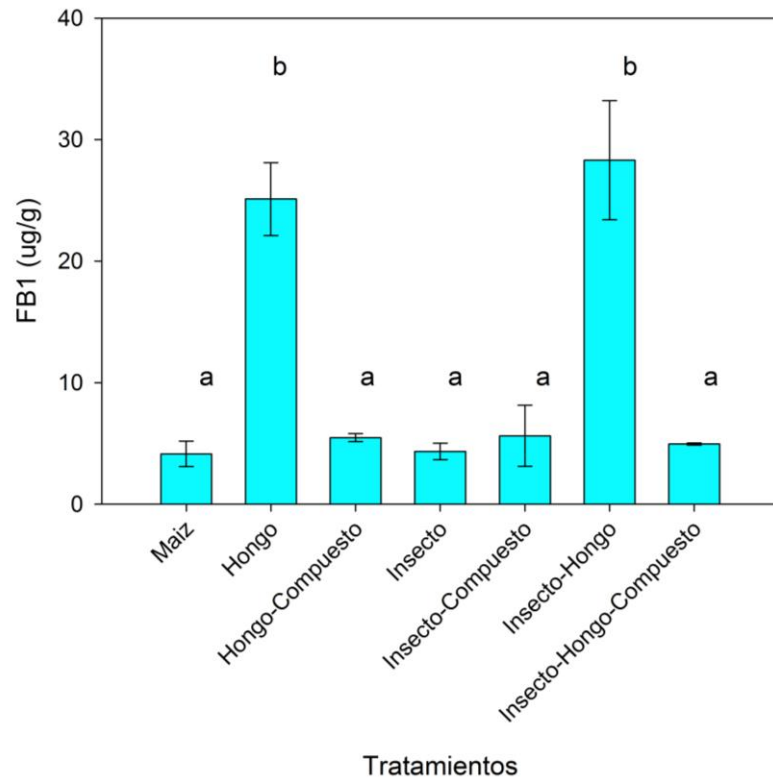


Figura 16: Cuantificación de FB₁ en maíz. Los resultados fueron expresados en media ± desvío estándar. Los tratamientos con diferentes letras son significativamente diferentes de acuerdo con test de comparación Tuckey ($p < 0,05$). Los experimentos se realizaron por quintuplicado.

Discusión

Conociendo el impacto de los pesticidas sintéticos actuales sobre la salud y el ecosistema, el uso de compuestos ecológicos se vuelve necesario para proteger los productos almacenados.

En el presente estudio, se evaluaron las actividades antimicóticas de diez compuestos orgánicos volátiles, dos aldehídos y ocho alcoholes, frente al hongo *Fusarium verticillioides*, plaga del maíz. Si bien la mayoría de los compuestos ensayados mostraron efecto inhibitorio sobre el desarrollo del hongo, geraniol presentó mayor actividad antimicótica afectando significativamente a los parámetros de crecimiento de *F. verticillioides*. Teniendo en cuenta el conjunto de alcoholes ensayados, los siguientes que revelaron mayor actividad fueron nerol y linalool. Los alcoholes que mostraron mayor efecto antifúngico, presentan un grupo sustituyente alílico, el cual incrementaría la toxicidad en alcoholes monoterpénicos (Tabanca et al., 2015). Además la actividad antifúngica se relaciona con la presencia y posición del grupo hidroxilo en la molécula (Veluri et al., 2004), ya que estos grupos forman puentes hidrógeno con los sitios activos de enzimas celulares, aumentando la actividad antimicótica (Daferera et al., 2000). Kordali et al. (2007) evaluaron las actividades antifúngicas de geraniol y linalool contra 31 hongos patógenos de plantas, afirmando que tienen potentes efectos inhibidores contra muchas de las especies de hongos ensayadas.

De los dos aldehídos utilizados, isovaleraldehído manifestó mayor efecto sobre la fase de latencia y la tasa de crecimiento de *F. verticillioides*, modificando significativamente al desarrollo del hongo. En plantas, hay una estimulación en la producción de aldehídos después de la infección por

patógenos (Croft et al., 1993; Shiojiri et al., 2006), y se ha comprobado que muchos de estos son compuestos bactericidas y fungicidas (Hamilton-Kemp et al., 1992; Nakamura y Hatanaka, 2002; Prost et al., 2005; Myung et al., 2007). Algunos aldehídos presentan altos niveles de actividad antimicótica en *F. verticillioides* (Zunino et al., 2015), *Aspergillus carbonarius* y *Fusarium proliferatum* (Mita et al., 2007), conociéndose una relación positiva entre la actividad antifúngica de los aldehídos y sus propiedades moleculares, como la lipofilicidad (log P) y la presión de vapor (Zunino et al., 2015).

Muchos compuestos actúan sobre la funcionalidad y la estructura de la membrana celular (Viuda-Martos et al., 2008). En bajas concentraciones generalmente los compuestos producen cambios en la estructura celular, inhibición de la respiración y cambio de la permeabilidad de la membrana celular, mientras que altas concentraciones conducen a daño severo de la membrana, pérdida de la homeostasis y muerte celular (Carson et al., 2002). La actividad antifúngica de los monoterpenos se relaciona con su capacidad de atravesar la membrana celular e interactuar con las estructuras intracelulares, (Cristani et al., 2007). Además los monoterpenos aumentan la concentración de peróxidos lipídicos, como los radicales hidroxilo, alcoxilo y alkoperoxi, lo que lleva a la destrucción de las células (Lucini et al., 2006). Una investigación reciente demostró que la alteración de las propiedades estructurales de la pared celular fue la principal fuente de inhibición de monoterpenos, ya que logró modificar la función de la pared, afectando la citocinesis (Brennan et al., 2013).

