



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
ESCUELA PARA GRADUADOS

**CARACTERIZACIÓN DE *Aspergillus flavus*  
AISLADOS DE ESPIGAS DE MAÍZ EN SANTIAGO  
DEL ESTERO Y REGIONES COLINDANTES**

**Ing. Agr. Javier M. Barontini**

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

**Córdoba, 2022**

# **CARACTERIZACIÓN DE *Aspergillus flavus* AISLADOS DE ESPIGAS DE MAÍZ EN SANTIAGO DEL ESTERO Y REGIONES COLINDANTES**

**Ing. Agr. Javier M. Barontini**

## **Comisión Asesora de Tesis**

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

**Codirectora:** Dra. Sofía N. Chulze

**Asesor:** Dr. Enrique I. Lucini

## **Tribunal Examinador de Tesis**

Dra. Juliana Iglesias

Dr. Enrique I. Lucini

Dra. Carina E. Magnoli

## **Presentación Formal Académica**

2 de mayo de 2022

Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Universidad Nacional de Córdoba



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

## **Agradecimientos**

En primer lugar, agradezco especialmente a mi directora de tesis Dra. María de la Paz Giménez Pecci por confiar en mí y brindarme la oportunidad de realizar este trabajo, por estimularme a seguir adelante frente a cada inconveniente que se presentó, por las experiencias vividas en miles de kilómetros de ruta recorridos, por sus consejos y por ayudarme a crecer, tanto en lo personal como en lo profesional. A mi codirectora, Dra. Sofia Chulze que con su compromiso y dedicación acompañaron el desarrollo de esta tesis. A mi asesor, Dr. Enrique Lucini por su excelente predisposición para ayudar y salvar dudas. A la Dra. Graciela Laguna por sus valiosos consejos, además de comentarios y sugerencias al corregir diferentes escritos, mejorando la calidad de su contenido. A los directores Mg. Alejandro Rago y Dr. Alejandro Giayetto por abrirme las puertas de la institución y por realizar las gestiones necesarias para el desarrollo de esta investigación. Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria por aportar los fondos para realizar este doctorado. A la Universidad Nacional de Córdoba y a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Agropecuarias. A mis compañeros del grupo de enfermedades en maíz, Dra. Karina Torrico, Dra. María Fernanda Maurino, Ing. Mariana Ferrer, Ing. Agustina Ruiz Posse, Ing. Jorge Raspanti, por su ayuda y valorable paciencia. Al Ing. Marcelo Druetta, Dr. Boris Camiletti, Ing. Ignacio Luna, Soledad Brandimarte, Walter Arce, Ing. Raúl Candela e Ing. Clara Berton, porque facilitaron las actividades de campo y de laboratorio. A la Dra. María Silvina Alaniz Zanon por su ayuda y compañía en cada estadía en Río Cuarto. A todo el personal del INTA que con su predisposición y amabilidad aportan calidez al lugar de trabajo. A mis amigos de la institución Vero, Andy, Eli, Mauro, Lorena, Flor M. y Nathalie por compartir sus conocimientos y por brindarme el cariño y la contención necesaria para lograr los objetivos propuestos. A mi familia, la cual, desde la distancia son el sostén de mi vida. A mi abuela, que me recibió con los brazos abiertos cuando lo necesité. A las personas que forman mi mundo y ocupan un lugar especial en mi corazón Manuel, Marilina, Ramiro, Mario, Poroto, Lorena O., Mariana, Eva, Ignacio y Javi. Finalmente, a mis compañeros de becario, laboratorios y a las personas que nos recibieron en cada viaje realizado.

## **Dedicatoria**

*A mi abuela y a mi madre*

## RESUMEN

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cultivos con mayor superficie sembrada en el mundo y Argentina se encuentra entre los líderes mundiales en producción y exportación. La región formada por la Provincia de Santiago del Estero, el este de Tucumán y el norte de Córdoba engloba ocho distritos agroclimáticos con características agroecológicas caracterizadas por una gran amplitud térmica y períodos de sequía frecuentes que exponen al cultivo a patógenos, entre los que destaca el hongo *Aspergillus flavus*, responsable junto a otros de la podredumbre de la espiga y la contaminación de los granos con micotoxinas como aflatoxinas y ácido ciclopiazónico (ACP). Es frecuente que la contaminación comience en los lotes de producción y que, al cosechar granos infectados, el problema se agrave durante el almacenamiento, situación que es promovida por factores hídricos, térmicos, el daño causado por insectos y el uso de germoplasma susceptible. El uso de híbridos resistentes tanto a orugas de la espiga (maíces Bt) como al patógeno y a la acumulación de aflatoxinas, junto con el control biológico del hongo a través de la exclusión competitiva, son las herramientas más prometedoras para hacer frente a esta problemática. En este trabajo se obtuvieron aislamientos del hongo a partir de espigas de maíz y se caracterizaron en cuanto a su capacidad toxigénica y morfotipo de esclerocios, además, aquellos no productores de aflatoxinas fueron estudiados para determinar sus grupos de compatibilidad vegetativa (GCV) y sus relaciones filogenéticas en base a las secuencias de un segmento del gen *CaM*. Conjuntamente se evaluaron tecnologías Bt frente a la infección natural del hongo, así como el comportamiento de híbridos frente a la inoculación con aislamientos aflatoxigénicos de *A. flavus*. Se obtuvieron 58 aislamientos en ocho localidades representativas de cada uno de los ocho distritos agroclimáticos, resultando 30 no aflatoxigénicos, 28 aflatoxigénicos y la totalidad productores de ACP. La caracterización por morfotipo de esclerocios determinó que 6 aislamientos no produjeron esclerocios, 51 fueron L y solo uno fue S, siendo este último no productor de aflatoxinas. Se ubicaron 8 aislamientos en 4 GCV. Las secuencias del gen *CaM* corroboraron la pertenencia de los aislamientos al clado *A. flavus* y la alta similitud nucleotídica entre ellos (99,4 % a 100 %) reveló diversidad genética casi nula en esta región geográfica. No se observaron diferencias significativas en la proporción de aislamientos entre híbridos comerciales y variedades nativas ni entre las campañas estudiadas ni entre distritos agroclimáticos. La evaluación de híbridos empleados en la región permitió identificar a los híbridos 510PWU y 510PW como los de menor daño de espigas por orugas, sin detectarse infección natural con *A. flavus* ni acumulación de aflatoxinas en ninguno de los estudiados, mientras que la inoculación con aislamientos aflatoxigénicos destacó a P2089VYHR como el de mayor rendimiento y junto con P1366VYHR resultaron sin acumulación de aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), no detectándose diferencias significativas entre híbridos en cuanto al comportamiento frente a la infección por el hongo. El tratamiento Inoculado presentó una disminución de rendimiento del 4 % respecto al No Inoculado. Por medio de esta investigación se conocieron características de las poblaciones del hongo en esta región agrícola del norte del país, muchas de ellas compartidas con aislamientos obtenidos en la zona agrícola central de Argentina y se detectaron híbridos comerciales de buen comportamiento frente a estas poblaciones del hongo en cuanto a la infección y a la acumulación de AFB<sub>1</sub>.

Palabras claves: aflatoxinas, ácido ciclopiazónico, resistencia genética de maíz, híbridos, distritos agroclimáticos.

## ABSTRACT

Maize (*Zea mays* L.) is one of the most widely planted crops in the world and Argentina is a world leader in its production and exportation. Santiago del Estero province, the east of Tucumán and the north of Córdoba encompasses eight agro-climatic districts, characterized agro-ecologically by a wide temperature range and frequent periods of drought that expose the crop to pathogens, particularly the fungus *Aspergillus flavus*, responsible, along with others, for ear rot and grain contamination with mycotoxins such as aflatoxins B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) and cyclopiazonic acid (CPA). Contamination often begins in the field and when infected grains are harvested, and worsens during storage, encouraged by hydric and thermal factors, insect damage and the use of susceptible germplasm. The use of hybrids resistant to earworms (Bt maize) as well as to the pathogen and to aflatoxin accumulation, together with biological control of the fungus through competitive exclusion, are the most promising tools to deal with this problem. In this study, we obtained isolates of the fungus from ears of corn and characterized them in terms of their toxigenic capacity and morphotype of sclerotia. In addition, those that did not produce aflatoxins were studied to determine their vegetative compatibility groups (VCG) and their phylogenetic relationships based on the sequences of a segment of the *CaM* gene. At the same time, Bt technologies were evaluated against the natural infection of the fungus, as well as the behavior of hybrids against inoculation with aflatoxigenic isolates of *A. flavus*. Fifty-eight isolates were obtained in eight localities representative of each of the eight agroclimatic districts that make up the study region, 30 of which were non-aflatoxigenic, 28 aflatoxigenic, and all producers of CPA. The characterization by sclerotia morphotype determined that 6 isolates did not produce sclerotia, 51 were L and only one was S, the latter being a non-producer of aflatoxins. Eight isolates were located in 4 GCV. The *CaM* gene sequences corroborated that the isolates belonged to the *A. flavus* clade and the high nucleotide similarity between them (99.4 % to 100 %) revealed almost zero genetic diversity in this geographic region. No significant differences were observed in the proportion of isolates between commercial hybrids and those for self-consumption, or between the crop years studied or between agroclimatic districts. Evaluating the hybrids used in the region identified 510PWU and 510PW hybrids as those with the least damage to ears by caterpillars, without detecting natural infection with *A. flavus* or accumulation of aflatoxins in any of those studied. Inoculation with aflatoxigenic isolates highlighted P2089VYHR as the one with the highest yield and, together with P1366VYHR, without accumulation of AFB<sub>1</sub>. No significant differences were detected between hybrids in terms of behavior against infection by the fungus. The Inoculated treatment showed a yield decrease of 4 % compared to the non-Inoculated. This research revealed characteristics of the fungus populations in this agricultural region of the north of the country, many of them shared with isolates obtained in the central agricultural zone of Argentina, and commercial hybrids were detected that behave well against these fungus populations in terms of infection and accumulation of AFB<sub>1</sub>.

Key words: aflatoxin, cyclopiazonic acid, maize genetic resistance, hybrids, agro-climatic districts.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Agradecimientos.....</b>	<b>III</b>
<b>Dedicatoria .....</b>	<b>IV</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>VI</b>
<b>TABLA DE CONTENIDO .....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>XIII</b>
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL MAÍZ .....	4
PRODUCCIÓN Y CONSUMO INTERNACIONAL.....	7
PRODUCCIÓN, COMERCIALIZACIÓN, CONSUMO E INDUSTRIALIZACIÓN EN ARGENTINA .....	9
ENFERMEDADES DEL MAÍZ - PODREDUMBRE DE LA ESPIGA.....	13
CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO <i>Aspergillus</i> .....	15
<i>Aspergillus flavus</i> Link Y LA PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS .....	18
BIOCONTROL DE AFLATOXINAS - CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE <i>Aspergillus flavus</i> .....	22
HIPÓTESIS .....	25
OBJETIVOS GENERALES .....	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>27</b>
<b>AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE <i>Aspergillus flavus</i> A PARTIR DE ESPIGAS DE MAÍZ.....</b>	<b>27</b>
INTRODUCCIÓN .....	27
MATERIALES Y MÉTODOS .....	35
MUESTREO.....	35
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE <i>Aspergillus flavus</i> ....	36
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>Aspergillus flavus</i> .....	38
CAPACIDAD TOXIGÉNICA .....	40
PRODUCCIÓN DE ESCLEROCIOS .....	41

GRUPOS DE COMPATIBILIDAD VEGETATIVA .....	42
RELACIONES FILOGENÉTICAS .....	44
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	47
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE <i>Aspergillus flavus</i> ....	48
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>Aspergillus flavus</i> .....	51
CAPACIDAD TOXIGÉNICA .....	52
PRODUCCIÓN DE ESCLEROCIOS .....	56
GRUPOS DE COMPATIBILIDAD VEGETATIVA .....	58
RELACIONES FILOGENÉTICAS .....	59
CONCLUSIONES .....	64
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>65</b>
<b>COMPORTAMIENTO DE HÍBRIDOS DE MAÍZ CON DIFERENTE BASE</b>	
<b>GENÉTICA ANTE LA INFECCIÓN DE ESPIGAS CON <i>Aspergillus flavus</i> .....</b>	<b>65</b>
INTRODUCCIÓN .....	65
MATERIALES Y MÉTODOS .....	68
ENSAYO A .....	68
ENSAYO B .....	72
SEGURIDAD .....	75
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	75
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	76
ENSAYO A .....	76
ENSAYO B .....	79
CONCLUSIONES .....	85
<b>CAPÍTULO 4 .....</b>	<b>86</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>86</b>
<b>PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DE LA TESIS.....</b>	<b>87</b>
<b>FINANCIAMIENTO UTILIZADO PARA LA REALIZACIÓN DE LA TESIS .....</b>	<b>88</b>
<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>90</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>92</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1. Estados fenológicos de maíz.....	6
Tabla 1.2. Principales países productores de maíz y producción.....	8
Tabla 1.3. Superficie sembrada y producción de maíz en diferentes campañas agrícolas en Argentina.....	9
Tabla 1.4. Estructura química de las aflatoxinas.....	20
Tabla 2.1. Fenotipado de mutantes de aislamientos no aflatoxigénicos de <i>Aspergillus flavus</i> en muestras de maíz de ocho localidades de ocho distritos agroclimáticos de Santiago del Estero y regiones colindantes de Córdoba y Tucumán durante 2015/16 y 2016/17.....	47
Tabla 2.2 Distribución geográfica y número de aislamientos de <i>Aspergillus flavus</i> . Campañas agrícolas 2015/16 y 2016/17.....	48
Tabla 2.3. Producción de AFB <sub>1</sub> , ACP y morfotipos de esclerocios en aislamientos de <i>Aspergillus flavus</i> de espigas de maíz de 8 localidades representativas de 8 distritos agroclimáticos de la Provincia de Santiago del Estero, este de Tucumán y norte de Córdoba, durante las campañas agrícolas 2015/16 y 2016/17 .....	53
Tabla 2.4. Grupos de compatibilidad vegetativa de 8 aislamientos no productores de aflatoxina de localidades representativas de distritos agroclimáticos de la Provincia de Santiago del Estero, este de Tucumán y norte de Córdoba durante las campañas agrícolas 2015/16 y 2016/17.....	59
Tabla 3.1. Híbridos comerciales evaluados en la campaña 2017/18 y sus correspondientes proteínas introducidas para el control de lepidópteros.....	69
Tabla 3.2. Características de los híbridos comerciales evaluados en las campañas 2018/19 y 2019/20 junto sus tecnologías para el control de insectos en las localidades de Sachayoj (Provincia de Santiago del Estero) y Gancedo (Provincia del Chaco)....	72

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Localidades representativas de 8 distritos agroclimáticos de Santiago del Estero, este de Tucumán y norte de Córdoba. Sachayoj (D4: Río Muerto), Quimilí (D5: Hickmann), Bandera (D17: Bandera), Santiago del Estero (D18: Monteagudo), Sumampa (D37: Soto), Santa Rosa de Leales (D18A: Monteagudo), Rayo Cortado (37C: Soto - Norte de Córdoba) y Villa de Tulumba (D61B: Deán Funes).....	1
Figura 1.2. Planta de maíz y sus partes .....	6
Figura 1.3 Áreas aptas para el cultivo de maíz en Argentina. Las zonas blancas indican las zonas aptas, las grises no aptas por limitaciones edafoclimáticas y las oscuras presentan limitaciones de uso. ....	10
Figura 1.4. Cadena de valor del complejo maicero argentino.....	12
Figura 1.5. Imagen en microscopio electrónico de barrido del conidióforo y conidios del género <i>Aspergillus</i> .....	16
Figura 1.6. Imagen en microscopio óptico de un conidióforo típico del género <i>Aspergillus</i> .....	17
Figura 1.7. Colonia de <i>Aspergillus flavus</i> Link en medio de cultivo extracto de malta agar (MEA).....	18
Figura 1.8. Estructura química de las principales aflatoxinas.....	20
Figura 1.9. Estructura química del ácido ciclopiazónico (ACP).....	22
Figura 2.1. Isotermas de temperaturas medias de Argentina. Serie 1981 – 2010.....	35
Figura 2.2. Isohietas de precipitaciones medias de Argentina. Serie 1981 – 2010.....	35
Figura 2.3. Granos de maíz de muestras de espigas colectadas a campo, sembrados en medio Diclorán Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) luego de la desinfección superficial incubados 7 días a 25° C.....	37
Figura 2.4. Crecimiento de diferentes hongos sobre granos de maíz de espigas colectadas a campo en medio de cultivo diclorán glicerol 18% (DG18) incubados 7 días a 25°C.....	37
Figura 2.5. Filtrado y obtención de esclerocios de aislamientos no aflatoxigénicos cultivados en medio Czapeck dox .....	42
Figura 2.6. Proporción de aislamientos de <i>Aspergillus flavus</i> obtenidos en muestras de espigas de maíz de cada localidad representativa de cinco distritos agroclimáticos durante la campaña agrícola 2015/16.....	50
Figura 2.7. Proporción de aislamientos de <i>Aspergillus flavus</i> obtenidos en muestras de espigas de maíz de cada localidad representativa de ocho distritos agroclimáticos durante la campaña agrícola 2016/17.....	50
Figura 2.8. Número de aislamientos de <i>Aspergillus flavus</i> en ocho localidades representativas de ocho distritos agroclimáticos. Datos de campañas agrícolas 2015/16 y 2016/17.....	51

Figura 2.9. Gel de electroforesis exhibiendo los productos de la PCR.....	52
Figura 2.10. Esclerocios morfotipo L en aislamiento aflatoxigénico de <i>Aspergillus flavus</i> en observación bajo lupa estereoscópica Nikon SMZ-10 (15X) (Izquierda). Esclerocio morfotipo L en observación en microscopio Nikon eclipse Cs1 espectral (Derecha).....	56
Figura 2.11. Mutante <i>NiaD</i> obtenido en medio de cultivo Agar Hipoxantina (HYP) (A), Agar Nitrito (AN) (B) y Czapeck dox (CZ) (C).....	59
Figura 2.12. Árbol filogenético construido según el método estadístico Neighbor-Joining (NJ) basado en la relación entre segmentos de secuencias del gen <i>CaM</i> de aislamientos de <i>Aspergillus flavus</i> no productores de aflatoxinas de localidades representativas de distritos agroclimáticos de la Provincia de Santiago del Estero, este de Tucumán y norte de Córdoba.....	60
Figura 2.13. Árbol filogenético construido según el método estadístico Maximum-Likelihood (ML) basado en la relación entre segmentos de secuencias del gen <i>CaM</i> de aislamientos de <i>Aspergillus flavus</i> no productores de localidades representativas de distritos agroclimáticos de la Provincia de Santiago del Estero, este de Tucumán y norte de Córdoba.....	61
Figura 3.1. Localidades evaluadas en las provincias de Santiago del Estero y del Chaco en ensayos de análisis de tecnologías Bt frente a la infección natural por <i>Aspergillus flavus</i> y de comportamiento de híbridos de maíz frente a la inoculación con aislamientos toxigénicos del hongo.....	68
Figura 3.2. Diagrama ombrotérmico de la localidad de Quimilí (Provincia de Santiago del Estero) durante la campaña agrícola 2017/18.....	69
Figura 3.3. Frascos Erlenmeyer conteniendo maíz molido y solvente de extracción acetonitrilo: agua (84:16, V/V) en agitador orbital.....	70
Figura 3.4. Extracto crudo filtrado en columna de limpieza MycoSep®224 AflaZon.....	71
Figura 3.5. Diagrama ombrotérmico de la localidad de Sachayoj (Provincia de Santiago del Estero) durante las campañas agrícolas 2018/19 y 2019/20.....	73
Figura 3.6. Diagrama ombrotérmico de la localidad de Gancedo (Provincia del Chaco) en las campañas agrícolas 2018/19 y 2019/20.....	73
Figura 3.7. Granos de maíz sembrados en medio DG18 para la determinación de su carga fúngica a los 7 días de incubación a 25° C.....	74
Figura 3.8. Media de rendimiento para 5 híbridos comerciales Bt (510PWU, 510PW y DK7210VT3Pro) y no Bt (510RR y DK7210RR) en Santiago del Estero, Argentina. Campaña agrícola 2017/18.....	76
Figura 3.9. Espiga de maíz con tecnología PWV sin daños por orugas (izquierda) y espiga de maíz con tecnología RR dañada por orugas (derecha).....	77
Figura 3.10. Proporción de individuos con severidad mayor a 3 % para cinco híbridos comerciales Bt (510 PWU, 510 PW y DK7210 VT3Pro) y no Bt (510 RR y DK 7210 RR) en Santiago del Estero, Argentina. Campaña agrícola 2017/18.....	78
Figura 3.11. Medias de rendimiento para tratamiento Inoculado respecto a No inoculado con los aislamientos nativos ASSE3, ASQU11 y ASQU16 de <i>Aspergillus flavus</i>	

productores de aflatoxinas, durante las campañas agrícolas 2018/19 y 2019/20 en Sachayoj, Provincia de Santiago del Estero y Gancedo, Provincia del Chaco. Los valores medios seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ; Test LSD).....	80
Figura 3.12. Medias de rendimiento de seis híbridos comerciales durante las campañas agrícolas 2018/19 y 2019/20.....	81
Figura 3.13. Medias de porcentaje de infección de granos de maíz por aislamientos nativos de <i>Aspergillus flavus</i> productores de aflatoxinas para tratamientos Inoculado y No Inoculado durante las campañas agrícolas 2018/19 y 2019/20 en Sachayoj y Gancedo.....	82
Figura 3.14. Medias de acumulación de AFB <sub>1</sub> en granos de maíz de espigas inoculadas con aislamientos de <i>Aspergillus flavus</i> productores de aflatoxinas durante las campañas agrícolas 2018/19 y 2019/20 en Sachayoj y Gancedo.....	84

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C: grados centígrados  
μL: microlitro  
μm: micrómetro  
μM: micromolar  
AA: agar agua  
ACP: ácido ciclopiazónico  
ACV: análisis de compatibilidad vegetativa  
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>  
AFM<sub>1</sub>: aflatoxina M<sub>1</sub>  
AFM<sub>2</sub>: aflatoxina M<sub>2</sub>  
AFPA: *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* agar  
AMD: Almidón agar  
C<sub>4</sub>: cuatro carbonos  
CEPROCOR: Centro de Excelencia de Productos y Procesos de la Provincia de Córdoba  
CIAP: Centro de Investigaciones Agropecuarias  
CZ: Czapeck Dox agar  
dATP: Desoxiadenosina trifosfato  
dCTP: Desoxicidina trifosfato  
DEPC: dietilpirocarbonato  
DG18: Diclorán Glicerol 18% agar  
dGTP: Desoxiguanosina trifosfato  
dNTP: Desoxinucleósido trifosfato  
DRBC: Diclorán rosa de bengala cloranfenicol agar  
dTTP: Desoxitimidina trifosfato  
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético  
g.espiga<sup>-1</sup>: gramos por espiga  
g.mol<sup>-1</sup>: gramos por mol  
g: gramo  
GCV: grupos de compatibilidad vegetativa  
ha: hectárea  
HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia  
HYP: Agar hipoxantina  
INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria  
IPAVE: Instituto de Patología Vegetal  
ITS: Espaciador Transcrito Interno  
km: kilómetros  
MAGyP. Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca.  
Mbp: mega pares de bases  
MEA: Extracto de Malta agar  
MINCyT: Ministerio de Ciencia y Tecnología e Innovación  
mm: milímetros

mM: milimolar  
N°: número  
AN: Agar Nitrito  
ng.g-1: nanogramo por gramo  
ng: nanogramo  
nm: nanómetros  
pb: pares de bases  
PCR: reacción en cadena de la polimerasa  
ppb: partes por billón  
rADN: ADN ribosomal  
RAPD: Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico  
SAIC: sociedad anónima, industrial y comercial  
SCAR: Región Amplificada de Secuencia Caracterizada  
SMN: Servicio Meteorológico Nacional  
t: tonelada  
TAE: Tris - Acetato - EDTA  
UV: luz ultravioleta  
vs: versus  
WT: “aislamiento salvaje”  
 $\alpha$ : alfa  
 $\beta$ : beta

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cultivos con mayor superficie sembrada en el mundo y alcanza una producción que ronda los 1.100 millones de toneladas (USDA - FAS, 2020). Argentina se encuentra entre los líderes mundiales en producción de este cereal, ocupando el sexto lugar como productor y oscila entre el tercero y cuarto como exportador con una producción de alrededor de 60 millones de toneladas (MAGyP, 2020).

La región conformada por la Provincia de Santiago del Estero, este de Tucumán y norte de Córdoba engloba ocho distritos agroclimáticos (D4: Río Muerto; D5: Hickmann; D17: Bandera; D18: Monteagudo; D37: Soto; D18A: Monteagudo; 37C: Soto - Norte de Córdoba; D61B: Deán Funes) (Figura 1.1) (De Fina, 1973) con características agroecológicas particulares para el desarrollo del maíz, siendo responsable de entre 10 % y 20 % de la producción nacional (MAGyP, 2020), dependiendo de los factores climáticos propios de cada campaña agrícola.

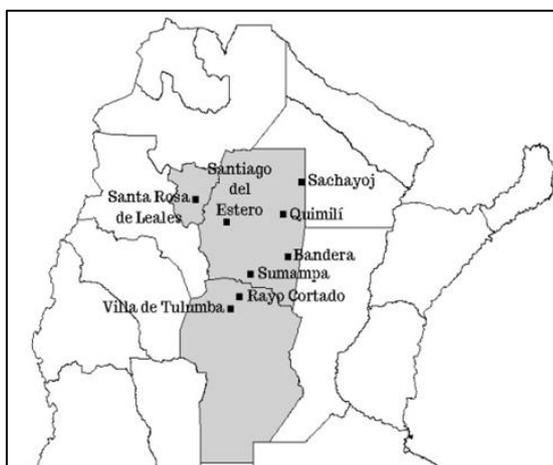


Figura 1.1. Localidades representativas de 8 distritos agroclimáticos de las provincias de Santiago del Estero, este de Tucumán y norte de Córdoba. Sachayoj (D4: Río Muerto), Quimilí (D5: Hickmann), Bandera (D17: Bandera), Santiago del Estero (D18: Monteagudo), Sumampa (D37: Soto), Santa Rosa de Leales (D18A: Monteagudo), Rayo Cortado (37C: Soto - Norte de Córdoba) y Villa de Tulumba (D61B: Deán Funes).

En las últimas dos décadas esta región experimentó una transformación importante debida a la expansión de las fronteras agrícolas, con modificación del uso del suelo y

evolución hacia sistemas agrícolas en detrimento de los sistemas ganaderos originales (Ginzo, 2015). En adición, la disponibilidad de nuevos híbridos adaptados a diferentes condiciones agroclimáticas y la modificación del régimen hídrico, producto del cambio climático (Cardini et al., 2018), posibilitaron el crecimiento de grandes centros de producción en los que el cultivo explora un ambiente con restricciones edafoclimáticas que lo exponen a estreses y a agentes bióticos responsables de numerosas enfermedades.

Diversas especies fúngicas son patógenos del cultivo y algunas de ellas producen micotoxinas, metabolitos secundarios nocivos para la salud humana y animal (De Rossi et al., 2017; Presello et al., 2016; Martínez et al., 2010). Especies de los género *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Diplodia*, causan podredumbre de la espiga, enfermedad favorecida por condiciones climáticas de humedad relativa y temperatura elevadas durante la etapa reproductiva del cultivo, ambiente característico de la región mencionada, que produce mermas importantes en el rendimiento y potencial contaminación de los granos con micotoxinas (Martínez et al., 2010).

*Aspergillus flavus* Link es un hongo patógeno y oportunista de animales y plantas, con distribución mundial (Grubisha y Cotty, 2015); se lo encuentra como constituyente normal de la microbiota del suelo y frente a determinados estreses hídricos y térmicos, algunas cepas producen micotoxinas, tales como aflatoxinas y ácido ciclopiazónico (ACP). Las aflatoxinas son metabolitos secundarios producidos principalmente por el género *Aspergillus*, con potente actividad hepatotóxica, teratogénica, inmunosupresora y mutagénica (Klingelhöfer et al., 2018; Wogan et al., 2012; Reddy et al., 2010). Las que se detectan con mayor frecuencia como contaminantes naturales en los cultivos y subproductos derivados son del tipo B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> y M<sub>1</sub>. Toman el nombre de B (*blue*) y G (*green*) dependiendo de la fluorescencia emitida cuando se observan con luz ultravioleta. Dichas aflatoxinas se excitan a longitudes de onda entre 225 nm y 365 nm emitiendo fluorescencia azul (*blue*) o verde (*green*) (Calvo, 2008).

La podredumbre de la espiga causada por *A. flavus* puede iniciarse en los lotes de producción, cosechándose granos contaminados con aflatoxinas e incrementándose el problema cuando los mismos son almacenados (Folcher et al., 2010; Wu, 2007). En condiciones de almacenamiento en silos, son fundamentales el monitoreo de la humedad del grano, la temperatura, la aireación y el control de insectos, para impedir el desarrollo

del hongo, mientras que en silo bolsas, además de la humedad del grano, se debe tener en cuenta confeccionarlos en zonas altas y limpias, con el tensado correcto, evitando el daño por roedores. Los insectos predisponen al maíz a la contaminación con hongos debido al daño que producen en el grano, facilitando la colonización por parte de patógenos (Windham et al., 2018; Munkvold et al., 2012). La principal estrategia de manejo utilizada en la región es el empleo de maíces con eventos transgénicos (Bt) que, al sufrir menor daño por insectos, tienen menor actividad fúngica y menor contenido de aflatoxinas en grano que los maíces no Bt, reduciendo el riesgo de contaminación en silos y almacenajes (Mwakinyali et al., 2019; Zhu et al., 2019; Weaver et al., 2017; Hruska et al., 2014; Warburton y Williams, 2014).

A partir del año 2016, numerosos híbridos de maíz sembrados en la región experimentaron el quiebre de la resistencia frente al ataque del “cogollero de la espiga” (*Spodoptera frugiperda*) (MRI-ASA, 2017) y como consecuencia se incrementaron los problemas de podredumbre de la espiga, infección por *A. flavus* y contaminación con aflatoxinas. De aquí que adquiere suma importancia orientar la investigación científica hacia los híbridos utilizados en la región, las líneas progenitoras, los nuevos germoplasmas lanzados al mercado y la población de *A. flavus* presente, con el objetivo de identificar fuentes de resistencia a la infección por *A. flavus*, debido a que esta especie es la principal productora de aflatoxinas (Amare y Keller, 2014; Martínez Padrón et al., 2013; Amaike y Keller, 2011; Georgianna y Payne, 2009; Brooks et al., 2005).

Desde la intensa sequía de la campaña 2008 se han evidenciado en esta región agrícola problemas con aflatoxinas<sup>1</sup>. Esto se convirtió en una situación de importancia económica debido a diversas razones: el aporte que realiza la región a la producción nacional, la distancia a los puertos (más de 500 km) que encarecen el traslado del grano, la variación del precio del maíz y la baja disponibilidad de camiones durante la cosecha que obligan a desarrollar estrategias comerciales para las cuales se necesita almacenar el grano en silo bolsas. A esto último se suma la calidad de confección y atmósfera interna de los mismos, las condiciones ambientales de la región que favorecen el desarrollo de hongos

---

<sup>1</sup> Reunión entre ARCOR SAIC e IPAVE-CIAP-INTA, “Presentación de problemas de aflatoxinas en el área agrícola centro norte del país y evaluación de posibles soluciones por parte del INTA”, Arroyito, Córdoba, junio de 2012; reunión entre Dirección de Promoción de Actividades Científicas MINCyT, ARCOR SAIC, IPAVE-CIAP-INTA y CEPROCOR, Córdoba, diciembre de 2012; Jornada de Salud y Reproducción animal, EEA Este de Santiago del Estero INTA, Monte Quemado, Santiago del Estero, octubre de 2015.

productores de micotoxinas y por último, el volumen importante de granos que es transformado en la región debido al crecimiento de proyectos zonales de molienda que incorporan valor agregado al maíz.

El control de hongos causantes de podredumbre de la espiga, como *A. flavus*, mediante fungicidas sintéticos, se dificulta debido a la imposibilidad de alcanzar al patógeno localizado en el interior de la espiga y al tiempo de carencia de los diferentes productos químicos que contrastan con la necesidad de prontitud de cosecha. En los últimos años se han realizado avances significativos a nivel nacional e internacional en el control biológico de este hongo en diferentes cultivos, basados en la competencia existente entre aislamientos toxigénicos y atoxigénicos (Ul Hassan et al., 2021; Ren et al., 2020; Alaniz Zanon et al., 2018, 2013; Hruska et al., 2014; Rosada et al., 2013; Reddy et al., 2010; Atehnkeng et al., 2008). Para desarrollar ésta y otras estrategias de manejo, previamente se deben caracterizar los aislamientos nativos de la zona.

Los aislamientos de *A. flavus* no productores de aflatoxinas seleccionados como biocontroladores deben cumplir determinados requisitos, tales como ser nativos y genéticamente aislados del resto de la población del hongo. Para ello, se debe analizar la diversidad genética de la población fúngica nativa a través de estudios como la determinación de grupos de compatibilidad vegetativa (GCV) (Grubisha y Cotty, 2015; Rodríguez Alvarado et al., 2013; Habibi y Banihashemi, 2008), el análisis de la cantidad y tamaño de esclerocios y las relaciones filogenéticas entre ellos (Rodríguez Alvarado et al., 2013; Gallo et al., 2012; Peterson, 2008).

## **CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL MAÍZ**

El maíz es una especie monocotiledónea anual perteneciente a la familia de las Poáceas (gramíneas) que no se encuentra en estado silvestre (Paliwal, 2001).

Es una gramínea originaria de Mesoamérica (México y Guatemala) con su centro de origen ubicado a lo largo del acantilado occidental de México, a unos 500 km de la Ciudad de México (Wilkes y Goodman, 1995). Fue domesticado por los nativos durante un período de entre 7.000 y 10.000 años atrás y fueron ellos quienes, a través de mejoras genéticas, obtuvieron variedades de grano dulce, amiláceas, duros y dentados, aunque

perdió su capacidad de vivir en forma silvestre. Lograron expandir su cultivo por toda América (Gear, 2008; Mangelsdorf, 1974) y fue Cristóbal Colón quien lo vio por primera vez en Cuba en octubre de 1492 (Fredenburg, 2006; McClintock et al., 1981).

El maíz tuvo su origen en un ecosistema con invierno seco alternado con lluvias de verano, en una región montañosa, con cuevas empinadas y sobre roca caliza. Esta región estaba ocupada por especies silvestres de teosinte y *Tripsacum* por lo que se sostienen diferentes teorías respecto al origen del maíz que lo vinculan con estas especies:

- a) Evolución vertical del maíz moderno a partir del silvestre.
- b) Progresión de teosinte a maíz.
- c) Separación del maíz y el teosinte, originados ambos en un ancestro común, habiéndose separado durante el proceso evolutivo.
- d) Hibridación entre teosinte y una gramínea desconocida (Acosta, 2009; Paliwal, 2001).

Según Galinat (1988) el maíz deriva del teosinte, ambos se cruzaron libremente y debido a ello los genes para resistencia y tolerancia a los estreses naturales presentes en el teosinte se transfirieron al maíz. Si bien en la actualidad no se sabe con certeza su origen, se considera a México como centro primario de diversidad genética y la zona Andina como el secundario (Acosta, 2009).

La especie posee metabolismo C<sub>4</sub>, es decir, no presenta fotorrespiración detectable (Martínez Álvarez, 2015), es diploide, consta de diez pares de cromosomas ( $2n=2x$ ) y se reproduce por semillas, las cuales pueden presentarse de color blanco, amarillo, rojo, morado y hasta negro, pero principalmente son de color amarillo (Ford, 2000; FAO, 1993; Xolocotzi, 1985). Las semillas son el resultado de la fecundación cruzada entre óvulos dispuestos en una inflorescencia femenina (espiga o mazorca), generalmente única y ubicada en posición axial, y granos de polen producidos en una inflorescencia masculina (panoja) ubicada en la porción apical del tallo (Figura 1.2). La polinización es anemófila y el porcentaje de autofecundación es muy reducido (Eyhéabide, 2012). El ciclo ontogénico de la planta de maíz puede dividirse en dos estados fisiológicos (FAO, 1993):

1. Estado vegetativo: desarrollo y diferenciación de los distintos tejidos hasta el momento que aparecen los estigmas en la flor masculina.

2. Estado reproductivo: comienza con la fecundación de la estructura femenina en la cual se desarrollarán los granos y culmina con la senescencia de la planta.

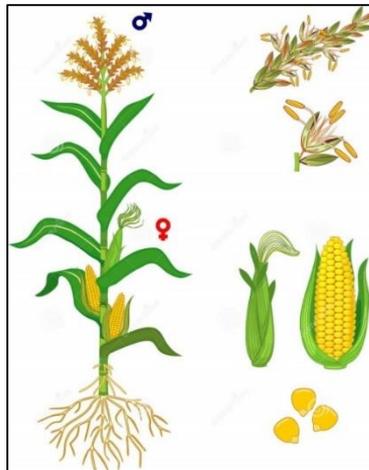


Figura 1.2. Planta de maíz y sus partes. Ilustración tomada de <https://thumbs.dreamstime.com/z/partes-de-la-planta-morfologia-del-maiz-con-las-hojas-el-sistema-raiz-frutas-y-flores-verdes-aislamientos-en-fondo-blanco-146924894.jpg>

El estudio del ciclo ontogénico se realiza a través de la fenología según las fases del desarrollo por las que atraviesa el cultivo, basándose en cambios morfológicos y fisiológicos de las plantas. Para el caso del maíz la escala más utilizada es la de Ritchie y Hanway (1982), que utiliza caracteres morfológicos macroscópicos para identificar dos períodos: vegetativo, subdividido en estadios indicados con la letra V y un subíndice, el cual corresponde al orden de la última hoja completamente expandida (lígula visible) al momento de la observación (VE: emergencia, V<sub>1</sub>, V<sub>2</sub>, V<sub>n</sub>, y V<sub>T</sub> o panojamiento), y el reproductivo, señalado con la letra R y un subíndice a partir de R<sub>1</sub> (emergencia de los estigmas), R<sub>2</sub> (cuaje o estado de ampolla), R<sub>3</sub> (grano lechoso), R<sub>4</sub> (grano pastoso), R<sub>5</sub> (grano duro) y R<sub>6</sub> (madurez fisiológica) (Tabla 1.1) (Martínez Álvarez, 2015; INTA, 2012).

Tabla 1.1. Estados fenológicos de maíz.

Estados vegetativos		Estados reproductivos	
V <sub>E</sub>	Emergencia	R <sub>1</sub>	Emergencia de estigmas
V <sub>1</sub>	1° Hoja	R <sub>2</sub>	Cuaje
V <sub>2</sub>	2° Hoja	R <sub>3</sub>	Grano lechoso
V <sub>n</sub>	N <sup>n</sup> Hoja	R <sub>4</sub>	Grano pastoso
V <sub>T</sub>	Panojamiento	R <sub>5</sub>	Grano duro
		R <sub>6</sub>	Madurez fisiológica

El valor del maíz radica en sus granos, los que constituyen uno de los alimentos más antiguos que se conoce. Es por ello que a lo largo de la historia el cultivo sufrió fuerte presión de selección que dio como resultado diferentes híbridos con características adaptables a ambientes agroecológicos diversos, tales como diferencias 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 filas de granos y número de granos.

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 %) (González Arguinzones, 2013; FAO, 1993).

El número de granos producidos por espiga y el peso de los mismos determina el rendimiento del cultivo y la formación del mismo comprende tres fases: la fase I, correspondiente al período de cuaje de los granos ( $R_2$ ), se extiende unos 10 a 20 días posterior a la floración, según la temperatura y el genotipo, y en ella queda definido el principal componente del rendimiento que es el número de granos por espiga. La fase II es la etapa efectiva de llenado de grano y dura más de la mitad del período total de llenado de los granos. Por último, la fase III o etapa final donde la tasa de llenado va declinando hasta hacerse nula, completándose de esta manera el crecimiento del grano que alcanza su madurez fisiológica y simultáneamente va perdiendo humedad hasta finalizada la etapa, donde se visualiza la formación de la capa de abscisión en la punta del grano, la cual impide una mayor acumulación de materia seca (“capa negra”) (Cirilo y Andrade, 1994).

## **PRODUCCIÓN Y CONSUMO INTERNACIONAL**

El maíz es uno de los cultivos que ocupa la mayor superficie cultivable del mundo, pero con diferencias importantes en cuanto a la relación superficie sembrada - rendimiento entre países. Históricamente la producción de maíz tuvo una tendencia alcista a lo largo de los últimos 35 años (Goizueta, 2014), siendo los mayores productores mundiales Estados Unidos, China y Brasil (Tabla 1.2) (USDA - FAS, 2021).

Los granos de maíz producidos mundialmente tienen como destino final la exportación, la alimentación de animales, el consumo humano y la industrialización, destacándose en esta última la producción de etanol (Castro y Emiliozzi, 2020; Calzada, 2016; CEF, 2007).

Los principales países consumidores son Estados Unidos con 35 % del consumo mundial y principalmente destinado a la producción de etanol, seguido por China (20 %) y la Unión Europea (7 %). En menor medida siguen Brasil y México (Goizueta, 2014). Durante la última década el consumo mundial creció a una tasa promedio anual de 3,4 %, de este, el forrajero representa el 62,5 % y el humano e industrial el 37,5 % (USDA - FAS, 2021). Países como China, India y la Unión Europea se destacan en este incremento anual del consumo con 3,8 %, 6,5 % y 15 %, respectivamente. En México, el consumo creció 3,3 %, motivado, principalmente, por el incremento del uso del maíz para la alimentación animal, siendo la avicultura el principal destino del grano (USDA - FAS México, 2021) y en Brasil su consumo creció 2,4 % debido al aumento de la producción de etanol y el uso de forraje para el ganado (USDA - FAS Brasil, 2021).

Tabla 1.2. Principales países productores de maíz y producción.

País	Producción de maíz (millones de toneladas)		
	2018/19	2019/20	2020/21
<b>Estados Unidos</b>	364.262	347.782	358.447
<b>China</b>	257.330	260.770	260.670
<b>Brasil</b>	101.000	101.000	86.000
<b>Unión Europea</b>	64.440	65.000	64.413
<b>Argentina</b>	56.860	58.395	60.525
<b>India</b>	27.715	28.500	31.510
<b>México</b>	27.600	25.000	27.350
<b>Ucrania</b>	35.805	35.800	30.297
<b>Canadá</b>	13.885	13.400	13.563
<b>Rusia</b>	11.415	14.275	13.872
<b>Sudáfrica</b>	11.824	16.000	16.900
<b>Indonesia</b>	12.000	12.700	11.800
<b>Nigeria</b>	11.000	11.000	10.000
<b>Etiopía</b>	8.350	8.400	8.600
<b>Filipinas</b>	7.608	8.100	8.352

El consumo humano tiene sus mayores valores en los países de África y Centro América con valores de entre 328 y 267 g/persona/día, respectivamente (Ranum et al., 2014). Estos valores están sujetos al crecimiento de la población y al aumento de los

ingresos, los cuales dictan los cambios de preferencias alimentarias y determinan los futuros hábitos de consumo de alimentos (FAO, 2017).

## **PRODUCCIÓN, COMERCIALIZACIÓN, CONSUMO E INDUSTRIALIZACIÓN EN ARGENTINA**

El maíz junto con la soja y el trigo constituyen la base de la producción agrícola nacional (CAS, 2014). Argentina es responsable de casi 16 % de la exportación mundial, siendo la superficie sembrada durante la campaña 2019/20 de 9,7 millones de hectáreas, levemente mayor a la campaña precedente y con una producción de 60,5 millones de toneladas (Tabla 1.3) (MAGyP, 2021).

Tabla 1.3. Superficie sembrada y producción de maíz en diferentes campañas agrícolas en Argentina.

