

Título: Metabolitos secundarios de hongos endófitos y fitopatógenos.
Secondary metabolites of plant pathogens and endophytic fungi.

Autor: Leonor Carrillo

Càtedra de Microbiologia Agrícola, Facultad de Ciencias Agrarias, UNJu

Resumen: Las plantas parecen totalmente autónomas, sin embargo, tienen hongos asociados en sus hojas y raíces. Estos hongos sintetizan metabolitos secundarios durante la fase estacionaria de su crecimiento, los cuales intervienen activamente en las relaciones mutualistas o patogénicas. Algunos de estos metabolitos son tóxicos para insectos y mamíferos por lo cual son importantes en el ambiente agrario.

Palabras clave: metabolitos, hongos, endófitos, fitopatógenos

Summary: *Plants seem to be totally autonomous, however, have in their leaves and roots associated fungi. These fungi synthesize secondary metabolites during the stationary phase of growth, which are actively involved in mutualistic or pathogenic relationships. Some of these metabolites are toxic to insects and mammals which are important in the agricultural environment.*

Key words: *metabolites, fungi, endophytes, plant pathogens*

1. Introducción

Hongos

Los hongos comprenden a microorganismos unicelulares (levaduras) y filamentosos (mohos), así como macroorganismos (setas, bejines y otros). Los filamentos (hifas) presentan septos perforados, o carecen de ellos, lo que permite el movimiento del citoplasma. Las hifas generan un micelio que se extiende radialmente sobre una superficie plana. Los hongos se multiplican por medio de esporas. Las de origen asexual se encuentran dentro de esporangios (esporangiosporas) o se desarrollan sobre las hifas o bien en el ápice de los conidióforos (conidios). Estos últimos en algunos casos están reunidos en un coremio, dentro de un picnidio o sobre una acérvula. Las esporas de origen sexual reciben distintos nombres según el tipo de hongos (ascosporas, basidiosporas, oosporas, zigosporas) y se originan en cuerpos fructíferos de morfología diversa. Los esclerocios son estructuras de resistencia desarrolladas sobre las colonias y las clamidosporas son células modificadas que sobreviven al micelio (Webster y Weber, 2007). El concepto morfológico de especie (morfoespecie) está basado en la similitud del aspecto y presenta dificultades para definir los límites de la misma porque las pocas características usadas pueden variar por la influencia del ambiente.

El concepto biológico de una especie está definido por el cruzamiento. El primer problema consiste en identificar las barreras entre individuos morfológicamente similares y este concepto no se puede aplicar siempre a los organismos homotálicos y asexuales. Tanto el concepto fisiológico como el ecológico parecen razonables cuando se trata de hongos parásitos o simbióticos y se ha usado con los patógenos vegetales.

Las plantas parecen totalmente autónomas, sin embargo, tienen en sus raíces hongos asociados formando micorrizas, cuya función más importante es absorber los elementos minerales menos móviles del suelo y transferirlos a la planta hospedante, mientras ésta proporciona compuestos carbonados al hongo.

El término endófito describe al microorganismo que pasa toda su vida o parte de ella dentro del tejido vegetal sin causar signos visibles de infección. Los asociados a las plantas herbáceas causan grandes cambios en el crecimiento y composición química de las mismas.

Los hongos perjudiciales tienen un período endofítico muy corto, aunque algunos patógenos latentes suelen estar asintomáticos durante semanas o meses. Se han encontrado endófitos en cada órgano vegetal, aunque la distribución dentro de la planta es heterogénea (Moore y otros, 2011).

Tabla 1.1. Reinos, divisiones y subdivisiones de los hongos propiamente dichos y organismos relacionados (Moore y otros 2011; Spatafora y otros 2016).