La actividad antifúngica en todos los COVs verdes se mostró relacionada con su concentración, a excepción de las concentraciones más bajas de trans-

3-hexen-1-ol, donde el crecimiento del hongo se observó estable. La inhibición del crecimiento generada por los COVs verdes estuvo relacionada con un efecto en los parámetros de crecimiento, observándose que a medida que la concentración del compuesto aumentaba la tasa de crecimiento disminuía y la fase de latencia se prolongaba.

Posteriormente se estudió el efecto de trans-2-hexen-1-ol sobre *Fusarium verticillioides* y su insecto vector, *Sitophilus zeamais*, en un sistema abierto, húmedo y con presencia de granos de maíz. El análisis de peso seco de los granos de maíz luego de 28 días de ensayo, no presentó cambios significativos en los tratamientos con *S. zeamais*, mientras que en los tratamientos inoculados con hongo se observó una mayor reducción del peso seco, indicando que el metabolismo de los hongos dentro de los granos de maíz disminuye el contenido de materia seca y, por lo tanto, la densidad del grano (Seitz et al. 1982). La infección de granos con hongos de almacenamiento además de pérdida de peso seco, provoca decoloración, olores desagradables, cambios químicos y nutricionales, presencia de micotoxinas, además de una reducción en la calidad del grano y producción (Sanchis et al., 1982; Suleiman et al., 2013). Otras investigaciones reportaron una considerable pérdida de peso del maíz infestado con gorgojos luego de 180 días de incubación (Almeida Filho et al., 2002). Bajo condiciones de 24-30° C de temperatura y 70-80% de humedad relativa, el ciclo de vida de *S. zeamais* es de 51.6 días. La duración de los distintos períodos de desarrollo es de 6,9, 28,7, 12,5 y 3,5 días para el huevo, larva, pupa y adulto, respectivamente (Devi et al., 2017). La vida de estos gorgojos se prolonga por 7 a 8 meses, y a veces un año (Agronegocios, 2015; Plagas, 2015). Por lo tanto 28 días no sería

un tiempo considerable para observar pérdida de peso seco en maíz por acción del insecto.

En el tratamiento insecto-hongo la pérdida de peso fue significativamente mayor a los tratamientos individuales. Estos resultados sugieren que la presencia del insecto incrementa el daño físico del grano, lo cual permite al hongo invadir el material vegetal y de esa forma establecerse dentro de los tejidos internos del grano que son más vulnerables (McFarlane et al., 2009), y además ayuda a la dispersión de las esporas, favoreciendo el desarrollo del hongo y posterior pérdida de materia seca.

En los tratamientos con trans-2-hexen-1-ol se observó una reducción significativa de la pérdida de peso seco de granos, lo cual podría deberse a la inhibición del crecimiento de *F. verticillioides*, principal causa de pérdida de peso seco en los primeros 28 días.

Cuando se analizó el efecto insecticida de trans-2-hexen-1-ol a la concentración ensayada (2,12 mM), la mortalidad sobre *S. zeamais* si bien presentó un valor considerable (61%), fue menor al reportado previamente por Calvimonte (2016) a la misma concentración del compuesto. Este resultado puede estar relacionado con la presencia de agua en el presente ensayo, ya que al incrementar la humedad relativa del microambiente la supervivencia del insecto crece. Un estudio en otra especie del género *Sitophilus*, mostró un aumento de la supervivencia al incrementar la humedad relativa de 45% a 70% (Evans et al., 1980). Este efecto de la humedad relativa sobre la supervivencia fue observado en muchos invertebrados (Beckett et al., 2011). Varios informes indican que los monoterpenos causan la mortalidad de los insectos al inhibir la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) (Houghton et al., 2006), o

actuando en otros sitios vulnerables como las monooxigenasas dependientes del citocromo P450 (Keto et al., 2002) o sobre el receptor GABAA, presente tanto en invertebrados como en vertebrados (Casida y Quistad, 1998; Bloomquist, 2003). Muchos hexenoles son elaborados por plantas para evitar el ataque de herbívoros, y actúan como sustancias de alarma para los insectos (Maffei et al., 2010).

En el presente estudio se observó que en presencia del hongo, la mortalidad del insecto aumentó. Si bien no se encontraron antecedentes de entomopatogenicidad de *F. verticillioides* sobre *S. zeamais*, el género *Fusarium* fue descrito en algunas investigaciones como entomopatógeno. *Fusarium oxysporum* produce mortalidad en larvas de *Eutectona machaeralis* (Roychoudhury y Dadwal, 2010), *Fusarium solani* produce altas tasas de mortalidad en *Tetanops myopaeformis* (Majumdar et al., 2008) y *Fusarium proliferatum* produce entomopatogenicidad en *Dryocosmus kuriphillus* (Tosi et al., 2015). Se ha identificado que *F. verticillioides* produce una patogénesis letal en *Heliothis virescens* (Abbas y Mulrooney, 1994), en plagas forestales (Sandhu et al., 1993), en el saltahojas marrón arroz (Srinivas y Pasalu, 1990) y *Tropidacris collares* (Pelizza et al., 2011). Es interesante destacar que los metabolitos secundarios fúngicos podrían intervenir en esta respuesta. Se conoce que los sesquiterpenos fúngicos pueden producir deformaciones morfológicas en escarabajos ó demorar el pasaje de pupa a adulto (García et al., 2003) y además muchas micotoxinas muestran propiedades insecticidas (Niu et al., 2009), aunque se desconoce que tal bioactividad la presente FB₁.