<b>Campaña agrícola</b>	<b>Superficie sembrada (ha)</b>	<b>Producción (t)</b>
<b>2016/17</b>	8.486.694	49.490.326
<b>2017/18</b>	9.139.766	43.462.323
<b>2018/19</b>	9.039.594	56.860.704
<b>2016/20</b>	9.504.473	58.395.811
<b>2020/21</b>	9.742.230	60.525.805

El cultivo de maíz se realiza en una vasta superficie del territorio nacional, principalmente en las regiones centro y norte del país (Figura 1.3), bajo diferentes condiciones agroecológicas en donde los factores climáticos como precipitaciones, radiación, temperatura, evaporación, entre otros, introducen el “azar” en los sistemas productivos, repercutiendo en la producción final del cultivo (Totis de Zeljkovich, 2012). Las principales regiones productoras son las localizadas en la zona central del país, incluyendo a las provincias de Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires (zona núcleo). Las zonas aledañas son denominadas “regiones marginales” en las que, el desarrollo de estrategias adaptadas a estos agroecosistemas diversos, con factores como mejoras en el manejo agronómico de los suelos, en el gerenciamiento, en la fertilización, en el riego y principalmente en el desarrollo de nuevas tecnologías como el mejoramiento genético de las semillas, posibilitaron la expansión del cultivo hacia estas regiones, aumentando el área

cultivable y la productividad, dando lugar a grandes centros de producción de maíz (CAS, 2014; MAIZAR, 2013).

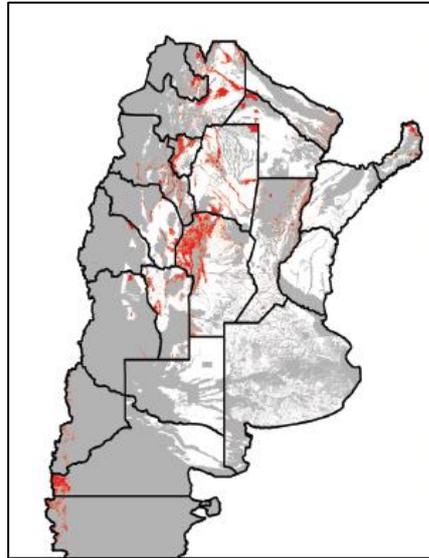


Figura 1.3. Áreas aptas para el cultivo de maíz en Argentina. Las zonas blancas indican las zonas aptas, las grises no aptas por limitaciones edafoclimáticas y las rojas presentan limitaciones de uso. Fuente: <http://docplayer.es/95667598-Mapas-de-areas-aptas-para-cultivos-de-secano-en-argentina.html>

La Provincia de Santiago del Estero, integrante de una de estas “regiones marginales”, no estuvo exenta del avance de este cultivo. Desde finales de los años 90 se evidenció un cambio marcado, especialmente en el extremo noreste de la provincia, en donde la modificación del uso del suelo incrementó la superficie destinada a sistemas agrícolas en detrimento de los ganaderos. La intensificación de los procesos productivos, el acceso a nuevos y numerosos híbridos adaptados a diferentes ambientes agroclimáticos, el desarrollo de nuevas áreas de cultivo debido al cambio de condición del suelo por desmonte (Ginzo, 2015) y la modificación del régimen hídrico, producto del cambio climático (Cardini et al., 2018), han permitido el desarrollo del cultivo en estos sistemas agroecológicos con características muy antagónicas, en donde el maíz, además de cumplir un rol socio-económico preponderante, tiene formas de cultivo, manejo y comportamientos diferentes.

De Fina (1973) clasificó al país en diferentes distritos agroclimáticos considerando las características edafoclimáticas de las regiones. La Provincia de Santiago del Estero, el este de Tucumán y el norte de Córdoba adquieren particular interés debido a que son sitios

en los cuales el maíz está expuesto a una alta variabilidad climática, la cual, acompañada de suelos frágiles, desde el punto de vista nutricional y estructural, exponen al cultivo a diferentes estreses que favorecen el desarrollo de enfermedades causadas por diferentes patógenos, destacándose *A. flavus* y su consecuente producción de micotoxinas.

La región está conformada por ocho distritos agroclimáticos con localidades representativas en cada uno de ellos (Figura 1.1) y su importancia radica en el aporte de entre 10 % y 20 % que realiza a la producción nacional (MAGyP, 2021), por la proporción de cereal que es almacenado en silos bolsas como estrategia comercial o para consumo animal y por el incremento de proyectos zonales de molienda que brindan ventajas competitivas a la producción y comercialización de productos y subproductos derivados del maíz.

El principal destino del maíz producido en el país es la exportación, cuyo valor oscila entre el 60 % y 68 % de la producción nacional, correspondiendo el 99 % a maíz en grano y un muy bajo porcentaje a aceite en bruto y almidón, con un ingreso de 2.893 millones de dólares (9,4 % de las exportaciones totales) (INDEC, 2019). Los principales destinos son Vietnam, Egipto, Medio Oriente, Argelia, Malasia, Sudáfrica, Corea del Sur y Chile, siendo el resto del maíz producido, procesado y consumido en el país. Los elevados impuestos, la evasión impositiva y el retraso en la aplicación de tecnología dañan la competitividad, por lo que el procesamiento interno del cereal se encuentra muy por debajo de otros países referentes como Brasil y Estados Unidos, con 65 % y 87 %, respectivamente (MAIZAR, 2018).

El principal destino interno del maíz es la producción avícola (carne y huevos), porcina y bovina (carne y leche); molienda húmeda, cuyo principal producto es la fructosa; molienda seca que incluye a las harinas de maíz y polentas; balanceadores que producen raciones y mezclas para alimentación animal y producción de etanol para biocombustibles (USDA - FAS Argentina, 2021).

Numerosos actores integran la cadena de valor del complejo maicero en Argentina (Figura 1.4) y las moliendas húmedas y secas, junto con la producción de balanceados y biocombustibles están creciendo en los últimos años (Bolsa de Cereales, 2018).

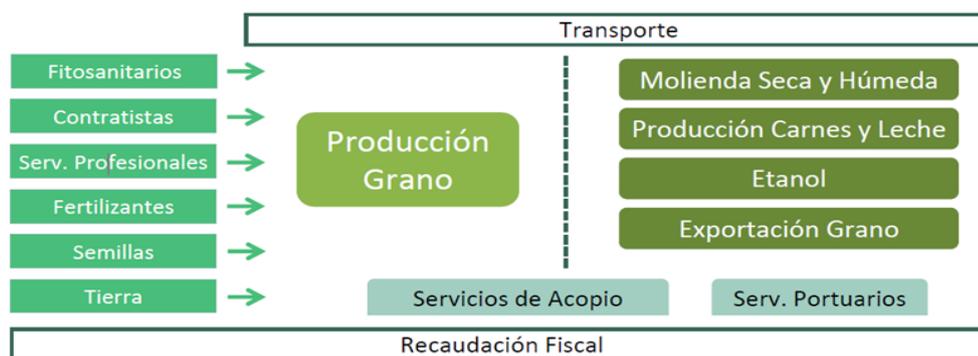


Figura 1.4. Cadena de valor del complejo maicero argentino. Fuente: <https://www.bolsadecereales.com/imagenes/retaa/2018-12/161-lacadenademaizenargentinaretaapaseeee09.11.2018.pdf>

En la molienda húmeda el grano es sometido a un proceso de maceración con agua sulfurada, el cual facilita la separación de los componentes básicos presentes en el grano: almidón, aceite de maíz (germen) y gluten. Los principales productos que se obtienen son: endulzantes calóricos, almidones, subproductos como el "gluten meal" y el "gluten feed", jarabes de maíz de alta fructosa, colorante caramelo, jarabe de maltosa, jarabe de glucosa, dextrosa y jarabes mezclas. El destino principal de estos subproductos son: forraje, balanceados, suplementación en la nutrición animal, industria alimenticia e insumos para el sector farmacéutico (Rodríguez Tejeda, 2018; Garzón et al., 2015). Este tipo de industrialización presenta el inconveniente que, ante la utilización de maíces contaminados con aflatoxinas, éstas se concentran en los subproductos como el gluten y harinas, encontrándose niveles de aflatoxinas de hasta tres veces respecto del maíz entero (Munkvold y White, 2016).

Durante el proceso de molienda seca se separan y rompen, a través de procesos físicos, el germen, el endosperma y el pericarpio del grano de maíz, obteniéndose harinas (polentas), sémolas y trozos o "grits" para elaboración de copos (corn flakes). También se obtiene harina zootécnica, compuesta por una mezcla de proporciones variables de salvado, germen y harina de menor granulometría. Los principales destinos de los productos de la molienda seca son: cerveceras, industria alimenticia para elaboración de cereales para desayuno, snacks o expandidos, sopas y forraje (Schabo et al., 2020; Pagkali et al., 2018; Rodríguez Tejeda, 2018; MAIZAR, 2017; Garzón et al., 2015).

## ENFERMEDADES DEL MAÍZ - PODREDUMBRE DE LA ESPIGA

Las nuevas tecnologías de insumos y procesos que en los últimos años se sumaron al complejo maicero argentino, permitieron la expansión del cultivo hacia nuevos ambientes, ampliando la fecha de siembra. De esta manera, se creó un corredor verde de siembra en el país que se extiende, prácticamente, durante todo el año calendario (Couretot et al., 2016), el cual, favorecido por las condiciones edafoclimáticas y susceptibilidad de los germoplasmas empleados, permiten el desarrollo y diseminación de enfermedades y vectores (Oleszczuk et al., 2020; Rodriguez, 2018; De Rossi et al., 2017; Giménez Pecci et al., 2012; Varón de Agudelo y Sarria Villa, 2007).

Las enfermedades pueden ser causadas por agentes bióticos, además de favorecidas por abióticos y se las puede agrupar en enfermedades no infecciosas e infecciosas. Las primeras son producidas por agentes abióticos tales como temperaturas extremas, exceso o deficiencia de nutrientes, disponibilidad de agua edáfica, granizo, fitotoxicidad de productos químicos, deficiencias nutricionales, provocando alteraciones que ocasionan pérdidas de rendimiento y/o muerte de la planta (Botta y González, 2012). Las enfermedades infecciosas son producidas por patógenos bióticos como hongos, virus, bacterias, mollicutes y nemátodos (Botta y González, 2012; Pérez y Terrón et al., 2012).

En el mundo se han reportado 32 virus afectando al cultivo de maíz, siendo los más importantes *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV), *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV), *Maize streak virus* (MSV), *Maize stripe virus* (MSpV), *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), *Wheat streak mosaic virus* (WSMV), *Maize red stripe virus* (MRSV), *Maize mosaic virus* (MMV), *Barley stripe mosaic virus* (BSMV), *Maize rayado fino virus* (MRFV), *Barley yellow dwarf virus* (BYDV), *Mal de Rio Cuarto virus* (MRCV) y *High Plains wheat mosaic virus* (HPWMoV). Pueden presentarse en infecciones simples y/o mixtas como el caso de la necrosis letal del maíz (CLN), resultante de infecciones mixtas de SCMV y MCMV (Giménez Pecci et al., 2017; Maurino et al., 2014; Laguna y Giménez Pecci, 2012). Dentro de los mollicutes, *Spiroplasma kunkelii* es el principal responsable del Achaparramiento del maíz (CSS), es transmitido por el cicadélido *Dalbulus maidis* y puede ocasionar graves pérdidas en la producción de este cultivo (Giménez Pecci et al., 2017; Virla et al., 2004). Las bacterias presentan numerosos síntomas y se pueden encontrar en

infecciones simples y mixtas, siendo las especies *Acidovorax avenae*, *Acidovorax temperans*, *Burkholderia andropogonis*, *Pantoea ananatis*, *Pantoea stewartii subsp. stewartii*, *Pseudomonas syringae* y *Xantomonas vasicola* las principales responsables del daño foliar en la planta y su consecuente pérdida de rendimiento (Plazas et al., 2018, 2014; Munkvold y White, 2016).

Los hongos constituyen unos de los patógenos más importantes del maíz, pudiendo ser saprófitos o parásitos. Pueden atacar todas las partes de la planta causando marchitamientos foliares, enanismo y pudriciones de raíz, tallo y espigas (Botta y Gonzalez, 2012). *Puccinia sorghi*, *Exserohilum turcicum*, *Cercospora zea-maydis* y *Bipolaris maydis* entre otros, son responsables de manchas foliares, mientras que las pudriciones de raíz y tallo más frecuentes, son ocasionadas por especies como *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticilloides*, *Stenocarpella macrospora*, *Stenocarpella maydis*, *Colletotrichum graminicola* y *Macrophomina phaseolina* (De Rossi et al., 2017; Munkvold y White, 2016).

Dentro de las diferentes especies fúngicas que atacan al cultivo de maíz, las de los géneros *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. y *Diplodia* sp., causan podredumbre de la espiga. Estas adquieren importancia cuando son favorecidas por condiciones climáticas de humedad relativa y temperatura ambiente elevadas durante la etapa reproductiva del cultivo, ocasionando mermas importantes en el rendimiento, pérdida de calidad de los granos y potencial contaminación de los mismos con micotoxinas, metabolitos secundarios nocivos para la salud humana y animal (De Rossi et al., 2017; Presello et al., 2016; Martínez et al., 2010).

La colonización de los granos se ve favorecida por el daño de insectos y pájaros y por el vuelco de las plantas, dejando a las espigas en contacto con el suelo. Las especies fúngicas mencionadas producen la desintegración de tejidos de la espiga y la proliferación de micelio, variando este último en color e intensidad, dependiendo de los hongos que estén produciendo la infección.

La mayoría de los patógenos que causan la podredumbre de la espiga proliferan en tejidos vegetales vivos, en el rastrojo e incluso en el suelo (Presello y Botta, 2004). De esta manera, el ciclo de la podredumbre comienza con esporas sexuales o asexuales que

pasaron el invierno y son transportadas mediante agentes bióticos (insectos, pájaros) y/o abióticos (viento, impacto de gotas de lluvia) hacia la espiga de maíz donde encuentran las dos principales vías de entrada: las heridas en los granos en desarrollo y los estigmas durante la floración. El hecho de que estos últimos no estén protegidos por las brácteas, como sí lo están los granos, los expone como un primer punto de contacto, considerándose una vía principal de entrada para los hongos (Miller et al., 2003). La colonización de los estigmas ocurre con mayor intensidad luego de la polinización y puede prolongarse hasta la senescencia de los mismos, permitiendo que las hifas crezcan a través de ellos y puedan llegar al grano. Generalmente estos hongos no invaden a través del pericarpio sano de los granos pero, si encuentran heridas que atraviesen las chalas (brácteas), pueden afectar unos pocos granos y comenzar el proceso de infección (Masiello et al., 2019; Gai et al., 2018; Vollmeister et al., 2012; Presello et al., 2004).

Entre las estrategias para manejar las podredumbres de espigas, se destacan las orientadas a disminuir el inóculo potencial presente en el lote. Para ello, la selección de materiales con resistencia o baja susceptibilidad al patógeno, la elección de la fecha de siembra, la rotación para cortar ciclos de vida de patógenos, la fertilización y densidad de siembra correctas, el control de malezas e insectos y la cosecha anticipada, entre otros, son herramientas adecuadas para ello y permitir la durabilidad de la resistencia genética de los híbridos comerciales de maíz (De Rossi et al., 2017; Munkvold y White, 2016; Reis et al., 2004).

## **CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO *Aspergillus***

La denominación primaria del género, “*Aspergillum*”, fue esgrimida por el biólogo italiano Pier Antonio Micheli (1729) debido a la similitud morfológica entre los conidióforos del género *Aspergillus* y los hisopos utilizados para rociar (aspergilar) agua bendita en ciertas liturgias (Amaiye y Keller, 2011). Esta descripción del hongo en su obra “*Nova Plantarum Genera*” marca el punto de partida de la micología como ciencia. El género *Aspergillus* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, incluye más de 350 especies clasificadas en subgéneros y agrupadas en diferentes secciones, son capaces de crecer en distintos sustratos naturales y bajo un amplio rango de condiciones medioambientales, lo que las hace extremadamente ubicuas (Figura 1.5) (Frisvad y Larsen,

2015; Samson et al., 2014; Martínez Padrón et al., 2013; Bennett, 1988). Las especies incluidas en este género son hongos filamentosos (compuesto de cadenas de células, llamadas hifas) y saprófitos que desempeñan un papel esencial en la degradación de la materia orgánica, formando parte del ciclo medioambiental del carbono y del nitrógeno (Pitt, 1994; Van Den Bossche et al., 1988). Se caracterizan por producir enzimas que degradan almidón, celulosa, pectinas y otros polímeros (Bennett, 2010), por lo que pueden desarrollarse sobre un amplio rango de sustratos naturales como maderas, textiles, cemento y medicamentos, entre otros (Pitt y Hocking, 2009). Los alimentos en base a cereales y oleaginosas destinados al consumo humano y animal constituyen una excelente fuente nutricional para el crecimiento de *Aspergillus* (Bennett, 2010), por lo que existen muy pocos alimentos o “commodities” de los cuales este hongo no sea aislado frecuentemente (Pitt y Hocking, 2009).

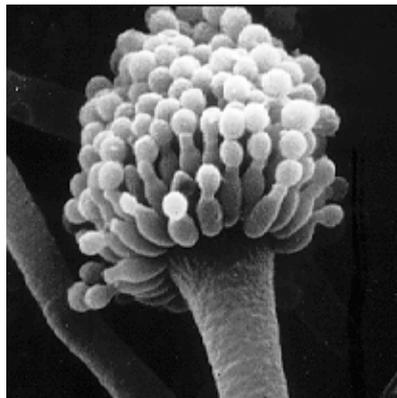


Figura 1.5. Imagen en microscopio electrónico de barrido del conidióforo y conidios del género *Aspergillus*. Fuente:<http://www.niaid.nih.gov/dir/labs/lci/aspergillus.gif>

La reproducción se realiza mediante conidios, los cuales son esporas asexuales originadas de células conidiógenas ubicadas sobre conidióforos (Figura 1.6) (Abarca, 2000). Estos conidios poseen un diámetro de 2 a 3  $\mu\text{m}$  y debido a que cada conidióforo puede producir unos 50.000 de ellos y que se dispersan con el viento a distancias que dependen de las condiciones climáticas, es posible encontrar gran cantidad de esporas en el aire, llegándose a contabilizar un número máximo de mil millones por metro cúbico (Van Den Bossche et al., 1988). Cuando una espora se deposita sobre una superficie (sólida o líquida) y bajo condiciones ambientales de humedad relativa entre 70 % y 90 % y temperatura entre 0° y 45 °C, se produce la germinación de la misma (Klich, 2002).

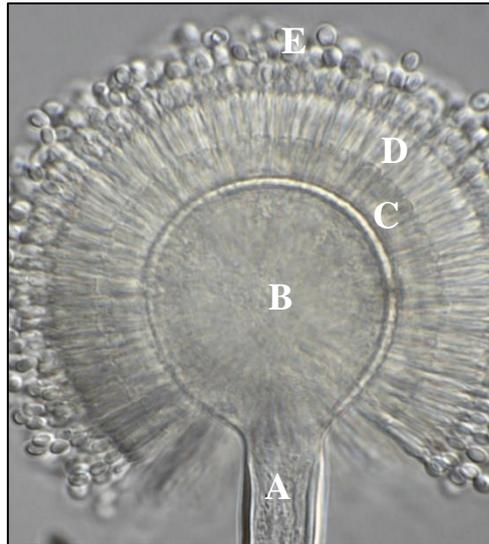


Figura 1.6. Imagen en microscopio óptico de un conidióforo típico del género *Aspergillus*. A: estipe; B: vesícula; C: métulas; D: fiálides; E: conidios.

Desde el punto de vista morfológico el color es la principal característica macroscópica para la identificación de los grupos de *Aspergillus*, los cuales poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro. Las especies del género se caracterizan por la formación de conidióforos (Figura 1.6), los que constituyen estructuras unicelulares que poseen tres partes bien diferenciadas: vesícula (extremo apical hinchado), estipe (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula) y célula pie (sección final, a veces separada por un septo, que une el conidióforo con la hifa). Las vesículas presentan, bajo el microscopio, cuatro formas básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme y sobre estas estructuras, se disponen fiálides (células conidiógenas) o métulas y fiálides dependiendo de la especie. Las cabezas conidiales que sólo presentan fiálides se denominan uniseriadas, mientras que las que presentan fiálides y métulas son denominadas biseriadas. Es a partir de las fiálides desde donde se forman las esporas denominadas conidios (Pitt y Hocking, 2009; Abarca, 2000; Kozakiewicz, 1988).

*Aspergillus* sección *Flavi* incluye 22 especies divididas en siete subtipos. Las especies de esta sección presentan cabezas conidiales en tonos amarillo-verdosos y esclerocios de color marrón oscuro, conformando, estos últimos, las estructuras de resistencia del hongo. Algunos integrantes de esta sección son utilizados en la fermentación de alimentos como *A. oryzae*, *A. sojae* y *A. tamarii*, pero la gran mayoría son considerados contaminantes de diferentes cultivos agrícolas, deteriorando la calidad de los mismos y algunos, como *A. flavus*, implican un riesgo para la salud humana y animal como

consecuencia de la producción de micotoxinas (Donner et al., 2015; Doster et al., 2014; Varga et al., 2011; Reddy et al., 2010; Perrone et al., 2007; Diener, 1989). Entre los principales productores de micotoxinas se destacan *A. nomius*, *A. parasiticus* y *A. flavus* (aflatoxinas); *A. terreus* (citroviridina); *A. niger* y *A. ochraceus* (ocratoxina A) (Carrillo y Audicio, 2007).

### ***Aspergillus flavus* Link Y LA PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS**

*A. flavus* Link es un hongo patógeno y oportunista de animales y plantas con distribución mundial (Grubisha y Cotty, 2015). Tiene la capacidad de crecer en sustratos con actividad de agua entre 0,76 y 0,98 y en un rango de temperatura de entre 15 °C y 45 °C, con un óptimo en 30 °C (Pitt y Hocking, 2009; Giorni, 2007). Forma colonias que comienzan con una tonalidad blanco-amarillenta, algodonosas o flocosas y con el tiempo se tornan pulverulentas y con tonalidades verdosa o verde-amarillentas (Figura 1.7). Cuando produce esclerocios, estos son de color marrón oscuro a negro, en ocasiones presentan exudados y de tamaños y formas variables, constituyendo este último rasgo, un carácter fenotípico (Abbas et al., 2005). La profundidad de la colonia normalmente es de 2 a 3 mm (Bonifaz Trujillo, 2012; Klich, 2002; Abarca, 2000).



Figura 1.7. Colonia de *Aspergillus flavus* Link en medio de cultivo agar extracto de malta (MEA).

Los aislamientos de *A. flavus* presentan al microscopio cabezas conidiales uni y biseriadas, principalmente radiales a columnares. Con micelio septado, hialino, ramificado y conidióforos largos y cenocíticos. Los estipes normalmente son rugosos, hialinos o pálidos y alcanzan un tamaño de entre 400 a 800  $\mu\text{m}$  x 8 a 17 mm. Las vesículas tienen forma esférica o alargadas, con un diámetro de entre 20 a 45  $\mu\text{m}$  y contienen de 1 a 2 series

de fiálides. Las métulas alcanzan un tamaño de entre 8 a 10  $\mu\text{m}$  x 5 a 7  $\mu\text{m}$ , mientras que las fiálides tienen una longitud de entre 7 a 12  $\mu\text{m}$  x 3 a 4  $\mu\text{m}$ . Los conidios son globosos o elipsoidales, miden entre 3 a 6  $\mu\text{m}$  y poseen paredes lisas o ligeramente rugosas (Bonifaz Trujillo, 2012; Payne y Yu, 2010; Klich, 2002; Abarca, 2000).

Posee un genoma de aproximadamente 37 Mb distribuido en 8 cromosomas que codifican para más de 12 mil genes funcionales (Chang y Ehrlich, 2010; Payne y Yu, 2010).

*A. flavus* está presente como constituyente normal de la microbiota del suelo y, al igual que otras especies de la sección *Flavi* como *A. parasiticus* y *A. fumigatus*, frente a determinados estreses hídricos y térmicos algunas cepas producen micotoxinas como aflatoxinas y ácido ciclopiazónico (ACP) (Reddy et al., 2010; Montes et al., 2009; Hernández Delgado et al., 2007).

La palabra micotoxina deriva del griego, “mikes” que significa hongo y “toxina” que significa veneno. Son productos del metabolismo secundario de algunos hongos, excretados al medio en el que se desarrollan y tienen efectos nocivos sobre la salud humana y animal (Rasheed et al., 2019; Mauro et al., 2015; Varga et al., 2011; Soriano del Castillo, 2007; Fokunang et al., 2006; Kusumoto et al., 2000; Yu et al., 2000; Lacey, 1989). Cuando las condiciones ambientales y/o la concentración de nutrientes en el medio no son las adecuadas, el hongo detiene su crecimiento y sus procesos de síntesis se orientan hacia la producción de estos metabolitos secundarios (Yu, 2012; Yu et al., 2010; Guzmán de Peña et al., 1998; Lacey, 1989).

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios producidos principalmente por *A. flavus* y otras especies de la sección *Flavi* como *A. parasiticus* y *A. fumigatus* y poseen una potente actividad hepatotóxica, teratogénica, inmunosupresora y mutagénica (Reddy et al., 2010). La capacidad de síntesis de aflatoxinas es una característica propia del aislamiento y no de la especie, por lo que el crecimiento del hongo no implica necesariamente la producción de aflatoxinas (Abbas et al., 2011b; Díaz, 1996).

Estas micotoxinas pertenecen a la familia de las difurano - cumarinas y se clasifican en dos grupos dependiendo de su estructura química (Tabla 1.4) (Urrego Novoa y Díaz,

2006). Son inodoras, insípidas e incoloras y forman un grupo de 15 a 20 metabolitos químicamente relacionados, de los cuáles cuatro tipos mayoritarios han sido identificados como aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), aflatoxina B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), aflatoxina G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) y aflatoxina G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) (Figura 1.8) (Wu et al., 2013; Urrego Novoa y Díaz, 2006). Otros tipos de aflatoxinas, denominadas aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) y aflatoxina M<sub>2</sub> (AFM<sub>2</sub>), han sido halladas en leche, como resultado de la alimentación de las vacas con suplementos contaminados con AFB<sub>1</sub> y AFB<sub>2</sub>, respectivamente (Van Egmond, 1989). Estas son el producto metabólico hidroxilado de las AFB<sub>1</sub> y AFB<sub>2</sub> y se estima que alrededor del 1 % de la AFB<sub>1</sub> consumida con el alimento es excretada en la leche como AFM<sub>1</sub> (Paterson y Lima, 2010; Moss, 1991).

Tabla 1.4. Estructura química de las aflatoxinas

Grupo	Tipo de Aflatoxina	Fórmula estructural	Peso molecular (g mol <sup>-1</sup> )	Punto de Fusión (°C)
Serie 1 Difurano - cumarinas - ciclo - pentanonas	B <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	312	268 - 269
	B <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314	286 - 289
	M <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328	299
	M <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330	293
Serie 2 Difurano - cumarinas - lactonas	G <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	328	244 - 246
	G <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330	237 - 240

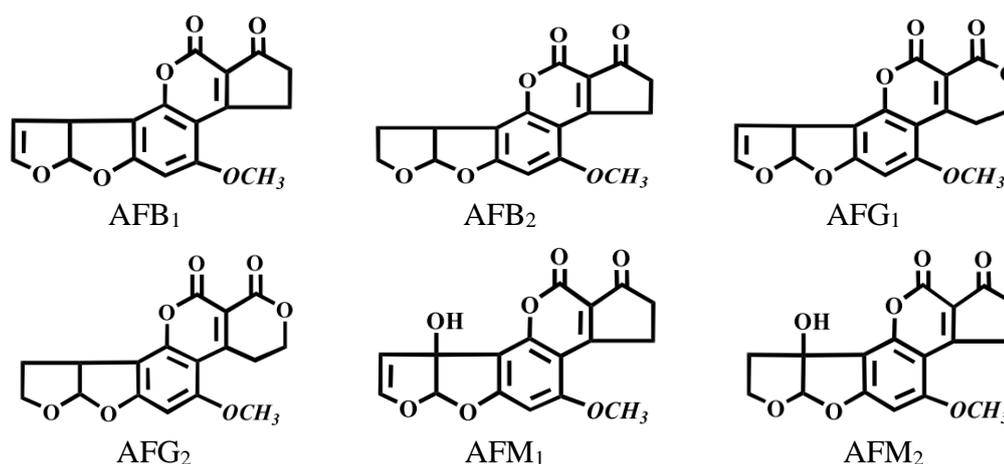


Figura 1.8. Estructura química de las principales aflatoxinas.

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>; AFM<sub>1</sub>: aflatoxina M<sub>1</sub>; AFM<sub>2</sub>: aflatoxina M<sub>2</sub>.

Se considera que *A. flavus* solo produce las del tipo B, pero existen reportes que indican que también puede producir las del tipo G (Okoth et al., 2018; Saldan et al., 2018;

Camiletti et al., 2017; Wicklow y Shotwell, 1983). Debido a su naturaleza química, poseen gran estabilidad térmica, con temperaturas de degradación entre 237 °C y 306 °C (Kabak, 2009), por lo que una vez presentes en los alimentos son difíciles de eliminar.

La importancia en los alimentos radica no solo en la cantidad, sino en el tipo de aflatoxina presente, ya que la AFB<sub>1</sub> es considerada la más importante debido a sus propiedades carcinogénicas, nefrotóxicas, inmunosupresoras y hepatotóxicas, produciendo principalmente, tumores en el hígado de humanos y animales (Paterson y Lima, 2010; Wang y Tang, 2004). En estos últimos se observa además, reducción en la ganancia de peso, efectos adversos en la reproducción, daño al sistema inmunológico y síntomas severos de intoxicación e incluso muerte cuando los niveles tóxicos son lo suficientemente altos (Valdivia et al., 2012). La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC, 2002) clasificó a las aflatoxinas en el grupo 1, como compuestos carcinógenos para humanos y a las tipo M<sub>1</sub> en el 2, como compuestos posiblemente carcinogénicos para humanos. Los efectos tóxicos de las aflatoxinas dependen de la dosis, duración de la ingesta, edad, especie, sexo y del estado nutricional de la persona o animal (Soriano del Castillo y Burdasapal, 2007).

*A. flavus* coloniza los productos agrícolas como el maíz y produce aflatoxinas tanto en el campo como en el transporte, almacenamiento y procesamiento del grano (Devreese et al., 2013; Bhat et al., 2010; Driehuis et al., 2008). La producción de aflatoxinas comienza poco después de la infección del hongo a las espigas, pudiendo alcanzar en dos días una concentración de 200 ng.g<sup>-1</sup> a temperatura ambiente, llegando a 2.000 ng.g<sup>-1</sup> luego de nueve días a temperatura entre 26 °C y 34 °C (Widstrom, 1992). El estrés hídrico, las altas temperaturas, los daños producidos en espigas por insectos de los géneros *Heliothis* sp. y *Spodoptera* sp., las fechas no adecuadas y las elevadas densidades de siembra y la alta incidencia de malezas, favorecen la entrada del patógeno y la posible producción de aflatoxinas (Kebede et al., 2012; Rodriguez del Bosque et al., 2010; Rodriguez del Bosque, 1996).

El límite máximo de aflatoxinas totales para la comercialización del maíz varía entre países, mientras la Unión Europea establece un límite de 4 ng.g<sup>-1</sup>, Argentina, Brasil y Estados Unidos permiten hasta 20 ng.g<sup>-1</sup> de aflatoxinas totales (CAA, 2019; Wu, 2015; ANVISA, 2011; FDA, 2011).

Otra micotoxina de efecto tóxico producida por *A. flavus* es el ácido ciclopiazónico (ACP) (Figura 1.9) (Perrone et al., 2014a; Abbas et al., 2011a; Vaamonde et al., 2003). Este metabolito es un ácido indol-tetrámico que posee punto de fusión entre 245 °C y 256 °C y debido a su estructura ácida puede quelar iones metálicos. Posee una  $\beta$ -dicetona y una  $\beta$ -hidroxi  $\alpha,\beta$ -cetona insaturada, con evidencia de ser este último grupo el responsable de su actividad quelante. La quelación de cationes como el calcio, magnesio y hierro pueden ser importantes mecanismos de toxicidad del ACP (Scott, 1992).

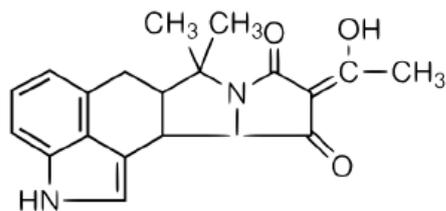


Figura 1.9. Estructura química del ácido ciclopiazónico (ACP).

Se asocia al ACP con daños hepáticos, renales y del sistema digestivo, con presencia de lesiones hemorrágicas en músculo y tracto gastrointestinal y con producción de convulsiones (Smith et al., 1992), por lo que tiene efectos en órganos como hígado, riñón, bazo, músculo esquelético, sistema nervioso, tracto gastrointestinal y sistema cardiovascular (Cullen et al., 1988; Lomax et al., 1984). En aves para producción de huevos se encuentra asociado a la pérdida de calidad de huevo, por su acción quelante de minerales en el proceso de formación de la cáscara (Devegowda y Murthy, 2005).

## **BIOCONTROL DE AFLATOXINAS - CARACTERIZACION MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Aspergillus flavus***

El control químico de *A. flavus* se dificulta tanto en precosecha como en el almacenamiento, al considerar los períodos de carencia de los fungicidas químicos, la generación de resistencia sobre el hongo y sus consecuencias sobre la salud humana y animal. Debido a ello, desde hace varios años las técnicas de control biológico, aplicables al control del desarrollo de este hongo, han tenido un avance notable, ya que suponen menor riesgo toxicológico para los humanos y el ambiente (Shakeel et al., 2018). Entre ellas, el principio de exclusión competitiva dado por la competencia entre aislamientos toxigénicos y atoxigénicos nativos, tuvo importantes resultados en diferentes cultivos como maíz, maní y pistacho (Accinelli et al., 2018; Hruska et al., 2014; Alaniz Zanon et

al., 2013; Rosada et al., 2013; Abdel-Hadi et al., 2011; Reddy et al., 2010; Atehnkeng et al., 2008; Barros et al., 2007; Pildain et al., 2005). Esta estrategia se sostiene en el hecho que los aislamientos no aflatoxigénicos compiten con los aflatoxigénicos nativos por los sitios de infección y nutrientes esenciales, desplazándolos y reduciendo de esta manera, la capacidad de producir aflatoxinas (Ul Hassan et al., 2021; Ren et al., 2020; Rangel Muñoz, 2019; Alaniz Zanon et al., 2018). En el caso de *A. flavus*, se determinó que algunos aislamientos de esta especie son incapaces de biosintetizar aflatoxina por lo que pueden ser utilizados como herramienta de biocontrol (Cotty et al., 2008).

Los estudios de estrategias de biocontrol a través de la exclusión competitiva deben ser de carácter local, para permitir desplazar los aislamientos toxigénicos a lo largo del ecosistema y así reducir las infecciones por parte de éstos (Cotty et al., 2008). Esto se debe a que la comunidad fúngica nativa de una zona puede diferir considerablemente respecto a otra población situada en otra área, en cuanto a su potencial toxigénico (Cotty, 1997) y además, como los aislamientos nativos se consideran mejor adaptados y con mejor habilidad competitiva, dan como resultado una mayor eficacia de control (Bandyopadhyay et al., 2016; Mehl y Cotty, 2010; Cotty et al., 2008). Prueba de ello existe en Estados Unidos, en donde se encuentran registrados en la Agencia de Protección Ambiental (EPA), dos aislamientos no aflatoxigénicos (Bandyopadhyay et al., 2016), *A. flavus* AF36, desarrollado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos y actualmente utilizado en cultivos de algodón, almendra, maíz, higo y pistacho (Donner et al., 2015; Doster et al., 2014; Mehl et al., 2012) y afla-guard®, producido y distribuido por Syngenta y utilizado en cultivos de maíz y maní (Dorner, 2004).

Los aislamientos de *A. flavus* no productores de aflatoxinas seleccionados como biocontroladores, además de ser nativos, deben estar adaptados al lugar y encontrarse genéticamente separados del resto de la población de aislamientos toxigénicos, por lo que es fundamental realizar caracterizaciones morfológicas y moleculares de los aislamientos nativos promisorios.

Los estudios necesarios para analizar la diversidad genética de la población fúngica nativa deben incluir la determinación de los grupos de compatibilidad vegetativa (VCG) (Grubisha y Cotty, 2015; Rodríguez Alvarado et al., 2013; Habibi y Banihashemi, 2008; Rodríguez Guerra et al., 2004), el conocimiento de la variabilidad de los aislamientos

teniendo en cuenta su producción de esclerocios (cantidad y tamaño) y la secuenciación de segmentos génicos, práctica mundialmente utilizada para identificar y caracterizar aislamientos de *A. flavus* (Krimitzas et al., 2013; Gallo et al., 2012; Peterson, 2008).

Desde la intensa sequía de la campaña agrícola 2008/09 se han recibido reportes provenientes de la Provincia de Santiago del Estero, norte de la Provincia de Córdoba y este de la Provincia de Tucumán, región englobada en los ocho distritos agroclimáticos previamente mencionados, informando de problemas con aflatoxinas en los granos de maíz cosechados. Esto adquiere relevancia debido al aporte que realiza la región a la producción nacional, a la gran proporción del cereal que es almacenado como estrategia comercial o para consumo animal en silos bolsas, con bajos controles del ambiente interno, y al crecimiento de proyectos zonales de molienda que incorporan valor agregado al maíz para lograr ventajas competitivas.

El problema de las aflatoxinas comienza en el lote de producción, en el campo, cuando *A. flavus* invade las espigas de maíz y posteriormente se cosechan los granos contaminados con el hongo y la micotoxina, incrementándose el problema cuando los mismos son almacenados (Folcher et al., 2010; Wu, 2007). Numerosos agentes predisponen al maíz a la contaminación con hongos, siendo la acción de los insectos uno de los factores principales, debido al daño que producen en el grano (Weaver et al., 2017; Bowen et al., 2014; Folcher et al., 2010). Debido a ello, una estrategia efectiva y actualmente utilizada en la región, es el empleo de maíces con eventos transgénicos (Bt), que al presentar menor daño por insectos tienen menor actividad fúngica y, consecuentemente, menor contenido de aflatoxinas en grano que los maíces no Bt, reduciendo de esta manera el riesgo de contaminación (Wu, 2007; Folcher et al., 2006; Bakan et al., 2002).

A partir del año 2016, muchos híbridos de maíz sembrados en la región experimentaron el quiebre de la resistencia frente al ataque por *Spodoptera frugiperda* (MRI-ASA, 2017), por consiguiente vieron incrementado su nivel de podredumbre de la espiga y su exposición a la infección por *A. flavus* y a la contaminación con aflatoxinas en el campo.

Entre las diferentes estrategias para reducir la contaminación de los granos de maíz con aflatoxinas, además de la mencionada previamente la cual se basa en el biocontrol por exclusión competitiva, probablemente la más adecuada es la orientada a la identificación de fuentes de resistencia a la infección por *A. flavus* (Amare y Keller, 2014; Martínez Padrón et al., 2013; Amaike y Keller, 2011; Cleveland et al., 2009; Georgianna y Payne, 2009; Brooks et al., 2005; Busboom y White, 2004). Para ello, es fundamental el estudio de las diferentes líneas progenitoras e híbridos actuales y los que constantemente se incorporen al mercado, junto con la caracterización de la población del patógeno.

## **HIPÓTESIS**

Las poblaciones de *Aspergillus flavus*, causantes de podredumbre de la espiga, presentan variabilidad genética relacionada a su variación fenotípica.

Híbridos de maíz con diferente base genética presentan comportamiento diferencial frente a la infección con *Aspergillus flavus*.

## **OBJETIVOS GENERALES**

Caracterizar poblaciones de *Aspergillus flavus* que infectan maíz de los distritos agroclimáticos de Santiago del Estero y regiones colindantes.

Evaluar el comportamiento de híbridos de maíz frente a la infección con *A. flavus*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Muestreo y aislamiento de *Aspergillus flavus* a partir de espigas de maíz de plantas en madurez fisiológica, en lotes comerciales y para autoconsumo, de 8 distritos agroclimáticos.
2. Determinar la capacidad toxigénica de los aislamientos obtenidos.
3. Caracterizar los aislamientos a través de la producción de esclerocios.
4. Caracterizar los aislamientos no aflatoxigénicos mediante el análisis de grupos de compatibilidad vegetativa (GCV).
5. Establecer relaciones filogenéticas en los aislamientos no aflatoxigénicos, empleando para ello la secuenciación de segmento del gen *CaM*.

6. Evaluar tecnologías Bt empleadas en la Provincia de Santiago del Estero frente a la infección natural por *Aspergillus flavus*.
7. Evaluar el comportamiento de híbridos de maíz cultivados comercialmente en la Provincia de Santiago del Estero y región colindante frente a la inoculación con aislamientos aflatoxigénicos de *Aspergillus flavus*.

## CAPÍTULO 2

### **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE *Aspergillus flavus* A PARTIR DE ESPIGAS DE MAÍZ**

#### **INTRODUCCIÓN**

Argentina se encuentra entre los líderes mundiales en producción de maíz con alrededor de 60 millones de toneladas producidas en la campaña agrícola 2020/21 (MAGyP, 2021). A lo largo de su historia el país se caracterizó por ser un fuerte proveedor de granos al mundo, proceso que se intensificó en las últimas dos décadas debido a la apertura al mundo globalizado con acceso a nuevos mercados. El incremento de la población mundial y su demanda de alimentos y el cambio en los hábitos alimenticios brindan al país posibilidades de crecimiento económico importantes.

La adopción de tecnologías como siembra directa, uso de fertilizantes, tratamiento de semillas con insecticidas y fungicidas y herramientas genéticas y biotecnológicas permiten mejorar la “performance” de los híbridos de maíz. Además, esto posibilitó la expansión del cultivo hacia zonas agroecológicas más vulnerables incrementando la productividad y crecimiento económico del sector rural y comunidades relacionadas al mismo (Viglizzo, 2010). Estas regiones, integradas por las provincias de Santiago del Estero, norte de Córdoba y este de Tucumán, no dejan de ser ecosistemas frágiles e inestables caracterizados por frecuentes período de estrés hídrico, térmico o una combinación de ambos, sumado a suelos poco fértiles y con baja estructura (Cardini et al., 2018; Ginzo, 2015).

La región estudiada se encuentra entre los 26° y 30° de latitud Sur, con temperaturas medias anuales entre 18 °C y 22 °C y precipitaciones anuales entre 600 mm y 1200 mm. Pertenece a la región “Parque Chaqueño”, con un área crítica en la zona central de la Provincia de Santiago del Estero, donde se establece un centro de confluencia climática que acentúa la variabilidad de todos los elementos del clima (MAGyP - Agroindustria, 2020). Debido a que el maíz cumple un rol socio económico importante, en la región coexisten lotes comerciales de gran superficie y lotes de maíz de base genética amplia o no mejorados genéticamente, destinados al autoconsumo. El desarrollo del cultivo

en estos agroecosistemas, en donde a través del desmonte se suprimió el estrato arbóreo y se lo reemplazó por cultivos agrícolas, explora un ambiente con fertilidad variable y estreses hídricos y térmicos que debilitan la planta y la predisponen a diferentes patógenos (De Rossi et al., 2017; Presello et al., 2016).

La temperatura ambiental puede alcanzar los 48 °C durante el período reproductivo del maíz y si bien las precipitaciones se concentran en la época estival, muchas veces son torrenciales y, sumado a la elevada demanda evaporativa, no alcanzan a suplir las necesidades del cultivo (MAGyP - Agroindustria, 2020), por lo que se generan estreses propicios para la infección del maíz con especies del género *Aspergillus*, uno de los responsables de la podredumbre de la espiga (Mahmoud et al., 2013; Presello et al., 2004; Etcheverry et al., 1999). Estas, además de deteriorar la calidad de los granos y producir mermas de rendimiento, los contaminan con micotoxinas, tales como aflatoxinas, tanto en la precosecha como en la poscosecha del cultivo (Martínez et al., 2010).

Una de las principales barreras que afectan la comercialización de granos de maíz es la presencia de micotoxinas (Bhatnagar Mathur et al., 2015; Wu, 2015), variando el límite máximo de aflatoxinas totales permitido entre países. En la actualidad estos valores son cuestionados, sugiriéndose disminuirlos debido a la elevada toxicidad y daño en la salud humana y animal (Londoño Cifuentes y Martínez Miranda, 2017; Wu et al., 2013). Si bien existen pocos registros de problemas de granos contaminados con aflatoxinas en la región objeto de estudio, se conoce la problemática (reunión efectuada entre MINCyT, IPAVE-CIAP-INTA, ARCOR SAIC y CEPROCOR, 2012) y existen registros de ello en zonas aledañas (Alaniz Zanon et al., 2018; Camiletti et al., 2018; Nesci et al., 2006; Nesci y Etcheverry, 2002).