- PROTOZOA: principalmente fagotróficos, sin pared
- ✓ *Myxomycota*: organismos mucosos, plasmodiales o unicelulares, de vida libre
- ✓ *Plasmodiophoromycota*: plasmodio intracelular, zoosporangio, parásito obligado
- ✓ *Acrasiomycota*: ameboide, saprobios
- CHROMISTA: no fagotróficos, flagelos con mastigonemas (tipo pincel), pared con celulosa
- ✓ *Labyrinthulomycota*: células deslizantes dentro de una red tubular, gametas biflageladas
- ✓ *Hyphochytriomycota*: holo o eucárpico, esporangio, zoosporas con un flagelo anterior
- ✓ *Oomycota*: unicelular o micelio sin septos, esporangio, zoosporas con dos flagelos, hifa somática diploide, reproducción oogámica
- EUMYCOTA: osmotróficos, pared con quitina
- ✓ *Chytridiomycota*: unicelular o micelial, zoosporas con solo un flagelo posterior, meiosis zigótica
- ✓ *Neocallimastigomycota*: anaerobios, con hidrogenosomas
- ✓ *Blastocladiomycota*: meiosis en esporos, gametotalo haploide, esporotalo diploide
- ✓ *Microsporidia*: parasito unicelular, mitocondrias muy reducidas
- ✓ *Mucoromycota*: micelio en general sin septos, zigosporas por conjugación gametangial
 - *Mucoromycotina*: saprobios en su mayoría, mitosporas en esporangios
 - *Mortierellomycotina*: esporangios sin columela
 - *Glomeromycota*: agentes de las endomicorrizas arbusculares
- ✓ *Zoopagomycota*: forma esporangios, merosporangios o conidios, zyposporas por conjugación gametangial
 - *Entomophthoromycotina*: parásitos de artrópodos o saprobios
 - *Zoopagomycotina*: parásitos
 - *Kickxellomycotina*: saprobios, parásitos o simbioses
- Dikarya
- ✓ *Ascomycota*: meiosporas dentro de ascas, anamorfos conidiales
 - *Pezizomycotina*: micelio septado, ascas en ascomas diversos

- *Taphrinomycotina*: parásito, micelio subcuticular o subepidérmico, ascas desnudas
- *Saccharomycotina*: levaduras brotantes, ascas libres
- ✓ *Basidiomycota*: meiosporas sobre basidios o estructura equivalente, micelio con septos doliporo o levaduras
 - *Agaricomycotina*
 - *Agaricomycetes*: basidioma visible carnoso, coriáceo o duro; hifas con fibulas; basidio sin septos primarios sobre laminillas, poros o en gasteroma; saprobios (epígeos, hipógeos o lignícolas) o ectomicorrízicos, raramente parásitos
 - *Tremellomycetes*: basidioma visible gelatinoso o ceroso; basidio septado; lignícolas o micoparásitos
 - *Dacrymycetes*: basidioma gelatinoso, basidio bifurcado, parentesoma no perforado
 - *Pucciniomycotina*: meiosporas en soros, micelio sin fibulas, parásitos obligados de plantas o insectos (royas)
 - *Ustilaginomycotina*: con fase levaduriforme, septo hifal por lo común sin doliporo (carbones)

Crecimiento

Los mohos son organismos saprobios, simbioses o parásitos, que tienen un área superficial amplia para absorber nutrientes y excretan enzimas para digerir parcialmente el sustrato orgánico que los nutre, cuya masa micelial contiene tanto células jóvenes como viejas. La trofofase es la etapa de captación de nutrientes y aumento del peso seco, mientras que la idiofase está asociada con el agotamiento de nutrientes y la síntesis de la mayoría de los metabolitos secundarios (Kale y Bennett, 1992). El área superficial es amplia y la actividad dinámica de esta estructura conduce a una interrelación íntima con el ambiente y los factores extrínsecos (temperatura, pH, actividad del agua, composición química del sustrato) tienen influencia sobre el crecimiento y la biosíntesis (Moss 1991). En general requieren una alta disponibilidad de agua, sin embargo algunos son xerófilos, tal es el caso de *Xeromyces bisporus* que puede crecer hasta en ambientes con una actividad de agua (a_w) de 0,62 debido a la presencia intracelular de una alta concentración de solutos compatibles, como glicerol y otros polialcoholes, que contrarrestan el efecto de la pérdida de agua. Entre los mohos contaminantes que crecen en ambientes con a_w entre

0,75 y 0,90 se encuentran especies de *Aspergillus*, *Eurotium*, y *Penicillium* (Carlile y otros, 2001).