A pesar de llevar a cabo una desinfección superficial de *S. zeamais*, parte de la carga de esporas permaneció sobre el cuerpo del insecto

produciendo un porcentaje de infección en grano de maíz y sobre la superficie del insecto próxima al 60%. El porcentaje de grano infectado presentó diferencias significativas entre los tratamientos hongo e insecto-hongo. Otros autores reportaron resultados similares, considerando que varios insectos pueden transportar y transmitir patógenos de plantas, incluyendo esporas de hongos (Nesci et al., 2011). La infección de grano de maíz y de insecto fue anulada por acción del compuesto.

Al cuantificar ergosterol, la interacción insecto-hongo es el tratamiento donde se encontró mayor cantidad de dicho esterol por gramo de maíz, por lo que podría establecerse que el insecto ayuda a una mayor dispersión del hongo desde sectores contaminados a regiones no contaminadas, favoreciendo su desarrollo y aumentando la biomasa fúngica presente. Además, la presencia de *S. zeamais* aumentaría el daño físico del grano y de esta manera *F. verticillioides* podría introducirse dentro del grano con mayor facilidad gracias al accionar de los insectos (Kommendahl y Windels, 1981; Munkvold y Carlton, 1997; Meikle et al., 1998; Robertson et al., 2011; Ncube et al., 2017), con el consecuente aumento de metabolito fúngico. Se ha reportado que los sesquiterpenos fúngicos podrían actuar como atrayentes de los insectos al indicarles una disponibilidad de carbohidratos menos complejos, como resultado de la actividad de las α -amilasas fúngicas (Mcfarlane et al., 2009) y esta atracción permitiría el uso de los insectos granívoros como medio de transporte para lograr una mayor dispersión.

En el tratamiento maíz con *S. zeamais*, prácticamente los niveles de ergosterol fueron nulos, a pesar de que el tratamiento de maíz (control) presentó dicho esterol. Estos resultados se pueden vincular a que los insectos

requieren esteroides para el crecimiento normal, la metamorfosis y la reproducción. Sin embargo, son incapaces de sintetizar estos compuestos orgánicos, pero pueden biotransformarlo a partir de su alimento. Los simbiontes fúngicos pueden ser una fuente alternativa de esteroides en forma de ergosterol (Bentz et al., 2006; Zhao, et al., 2015), por lo cual la micofagia podría ser obligatoria para algunos insectos granívoros. De esta manera el nivel de ergosterol presente en maíz podría ser reducido por acciones metabólicas del gorgojo.

Los tratamientos con trans-2-hexen-1-ol mostraron una disminución considerable de la cantidad de ergosterol en grano, debido al efecto inhibitorio del compuesto sobre el crecimiento y desarrollo de *F. verticillioides*.

En cuanto a la producción de fumonisinas por parte de *F. verticillioides*, los tratamientos hongo e insecto-hongo presentaron los mas altos niveles de FB₁, pero no mostraron diferencias significativas entre ellos. Hay una correlación positiva entre el daño mecánico causado por los insectos y el crecimiento de los hongos del género *Fusarium* en los sistemas de almacenamiento (Fandohan et al., 2005). Sin embargo una mayor cantidad de ergosterol en los tratamientos, no reflejó un considerable aumento de toxina.

Los insectos se mueven con fines de cría y alimentación, contribuyendo a la dispersión de esporas viables de hongos, transportándolas en la superficie corporal o depositándolas en sus excrementos (Nesci et al., 2011). Además, durante la alimentación, los insectos rompen la capa de semillas de granos, (barrera natural para el crecimiento de hongos) promoviendo la propagación de esporas de hongos productores de micotoxinas (Setamau et al., 1998).

La producción de toxina disminuyó considerablemente en el tratamiento hongo-insecto-compuesto, y es probable que el aumento de la mortalidad de *S. zeamais* diera como resultado menor movimiento de insectos y reducción de daños en el recubrimiento de las semillas, disminuyendo la infección por hongos y la producción de FB₁.

En todos los tratamientos con compuesto, los valores de FB₁ se redujeron a niveles similares al tratamiento control. Esta disminución de toxina estaría relacionada a la actividad antifúngica del compuesto ya que, al estar inhibido el crecimiento del hongo, disminuiría producción de la toxina.

Durante el almacenamiento, el maíz es susceptible a pérdidas resultantes de la invasión por una variedad de insectos y microorganismos. Son necesarias buenas prácticas de almacenamiento de granos para garantizar su conservación y minimizar los riesgos de contaminación y deterioro. Es imprescindible encontrar e integrar la protección de los productos almacenados, utilizando sustancias químicas seguras para los alimentos, frente a los tradicionales plaguicidas, peligrosos para la salud y el ambiente.

El presente estudio mostró que geraniol, nerol, linalool e isovaleraldehído son los compuestos más prometedores para controlar *F. verticillioides* al afectar la fase de latencia y la tasa de crecimiento. Muchos COVs verdes pueden ser una fuente potencial de compuestos naturales con actividad contra el crecimiento de *F. verticillioides* M3125, siendo una alternativa más segura y económicamente viable para la conservación de granos almacenados y el control de plagas.

En este trabajo se evidenció que *S. zeamais* favorece la dispersión del hongo toxigénico, *F. verticillioides*, confirmando la importancia de estos

insectos como vectores mecánicos de esporas fúngicas (Beti, et al., 1995; Nesci, et al., 2011; Ferreira-Castro et al, 2012).

El trans-2-hexen-1-ol presenta actividad antifúngica contra *F. verticillioides* M3125 y aumenta la mortalidad en el insecto vector, *S. zeamais*, evitando también la aparición de FB₁, la dispersión de las esporas de los hongos y la ruptura de granos en un sistema que se aproxima al procedimiento real de almacenamiento de maíz: el silo. Los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron la capacidad del trans-2-hexen-1-ol como una potencial herramienta para controlar dos importantes plagas del maíz de una manera mas natural y constituyendo una alternativa a los fungicidas sintéticos. Si bien trans-2-hexen-1-ol como compuesto puro presenta pocos estudios sobre sus efectos en plagas, hay amplia variedad de trabajos que demuestran las diferentes proporciones de este compuesto volátil en plaguicidas patentados y en aceites esenciales con efecto pesticida (Whitman, 1988; Roberts et. al., 2007; Yang et. al., 2015).