*Aspergillus flavus* incrementa su incidencia y la síntesis de aflatoxinas en espigas de maíz (Bhatnagar Mathur et al., 2015) causando la contaminación de los granos (Mauro et al., 2015; Perrone et al., 2014a; Pitt y Hocking, 2009; Cotty et al., 2008; Giorni, 2007) frente a variaciones anuales de temperatura y precipitaciones que provocan períodos de sequía. El estado de floración del maíz es el más vulnerable al ingreso de estos patógenos, caracterizándose *Aspergillus* sección *Flavi* por contaminar la espiga en dos fases, la primera durante la floración, ingresando a través del canal estilar y siendo favorecida por altas temperaturas y períodos de sequía, y la segunda fase que ocurre posterior a la

maduración del cultivo y es ayudada por altas temperaturas junto con alta humedad ambiental (Cotty et al., 2008). En la región, este período coincide con los meses de febrero - marzo (verano en el hemisferio sur) y julio – agosto respectivamente, dependiendo de las fechas de siembra y genotipos empleados.

La producción de aflatoxinas en *A. flavus* es variable, encontrándose aislamientos que producen grandes cantidades de estas sustancias, “aislamientos aflatoxigénicos” y otros que resultan no productores, “aislamientos no aflatoxigénicos”. Independientemente de las aflatoxinas, los aislamientos pueden o no sintetizar ACP (Mauro et al., 2013). El conocimiento de la frecuencia de aislamientos productores y no productores de aflatoxinas y de ACP, y la cuantificación de la cantidad de micotoxinas que pueden producir, son de suma importancia debido a que una baja frecuencia de aislamientos altamente productores de micotoxinas puede ser más importante en la contaminación con aflatoxinas que una alta frecuencia de aislamientos con baja producción de micotoxinas (Cotty et al., 2008). La profundización de estos estudios en una determinada región permite determinar la potencialidad y el riesgo de contaminación con micotoxinas de los granos producidos, su posterior uso como alimento para el ganado de faena y de producción de leche y las consecuentes penalidades y restricciones en la exportación de granos contaminados a mercados internacionales.

Las diferentes especies del género *Aspergillus* producen estructuras de resistencia denominadas esclerocios, consistentes en masas de hifas oscuras y firmes (Klich, 2007) que les confieren diferentes características fenotípicas (Abbas et al., 2005) permitiendo su clasificación en dos morfotipos: aislamientos S que producen numerosos esclerocios de diámetro menor a 400  $\mu\text{m}$  y asociados a altos niveles de aflatoxinas y aislamientos L que producen menor cantidad de esclerocios de diámetro mayor a 400  $\mu\text{m}$  y relacionados a niveles variables de aflatoxinas (Singh y Cotty, 2019; Probst et al., 2014, 2010; Alaniz Zanon et al., 2013; Mehl et al., 2012; Diedhiou et al., 2011; Jaime García y Cotty, 2010; Cotty, 1989). Por ejemplo, existen genotipos de morfotipo L que no producen aflatoxinas, es decir, son atoxigénicos, debido a deleciones, inversiones o defectos en uno o más de los genes responsables en la biosíntesis de las aflatoxinas (Adhikari et al., 2016). Un tercer tipo de morfotipo, el cual no produce esclerocios en condiciones de laboratorio fue identificado en las regiones maiceras I y IV de Argentina y en Italia (Giorni, 2007; Barros

et al., 2006; Pildain et al., 2004; Novas y Cabral, 2002). En general, los aislamientos con morfotipo S se hallan asociados a la habilidad de producir aflatoxinas, mientras que los morfotipo L se asocian a aislamientos no aflatoxigénicos.

El empleo de aislamientos atoxigénicos como herramienta de biocontrol de aflatoxinas, a través de la exclusión competitiva, es una práctica agronómica mundialmente adoptada en diferentes cultivos comerciales (Bandyopadhyay et al., 2016; Doster et al., 2014; Mehl et al., 2012). Para que sea exitosa y permita lograr un manejo efectivo de la contaminación con aflatoxinas, es necesario conocer la variabilidad genética y la estructura de las poblaciones nativas de *A. flavus* presentes en la región (Horn et al., 1996; Bayman y Cotty, 1993). En esta estrategia, que involucra aislamientos atoxigénicos para desplazar a los toxigénicos, adquiere suma importancia el estudio de las recombinaciones, con el consecuente intercambio genético entre los aislamientos (Geiser et al., 1998).

Una de las fuentes de variación genética en *A. flavus*, es la producida por las recombinaciones en el ciclo parasexual (Papa, 1973). En éste, las hifas de dos aislamientos diferentes se anastomosan y sus núcleos se fusionan, originando un micelio heterocarionte. Estos dos núcleos diferentes originan uno diploide, luego se produce un entrecruzamiento o intercambio de material genético durante la mitosis y por último se haploidiza por medio de aneuploidía (pérdida gradual de cromosomas hasta la restauración del haploide recombinante) (Alexopoulos et al., 1996; Hocart et al., 1993; Sinisterra et al., 1993). La formación y viabilidad del heterocarionte está regulada por sistemas genéticos alélicos y no alélicos. Debido a que *A. flavus* posee 8 locus *het* con múltiples alelos, dispuestos en cinco grupos de ligamiento, que regulan la compatibilidad vegetativa y por lo tanto la formación del heterocarionte, cuando dos aislamientos poseen idéntico set de locus *het*, éstos formarán un heterocarionte estable. Mientras que aquellos que difieran en alguno de esos locus serán incapaces de formar el heterocarionte (Leslie y Summerell, 2006; Glass et al., 2000; Leslie, 1993; Glass y Kulda, 1992). Los aislamientos que forman un heterocarionte estable se denominan “vegetativamente compatibles” (Vaillancourt y Hanau, 1994).

El hecho de que las hifas de dos aislamientos diferentes puedan anastomosarse y fusionarse formando un heterocarionte estable reviste gran importancia en las estrategias de exclusión competitiva, en las que se debe evitar el intercambio de material genético (Barros et al., 2007). El estudio de la compatibilidad vegetativa entre hongos a través de la

heterocariosis es muy utilizado para subdividir las poblaciones entre diferentes grupos de compatibilidad vegetativa (GCV). De esta manera, se puede determinar si los aislamientos de un lugar en particular son clones de un progenitor común, los cuales comparten determinadas características fenotípicas y de patogenicidad, como la habilidad para producir aflatoxinas, o el número de grupos genéticamente diferentes que componen la población fúngica (Grubisha y Cotty, 2015; Jaime Garcia y Cotty, 2006; Pildain et al., 2004; Leslie, 1993; Puhalla, 1985).

La técnica de laboratorio mediante la cual se determina la compatibilidad vegetativa se basa en la observación directa de la formación o no del heterocarionte con intercambio genético en la zona de intersección de sus hifas y sus características en pruebas de complementación. Los aislamientos vegetativamente compatibles con otros se describen como pertenecientes al mismo GCV (Leslie y Summerell, 2006; Vaillancourt y Hanau, 1994).

Debido a que las poblaciones de *A. flavus* presentes en un determinado agroecosistema están compuestas por numerosos GCV, cuyas frecuencias relativas varían respecto a los cultivos, regiones y campañas (Atehnkeng et al., 2016; Mehl et al., 2012), conocer su diversidad genética mediante el análisis de GCV (Grubisha y Cotty, 2015; Rodríguez Alvarado et al., 2013; Habibi y Banihashemi, 2008; Rodríguez Guerra et al., 2004) facilita la identificación de potenciales aislamientos utilizables en el desarrollo de estrategias de biocontrol (Alaniz Zanon et al., 2016; Bandyopadhyay et al., 2016; Mauro et al., 2015; Zhou et al., 2015; Tran Dinh et al., 2014).

El aislamiento y la correcta identificación de *A. flavus* es fundamental para abordar estudios de caracterización de aislamientos que puedan ser utilizados en estrategias de biocontrol. La identificación basada solo en características morfológicas presenta una moderada sensibilidad y especificidad, pudiendo variar dentro de una misma especie (Geiser et al., 2007), además, requiere entrenamiento y conocimientos para diferenciar morfológicamente las distintas especies del género *Aspergillus* (Gherbawy y Voigt, 2010). Debido a esto, el uso de caracteres moleculares tiene un papel importante en el reconocimiento de taxones fúngicos, ya que la identificación basada en características propias del ADN fúngico resultan confiables y necesarias para completar los estudios de identificación morfológica (Iheanacho et al., 2014; Geiser et al., 2007). Actualmente,

mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para determinados marcadores, se pueden identificar diferentes especies del género *Aspergillus* (Okoth et al., 2018; Samson et al., 2014; Devi Prameela et al., 2013; González Salgado et al., 2011).

Los marcadores moleculares son fragmentos de ADN que pueden corresponder o no a un rasgo genético que se expresa (gen), ARN o proteínas, como lo son las regiones no codificantes del rDNA o regiones ITS (Espaciador Interno Transcrito), genes codificantes como los de EF-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulina, calmodulina, RNA polimerasa II subunidad (RPB2) y policétido sintasas (Frisvad et al., 2019; Okoth et al., 2018; Samson et al., 2014; Susca et al., 2007; Dao et al., 2005; Perrone et al., 2004; Montes et al., 2003; Carbone y Kohn, 1999; Glass y Donaldson, 1995).

En particular, los genes de la calmodulina (*CaM*) constituyen un carácter molecular ampliamente utilizado para establecer relaciones filogenéticas debido a que la base de datos de secuencias de *CaM* está casi completa para las especies aceptadas (Frisvad et al., 2019; Houbraken et al., 2014; Samson et al., 2014; Peterson, 2008). Es un polipéptido altamente conservado que se encuentra presente en células eucariotas, tanto en invertebrados como en plantas, humanos y hongos. El gen de la calmodulina codifica para receptores citoplasmáticos de Ca<sup>2+</sup> que están presentes en células no musculares, permitiéndole al Ca<sup>2+</sup> mediar respuestas celulares y mantener los niveles de homeostasis en tejidos no musculares (Sorensen et al., 2013; Zhang et al., 2012; Pang et al., 2010; Yasui et al., 1995). En el género *Aspergillus*, es importante en la fosforilación y desfosforilación de proteínas involucradas en la biosíntesis de aflatoxinas (Juvvadi y Chivukula, 2006; Jayashree et al., 2000). Las proteínas presentan propiedades diferentes cuando están fosforiladas y cuando no lo están, por lo que la adición del grupo fosfato a una proteína (fosforilación) o la sustracción del mismo (desfosforilación), provoca en ella un fenómeno de transconformación con consecuencia en el cambio de sus propiedades biológicas y, por lo tanto, una modificación en las características de los procesos en los cuales participan (Hernández Fernández, 2012). Los hongos poseen una única copia del gen para la calmodulina compuesto de 5 intrones y 5 exones que se traduce en 149 aminoácidos y debido a su fácil amplificación y a que presenta regiones conservadas, relacionadas a los sitios de unión del Ca<sup>2+</sup> y a la vez mutaciones puntuales en las regiones no codificantes, es muy utilizado como indicador evolutivo (Visagie et al., 2014; Serra y Peterson, 2007).

Para inferir las relaciones filogenéticas entre organismos se utilizan varios métodos, los cuales permitirán construir el árbol filogenético correspondiente. Estos árboles son diagramas que ilustran el patrón de divergencia entre los individuos analizados, están conformados por nodos que soportan las ramas, las que conectan a los individuos de un determinado taxón. Se considera que las longitudes de las ramas son proporcionales a la cantidad de divergencia genética entre los taxones (Allendorf et al., 2010).

Dentro de los métodos de reconstrucción de los árboles filogenéticos, los de Vecinos más Cercanos (Neighbor-Joining - NJ) (Saitou y Nei, 1987) y Máxima Verosimilitud (Maximum-Likelihood - ML) (Tamura y Nei, 1993) están entre los más difundidos. En el primero, se genera una matriz de distancias por parejas de secuencias a partir del alineamiento múltiple, es decir, se unen las dos secuencias que tengan la menor distancia genética y este par inicial es considerado una sola entidad, posteriormente, se busca el siguiente terminal que tenga la menor distancia genética con este, es decir, se busca la secuencia más parecida. El procedimiento continúa hasta unir todos los terminales al “árbol filogenético”. La distancia genética entre dos terminales es calculada en base al número total de sustituciones de bases nitrogenadas, o sea, el número de bases nitrogenadas que son diferentes en estas dos secuencias. En este método toda la información de similitudes y diferencias entre dos secuencias queda resumida por un simple número (matriz de distancia) a partir de la cual se reconstruye el árbol filogenético (Peña, 2011; Saitou y Nei, 1987). El método de Máxima Verosimilitud (ML) se basa en el análisis de los caracteres que forman las secuencias y no en las distancias entre pares de éstas. Emplea modelos probabilísticos para seleccionar el mejor árbol y para ello calcula la probabilidad de que nuestros datos hayan sido generados por los distintos árboles posibles y vuelve el árbol que presenta una máxima probabilidad, es decir, al árbol que es más probable que haya generado los datos que hemos observado (árbol máximo verosímil) (Felsenstein, 2004).

El objetivo de este capítulo fue obtener y caracterizar aislamientos de *A. flavus* a partir de espigas de maíz de plantas en madurez fisiológica en la región delimitada para el estudio, a fin de conocer la diversidad de esa población. Para ello los objetivos específicos fueron: coleccionar aislamientos en los distintos distritos, en dos campañas diferentes, en lotes comerciales y lotes para autoconsumo a fin de determinar la mayor variabilidad posible y

estudiar la diversidad de los mismos en cuanto a su capacidad para producir aflatoxinas y ACP, morfotipos de esclerocios, número y distribución de los GCV y relaciones filogenéticas de secuencias de un segmento del gen *CaM* de aislamientos no aflatoxigénicos.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## MUESTREO

Los muestreos se realizaron en dos campañas agrícolas. En la campaña 2015/16 se evaluó una localidad representativa de cinco distritos agroclimáticos comprendidos en la Provincia de Santiago del Estero: Sachayoj (Distrito 4 - Río Muerto), Quimilí (Distrito 5 - Hickmann), Bandera (Distrito 17 - Bandera), Sumampa (Distrito 37 - Soto) y Santiago del Estero (Distrito 18 - Monteagudo). Un sexto distrito no se consideró ya que corresponde a la región de salinas que posee la provincia. Para ampliar el estudio hacia situaciones climáticas contrastantes pero colindantes con la Provincia de Santiago del Estero (Figuras 2.1 y 2.2), en la campaña agrícola 2016/17 se incorporaron las localidades de Villa Tulumba (Distrito 61B - Deán Funes) y Rayo Cortado (Distrito 37C - Soto) ubicadas en la Provincia de Córdoba y Santa Rosa de Leales (Distrito 18A - Monteagudo) situada en la Provincia de Tucumán. De esta manera el estudio comprendió una región de ocho distritos agroclimáticos en donde se analizaron muestras de maíz de cada una de las ocho localidades representativas.

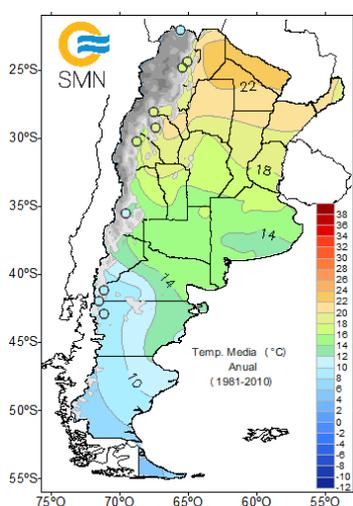


Figura 2.1. Isotermas de temperaturas medias de Argentina. Serie 1981 – 2010 (SMN, 2020).

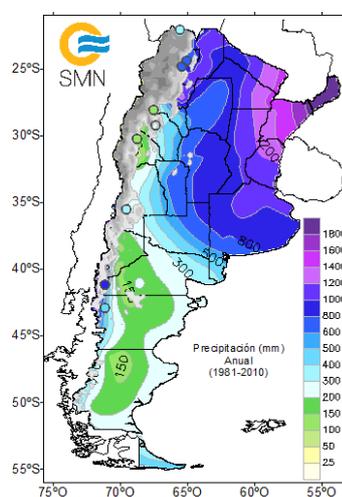


Figura 2.2. Isohietas de precipitaciones medias de Argentina. Serie 1981 – 2010 (SMN, 2020).

En cada una de ellas se analizaron 3 situaciones de cultivo de maíz: variedad nativa de base genética amplia, cultivada en chacras y con destino al autoconsumo, denominada “maíz de chacra” y 2 híbridos utilizados en la región, sembrados en lotes comerciales. En

Sumampa se evaluó solo un cultivar para autoconsumo debido a que es el principal sistema de cultivo de maíz en este distrito agroclimático.

Para cada una de las localidades y campañas agrícolas se tomaron 10 espigas colectadas al azar a lo largo de una diagonal del lote, en madurez fisiológica y previo a la cosecha. Las espigas de cada muestra se trillaron formando una muestra compuesta, se secaron en estufa a 38 °C durante 72 horas para lograr humedad final menor a 12 %, minimizando la posibilidad de desarrollo de hongos, y se conservaron a 4 °C hasta su utilización (De Oliveira Rocha et al., 2012; Sepúlveda y Piontelli, 2005).

### **AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE *Aspergillus flavus***

El aislamiento de la micobiota general se realizó mediante el método de siembra directa de los granos con desinfección superficial. Se tomaron 100 granos de cada muestra (compuesta de 10 espigas) conservada a 4 °C y se les realizó desinfección superficial con hipoclorito de sodio al 1 % y posteriormente 3 lavados con agua estéril.

Para evaluar el medio de cultivo, a modo de prueba se utilizaron algunas muestras. Para ello, se sembraron inicialmente 100 granos de cada muestra distribuidos homogéneamente en 10 cajas de Petri, conteniendo 10 granos cada una. El medio evaluado fue *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* agar (AFPA) (10 g Peptona, 20 g Extracto de levadura, 0,5 g Citrato de amonio férrico ( $C_6H_{11}FeNO_7$ ), 100 mg Cloranfenicol, 2 mg Diclorán, 15 g Agar, 1000 mL Agua destilada c.s.p., pH=6,2). Luego de la siembra, las placas se incubaron en oscuridad a 30 °C durante 42 a 48 horas con la finalidad de observar reverso anaranjado, indicativo de *A. flavus* y de *A. parasiticus*.

Para evaluar diferencias entre los medios Diclorán Rosa de Bengala Cloranfenicol agar (DRBC) y Diclorán glicerol 18% agar (DG18) se siguió la misma metodología que para el medio AFPA. Para ello, granos de las muestras obtenidas fueron desinfectados superficialmente y 10 submuestras de 10 granos cada una se sembraron, por duplicado, en los medios DRBC (10 g Glucosa, 5 g Peptona, 1 g  $PO_4H_2K$ , 0,5 g  $SO_4Mg.7H_2O$ , 25 mg Rosa de Bengala, 2 mg Diclorán, 100 mg Cloranfenicol, 15 g Agar, 1000 mL Agua destilada c.s.p., pH=5,5) y DG18 (10 g Glucosa, 5 g Peptona, 1 g  $PO_4H_2K$ , 0,5 g  $SO_4Mg.7H_2O$ , 220 g Glicerol, 2 mg Diclorán, 15 g Agar, 1000 mL Agua destilada c.s.p.,

pH=5,5) (Figura 2.3) y se incubaron en estufa durante 7 días a 25 °C, para evaluar diferencias entre medios.



Figura 2.3. Granos de maíz de muestras de espigas colectadas a campo, sembrados en medio de cultivo diclorán rosa de bengala cloranfenicol (DRBC) luego de la desinfección superficial incubados 7 días a 25°C.

El resto de los granos de cada muestra se cultivaron solo en medio DG18. Los hongos que crecieron sobre los granos cultivados en este medio y que presentaban características morfológicas similares a las de *A. flavus* (Figura 2.4) fueron transferidos al medio Extracto de Malta agar (MEA) (20 g Extracto de Malta, 1 g Peptona, 20 g Glucosa, 20 g Agar, 1000 mL Agua destilada c.s.p., pH=5,6), permaneciendo en estufa durante 7 días a 25 °C (Pitt y Hocking, 2009).

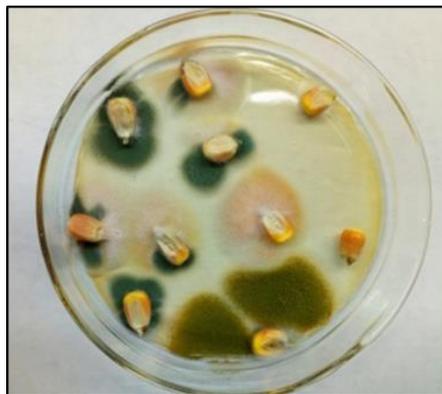


Figura 2.4. Crecimiento de diferentes hongos sobre granos de maíz de espigas colectadas a campo en medio de cultivo diclorán glicerol 18% (DG18) incubados 7 días a 25°C.

Las características macroscópicas observadas en el medio MEA fueron: color y diámetro de las colonias, color del reverso, presencia de exudados y producción de esclerocios. Las características microscópicas analizadas fueron: presencia de fiálides y/o métulas en el conidióforo, longitud y rugosidad del estipe y por último diámetro y forma de

los conidios (Klich, 2002). Posteriormente, se determinó la especie morfológica mediante clave taxonómica para la identificación de especies del género *Aspergillus* (Klich 2002) y los aislamientos con características compatibles con *A. flavus* se almacenaron siguiendo 3 métodos de conservación: a) agua destilada estéril con 0,01 % de Tween 20 y almacenadas a 4 °C, b) glicerol con 0,01 % de Tween 20 y almacenadas a -80 °C y c) crecimiento de micelio en tubos de hemodiálisis en medio MEA, cubierto con glicerol y almacenadas a 4 °C (Pitt y Hocking, 2009). Cada aislamiento se rotuló como natural (Wild type – WT).

Para la obtención de los aislamientos monospóricos (M) se realizaron diluciones seriadas a partir de esporas de cada aislamiento natural (WT) conservada en agua destilada estéril con 0,01 % de Tween 20 y almacenada a 4 °C. La concentración más diluida se sembró en medio Agar – Agua 2 % (AA) (15 g Agar, 1000 mL Agua destilada c.s.p., pH=7,0) y se incubó en estufa a 27 °C durante 18 horas (Pitt y Hocking, 2009). Transcurrido dicho período, se identificaron los conidios germinados bajo lupa estereoscópica Nikon SMZ-10 (15X), se tomaron dos de ellos por caja de Petri, se transfirieron a cajas con medio MEA y se incubaron durante 7 días a 25 °C. Los cultivos monospóricos (M) obtenidos se conservaron siguiendo los tres métodos enumerados precedentemente.

## **IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Aspergillus flavus***

Los aislamientos monospóricos obtenidos se cultivaron en MEA durante 7 días a 25 °C, luego de lo cual, se tomó una alícuota de micelio y se le extrajo el ADN siguiendo el método rápido de cuatro pasos propuesto por Liu *et al.* (2000). Para ello se colocó 500 µL de tampón lisis (400 mM Tris-HCl [pH 8.0], 60 mM EDTA [pH 8.0], 150 mM NaCl, 1 % Dodecilsulfato sódico), en tubos de 1,5 mL, se añadió un pequeño trozo de micelio utilizando un palillo estéril con el cual se rompió el micelio y luego se dejó el tubo a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente se adicionaron 150 µl de tampón acetato de potasio (pH 4,8; 60 mL de acetato de potasio 5 M; 11,5 mL de ácido acético glacial y 28,5 mL de agua destilada), el tubo se agitó brevemente y se centrifugó a 10.000 revoluciones durante 1 min. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo de 1,5 mL y se volvió a centrifugar como se describe anteriormente, luego se transfirió el sobrenadante a

un nuevo tubo de 1,5 mL, se agregó igual volumen de alcohol isopropílico y se mezcló brevemente por inversión del tubo. Se centrifugó el tubo a 10.000 revoluciones durante 2 min. y se descartó el sobrenadante. El sedimento de ADN resultante se lavó en 300  $\mu$ L de etanol al 70 % y se centrifugó a 10.000 revoluciones durante 1 min, descartándose luego el sobrenadante. El sedimento de ADN se secó al aire y se disolvió en 50  $\mu$ L de 1X Tris-EDTA.

Como control positivo se empleó el aislamiento *A. flavus* CCC 101-92 < NRRL 3251 provisto por el Centro de Referencia de Micología de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (Universidad Nacional de Rosario) y como control negativo el aislamiento *A. parasiticus* NRRL 2999 provisto por el Dr. Ricardo Comerio (EEA INTA Anguil, La Pampa, Argentina).

La totalidad de los aislamientos fueron analizados con los juegos de iniciadores *Asp f1* 5'-CCCGTGAAGTTGCCAGGT-3'; *Asp r2* 5'-GTCGTTTGGTGAGTGGGAA-3' (Devi Prameela et al., 2013) y *FLA1* 5'-GTAGGGTTCCTAGCGAGCC-3'; *FLA2* 5'-GGAAAAGATTGATTTGCGTTC-3' (González Salgado et al., 2011). Para cada reacción individual se mezcló 1  $\mu$ L (concentración final 20 – 100 ng de ADN, $\mu$ L<sup>-1</sup>, cuantificado en Nano Drop, Thermo Fisher Scientific, USA) de solución de ADN con 24  $\mu$ L de una solución compuesta por 5  $\mu$ L de solución tampón de reacción 5x Green GoTaq<sup>®</sup> (Promega<sup>®</sup>, Madison, WI, USA), 0,5  $\mu$ L de mezcla de dNTP (10 mM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1  $\mu$ L de los cebadores *Asp f1* y *Asp r2* (2,5  $\mu$ M) o *FLA1* y *FLA2* (20  $\mu$ M), 1  $\mu$ L de enzima polimerasa GoTaq<sup>®</sup> (5U, $\mu$ L<sup>-1</sup>, Promega<sup>®</sup>, Madison, WI, USA) y 16,5  $\mu$ L de agua DEPC. La reacción de PCR fue llevada a cabo en un termociclador, con las siguientes condiciones: a) un ciclo a 94 °C por 4 minutos; 40 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 62 °C por 1 minuto y 72 °C por 1,5 minutos; y una extensión final a 72 °C durante 11 minutos según Devi Prameela *et al.* (2013) y b) un ciclo a 95 °C por 5 minutos; 26 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos y 72 °C por 45 segundos; y una extensión final a 72 °C por 5 minutos según González Salgado *et al.* (2011).

Los productos de PCR fueron revelados por electroforesis en gel de agarosa 1,5 % en solución tampón TAE (1x) (4,84 g. Tris, 1,14 mL. ácido acético glacial, 2 mL. EDTA 500 mM (pH=8,0), 1000 mL. agua destilada c.s.p.), visualizados en transiluminador UV, previa tinción en solución de GelRed<sup>™</sup> Biotium (2,5 ng, $\mu$ L<sup>-1</sup>) y corroborados por

amplificación de la banda de 490 pb para los cebadores de Devi Prameela *et al.* (2013) y de 500 pb para los de González Salgado *et al.* (2011). El tamaño molecular de los mismos fue estimado utilizando el marcador “qLadder 100 pb precisión” (PB-L<sup>®</sup>, BsAs, Argentina).

## **CAPACIDAD TOXIGÉNICA**

Los aislamientos monospóricos de *A. flavus* fueron evaluados por su capacidad para producir aflatoxinas, en medio de cultivo, a través de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Los mismos fueron sembrados por duplicado en medio MEA durante 7 días a  $28 \pm 2$  °C, y posteriormente, se cosechó el micelio para realizar una suspensión de esporas en agua destilada estéril con 0,01 % de Tween 20, las cuales fueron contabilizadas y ajustadas a  $1 \times 10^5$  conidios.mL<sup>-1</sup>, utilizando un hematocitómetro (cámara de Neubauer). Las suspensiones obtenidas para cada aislamiento monospórico fueron almacenadas a 4 °C (De Rodríguez *et al.*, 2011; Borman *et al.*, 2006). Para el experimento se utilizaron viales de vidrio de 4 mL conteniendo 1 mL de medio para producción de aflatoxinas y ácido ciclopiazónico (150 g Sacarosa, 10 g Peptona de soja, 40 g Glucosa, 20 g Extracto de levadura, 1000 mL Agua destilada c.s.p.) y sellados con tapón. El medio se inoculó por duplicado, con 4 mL de cada suspensión de esporas almacenadas de los diferentes aislamientos y se incubaron durante 7 días a  $28 \pm 2$  °C en oscuridad. Posteriormente, se retiró y descartó el micelio y se transfirió el medio de cultivo a un tubo de 1,5 mL al cual se adicionó 1 mL de cloroformo. Se agitó durante 30 segundos y se recuperó la fase clorofórmica, se filtró con filtros Titan de Nylon de 0,45 µm y se evaporó hasta sequedad.

Cada muestra del primer grupo de extractos secos fue resuspendida, para la determinación de aflatoxinas, en 200 µL de fase móvil acetonitrilo: metanol: H<sub>2</sub>O (17:17:66, V/V/V), posteriormente se adicionó 700 µL de derivatizante ácido trifluoroacético: ácido acético glacial: H<sub>2</sub>O (20:10:70, V/V/V), se agitó y sumergió en baño térmico a 65 °C durante 8 ½ minutos. Luego, se enfriaron a temperatura ambiente y 50 µl de extracto se inyectaron manualmente en el sistema HPLC, el cual consistió en una bomba Hewlett Packard modelo 1100 (Hewlett Packard, Palo Alto, CA) conectada a un detector de fluorescencia Hewlett Packard modelo 1046<sup>a</sup> y un módulo de datos Hewlett Packard Kayak XA (HP ChemStation Rev.A.06.01). Las separaciones cromatográficas se realizaron en columna C18 de fase reversa, de acero inoxidable (150 m x 4,6 mm i.d., 5 µm

tamaño de partícula; Luna-Phenomenex, Torrance, CA, USA) conectada a una pre-columna C18, de acero inoxidable (20 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm tamaño de partícula, Luna-Phenomenex, Torrance, CA, USA). Se utilizó la fase móvil acetonitrilo: metanol: H<sub>2</sub>O (17:17:66, V/V/V) a una velocidad de flujo de 1,5 mL.min<sup>-1</sup>. Se realizó el análisis cuantitativo mediante normalización del área de los picos y se elaboró una curva de calibración a partir de las áreas obtenidas para diferentes concentraciones de estándares (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Trucksess y Stack, 1994). El límite de detección de AFB<sub>1</sub> fue de 1 ng.g<sup>-1</sup> y cuando no se detectaron aflatoxinas mediante esta técnica, el aislamiento se clasificó como no aflatoxigénicos (Doster et al., 2014).

Para la determinación del ácido ciclopiazónico se resuspendió el segundo extracto seco obtenido de cada aislamiento estudiado en 500 µL de fase móvil acetonitrilo: solución tampón de ZnSO<sub>4</sub> 4mM (65:35, V/V), se agitó y se incorporó al mismo equipo descrito para la determinación de aflatoxinas. Las separaciones cromatográficas se realizaron en columna Agilent ZORBAX RX-SIL (250 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm tamaño de partícula) conectada a una pre-columna Security Guard (20 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm tamaño de partícula, Phenomenex). La fase móvil se utilizó a una velocidad de flujo de 0,8 mL.min<sup>-1</sup>. Se realizó el análisis cuantitativo mediante normalización del área de los picos y se elaboró una curva de calibración a partir de las áreas obtenidas para diferentes concentraciones de estándares de ACP (Sigma Aldrich, USA). El límite de detección de ACP fue de 1 ng.g<sup>-1</sup> y se consideraron como positivas las muestras con pico similar al espectro y tiempo de retención del estándar (Da Motta y Valente Soares, 2000).

## **PRODUCCIÓN DE ESCLEROCIOS**

La totalidad de los aislamientos monospóricos fueron caracterizados según su capacidad para producir esclerocios, como así también el número y tamaño de los mismos, debido a la correlación entre tamaño y cantidad de esclerocios formados, con la producción de aflatoxinas (Barros et al., 2007; Pildain et al., 2005; Cotty, 1989). Cajas de Petri de 6 cm de diámetro conteniendo medio Czapek Dox agar (CZ) (30 g Sacarosa, 3 g NaNO<sub>3</sub>, 1 g PO<sub>4</sub>HK<sub>2</sub>, 0,5 g SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,5 g KCl, 0,01 g FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 15 g Agar, 1000 mL Agua destilada c.s.p., pH=7,3) se inocularon centralmente con 10 µL de una suspensión de esporas, se realizaron 3 réplicas por cada aislamiento y se incubaron a

$30 \pm 2$  °C en oscuridad durante 14 días (Pildain et al., 2005). Posteriormente, a cada caja de Petri se le adicionó 5 mL de solución salina Tween 20 % y se raspó la superficie desprendiendo el micelio. La suspensión obtenida se filtró en kitasato con filtro Whatman N° 2, se secó en estufa a 35 °C durante 4 horas recuperándose los esclerocios (Figura 2.5). El número de esclerocios se determinó diseminándolos sobre una cuadrícula de 10 mm x 10 mm, marcada en una caja de Petri, se eligieron al azar 3 cuadrados y se efectuaron las observaciones bajo lupa estereoscópica Nikon SMZ-10 (15X). Para la determinación del diámetro de los esclerocios estos se esparcieron sobre la caja de Petri cuadrículada y se eligieron al azar 26 esclerocios ubicados sobre una de las líneas de la cuadrícula previamente definida, sus diámetros se determinaron en microscopio (Nikon eclipse Cs1 espectral) (Novas y Cabral, 2002) y de esta manera se clasificaron los aislamientos de *A. flavus* como morfotipos L (diámetro promedio  $> 400$   $\mu\text{m}$ ) o S (diámetro promedio  $< 400$   $\mu\text{m}$ ) (Cotty, 1989). Aquellos aislamientos que no produjeron esclerocios, luego del período de incubación, se cultivaron en medio 5/2 agar a 31 °C por 5 a 7 días en oscuridad, para inducir la producción de los mismos (Giorni, 2007). Los aislamientos que no produjeron esclerocios por ninguna de las técnicas mencionadas se clasificaron como no productores (NP) (Novas y Cabral, 2002).



Figura 2.5. Filtrado y obtención de esclerocios de aislamientos no aflatoxigénicos cultivados en medio Czapeck dox.

## **GRUPOS DE COMPATIBILIDAD VEGETATIVA**

Se estudio la diversidad presente en la poblacion de aislamientos monospóricos de *A. flavus* no productores de aflatoxinas a través del análisis de compatibilidad vegetativa (ACV). Cada aislamiento se cultivó en cajas de Petri conteniendo medio de Selección (SEL) (30 g Sacarosa, 3 g  $\text{NaNO}_3$ , 0,5 g  $\text{PO}_4\text{HK}_2$ , 0,5 g  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ , 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g

KCl, 25 g KClO<sub>3</sub>, 10 mL Rosa de Bengala, 1 mL A&M micronutrientes, 20 g Agar, 1000 mL Agua destilada c.s.p., pH=7) para la obtención de los mutante auxotrófico *nit* (Nitrate – nonutilizing), identificados como sectores de micelio resistente al clorato, incapaces de utilizar nitrato como fuente de nitrógeno. Para ello, se retiró la porción central del medio SEL con sacabocado, se inoculó con 8 µL de solución de esporas de 1x10<sup>6</sup> conidios.mL<sup>-1</sup> y se incubaron a 30 ± 2 °C en oscuridad, hasta la aparición de micelio con un patrón de crecimiento “ralo y expansivo”. Se tomaron los extremos de estos sectores auxotróficos, recuperando entre 3 y 5 *nits* por cada aislamiento cultivado y se transfirieron a medio MIT (30 g Sacarosa, 3 g NaNO<sub>3</sub>, 0,5 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, 15 g KClO<sub>3</sub>, 1 mL A&M micronutrientes, 20 g Agar, 1000 mL Agua destilada c.s.p., pH= 6,5) para su limpieza y estabilización durante 3 días a 30 ± 2 °C. Luego de dicho período, se tomó un extremo de crecimiento del mutante de cada aislamiento y se transfirió a medio 5/2 agar (50 mL V-8TM jugo, 20 g Agar, 1000 mL Agua destilada c.s.p., pH= 6,5) para favorecer su esporulación y posterior realización de soluciones para utilizar en estudios de compatibilidad. Se efectuó el fenotipado de los mutantes obtenidos de acuerdo al crecimiento de tipo normal (+) o “ralo y expansivo” (-) en medios de cultivo CZ, Agar Hipoxantina (HYP) (50 g Sacarosa, 10 g PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K, 0,2 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 10 mL Hipoxantina, 1 mL A&M micronutrientes, 20 g Agar, 1000 mL Agua destilada c.s.p., pH=5,5) y Agar Nitrito (AN) (50 g Sacarosa, 10 g PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K, 2 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,5 g NaNO<sub>2</sub>, 1 mL A&M micronutrientes, 20 g Agar, 1000 mL Agua destilada c.s.p., pH=5,5), identificándolos como *niaD* (incapaces de utilizar nitrato), *nirA* (incapaces de utilizar nitrito y nitrato) y *cnx* (incapaces de utilizar hipoxantina y nitrato) (Tabla 2.1) (Mauro et al., 2013; Pildain et al., 2004).

Tabla 2.1. Fenotipado de mutantes de aislamientos no aflatoxigénicos de *Aspergillus flavus* en muestras de maíz de ocho localidades de ocho distritos agroclimáticos de Santiago del Estero y regiones colindantes de Córdoba y Tucumán durante 2015/16 y 2016/17.

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

<sup>a</sup> (+): crecimiento normal; (-): crecimiento ralo y expansivo. <sup>b</sup> CZ: Czapeck Dox agar, AN: Agar Nitrito, HYP: Agar Hipoxantina.

Se evaluó la autocompatibilidad entre mutantes de un mismo aislamiento en medio de cultivo Almidón agar (AMD) (36 g Sacarosa, 3 g NaNO<sub>3</sub>, 0,5 g PO<sub>4</sub>HK<sub>2</sub>, 0,5 g PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K, 2 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,5 g KCl 20 g Almidón soluble, 1 mL A&M micronutrientes, 20 g Agar, 1000 mL Agua destilada c.s.p., pH=6). A cajas de Petri conteniendo medio de cultivo AMD se les retiró 2 porciones de la parte central con sacabocado, se inocularon con 8 µL de solución de esporas de cada fenotipo, de un mismo aislamiento, y se incubaron a 30 ± 2 °C en oscuridad. La compatibilidad de los dos mutantes a evaluar se identificó como una línea de crecimiento normal en el sitio donde el micelio de ambos entra en contacto (Cotty y Taylor, 2003). Posteriormente, todos los mutantes fueron evaluados con probadores de los GCV obtenidos por Camiletti *et al.* (2018) en poblaciones de Argentina. Para ello, se retiraron tres porciones de medio AMD con sacabocado, siguiendo un patrón triangular en el centro de la caja de Petri, se sembraron dos de los orificios con cada uno de los probadores de un determinado GCV y el tercero con la dilución de esporas de los mutantes obtenidos de cada aislamiento a caracterizar. Las cajas se incubaron a 31 °C durante 5 a 10 días y los mutantes que formaron un heterocarionte estable (línea de crecimiento normal) con uno o ambos probadores de un determinado GCV fueron considerados como integrantes de este GCV (Agbetiameh *et al.*, 2019).

## **RELACIONES FILOGENÉTICAS**

Los aislamientos monospóricos no productores de aflatoxinas se caracterizaron molecularmente para estudiar las relaciones filogenéticas entre ellos. Para ello, los aislamientos monospóricos no aflatoxigénicos, que se encontraban almacenados en agua destilada estéril con 0,01 % de Tween 20, fueron cultivados en medio MEA durante 7 días a 30 ± 2 °C y en oscuridad. Posteriormente, se llevaron a cabo 3 metodologías para determinar la más efectiva.

### **METODOLOGÍA A**

Se tomó una alícuota de micelio de los aislamientos cultivados en MEA y se les realizó la extracción de ADN siguiendo el método rápido de cuatro pasos propuesto por Liu *et al.* (2000) según se describe previamente.

## METODOLOGÍA B

De los aislamientos cultivados en MEA, tal como se mencionó precedentemente, se tomó una porción de micelio y se extrajo su ADN siguiendo la metodología cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) propuesta por Leslie y Summerell (2006). Esta metodología tuvo 3 variantes antes de realizar la extracción propiamente dicha. En el primer caso el micelio fue pulverizado con N<sub>2</sub> líquido en mortero, en el segundo se molió con pistilo en tubo de 1,5 mL conteniendo 500 µL de solución tampón CTAB 2 % (Tris Cl 100 mM, EDTA 20 mM y ClNa 1,4 M) y finalmente en el tercer caso el micelio fue molido con pistilo en tubo de 1,5 mL al que se le adicionó N<sub>2</sub> líquido. Para el primer y último caso, posteriormente se incorporaron los 500 µL de solución tampón CTAB 2 % mencionado. Posteriormente, a cada muestra se le agregó 1 µL de mercaptoetanol 0,2 % y se agitaron durante 30 segundos. Los tubos fueron colocados a baño térmico a 65 °C durante 30 min., a cada uno de ellos se les adicionó 25 µL de la mezcla cloroformo - alcohol isoamílico (24:1), se agitaron durante 1 min. y se centrifugaron a 10.000 revoluciones durante 10 min (TA 16 °C). Posteriormente, se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 mL y se repitió el agregado del cloroformo - alcohol isoamílico (24:1) y posterior centrifugado a 10.000 revoluciones durante 10 min (TA 16 °C). Se recuperó el sobrenadante y se volcó en un nuevo tubo de 1,5 mL, se agregó a cada uno 0,66 volúmenes de isopropanol frío, se mezcló por inversión suave del tubo y se dejó precipitar por 1 hora. Luego, se centrifugó a 12.000 revoluciones durante 20 min, se descartó el sobrenadante por inversión del tubo, evitando que se desprege el pellet del fondo del mismo, y se dejó secar boca abajo en papel secante durante 10 a 15 min. Posteriormente, se lavó el pellet con 1 mL de etanol 70 % (agitando suavemente el tubo para que se desprege el pellet), se lo dejó durante 20 min a -20 °C y luego se centrifugó a 10.000 revoluciones durante 10 min. El sobrenadante fue eliminado y cada tubo permaneció boca abajo para eliminar el resto de etanol, se dejó secar el pellet y finalmente se resuspendió en 50 µL de agua DPC.

## METODOLOGÍA C

A partir de los aislamientos cultivados en medio MEA, se realizó una suspensión de esporas en agua destilada estéril con 0,01 % de Tween 20, se contabilizaron en hematocitómetro (cámara de Neubauer) y su concentración se ajustó a  $1 \times 10^6$  conidios.mL<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>. Posteriormente, se inocularon 100 mL de medio Lixiviado de papa y glucosa (LP) (100 mL de Infusión de papa a partir de 200 g, 20 g Glucosa, 1000 mL Agua destilada c.s.p., pH= 4,5) con la dilución de esporas en matraces de Erlenmeyer (250 mL) y se incubaron en agitador orbital a 150 rpm y a  $25 \pm 2$  °C, durante 48 horas. Transcurrido este período, se colectó el micelio por filtración en kitasato con bomba de vacío y filtro Whatman N° 2, se enjuagó con agua destilada estéril, se pulverizó con N<sub>2</sub> líquido en mortero (Devi Prameela et al., 2013) y se realizó la extracción de ADN con la metodología de CTAB mencionada.

Las muestras de ADN obtenidas, según cada una de las 3 metodologías, fueron cuantificadas por espectrofotometría (Nano Drop, Thermo Fisher Scientific, USA) y se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % en solución tampón TAE 1X. La concentración y pureza del ADN se determinó por espectrofotometría en transiluminador UV, previa tinción en solución de GelRed™ Biotium (2,5 ng.µl<sup>-1</sup>). La estimación de la concentración del ADN se realizó por comparación visual con la intensidad de las bandas del marcador “qLadder 100 pb precisión” (PB-L®, Bs As, Argentina) de 100 pb y se cotejó con los valores obtenidos en NanoDrop.

El ADN obtenido y cuantificado de cada aislamiento fue utilizado para amplificar un segmento del gen de la calmodulina (*CaM*) con los iniciadores *CL1*, 5'-GA(GA)T(AT)CAAGGAGGCCTTCTC-3'; *CL2A*, 5'-TTTTTGCATCATGAGTTGGAC-3' (O'Donnell et al., 2000). Para cada reacción individual se mezcló 1 µL (concentración final 20 – 100 ng de ADN.µL<sup>-1</sup>) de solución de ADN con 49 µL de una solución compuesta por: 10 µL de solución tampón de reacción 5x Green GoTaq® (Promega®, Madison, WI, USA), 3 µL de CIMg<sub>2</sub>, 1 µL de mezcla de dNTP (10 mM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1,5 µL de los cebadores *CL1* y *CL2A* (10 µM), 0,4 µL de enzima polimerasa GoTaq® (5U.µL<sup>-1</sup>, Promega®, Madison, WI, USA) y 31,6 µL de agua DEPC. Una solución sin ADN se incluyó en cada experimento como control negativo a fin de probar posibles contaminaciones de los reactivos. La reacción de PCR fue llevada a cabo en un termociclador, con las siguientes condiciones: un ciclo a 95 °C por 2 minutos; 40 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 50 segundos; y una extensión final a 72 °C durante 7 minutos (O'Donnell et al., 2000).