Los mohos epífitos requieren para la germinación una a_w de 0,85-0,90, para el crecimiento 0,88-0,92 y para la esporulación 0,90-0,92. Esto equivale a una humedad relativa en equilibrio (HRE) de 85-90, 88-92 y 90-92% o expresado como potencial agua (Ψ) -22,4 a -14,5, -17,6 a -11,5 y -14,5 a -11,5 MPa respectivamente. En cambio, el límite menor de a_w para la esporulación en los patógenos oscila entre 0,90 y 0,98, como es el caso de *Fusarium*.

Los hongos se desarrollan bajo un amplio rango de temperatura entre 0 y 35°C, aunque algunos pueden hacerlo a 40°C o más. Las especies psicotolerantes crecen a la temperatura de congelación, así el rango de crecimiento en *Penicillium aurantiogriseum* va de -4 a + 35°C, y las termotolerantes por sobre los 40°C, como *Humicola lanuginosa* o *Aspergillus fumigatus* que alcanzan los 55°C, pero las ascosporas de *Neosartorya fischeri* y algunos otros hongos pueden sobrevivir a temperaturas extremas en ambientes secos (Lacey, 1989).

Para la mayoría de las especies el rango de pH más favorable es 5,5 - 6,5 y algunos toleran condiciones muy ácidas.

Los hongos requieren oxígeno para vivir, pero las levaduras y unos pocos mohos también tienen un metabolismo fermentativo. La concentración de O₂ puede bajar hasta 4% antes que se observe un cambio importante en la velocidad de crecimiento de muchas especies. El aumento de la concentración de CO₂ en la atmósfera hasta 5-10% suele estimular el crecimiento de algunas especies cuando el Ψ es alto. La tolerancia de *Penicillium roquefortii* a un alto nivel de CO₂ disminuye con un descenso en la concentración de O₂ y la temperatura.

La luz no parece ser un factor limitante, especialmente en aquellas especies que poseen pigmentación oscura (Carlile y otros 2001). La radiación ultravioleta reduce la viabilidad de las esporas, y la luz azul disminuye la biosíntesis de algunos metabolitos, como es el caso de ocratoxina y citrinina (Schmidt-Heydt y otros, 2012).

Por otra parte, las condiciones bajo las cuales hay un número de hongos mayor son aquellas en las cuales pueden sobrevivir o competir más frente a otros organismos, no crecer mejor (Carlile y otros 2001).

Metabolismo secundario

El metabolismo secundario consiste en un pequeño número de procesos enzimológicos que convierten a unos compuestos intermediarios del metabolismo primario en otros, los

cuales permiten la comunicación intercelular facilitando la defensa y competitividad frente a otros organismos. La mayoría de los metabolitos secundarios tienen su origen en un pequeño número de intermediarios (figura 1.1).