Referencias bibliográficas

1. Abbas, H. K., y Mulrooney, J. E. Effect of some phytopathogenic fungi and their metabolites on growth of *Heliothis virescens* (F.) and its host plants. *Biocontrol Science and Technology*. 1994, 4, 77-87.
2. Aharoni, Y.; Stewart, J.K.; Hartsell, P.L.; Young, D.K. Acetaldehydes a potential fumigant for control of the green peach aphid on harvested head lettuce. *Journal of Economic Entomology* . 1979, 72, 493-495.
3. Almeida Filho, A. J.; Fontes, L. S.; Arthur, V. Determinação da perda de peso do milho (*Zea mays*) provocada por *Sitophilus oryzae* e *Sitophilus zeamais*. *Ecosistema*. 2002, 27, 1-2.
4. Alvarez-Castellanos, P.P.; Bishop, C.D.; Pascual-Villalobos, M.J. Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. *Phytochemistry*. 2001, 57, 99–102.
5. Araújo, R.A.; Williamson, M.; Bass, C.; Field, L.M.; Duce, I.R. Pyrethroid resistance in *Sitophilus zeamais* is associated with a mutation (T929I) in the voltage - gated sodium channel. *Insect Molecular Biology*. 2011, 20, 437.
6. Arras, G.; Usai, M. Fungitoxic activity of 12 essential oils against four postharvest citrus pathogens: chemical analysis of *Thymus captatus* oil and its effect in subatmospheric pressure conditions. *Journal of Food Protection*. 2001, 64, 1025–1029.
7. Artemio, P.C.; Flavio, R.M.; Carlos, T.A.; Mauro, S.M.; Alfredo, S.R.J.; Sabel, B.F.; José, R.M., Alberto, E.E.V. Manual de producción de maíz para los estados de Veracruz y Tabasco. 2002.
8. Beckett, S.J. Insect and mite control by manipulating temperature and moisture before and during chemical-free storage. *Journal of stored products research*. 2011, 47, 284-292.
9. Bentz, B.J.; Six, D.L. Ergosterol content of fungi associated with *Dendroctonus ponderosae* and *Dendroctonus rufipennis* (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae). *Annals of the Entomological Society of America*. 2006, 99, 189-194.
10. Beti, J.A.; Phillips, T.W.; Smalley, E.B. Effects of maize weevils (Coleoptera: Curculionidae) on production of aflatoxin B1 by *Aspergillus flavus* in stored corn. *Journal of Economical Entomology*. 1995, 88, 1776-1782.
11. Bloomquist, J.R. Chloride channels as tools for developing selective insecticides. *Archives of insect biochemistry and physiology*. 2003, 54, 145-156.
12. Bluma, R.V.; Etcheverry, M.G. Application of essential oils in maize grain: Impact on *Aspergillus section Flavi* growth parameters and aflatoxin accumulation. *Food Microbiology*. 2008, 25, 324-334.
13. Boyer, S.; Zhang, H.; Lemperiere, G. A review of control methods and resistance mechanisms in stored-product insects. *Bulletin of entomological research*. 2012, 102, 213–229.

14. Brennan, T.C.; Krömer, J.O.; Nielsen, L.K. Physiological and transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to d-limonene show changes to the cell wall but not to the plasma membrane. *Applied and environmental microbiology*. 2013, 79, 3590-3600.
15. Briggs, S.A.; Carson Council, R. Basic guide to pesticides. Their characteristics and hazards. Washington: Taylor & Francis publishers, 1992.
16. Cairns, V.; Magan, N. Impact of essential oils on growth and ochratoxin a production by *Penicillium verrucosum* and *Aspergillus ochraceus* on a wheat-based substrate. 2003, 479–485.
17. Calvimonte, H. Microorganismos y Plantas Como Fuentes Productoras De Bioalcoholes Para El Control De *Sitophilus zeamais*. Tesina de Grado. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. 2016.
18. Campbell, J. Influence of seed size on exploitation by the rice weevil, *Sitophilus oryzae*. *Journal of Insect Behavior*. 2002, 15, 429-445.
19. Cano, P.M., Puel, O., Oswald, I.P. Mycotoxins: Fungal Secondary Metabolites with Toxic Properties. *Fungi: Applications and Management Strategies*. 2016, 318–371.
20. Cardoza, Y.J.; Albron, H.T.; Tumlinson, J.H. In vivo volatile emissions from peanut plants induced by simultaneous fungal infection and insect damage. *Journal of Chemical Ecology*. 2002, 28, 161–174.
21. Carson, C.F.; Mee, B.J.; Riley, T.V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002, 46, 1914-1920.
22. Casado, J.M.; Theumer, M.G.; Masih, D.T.; Rubinstein, H.R. Experimental subchronic mycotoxicoses in mice. Individual and combined effects of dietary exposure to fumonisins and aflatoxin B1. *Food and Chemical Toxicology*. 2001, 29, 89–96.
23. Casida, J.E.; Quistad, G.B. Golden age of insecticide research: past, present, or future?. *Annual review of entomology*. 1998, 43, 1-16.
24. Chulze, S.N.; Ramirez, M.L.; Torres, A.; Leslie, J.F. Genetic variation in *Fusarium* section *Liseola* from no-till maize in Argentina. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, 66, 5312-5315.
25. Cristani, M.; d'Arrigo, M.; Mandalari, G.; Castelli, F.; Sarpietro, M.G.; Micieli, D.; Venuti, V.; Bisignano, G.; Saija, A.; Trombetta, D. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, 55, 6300-6308.
26. Croft, K.; Jüttner, F.; Slusarenko, A.J. Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae pv phaseolicola*. *Plant Physiology*. 1993, 101, 13–24.