Los productos de PCR fueron revelados por electroforesis en 1,5 % de agarosa en solución tampón TAE 1X, visualizados en transiluminador UV, previa tinción en solución de GelRed™ Biotium (2,5 ng.µL<sup>-1</sup>) y corroborados por amplificación de la banda esperada de 688 pb. El tamaño molecular de los mismos fue estimado utilizando el marcador “qLadder 100 pb precisión” (PB-L®, Bs. As., Argentina) de 100 pb.

Los fragmentos amplificados se purificaron utilizando columnas de purificación de ADN Wizard® SV Gel and PCR clean - Up system (Promega, Madison, WI, USA) según especificaciones del fabricante y se cuantificaron por espectrofotometría (Nano Drop, Thermo Fisher Scientific, USA). Ambas cadenas de ADN se enviaron para secuenciar mediante el método Sanger (Macrogen, Seúl, Corea del Sur), utilizando los oligonucleótidos específicos *CLI* y *CL2A* (O'Donnell et al., 2000).

Las secuencias obtenidas se alinearon con el programa Clustal X2 (Larkin et al., 2007) y en los casos que resultó necesario se ajustaron manualmente. Se utilizó el programa MEGA versión 7 (Kumar et al., 2016) para la selección del mejor modelo de sustitución nucleotídica y para obtener los árboles filogenéticos empleando los métodos Neighbor-Joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987) y Maximum-Likelihood (ML) (Tamura y Nei, 1993), ambos con un bootstrap de 10.000 réplicas. Se compararon con la secuencia de referencia NW\_002477238.1 y se utilizó como outgroup a *A. niger* MH645004.1, ambas de la base de datos del GeneBank.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos obtenidos para morfotipo de esclerocios, capacidad toxigénica y diversidad de las secuencias del gen *CaM* fueron analizados utilizando el software estadístico InfoStat (Di Rienzo et al., 2020), los valores medios se obtuvieron a través del análisis de la varianza (ANOVA) y las diferencias entre medias se compararon utilizando el test LSD de Fisher ( $P < 0,05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE *Aspergillus flavus*

En la campaña agrícola 2015/16 se recolectaron 13 muestras provenientes de cada una de las 5 localidades representativas de los 5 distritos agroclimáticos, pertenecientes a la Provincia de Santiago del Estero, en 9 de las cuales se aisló *A. flavus*. En la campaña 2016/17, se recolectaron 18 muestras provenientes de 8 localidades, una por cada distrito agroclimático, de las provincias de Santiago del Estero, norte de Córdoba y este de Tucumán, encontrándose a *A. flavus* en 11 de las 18 muestras (Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Distribución geográfica y número de aislamientos de *Aspergillus flavus*. Campañas agrícolas 2015/16 y 2016/17.

<b>Campaña</b>	<b>Distrito Agroclimático</b>	<b>Localidad</b>	<b>Híbrido</b>	<b>Empresa</b>	<b>N° aislamientos <i>A. flavus</i></b>
<b>2015/16</b>	4 - Río Muerto	Sachayoj	DK 7210	Dekalb	1
			DK 7310	Dekalb	1
			Maíz de chacra		2
	5 - Hickmann	Quimilí	DK 7210	Dekalb	19
			DK 7310	Dekalb	-
			Maíz de chacra		1
	17 - Bandera	Bandera	DK 7210	Dekalb	1
			DK 7310	Dekalb	2
			Maíz de chacra		1
	18 - Monteagudo	Sgo. del Estero	DK 7210	Dekalb	-
			DK 390	Dekalb	-
			Maíz de chacra		1
	37 - Soto	Sumampa	Maíz de chacra		-
<b>2016/17</b>	4 - Río Muerto	Sachayoj	DK 7210	Dekalb	1
			DK 7310	Dekalb	-
			Maíz de chacra		1
	5 - Hickmann	Quimilí	DW 538	Corteva	-
			DK 7310	Dekalb	-
			Maíz de chacra		1
	17 - Bandera	Bandera	DK 7210	Dekalb	8
			DK 7310	Dekalb	-
			Maíz de chacra		-
	18 - Monteagudo	Sgo. del Estero	120 PW	Corteva	5
			510 PW	Corteva	2
			Maíz de chacra		1
	37 - Soto	Sumampa	Maíz de chacra		2
	18A - Monteagudo	Leales	120 PW	Corteva	-

Tabla 2.2. Distribución geográfica y número de aislamientos de *Aspergillus flavus*. Campañas agrícolas 2015/16 y 2016/17. Continuación.

		NK 139 SY	Syngenta	-
		DM 2771	Dekalb	1
61B - Deán Funes	V. de Tulumba	DK 7210	Dekalb	4
37C - Soto	Rayo Cortado	Maíz de chacra		3
<b>TOTAL</b>				<b>58</b>

El escaso crecimiento de los aislamientos en el medio AFPA no permitió identificar especies de *A. flavus* y *A. parasiticus*. Frändberg *et al.* (2003) reportaron un menor recuento de hongos totales en este medio de cultivo comparado con DG18, mientras que Pitt *et al.* (1983) indicaron la existencia de algunos casos de falsos positivos o negativos. No se observaron diferencias significativas en el número de aislamientos obtenidos entre los medios DRBC y DG18, indicando esto que ambos son apropiados para el crecimiento del hongo.

Se obtuvieron 58 aislamientos de las ocho localidades evaluadas (Anexo 1), con características morfológicas de *A. flavus* de acuerdo a Klich (2002), de los que posteriormente se obtuvo su correspondiente aislamiento monospórico (Tabla 2.1). Se observó una mejor distribución de aislamientos entre los distritos agroclimáticos en la campaña agrícola 2016/17 respecto de su precedente, habiéndose obtenido aislamientos en todas las localidades evaluadas (Figuras 2.6 y 2.7). Esto puede deberse a la incorporación en el trabajo de nuevos distritos agroclimáticos que posibilitaron explorar otros agroecosistemas con características de manejo, y condiciones climáticas y edáficas diferentes (Dos Santos *et al.*, 2016; Tola y Kebede, 2016; Villers, 2014; Wu, 2007; Nesci *et al.*, 2006), además de las condiciones climáticas propias de la campaña agrícola y puntuales de cada lote, como estreses hídricos y térmicos en el período reproductivo que pudieron favorecer la colonización del cultivo por parte del patógeno (Díaz *et al.*, 2012; Cotty y Jaime García, 2007; Mazzani *et al.*, 2004; Presello *et al.*, 2004).

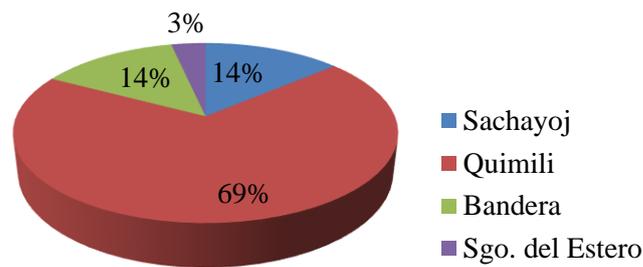


Figura 2.6. Proporción de aislamientos de *Aspergillus flavus* obtenidos en muestras de espigas de maíz de cada localidad representativa de cinco distritos agroclimáticos durante la campaña agrícola 2015/16. En la localidad de Sumampa no se obtuvieron aislamientos en la campaña.

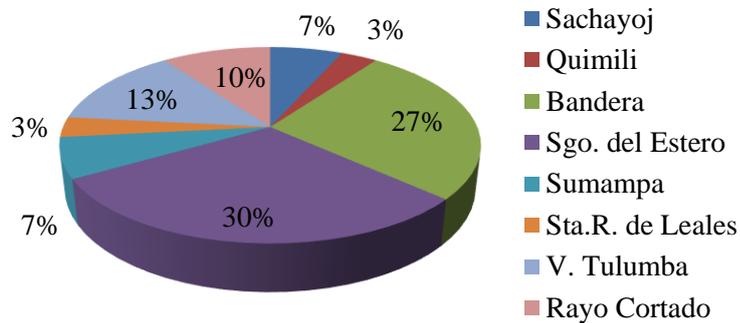


Figura 2.7. Proporción de aislamientos de *Aspergillus flavus* aislados en muestras de espigas de maíz de cada localidad representativa de ocho distritos agroclimáticos durante la campaña agrícola 2016/17.

En la campaña agrícola 2015/16, la localidad de Quimilí registró la mayor cantidad de aislamientos con 20 identificados, mientras que en la campaña 2016/17 las localidades de Bandera y Santiago del Estero registraron la mayoría de los aislamientos, con 8 cada una (Figura 2.8). La situación en la localidad de Quimilí puede estar asociada a las precipitaciones, debido a que la campaña 2015/16 fue más seca que la siguiente (771 mm vs 1.032 mm, para Quimilí). Pero esto contrasta con lo sucedido en Bandera y Santiago del Estero, donde las precipitaciones en ambas campañas agrícolas fueron prácticamente iguales, con adecuado aporte de agua en el período crítico del cultivo, para Santiago del Estero 609 mm y 550 mm, en 2015/16 y 2016/17 respectivamente y para Bandera 1.034 mm y 994 mm, en 2015/16 y 2016/17 respectivamente (INTA - SIGA, 2020). Esta última situación, con número variable de aislamientos por campañas, aún con condiciones climáticas similares entre ambas, puede asociarse a otras variables influyentes como la presencia de insectos plagas que favorecen la infección con *A. flavus* (Garcia et al., 2006; Williams et al., 2005; Boiça et al., 2001) y a la diferencia en el germoplasma, como el caso

de Santiago del Estero (Tabla 2.2) (Presello et al., 2016, 2012; de Luna López et al., 2013; Martínez Padrón et al., 2013).

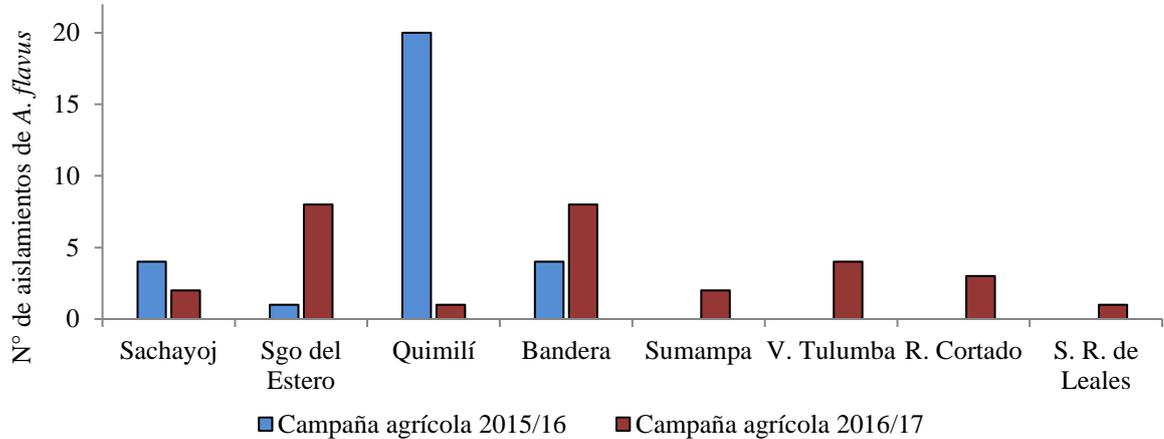


Figura 2.8. Número de aislamientos de *Aspergillus flavus* en ocho localidades representativas de ocho distritos agroclimáticos. Datos de campañas agrícolas 2015/16 y 2016/17.

La presencia de aislamientos de *A. flavus* en las 8 localidades pertenecientes a los 8 distritos agroclimáticos estudiados, con condiciones agroecológicas y escenarios meteorológicos propios de cada una de ellas y de cada campaña agrícola, da cuenta de la amplia distribución del hongo en la zona estudiada, tal como sucede en otras regiones del país (Alaniz Zanon et al., 2018; Camiletti et al., 2017; Barros et al., 2003, 2006) y el mundo (Bandyopadhyay et al., 2016; Donner et al., 2015; Mauro et al., 2015; Doster et al., 2014; Perrone et al., 2014a; Gallo et al., 2012; Habibi y Banihashemi, 2008; Cardwell y Cotty, 2002).

## IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Aspergillus flavus*

Los iniciadores *Asp f1* y *Asp f2* (Devi Prameela et al., 2013) no permitieron distinguir a *A. flavus* de *A. parasiticus*. Estas dos especies, pertenecientes a la sección *Flavi*, poseen características macro y microscópicas semejante que dificultan la separación de las especies morfológicas (Da Silva et al., 2015; Iheanacho et al., 2014; El Khoury et al., 2011; Godet y Munaut, 2010; White, 1999).

La identidad de los 58 aislamientos de *A. flavus* se corroboró utilizando los iniciadores específicos *FLA1* y *FLA2*, que tienen como blanco la región ITS (González Salgado et al., 2011), a través de una amplificación de 500 pb (Figura 2.9).

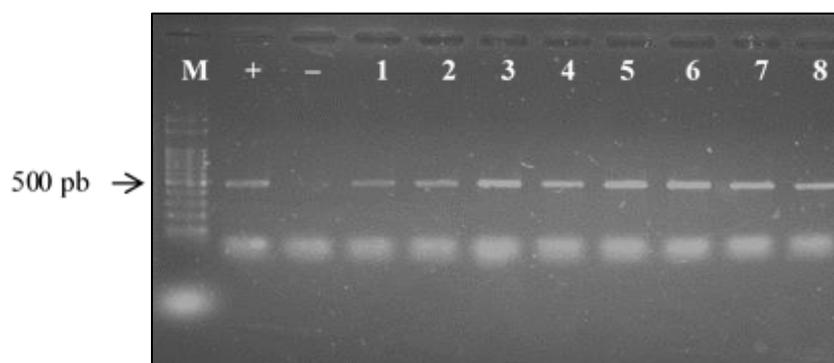


Figura. 2.9. Gel de electroforesis exhibiendo los productos de la PCR. M: marcador molecular (100 pb ADN Ladder); +: *Aspergillus. flavus* NRRL 3251 (control positivo); -: *Aspergillus parasiticus* (control negativo); 1: ASSA2; 2: ASQU7; 3: ASQU21; 4: ASQU10; 5: ASQU15; 6: ASRC2; 7: ASQU12; 8: ASQU6.

En este trabajo se exploró como alternativa el uso de cebadores diseñados a partir de regiones específicas como las del gen de la calmodulina e ITS para identificar a la especie, dentro de otras reportadas como  $\beta$ -tubulina, las regiones ITS1 e ITS2 del rADN, las regiones variables el extremo 5' del gen 28S y los genes de la vía biosintética de las aflatoxinas (Samson et al., 2014; Arrúa Alvarenga et al., 2012) (ver Relaciones Filogenéticas, página 59).

## CAPACIDAD TOXIGÉNICA

A la totalidad de los aislamientos obtenidos se les determinó la capacidad de producir aflatoxinas y ACP por HPLC. Si bien existen reportes indicando que *A. flavus* puede producir aflatoxinas de los grupos B y G en Argentina y en otras partes del mundo como Tailandia, Croacia y Kenia (Singh y Cotty, 2019; Okoth et al., 2018; Camiletti et al., 2017; Baranyi et al., 2015; Perrone et al., 2014b; Sornmayura et al., 2007; Barros et al., 2006; Vaamonde et al., 2003), solamente se cuantificó la producción de AFB<sub>1</sub>, debido a la mayor frecuencia de producción por parte los aislamientos reportados y toxicidad (Bennett y Klich, 2003; Cotty et al., 2008). Se identificaron 30 aislamientos no aflatoxigénicos (52 %) y 28 aflatoxigénicos (48 %), del total de aislamientos obtenidos (Tabla 2.3). Similares proporciones entre aislamientos aflatoxigénicos y no aflatoxigénicos fueron indicados por Frisvad *et al.* (2007), Martins *et al.* (2017) y Taniwaki y Pitt (2013). Se

obtuvieron aislamientos productores y no productores de aflatoxinas aislados de las ocho localidades representativas de los distritos agroclimáticos estudiados, excepto en Santa Rosa de Leales, donde el único aislamiento hallado resultó no aflatoxigénico.

Tabla 2.3. Producción de AFB<sub>1</sub>, ACP y morfotipos de esclerocios en aislamientos de *Aspergillus flavus* de espigas de maíz de 8 localidades representativas de 8 distritos agroclimáticos de la Provincia de Santiago del Estero, este de Tucumán y norte de Córdoba, durante las campañas agrícolas 2015/16 y 2016/17.

Provincia	Localidad	Año muestreo	Esclerocios			AFB <sub>1</sub> (ng.g <sup>-1</sup> )	ACP (ng.g <sup>-1</sup> )	Aislamiento
			Morfotipo	N°	Tamaño (µm)			
COR	Rayo Cortado	2017	L	38,7	823,1	6,43	63,26	ASRC1
COR	Rayo Cortado	2017	NP	ND	ND	<LD	66,23	ASRC2
COR	Rayo Cortado	2017	NP	ND	ND	<LD	60,56	ASRC3
COR	V. Tulumba	2017	L	5	582,12	278,46	8,31	ASVT1
COR	V. Tulumba	2017	L	0,30	496,2	<LD	32,80	ASVT2
COR	V. Tulumba	2017	L	44,1	963,14	405,09	38,56	ASVT3
COR	V. Tulumba	2017	L	35,10	500,92	60,61	12,28	ASVT4
SE	Bandera	2016	L	12,20	500,70	16,31	29,98	ASBA12
SE	Bandera	2016	L	2,60	476,40	<LD	22,80	ASBA3
SE	Bandera	2016	L	12,90	701,64	7,17	29,25	ASBA4
SE	Bandera	2016	L	6	605,56	<LD	14,74	ASBA8
SE	Bandera	2017	L	17,30	643,24	<LD	32,26	ASBA1
SE	Bandera	2017	L	10,40	742,80	5,92	29,31	ASBA10
SE	Bandera	2017	L	75	597,50	<LD	22,34	ASBA11
SE	Bandera	2017	L	34,30	643,58	<LD	32,27	ASBA2
SE	Bandera	2017	L	9,60	871,96	<LD	36,67	ASBA5
SE	Bandera	2017	L	3,50	603,36	90,73	42,98	ASBA6
SE	Bandera	2017	L	29,10	555,14	6,68	35,43	ASBA7
SE	Bandera	2017	NP	ND	ND	<LD	56,91	ASBA9
SE	Quimilí	2016	L	19,80	829,28	7,23	25,61	ASQU1
SE	Quimilí	2016	L	70,30	426,40	<LD	85,45	ASQU10
SE	Quimilí	2016	L	12,50	596,25	2.521,47	17,55	ASQU11
SE	Quimilí	2016	L	25,70	758,20	17,16	15,78	ASQU12
SE	Quimilí	2016	L	14,60	708,41	5,66	51,20	ASQU13
SE	Quimilí	2016	L	62,10	854,32	5,64	38,66	ASQU14
SE	Quimilí	2016	L	2,60	911,50	<LD	43,18	ASQU15
SE	Quimilí	2016	L	5,30	842,70	<LD	24,24	ASQU16
SE	Quimilí	2016	L	7	645,21	<LD	68,69	ASQU17
SE	Quimilí	2016	L	27,60	703,45	<LD	58,72	ASQU18
SE	Quimilí	2016	L	40	940,20	<LD	10,63	ASQU19
SE	Quimilí	2016	L	4,30	740,04	<LD	20,61	ASQU2
SE	Quimilí	2016	L	89,30	824,30	<LD	37,14	ASQU20
SE	Quimilí	2016	L	42,30	833,78	499,07	15,96	ASQU21
SE	Quimilí	2016	L	8,60	927,21	34,01	30,36	ASQU3
SE	Quimilí	2016	L	35,20	662,95	9,35	48,13	ASQU4
SE	Quimilí	2016	L	34,60	644,23	6,33	116,40	ASQU5
SE	Quimilí	2016	L	18,20	641,30	6,04	16,19	ASQU6
SE	Quimilí	2016	L	49,20	688,77	5,76	56,87	ASQU8

Tabla 2.3. Producción de AFB<sub>1</sub>, ACP y morfotipos de esclerocios en aislamientos de *Aspergillus flavus* de espigas de maíz de 8 localidades representativas de 8 distritos agroclimáticos de la Provincia de Santiago del Estero, este de Tucumán y norte de Córdoba, durante las campañas agrícolas 2015/16 y 2016/17. Continuación

SE	Quimilí	2016	L	31,30	632,94	<LD	48,59	<b>ASQU9</b>
SE	Quimilí	2017	L	21	458,07	<LD	61,58	<b>ASQU7</b>
SE	Sachayoj	2016	L	14,71	824,01	9,81	38,50	<b>ASSA1</b>
SE	Sachayoj	2016	L	5,30	472,12	13,25	29,89	<b>ASSA3</b>
SE	Sachayoj	2016	L	9,60	781,80	<LD	57,60	<b>ASSA4</b>
SE	Sachayoj	2016	L	24,80	428,90	9,07	79,11	<b>ASSA6</b>
SE	Sachayoj	2017	L	72,10	841,78	70,06	37,99	<b>ASSA2</b>
SE	Sachayoj	2017	L	18	636,42	<LD	13,82	<b>ASSA5</b>
SE	Santiago del Estero	2016	L	8,20	712,52	5,84	18,96	<b>ASSE5</b>
SE	Santiago del Estero	2017	S	144	312,25	<LD	21,80	<b>ASSE1</b>
SE	Santiago del Estero	2017	L	23,40	635,84	<LD	20,63	<b>ASSE2</b>
SE	Santiago del Estero	2017	L	25,70	809,56	48.958,11	22,28	<b>ASSE3</b>
SE	Santiago del Estero	2017	L	51	593,88	290,93	44,91	<b>ASSE4</b>
SE	Santiago del Estero	2017	NP	ND	ND	<LD	14,99	<b>ASSE6</b>
SE	Santiago del Estero	2017	NP	ND	ND	<LD	30,59	<b>ASSE7</b>
SE	Santiago del Estero	2017	L	1	829,63	<LD	22,00	<b>ASSE8</b>
SE	Santiago del Estero	2017	L	6	881,20	<LD	20,83	<b>ASSE9</b>
SE	Sumampa	2017	NP	ND	ND	<LD	32,95	<b>ASSU1</b>
SE	Sumampa	2017	L	44,30	840,72	12,33	55,14	<b>ASSU2</b>
TUC	Sta. R. de Leales	2017	L	19,60	590,68	<LD	51,28	<b>ASLE1</b>

COR: Córdoba; SE: Santiago del Estero; TUC: Tucumán.

L: esclerocios de tamaño > 400 µm; S: esclerocios de tamaño < 400 µm; NP: no productor de esclerocios; ND: no detectado.

AFB<sub>1</sub>: Aflatoxina B<sub>1</sub>; ACP: ácido ciclopiazónico; <LD: menor al límite de detección de 1 ng.g<sup>-1</sup>.

De los aislamientos productores de AFB<sub>1</sub>, 26 (93 %) registraron concentraciones de hasta 500 ng.g<sup>-1</sup>, destacándose ASQU11 en Quimilí y ASSE3 en Santiago del Estero con 2.600 ng.g<sup>-1</sup> y 48.958 ng.g<sup>-1</sup> respectivamente (Anexo 1). La variación en la producción de aflatoxinas entre aislamientos está relacionada con el tipo y variedad de enzimas hidrolíticas que producen para colonizar el tejido hospedante (Mehl y Cotty, 2008; Mellon et al., 2007). Si bien la cantidad de micotoxinas producidas puede estar regida por el origen geográfico y las condiciones ambientales (Perrone et al., 2014a; Vaamonde et al., 2003), muchas veces puede no diferir entre regiones cercanas debido a la distribución cosmopolita que presenta *A. flavus* (Bayman y Cotty, 1993), nuestros resultados no muestran ningún patrón asociado a estas dos características.

Para estudiar la coocurrencia de aislamientos productores de aflatoxinas y ACP, se evaluó la capacidad de producción de esta última en los 58 aislamientos monospóricos identificados, encontrándose que la totalidad de los mismos eran productores de ACP

(Anexo 1). Esto es importante tanto por la toxicidad del ACP (Uka et al., 2017; Antony et al., 2003), como por la utilización de aislamientos para aplicarlos en tácticas de biocontrol de aflatoxinas, como el agente AF36 utilizado en la estrategia de exclusión competitiva, el cual fue reportado como responsable del incremento de ACP en granos de maíz inoculados a campo y en maní (Abbas et al., 2011; Dorner et al., 2000).

La producción de ACP de los diferentes aislamientos resultó menor que la de AFB<sub>1</sub>, encontrándose solo un aislamiento (2 %) con 116,4 ng.g<sup>-1</sup> aislado de la localidad de Quimilí (D5: Hickmann), mientras que los 57 (98 %) restantes registraron concentraciones menores a 59 ng.g<sup>-1</sup>. En este estudio se encontraron diferencias significativas, con valores medios de 1.905,87 ng.g<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> vs 37,46 ng.g<sup>-1</sup> de ACP y valores máximos de 48.958,47 ng.g<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> vs 116,4 ng.g<sup>-1</sup> de ACP, coincidente con Astoreca *et al.* (2014) y Horn *et al.* (1996) quienes demostraron producciones menores de ACP respecto de AFB<sub>1</sub> por aislamientos de *A. flavus*.

La presencia de aislamientos productores de ACP junto con aflatoxinas ha sido reportada en Argentina y el mundo (Garcia Cela et al., 2020; Camiletti et al., 2018; Alaniz Zanon et al., 2013; Riba et al., 2010; Barros et al., 2006; Razzaghi Abyaneh et al., 2006; Vaamonde et al., 2003). Los aislamientos con mayor producción de AFB<sub>1</sub> obtenidos en la región de estudio, no correspondieron a los de mayor producción de ACP, aunque en la localidad de Quimilí se obtuvo el aislamiento con mayor producción de ACP así como el segundo con mayor producción de AFB<sub>1</sub>.

A diferencia de nuestros resultados, Camiletti *et al.* (2018) en espigas de maíz en Argentina, informó 81 % de aislamientos productores de ACP. Por otro lado, también en Argentina pero en trigo, soja y maní, Vaamonde *et al.* (2003), reportaron entre 73 % y 94 % de aislamientos productores de esta micotoxina. En Italia y también sobre granos de maíz, Giorni (2007) identificó 61 % de aislamientos productores de ACP, mientras que en plantaciones orgánicas de nueces en Brasil, Reis *et al.* (2014) encontraron que 66 % de los aislamientos de *A. flavus*, eran productores de esta micotoxina. Incluso en muestras de suelo de plantaciones de pistacho en República Checa, Jamali *et al.* (2012) identificó 81 % de aislamientos productores de ACP.

## PRODUCCIÓN DE ESCLEROCIOS

De los 58 aislamientos de *A. flavus*, 6 (10 %) no produjeron esclerocios (NP), mientras que 52 (90 %) sí lo hicieron. De estos últimos, 51 (98 %) fueron identificados como morfotipo L, con diámetro  $>400 \mu\text{m}$  (Figura 2.10) y solo el aislamiento ASSE1 (2 %) correspondió al morfotipo S, con diámetro  $<400 \mu\text{m}$  (Tabla 2.3) (Anexo 1).

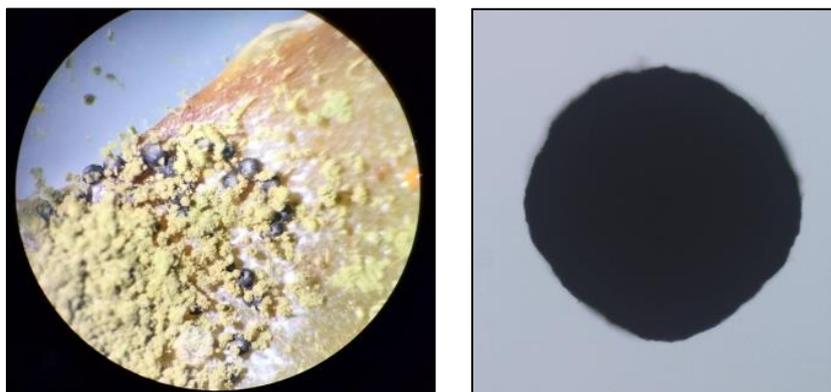


Figura 2.10. Esclerocios morfotipo L en aislamiento aflatoxigénico de *Aspergillus flavus* en observación bajo lupa estereoscópica Nikon SMZ-10 (15X) (Izquierda). Esclerocio morfotipo L en observación en microscopio Nikon eclipse Cs1 espectral (Derecha).

Similares proporciones entre morfotipos L, S y NP fueron reportadas en México, en aislamientos de granos de maíz, por Moreno (2004), quien informó 86 % de aislamientos con esclerocios del tipo L, 4 % del tipo S y 11 % del NP y también por Pildain *et al.* (2005) en Argentina, quien obtuvo 47 % de esclerocios tipo L, 25 % del tipo S y 28 % NP en aislamientos provenientes de cultivo de maní.

La baja o nula presencia del morfotipo S en aislamientos de maíz también fue reportada por Giorni (2007) en Italia sobre una población de *A. flavus* en espigas de maíz, en donde solo 1 aislamiento de un total de 70, fue caracterizado como morfotipo S mientras que la mayoría resultó NP. También Alaniz Zanon *et al.* (2018) observaron, en aislamientos no aflatoxigénicos de poblaciones de *A. flavus* presentes en granos de maíz en Argentina, 86 % con morfotipo L y 14 % no productores de esclerocios. El predominio del morfotipo L en los aislamientos obtenidos en la región estudiada concuerda con lo informado en otras partes de Argentina, en donde si bien se identificaron los dos morfotipos posibles junto con aislamientos no productores de esclerocios, se destaca la prevalencia del morfotipo L (Camiletti *et al.*, 2018; Alaniz Zanon *et al.*, 2016; Barros *et al.*,

2006; Sepúlveda y Piontelli, 2005; Nesci y Etcheverry, 2002; Novas y Cabral, 2002) y concuerda también con lo reportado en países como Argelia, Brasil, Portugal, Nigeria y regiones del África subsahariana (Ait Mimoune et al., 2018; Probst et al., 2014; Costa Baquião et al., 2013; Ezekiel et al., 2013, 2014; Guezlane Tebibel et al., 2013; Riba et al., 2010; Rodrigues et al., 2009, 2011; Atehnkeng, 2008).

Los aislamientos tipo S generalmente producen concentraciones mayores de aflatoxina que los tipo L o NP, están identificados como los principales responsables de contaminación severa del maíz y de la mayoría de las muertes humanas por aflatoxicosis (Mehl y Cotty, 2008; Probst et al., 2007; Barros et al., 2006; Lewis et al., 2005; Pildain et al., 2005). Se encuentran distribuidos en gran parte del mundo y asociados a la producción de aflatoxinas del grupo B, como en Estados Unidos y África (Probst et al., 2014), o de ambos tipos de aflatoxinas B y G (Agbetiameh et al., 2018; Okoth et al., 2018; Probst et al., 2012; Diedhiou et al., 2011; Donner et al., 2009; Varga et al., 2009; Atehnkeng et al., 2008; Giorni, 2007; Cotty y Cardwell, 1999; Bayman y Cotty, 1993). El único aislamiento S identificado en este estudio fue no productor de AFB<sub>1</sub> y corresponde a la localidad de Santiago del Estero (ASSE1). La presencia de aislamientos S no productores de aflatoxinas fue reportada en Estados Unidos, Ghana y Brasil (Agbetiameh et al., 2018; Gonçalves et al., 2012; Horn y Dorner, 1999; Cotty, 1997), se encuentran distribuidos en gran parte del mundo y asociados tanto a la producción de aflatoxinas del grupo B, como en Estados Unidos y África (Probst et al., 2014), como a la de ambos tipos B y G (Agbetiameh et al., 2018; Okoth et al., 2018; Probst et al., 2012; Giorni et al., 2007). Además, si bien se encuentran asociados a regiones con bajas precipitaciones y altas temperaturas, en donde la producción de cantidades elevadas de pequeños esclerocios puede ser un rasgo de supervivencia adaptado a ambientes con fluctuaciones rápidas de temperatura y humedad (Cardwell y Cotty, 2002; Horn y Dorner, 1999; Orum et al., 1999), esto no fue observado en la región analizada, aun cuando presenta estas características climáticas. Por otro lado, en Arizona, EEUU, se reportó que la incidencia de aislamientos S estuvo inversamente correlacionada con la elevación geográfica (Bigelow et al., 2000), pero para la región en estudio esto no pudo ser corroborado debido al escaso número de aislamientos S.

Se observaron diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) tanto en el tamaño, como en el número de esclerocios, para los diferentes aislamientos evaluados y se encontró correlación

negativa ( $r = -0,79$ ) entre el tamaño y el número de esclerocios, indicando esto, que disminuyen su tamaño a medida que aumentan en número. La producción de aflatoxina se correlacionó positivamente con el número de esclerocios ( $r = 0,62$ ) y negativamente con el tamaño ( $r = -0,38$ ), es decir, que la cantidad de aflatoxina producida aumenta al incrementarse la producción de esclerocios y a medida que estos disminuyen su tamaño. Resultados similares fueron encontrados por Arrúa Alvarenga *et al.* (2012) y Pildain *et al.* (2005) pero difieren de los encontrados por Bouti *et al.* (2020) quienes no encontraron correlación entre los esclerocios y la producción de aflatoxinas. Diversos autores sugieren que la biosíntesis de aflatoxinas y la morfogénesis de los esclerocios están interrelacionadas (Calvo *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2002; Trail *et al.*, 1995; Cotty, 1988; Wicklow y Shotwell, 1983). En este estudio no se observó correlación entre la producción de ACP y el número y tamaño de esclerocios.

Debido a que la predominancia de morfotipo L está usualmente asociada a una mayor frecuencia de aislamientos atoxigénicos, conocer la proporción de aislamientos tipo L, S y NP, puede proveer una estimación rápida de la toxigenicidad de la población de *A. flavus* de la región y brindan la posibilidad de explorar su potencial para el desarrollo de estrategias de biocontrol (Mauro *et al.*, 2013; Cotty, 1997, 1989).

## **GRUPOS DE COMPATIBILIDAD VEGETATIVA**

Los aislamientos no productores de aflatoxinas (Tabla 2.3) fueron caracterizados por determinación de los GCV. El protocolo utilizado (Mauro *et al.*, 2013) no permitió lograr los mutantes para los estudios de autocompatibilidad entre aislamientos y posteriores pruebas de complementariedad entre mutantes de los diferentes aislamientos. Se ajustó la técnica con el incremento en la dosis de  $KClO_3$  necesaria para lograr los mutantes, obteniéndose 8 mutantes de un total de 30 aislamientos no productores de aflatoxinas, se clasificaron según fenotipo *NirA*, *NiaD* y *cnx* (Figura 2.11) y se realizaron las pruebas de autocompatibilidad y de complementariedad con los probadores de los grupos de compatibilidad obtenidos por Camiletti *et al.* (2018), logrando ubicarlos en 4 GCV (Tabla 2.4).

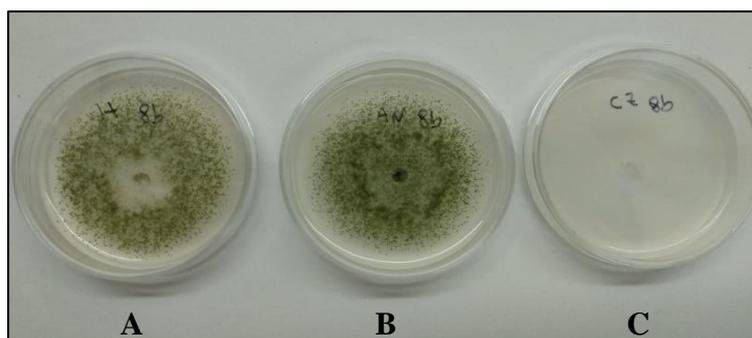


Figura 2.11. Mutante *NiaD* obtenido en medio de cultivo Agar Hipoxantina (HYP) (A), Agar Nitrito (AN) (B) y Czapeck dox (CZ) (C).

Tabla 2.4. Grupos de compatibilidad vegetativa de 8 aislamientos no productores de aflatoxina de localidades representativas de distritos agroclimáticos de la Provincia de Santiago del Estero, este de Tucumán y norte de Córdoba durante las campañas agrícolas 2015/16 y 2016/17.

GCV	Aislamiento	Localidad	Provincia
AM1	ASLE1	Sta. R. de Leales	Tucumán
	ASBA3	Bandera	Santiago del Estero
	ASBA11	Bandera	Santiago del Estero
	ASSE6	Santiago del Estero	Santiago del Estero
AM2	ASQU2	Quimilí	Santiago del Estero
	ASQU16	Quimilí	Santiago del Estero
AM5	ASVT2	V. Tulumba	Córdoba
AM6	ASSE2	Santiago del Estero	Santiago del Estero

GCV: Grupo de Compatibilidad Vegetativa

Los resultados son preliminares debido a que dicho objetivo no se pudo completar por la situación de aislamiento por pandemia por COVID-19 durante 2020 y parte de 2021.

## RELACIONES FILOGENÉTICAS

Las metodologías A y B no permitieron obtener la concentración mínima de ADN necesaria para realizar la secuenciación ( $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ ), mientras que la metodología C posibilitó identificar a la totalidad de las secuencias del gen *CaM* estudiadas, de los 30 aislamientos no productores de aflatoxinas, como pertenecientes al clado *A. flavus*, tanto al utilizar Neighbor-Joining (NJ) como Maximum-Likelihood (ML) (Figuras 2.12 y 2.13). El polimorfismo entre los aislamientos fue bajo, con identidad nucleotídica entre 99,4 % y 100 %. La limitada variabilidad genética dentro de la población puede ser debida a que son

poblaciones jóvenes obtenidas en zonas desmontadas que se incorporaron recientemente a la agricultura y que por lo tanto no han sufrido suficientes mutaciones o recombinaciones que generen diversidad genética en los aislamientos (Grubisha and Cotty, 2015; Perrone et al., 2014b).

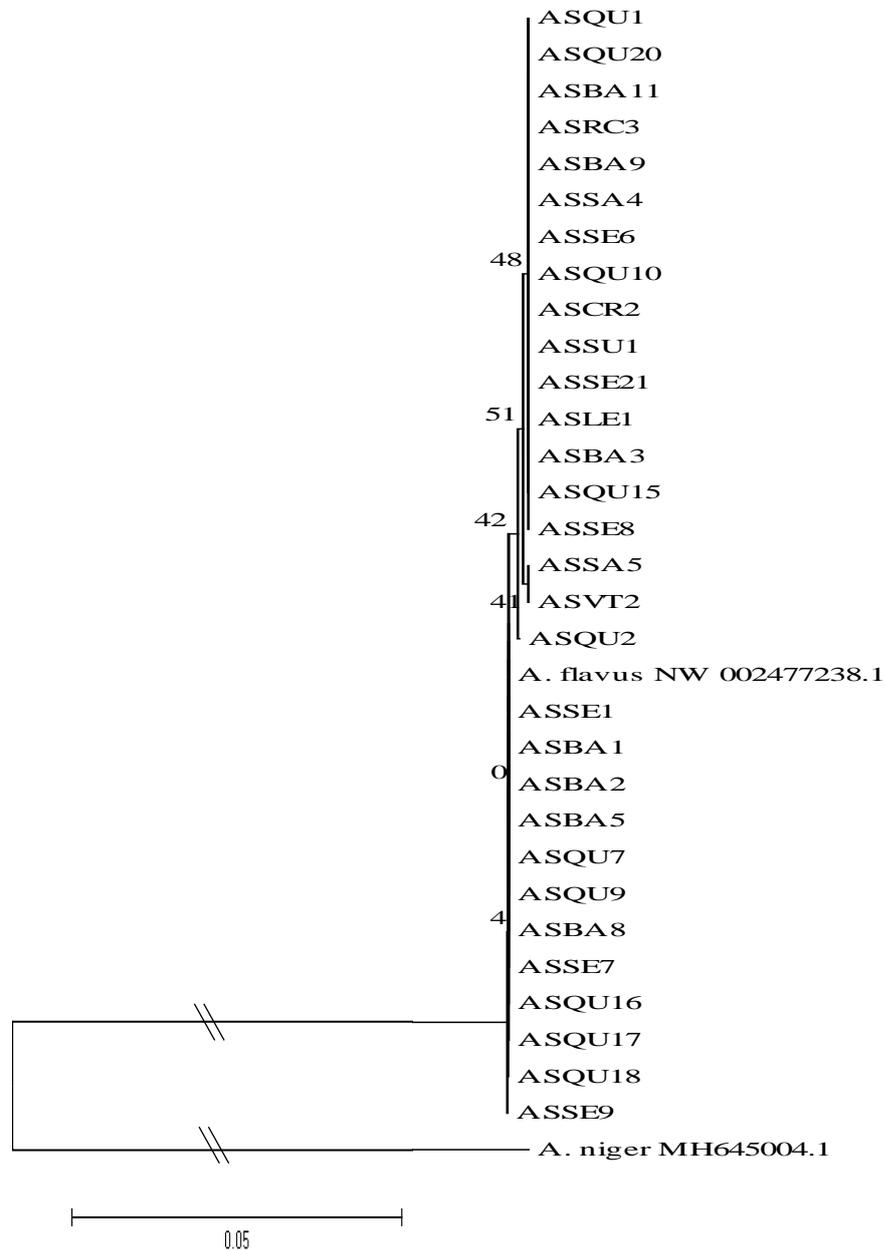


Figura 2.12. Árbol filogenético construido según el método estadístico Neighbor-Joining (NJ) basado en la relación entre segmentos de secuencias del gen *CaM* de aislamientos de *Aspergillus flavus* no productores de aflatoxinas de localidades representativas de distritos agroclimáticos de la Provincia de Santiago del Estero, este de Tucumán y norte de Córdoba. Los números de los nodos corresponden a los valores de soporte de bootstrap (10000 réplicas). *A. flavus* NW 002477238.1 fue elegida como secuencia de referencia y *A. niger* MH645004.1 como secuencia externa al grupo.