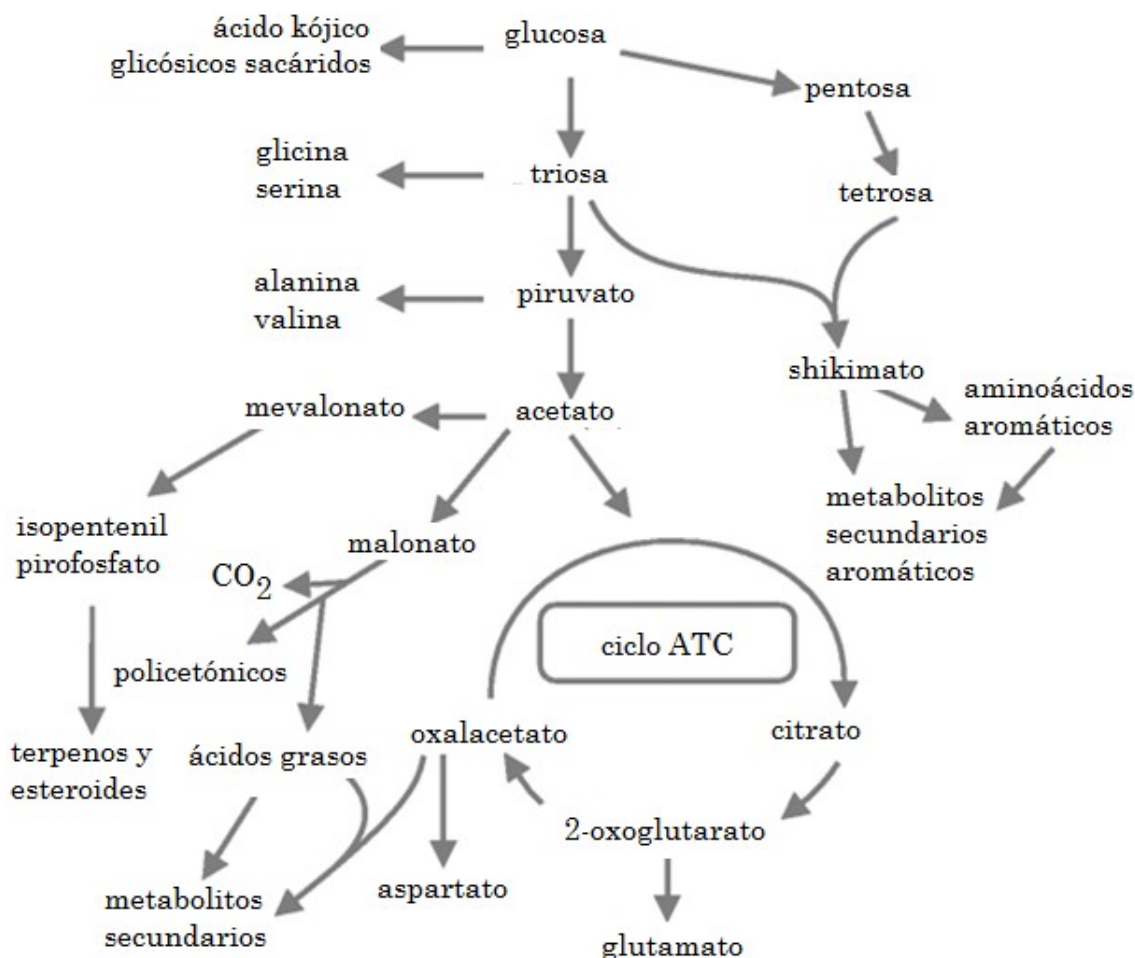


Figura 1.1. Interrelaciones entre el metabolismo primario y las principales rutas para síntesis de los metabolitos secundarios (Moore y otros 2011).

Entre los compuestos policetónicos se encuentran aflatoxina B₁ y citrinina sintetizadas por *Aspergillus*, y la zearalenona formada por *Fusarium*. La ruta del shikimato conduce a una variedad de productos, tal como aminoácidos aromáticos, ácido lisérgico y ergocristina formada por *Claviceps purpurea*. Algunos metabolitos secundarios derivan de péptidos, entre ellos están las penicilinas y cefalosporinas. La modificación de los ácidos grasos conduce una variedad de metabolitos que incluye, entre otros la brefeldina presente en algunos *Penicillium*. Los terpenos derivan de unidades isoprenoides, los cuales pueden ser de cadena abierta o cíclicos, y la síntesis ocurre por sucesivas condensaciones tal como ocurre con el ácido giberélico (Moore y otros, 2011).

Muchos de los metabolitos secundarios conocidos son producidos por especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Talaromyces*, en comparación *Fusarium* y *Trichoderma* forman pocos metabolitos. Éstos son definidos como pequeñas moléculas producidas durante la diferenciación química y morfológica y que luego son excretadas o depositadas en o sobre la pared celular (Frisvad, 2016). Tales metabolitos favorecen la prevalencia del moho frente a otros microorganismos y parte de ellos son tóxicos para animales y/o plantas (Swanson, 1987).

Tabla 1.2. Origen biosintético de algunos metabolitos secundarios (Moss, 1987; Mousa y Raizada 2013)