27. Daferera, D.J.; Ziogas, B.N.; Polissiou, M.G. GC–MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, 48, 2576–2581.
28. Devi, S.R.; Thomas, A.; Rebijith, K.B.; Ramamurthy, V.V. Biology, morphology and molecular characterization of *Sitophilus oryzae* and *S. zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*. 2017, 73, 135-141.
29. Di Rienzo, J.A.; Guzmán, A.W.; Casanoves, F. A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *The Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics*. 2002, 7, 129–142.
30. Di Rienzo, J.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C. Infostat, versión 2010; Grupo Infostat, Facultad de Ciencias Agropecuarias (FCA), Universidad Nacional de Córdoba: Córdoba, Argentina, 2010.
31. Dudareva, N.; Negre, F.; Nagegowda, D.A.; Orlova, I. Plant volatiles: Recent advances and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2006, 25, 417–440.
32. EPA, U., 2015.
33. Etcheverry, M.; Nesci, A.; Barros, G.; Torres, A.; Chulze, S. Occurrence of *Aspergillus section Flavi* and aflatoxin B1 in corn genotypes and corn meal in Argentina. *Mycopathologia*. 1999, 147, 37-41.
34. Evans D.E. Further studies on acclimatization to low temperatures in the grain weevils *Sitophilus oryzae* (L.) and *S. granarius* (L.). *Australian Journal of Ecology*. 1980, 5, 309-318.
35. Ewuola, E.O.; Egbunike, G.N. Effects of dietary fumonisin B1 on the onset of puberty, semen quality, fertility rates and testicular morphology in male rabbits. *Reproduction*. 2010, 139, 439-445.
36. Fandohan, P.; Gnonlonfin, B.; Hell, K.; Marasas, W.F.O.; Wingfield, M.J. Impact of indigenous storage systems and insect infestation on the contamination of maize with fumonisins. *African Journal of Biotechnology*. 2005, 5, 546-552.
37. Fernando, P.C. Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environmental Science & Policy*. 2006, 9, 685-692.
38. Ferreira-Castro, F.L.; Potenza, M.R.; Rocha, L.O.; Correa, B. Interaction between toxigenic fungi and weevils in corn grain samples. *Food Control*. 2012, 26, 594–600.
39. Food and Agricultural Organization (FAO). Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides. Tentative method for adults of some major beetle pests of stored cereals with malathion or lindane—FAO Method NO. 15. *FAO Plant Protect. Bull.* 1974, 22, 127–137.
40. García, M.; Sosa, M.E.; Donadel, O.J.; Giordano, O.S.; Tonn, C.E. Allelochemical effects of eudesmane and eremophilane sesquiterpenes on *Tribolium castaneum* larvae. *Journal of chemical ecology*. 2003, 29, 175-187.

41. Gong, H.Z.; Ji, R.; Li, Y.X.; Zhang, H.Y.; Li, B.; Zhao, Y. Occurrence of fumonisin B1 in corn from the main corn-producing areas of China. *Mycopathologia*. 2009, 167, 31–36.
42. Gu, Y.Q.; Mo, M.H.; Zhou, J.P.; Zou, C.S.; Zhang, K.Q. Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. *Soil Biology & Biochemistry*. 2007, 39, 2567-2575.
43. Gupta, S.; Dikshit, A. Biopesticides: An ecofriendly approach for pest control. *Journal of Biopesticides*. 2010, 3, 186-188.
44. Guynot, M.E.; Ramos, A.J.; Seto, L.; Purroy, P.; Sanchis, V.; Marin, S. Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products. *Journal of Applied Microbiology*. 2003, 94, 893–9.
45. Hamilton-Kemp, T.R.; McCracken Jr.C.T.; Loughrin, J.H.; Andersen, R.A.; Hildebrand, D.F. Effects of some natural volatile compounds on the pathogenic fungi. *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea*. *Journal of Chemical Ecology*. 1992, 18, 1083–1091.
46. Haschek, W.M.; Gumprecht, L.A.; Smith, G.; Tumbleson, M.E.; et al., Fumonisin toxicosis in swine: an overview of porcine pulmonary edema and current perspectives. *Environmental Health Perspectives*. 2001, 109, 251–257.
47. Hope, R.; Jestoi, M.; Magan, N. Multitarget environmental approach for control of growth and toxin production by *Fusarium culmorum* using essential oil and antioxidant. Centre for Agricultural Bioscience International. 2003, 486–492.
48. Houghton, P.J.; Ren, Y.; Howes, M.J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Product Reports*. 2006, 23, 181-199.
49. Hubert, J.; Münzbergová, Z.; Santino, A. Plant volatile aldehydes as natural insecticides against stored-product beetles. *Pest management science*. 2008, 64, 57-64.
50. INDEC. Anuario Estadístico de la República Argentina, 1st ed.; Itzcovich, N., Ed.; Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INDEC): Buenos Aires, Argentina, 2015.
51. Isman, M.B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*. 2006, 51, 45-66.
52. Kai, M.; Effmert, U.; Berg, G.; Piechulla, B. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Archives of Microbiology*. 2007, 187, 351-360.
53. Ketoh, G.K.; Glietho, A.I.; Huignard, J. Susceptibility of the bruchid *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and its parasitoid *Dinarmus basalis* (Hymenoptera: Pteromalidae) to three essential oils. *Journal of Economic Entomology*. 2002, 95, 174-182.
54. Kommendahl, T.; Windels, C.E. Root-, stalk-, and ear-infecting *Fusarium* species on corn in the USA. *Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy*. 1981, 94-103.