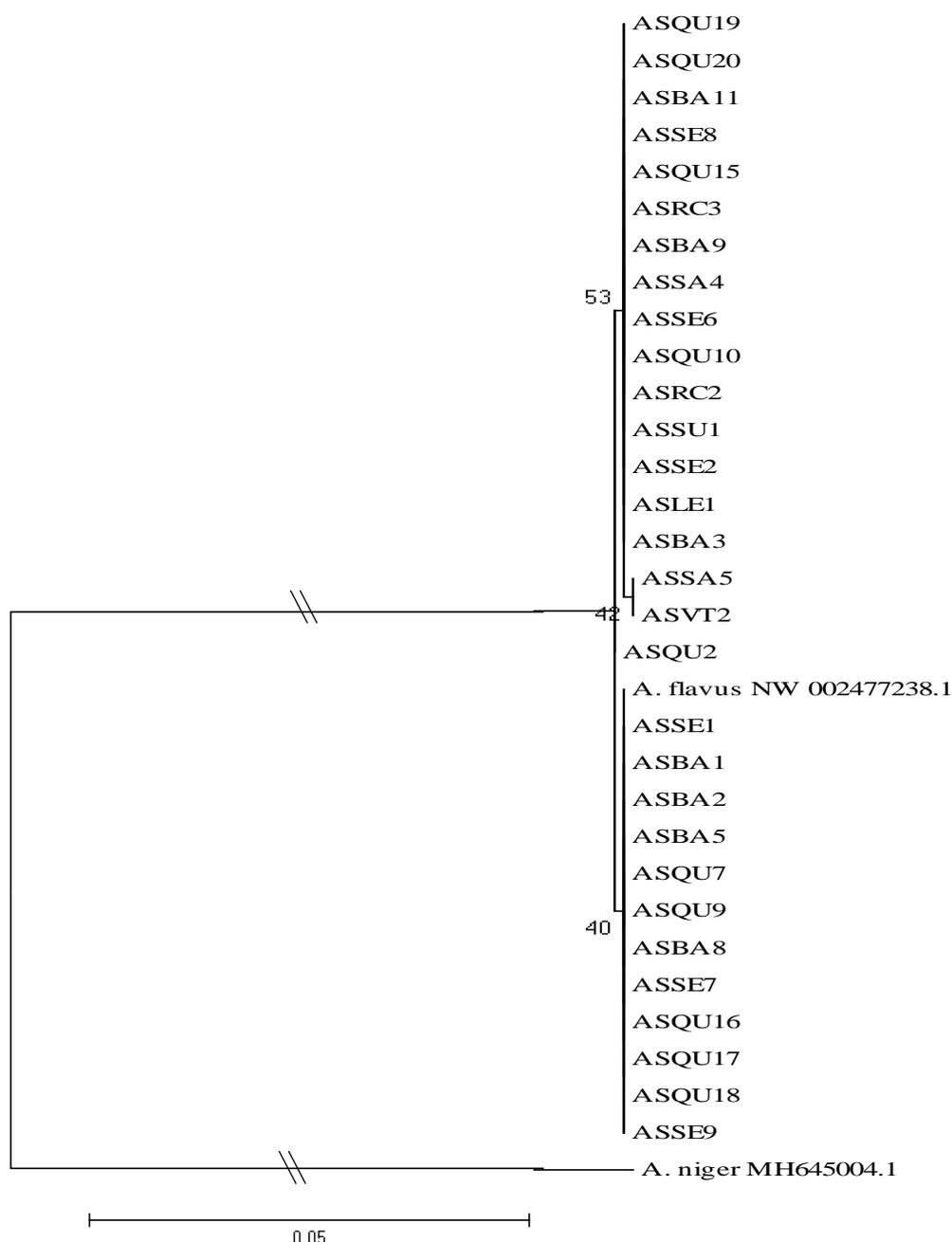


Figura 2.13. Árbol filogenético construido según el método estadístico Maximum-Likelihood (ML) basado en la relación entre segmentos de secuencias del gen *CaM* de aislamientos de *Aspergillus flavus* no productores de aflatoxinas de localidades representativas de distritos agroclimáticos de la Provincia de Santiago del Estero, este de Tucumán y norte de Córdoba. Los números de los nodos corresponden a los valores de soporte de bootstrap (10000 réplicas). *A. flavus* NW 002477238.1 fue elegida como secuencia de referencia y *A. niger* MH645004.1 como secuencia externa al grupo.

En este trabajo se utilizó un segmento del gen de la calmodulina porque presenta regiones conservadas y variables (Samson et al., 2014; Geiser et al., 2000), mientras que,

otras regiones muy estudiadas, tales como  $\beta$ -tubulina e ITS presentan problemas en las inferencias de relaciones (Geiser et al., 2007). En esta línea, Perrone *et al.* (2014b) utilizando un segmento del gen de la calmodulina estableció relaciones filogenéticas y agrupó aislamientos de *A. flavus*, provenientes de Ghana y Nigeria, en un mismo cluster. Por su parte, Samson *et al.* (2014), basándose en el mismo gen, ubicó alrededor de 1500 aislamientos de *Aspergillus* de la sección *Nigri* en 25 clados bien definidos, indicando que el gen es adecuado para identificar aislamientos en esta sección. También utilizando un segmento del gen de la calmodulina, Da Silva *et al.* (2020), pudieron estudiar la diversidad de especies dentro del clado *A. niger* en Brasil.

Por otro lado, Nadir *et al.* (2021) basándose en el gen de la calmodulina junto con segmentos del gen de la  $\beta$ -tubulina y la región ITS del rARN, demostró por primera vez la presencia de *A. vadensis* en China. Lo mismo hizo Varga *et al.* (2011) para proponer a *A. kambarensis* y a *A. fasciculatus* como sinónimos de *A. flavus*, mientras que Gonçalves *et al.* (2012) agrupó a estas dos especies junto con *A. oryzae*, un lugar filogenéticamente diferente de *A. flavus*, lo que da cuenta de la baja especificidad que pueden tener estos marcadores moleculares. Por su parte, Alshehri y Palanisamy (2020) utilizando marcadores como ITS,  $\beta$ -tubulina y calmodulina, identificaron las especies del género *Aspergillus* responsables de la keratitis infecciosa en humanos, concluyendo que la secuencia de Igen de la calmodulina fue la que mejor explicó la diversidad entre las especies del género. Pildain *et al.* (2008) usando segmentos del gen de la calmodulina y  $\beta$ -tubulina identificaron a *A. oryzae*, *A. thomii*, *A. kambarensis*, *A. fasciculatus* y a *A. subolivaceus* como especies estrechamente relacionadas a *A. flavus*. También utilizando estos dos genes, Rasheed *et al.* (2019) identificaron a *A. flavus*, *A. arachidicola*, *A. pseudonomius* y *A. novoparasiticus* en muestras provenientes de China, no pudiendo lograrlo con la región ITS del rADN. Resultados similares fueron reportados por Sivaraman *et al.* (2018), quienes no lograron ubicar a *A. flavus* y a *A. oryzae* en diferentes clados, al basarse en la región ITS del rADN.

De acuerdo a lo mencionado, calmodulina, al igual que  $\beta$ -tubulina son marcadores útiles para discriminar especies dentro de la sección *Flavi* (Nadir et al., 2021; Alshehri y Palanisamy, 2020; Da Silva et al., 2020; Singh et al., 2020, 2018; Kamaruddin y Zakaria, 2019; Makhoul et al., 2019; Kocsubé et al., 2016; Nováková et al., 2014; Kanbe et al., 2002), pero para especies de mayor similitud genética, resultan más eficientes los genes

relacionados al metabolismo secundario (Abdal Aziz y Ali, 2021; Yuan et al., 2019; Moore et al., 2009; Bhatnagar et al., 2006; Yu et al., 2005). Autores como Usman *et al.* (2019), Moore *et al.* (2009) y Geiser *et al.* (2000) reportaron que la utilización del cluster de genes de las aflatoxinas es una herramienta útil para realizar estudios filogenéticos en la sección *Flavi*.

## CONCLUSIONES

- No hubo diferencias significativas entre los medios DRBC y DG18 para el aislamiento de *A. flavus*, mientras que en el medio AFPA se observó desarrollo fúngico escaso que no permitió poner de manifiesto el reverso característico.
- La identidad de *A. flavus* fue corroborada con el test molecular basado en los iniciadores propuesto por González Salgado *et al.* (2011), mientras que el desarrollado por Devi Prameela *et al.* (2013) no permitió diferenciar a *A. flavus* de *A. parasiticus*.
- El gen *CaM* fue útil para corroborar la ubicación de todos los aislamientos en el clado *A. flavus*.
- Se evidencia la alta prevalencia del patógeno en la región y su presencia activa en las dos campañas analizadas.
- Los híbridos comerciales y los maíces para autoconsumo analizados y cultivados en los ocho distritos agroclimáticos resultaron infectados con *A. flavus*.
- No se observaron diferencias significativas en la proporción de aislamientos aflatoxigénicos entre híbridos comerciales y maíces para autoconsumo.
- Se evidenció una proporción similar de aislamientos aflatoxigénicos y no aflatoxigénicos, con producción de ACP en todos los aislados. Dos aislamientos produjeron elevados niveles de AFB<sub>1</sub>, ASSE3 en Santiago del Estero durante la campaña 2016/17 y ASQU11 en Quimilí durante la campaña 2015/16.
- La población de *A. flavus* analizada presenta poca variación de morfotipos de esclerocios.
- El gen *CaM* no resultó un marcador adecuado para evaluar la diversidad genética de la población no aflatoxigénica, requiriéndose el análisis de regiones menos conservadas y relacionadas al metabolismo secundario del hongo para estudiar con mayor profundidad la diversidad genética de los aislamientos.

## CAPÍTULO 3

# COMPORTAMIENTO DE HÍBRIDOS DE MAÍZ CON DIFERENTE BASE GENÉTICA ANTE LA INFECCIÓN DE ESPIGAS CON *Aspergillus flavus*

## INTRODUCCIÓN

La región conformada por la Provincia de Santiago del Estero, el norte de Córdoba y el este de Tucumán es responsable de entre 6 y 12 millones de toneladas de maíz, de las 60 millones que se producen anualmente en el país (MAGyP, 2020). El desarrollo de tecnologías de insumos y procesos, como son los nuevos híbridos lanzados al mercado anualmente y los cambios en el manejo de los recursos productivos, sumados a modificaciones en los regímenes hídricos y térmicos producto del cambio climático, posibilitaron la modificación de los agroecosistemas originales de la región (Cardini et al., 2018; Ginzo, 2015). En ellos, el cultivo de maíz encontró condiciones propicias para su rápida expansión, pero sin estar exento a numerosos agentes bióticos y abióticos que deprimen rendimiento y calidad de granos (De Rossi et al., 2017; Presello et al., 2016; Martinez et al., 2010; Wu, 2007; Folcher et al., 2006).

Las plagas insectiles y fúngicas que atacan a la espiga son un componente importante en la disminución de la rentabilidad en las producciones agrícolas de la región. Entre las primeras se encuentran el “gusano cogollero” (*Spodoptera frugiperda*) y la “isoca de la espiga” (*Heliothis=Helicoverpa zea*). Las larvas de *S. frugiperda* tienen hábitos cortadores, defoliadores y cogolleros, pudiendo alimentarse de los granos, mientras que las larvas de *H. zea* dañan los estigmas, penetran en la espiga y la consumen (Pogue, 2002). Además del daño directo en el grano de maíz, facilitan la colonización de patógenos fúngicos que deterioran la espiga (Dos Santos Almeida et al., 2016; Munkvold et al., 2012; Wu, 2007; Garcia et al., 2006; Boiça et al., 2001).

Los maíces transgénicos resistentes a insectos o Bt son plantas modificadas por ingeniería genética que expresan proteínas insecticidas provenientes de la bacteria esporuladora *Bacillus thuringiensis*, la cual produce 2 tipos de toxinas: proteínas Cry (Van

Frankenhuyzen, 2009) y proteínas Vip “*Vegetative Insecticidal Protein*” (Bravo et al., 2012).

Más del 96 % de los maíces sembrados en el país son transgénicos (ArgenBio, 2019) y la liberación continua al mercado de híbridos Bt, con nuevos y más apilamientos de genes que expresan diferentes toxinas, es una de las herramientas disponibles para enfrentar esta problemática. La mencionada tecnología debe estar acompañada de la realización de refugios por parte del productor, con la finalidad de retrasar la aparición de insectos resistentes, de los cuales se cuenta con evidencia en la actualidad (Trumper, 2014).

En adición al daño causado por los insectos, las condiciones agroecológicas y el germoplasma utilizado afectan el desarrollo del cultivo y lo predisponen a la infección de numerosos patógenos fúngicos asociados a la podredumbre de la espiga, tales como especies de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Diplodia* (De Rossi et al., 2017; Mahmoud et al., 2013; Presello et al., 2004; Etcheverry et al., 1999), siendo algunas de ellas, responsables de la contaminación de los granos con micotoxinas nocivas para la salud humana y animal (Chulze, 2010; Martinez et al., 2010; Santos Chona, 2010).

Las aflatoxinas producidas por *A. flavus*, son responsables de graves problemas de contaminación en la mayoría de los agroecosistemas mundiales (Camiletti et al., 2018, 2017; Cardwell y Cotty, 2002; McGee et al., 1996), produciendo pérdidas de rendimiento y de calidad de los granos cosechados. El consumo de alimentos contaminados, además de ser causal de enfermedades que pueden resultar fatales, producen cuantiosos costos económicos y pérdida de productividad (Gizachew et al., 2016; Presello et al., 2016, 2014a, 2009), por lo que la presencia de micotoxinas en granos constituye una de las principales barreras que afectan la comercialización de granos de maíz en el mundo (Presello et al., 2008).

La contaminación por micotoxinas evidencia un desafío importante para la inocuidad de los alimentos (López et al., 1999), especialmente en países o regiones con clima tropical y/o subtropical, donde se estima que alrededor de 4,5 billones de personas están expuestas a aflatoxinas (Villers, 2014). De esta manera, adquieren importancia diferentes tácticas para reducir la infección del cultivo por *A. flavus* y su posterior

contaminación con aflatoxinas, como las orientadas a reducir el estrés en el cultivo a través de fertilización adecuada, manejo de fecha y densidad de siembra, control de malezas, aplicación de fungicidas sintéticos o biológicos, control de insectos, humedad y calidad de cosecha y condiciones de almacenamiento que eviten el desarrollo del patógeno (Chalivendra et al., 2020; Krnjaja et al., 2019; Chulze, 2010), siendo el empleo de cultivares resistentes la mejor estrategia para reducir la contaminación con micotoxinas en granos (Logrieco et al., 2021; Guo et al., 2017; Presello et al., 2016; Amare y Keller, 2014; Martínez Padrón et al., 2013; Wiatrak et al., 2005; Bruns, 2003). Varios factores se encuentran asociados a la resistencia a la infección por *A. flavus* y a la acumulación de aflatoxinas como son la rigidez de la chala, la resistencia a nivel de pericarpio y subpericarpio (Cary et al., 2011), la producción de proteínas relacionadas a la inhibición del crecimiento del hongo como es la inhibidora de la tripsina (TI) (Chen et al., 2016), las poliaminas y su rol en la defensa de la planta frente a estreses (Majumdar et al., 2019), el nivel de ácido linoleico (Scarpari et al., 2014) y el metabolismo de las oxilipinas en plantas de maíz (Battilani et al., 2018). Además de la identificación de genes relacionados a la resistencia a la infección y/o contaminación con aflatoxinas (Prasad et al., 2019; Hawkins et al., 2018), la sobreexpresión de genes antifúngicos que codifican proteínas o péptidos asociados a la resistencia (Rajasekaran et al., 2018), el silenciamiento de genes inducido por el huésped basados en la interferencia de ARN (Gilbert et al., 2018; Ojiambo et al., 2018) y el uso de tecnologías de edición de genes, como CRISPR/Cas9, para el silenciamiento o la introducción de genes de resistencia en el maíz (Gao, 2018).

El objetivo de este capítulo fue evaluar las tecnologías Bt presentes en híbridos de maíz en la región frente a la infección natural por *A. flavus* y el comportamiento de híbridos de maíz frente a la inoculación con aislamientos aflatoxigénicos del hongo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevaron a cabo dos ensayos experimentales (A y B) para estudiar la relación entre híbridos comerciales empleados en la región en estudio (Figura 3.1), el daño por orugas en espigas, el porcentaje de infección por *A. flavus* y la acumulación de AFB<sub>1</sub>.

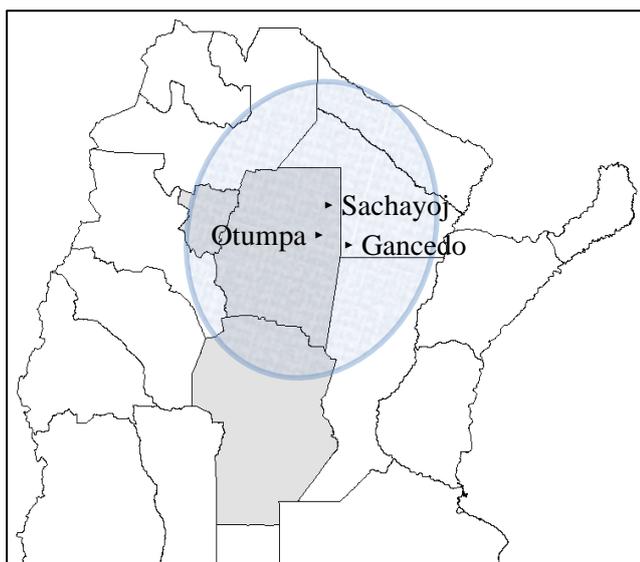


Figura 3.1. Localidades evaluadas en las provincias de Santiago del Estero y del Chaco en ensayos de análisis de tecnologías Bt frente a la infección natural por *Aspergillus flavus* y de comportamiento de híbridos de maíz frente a la inoculación con aislamientos toxigénicos del hongo.

En el ensayo A se evaluaron dos híbridos comerciales con diferentes eventos genéticos (Bt e isolíneas no Bt) sembrados en la Provincia de Santiago del Estero, totalizando cinco materiales genéticos frente a la infección natural por *A. flavus*, correlacionando el daño causado por insectos y la presencia de aflatoxinas, determinadas por HPLC, en espigas de.

En el ensayo B se evaluó el comportamiento de cinco híbridos de maíz empleados comercialmente en la Provincia de Santiago del Estero y región colindante frente a la inoculación con aislamientos aflatoxigénicos de *A. flavus*.

### ENSAYO A

Se realizó en la campaña agrícola 2017/18 en la localidad de Otumpa, Santiago del Estero, Argentina (-27.2155°; -62.0627°; 156 msnm) sobre un suelo Haplustol típico

(INTA, 2019). El estudio consistió en 5 tratamientos conformados por híbridos templados comerciales con diferentes proteínas introducidas para el control de lepidópteros (ISAAA, 2019) (Tabla 3.1) T1: 510PW, T2: 510PWU, T3: 510RR, T4: DK7210VT3Pro y T5: DK7210RR. La implantación del cultivo se realizó en siembra directa el 15 de enero de 2018 en un lote con antecesor soja. Las parcelas fueron de 546 m<sup>2</sup> formadas por 7 surcos con 0,52 m de espaciamiento ente hileras y 150 m de largo con una densidad de 5,67 plantas.m<sup>-2</sup>.

Tabla 3.1. Híbridos comerciales evaluados en la campaña 2017/18 y sus correspondientes proteínas introducidas para el control de lepidópteros.

Tratamientos	Tecnología	Proteína (transgenes introducidos)
510PW	Powercore (PW)	Cry1F, Cry1A.105 y Cry2Ab2
510PWU	Powercore ultra (PWU)	Cry1F, Cry1A.105, Cry2Ab2 y Vip3Aa20
510RR		No Bt
DK7210VT3Pro	VT Triple Pro	Cry1A105, Cry2Ab2 y Cry3Bb1
DK7210RR		No Bt

Los registros de precipitaciones y temperaturas se tomaron de la estación agrometeorológica del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Quimilí, Santiago del Estero, Argentina (Figura 3.2).

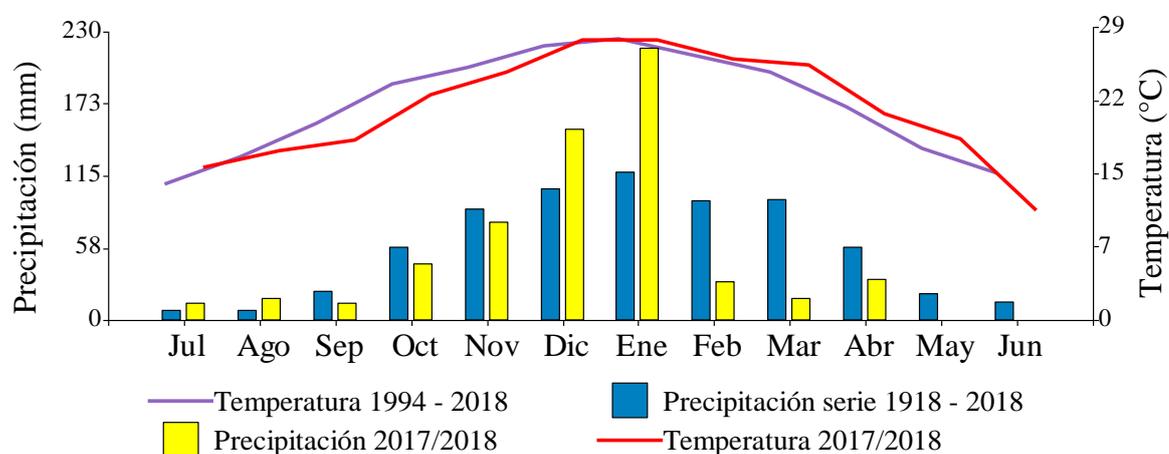


Figura 3.2. Diagrama ombrotérmico de la localidad de Quimilí (Provincia de Santiago del Estero) durante la campaña agrícola 2017/18.

Cuando el cultivo alcanzó la madurez fisiológica (julio) se recolectaron 300 espigas sobre los 5 surcos centrales de cada tratamiento y posteriormente se determinó la severidad del daño por orugas en espiga, estimada como el porcentaje de área dañada por espiga

muestreada. A los fines prácticos del presente estudio se analizó la proporción de espigas con severidad mayor a 3 %.

Se trilló manualmente cada espiga, los granos obtenidos se secaron en estufa para lograr una humedad final de 14 %, humedad comercial del maíz, y se determinó el rendimiento ( $\text{g. espiga}^{-1}$ ).

Se detectó y cuantificó la producción de  $\text{AFB}_1$  en los diferentes genotipos siguiendo la metodología propuesta por Alaniz Zanon *et al.* (2018). Para ello, cada muestra se molió y homogeneizó para obtener 25 g de granos molidos de maíz. Posteriormente, se colocaron en frascos Erlenmeyer y se adicionó el solvente de extracción acetoneitrilo: agua (84:16, V/V), se agitó durante 30 minutos en agitador orbital (Figura 3.3) y se filtró el sobrenadante utilizando papel Whatman N°4. Se pasaron 5 mL del extracto crudo a través de una columna de limpieza MycoSep<sup>®</sup>224 AflaZon (Laboratorios Romer, USA) (Figura 3.4), se recuperaron 2 mL del extracto purificado, se colocaron en un vial y se evaporaron hasta sequedad con nitrógeno gaseoso.



Figura 3.3. Frascos Erlenmeyer conteniendo maíz molido y solvente de extracción acetoneitrilo: agua (84:16, V/V) en agitador orbital.



Figura 3.4. Extracto crudo filtrado en columna de limpieza MycoSep®224 AflaZon.

Posteriormente, se resuspendió el extracto seco de cada muestra en 200  $\mu\text{L}$  de fase móvil acetonitrilo: metanol:  $\text{H}_2\text{O}$  (17:17:66, V/V/V) y se prosiguió la reacción de derivatización descrita previamente en la sección materiales y métodos del capítulo 2. Se inyectaron manualmente 50  $\mu\text{L}$  en el sistema HPLC el cual consistió en una bomba Hewlett Packard modelo 1100 (Hewlett Packard, Palo Alto, CA) conectada a un detector de fluorescencia Hewlett Packard modelo 1046A y un módulo de datos Hewlett Packard Kayak XA (HP ChemStation Rev.A.06.01). Las separaciones cromatográficas se realizaron en columna C18 de fase reversa, de acero inoxidable (150 mm x 4,6 mm i.d., 5  $\mu\text{m}$  tamaño de partícula; Luna-Phenomenex, Torrance, CA, USA) conectada a una pre-columna C18, de acero inoxidable (20 mm x 4,6 mm i.d., 5  $\mu\text{m}$  tamaño de partícula, Luna-Phenomenex, Torrance, CA, USA). Se utilizó la fase móvil acetonitrilo: metanol:  $\text{H}_2\text{O}$  (17:17:66, V/V/V) a una velocidad de flujo de 1,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  y solventes marca Biopack. Se realizó el análisis cuantitativo mediante normalización del área de los picos y se elaboró una curva de calibración a partir de las áreas obtenidas para diferentes concentraciones de estándares de  $\text{AFB}_1$  (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). El límite de detección de aflatoxinas fue de 1  $\text{ng g}^{-1}$  (Doster et al., 2014).

Se determinó la relación entre el porcentaje de espigas dañadas por orugas, el rendimiento para cada tratamiento y la concentración de aflatoxinas.

## ENSAYO B

El ensayo se realizó durante las campañas agrícolas 2018/19 y 2019/20 en las localidades de Sachayoj, Provincia de Santiago del Estero (-26.6884; -61.9637; 190 msnm) sobre un suelo Argiustol típico y de Gancedo, Provincia de Chaco (-27.4429; -61.7890°; 90 msnm) sobre suelo Haplustol údico (INTA, 2019), ambos con cultivo antecesor soja. El experimento consistió en un ensayo multifactorial en 3 bloques completos aleatorizados en donde se evaluaron 5 híbridos comerciales de amplio empleo en la región junto con P1366VYHR como control resistente a la podredumbre de la espiga por *A. flavus* (Ph.D. Sergio Uhart, comunicación personal) (Tabla 3.2). Cada parcela experimental constó de 4 surcos de ancho sembrados a 0,52 m ente sí con una extensión de 4 m, delimitando una superficie de 6,24 m<sup>2</sup>. En la localidad de Sachayoj, los híbridos se sembraron el 23/01/2019 y el 3/01/2020, con 3,15 pl.m<sup>-1</sup>, mientras que en Gancedo las siembras se realizaron el 26/01/2019 y el 20/01/2020, con 3,17 pl.m<sup>-1</sup>.

Tabla 3.2. Características de los híbridos comerciales evaluados en las campañas 2018/19 y 2019/20 junto a sus tecnologías para el control de insectos en las localidades de Sachayoj (Provincia de Santiago del Estero) y Gancedo (Provincia del Chaco).

Híbridos	Tecnología	Proteína (transgenes introducidos)
DK7210VT3Pro	VT Triple Pro	Cry1A105, Cry2Ab2 y Cry3Bb1
P2089VYHR	Leptra	Cry1F, Cry1Ab, Vip3A
Next 22.6PWU	Powercore ultra	Cry1F, Cry1A.105, Cry2Ab2 y Vip3Aa20
Next 25.8PWU	Powercore ultra	Cry1F, Cry1A.105, Cry2Ab2 y Vip3Aa20
DS510PWU	Powercore ultra	Cry1F, Cry1A.105, Cry2Ab2 y Vip3Aa20
P1366VYHR (Control Tolerante)	Leptra	Cry1F, Cry1Ab, Vip3

Los datos meteorológicos de ambas campañas agrícolas fueron obtenidos de la estación agrometeorológica de la estancia “El Estribo” (Sachayoj, Provincia de Santiago del Estero) y de la estancia “Santa Guillermina” (Gancedo, Provincia del Chaco). En Sachayoj la precipitación acumulada fue de 1.105 mm y 842 mm, con 172 mm y 102 mm durante el período crítico del cultivo (marzo, correspondiente a la floración del maíz), en las campañas 2018/19 y 2019/20 respectivamente (Figura 3.5). Mientras que en Gancedo la precipitación acumulada fue de 1.250 mm y 845 mm, con 225 mm y 35 mm durante el período crítico del cultivo, durante 2018/19 y 2019/20 respectivamente (Figura 3.6).

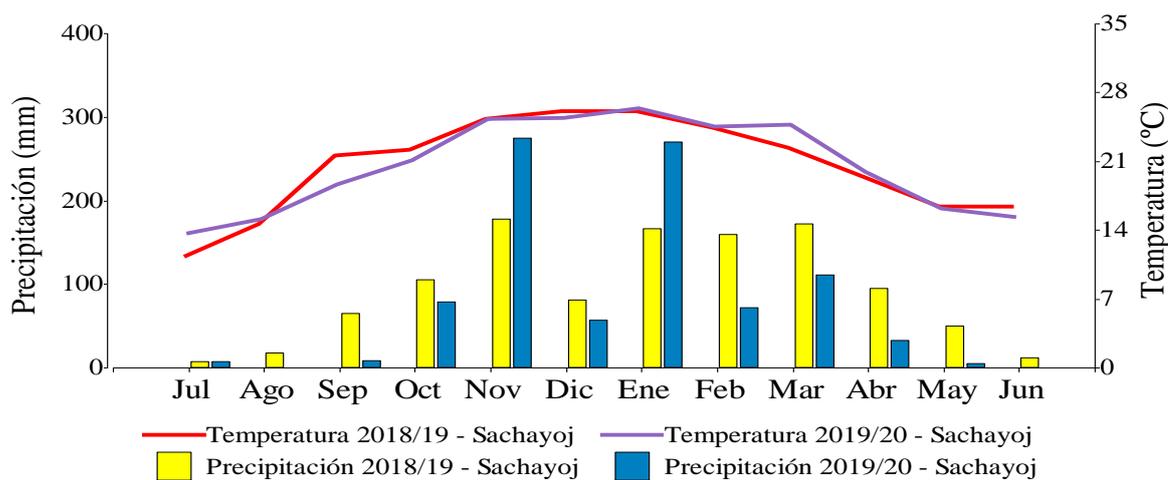


Figura 3.5. Diagrama ombrotérmico de la localidad de Sachayoj (Provincia de Santiago del Estero) durante las campañas agrícolas 2018/19 y 2019/20.

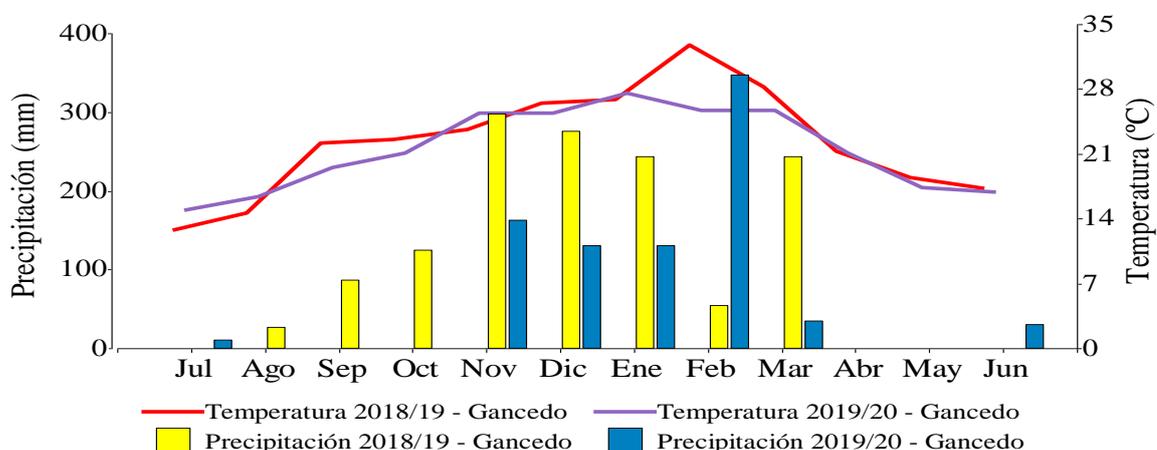


Figura 3.6. Diagrama ombrotérmico de la localidad de Gancedo (Provincia del Chaco) en las campañas agrícolas 2018/19 y 2019/20.

De los aislamientos de *A. flavus* y a los cuales se les determinó la capacidad de producir aflatoxinas en el capítulo 2, se seleccionaron ASSE3, ASQU11 y ASQU16, el primero de ellos colectado en la localidad de Santiago del Estero y los dos últimos en Quimilí, todos en la Provincia de Santiago del Estero, debido a su alta producción de AFB<sub>1</sub>, 48.958 ng.g<sup>-1</sup>, 2.521 ng.g<sup>-1</sup> y 499 ng.g<sup>-1</sup>, respectivamente. Se tomaron 8 µl de cada uno de los 3 aislamientos almacenados y conservados a 4 °C en la Micoteca del IPAVE – CIAP – INTA y se sembraron en medio MEA, incubándose durante 7 días a 25 °C (Pitt y Hocking, 2009). Luego de dicho período, se realizó una suspensión de esporas en agua destilada estéril, se contabilizaron las esporas en hematócmetro (cámara de Neubauer) y previo a la salida a campo e inoculación, se elaboró un inóculo mixto con partes iguales de cada aislamiento con una concentración individual de 10<sup>3</sup> esporas.mL<sup>-1</sup> (Rodríguez, 2018).

Cuando el cultivo alcanzó el estado fenológico R1 (Ritchie y Hanway, 1982), 10 espigas al azar de los 2 surcos centrales de cada parcela, se inocularon con jeringa automática (tratamiento Inoculado). Para ello, se inyectaron 2 mL de la suspensión conidial del inóculo mixto en el canal de los estigmas, en la parte apical de la espiga y siendo cada planta inoculada marcada con cintas de tela y pintura en una porción del tallo para su posterior identificación (Rodríguez, 2018). Al llegar a la madurez fisiológica se recolectaron las 10 espigas inoculadas de cada parcela, junto con su espiga vecina más próxima no inoculada, constituyendo esta última, el tratamiento No Inoculado. Se trillo cada espiga, se ajustó la humedad del grano a 14 % y se estimó el rendimiento ( $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) según lo detallado en el punto anterior.

En cada muestra, de cada tratamiento, se determinaron dos parámetros: porcentaje de granos cosechados infectados con *A. flavus*, medido como el porcentaje de granos con crecimiento del hongo sobre el total de granos analizados y acumulación de AFB<sub>1</sub>. Para el primero, se tomaron 100 granos de cada muestra, se les realizó desinfección superficial con inmersión en hipoclorito de sodio al 1 % y 3 lavados consecutivos con agua destilada estéril, se sembraron en bandeja plástica (50 granos por bandeja) esterilizada con óxido de etileno, en medio DG18 (Figura 3.7) y se incubaron en estufa durante 7 días a 25 °C (Pitt y Hocking, 2009) Luego, se corroboró la especie fúngica mediante clave taxonómica para la identificación de especies del género *Aspergillus* (Klich, 2002).



Figura 3.7. Granos de maíz sembrados en medio DG18 para la determinación de su carga fúngica a los 7 días de incubación a 25° C.

La producción de AFB<sub>1</sub> de los diferentes germoplasmas se cuantificó por HPLC con detección de fluorescencia y limpieza por extracción en fase sólida según se detalla en el ensayo A, y se exploró la relación entre los híbridos evaluados, el rendimiento, el porcentaje de infección por el hongo y la concentración de aflatoxinas.

## **SEGURIDAD**

Debido a que AFB<sub>1</sub> es una micotoxina altamente tóxica, la manipulación de todos los ensayos de esta tesis se realizaron con cuidado y utilizando ropa de cobertura, guantes quirúrgicos y semimáscara 3M 6200 con cartucho 6001. El material de vidrio utilizado y los residuos generados se descontaminaron durante 30 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 10 % y sobre eso mismo, una vez transcurrida la primera media hora, se agregó una solución de acetona al 10 % y se dejó actuar otra media hora.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico se realizó con el software estadístico InfoStat (Di Rienzo et al., 2020) y las diferencias entre medias se compararon con el test DGC con 5 % de significancia, para el ensayo A y con el test LSD Fisher con un 5 % de significancia para el ensayo B.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## ENSAYO A

El análisis de las diferencias entre medias de rendimiento para cada tratamiento permitió identificar tres grupos en orden decreciente de rendimiento: el primero integrado por el híbrido 510PWU con  $162,76 \text{ g.espiga}^{-1}$ , seguido por el híbrido DK7210VT3Pro con  $155,87 \text{ g.espiga}^{-1}$  y finalmente el grupo conformado por los híbridos 510RR, DK7210RR y 510PW con  $145,89 \text{ g.espiga}^{-1}$ ,  $143,06 \text{ g.espiga}^{-1}$  y  $139,55 \text{ g.espiga}^{-1}$ , respectivamente (Figura 3.8). Ma y Subedi (2005) encontraron que bajo condiciones controladas en las que no había daño por orugas no se evidenciaron diferencias entre híbridos Bt y no Bt, por lo que se infiere que las diferencias de rendimiento son producidas por el daño causado por la alimentación de las orugas en las espigas (Marques et al., 2019; Bowen et al., 2014; Casmuz et al., 2010; Betancourt y Scatoni, 2006). Asociado a esto, Bernardi *et al.* (2016) encontraron que larvas de *S. frugiperda* sobreviven menos tiempo en granos de maíces Bt que en no Bt, lo que indicaría menor tiempo de alimentación y consecuentemente menor daño en la espiga.

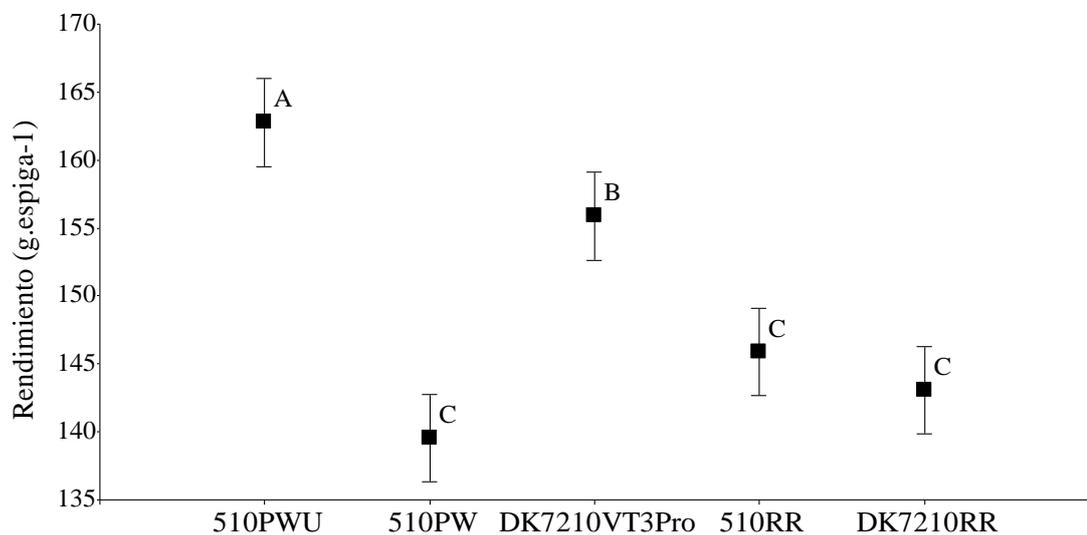


Figura 3.8. Media de rendimiento para 5 híbridos comerciales Bt (510PWU, 510PW y DK7210VT3Pro) y no Bt (510RR y DK7210RR) en Santiago del Estero, Argentina. Campaña agrícola 2017/18. Los valores medios seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ; Test DGC).

Se observaron diferencias significativas en la proporción de espigas con severidad de daño por orugas mayor a 3 % (Figura 3.9). El híbrido 510RR fue el más dañado por orugas de la espiga, seguido por los híbridos DK7210RR y DK7210VT3Pro; finalmente los híbridos 510PWU y 510PW fueron los que mejor comportamiento presentaron, con menor proporción de espigas dañadas (Figura 3.10). Waquil *et al.* (2013) hallaron diferencias en el daño en espigas de maíz causados por *S. frugiperda*, siendo mayor en híbridos con una sola proteína Cry respecto a híbridos con dos proteínas Cry apiladas. Marques *et al.* (2019) encontraron que el evento Vip3Aa20 y el apilamiento del mismo con diferentes proteínas Cry reducían significativamente el daño de *H. zea* en espigas de maíz respecto a sus correspondientes isohíbridos no Bt. Balbi y Flores (2015) analizaron la presencia de orugas de *H. zea* en espigas de diferentes híbridos Bt, encontrando que los híbridos que poseían la tecnología Víptera (Cry1Ab, Vip3Aa20, mCry3A) tenían solo 7,5 % de las espigas con presencia de orugas, seguido por VT3Pro (Cry1A.105 + Cry2Ab + Cry3Bb1) con 58 %, luego por Powercore (Cry1A.105 + Cry2Ab + Cry1Fa2) con 83 %, y finalmente los híbridos con tecnología TDMax (Cry1Ab) poseían la totalidad de las espigas estudiadas con presencia de orugas.



Figura 3.9. Espiga de maíz con tecnología PWV sin daños por orugas (izquierda) y espiga de maíz con tecnología RR dañada por orugas (derecha).

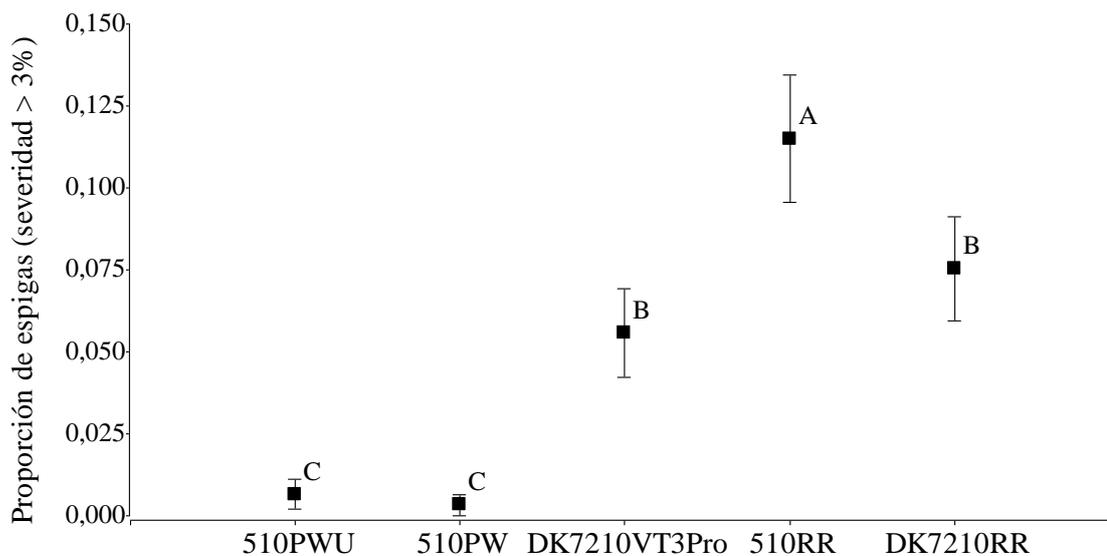


Figura 3.10. Proporción de individuos con severidad de daño por orugas mayor a 3% para cinco híbridos comerciales Bt (510 PWU, 510 PW y DK7210 VT3Pro) y no Bt (510 RR y DK 7210 RR) en Santiago del Estero, Argentina. Campaña agrícola 2017/18. Los valores medios seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ; Test DGC).

No se detectó la presencia de AFB<sub>1</sub> en los diferentes híbridos comerciales evaluados. Esto puede estar asociado a que en la campaña agrícola 2017/18 la precipitación acumulada fue de 674 mm, coincidente con la precipitación promedio de la zona, la cual se encuentra entre los 600 mm y 700 mm anuales (Galván et al., 2003), durante el ciclo del cultivo fue de 299 mm y en el transcurso del período crítico del cultivo, correspondiente a dos semanas pre y post floración (Presello et al., 2012), la precipitación acumulada fue de 17 mm registrándose al final de dicho período. Probablemente el cultivo no sufrió un estrés hídrico importante y de estar presentes hongos aflatoxigénicos, no se dieron las condiciones adecuadas para producir aflatoxinas (Coppock et al., 2018; Tola y Kebede, 2016; Darwish et al., 2014; Villers, 2014; Ni et al., 2011).

Para todos los híbridos se observó correlación negativa significativa entre la severidad de daño por orugas y el rendimiento (-0,25), mientras que no se observó correlación entre la severidad y la concentración de AFB<sub>1</sub>. Resultados diferentes fueron reportados por Gradziel *et al.* (1995) y Lynch y Wilson (1991) en cultivos de maní y nueces respectivamente, al encontrar una correlación positiva entre las aflatoxinas y el daño por insectos. Wicklow (1991) encontró que cuando se duplicaba el porcentaje de daño por lepidópteros en espigas de maíz el contenido de aflatoxinas se incrementaba 20 veces. Wu (2007) y Williams *et al.* (2005) estudiaron el daño por orugas en espigas de

maíz en diferentes híbridos Bt y no Bt, reportando que, al incrementarse el daño en las espigas, también aumentaba la concentración de aflatoxinas en los granos de las mismas. Cardwell y Cotty (2002) informaron que el nivel de infección de espigas de maíz con *A. flavus* y *Fusarium verticillioides* fue menor en híbridos Bt respecto a sus isolíneas no Bt, indicando que existiría una relación directa con el daño de orugas en espigas de maíz e indirectamente con la concentración de aflatoxinas, al suponer la relación existente entre la infección por el hongo y la producción de esta micotoxina. Similares resultados obtuvieron Bakan *et al.* (2002) al estudiar la presencia de hongos del género *Fusarium* en híbridos Bt y no Bt. Al igual que lo que ocurre con las aflatoxinas, Folcher *et al.* (2010) reportaron que los niveles de fumonisinas, producidas por hongos del género *Fusarium*, eran menores en híbridos Bt respecto a no Bt.

## **ENSAYO B**

En este ensayo se midieron tres parámetros en los seis híbridos analizados: rendimiento, porcentaje de granos infectados con *A. flavus* y acumulación de AFB<sub>1</sub>. El estudio de la disminución del rendimiento entre los tratamientos Inoculado y No Inoculado permitió observar diferencias significativas entre ellos con disminución del rendimiento de 4 % (395 kg.ha<sup>-1</sup>), lo que da cuenta del efecto que *A. flavus* tiene sobre el rendimiento del cultivo (Figura 3.11) independientemente de la producción de la toxina, de acuerdo a lo reportado por Rehman *et al.* (2021), Molo *et al.* (2019) y De Rossi *et al.* (2017). Técnicas menos agresivas como la inoculación a través del asperjado de los estigmas, también reportaron estas diferencias entre tratamientos (Zafar *et al.*, 2021), pero existen reportes contradictorios respecto a su efectividad, lo que además, resulta afectado por condiciones ambientales, localización de los ensayos y germoplasmas evaluados (Windham y Williams, 2016; Williams y Windham, 2012).