55. Kordali, S.; Kotan, R.; Cakir, A. Screening of antifungal activities of 21 oxygenated monoterpenes in-vitro as plant disease control agents. *Allelopathy Journal*. 2007, 19, 373–392.
56. Koroch, A.R.; Juliani, H.R.; Zygadlo, J.A. Bioactivity of essential oils and their components. *Flavours and fragrances*. Springer. 2007, 87-115.
57. Lamboni, Y.; Hell, K. Propagation of mycotoxigenic fungi in maize stores by post-harvest insects. *International Journal of Tropical Insect Science*. 2009, 29, 31–39.
58. Leslie, J.F.; Plattner, R.D.; Desjardins, A.E.; Klittich, C.J. Fumonisin B1 production by strains from different mating populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium section Liseola*). *Phytopathology*. 1992, 82, 341–345.
59. Leslie, J.; Summerel, B.A. Species concepts in *Fusarium*. *The Fusarium Laboratory Manual*. 2006; Chapter 9, 88–95.
60. Liu, W.W.; Mu, W.; Zhu, B.Y.; Du, Y.C.; Liu, F. Antagonistic activities of volatiles from four strains of *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. against soil-borne plant pathogens. *Agricultural Sciences in Chin*. 2008, 7, 1104-1114.
61. Lucini, E.I.; Zunino, M.P.; Lopez, M.L.; Zygadlo, J.A. Effect of monoterpenes on lipid composition and sclerotial development of *Sclerotium cepivorum* Berk. *Journal of Phytopathology*. 2006, 154, 441–446.
62. Maffei, M. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *South African Journal of Botany*. 2010, 76, 612-631.
63. Majumbar, A.; Boetel, M.A.; Jaronski, T.S. Discovery of *Fusarium solani* as a naturally occurring pathogen of sugarbeet root maggot (Diptera: Ulidiidae) pupae: Prevalence and baseline susceptibility. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2008, 97, 1-8.
64. Mahmound, A.L.E. Antifungal action and antiaflatoxigenic properties of some essential oil constituents. *Letters in Applied Microbiology*. 1994, 19, 110–113.
65. Marasas, W.F.O.; Kriek, N.P.; Fincham, J.E.; Van Rensburg, S.J. Primary liver cancer and oesophageal basal cell hyperplasia in rat caused by *Fusarium moniliforme*. *International Journal of Cancer*. 1984, 34, 383–387.
66. Marasas, W.F.O.; Riley, R.T.; Hendricks, K.A.; Stevens, V.L.; et al., Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisincontaminated maize. *Journal of Nutrition*. 2004, 134, 711–716
67. Marei, G.I.K.; Rasoul, M.A.A.; Abdelgaleil, S.A. Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pesticide biochemistry and physiology*. 2012, 103, 56-61.
68. Mateo, E.M.; Gómez, J.V.; Domínguez, I.; Gimeno-Adelantado, J. V.; Mateo-Castro, R.; Gavara, R.; Jiménez, M. Impact of bioactive packaging systems based on EVOH films and essential oils in the control of aflatoxigenic fungi and aflatoxin production in maize. *International Journal of Food Microbiology*. 2017, 254, 36-46.

69. McFarlane, S.A.; Govender, P.; Rutherford, R.S. Interactions between *Fusarium* species from sugarcane and the stalk borer, *Eldana saccharina* (Lepidoptera: Pyralidae). *Annals of applied biology*. 2009, 155, 349-359.
70. Meikle, W.G.C.; Adda, K.; Azoma, C.; Borgemeister, P.; Djomamou, B.; Markham, R.H. The effects of maize variety on the density of *Prostephanus truncatus* (Col.: Bostrichidae) and *Sitophilus zeamais* (Col.: Curculionidae) in grain stores in Benin Republic. *Journal of Stored Products Research*. 1998, 34:45-58.
71. Mercier, J.; Smilanick, J.L. Control of green mold and sour rot of stored lemon by biofumigation with *Mscodor albus*. *Biological Control*. 2005, 32, 401-407.
72. Mita, G.; Fasano, P.; De Domenico, S.; Perrone, G.; Epifani, F.; Lannacone, R.; *et al.* 9-Lipoxygenase metabolism is involved in the almond *Aspergillus carbonarius* interaction. *Journal of Experimental Botany*. 2007, 58, 1803–1811.
73. Munkvold, G.P.; Carlton, W.M. Influence of inoculation method on systemic *Fusarium moniliforme* infection of maize plants grown from infected seeds. *Plant Disease Journal*. 1997, 81, 211-216.
74. Myung, K.; Hamilton-Kemp, T.R.; Archbold, D.D. Interaction with and effects on the profile of proteins of *Botrytis cinerea* by C6 aldehydes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, 55, 2182–2188.
75. Nakamura, S.; Hatanaka, A. Green-leaf-derived C6-aroma compounds with potent antibacterial action that act on both Gram-negative and Gram positive bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, 50, 7639–7644.
76. Ncube, E.; Flett, B.C.; Van den Berg, J.; Erasmus, A.; Viljoen, A. The effect of *Busseola fusca* infestation, fungal inoculation and mechanical wounding on *Fusarium* ear rot development and fumonisin production in maize. *Crop Protection*. 2017, 99, 177-183.
77. Nelson, P.E.; Desjardins, A.E. ; Plattner, R.D. Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry, and significance. *Annual Review of Phytopathology*. 1993, 31, 233-252.
78. Nesci, A.; Barra, P.; Etcheverry, M. Integrated management of insect vectors of *Aspergillus flavus* in stored maize, using synthetic antioxidants and natural phytochemical. *Journal of Stored Products Research*. 2011, 47, 231-237.
79. Nesci, A.; Ferrari, L.; Etcheverry, M. Effect of synthetic antioxidants on stored maize grain mycoflora in situ. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2008, 88, 797-804.
80. Niu, G.; Siegel, J.; Schuler, M.A.; Berenbaum, M.R. Comparative toxicity of mycotoxins to navel orangeworm (*Amyelois transitella*) and corn earworm (*Helicoverpa zea*). *Journal of chemical ecology*. 2009, 35, 951-957.
81. Organización Mundial de la Salud (OMS), Organización Panamericana de la Salud (OPS), División Salud y Ambiente. Plaguicidas y salud en las Américas, Washington: OMS/OPS, 1993.

82. Parde, S.R.; Jayas, D.S.; White, N.D.G. Movement of *Cryptolestes ferrugineus* (Coleoptera: Cucujidae) in grain columns containing pockets of high moisture content wheat and carbon dioxide gradients. *Journal of Stored Products Research*. 2004, 40, 299-316.
83. Pelizza, S.A.; Stenglein, S.A.; Cabello, M.N.; Dinolfo, M.I.; Lange, C.E. First record of *Fusarium verticillioides* as an entomopathogenic fungus of grasshoppers. *Journal of Insect Science*. 2011, 11, 70.
84. Perez-Mendoza, J. Survey of insecticide resistance in Mexican populations of maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*. 1999, 35, 107-115.
85. Pitt, J.I., y Hocking, A.D. *Fungi and food spoilage* (2nd ed.). Sydney: Academic Press. 1997.
86. Pitt, J.I.; Taniwaki, M.H.; Cole, M.B. Mycotoxin production in major crops as influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the achievement of food safety objectives. *Food Control*. 2013, 32, 205–215.
87. Pizzolitto, R.P.; Barberis, C.L.; Dambolena, J.S.; Herrera, J.M.; Zunino, M.P.; Magnoli, C.E.; Rubinstein, H.R.; Zygadlo, J.A.; Dalcerro, A.M. Inhibitory effect of natural phenolic compounds on *Aspergillus parasiticus* growth. *Journal of Chemistry*. 2015, doi:10.1155/2015/547925.
88. Prost, I.; Dhondt, S.; Rothe, G.; Vicente, J.; Rodriguez, M.J.; Kift, N.; Carbonne, F.; Griffiths, G.; Esquerré-Tugayé, M.-T.; Rosahl, S.; Castresana, C.; Hamberg, M., Fournier, J. Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. *Plant Physiology*. 2005, 139, 1902–1913.
89. Ranum, P.; Peña-Rosas, J.P.; García-Casal, M.N. Global maize production, utilization, and consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2014, 1312, 105–112.
90. Rasmann, S.; Kollner, T.G.; Degenhardt, J.; Hiltbold, I.; Toepfer, S.; Kuhlmann, U.; Gershenzon, J.; Turlings, T.C.J. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insectdamaged maize roots. *Nature*. 2005, 434, 732–737.
91. Roberts, D.D. *Patent No. 7,195,788*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. 2007.
92. Robertson, A.E.; Munkvold, G.P.; Hurburgh, C.R.; Ensley, S. Effects of natural hail damage on ear rots, mycotoxins, and grain quality characteristics of corn. *Agronomy Journal*. 2011, 103, 193-199.
93. Roychoudhury, N.; Dadwal, V.S. Occurrence of entomogenous fungi, *Beauveria bassiana* and *Fusarium oxysporum* on teak leaf skeletonizer, *Eutectona machaeralis* and their pathogenicity. *World Journal of Zoology*. 2010, 5, 200-204.
94. Saint Geroges-Grیدهlet, D. Effects of dietary lipids on the population growth of *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Proceedings of 6th International Congress of Acarology*. 1984, 1, 351-357.

95. SAGPyA, 2009. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Agricultura, Estimaciones Agrícolas, Campaña 2008-2009. URL. <http://www.sagpya.gov.ar>.
96. Sanchis, V.; Vinas, I.; Jimenez, M.; Calvo, M. A.; Hernandez, E. Mycotoxins producing fungi isolated from bin-stored corn. *Mycopathologia*. 1982, 80, 89-93.
97. Sandhu, S.S.; Rajak, R.C.; Agarwal, G.P. Microbial control agents of forest pests at Jabalpur. *Annals of Forestry*. 1993, 1,136-140.
98. Santino, A.; Poltronieri, P.; Mita, G. Advances on plant products with potential to control toxigenic fungi: a review. *Food Additives y Contaminants*. 2005, 22, 389–395.
99. SCOOP (Scientific Cooperation on Questions to Food) Task 3.2.10 Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states. Subtask III: Fumonisin. 2003.
100. Seiber, J.N.; Coats, J.; Duke, S.O.; Gross, A.D. Biopesticides: State of the art and future opportunities. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2014, 62, 11613-11619.
101. Seitz, L.M.; Mohr, H.E.; Burroughs, R.; Sauer, D.B. Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. *Cereal Chemistry Journal*. 1977, 54, 1207-1217.
102. Seitz, L.M.; Sauer, D.B.; Mohr, H.E.; Aldis, D.F. Fungal growth and dry matter loss during bin storage of high-moisture corn. *Cereal Chemistry Journal*. 1982, 59, 9-14.
103. Setamau, M.; Cardwell, K.F.; Schulthess, F.; Hell, K. Effect of insect damage to maize ears, with special reference to *Mussidia nigrivenella* (Lepidoptera: Pyralidae) on *Aspergillus flavus* (Deuteromycetes: Monoliales) infection and aflatoxin production in maize before harvest in the Republic of Benin. *Journal of Economic Entomology*. 1998, 91, 433-438.
104. Sharifi, S.; Mills, R.B. Radiographic studies of *Sitophilus zeamais Motschulsky* in wheat kernels. *Journal of Stored Products Research*. 1971, 7, 195-206.
105. Shephard, G.S.; Sydenham, E.W.; Thiel, P.G.; Gelderblom, W.C.A. Quantitative determination of fumonisin B1 and B2 by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography*. 1990, 13, 2077–2087.
106. Shiojiri, K.; Kishimoto, K.; Ozawa, R.; Kugimiya, S.; Urashimo, S.; Arimura, G.; Horiuchi, J.; Nishioka, T.; Matsui, K.; Takabayashi, J. Changing green leaf volatile biosynthesis in plants: an approach for improving plant resistance against both herbivores and pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006, 103, 16672–16676.
107. Srinivas, P.R.; Pasalu, I.C. Occurrence of a fungal disease on brown planthopper of rice. *Journal of Biological Control*. 1990, 4, 67.
108. Stockmann-Juvala, H.; Savolainen, K. A review of the toxic effects mechanisms of action of fumonisin B1. *Human & Experimental Toxicology*. 2008, 27, 799–809.
109. Streit, E.; Naehrer, K.; Rodrigues, I.; Schatzmayr, G. Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials worldwide: long-term analysis with special focus on Europe and Asia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013, 93, 2892–2899.