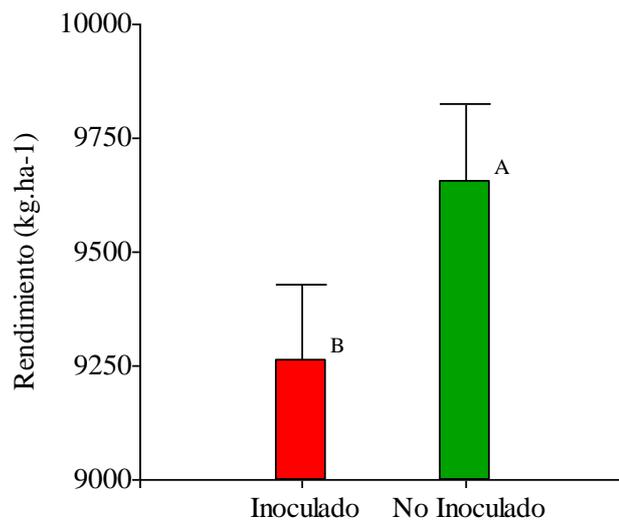


Figura 3.11. Medias de rendimiento para tratamiento Inoculado respecto a No inoculado con los aislamientos nativos ASSE3, ASQU11 y ASQU16 de *Aspergillus flavus* productores de aflatoxinas, durante las campañas agrícolas 2018/19 y 2019/20 en Sachayoj, Provincia de Santiago del Estero y Gancedo, Provincia del Chaco. Los valores medios seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ; Test LSD).

El análisis de las diferencias entre los rendimientos medios para cada híbrido obtenidos durante las campañas agrícolas 2018/19 y 2019/20 permitió identificar al híbrido P2089VYHR como el de mejor performance, con un rendimiento de  $11.089 \text{ kg.ha}^{-1}$ , durante 2018/19, coincidente con la campaña que registró las mayores precipitaciones, mientras que el híbrido menos rendidor fue P1366VYHR con  $7.747 \text{ kg.ha}^{-1}$  durante la campaña agrícola siguiente. El resto de los híbridos no mostraron diferencias significativas entre ellos, con rendimientos entre  $8.900 \text{ kg.ha}^{-1}$  y  $10.000 \text{ kg.ha}^{-1}$  (Figura 3.12), al igual que la interacción híbrido x tratamiento. Si bien las localidades pertenecen a ambientes agroclimáticos distintos, no se observaron diferencias entre ellas ni entre campañas. Esto se debe a que durante la campaña 2018/19 la región fue afectada por un evento Niño - ENSO muy fuerte, seguido por una campaña agrícola con transición hacia un evento Neutro - ENSO (Null, 2021; SMN, 2021), los cuales se caracterizan por precipitaciones por encima del registro normal y con distribución uniforme (Heinzenknecht, 2011; Kurtz et al., 1998), por lo que estas condiciones climáticas impidieron explorar la variabilidad ambiental existente en la región estudiada.

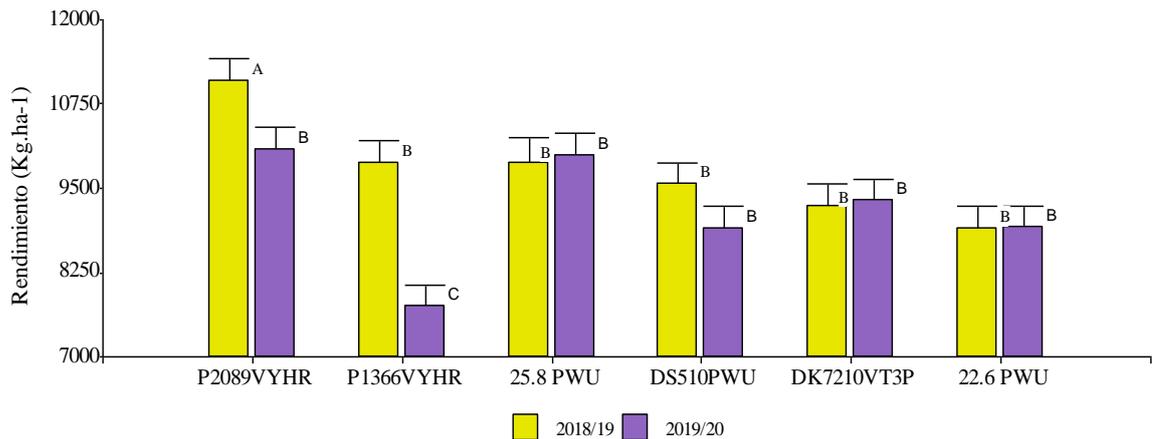


Figura 3.12. Medias de rendimiento de seis híbridos comerciales durante las campañas agrícolas 2018/19 y 2019/20. Los valores medios seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ; Test LSD).

La infección con *A. flavus* mostró diferencias significativas entre los tratamientos y las campañas agrícolas, alcanzando el tratamiento Inoculado niveles de infección promedio por encima del 50 % en ambas campañas (Figura 3.13). Estos valores son esperables en inoculaciones artificiales y en condiciones de escasas precipitaciones al momento de la floración y elevadas temperaturas (Giorni et al., 2016), siendo estas últimas frecuentes en la región de estudio (Figuras 3.5 y 3.6). La infección natural ocurrida bajo el tratamiento No Inoculado reportó mayor porcentaje de infección durante 2019/20, coincidente con la campaña agrícola con menores precipitaciones durante la floración del maíz (marzo, 198 mm promedio en 2018/19 versus 68 mm promedio en 2019/20), sometiendo al cultivo a estrés hídrico junto al térmico característico de la región y favoreciendo, de esta manera, la infección y desarrollo del patógeno (Massomo 2020; De Rossi et al. 2017; Presello et al. 2016; Bhatnagar et al. 2015). En esta línea y para la misma región de estudio, Camiletti *et al.* (2017) reportaron diferencias en los niveles de infección natural por *A. flavus* en granos de maíz a campo, asociadas a campañas agrícolas con períodos de sequía estresantes para el cultivo. Presello *et al.* (2004) también indicaron que son esperables elevados niveles de infección por *Aspergillus* cuando se producen sequías durante la floración del maíz.

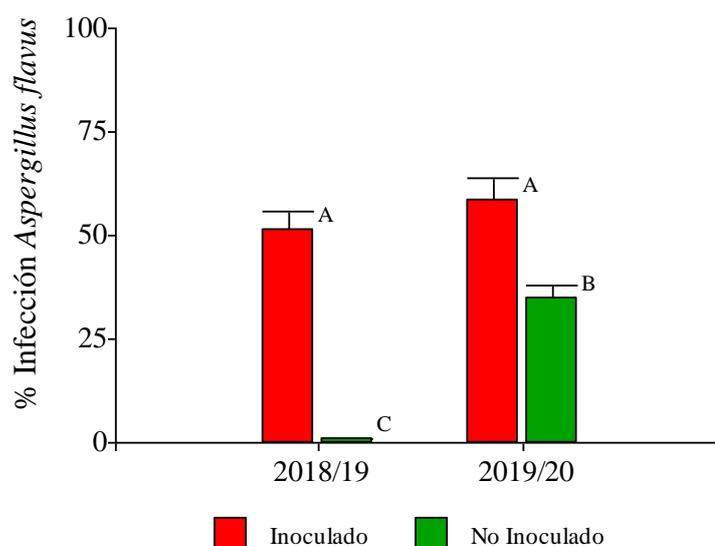


Figura 3.13. Medias de porcentaje de infección de granos de maíz por aislamientos nativos de *Aspergillus flavus* productores de aflatoxinas para tratamientos Inoculado y No Inoculado durante las campañas agrícolas 2018/19 y 2019/20 en Sachayoj y Gancedo. Los valores medios seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ; Test LSD).

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de infección del patógeno entre localidades, lo cual podría asociarse a que las condiciones climáticas propias de los años Niño - ENSO y de transición a Neutro - ENSO son generales para toda la región afectada, a diferencia de los años Niña - ENSO en los que estas cambian en pocos kilómetros (Heinzenknecht, 2011; Kurtz et al., 1998).

La técnica de inoculación utilizando jeringa automática no permitió observar diferencias significativas entre los híbridos evaluados en cuanto a su nivel de infección por *A. flavus*. En este trabajo se adoptó esta técnica debido a que fue empleada con éxito en otras regiones de Argentina pero con diferentes condiciones ambientales, germoplasmas y/o patógeno (Rodríguez, 2018; Presello et al., 2014b). Por otro lado, Windham y Williams (2007) indicaron que técnicas que dañan mecánicamente los granos de maíz, como las de presión utilizando un “pinche”, son más agresivas y por lo tanto más eficientes y consistentes en determinar el comportamiento de germoplasmas a la acumulación de toxinas, mientras que las técnicas menos agresivas, como el uso de jeringa automática y el asperjado sobre estigmas, son recomendadas para identificar germoplasmas resistentes a la infección del patógeno. En ensayos de campo utilizando estas dos técnicas menos agresivas, Windham y Williams (2012) reportaron elevados niveles de infección en

germoplasmas susceptibles, por lo que los resultados de esta tesis indicarían que los híbridos evaluados pueden ser susceptibles a la infección por *A. flavus*, lo cual debe ser corroborado utilizando algún método menos invasivo como la técnica de asperjado de estigmas. Diferencias en el nivel de infección de *A. flavus* utilizando métodos que dañan mecánicamente al grano fueron reportadas, pero solo estudiando el comportamiento de híbridos de conocida resistencia y susceptibilidad al patógeno (Windham et al., 2018; Luna López et al., 2013; Williams et al., 2013; Ankala et al., 2011).

La correlación entre rendimiento y porcentaje de infección por *A. flavus* fue significativa ( $P < 0.05$ ) pero muy débil (-0.19). Esta relación también fue reportada por Zafar *et al.* (2018), en ensayos llevados a cabo en Pakistán sobre 14 genotipos de maíz, quienes encontraron asociación entre el nivel de infección del patógeno y parámetros asociados al rendimiento del cultivo.

El análisis de las diferencias entre los valores de acumulación de AFB<sub>1</sub> para cada híbrido durante las campañas agrícolas 2018/19 y 2019/20 identificó al híbrido P2089VYHR junto con el control resistente P1366VYHR sin acumulación de AFB<sub>1</sub> (Figura 3.14). Las condiciones climáticas de la región alternan entre años con abundantes y escasas precipitaciones y con elevadas temperaturas en la época de crecimiento del cultivo, por lo que los requerimientos hídricos mínimos del maíz de alrededor de 600 mm durante el ciclo de cultivo y de 180 mm a 200 mm en el período de floración y cuaje de granos son difíciles de alcanzar, haciendo que la acumulación de AFB<sub>1</sub> en los granos cosechados se modifique entre las diferentes campañas agrícolas (Zúñiga Oñate, 2016; FAO, 2012; Totis de Zeljkovich, 2012; María José Galdeano, comunicación personal).

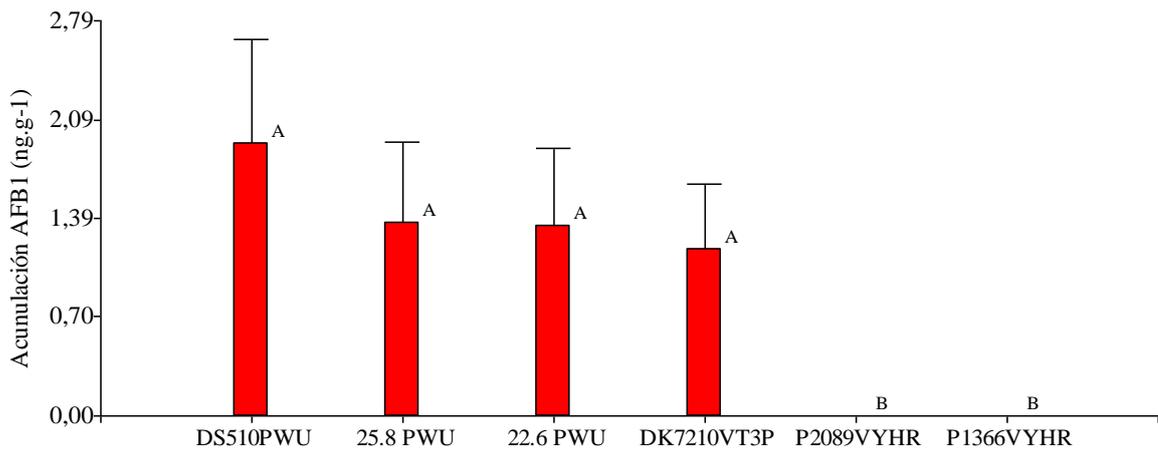


Figura 3.14. Medias de acumulación de AFB<sub>1</sub> en granos de maíz de espigas inoculadas con aislamientos de *Aspergillus flavus* productores de aflatoxinas durante las campañas agrícolas 2018/19 y 2019/20 en Sachayoj y Gancedo. Los valores medios seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ; Test LSD).

Las diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) registradas para este parámetro, entre el tratamiento Inoculado y el No Inoculado, permiten destacar la efectividad de la técnica basada en jeringa automática, en concordancia con lo informado por otros autores (Guo et al., 2017; Giorni et al., 2016; Williams et al., 2013; Windham y Williams, 1998). En Estados Unidos y utilizando la misma técnica de inoculación, Chalivendra *et al.* (2020) y Windham *et al.* (2018), informaron diferencias entre híbridos resistentes y susceptibles a la acumulación de aflatoxinas. Además, el empleo de esta técnica permitió identificar y registrar diferentes líneas de maíces resistentes a la acumulación de aflatoxinas (Guo et al., 2017; Brown et al., 2016; Williams y Windham, 2012; Henry et al., 2009).

No se observó correlación entre el rendimiento y la acumulación de aflatoxinas, coincidente con lo reportado por Wahl *et al.* (2017) en ensayos llevados a cabo a lo largo de Estados Unidos en numerosos años. Por su parte, la correlación entre el nivel de infección por *A. flavus* y la acumulación de aflatoxinas fue significativa pero débil (0.35). Esto último también fue informado por Williams *et al.* (2013) quienes, en estudios realizados en Estados Unidos durante dos años sobre diez híbridos de maíz, también hallaron asociación entre estos dos parámetros pero mucho más fuerte. Estas diferencias pueden deberse a que la infección por *A. flavus* y la acumulación de aflatoxinas son parámetros que dependen de las condiciones ambientales, de la susceptibilidad del germoplasma de maíz y de la habilidad de los aislamientos del patógeno para ingresar al grano (Horn, 2003).

## CONCLUSIONES

- Los híbridos Bt tuvieron mejores rendimientos que los no Bt, a excepción del 510PW que fue similar a los no Bt.
- Los híbridos 510PW y 510PWU, de tecnologías Powercore y Powercore ultra respectivamente, resultaron los menos dañados por orugas en espigas.
- En el ensayo llevado a cabo bajo condiciones naturales de infección no se pudo concluir respecto a la resistencia al patógeno y a la acumulación de aflatoxina debido a la insuficiente presión natural del inoculo.
- La técnica de inoculación utilizando jeringa automática no permitió observar diferencias significativas entre los híbridos evaluados en cuanto a su nivel de infección por *A. flavus*, pero sí en la acumulación de aflatoxinas.
- El elevado nivel de infección de *A. flavus* en los híbridos bajo el tratamiento Inoculado, es indicativo de la susceptibilidad que presentan los diferentes germoplasmas al patógeno.
- Las diferencias encontradas en el nivel de infección natural (tratamiento No Inoculado), en ambas campañas agrícolas, están asociadas a las condiciones climáticas de la región, las cuales favorecieron la infección y el desarrollo del patógeno.
- La infección con el patógeno produjo disminución del rendimiento en los híbridos comerciales estudiados.
- La acumulación de AFB<sub>1</sub> se relacionó con el nivel de infección, pero no con el rendimiento en los híbridos comerciales estudiados.
- El ensayo bajo inoculación con aislamientos toxigénicos del patógeno se detectó buen comportamiento de P2089VYHR, híbrido de amplia difusión en la región, frente al impacto sobre el rendimiento y a contaminación de los granos con AFB<sub>1</sub>, en este último caso junto al control resistente P1366VYHR.

## CAPÍTULO 4

### CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo de tesis se caracterizó la población de *Aspergillus flavus* que infecta la espiga de maíz en una región del norte de Argentina y se evaluó el comportamiento de híbridos de maíz cultivados en la región frente a la infección por el hongo. El maíz cumple un rol fundamental en la economía de la región y las condiciones climáticas que allí explora el cultivo lo expone a estreses térmicos e hídricos que a su vez posibilitan el desarrollo del hongo y la producción de micotoxinas. Las aflatoxinas y el ácido ciclopiazónico implican serios riesgos a la salud humana y animal, además de generar rechazos en la exportación del grano, al superar los umbrales de contenido de la toxina fijados por los diversos países del mundo y a la recirculación dentro del país de estas partidas rechazadas.

Se aisló *A. flavus* de espigas de maíz de 8 distritos agroclimáticos que integran la región semiárida del Parque Chaqueño argentino, comprendida por la Provincia de Santiago del Estero, norte de Córdoba y este de Tucumán y los aislamientos obtenidos se caracterizaron de manera morfológica, molecular y toxigénica, junto con el análisis de los morfotipos de esclerocios producidos por el hongo y de las relaciones filogenéticas obtenidas a través de la secuenciación de un segmento del gen de la calmodulina (*CaM*). De esta manera se concluye que:

- *A. flavus* está presente en todas las localidades de los 8 distritos agroclimáticos analizados durante las campañas agrícolas 2015/16 y 2016/17.
- El maíz en la región se infecta con *A. flavus* en precosecha, con el cultivo en el lote de producción, lo que implica un problema grave en la poscosecha del cultivo frente a la posibilidad de contaminación de los granos con micotoxinas.
- La proporción entre aislamientos aflatoxigénicos y no aflatoxigénicos es similar; todos ellos son productores de ácido ciclopiazónico.
- La población de *A. flavus* analizada exhibe poca variación de morfotipos de esclerocios. La gran mayoría produce esclerocios L relacionados con bajas producciones de toxina.

- La elevada identidad nucleotídica de esta población para el gen *CaM* indica que, al menos para este carácter, no hay variabilidad genética.

El empleo de híbridos con características genéticas que brinden resistencia a la acumulación de aflatoxinas, así como al daño por insectos de la espiga que favorecen el ingreso del hongo y su posterior contaminación del grano es una de las mejores estrategias para hacer frente a la problemática de las aflatoxinas en granos. Híbridos con diferentes tecnologías Bt (*Cry* y *Vip*) que expresan proteínas insecticidas, así como la búsqueda de germoplasmas resistentes a *A. flavus* y/o a la acumulación de aflatoxinas fueron estudiados en este trabajo, concluyendo que:

- Si bien la infección natural no tuvo presión suficiente para identificar diferencias entre híbridos con diferentes tecnologías Bt, en cuanto a la acumulación de aflatoxina, el estudio permitió detectar diferencias en cuanto al rendimiento y a la severidad de daño por orugas en la región agrícola analizada.
- Existen diferencias entre híbridos comerciales actualmente empleados en la región en el comportamiento frente a la infección por *A. flavus* y a la acumulación de aflatoxinas.

Esta investigación posibilitó conocer características de la población de *A. flavus* presentes en una región agrícola relativamente nueva del norte del país, proveniente de monte nativo y avanzar en los primeros estudios para identificar aislamientos con potencialidad para ser utilizados en estrategias de biocontrol de aflatoxinas en maíz.

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

- Barontini J.M., Druetta M.A., Luna I.M., Torrico A.K., Alaniz Zanon M.S., Paccioretti P.A., Maurino M.F., Giménez Pecci M.P., Chulze S.N. 2020. Performance of transgenic maize genotypes against ear caterpillars in Argentina. *Maydica* 65 – M15 (2), 1-6.
- Barontini J.M., Alaniz Zanon M.S., Druetta M.A., Ruiz Posse A.M., Torrico A.K., Monge M.P., Candela R.E., Chulze S.N., Giménez Pecci M.P. 2022. Differential response of maize hybrids to field infection with *Aspergillus flavus* and aflatoxin

accumulation in the Chaco Semi-arid region of Argentina. *Crop Protection* 156 (2022) 105960, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2022.105960>

- Barontini J.M., Ruiz Posse A., Druetta M., Torrico A.K., Ferrer M., Laguna I., Giménez Pecci, M.P. 2022. Relative composition of fungi causing maize ear rot in two environments and two agricultural seasons (Abstr.) *Phytopathology* 112:S1.15. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-112-3-S1.1>
- Barontini J.M., Torrico A.K., Alaniz Zanon M.S., Druetta M.A., Luna I., Ruiz Posse A.M., Chulze S.N., Giménez Pecci M.P. 2022. A polyphasic study of *Aspergillus flavus* Link isolates from maize in Chaco Semi-arid region of Argentina. (*International Journal of Food Microbiology*, enviada).

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

- 2016-2022. Beca Interna Doctoral CONICET. Título: “Aislamiento y caracterización de cepas de *Aspergillus flavus*, causal de podredumbre de la espiga en maíz, en distritos agroclimáticos de Santiago del Estero y regiones colindantes”. Aprobado mediante Resolución N° 3902 de fecha 25 de septiembre de 2015.
- 2014-2018. Proyecto Estructural INTA Programa Nacional de Cereales y Oleaginosas PE INTA PNCYO 1127034 “Evaluación y desarrollo de sistemas de manejo integrado de las plagas en cultivos de cereales y oleaginosas”.
- 2015-2018. Proyectos de Investigación Científica y Tecnológica (PICT) 1253 – 2015 de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT). “Desarrollo de bioinsumos amigables con el medio ambiente para reducir el impacto de hongos patógenos y toxicogénicos y la acumulación de micotoxinas en cereales”.
- 2018-2019. Proyectos de Investigación Orientado a las Demandas y las Oportunidades (PIODO). Aislamiento e identificación de cepas nativas de *Aspergillus flavus* no productoras de toxinas, desde espigas de maíz de la región centro-norte de la provincia de Córdoba.

- 2018-2022 COFECYT 2017 Línea ESPRO. Expediente N° 2017-16156848 IP N° 22. “Plataforma virtual de información para el manejo integrado de enfermedades en el cultivo de maíz en la provincia de Córdoba” Jurisdicción: CÓRDOBA. Consejo Federal de Ciencia y Tecnología. Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva.
- 2019-2022. Proyecto Estructural INTA PE-E7-I147 “Inocuidad de alimentos para consumo humano y animal”.
- 2019-2022. Proyecto Estructural INTA PE-E4-I074 “Manejo Integrado de Plagas”. Línea A009 “Estrategias de manejo para micotoxinas de *Aspergillus flavus* en podredumbre de espiga de maíz”.

## ANEXO 1

Tabla 1. Aislamientos de *Aspergillus flavus* de espigas de maíz de ocho localidades de distritos agroclimáticos de la Provincia de Santiago del Estero, N de Córdoba y E de Tucumán. AFB<sub>1</sub>, ACP y morfotipo de esclerocios durante campañas 2015/16 y 2016/17.

Provincia	Localidad	Año muestreo	Esclerocios			AFB <sub>1</sub> (ng.g <sup>-1</sup> )	ACP (ng.g <sup>-1</sup> )	Identidad nucleotídica*	Sustitución nucleotídica			Aislamiento
			Morfotipo	Número	Tamaño (µm)							
COR	Rayo Cortado	2017	L	38,7	823,1	6,43	63,26					ASRC1
COR	Rayo Cortado	2017	NP	ND	ND	<LD	66,23	0,994	1	27	47	ASRC2
COR	Rayo Cortado	2017	NP	ND	ND	<LD	60,56	0,994	1	27	47	ASRC3
COR	Tulumba	2017	L	5	582,12	278,46	8,31					ASVT1
COR	Tulumba	2017	L	0,30	496,2	<LD	32,80	0,998		27		ASVT2
COR	Tulumba	2017	L	44,1	963,14	405,09	38,56					ASVT3
COR	Tulumba	2017	L	35,10	500,92	60,61	12,28					ASVT4
SE	Bandera	2016	L	12,20	500,70	16,31	29,98					ASBA12
SE	Bandera	2016	L	2,60	476,40	<LD	22,80	0,994	1	27	47	ASBA3
SE	Bandera	2016	L	12,90	701,64	7,17	29,25					ASBA4
SE	Bandera	2016	L	6	605,56	<LD	14,74	1				ASBA8
SE	Bandera	2017	L	17,30	643,24	<LD	32,26	1				ASBA1
SE	Bandera	2017	L	10,40	742,80	5,92	29,31					ASBA10
SE	Bandera	2017	L	75	597,50	<LD	22,34	0,994	1	27	47	ASBA11
SE	Bandera	2017	L	34,30	643,58	<LD	32,27	1				ASBA2
SE	Bandera	2017	L	9,60	871,96	<LD	36,67	1				ASBA5
SE	Bandera	2017	L	3,50	603,36	90,73	42,98					ASBA6
SE	Bandera	2017	L	29,10	555,14	6,68	35,43					ASBA7
SE	Bandera	2017	NP	ND	ND	<LD	56,91	0,994	1	27	47	ASBA9
SE	Quimilí	2016	L	19,80	829,28	7,23	25,61					ASQU1
SE	Quimilí	2016	L	70,30	426,40	<LD	85,45	0,994	1	27	47	ASQU10
SE	Quimilí	2016	L	12,50	596,25	2521,47	17,55					ASQU11
SE	Quimilí	2016	L	25,70	758,20	17,16	15,78					ASQU12
SE	Quimilí	2016	L	14,60	708,41	5,66	51,20					ASQU13
SE	Quimilí	2016	L	62,10	854,32	5,64	38,66					ASQU14
SE	Quimilí	2016	L	2,60	911,50	<LD	43,18	0,996		27	47	ASQU15
SE	Quimilí	2016	L	5,30	842,70	<LD	24,24	1				ASQU16
SE	Quimilí	2016	L	7	645,21	<LD	68,69	1				ASQU17
SE	Quimilí	2016	L	27,60	703,45	<LD	58,72	1				ASQU18
SE	Quimilí	2016	L	40	940,20	<LD	10,63	0,994	1	27	47	ASQU19
SE	Quimilí	2016	L	4,30	740,04	<LD	20,61	0,998			47	ASQU2
SE	Quimilí	2016	L	89,30	824,30	<LD	37,14	0,994	1	27	47	ASQU20
SE	Quimilí	2016	L	42,30	833,78	499,07	15,96					ASQU21
SE	Quimilí	2016	L	8,60	927,21	34,01	30,36					ASQU3
SE	Quimilí	2016	L	35,20	662,95	9,35	48,13					ASQU4
SE	Quimilí	2016	L	34,60	644,23	6,33	116,40					ASQU5
SE	Quimilí	2016	L	18,20	641,30	6,04	16,19					ASQU6
SE	Quimilí	2016	L	49,20	688,77	5,76	56,87					ASQU8
SE	Quimilí	2016	L	31,30	632,94	<LD	48,59	1				ASQU9
SE	Quimilí	2017	L	21	458,07	<LD	61,58	1				ASQU7
SE	Sachayoj	2016	L	14,71	824,01	9,81	38,50					ASSA1
SE	Sachayoj	2016	L	5,30	472,12	13,25	29,89					ASSA3
SE	Sachayoj	2016	L	9,60	781,80	<LD	57,60	0,994	1	27	47	ASSA4
SE	Sachayoj	2016	L	24,80	428,90	9,07	79,11					ASSA6
SE	Sachayoj	2017	L	72,10	841,78	70,06	37,99					ASSA2
SE	Sachayoj	2017	L	18	636,42	<LD	13,82	0,998		27		ASSA5
SE	Santiago del Estero	2016	L	8,20	712,52	5,84	18,96					ASSE5

Tabla 1. Aislamientos de *Aspergillus flavus* de espigas de maíz de ocho localidades de distritos agroclimáticos de la Provincia de Santiago del Estero, N de Córdoba y E de Tucumán. AFB<sub>1</sub>, ACP y morfotipo de esclerocios durante campañas 2015/16 y 2016/17. Continuación.

SE	Santiago del Estero	2017	S	144	312,25	<LD	21,80	1				ASSE1
SE	Santiago del Estero	2017	L	23,40	635,84	<LD	20,63	0,994	1	27	47	ASSE2
SE	Santiago del Estero	2017	L	25,70	809,56	48958,11	22,28					ASSE3
SE	Santiago del Estero	2017	L	51	593,88	290,93	44,91					ASSE4
SE	Santiago del Estero	2017	NP	ND	ND	<LD	14,99	0,994	1	27	47	ASSE6
SE	Santiago del Estero	2017	NP	ND	ND	<LD	30,59	1				ASSE7
SE	Santiago del Estero	2017	L	1	829,63	<LD	22,00	0,996		27	47	ASSE8
SE	Santiago del Estero	2017	L	6	881,20	<LD	20,83	1				ASSE9
SE	Sumampa	2017	NP	ND	ND	<LD	32,95	0,994	1	27	47	ASSU1
SE	Sumampa	2017	L	44,30	840,72	12,33	55,14					ASSU2
TUC	Leales	2017	L	19,60	590,68	<LD	51,28	0,994	1	27	47	ASLE1

COR: Córdoba; SE: Santiago del Estero; TUC: Tucumán.

L: esclerocios de tamaño > 400 µm; S: esclerocios de tamaño < 400 µm; NP: no productor de esclerocios; ND: no detectado.

AFB<sub>1</sub>: Aflatoxina B<sub>1</sub>; ACP: ácido ciclopiazónico; <LD: menor al límite de detección de 1 ng.g<sup>-1</sup>.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abarca, M. L. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17, 79–84.
- Abbas, H. K., Weaver, M. A., Horn, B. W., Carbone, I., Monacell, J. T., & Shier, W. T. (2011). Selection of *Aspergillus flavus* isolates for biological control of aflatoxins in corn. *Toxin Reviews*, 30(2–3), 59–70. <https://doi.org/10.3109/15569543.2011.591539>
- Abbas, H. K., Weaver, M. A., Zablutowicz, R. M., Horn, B. W., & Shier, W. T. (2005). Relationships between aflatoxin production and sclerotia formation among isolates of *Aspergillus* section *Flavi* from the Mississippi Delta. *European Journal of Plant Pathology*, 112(3), 283–287. <https://doi.org/10.1007/s10658-004-4888-8>
- Abbas, H. K., Zablutowicz, R. M., Horn, B. W., Phillips, N. A., Johnson, B. J., Jin, X., & 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 Additives & Contaminants: Part A*, 28(2), 198–208. <https://doi.org/10.1080/19440049.2010.544680>
- Abdal Aziz, S., & Ali, S. (2021). Molecular characterization and differentiation of proteases isolated from different *Aspergillus* fungal species. *OnLine Journal of Biological Sciences*, 21(1), 69–119. <https://doi.org/10.3844/ojbsci.2021.69.119>
- Abdel Hadi, A., Caley, D., Carter, D., & Magan, N. (2011). Control of aflatoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* using RNA silencing technology by targeting aflD (nor-1) gene. *Toxins*, 3(6), 647–659. <https://doi.org/10.3390/toxins3060647>
- Accinelli, C., Abbas, H. K., Little, N. S., Kotowicz, J. K., & Shier, W. T. (2018). Biological control of aflatoxin production in corn using non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* administered as a bioplastic-based seed coating. *Crop Protection*, 107, 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.02.004>
- Acosta, R. (2009). El cultivo del maíz, su origen y clasificación. El maíz en Cuba. *Cultivos Tropicales*, 30(2), 113–120.
- Adhikari, B. N., Bandyopadhyay, R., & Cotty, P. J. (2016). Degeneration of aflatoxin gene clusters in *Aspergillus flavus* from Africa and North America. *AMB Express*, 6(1), 62. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0228-6>
- Agbetiameh, D., Ortega Beltran, A., Awuah, R. T., Atehnkeng, J., Cotty, P. J., &

- Bandyopadhyay, R. (2018). Prevalence of aflatoxin contamination in maize and groundnut in Ghana: Population structure, distribution, and toxigenicity of the causal agents. *Plant Disease*, *102*(4), 764–772. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-17-0749-RE>
- Agbetiameh, D., Ortega Beltran, A., Awuah, R. T., Atehnkeng, J., Islam, M. S., Callicott, K. A., Cotty, P. J., & Bandyopadhyay, R. (2019). Potential of atoxigenic *Aspergillus flavus* vegetative compatibility groups associated with maize and groundnut in Ghana as biocontrol agents for aflatoxin management. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02069>
- Ait Mimoune, N., Arroyo Manzanares, N., Gámiz Gracia, L., García Campaña, A. M., Bouti, K., Sabaou, N., & Riba, A. (2018). *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in dried figs and nuts in Algeria. *Food Additives & Contaminants: Part B*, *11*(2), 119–125. <https://doi.org/10.1080/19393210.2018.1438524>
- Alaniz Zanon, M. S., Barros, G. G., & Chulze, S. N. (2016). Non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* as potential biocontrol agents to reduce aflatoxin contamination in peanuts harvested in Northern Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, *231*, 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.016>
- Alaniz Zanon, M. S., Chiotta, M., Giaj Merlera, G., Barros, G., & Chulze, S. (2013). Evaluation of potential biocontrol agent for aflatoxin in Argentinean peanuts. *International Journal of Food Microbiology*, *162*(3), 220–225. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.017>
- Alaniz Zanon, M. S., Clemente, M. P., & Chulze, S. N. (2018). Characterization and competitive ability of non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolated from the maize agro-ecosystem in Argentina as potential aflatoxin biocontrol agents. *International Journal of Food Microbiology*, *277*(March), 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.020>
- Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., & Blackwell, M. (1996). *Introductory Mycology* (4th ed.). Wiley & Sons, Inc. New York, USA.
- Allendorf, F. W., Hohenlohe, P. A., & Luikart, G. (2010). Genomics and the future of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics*, *11*(10), 697–709. <https://doi.org/10.1038/nrg2844>
- Alshehri, B., & Palanisamy, M. (2020). Evaluation of molecular identification of *Aspergillus* species causing fungal keratitis. *Saudi Journal of Biological Sciences*,

- 27(2), 751–756. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.12.030>
- Amaike, S., & Keller, N. P. (2011). *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1), 107–133. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095221>
- Amare, M. G., & Keller, N. P. (2014). Molecular mechanisms of *Aspergillus flavus* secondary metabolism and development. *Fungal Genetics and Biology*, 66, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.02.008>
- Ankala, A., Bolla, B. K., Shivaji, R., Williams, W. P., & Wilkinson, J. R. (2011). Comparative analysis of the performance of *Aspergillus flavus* on resistant and susceptible maize genotypes during infection. *Fungal Ecology*, 4(1), 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2010.07.004>
- ANMAT. Administración Nacional de Medicamentos, A. y T. M. (2017). *Código Alimentario Argentino*. [http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas\\_alimentos\\_caa.asp](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp)
- Antony, M., Shukla, Y., & Janardhanan, K. K. (2003). Potential risk of acute hepatotoxicity of kodo poisoning due to exposure to cyclopiazonic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, 87(2–3), 211–214. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00146-6](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00146-6)
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2011). *Resolución RDC N° 7. Disposición sobre límites máximos tolerados para micotoxinas en alimentos. Diario oficial de la Unión, Poder Ejecutivo, Brasilia, DF. 1*, 66–67.
- ArgenBio. (2019). *Consejo Argentino para la información y el desarrollo de la Biotecnología*. ArgenBio. <http://www.argenbio.org/index.php?action=novedades&note=261>
- Arrúa Alvarenga, A. A., Moreno Martínez, E., Quezada Viay, M. Y., Moreno Lara, J., Vázquez Badillo, E., & Flores Olivas, A. (2012). *Aspergillus* aflatoxigénicos: enfoque taxonómico actual. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(4), 1047–1052. <https://doi.org/10.29312/remexca.v3i5.1414>
- Astoreca, A., Vaamonde, G., Dalcero, A., Marin, S., & 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 Microbiology*, 38, 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.07.012>
- Atehnkeng, J. (2008). Distribution and toxigenicity of *Aspergillus* species isolated from

- maize kernels from three agro-ecological zones in Nigeria. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1–2), 74–84.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.062>
- Atehnkeng, J., Donner, M., Ojiambo, P. S., Ikotun, B., Augusto, J., Cotty, P. J., & Bandyopadhyay, R. (2016). Environmental distribution and genetic diversity of vegetative compatibility groups determine biocontrol strategies to mitigate aflatoxin contamination of maize by *Aspergillus flavus*. *Microbial Biotechnology*, 9(1), 75–88.  
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.12324>
- Atehnkeng, J., Ojiambo, P., Ikotun, T., Sikora, R., Cotty, P., & Bandyopadhyay, R. (2008). Evaluation of atoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* as potential biocontrol agents for aflatoxin in maize. *Food Additives & Contaminants.*, 25(10), 1264–1271.  
<https://doi.org/10.1080/02652030802112635>
- Bakan, B., Melcion, D., Richard Molard, D., & Cahagnier, B. (2002). Fungal growth and Fusarium mycotoxin content in isogenic traditional maize and genetically modified maize grown in France and Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 728–731. <https://doi.org/10.1021/jf0108258>
- Balbi, E. I., & Flores, F. M. (2015). Evaluación del daño causado por el “Cogollero de maíz” (*Spodoptera frugiperda*) y presencia de la “Isoca de la espiga” (*Helicoverpa zea*) en diferentes híbridos de maíz transgénico. *Informe de Actualización Técnica*, 34, 21–26.
- Bandyopadhyay, R., Ortega Beltran, A., Akande, A., Mutegi, C., Atehnkeng, J., Kaptoge, L., Senghor, A. L., Adhikari, B. N., & Cotty, P. J. (2016). Biological control of aflatoxins in Africa: current status and potential challenges in the face of climate change. *World Mycotoxin Journal*, 9(5), 771–789.  
<https://doi.org/10.3920/WMJ2016.2130>
- Baranyi, N., Despot, D. J., Palágyi, A., Kiss, N., Kocsubé, S., Szekeres, A., Kecskeméti, A., Bencsik, O., Vágvölgyi, C., Klarić, M. Š., & Varga, J. (2015). Identification of *Aspergillus* species in Central Europe able to produce G-type aflatoxins. *Acta Biologica Hungarica*, 66(3), 339–347. <https://doi.org/10.1556/018.66.2015.3.9>
- Barros, G. G., Torres, A., Palacio, G., & Chulze, S. N. (2003). *Aspergillus* species from section *Flavi* isolated from soil at planting and harvest time in peanut-growing regions of Argentina. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(13), 1303–1307.

- <https://doi.org/10.1002/jsfa.1539>
- Barros, G. G., Torres, A., Rodriguez, M., & Chulze, S. (2006). Genetic diversity within *Aspergillus flavus* strains isolated from peanut-cropped soils in Argentina. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(1), 145–152.  
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.04.028>
- Barros, G., Torres, A., & Chulze, S. (2007). *Selección de aspergillus sección Flavi como agentes de biocontrol de hongos aflatoxicogénicos en maní*.  
<Http://Www.Ciacabrera.Com.Ar/Docs/JORNADA%2018/14-%20BARROS%20G.Pdf>.
- Battilani, P., Lanubile, A., Scala, V., Reverberi, M., Gregori, R., Falavigna, C., Dall’asta, C., Park, Y. S., Bennett, J., Borrego, E. J., & Kolomiets, M. V. (2018). Oxylipins from both pathogen and host antagonize jasmonic acid-mediated defence via the 9-lipoxygenase pathway in *Fusarium verticillioides* infection of maize. *Molecular Plant Pathology*, 19(9), 2162–2176. <https://doi.org/10.1111/mpp.12690>
- Bayman, P., & Cotty, P. J. (1993). Genetic diversity in *Aspergillus flavus*: association with aflatoxin production and morphology. *Canadian Journal of Botany*, 71(1), 23–31.  
<https://doi.org/10.1139/b93-003>
- Bennett, J. E. (1988). Especies de *Aspergillus* pp. In *Enfermedades infecciosas y sus agentes etiológicos* (pp. 2072-2075 pp). Médica Panamericana.
- Bennett, J. W. (2010). An overview of the genus *Aspergillus*. In M. Machida & K. Gomi (Eds.), *Aspergillus molecular Biology and Genomics* (pp. 1-17 pp). Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Bennett, J. W., & Klich, M. A. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 497–516. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>
- Bernardi, O., Bernardi, D., Horikoshi, R. J., Okuma, D. M., Miraldo, L. L., Fatoretto, J., Medeiros, F. C., Burd, T., & Omoto, C. (2016). Selection and characterization of resistance to the Vip3Aa20 protein from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda*. *Pest Management Science*, 72(9), 1794–1802.  
<https://doi.org/10.1002/ps.4223>
- Betancourt, C. M., & Scatoni, I. B. (2006). Lepidópteros de importancia económica en el Uruguay : reconocimiento, biología y daños de las plagas agrícolas y forestales. *Hemisferio Sur*, 2, 29–35.

- Bhat, R., Rai, R. V., & Karim, A. A. (2010). Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(1), 57–81. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00094.x>
- Bhatnagar, D., Cary, J. W., Ehrlich, K., Yu, J., & Cleveland, T. E. (2006). Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. *Mycopathologia*, 162(3), 155–166. <https://doi.org/10.1007/s11046-006-0050-9>
- Bhatnagar Mathur, P., Sunkara, S., Bhatnagar Panwar, M., Waliyar, F., & Sharma, K. (2015). Biotechnological advances for combating *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in crops. *Plant Science*, 234, 119–132. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.02.009>
- Bigelow, D. M., Orum, T., Cotty, P. J., & Nelson, M. (2000). Monitoring *Aspergillus flavus* AF36 and S strain incidence en the Desert Southwest. In *APS PACific Division Meeting Abstracts*. Canadian Phytopathological Society, Victoria, BC, Canadá.
- Boiça, J. R., Martinelli, A. L., & Pereira, M. F. A. (2001). Resistance of maize genotypes to *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) and *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidóptera: Noctuidae). *Ecossistema*, 26, 86–90.
- Bolsa de Cereales de Buenos Aires. (2018). *La cadena del maíz en la Argentina: evolución del cultivo durante las últimas campañas*. <http://www.bolsadecereales.com/imagenes/retaa/2018-12/161-lacadenaDMAZENARGENTINARETAAPASEEE09.11.2018.pdf>
- Bonifaz Trujillo, A. (2012). *Micología médica básica*. McGraw-Hill Interamericana, México.
- Borman, A. M., Szekely, A., Campbell, C. K., & Johnson, E. M. (2006). Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. *Mycopathologia*, 161(6), 361–368. <https://doi.org/10.1007/s11046-006-0023-z>
- Botta, G., & Gonzalez, M. (2012). Enfermedades fúngicas, bacterianas y abióticas del maíz. In G. H. Eyhérbide (Ed.), *Bases para el manejo del cultivo de Maíz* (pp. 125-150 pp). Ediciones INTA. [https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta\\_bases\\_para\\_el\\_manejo\\_de\\_maiz\\_reglon\\_100-2\\_2.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_bases_para_el_manejo_de_maiz_reglon_100-2_2.pdf)
- Bouti, K., Verheecke Vaessen, C., Mokrane, S., Meklat, A., Djemouai, N., Sabaou, N.,

- Mathieu, F., & Riba, A. (2020). Polyphasic characterization of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from animal feeds in Algeria. *Journal of Food Safety*, 40(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/jfs.12743>
- Bowen, K. L., Flanders, K. L., Hagan, A. K., & Ortiz, B. (2014). Insect damage, aflatoxin content, and yield of Bt corn in Alabama. *Journal of Economic Entomology*, 107(5), 1818–1827. <https://doi.org/10.1603/EC13442>
- Bravo, A., Gómez, I., Porta, H., García Gómez, B. I., Rodríguez Almazan, C., Pardo, L., & Soberón, M. (2012). Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. *Microbial Biotechnology*, 6(1), 17–26. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2012.00342.x>
- Brooks, T. D., Williams, W. P., Windham, G. L., Willcox, M. C., & Abbas, H. K. (2005). Quantitative trait loci contributing resistance to aflatoxin accumulation in the maize inbred Mp313E. *Crop Science*, 45, 171–174.
- Brown, R., Williams, W., Windham, G., Menkir, A., & Chen, Z. Y. (2016). Evaluation of African-bred maize germplasm lines for resistance to aflatoxin accumulation. *Agronomy*, 6(2), 24. <https://doi.org/10.3390/agronomy6020024>
- Bruns, H. (2003). Controlling flatoxin and fumonisin in maize by crop management. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 22(2–3), 153–173. <https://doi.org/10.1081/TXR-120024090>
- Busboom, K. N., & White, D. G. (2004). Inheritance of resistance to aflatoxin production and *Aspergillus* ear rot of corn from the cross of inbreds b73 and oh516. *Phytopathology*, 94(10), 1107–1115. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.10.1107>
- CAA. Código Alimentario Argentino. (2019). *Secretaría de Alimentos, Bieoconomía y Desarrollo Regional Resolución Conjunta 22/ 2019, and 9/2021*.
- Calvo, A. M., Bok, J., Brooks, W., & Keller, N. P. (2004). veA is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 4733–4739. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.8.4733-4739.2004>
- Calvo, M. (2008). *Bioquímica de los alimentos. Toxinas fúngicas*. <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/toxico/micotoxinas.html>
- Calzada, J. (2016). 6 % de la producción mundial de cereales se destina a producir etanol para biocombustibles: 157 Mt. In *Bolsa de Comercio de Rosario* (pp. 6–9).