110. Suleiman, R.A.; Rosentrater, K.A.; Bern, C.J. Effects of deterioration parameters on storage of maize. American Society of Agricultural and Biological Engineers. 2013.
111. Summerell, B.A.; Salleh, B.; Malaysia, P.; Leslie, J.F. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Disease*. 2003, 87, 117–128.
112. Tabanca, N.; Demirci, B.; Ali, A.; Ali, Z.; Blythe, E.K.; Khan, I.A. Essential oils of green and red *Perilla frutescens* as potential sources of compounds for mosquito management. *Industrial Crops and Products*. 2015, 65, 36-44.
113. Theumer, M.G.; Lopez, A.G.; Masih, D.T.; Chulze, S.N.; Rubinstein, H.R. Immunobiological effects of fumonisin B1 in experimental subchronic mycotoxicoses in rats. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2002, 9, 149–155.
114. Tosi, L.; Beccari, G.; Rondoni, G.; Covarelli, L.; Ricci, C. Natural occurrence of *Fusarium proliferatum* on chestnut in Italy and its potential entomopathogenicity against the Asian chestnut gall wasp *Dryocosmuskuriphilus*. *Journal of pest science*. 2015, 88, 369-381.
115. Trematerra, P.; Ianiro, R.; Athanassiou, C.G.; Kavallieratos, N.G. Behavioral responses of *Sitophilus zeamais* Motschulsky adults to conditioned grain kernels. *Journal of Stored Products Research*. 2013, 53, 77–81.
116. Velluti, A.; Sanchis, V.; Ramos, A.; Marín, S. Effect of essential oil of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarosa on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium verticillioides* in maize grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2004, 89, 145-154.
117. Velluti, A.; Sanchis, V.; Ramos, A.J.; Ergido, J.; Marín, S. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarosa essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. *International Journal of Food Microbiology* . 2003, 89,145–154.
118. Veluri, R.; Weir, T.L.; Bais, H.P.; Stermitz, F.R.; Vivanco, J.M. Phytotoxic and antimicrobial activities of catechin derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, 52, 1077–1082.
119. Vikram, A.; Hamzehzarghani, H.; Kushalappa, A.C. Volatile metabolites from the headspace of onion bulbs inoculated with postharvest pathogens as a tool for disease discrimination. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 2005, 27, 194–203.
120. Viuda-Martos, M.; Ruiz-Navajas, Y.; Fernández-López, J.; Pérez-Álvarez, J. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*. 2008, 19, 1130-1138.
121. Voss, K.A.; Smith, G.W.; Haschek, W.M. (2007). Fumonisin: toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. *Animal feed science and technology*. 2007, 137, 299-325.
122. Wang, Q.H.; Dorn S. Selection on olfactory response to semiochemicals from a plant-host complex in a parasitic wasp. *Heredity*. 2003, 91, 430–435.

123. Weete, J.D. *Lipid biochemistry of fungi and other organisms*. Springer Science & Business Media. 2012.
124. Whitman, D.W. Plant natural products as parasitoid cuing agents. 1988.
125. Yang, X.N.; Khan, I.; Kang, S.C. Chemical composition, mechanism of antibacterial action and antioxidant activity of leaf essential oil of *Forsythia koreana deciduous shrub*. Asian Pacific journal of tropical medicine. 2015, 8, 694-700.
126. Young, J.C. Microwave-assisted extraction of the fungal metabolite ergosterol and total fatty acids. The Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1995, 43, 2904–2910.
127. Zhao, L.J.; Yang, X.N.; Li, X.Y.; Mu, W.; Liu, F. Antifungal, insecticidal and herbicidal properties of volatile components from *Paenibacillus polymyxa* Strain BMP-11. Agricultural Sciences in China. 2011, 10, 728–736.
128. Zhao, T.; Axelsson, K.; Krokene, P.; Borg-Karlson, A.K. Fungal symbionts of the spruce bark beetle synthesize the beetle aggregation pheromone 2-methyl-3-buten-2-ol. Journal of chemical ecology. 2015, 41, 848-852.
129. Zunino, M.P.; Herrera, J.M.; Pizzolitto, R.P.; Rubinstein, H.R.; Zygadlo, J.A.; Dambolena, J.S. Effect of Selected Volatiles on Two Stored Pests: The Fungus *Fusarium verticillioides* and the Maize Weevil *Sitophilus zeamais*. The Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2015, 63, 7743–7749.