- <https://www.bcr.com.ar/es/mercados/investigacion-y-desarrollo/informativo-semanal/noticias-informativo-semanal/6-de-la>
- Camiletti, B. X., Moral, J., Asensio, C. M., Torrico, A. K., Lucini, E. I., Giménez Pecci, M. P., & Michailides, T. J. (2018). Characterization of argentinian endemic *Aspergillus flavus* isolates and their potential use as biocontrol agents for mycotoxins in maize. *Phytopathology*, *108*(7), 818–828. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-17-0255-R>
- Camiletti, B. X., Torrico, A. K., Maurino, M. F., Cristos, D., Magnoli, C., Lucini, E. I., & Giménez Pecci, M. P. (2017). Fungal screening and aflatoxin production by *Aspergillus* section *Flavi* isolated from pre-harvest maize ears grown in two Argentine regions. *Crop Protection*, *92*, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.10.012>
- Carbone, I., & Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in Filamentous Ascomycetes. *Mycologia*, *91*(3), 553. <https://doi.org/10.2307/3761358>
- Cardini, J., Campo, M., Legal, N., Garea, M., Faya, T., & Cáceres, R. (2018). Consideración del cambio climático en la planificación de obras de mitigación de inundaciones en la Región Húmeda Argentina. *XXVIII Congreso Latinoamericano de Hidráulica*. [https://www.ina.gob.ar/congreso\\_hidraulica/resumenes/LADHI\\_2018\\_RE\\_439.pdf](https://www.ina.gob.ar/congreso_hidraulica/resumenes/LADHI_2018_RE_439.pdf)
- Cardwell, K. F., & Cotty, P. J. (2002). Distribution of *Aspergillus* section *Flavi* among field soils from the four agroecological zones of the Republic of Bénin, West Africa. *Plant Disease*, *86*(4), 434–439. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.4.434>
- Carrillo, L., & Audicio, M. C. (2007). *Manual de microbiología de los alimentos*. Asociación Cooperadora de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNJU, San Salvador, Jujuy.
- Cary, J. W., Rajasekaran, K., Brown, R. L., Luo, M., Chen, Z. Y., & Bhatnagar, D. (2011). Developing resistance to aflatoxin in maize and cottonseed. *Toxins*, *3*(6), 678–696. <https://doi.org/10.3390/toxins3060678>
- CAS. Consejo Agropecuario del sur. (2014). *EL mercado del maíz en los países del CAS*. 1–109. <http://consejocas.org/el-mercado-del-maiz-en-los-paises-del-cas/>
- Casmuz, A., Juárez, M. L., Socías, M. ., Murúa, M. G., Prieto, S., Medina, S., Willink, E.,

- & Gastaminza, G. (2010). Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista de La Sociedad Entomológica Argentina*, 69(3–4), 209–231.
- Castro, M. B., & Emiliozzi, A. L. (2020). El Bioetanol en base a maíz y su inserción en cadenas de valor en la Provincia de Córdoba, Argentina. *Redes*, 25(3), 1302–1321. <https://doi.org/10.17058/redes.v25i3.14054>
- CEFP. (2007). México: El mercado del maíz y la agroindustria de la tortilla. In *Centro de Estudios de las Finanzas Publicas* (p. 19). <http://www.cefp.gob.mx/intr/edocumentos/pdf/cefp/cefp0042007.pdf>
- Chalivendra, S., Huang, F., Busman, M., Williams, W. P., & Ham, J. H. (2020). Low aflatoxin levels in *Aspergillus flavus* resistant maize are correlated with increased corn earworm damage and enhanced seed fumonisin. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.565323>
- Chang, P. K., Bennett, J. W., & Cotty, P. J. (2002). Association of aflatoxin biosynthesis and sclerotial development in *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia*, 153(1), 41–48.
- Chang, P. K., & Ehrlich, K. C. (2010). What does genetic diversity of *Aspergillus flavus* tell us about *Aspergillus oryzae*? *International Journal of Food Microbiology*, 138(3), 189–199. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.033>
- Chen, Z. Y., Warburton, M. L., Hawkins, L., Wei, Q., Raruang, Y., Brown, R. L., Zhang, L., & Bhatnagar, D. (2016). Production of the 14 kDa trypsin inhibitor protein is important for maize resistance against *Aspergillus flavus* infection/aflatoxin accumulation. *World Mycotoxin Journal*, 9(2), 215–228. <https://doi.org/10.3920/WMJ2015.1890>
- Chulze, S. N. (2010). Strategies to reduce mycotoxin levels in maize during storage: a review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 27(5), 651–657. <https://doi.org/10.1080/19440040903573032>
- Cirilo, A. G., & Andrade, F. H. (1994). Sowing date and maize productivity: II Kernel number fetermination. *Crop Science*, 34(4), 1044–1046. <https://doi.org/10.2135/cropsci1994.0011183X003400040038x>
- Cleveland, T. E., Yu, J., Fedorova, N., Bhatnagar, D., Payne, G. A., Nierman, W. C., & Bennett, J. W. (2009). Potential of *Aspergillus flavus* genomics for applications in

- biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 27(3), 151–157.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.11.008>
- Coppock, R. W., Christian, R. G., & Jacobsen, B. J. (2018). Aflatoxins. In *Veterinary Toxicology* (pp. 983–994). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00069-6>
- Costa Baquião, A., Martins Melo de Oliveira, M., Alves Reis, T., Zorzete, P., Diniz Atayde, D., & Correa, B. (2013). Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. *Food Chemistry*, 139(1–4), 1127–1132. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.007>
- Cotty, P. J. (1988). Aflatoxin and sclerotial production by *Aspergillus flavus*: Influence of pH. *Phytopathology*, 78(9), 1250. <https://doi.org/10.1094/Phyto-78-1250>
- Cotty, P. J. (1989). Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology*, 79(7), 808–814.
- Cotty, P. J. (1997). Aflatoxin-producing potential of communities of *Aspergillus* section *Flavi* from cotton producing areas in the United States. *Mycological Research*, 101(6), 698–704. <https://doi.org/10.1017/S0953756296003139>
- Cotty, P. J., & Cardwell, K. F. (1999). Divergence of West African and North American communities of *Aspergillus* section *Flavi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5), 2264–2266.
- Cotty, P. J., & Jaime García, R. (2007). Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1–2), 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.060>
- Cotty, P. J., Probst, C., & Jaime García, R. (2008). Etiology and management of aflatoxin contamination. In *Mycotoxins: detection methods, management, public health and agricultural trade* (Issue May, pp. 287–299). CABI, Oxfordshire, UK.  
<https://doi.org/10.1079/9781845930820.0287>
- Cotty, P. J., & Taylor, D. R. (2003). Influence of complementation medium composition on vegetative compatibility analyses of *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, 93, 18.
- Couretot, L., Parisi, L., Magnone, G., De Rossi, R. L., Guerra, F. A., Plaza, M. C., Vuletic, E., Brücher, E., & Guerra, G. D. (2016). Enfermedades del maíz en las últimas cinco campañas. *Maíz. Actualización 2016. Informe de Actualización Técnica En Línea*, 5, 46–50. [https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta\\_mj\\_actualizacion\\_maiz2016.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_mj_actualizacion_maiz2016.pdf)

- Cullen, J. M., Wilson, M., Hagler, W. M. J., Ort, J. F., & Cole, R. J. (1988). Histologic lesions in broiler chicks given cyclopiazonic acid orally. *American Journal of Veterinary Research*, 49(5), 728–731.
- Da Motta, S., & Valente Soares, L. M. (2000). Simultaneous determination of tenuazonic and cyclopiazonic acids in tomato products. *Food Chemistry*, 71(1), 111–116.  
[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00040-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00040-6)
- Da Silva, J. J., Iamanaka, B. T., Ferranti, L. S., Massi, F. P., Taniwaki, M. H., Puel, O., Lorber, S., Frisvad, J. C., & Fungaro, M. H. P. (2020). Diversity within *Aspergillus niger* clade and description of a new species: *Aspergillus vinaceus* sp. nov. *Journal of Fungi*, 6(4), 371. <https://doi.org/10.3390/jof6040371>
- Da Silva, J. L., Ceriani Aparecido, C., Hansen, D., Alves Muniz Pereira, T., D'arc Felicio, J., & Gonzalez, E. (2015). Identification of toxigenic *Aspergillus* species from diet dairy goat using a polyphasic approach. *Ciência Rural*, 45(8), 1466–1471.  
<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140581>
- Dao, H. P., Mathieu, F., & Lebrihi, A. (2005). Two primer pairs to detect OTA producers by PCR method. *International Journal of Food Microbiology*, 104(1), 61–67.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.02.004>
- Darwish, W. S., Ikenaka, Y., Nakayama, S. M. M., & Ishizuka, M. (2014). An overview on mycotoxin contamination of foods in Africa. *Journal of Veterinary Medical Science*, 76(6), 789–797. <https://doi.org/10.1292/jvms.13-0563>
- De Fina, A. (1973). Mapa nacional de los distritos agroclimáticos argentinos. *IDIA*, 21–28.
- De Oliveira Rocha, L., Reis, G. M., Braghini, R., Kobashigawa, E., de Araújo, J., & Corrêa, B. (2012). Characterization of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from corn grains of different geographic origins in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, 132(3), 353–366.  
<https://doi.org/10.1007/s10658-011-9881-4>
- De Rodríguez, D. J., Rodríguez García, R., Hernández Castillo, F. D., Aguilar González, C. N., Sáenz Galindo, A., Villarreal Quintanilla, J. A., & Moreno Zuccolotto, L. E. (2011). In vitro antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan Desert plants against postharvest fruit fungi. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 960–966.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.03.001>
- De Rossi, R. L., Guerra, F. A., Brücher, E., Torrico, A. K., Maurino, M. F., Lucini, E.,

- Gimenéz Pecci, M. P., Plaza, M. C., Guerra, G. D., Camiletti, B. X., Ferrer, M., & Laguna, I. G. (2017). Enfermedades del maíz de siembra tardía causada por hongos. In L. Borrás & S. Uhart (Eds.), *El mismo maíz, un nuevo desafío: Compendio primer congreso de maíz tardío* (1° ed. com, pp. 109-127 pp). Dow Agrosiences.
- Devegowda, G., & Murthy, T. N. . (2005). Mycotoxins: Their effects in poultry and practical solutions. In D. E. Díaz (Ed.), *The mycotoxin Blue Book* (pp. 25-56 pp). Nottingham University Press.
- Devi Prameela, T., Prabhakaran, N., Kamil, D., Borah, J., & Alemayehu, G. (2013). Development of SCAR marker for specific detection of *Aspergillus flavus*. *African Journal of Microbiology Research*, 7(9), 783–790.  
<https://doi.org/10.5897/AJMR12.1552>
- Devreese, M., Backer, P., & Croubels, S. (2013). Different methods to counteract mycotoxin production and its impact on animal health. *Diergeneeskundig Tijdschrift*, 82, 181–190. <https://doi.org/000324284400002>
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2020). *InfoStatversión 2020. Centro de Transferencia* (No. 2020). Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.  
[www.infostat.com.ar](http://www.infostat.com.ar)
- Díaz, C. G., Rodríguez, R., Aguaysol, C., Juárez, J., Saleme, P., & Ploper, L. D. (2012). Relación entre incidencia de *Fusarium verticillioides* y variables de calidad de grano bajo condiciones de almacenamiento de maíz en Tucumán, Argentina. *Revista Agronómica Del Noroeste Argentino*, 32(1–2), 47–53.  
<http://www.faz.unt.edu.ar/ranar/ranar32127.pdf>
- Díaz, G. J. (1996). Micotoxinas y micotoxicosis en salud humana y animal. *Veterinaria Al Día*, 2, 28–34.
- Diedhiou, P. M., Bandyopadhyay, R., Atehnkeng, J., & Ojiambo, P. S. (2011). *Aspergillus* colonization and aflatoxin contamination of maize and sesame kernels in two agro-ecological zones in Senegal. *Journal of Phytopathology*, 159(4), 268–275.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01761.x>
- Diener, U. L. (1989). Preharvest aflatoxin contamination of peanuts, corn and cottonseed: A Review. In *Biodeterioration Research 2* (pp. 217–244). Springer US.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5670-7\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5670-7_20)

- Donner, M., Atehnkeng, J., Sikora, R., Bandyopadhyay, R., & Cotty, P. (2009). Distribution of *Aspergillus* section *Flavi* in soils of maize fields in three agroecological zones of Nigeria. *Soil Biology and Biochemistry*, *41*(1), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.09.013>
- Donner, M., Lichtemberg, P. S. F., Doster, M., Picot, A., Cotty, P. J., Puckett, R. D., & Michailides, T. J. (2015). Community structure of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in major almond-producing areas of California, United States. *Plant Disease*, *99*(8), 1161–1169. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-14-0450-RE>
- Dorner, J. W. (2004). Biological control of aflatoxin contamination of crops. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, *23*(2–3), 425–450. <https://doi.org/10.1081/TXR-200027877>
- Dorner, J. W., Horn, B. W., & Cole, R. J. (2000). Non-toxigenic strain of *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae* for biocontrol of toxigenic fungi. *United States Department of Agriculture Patents N° 6,027,724*. <https://patentimages.storage.googleapis.com/2b/7e/3e/f35408d90a6b8b/US6027724.pdf>
- Dos Santos, C. A., Marucci, R. C., Barbosa, T. A. N., Araujo, O. G., Waquil, J. M., Dias, A. S., Hebach, F. C., & Mendes, S. M. (2016). Development of *Helicoverpa* spp. in Bt maize expressing different proteins. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, *51*(5), 537–544. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500014>
- Doster, M. A., Cotty, P. J., & Michailides, T. J. (2014). Evaluation of the atoxigenic *Aspergillus flavus* strain AF36 in Pistachio orchards. *Plant Disease*, *98*(7), 948–956. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-13-1053-RE>
- Driehuis, F., Spanjer, M. C., Scholten, J. M., & Te Giffel, M. C. (2008). Occurrence of mycotoxins in feedstuffs of dairy cows and estimation of total dietary intakes. *Journal of Dairy Science*, *91*(11), 4261–4271. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1093>
- El Khoury, A., Atoui, A., Rizk, T., Lteif, R., Kallassy, M., & Lebrihi, A. (2011). Differentiation between *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* from pure culture and aflatoxin-contaminated grapes using PCR-RFLP analysis of aflR-aflJ intergenic spacer. *Journal of Food Science*, *76*(4), M247–M253. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02153.x>
- Etcheverry, M., Nesci, A., Barros, G., Torres, A., & Chulze, S. N. (1999). Occurrence of

- Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxin B1 in corn genotypes and corn meal in Argentina. *Mycopathologia*, 147(1), 37–41.  
<https://doi.org/10.1023/A:1007040123181>
- Eyhérabide, G. H. (2012). El maíz y su cultivo en Argentina. In M. P. Giménez Pecci, I. G. Laguna, & S. L. Lenardón (Eds.), *Enfermedades del maíz producidas por virus y mollicutes en Argentina* (p. 208). Ediciones INTA.
- Ezekiel, C. N., Atehnkeng, J., Odebode, A. C., & Bandyopadhyay, R. (2014). Distribution of aflatoxigenic *Aspergillus* section *Flavi* in commercial poultry feed in Nigeria. *International Journal of Food Microbiology*, 189, 18–25.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.026>
- Ezekiel, C. N., Sulyok, M., Babalola, D. A., Warth, B., Ezekiel, V. C., & Krska, R. (2013). Incidence and consumer awareness of toxigenic *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxin B1 in peanut cake from Nigeria. *Food Control*, 30(2), 596–601.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.07.048>
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (1993). *El maíz en la nutrición humana*. Colección FAO: Alimentación y nutrición. Departamento de Agricultura. <http://www.fao.org/3/t0395s/T0395S00.htm#Contents>
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2012). Respuesta del rendimiento de los cultivos al agua. In *Estudio FAO: Riego y Drenaje* (Vol. 66). FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2017). World Agriculture: Towards 2015/2030. In *World Agriculture: Towards 2015/2030: An FAO Study*. Routledge. <https://doi.org/10.4324/9781315083858>
- FDA. Food and Drug Administration. (2011). *Guidance for Industry: Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed* (pp. 1–15). <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-action-levels-poisonous-or-deleterious-substances-human-food-and-animal-feed#afla>
- Felsenstein, J. (2004). *Inferring phylogenies*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA.
- Fokunang, C. N., Tembe Fokunang, E. A., Tomkins, P., & Barkwan, S. (2006). Global

- impact of mycotoxins on human and animal health management. *Outlook on Agriculture*, 35(4), 247–253. <https://doi.org/10.5367/000000006779398263>
- Folcher, L., Delos, M., Marengue, E., Jarry, M., Weissenberger, A., Eychenne, N., & Regnault Roger, C. (2010). Lower mycotoxin levels in Bt maize grain. *Agronomy for Sustainable Development*, 30(4), 711–719. <https://doi.org/10.1051/agro/2010005>
- Folcher, L., Eychenne, N., Weissenberger, A., Jarry, M., Regnault Roger, C., & Delos, M. (2006). Study of effects of Bt maize (*Zea mays*) events on Lepidoptera *Ostrinia nubilalis*, *Sesamia nonagrioides* in southwestern France. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 71(2 Pt A), 227–231.
- Ford, R. H. (2000). Inheritance of kernel color in corn: Explanations & Investigations. *The American Biology Teacher*, 62(3), 181–188. <https://doi.org/10.2307/4450870>
- Frändberg, E., Pitt, J., & Olsen, M. (2003). Quality control of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* agar and comparison with dichloran 18% glycerol agar: a collaborative study. *International Journal of Food Microbiology*, 89(1), 99–102. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00293-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00293-9)
- Fredenburg, P. (2006). *Generation challenge programme partner and product highlights* (2006th ed.). Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo (CIMMYT).
- Frisvad, J. C., Hubka, V., Ezekiel, C. N., Hong, S. B., Nováková, A., Chen, A. J., Arzanlou, M., Larsen, T. O., Sklenář, F., Mahakarnchanakul, W., Samson, R. A., & Houbraken, J. (2019). Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Studies in Mycology*, 93, 1–63. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.06.001>
- Frisvad, J. C., & Larsen, T. O. (2015). Chemodiversity in the genus *Aspergillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(19), 7859–7877. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6839-z>
- Frisvad, J. C., Thrane, U., & Samson, R. A. (2007). Mycotoxin producers. In J. Dijksterhuis & R. A. Samson (Eds.), *A multifaceted approach to fungi and food* (pp. 135-159 pp). CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Gai, X., Dong, H., Wang, S., Liu, B., Zhang, Z., Li, X., & Gao, Z. (2018). Infection cycle of maize stalk rot and ear rot caused by *Fusarium verticillioides*. *PLOS ONE*, 13(7), e0201588. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201588>
- Galinat, W. C. (1988). The origin of corn. In G. F. Sprague & J. W. Dudley (Eds.), *Corn*

- and corn improvement* (3rd ed., p. 31). American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America.
- Gallo, A., Stea, G., Battilani, P., Logrieco, A., & Perrone, G. (2012). Molecular characterization of an *Aspergillus flavus* population isolated from maize during the first outbreak of aflatoxin contamination in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, *51*(1), 198–206.
- Galván, L., Infante, C., Acuña, L. R., & Angueira, C. (2003). Análisis espacial de precipitaciones en la Provincia de Santiago del Estero a escalas temporales mensual y anual. *Congreso Regional de Ciencia y Tecnología. Ciencias de La Tierra y Ambiente*, *1*, 1–17. <https://docplayer.es/14580783-Analisis-espacial-de-precipitaciones-en-la-provincia-de-santiago-del-estero-a-escalas-temporales-mensual-y-anual.html>
- Gao, C. (2018). The future of CRISPR technologies in agriculture. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *19*(5), 275–276. <https://doi.org/10.1038/nrm.2018.2>
- García Cella, E., Gari Sanchez, F. J., Sulyok, M., Verheecke Vaessen, C., Medina, A., Krška, R., & Magan, N. (2020). Carbon dioxide production as an indicator of *Aspergillus flavus* colonisation and aflatoxins/cyclopiazonic acid contamination in shelled peanuts stored under different interacting abiotic factors. *Fungal Biology*, *124*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.10.003>
- García, M. S., Busato, G. R., Zart, M., Bernardi, O., Nunes, A. M., Giorgi, F., & Bernardi, D. (2006). Artificial diet volume in glass containers for rearing of *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Brasileira de Agrobiologia*, *12*, 363–366.
- Garzón, J. M., Moncarza, P., Rossetti, V., Torre, N., Bullano, F., Fiant, S., & Augusto, G. (2015). *El aporte del campo a la economía de Córdoba* (1° ed.). IERAL. Instituto de Estudios sobre la Realidad Argentina y Latinoamericana. Bolsa de Cereales de Córdoba.
- Gear, J. R. (2008). *Maíz y nutrición: informe sobre los usos y las propiedades nutricionales del maíz para la alimentación humana y animal*. ILSI Argentina.
- Geiser, D. M., Dorner, J. W., Horn, B. W., & Taylor, J. W. (2000). The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*, *31*(3), 169–179. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1215>

- Geiser, D. M., Klich, M. A., Frisvad, J. C., Peterson, S. W., Varga, J., & Samson, R. A. (2007). The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 59, 1–10. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.01>
- Geiser, D. M., Pitt, J., & Taylor, J. W. (1998). Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(1), 388–393. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.1.388>
- Georgianna, D. R., & Payne, G. A. (2009). Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: from gene to genome. *Fungal Genetics and Biology*, 46(2), 113–125. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.10.011>
- Gherbawy, Y., & Voigt, K. (Eds.). (2010). *Molecular Identification of Fungi*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-05042-8>
- Gilbert, M. K., Majumdar, R., Rajasekaran, K., Chen, Z. Y., Wei, Q., Sickler, C. M., Lebar, M. D., Cary, J. W., Frame, B. R., & Wang, K. (2018). RNA interference-based silencing of the alpha-amylase (*amy1*) gene in *Aspergillus flavus* decreases fungal growth and aflatoxin production in maize kernels. *Planta*, 247(6), 1465–1473. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2875-0>
- Giménez Pecci, M. P., Laguna, I. G., & Lenardón, S. L. (2012). *Enfermedades del maíz producidas por virus y mollicutes en Argentina* (M. P. Giménez Pecci, I. G. Laguna, & S. L. Lenardón (Eds.); Ediciones).
- Giménez Pecci, M. P., Maurino, M. F., Druetta, M., Torrico, A. K., Oleszczuc, D., Guerra, F. A., Guerra, G. D., De Rossi, R. L., Plazas, M. C., Brücher, E., Barontini, J., Ferrer, M., & Laguna, I. G. (2017). Enfermedades del maíz de siembra tardía causadas por virus, mollicutes y bacterias. In L. Borrás & S. Uhart (Eds.), *El mismo maíz, un nuevo desafío: Compendio primer congreso de maíz tardío* (1st ed., pp. 128-145 pp). Dow Agrosciences.
- Ginzo, H. D. (2015). Emisiones de gases de efecto invernadero y mitigación en el sector de uso del suelo, cambio en el uso del suelo y silvicultura. In *Cepal. Comisión Económica para América Latina y el Caribe* (Vol. 160). Naciones Unidas.
- Giorni, P. (2007). *Impact of environmental and plant factors on Aspergillus section Flavi* [Cranfield University, Cranfield, UK]. <http://hdl.handle.net/1826/2851>
- Giorni, P., Bertuzzi, T., & Battilani, P. (2016). Aflatoxin in maize, a multifaceted answer of *Aspergillus flavus* governed by weather, host-plant and competitor fungi. *Journal*

- of Cereal Science*, 70, 256–262. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.07.004>
- Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., Bertuzzi, T., & Battilani, P. (2007). Studies on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in northern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 113(3), 330–338.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.007>
- Gizachew, D., Szonyi, B., Tegegne, A., Hanson, J., & Grace, D. (2016). Aflatoxin contamination of milk and dairy feeds in the Greater Addis Ababa milk shed, Ethiopia. *Food Control*, 59, 773–779. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.060>
- Glass, N. L., & Donaldson, G. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), 1323–1330.
- Glass, N. L., Jacobson, D. J., & Shiu, P. K. T. (2000). The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous Ascomycete Fungi. *Annual Review of Genetics*, 34(1), 165–186. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.34.1.165>
- Glass, N. L., & Kulda, G. A. (1992). Mating type and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. *Annual Review of Phytopathology*, 30(1), 201–224.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.py.30.090192.001221>
- Godet, M., & Munaut, F. (2010). Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section *Flavi*. *FEMS Microbiology Letters*, 304(2), 157–168.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01890.x>
- Goizueta, M. E. (2014). *Conducta, dinámica y patrones tecnológicos de la cadena del maíz* (1st ed.). Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva.  
<http://www.mincyt.gob.ar/adjuntos/archivos/000/036/0000036195.pdf>
- Gonçalves, S. S., Cano, J. F., Stchigel, A. M., Melo, A. S., Godoy Martinez, P. C., Correa, B., & Guarro, J. (2012). Molecular phylogeny and phenotypic variability of clinical and environmental strains of *Aspergillus flavus*. *Fungal Biology*, 116(11), 1146–1155.  
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.08.006>
- González Arguinzones, U. (2013). *El maíz y los productos de su industrialización*. Trillas.
- González Salgado, A., González Jaén, T., Vázquez, T., & Patiño, B. (2011). Microbial toxins. In O. Holst (Ed.), *Microbial Toxins: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (Vol. 739, Issue 19). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-102-4>

- Gradziel, T., Dandekar, A., Ashamed, M., Driver, N., & Tang, A. (1995). Proceedings of the USDA-ARS aflatoxin elimination workshop. In *Integrating fungal pathogen and insect vector resistance for comprehensive preharvest aflatoxin control in almond*. Workshop, Atlanta, USA.
- Grubisha, L. C., & Cotty, P. J. (2015). Genetic analysis of the *Aspergillus flavus* vegetative compatibility group to which a biological control agent that limits aflatoxin contamination in USA crops belongs. *American Society for Microbiology*, *81*, 5889–5899.
- Guezlane Tebibel, N., Bouras, N., Mokrane, S., Benayad, T., & Mathieu, F. (2013). Aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from marketed peanuts (*Arachis hypogaea*) in Algiers (Algeria). *Annals of Microbiology*, *63*(1), 295–305. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0473-0>
- Guo, B. Z., Ji, X., Ni, X., Fountain, J. C., Li, H., Abbas, H. K., Lee, R. D., & Scully, B. T. (2017). Evaluation of maize inbred lines for resistance to pre-harvest aflatoxin and fumonisin contamination in the field. *The Crop Journal*, *5*(3), 259–264. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2016.10.005>
- Guzmán de Peña, D., Aguirre, J., & Ruiz Herrera, J. (1998). Regulation of mycotoxins biosynthesis during sporulation of *Aspergelli*. In M. Miraglia, H. Van Equmond, C. Berna, & J. Gilbert (Eds.), *Mycotoxins and phycotoxin Development in chemistry, toxicology and food safety*. (pp. 321-326 pp). USA.
- Habibi, A., & Banihashemi, Z. (2008). Vegetative compatibility groups among isolates of *Aspergillus flavus* from sesame seed in Iran and mycotoxin production. *Phytopathologia Mediterranea*, *47*(1), 28–34.
- Hawkins, L., Warburton, M., Tang, J., Tomashek, J., Alves Oliveira, D., Ogunola, O., Smith, J., & Williams, W. (2018). Survey of candidate genes for maize resistance to infection by *Aspergillus flavus* and/or aflatoxin contamination. *Toxins*, *10*(2), 61. <https://doi.org/10.3390/toxins10020061>
- Heinzenknecht, G. M. (2011). Proyecto riesgo y seguro agropecuario. *ORA - MAGyP*, 1–58. <http://www.ora.gov.ar/informes/enso.pdf>
- Henry, W. B., Williams, W. P., Windham, G. L., & Hawkins, L. K. (2009). Evaluation of maize inbred lines for resistance to *Aspergillus* and *Fusarium* ear rot and mycotoxin accumulation. *Agronomy Journal*, *101*(5), 1219–1226.

<https://doi.org/10.2134/agronj2009.0004>

- Hernández Delgado, S., Reyes López, M. A., García, J. G., Mayek Pérez, N., & Reyes Méndez, C. A. (2007). Incidencia de hongos potencialmente toxígenos en Maíz (*Zea mays* L.) almacenado y cultivado en el norte de Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25(2), 127–133.
- Hernández Fernández, R. A. (2012). Kinasas y fosfatasas: el yin y yan de la vida. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 11(1), 15–24.
- Hocart, M. J., Lucas, J. A., & Peberdy, J. F. (1993). Characterization of the parasexual cycle in the eyespot fungus, *Pseudocercospora herpotrichoides*. *Mycological Research*, 97(8), 967–976. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80864-2](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80864-2)
- Horn, B. W. (2003). Ecology and population biology of aflatoxigenic fungi in soil. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 22(2–3), 351–379. <https://doi.org/10.1081/TXR-120024098>
- Horn, B. W., & Dorner, J. W. (1999). Regional differences in production of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid by soil isolates of *Aspergillus flavus* along a transect within the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4), 1444–1449.
- Horn, B. W., Greene, R. L., Sobolev, V. S., Dorner, J. W., Powell, J. H., & Layton, R. C. (1996). Association of morphology and mycotoxin production with vegetative compatibility groups in *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, and *A. tamarii*. *Mycologia*, 88(4), 574. <https://doi.org/10.2307/3761151>
- Houbraken, J., Visagie, C. M., Meijer, M., Frisvad, J. C., Busby, P. E., Pitt, J. I., Seifert, K. A., Louis-Seize, G., Demirel, R., Yilmaz, N., Jacobs, K., Christensen, M., & Samson, R. A. (2014). A taxonomic and phylogenetic revision of *Penicillium* section *Aspergilloides*. *Studies in Mycology*, 78(1), 373–451. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.002>
- Hruska, Z., Rajasekaran, K., Yao, H., Kincaid, R., Darlington, D., Brown, R., Bhatnagar, D., & Cleveland, T. E. (2014). Co-inoculation of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* to study fungal invasion, colonization, and competition in maize kernels. *Frontiers in Microbiology*, 5(MAR), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00122>
- IARC. International Agency for Research on Cancer. (2002). *Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans: some traditional herbal medicines*,

- some mycotoxins, naphthalene and styrene Vol. 82. IARC, Geneva, pp. 301–366.* (82nd ed.). IARC Press.
- Iheanacho, H. E., Njobeh, P. B., Dutton, F. M., Steenkamp, P. A., Steenkamp, L., Mthombeni, J. Q., Daru, B. H., & Makun, A. H. (2014). Morphological and molecular identification of filamentous *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* isolated from compound feeds in South Africa. *Food Microbiology*, *44*, 180–184. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.05.019>
- INDEC. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. (2019). *Informes Técnicos*. <https://www.indec.gov.ar/indec/web/Nivel4-Tema-3-8-89>
- INTA. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. (2012). *Fenología del Maíz*. <http://riap.inta.gov.ar>
- INTA. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. (2019). *Suelos de la República Argentina*. <http://www.geointa.inta.gov.ar/2013/05/26/suelos-de-la-republica-argentina/>
- INTA. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. (2020). *Sistema de Información y Gestión Agrometeorológica*. <http://siga.inta.gov.ar/#/data>
- International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA). (2019). *GM Approval Database*. <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/>
- Jaime García, R., & Cotty, P. J. (2006). Spatial relationships of soil texture and crop rotation to *Aspergillus flavus* community structure in South Texas. *Phytopathology*, *96*(6), 599–607. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0599>
- Jaime García, R., & Cotty, P. J. (2010). Crop rotation and soil temperature influence the community structure of *Aspergillus flavus* in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, *42*(10), 1842–1847. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.06.025>
- Jamali, M., Ebrahimi, M., Karimipour, M., Shams Ghahfarokhi, M., Dinparas Djadid, N., Kalantari, S., Pilehvar Soltanahmadi, Y., Amani, A., & Razzaghi Abyaneh, M. (2012). An insight into the distribution, genetic diversity, and mycotoxin production of *Aspergillus* section *Flavi* in soils of pistachio orchards. *Folia Microbiologica*, *57*(1), 27–36. <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0090-5>
- Jayashree, T., Praveen Rao, J., & Subramanyam, C. (2000). Regulation of aflatoxin production by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein phosphorylation and dephosphorylation. *FEMS Microbiology Letters*, *183*(2), 215–219.

- <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb08960.x>
- Juvvadi, P. R., & Chivukula, S. (2006). Putative calmodulin-binding domains in aflatoxin biosynthesis–regulatory proteins. *Current Microbiology*, 52(6), 493–496.  
<https://doi.org/10.1007/s00284-005-0389-z>
- Kabak, B. (2009). The fate of mycotoxins during thermal food processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(4), 549–554. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3491>
- Kamaruddin, A., & Zakaria, L. (2019). *Aspergillus* species from groundnuts (*Arachis hypogaea*) and mycotoxin production by toxigenic species. *Malaysian Journal of Microbiology*, 15(6), 471–479. <https://doi.org/10.21161/mjm.190375>
- Kanbe, T., Yamaki, K., & Kikuchi, A. (2002). Identification of the pathogenic *Aspergillus* species by nested PCR using a mixture of specific primers to DNA topoisomerase II Gene. *Microbiology and Immunology*, 46(12), 841–848.  
<https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2002.tb02771.x>
- Kebede, H., Abbas, H. K., Fisher, D., & Bellaloui, N. (2012). Relationship between aflatoxin contamination and physiological responses of corn plants under drought and heat stress. *Toxins*, 4(11), 1385–1403. <https://doi.org/10.3390/toxins4111385>
- Klich, M. A. (2002). *Identification of common Aspergillus species*. Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Klich, M. A. (2007). Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycoscience*, 48(2), 71–80. <https://doi.org/10.1007/S10267-006-0336-2>
- Klingelhöfer, D., Zhu, Y., Braun, M., Bendels, M. H. K., Brüggmann, D., & Groneberg, D. A. (2018). Aflatoxin – Publication analysis of a global health threat. *Food Control*, 89, 280–290. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2018.02.017>
- Kocsubé, S., Perrone, G., Magistà, D., Houbraken, J., Varga, J., Szigeti, G., Hubka, V., Hong, S. B., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2016). *Aspergillus* is monophyletic: Evidence from multiple gene phylogenies and extrolites profiles. *Studies in Mycology*, 85, 199–213. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2016.11.006>
- Kozakiewicz, Z. (1988). *Aspergillus species on stored products*. Wallingford (UK) C.A.B. International.
- Krimitzas, A., Pyrri, I., Kouvelis, V., Kapsanaki gotsi, E., & Typas, M. (2013). A phylogenetic analysis of greek isolates of *Aspergillus* species based on morphology

- and nuclear and mitochondrial gene sequences. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International*, 2013, 18.
- Krnjaja, V., Mandić, V., Stanković, S., Obradović, A., Vasić, T., Lukić, M., & Bijelić, Z. (2019). Influence of plant density on toxigenic fungal and mycotoxin contamination of maize grains. *Crop Protection*, 116, 126–131.  
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.10.021>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Kurtz, D. B., Perucca, A. R., Ybarra, D. ., López Fernández, C., Rey Montoya, S., & Barrios, R. (1998). El fenómeno el niño. *INTA*, 1–18.  
[https://inta.gob.ar/sites/default/files/fenomeno\\_el\\_nino\\_2015-2016-1.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/fenomeno_el_nino_2015-2016-1.pdf)
- Kusumoto, K., Nogata, Y., & Ohta, H. (2000). Directed deletions in the aflatoxin biosynthesis gene homolog cluster of *Aspergillus oryzae*. *Current Genetics*, 37(2), 104–111. <https://doi.org/10.1007/s002940050016>
- Lacey, J. (1989). Prevention of mould growth and mycotoxin production through control of environmental factors. In S. Natori, K. Hashimoto, & Y. Ueno (Eds.), *Mycotoxins and Phycotoxins* 88 (pp. 161-169 pp). Elsevir, Amsterdam.
- Laguna, I. G., & Giménez Pecci, M. P. (2012). Panorama mundial de las enfermedades causadas por virus y mollicutes en el cultivo de maíz. In M. P. Giménez Pecci, I. G. Laguna, & S. L. Lenardón (Eds.), *Enfermedades del maíz producidas por virus y mollicutes en Argentina* (pp. 31-40 pp). Ediciones INTA.
- Larkin, M., Blackshields, G., Brown, N., Chenna, R., Mcgettigan, P., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J., Gibson, T., & Higgins, D. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947–2948.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
- Leslie, J. F. (1993). Fungal vegetative compatibility. *Annual Review of Phytopathology*, 31(1), 127–150. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.31.090193.001015>
- Leslie, J. F., & Summerell, B. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Wiley - Blackwell, Ames, Iowa, USA.
- Lewis, L., Onsongo, M., Njapau, H., Schurz Rogers, H., Lubber, G., Kieszak, S., Nyamongo, J., Backer, L., Dahiye, A. M., Misore, A., DeCock, K., & Rubin, C.

- (2005). Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. *Environmental Health Perspectives*, *113*(12), 1763–1767. <https://doi.org/10.1289/ehp.7998>
- Liu, D., Coloe, S., Baird, R., & Pedersen, J. (2000). Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, *38*(1), 471.
- Logrieco, A., Battilani, P., Leggieri, M. C., Jiang, Y., Haesaert, G., Lanubile, A., Mahuku, G., Mesterházy, A., Ortega Beltran, A., Pasti, M., Smeu, I., Torres, A., Xu, J., & Munkvold, G. P. (2021). Perspectives on global mycotoxin issues and management from the mycokey maize working group. *Plant Disease*, *105*(3), 525–537. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1322-FE>
- Lomax, L. G., Cole, R. J., & Dorner, J. W. (1984). The toxicity of cyclopiazonic acid in weaned pigs. *Veterinary Pathology*, *21*(4), 418–424. <https://doi.org/10.1177/030098588402100408>
- Londoño Cifuentes, E. ., & Martínez Miranda, M. M. (2017). Aflatoxinas en alimentos y exposición dietaria como factor de riesgo para el carcinoma hepatocelular. *Biosalud*, *16*(1), 53–66. <https://doi.org/10.17151/biosa.2017.16.1.7>
- López, G., Park, D., & Phillips, T. (1999). Reducción al mínimo de los riesgos que plantean las micotoxinas mediante la utilización del concepto de HACCP. 3° Conferencia Internacional FAO/OMS/PMA Sobre Micotoxinas, 3–6.
- Luna López, M. C. de, Valdivia Flores, A. G., Jaramillo Juárez, F., Reyes, J. L., Ortiz Martínez, R., & Quezada Tristán, T. (2013). Association between *Aspergillus flavus* colonization and aflatoxins production in immature grains of maize genotypes. *Journal of Food Science and Engineering*, *3*, 688–698.
- Lynch, R. E., & Wilson, D. M. (1991). Enhanced infection of peanut, *Arachis hypogaea* L., seeds with *Aspergillus flavus* group Fungi due to external scarification of peanut pods by the lesser cornstalk borer, *Elasmopalpus lignosellus*. *Peanut Science*, *18*(2), 110–116. <https://doi.org/10.3146/i0095-3679-18-2-13>
- Ma, B. L., & Subedi, K. D. (2005). Development, yield, grain moisture and nitrogen uptake of Bt corn hybrids and their conventional near-isolines. *Field Crops Research*, *93*(2–3), 199–211. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2004.09.021>
- MAGyP. Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca. (2021). *Estimaciones agrícolas*. <http://datosestimaciones.magyp.gob.ar/reportes.php?reporte=Estimaciones>

- MAGyP - Agroindustria. Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca. (2020). *Características de la región Parque Chaqueño*.  
<http://forestindustria.magyp.gob.ar/archivos/informacion-por-region/parque-chaqueno.pdf>
- Mahmoud, M. A., Al Othman, M. R., Abd El Aziz, A. R., & Arabia, S. (2013). Mycotoxigenic fungi contaminating corn and sorghum grains in Saudi Arabia. *Pakistan Journal of Botany*, 45(5), 1831–1839.
- MAIZAR. Asociación Maíz y sorgo Argentino. (2013). *La cadena de maíz y las oportunidades para desarrollo en la Argentina*.  
<http://www.maizar.org.ar/vertext.php?id=425>
- MAIZAR. Asociación Maíz y sorgo Argentino. (2017). *La cadena del maíz Flint y la molienda seca*. <http://www.maizar.org.ar/vertext.php?id=527>
- MAIZAR. Asociación Maíz y sorgo Argentino. (2018). *Cadena de Maíz*.  
[http://www.maizar.org.ar/vertodas\\_area.php?id=15](http://www.maizar.org.ar/vertodas_area.php?id=15)
- Majumdar, R., Minocha, R., Lebar, M. D., Rajasekaran, K., Long, S., Carter Wientjes, C., Minocha, S., & Cary, J. W. (2019). Contribution of maize polyamine and amino acid metabolism toward resistance against *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin Production. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00692>
- Makhlouf, J., Carvajal Campos, A., Querin, A., Tadríst, S., Puel, O., Lorber, S., Oswald, I. P., Hamze, M., Bailly, J. D., & Bailly, S. (2019). Morphologic, molecular and metabolic characterization of *Aspergillus* section *Flavi* in spices marketed in Lebanon. *Scientific Reports*, 9(1), 5263. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41704-1>
- Mangelsdorf, P. C. (1974). *Corn: Its origin, evolution and improvement* (2nd ed.). Belknap Press, Harvard University Press.
- Marques, L. H., Santos, A. C., Castro, B. A., Moscardini, V. F., Rosseto, J., Silva, O. A. B. N., & Babcock, J. M. (2019). Assessing the efficacy of *Bacillus thuringiensis* (Bt) pyramided proteins Cry1F, Cry1A.105, Cry2Ab2, and Vip3Aa20 expressed in Bt maize against lepidopteran pests in Brazil. *Journal of Economic Entomology*, 112(2), 803–811. <https://doi.org/10.1093/jee/toy380>
- Martínez Álvarez, D. (2015). Ecofisiología del cultivo de maíz. In J. A. Garay & J. C. Colazo (Eds.), *El cultivo de maíz en San Luis* (pp. 7–31). Ediciones INTA.
- Martínez, M., Moschini, R., Barreto, D., Bodega, J., Comerio, R., Forjan, H., Piatti, F.,

- Presello, D. A., & Valentinuz, O. (2010). Factores ambientales que afectan el contenido de fumonisina en granos de maíz. *Tropical Plant Pathology*, 35(5), 277–284.
- Martínez Padrón, H. Y., Delgado Hernández, S., Reyes Méndez, C. A., & Vázquez Carrillo, G. (2013). El género *Aspergillus* y sus micotoxinas en maíz en México: problemática y perspectivas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31(2), 126–146.
- Martins, L. M., Sant’Ana, A. S., Pelegrinelli Fungaro, M. H., Silva, J. J., Da Silva do Nascimento, M., Frisvad, J. C., & Taniwaki, M. H. (2017). The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in the Brazilian peanut production chain. *Food Research International*, 94, 101–107.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.02.006>
- Masiello, M., Somma, S., Ghionna, V., Logrieco, A. F., & Moretti, A. (2019). In vitro and in field response of different fungicides against *Aspergillus flavus* and Fusarium species causing ear rot disease of Maize. *Toxins*, 11(1), 11.  
<https://doi.org/10.3390/toxins11010011>
- Massomo, S. M. S. (2020). *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in the maize value chain and what needs to be done in Tanzania. *Scientific African*, 10, e00606.  
<https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00606>
- Maurino, M. F., Raspanti, J. G., Ferrer Lanfranchi, M., Laguna, I. G., & Giménez Pecci, M. P. (2014). Expansión de enfermedades causadas por virus y hongos en maíz, en Argentina. In *X Congreso de Maíz*.
- Mauro, A., Battilani, P., Callicott, K. A., Giorni, P., Pietri, A., & Cotty, P. J. (2013). Structure of an *Aspergillus flavus* population from maize kernels in northern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 162(1), 1–7.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.021>
- Mauro, A., Battilani, P., & Cotty, P. J. (2015). Atoxigenic *Aspergillus flavus* endemic to Italy for biocontrol of aflatoxins in maize. *BioControl*, 60(1), 125–134.  
<https://doi.org/10.1007/s10526-014-9624-5>
- Mazzani, C., Luzón, O., & Chavarri, M. (2004). *Aspergillus flavus* asociado a *Epitragus* sp. (coleoptera: Tenebrionidae) en maíz bajo riego en Turén, estado portuguesa, Venezuela. *Entomotropica*, 19(3), 157–159.
- McClintock, B., Kato, T., & Blumenschein, A. (1981). *Constitución cromosómica de las*

- razas de maíz (C. de P. Texcoco, Estado de México, México:Chapingo (Ed.)).
- McGee, D. C., Olanya, O. M., Hoyos, G. M., & Tiffany, L. H. (1996). Populations of *Aspergillus flavus* in the Iowa cornfield ecosystem in years not favorable for aflatoxin contamination of corn grain. In *Plant Disease* (Vol. 80, Issue 7, pp. 742–746).  
<https://doi.org/10.1094/PD-80-0742>
- Mehl, H. L., & Cotty, P. J. (2008). Variability in competitive ability among *Aspergillus flavus* vegetative compatibility groups during maize infection. *Phytopathology*, *98*, S103.
- Mehl, H. L., & Cotty, P. J. (2010). Variation in competitive ability among isolates of *Aspergillus flavus* from different vegetative compatibility groups during maize infection. *Phytopathology*, *100*(2), 150–159. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-2-0150>
- Mehl, H. L., Jaime, R., Callicott, K. A., Probst, C., Garber, N. P., Ortega Beltran, A., Grubisha, L. C., & Cotty, P. J. (2012). *Aspergillus flavus* diversity on crops and in the environment can be exploited to reduce aflatoxin exposure and improve health. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1273*, 7–17.  
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06800.x>
- Mellon, J. E., Cotty, P. J., & Dowd, M. K. (2007). *Aspergillus flavus* hydrolases: their roles in pathogenesis and substrate utilization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *77*(3), 497–504. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1201-8>
- Miller, S. S., Reid, L. M., Butler, G., Winter, S. P., & McGoldrick, N. J. (2003). Long chain alkanes in silk extracts of maize genotypes with varying resistance to *Fusarium graminearum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(23), 6702–6708.  
<https://doi.org/10.1021/jf0341363>
- Molo, M. S., Heiniger, R. W., Boerema, L., & Carbone, I. (2019). Trial summary on the comparison of various non-Aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* on mycotoxin levels and yield in Maize. *Agronomy Journal*, *111*(2), 942–946.  
<https://doi.org/10.2134/agronj2018.07.0473>
- Montes, B., Restrepo, A., & McEwen, J. G. (2003). Nuevos aspectos sobre la clasificación de los hongos y su posible aplicación médica. *Biomédica*, *23*(2), 213.  
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v23i2.1214>
- Montes, G. N., Reyes, M. C. A., Montes, R. N., & Cantu, A. M. A. (2009). Incidence of

- potentially toxigenic fungi in maize (*Zea mays* L.) grain used as food and animal feed. *CyTA - Journal of Food*, 7(2), 119–125. <https://doi.org/10.1080/19476330902940432>
- Moore, G. G., Singh, R., Horn, B. W., & Carbone, I. (2009). Recombination and lineage-specific gene loss in the aflatoxin gene cluster of *Aspergillus flavus*. *Molecular Ecology*, 18(23), 4870–4887. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04414.x>
- Moreno, J. (2004). *Estudio comparativo de Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus en la producción de aflatoxinas bajo diferentes condiciones de humedad y temperatura*. UNAM. Facultad de Estudios Superiores de Posgrado. Cuautitlán Izcali, Estado de México.
- Moss, M. O. (1991). The environmental factors controlling mycotoxin formation. In J. E. Smith & R. S. Henderson (Eds.), *Mycotoxins and Animal Foods* (pp. 37-56 pp). CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA.
- MRI. Manejo de Resistencia de Insectos, & ASA. Asociación Semilleros Argentinos. (2017). *Programa MRI - ASA*. <http://www.programamri.com.ar/tag/cogollero/>
- Munkvold, G. P., Hurburgh, C., Meyer, J., Loy, D., & Robertson, A. (2012). *Aflatoxins in corn*. <https://doi.org/10.1021/bk-1983-0234.ch016>
- Munkvold, G. P., & White, D. . (2016). *Compendium of corn diseases. Fourth edition* (G. P. Munkvold & D. G. White (Eds.)). The American Phytopathological Society, APS Press.
- Mwakinyali, S. E., Ding, X., Ming, Z., Tong, W., Zhang, Q., & Li, P. (2019). Recent development of aflatoxin contamination biocontrol in agricultural products. In *Biological Control*. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.09.012>
- Nadir, S., Khan, S., Wanasinghe, D., Tibpromma, S., Iqbal, S., Xu, J., & Mortimer, P. (2021). A new record of *Aspergillus vadensis* (Ascomycota) isolated from soil in Yunnan Province, China. *Phyton*, 90(3), 1031–1039. <https://doi.org/10.32604/phyton.2021.012075>
- Nesci, A., Barros, G., Castillo, C., & Etcheverry, M. (2006). Soil fungal population in preharvest maize ecosystem in different tillage practices in Argentina. *Soil and Tillage Research*, 91(1–2), 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.still.2005.11.014>
- Nesci, A., & Etcheverry, M. (2002). *Aspergillus* section *Flavi* populations from field maize in Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, 34(5), 343–348. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2002.01094.x>

- Ni, X., Wilson, J. P., Buntin, G. D., Guo, B., Krakowsky, M. D., Lee, R. D., Cottrell, T. E., Scully, B. T., Huffaker, A., & Schmelz, E. A. (2011). Spatial patterns of aflatoxin levels in relation to ear-feeding insect damage in pre-harvest corn. *Toxins*, 3(7), 920–931. <https://doi.org/10.3390/toxins3070920>
- Nováková, A., Hubka, V., Dudová, Z., Matsuzawa, T., Kubátová, A., Yaguchi, T., & Kolařík, M. (2014). New species in *Aspergillus* section Fumigati from reclamation sites in Wyoming (U.S.A.) and revision of *A. viridinutans* complex. *Fungal Diversity*, 64(1), 253–274. <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0262-5>
- Novas, M. V., & Cabral, D. (2002). Association of mycotoxin and sclerotia production with compatibility groups in *Aspergillus flavus* from peanut in Argentina. *Plant Disease*, 86(3), 215–219.
- Null, J. (2021). *El Niño and La Niña years and intensities*. <https://ggweather.com/enso/oni.htm>
- O'Donnell, K., Nirenberg, H., Aoki, T., & Cigelnik, E. (2000). A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience*, 41(1), 61–78. <https://doi.org/10.1007/BF02464387>
- Ojiambo, P. S., Battilani, P., Cary, J. W., Blum, B. H., & Carbone, I. (2018). Cultural and genetic approaches to manage aflatoxin contamination: recent insights provide opportunities for improved control. *Phytopathology*, 108(9), 1024–1037. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-18-0134-RVW>
- Okoth, S., De Boevre, M., Vidal, A., Diana Di Mavungu, J., Landschoot, S., Kyallo, M., Njuguna, J., Harvey, J., & De Saeger, S. (2018). Genetic and toxigenic variability within *Aspergillus flavus* population isolated from maize in two diverse environments in Kenya. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00057>
- Oleszczuk, J. D., Catalano, M. I., Dalaisón, L., Di Rienzo, J. A., Giménez Pecci, M. P., & Carpane, P. (2020). Characterization of components of resistance to Corn Stunt disease. *PLOS ONE*, 15(10), e0234454. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234454>
- Orum, T. V., Bigelow, D. M., Cotty, P. J., & Nelson, M. R. (1999). Using predictions based on geostatistics to monitor trends in *Aspergillus flavus* strain composition. *Phytopathology*, 89(9), 761–769. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.9.761>
- Pagkali, V., Petrou, P. S., Makarona, E., Peters, J., Haasnoot, W., Jobst, G., Moser, I., Gajos, K., Budkowski, A., Economou, A., Misiakos, K., Raptis, I., & Kakabakos, S.

- E. (2018). Simultaneous determination of aflatoxin B1, fumonisin B1 and deoxynivalenol in beer samples with a label-free monolithically integrated optoelectronic biosensor. *Journal of Hazardous Materials*, 359, 445–453. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.080>
- Paliwal, R. L. (2001). *El maíz en los trópicos*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. <http://www.fao.org/3/x7650s14.htm#TopOfPage>
- Pang, Z. P., Cao, P., Xu, W., & Sudhof, T. C. (2010). Calmodulin controls synaptic strength via presynaptic activation of Calmodulin Kinase II. *Journal of Neuroscience*, 30(11), 4132–4142. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3129-09.2010>
- Papa, K. E. (1973). The parasexual cycle in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, 65(5), 1201–1205. <https://doi.org/10.1080/00275514.1973.12019538>
- Paterson, R. R., & Lima, N. (2010). Toxicology of mycotoxins. *EXS*, 100, 31–63. [https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8338-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8338-1_2)
- Payne, G. A., & Yu, J. (2010). Ecology, development and gene regulation in *Aspergillus flavus*. In M. Machida & K. Gomi (Eds.), *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. (pp. 151-171 pp). Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Peña, C. (2011). Métodos de inferencia filogenética. *Revista Peruana de Biología*, 18(2), 265–267. <https://doi.org/10.15381/rpb.v18i2.243>
- Pérez y Terrón, R., Carmona Díaz, J. C., Cebada Ruíz, J. A., & Munive Hernández, J. A. (2012). Patogenicidad bacteriana en maíz (*Zea mays*). *Revista Iberoamericana de Las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*, 1(1), 3. <https://pdfs.semanticscholar.org/dbc3/d7db1e00f512742a0d664bb02c142e3df4d4.pdf>
- Perrone, G., Gallo, A., & Logrieco, A. F. (2014). Biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in Europe in relation to the management of aflatoxin risk. *Frontiers in Microbiology*, 5(377), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00377>
- Perrone, G., Haidukowski, M., Stea, G., Epifani, F., Bandyopadhyay, R., Leslie, J. F., & Logrieco, A. (2014). Population structure and aflatoxin production by *Aspergillus* Sect. *Flavi* from maize in Nigeria and Ghana. *Food Microbiology*, 41, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.12.005>
- Perrone, G., Susca, A., Cozzi, G., Ehrlich, K., Varga, J., Frisvad, J. C., Meijer, M., Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., & Samson, R. A. (2007). Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in Mycology*, 59,

- 53–66. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.07>
- Perrone, G., Susca, A., Stea, G., & Mulè, G. (2004). PCR Assay for identification of *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus japonicus*. *European Journal of Plant Pathology*, *110*(5/6), 641–649. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000032403.08921.49>
- Peterson, S. W. (2008). Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia*, *100*(2), 205–226. <https://doi.org/10.3852/mycologia.100.2.205>
- Pildain, M. B., Cabral, D., & Vaamonde, G. (2005). Poblaciones de *Aspergillus flavus* en maní cultivados en diferentes zonas agroecológicas de la Argentina, caracterización morfológica y toxigénica. *RIA*, *34*(3), 3–19.
- Pildain, M. B., Frisvad, J. C., Vaamonde, G., Cabral, D., Varga, J., & Samson, R. A. (2008). Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *58*(3), 725–735. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65123-0>
- Pildain, M. B., Vaamonde, G., & Cabral, D. (2004). Analysis of population structure of *Aspergillus flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic origin, mycotoxin and sclerotia production. *International Journal of Food Microbiology*, *93*(1), 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.10.007>
- Pitt, J., & Hocking, A. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>
- Pitt, J. I. (1994). The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. *Medical Mycology*, *32*(s1), 17–32. <https://doi.org/10.1080/02681219480000701>
- Pitt, J. I., Hocking, A. D., & Glenn, D. R. (1983). An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Journal of Applied Bacteriology*, *54*(1), 109–114. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1983.tb01307.x>
- Plazas, M. C., De Rossi, R. L., Brücher, E., Guerra, F. A., Vilaró, M., Guerra, G. D., Wu, G., Ortiz Castro, M. C., & Broders, K. (2018). First report of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* causing bacteria leaf streak of maize (*Zea mays*) in Argentina. *Plant Disease*, *102*(5), 1026–1026. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1578-PDN>
- Plazas, M. C., De Rossi, R. L., Guerra, F. A., & Guerra, G. D. (2014). *Identificación de bacterias que afectan el cultivo de maíz en el centro norte de Córdoba*. III Congreso

Argentino de Fitopatología.

- Pogue, M. (2002). *A world revision of the genus Spodoptera guenée: (Lepidoptera: Noctuidae)*. Amer Entomological Society.
- Prasad, K., Sharma, K. K., & Bhatnagar Mathur, P. (2019). *Biotechnological strategies for development of aflatoxin free crops* (pp. 289–376). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-95354-0\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-319-95354-0_11)
- Presello, D. A., Botta, G., & Iglesias, J. (2004). Podredumbres de espiga de maíz y micotoxinas asociadas. *Idia Xxi*, 4(6), 152–157.  
<http://www.biblioteca.org.ar/libros/210728.pdf>
- Presello, D. A., Botta, G., Iglesias, J., & Eyhéabide, G. H. (2008). Effect of disease severity on yield and grain fumonisin concentration of maize hybrids inoculated with *Fusarium verticillioides*. *Crop Protection*, 27(3–5), 572–576.  
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2007.08.015>
- Presello, D. A., Eyhéabide, G. H., Iglesias, J., Mroginski, E., & Lorea, R. (2012). Cultivares. Criterios para su elección. In G. H. Eyhéabide (Ed.), *Bases para el manejo del cultivo de Maíz* (pp. 79-106 pp). Ediciones INTA.
- Presello, D. A., Fernandez, M., Oviedo, M. S., Iglesias, J., Giomi, G. M., & Fauguel, C. M. (2014). Micotoxinas en maíz. *Cartilla Digital INTA Pergamino*, 1.
- Presello, D. A., Iglesias, J., Fernández, M., Fauguel, C. M., Eyhéabide, G. H., & Lorea, R. (2009). Reacción de cultivares a hongos productores de micotoxinas en maíz. *Estación Experimental Agropecuaria Pergamino “Ing. Agr. Walter Kugler” Grupo Maíz*.  
[http://anterior.inta.gob.ar/f/?url=http://anterior.inta.gob.ar/pergamino/info/documentos/t\\_maiz/09/artic73.htm%255Cnhttp://agrolluvia.com/wp-content/uploads/2010/03/inta-pergamino-publicacion-reaccion-de-cultivares-a-hongos-productores-de-micotoxinas-en-m](http://anterior.inta.gob.ar/f/?url=http://anterior.inta.gob.ar/pergamino/info/documentos/t_maiz/09/artic73.htm%255Cnhttp://agrolluvia.com/wp-content/uploads/2010/03/inta-pergamino-publicacion-reaccion-de-cultivares-a-hongos-productores-de-micotoxinas-en-m)
- Presello, D. A., Iglesias, J., Fernández, M., Fauguel, C. M., Giomi, G. M., & Oviedo, M. S. (2014). Uso de resistencia genética para reducir los niveles de contaminación con micotoxinas en maíz. *Engormix*.  
<https://www.engormix.com/micotoxinas/articulos/uso-resistencia-genetica-reducir-t40563.htm>
- Presello, D. A., Oviedo, M., Fernandez, M., Iglesias, J., & Copia, P. (2016). Resistencia a

- podredumbres. *RTA*, 10(32), 29–32.
- Probst, C., Bandyopadhyay, R., & Cotty, P. J. (2014). Diversity of aflatoxin-producing fungi and their impact on food safety in sub-Saharan Africa. *International Journal of Food Microbiology*, 174, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.010>
- Probst, C., Callicott, K. A., & Cotty, P. J. (2012). Deadly strains of Kenyan *Aspergillus* are distinct from other aflatoxin producers. *European Journal of Plant Pathology*, 132(3), 419–429. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9887-y>
- Probst, C., Njapau, H., & Cotty, P. J. (2007). Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004: identification of the causal agent. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(8), 2762–2764. <https://doi.org/10.1128/AEM.02370-06>
- Probst, C., Schulthess, F., & Cotty, P. J. (2010). Impact of *Aspergillus* section *Flavi* community structure on the development of lethal levels of aflatoxins in Kenyan maize (*Zea mays*). *Journal of Applied Microbiology*, 108(2), 600–610. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04458.x>
- Puhalla, J. E. (1985). Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Canadian Journal of Botany*, 63(2), 179–183. <https://doi.org/10.1139/b85-020>
- Rajasekaran, K., Sayler, R. J., Sickler, C. M., Majumdar, R., Jaynes, J. M., & Cary, J. W. (2018). Control of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in transgenic maize kernels expressing a tachyplestin-derived synthetic peptide, AGM182. *Plant Science*, 270, 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.02.006>
- Rangel Muñoz, E. J. (2019). *Caracterización morfológica molecular de aislados nativos de Aspergillus flavus eficaces para el control de la contaminación con aflatoxinas del ensilaje de maíz en Aguascalientes* [Universidad Autónoma de Aguascalientes, México]. <http://hdl.handle.net/11317/1710>
- Ranum, P., Peña Rosas, J. P., & Garcia Casal, M. N. (2014). Global maize production, utilization, and consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1312(1), 105–112. <https://doi.org/10.1111/nyas.12396>
- Rasheed, U., Wu, H., Wei, J., Ou, X., Qin, P., Yao, X., Chen, H., Chen, A. J., & Liu, B. (2019). A polyphasic study of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from corn in Guangxi, China a hot spot of aflatoxin contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 310(March), 108307.

- <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108307>
- Razzaghi Abyaneh, M., Shams Ghahfarokhi, M., Allameh, A., Kazeroon Shiri, A., Ranjbar Bahadori, S., Mirzahoseini, H., & Rezaee, M. B. (2006). A Survey on distribution of *Aspergillus* section *Flavi* in corn field soils in Iran: Population patterns based on aflatoxins, cyclopiazonic acid and sclerotia production. *Mycopathologia*, *161*(3), 183–192. <https://doi.org/10.1007/s11046-005-0242-8>
- Reddy, K., Raghavender, C., Reddy, B., & Salleh, B. (2010). Biological control of *Aspergillus flavus* growth and subsequent aflatoxin B1 production in sorghum grains. *African Journal of Biotechnology*, *9*(27), 4247–4250. <https://doi.org/10.5897/AJB09.1957>
- Rehman, F. U., Adnan, M., Kalsoom, M., Naz, N., Husnain, M., Ilahi, H., Ilyas, M. A., Yousaf, G., Tahir, R., & Ahmad, U. (2021). Seed borne fungal diseases of maize (*Zea mays* L.): A review. *Agrinula : Jurnal Agroteknologi Dan Perkebunan*, *4*(1), 43–60. <https://doi.org/10.36490/agri.v4i1.123>
- Reis, E. M., Trezzi Casa, R., & Broselin, A. C. (2004). *Manual de diagnose e controle de doencas do milho* (2° ed. Rev). Graphel.
- Reis, T. A., Baquião, A. C., Atayde, D. D., Grabarz, F., & Corrêa, B. (2014). Characterization of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from organic Brazil nuts using a polyphasic approach. *Food Microbiology*, *42*, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.02.012>
- Ren, Y., Jin, J., Zheng, M., Yang, Q., & Xing, F. (2020). Ethanol inhibits Aflatoxin B1 biosynthesis in *Aspergillus flavus* by up-regulating oxidative stress-related genes. *Frontiers in Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02946>
- Riba, A., Bouras, N., Mokrane, S., Mathieu, F., Lebrihi, A., & Sabaou, N. (2010). *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in Algerian wheat and derived products. *Food and Chemical Toxicology*, *48*(10), 2772–2777. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.07.005>
- Ritchie, S. W., & Hanway, J. J. (1982). *How a corn plant develops*. Iowa State University of Science and Technology. Cooperative Extension Service Ames, Iowa. Special Report N° 48.
- Rodrigues, P., Santos, C., Venâncio, A., & Lima, N. (2011). Species identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates from Portuguese almonds using phenotypic,

- including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. *Journal of Applied Microbiology*, 111(4), 877–892. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05116.x>
- Rodrigues, P., Venâncio, A., Kozakiewicz, Z., & Lima, N. (2009). A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. *International Journal of Food Microbiology*, 129(2), 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.023>
- Rodríguez, A. V. (2018). *Comportamiento de híbridos de maíz ante una cepa de Aspergillus flavus en la provincia de Córdoba* [Universidad Nacional de La Plata]. <https://doi.org/10.35537/10915/70667>
- Rodríguez Alvarado, G., Betancourt Resendes, I., Rodríguez Fernández, R., Velázquez Monreal, J., Fernández Pavía, S., & Gómez Dorantes, N. (2013). Caracterización de grupos de compatibilidad vegetativa de *Fusarium mexicanum* causante de la Malformación del Mango en Jalisco , México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 30(2), 128–140.
- Rodriguez del Bosque, L. A. (1996). Impact of agronomic factors on aflatoxin contamination in preharvest field corn in northeastern México. *Plant Disease*, 80(9), 988–993.
- Rodriguez del Bosque, L. A., Cantú Almaguer, M. A., & Reyes Méndez, C. A. (2010). Effect of planting date and hybrid selection on *Helicoverpa zea* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptere: Noctuidae) damage on maize ears in northeastern México. *Southwestern Entomologist*, 35(2), 157–164. <https://doi.org/10.3958/059.035.0204>
- Rodríguez Guerra, R., Ramirez Rueda, M. T., & Simpson, J. (2004). Capacidad de anastomosis de cepas del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib., agente aausal de la Antracnosis del Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(1), 37–43.
- Rodriguez Tejeda, A. (2018). *El aporte de la cadena del maíz a la economía argentina*. <http://www.congresomaizar.org.ar/2018/presentaciones/maiz/tejeda.pdf>
- Rosada, L. J., Santana, J. R., Franco, C. C. S., Esquissato, G. N. M., Santos, P. A. S. R., Yajim, J. P. R. S., Ferreira, F. D., Machinski, M., Correa, B., & Castro Prado, M. A. A. (2013). Identification of *Aspergillus flavus* isolates as potential biocontrol agents of aflatoxin contamination in crops. *Journal of Food Protection*, 76(6), 1051–1055. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-436>

- Rosada, L., Sant'anna, J., Franco, C., Esquissato, G., Santos, P., Yajima, J., Ferreira, F., Machinski, M., Corrêa, B., & Castro-Prado, M. (2013). Identification of *Aspergillus flavus* isolates as potential biocontrol agents of aflatoxin contamination in crops. *Journal of Food Protection*, 76(6), 1051–1055. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-436>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Saldan, N. C., Almeida, R. T. R., Avíncola, A., Porto, C., Galuch, M. B., Magon, T. F. S., Pilau, E. J., Svidzinski, T. I. E., & Oliveira, C. C. (2018). Development of an analytical method for identification of *Aspergillus flavus* based on chemical markers using HPLC-MS. *Food Chemistry*, 241, 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.065>
- Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Susca, A., Tanney, J. B., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Yaguchi, T., & Frisvad, J. C. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 78, 141–173. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>
- Santos Chona, O. (2010). Importancia y efectos de la aflatoxina en los seres humanos. *MedUNAB*, 2. <http://www.bvsde.paho.org/bvstox/e/fulltext/aflatoxi/aflatoxi.pdf>
- Scarpari, M., Punelli, M., Scala, V., Zaccaria, M., Nobili, C., Ludovici, M., Camera, E., Fabbri, A. A., Reverberi, M., & Fanelli, C. (2014). Lipids in *Aspergillus flavus* maize interaction. *Frontiers in Microbiology*, 5(FEB), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00074>
- Schabo, D. C., Martins, L. M., Maciel, J. F., Iamanaka, B. T., Taniwaki, M. H., Schaffner, D. W., & Magnani, M. (2020). Production of aflatoxin B1 and B2 by *Aspergillus flavus* in inoculated wheat using typical craft beer malting conditions. *Food Microbiology*, 89, 103456. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103456>
- Scott, P. M. (1992). Methods for the detection and determination of nitrogen-containing mycotoxins. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 28, 617–625.
- Sepúlveda, C., & Piontelli, E. (2005). Poblaciones de *Aspergillus* en semillas de maíz y soja de importación Argentina: énfasis en la sección *Flavi*. *Boletín Micológico*, 20,

41–55.

- Serra, R., & Peterson, S. W. (2007). *Penicillium astrolabium* and *Penicillium neocrassum*, two new species isolated from grapes and their phylogenetic placement in the *P. olsonii* and *P. brevicompactum* clade. *Mycologia*, 99(1), 78–87. <https://doi.org/10.1080/15572536.2007.11832602>
- Shakeel, Q., Lyu, A., Zhang, J., Wu, M., Li, G., Hsiang, T., & Yang, L. (2018). Biocontrol of *Aspergillus flavus* on peanut kernels using *Streptomyces yanglinensis*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1049. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01049>
- Singh, P., Callicott, K. A., Orbach, M. J., & Cotty, P. J. (2020). Molecular analysis of S-morphology aflatoxin producers from the United States reveals previously unknown diversity and two new taxa. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01236>
- Singh, P., & Cotty, P. J. (2019). Characterization of *Aspergilli* from dried red chilies (*Capsicum spp.*): Insights into the etiology of aflatoxin contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 289, 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.025>
- Singh, P., Orbach, M., & Cotty, P. J. (2018). *Aspergillus texensis*: a novel aflatoxin producer with S morphology from the United States. *Toxins*, 10(12), 513. <https://doi.org/10.3390/toxins10120513>
- Sinisterra, X., Medina, G., & Arbeláez, G. (1993). Uso de la compatibilidad vegetativa en la identificación de las razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum*. *Agronomía Colombiana*, 10(1), 28–32.
- Sivaraman, G. K., Visnuvinayagam, S., Jha, A. K., Remya, S., Renuka, V., Ajeesh, K., & Vanik, D. (2018). Molecular divergence and identification of *Aspergillus* species in dry fishes of Gujarat, India. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 88(2), 505–515. <https://doi.org/10.1007/s40011-016-0779-y>
- Smith, E. E., Kubena, L. F., Braithwaite, C. E., Harvey, R. B., Phillips, T. D., & Reine, A. H. (1992). Toxicological evaluation of aflatoxin and cyclopiazonic acid in broiler chickens. *Poultry Science*, 71(7), 1136–1144. <https://doi.org/10.3382/ps.0711136>
- SMN. Servicio Meteorológico Nacional. (2020). *Atlas Climático Argentina*. Atlas Climático Argentina. <https://www.smn.gob.ar/clima/atlasclimatico>

- SMN. Servicio Meteorológico Nacional. (2021). *El Niño/La Niña*.  
[https://www.smn.gob.ar/como\\_nos\\_afecta](https://www.smn.gob.ar/como_nos_afecta)
- Sorensen, A. B., Søndergaard, M. T., & Overgaard, M. T. (2013). Calmodulin in a heartbeat. *FEBS Journal*, 280(21), 5511–5532. <https://doi.org/10.1111/febs.12337>
- Soriano del Castillo, J. M. (2007). *Micotoxinas en Alimentos* (1°). Ediciones Díaz de Santos.
- Sornmayura, P., Boonsakan, P., Sobhonslidsuk, A. Sriphojanart, S., Euanorasetr, C., & Bunyaratvej, S. (2007). Dysplastic nodules and small primary carcinoma of the liver: a study detecting the early morphological changes during hepatocarcinogenesis. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 90(2), 352–362.
- Susca, A., Stea, G., Mulè, G., & Perrone, G. (2007). Polymerase chain reaction (PCR) identification of *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* based on the calmodulin gene. *Food Additives and Contaminants*, 24(10), 1154–1160.  
<https://doi.org/10.1080/02652030701546206>
- Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10(3), 512–526.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>
- Taniwaki, M. H., & Pitt, J. I. (2013). Mycotoxins. In M. P. Doyle & R. L. Buchanan (Eds.), *Food microbiology: fundamentals and frontiers* (4th ed., pp. 597-618 pp). ASM Press: Washington, USA.
- Tola, M., & Kebede, B. (2016). Occurrence, importance and control of mycotoxins: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1–12.  
<https://doi.org/10.1080/23311932.2016.1191103>
- Toso, R. E., Toribio, M. S., Diesser, M., Borello, A. B., & Ardoino, S. M. (2018). Affections in animals and humans due to ingestion or exposure to aflatoxins. Preventive measures to avoid toxic effects. *Ciencia Veterinaria*, 20(1), 51–67.  
<https://doi.org/10.19137/cienvet-20182013>
- Totis de Zeljkovich, L. E. (2012). Requerimientos agroclimáticos del cultivo de maíz. In G. H. Eyherávide (Ed.), *Bases para el manejo del cultivo de Maíz* (pp. 7–24). Ediciones INTA.
- Trail, F., Mahanti, N., & Linz, J. (1995). Molecular biology of aflatoxin biosynthesis.

- Microbiology*, 141(4), 755–765. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-4-755>
- Tran Dinh, N., Pitt, J. I., & Markwell, P. J. (2014). Selection of nontoxic strains of *Aspergillus flavus* for biocontrol of aflatoxins in maize in Thailand. *Biocontrol Science and Technology*, 3157(July 2015), 1–20.  
<https://doi.org/10.1080/09583157.2014.888398>
- Trucksess, M. W., & Stack, M. E. (1994). Enzyme-linked immunosorbent assay of total aflatoxins B1, B2, and G1 in corn: follow-up collaborative study. *Journal of AOAC International*, 77(3), 655–658.
- Trumper, E. V. (2014). Resistencia de insectos a cultivos transgénicos con propiedades insecticidas. Teoría, estado del arte y desafíos para la República Argentina. *Agriscientia*, 31(2), 109–126.
- Uka, V., Moore, G. G., Arroyo Manzanares, N., Nebija, D., De Saeger, S., & Di Mavungu, J. D. (2017). Unravelling the diversity of the cyclopiazonic acid family of mycotoxins in *Aspergillus flavus* by UHPLC triple-TOF HRMS. *Toxins*, 9(1), 1–21.  
<https://doi.org/10.3390/toxins9010035>
- Ul Hassan, Z., Al Thani, R., Atia, F. A., Alsafran, M., Migheli, Q., & Jaoua, S. (2021). Application of yeasts and yeast derivatives for the biological control of toxigenic fungi and their toxic metabolites. *Environmental Technology & Innovation*, 22, 101447. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101447>
- Urrego Novoa, J. R., & Díaz, G. J. (2006). Aflatoxinas: mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. *Revista de La Facultad de Medicina*, 54(2), 108–116.
- USDA - FAS. United States Department of Agriculture. (2021). *Market and Trade Data*. <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery>
- USDA - FAS Argentina. United States Department of Agriculture. (2021). *Argentina: Grain and Feed Update*. <https://www.fas.usda.gov/data/argentina-grain-and-feed-update-10>
- USDA - FAS Brasil. United States Department of Agriculture. (2021). *Grain and Feed update*. <https://www.fas.usda.gov/data/brazil-grain-and-feed-update-13>
- USDA - FAS México. United States Department of Agriculture. (2021). *México: Grain and Feed Update*. <https://www.fas.usda.gov/data/mexico-grain-and-feed-update-13>
- Usman, M., Javed, M. R., Mehmood, M. A., Huma, T., & Ijaz, A. (2019). Isolation of

- aflatoxigenic *Aspergillus flavus* from animal-feed and exploration of the genetic basis of aflatoxin biosynthesis. *Pakistan Veterinary Journal*, 39(04), 541–547.  
<https://doi.org/10.29261/pakvetj/2019.078>
- Vaamonde, G., Patriarca, A., Fernández Pinto, V., Comerio, R., & Degrossi, C. (2003). Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *Flavi* from different substrates in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 88(1), 79–84. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00101-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00101-6)
- Vaillancourt, L. J., & Hanau, R. M. (1994). Nitrate-nonutilizing mutants used to study heterokaryosis and vegetative compatibility in *Glomerella graminicola* (*Colletotrichum graminicola*). *Experimental Mycology*, 18(4), 311–319.  
[https://doi.org/10.1016/S0147-5975\(06\)80004-6](https://doi.org/10.1016/S0147-5975(06)80004-6)
- Valdivia, A., Quezada, T., Ortiz, R., & Martínez, A. (2012). Contaminantes ambientales y estrés oxidativo-micotoxinas. In J. F. Jaramillo & S. M. C. Martínez (Eds.), *Estrés oxidativo y su impacto en la salud* (pp. 133-155 pp). Universidad Autónoma de Aguascalientes, México.
- Van Den Bossche, H., Cauwenbergh, G., & MacKenzie, D. W. R. (1988). *Aspergillus and Aspergillosis* (H. Vanden Bossche, D. W. R. Mackenzie, & G. Cauwenbergh (Eds.)). Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-3505-2>
- Van Egmond, H. P. (1989). Aflatoxin M1: occurrence, toxicity, regulation. In H. P. Van Egmond (Ed.), *Mycotoxins in dairy products* (pp. 11-55 pp). Elsevier, London, UK.
- Van Frankenhuyzen, K. (2009). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101(1), 1–16.  
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.02.009>
- Varga, J., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2011). Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Studies in Mycology*, 69(1), 57–80.  
<https://doi.org/10.3114/sim.2011.69.05>
- Varga, J., Frisvad, J., & Samson, R. (2009). A reappraisal of fungi producing aflatoxins. *World Mycotoxin Journal*, 2(3), 263–277. <https://doi.org/10.3920/WMJ2008.1094>
- Varón de Agudelo, F., & Sarria Villa, G. A. (2007). Enfermedades del maíz y su manejo. In *Instituto Colombiano Agropecuario. Palmira, Colombia* (Grupo de T). ICA. Instituto Colombiano Agropecuario.
- Viglizzo, F. (2010). El agro, el clima y el agua en La Pampa Semiárida : Revisando

- paradigmas. *Jornada “Condiciones Para El Desarrollo de Producciones Agrícola-Ganaderas En El S.O. Bonaerense,”* 251–267.  
<http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/27600>
- Villers, P. (2014). Aflatoxins and safe storage. *Frontiers in Microbiology*, 5(APR), 1–6.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00158>
- Virla, E. G., Díaz, C. G., Carpane, P., Laguna, I. G., Ramallo, J., Gerónimo Gómez, L., & Giménez Pecci, M. P. (2004). Evaluación preliminar de la disminución en la producción de maíz causada por el “Corn Stunt Spiroplasma” (CSS) en Tucumán, Argentina. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 30, 257–267.
- Visagie, C. M., Varga, J., Houbaken, J., Meijer, M., Kocsubé, S., Yilmaz, N., Fotedar, R., Seifert, K. A., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2014). Ochratoxin production and taxonomy of the yellow Aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*). *Studies in Mycology*, 78, 1–61. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.001>
- Vollmeister, E., Schipper, K., Baumann, S., Haag, C., Pohlmann, T., Stock, J., & Feldbrügge, M. (2012). Fungal development of the plant pathogen *Ustilago maydis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(1), 59–77. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00296.x>
- Wahl, N., Murray, S. C., Isakeit, T., Krakowsky, M., Windham, G. L., Williams, W. P., Guo, B., Ni, X., Knoll, J., Xu, W., Scully, B., Mayfield, K., & Betran, J. (2017). Identification of resistance to aflatoxin accumulation and yield potential in maize hybrids in the Southeast Regional Aflatoxin Trials (SERAT). *Crop Science*, 57(1), 202–215. <https://doi.org/10.2135/cropsci2016.06.0519>
- Wang, J. S., & Tang, L. (2004). Epidemiology of aflatoxin exposure and human liver cancer. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 23(2–3), 249–271.  
<https://doi.org/10.1081/TXR-200027834>
- Waquil, J. M., Dourado, P. M., Carvalho, R. A. de, Oliveira, W. S., Berger, G. U., Head, G. P., & Martinelli, S. (2013). Management of Lepidopteran pests in maize crop using the Bt pyramided event Cry1A.105 and Cry2Ab2. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48(12), 1529–1537. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013001200001>
- Warburton, M. L., & Williams, W. P. (2014). Aflatoxin resistance in maize: What have we learned lately? *Advances in Botany*, 2014, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2014/352831>
- Weaver, M., Abbas, H. K., Brewer, M., Pruter, L., & Little, N. (2017). Integration of

- biological control and transgenic insect protection for mitigation of mycotoxins in corn. *Crop Protection*, 98, 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.03.020>
- White, D. G. (1999). *Compendium of corn diseases*. APS Press, St Paul, MN, USA.
- Wiatrak, P. J., Wright, D. L., Marois, J. J., & Wilson, D. (2005). Influence of planting date on aflatoxin accumulation in Bt, non-Bt, and tropical non-Bt hybrids. *Agronomy Journal*, 97(2), 440–445. <https://doi.org/10.2134/agronj2005.0440>
- Wicklowsky, D. T. (1991). Epidemiology of *Aspergillus flavus* in corn. In O. L. Shotwell & C. R. Hurburg (Eds.), *Aflatoxin in corn: new perspectives* (p. 599).
- Wicklowsky, D. T., & Shotwell, O. L. (1983). Intrafungal distribution of aflatoxins among conidia and sclerotia of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 29(1), 1–5. <https://doi.org/10.1139/m83-001>
- Widstrom, N. W. (1992). Aflatoxin in developing maize: interactions among involved biota and pertinent economic factors. In D. Bhatnagar, E. B. Lillehoj, & D. K. Arora (Eds.), *Mycotoxins in Ecological Systems* (pp. 23-58 pp). Marcel Dekker, New York, USA.
- Wilkes, H. G., & Goodman, M. M. (1995). Mystery and missing links: The origin of maize. In S. Taba (Ed.), *Maize Genetics Resources. Maize Program Special Report. Mexico, D.F.: CIMMYT*. (1995th ed., p. 95). CIMMYT.
- Williams, W. P., Alpe, M. N., Windham, G. L., Ozkan, S., & Mylroie, J. E. (2013). Comparison of two inoculation methods for evaluating maize for resistance to *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin accumulation. *International Journal of Agronomy*, 2013, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2013/972316>
- Williams, W. P., & Windham, G. L. (2012). Registration of Mp718 and Mp719 germplasm lines of maize. *Journal of Plant Registrations*, 6(2), 200–202. <https://doi.org/10.3198/jpr2011.09.0489crg>
- Williams, W. P., Windham, G. L., Buckley, P. M., & Perkins, J. M. (2005). Southwestern corn borer damage and aflatoxin accumulation in conventional and transgenic corn hybrids. *Field Crops Research*, 91(2–3), 329–336. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2004.08.002>
- Windham, G. L., & Williams, W. P. (1998). *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin accumulation in resistant and susceptible maize hybrids. *Plant Disease*, 82(3), 281–284. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.3.281>

- Windham, G. L., & Williams, W. P. (2007). Systemic infection of stalks and ears of corn hybrids by *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia*, *164*(5), 249–254.  
<https://doi.org/10.1007/s11046-007-9049-0>
- Windham, G. L., & Williams, W. P. (2012). Comparison of different inoculating methods to evaluate the pathogenicity and virulence of *Aspergillus niger* on two maize hybrids. *Phytoparasitica*, *40*(4), 305–310. <https://doi.org/10.1007/s12600-012-0220-x>
- Windham, G. L., & Williams, W. P. (2016). Effect of inoculum concentrations of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on aflatoxin accumulation and kernel infection in resistant and susceptible maize hybrids. *Phytoparasitica*, *44*(3), 333–339.  
<https://doi.org/10.1007/s12600-016-0523-4>
- Windham, G. L., Williams, W. P., Mylroie, J. E., Reid, C. X., & Womack, E. D. (2018). A histological study of *Aspergillus flavus* colonization of wound inoculated maize kernels of resistant and susceptible maize hybrids in the field. *Frontiers in Microbiology*, *9*(APR), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00799>
- Wogan, G. N., Kensler, T. W., & Groopman, J. D. (2012). Present and future directions of translational research on aflatoxin and hepatocellular carcinoma. A review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, *29*(2), 249–257.  
<https://doi.org/10.1080/19440049.2011.563370>
- Wu, F. (2007). Bt corn and impact on mycotoxins. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, *2*(060).  
<https://doi.org/10.1079/PAVSNNR20072060>
- Wu, F. (2015). Global impacts of aflatoxin in maize: trade and human health. *World Mycotoxin Journal*, *8*(2), 137–142. <https://doi.org/10.3920/WMJ2014.1737>
- Wu, F., Stacy, S. L., & Kensler, T. W. (2013). Global risk assessment of aflatoxins in maize and peanuts: are regulatory standards adequately protective? *Toxicological Sciences*, *135*(1), 251–259. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft132>
- Xolocotzi, E. H. (1985). Maize and man in the Greater Southwest. *Economic Botany*, *39*(4), 416–430. <https://doi.org/10.1007/BF02858749>
- Yasui, K., Kitamoto, K., Gomi, K., Kumagai, C., Ohya, Y., & Tamura, G. (1995). Cloning and nucleotide sequence of the Calmodulin-encoding gene (*cmdA*) from *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *59*(8), 1444–1449.  
<https://doi.org/10.1271/bbb.59.1444>

- Yu, J. (2012). Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination. *Toxins*, 4(11), 1024–1057.  
<https://doi.org/10.3390/toxins4111024>
- Yu, J., Cleveland, T. E., Nierman, W. C., & Bennett, J. W. (2005). *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. *Revista Iberoamericana de Micología*, 22(4), 194–202.  
[https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(05\)70043-7](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(05)70043-7)
- Yu, J., Nierman, W. C., & Thomas, E. (2010). Genetic and genomic of *Aspergillus flavus*. In M. C. Rai & G. Kovics (Eds.), *Progress in mycology* (pp. 51-73 pp). Scientific Publishers, India.
- Yu, J., Woloshuk, C. P., Bhatnagar, D., & Cleveland, T. E. (2000). Cloning and characterization of avfA and omtB genes involved in aflatoxin biosynthesis in three *Aspergillus* species. *Gene*, 248(1–2), 157–167. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00126-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00126-8)
- Yuan, J., Li, D., Qin, L., Shen, J., Guo, X., Tumukunde, E., Li, M., & Wang, S. (2019). HexA is required for growth, aflatoxin biosynthesis and virulence in *Aspergillus flavus*. *BMC Molecular Biology*, 20(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s12867-019-0121-3>
- Zafar, S., Ali, M., Iqbal, N., Aziz, K., Haider, M. Z., & Rafique, M. (2018). Effects of *Aspergillus flavus* inoculation on spring maize (*Zea mays* L.) grain yield. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 13(04), 24–35.  
<https://doi.org/10.12692/ijb/13.4.24-35>
- Zafar, S., Iqbal, N., Zulqurnain Haidar, M., Rafique, M., & Ali, M. (2021). Responses of spring sown maize (*Zea mays* L.) genotypes to *Aspergillus flavus* inoculation: grain yield and quality attributes. *Pakistan Journal of Botany*, 53(4).  
[https://doi.org/10.30848/PJB2021-4\(30\)](https://doi.org/10.30848/PJB2021-4(30))
- Zhang, M., Abrams, C., Wang, L., Gizzi, A., He, L., Lin, R., Chen, Y., Loll, P. J., Pascal, J. M., & Zhang, J. (2012). Structural basis for calmodulin as a dynamic calcium sensor. *Structure*, 20(5), 911–923. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.03.019>
- Zhou, L., Wei, D. D., Selvaraj, J. N., Shang, B., Zhang, C. S., Xing, F. G., Zhao, Y. J., Wang, Y., & Liu, Y. (2015). A strain of *Aspergillus flavus* from China shows potential as a biocontrol agent for aflatoxin contamination. *Biocontrol Science and Technology*, 25(5), 583–592. <https://doi.org/10.1080/09583157.2014.998990>

- Zhu, C., Niu, Y., Zhou, Y., Guo, J., Head, G. P., Price, P. A., Wen, X., & Huang, F. (2019). Survival and effective dominance level of a Cry1A.105/Cry2Ab2-dual gene resistant population of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) on common pyramided Bt corn traits. *Crop Protection*. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.09.008>
- Zúñiga Oñate, L. A. (2016). *Duración de las etapas fenológicas y profundidad radicular del cultivo de maíz (Zea mays) var. balnco harinoso criollo bajo las condiciones climáticas del cantón cevallos*. Universidad técnica de Ambato, Facultad de Ciencias Agropecuarias.