Precusores	Género	Productos del metabolismo secundario
Aminoácidos	<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> <i>Pithomyces</i> <i>Rhizoctonia</i> <i>Trichoderma</i>	Ácido aspergílico Gliotoxina Esporidesmina Eslaframina Gliotoxina
Mevalonato	<i>Fusarium</i>	Tricotecenos: desoxinivalenol, neosolaniol, toxina T-2, otros
Acetil y malonil coenzima-A	<i>Aspergillus</i> <i>Fusarium</i> <i>Penicillium</i>	Aflatoxinas, citrinina, esterigmatocistina, patulina Zearalenona Ácido penicílico, citreoviridina, citrinina, luteoskirina, rugulosina
Intermediarios de ácidos tricarbóxicos	<i>Byssochlamys</i> <i>Penicillium</i>	Ácido byssoclámico Ácido glaucánico, rubratoxina
Aminoácidos + mevalonato	<i>Aspergillus</i> <i>Claviceps</i>	Ácido ciclopiazónico, fumitremógeno Alcaloides del ergot
Aminoácidos + policetonas	<i>Aspergillus</i> <i>Helminthosporium</i> <i>Metarrhizium</i> <i>Penicillium</i>	Ocratoxina A Citochalcasina Citochalcasina Ocratoxina A
Policetonas + mevalonato	<i>Myrothecium</i>	Roridina, verrucarina

2. Endófitos

Diversos hongos han sido aislados de los tejidos internos sanos de plantas terrestres y acuáticas. Estos endófitos están presentes en casi todas las partes de la planta: hojas, tallo, raíz, rizoma, y suelen llamarlos patógenos asintomáticos porque bajo ciertas condiciones algunos pueden causar daño y no es claro si todos son mutualistas. Diferentes factores pueden disparar la transformación del hongo saprobio o mutualista a patógeno. Por otra parte, la comunidad microbiana del filoplano es muy distinta a la endofítica a pesar estar muy próximas (Moore y otros, 2011).

Los hongos permanecen dentro del tejido vegetal a menos que surjan como cuerpos fructíferos. Las hojas son colonizadas por una variedad de hongos a las pocas semanas de su emergencia y las colonias permanecen asintomáticas. Las especies fúngicas predominantes corresponden a los ascomicetos (anamórficos y teleomórficos) aunque también se encuentran algunos basidiomicetos y mucoromicetos (Rodríguez y otros, 1009; Arnold, 2007).

En la interacción del endófito fúngico con la planta hospedante, los hongos producen las enzimas necesarias para penetrar y colonizar los órganos aéreos de sus hospedantes, local e intracelularmente, usando solo el fluido apoplástico como medio de crecimiento (Moore y otros, 2011).

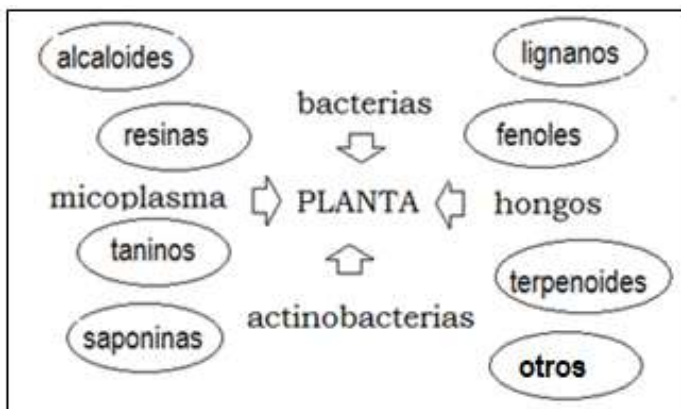


Figura 2.1. Compuestos bioactivos en la relación endófitos-planta (Gouda y otros, 2016).

Tabla 2.1. Algunos géneros de hongos aislados de hojas de árboles e hierbas (Osono 2014; Bejarano 2016; Currie y otros, 2014)

Géneros	árboles	hierbas	Géneros	árboles	hierbas
<i>Acremonium</i>	-	+	<i>Lasiodiplodia</i>	+	-
<i>Alternaria</i>	+	+	<i>Mycosphaerella</i>	+	-
<i>Ampelomyces</i>	-	+	<i>Mucor</i>	-	+
<i>Aspergillus</i>	-	+	<i>Nigrospora</i>	+	+
<i>Arthrinium</i>	+	+	<i>Nodulisporium</i>	+	-
<i>Ascochyta</i>	+	-	<i>Periconiella</i>	+	-
<i>Aureobasidium</i>	+	+	<i>Pestalotiopsis</i>	+	-
<i>Botrytis</i>	-	+	<i>Phialocephala</i>	+	-
<i>Cenangium</i>	+	-	<i>Phialophora</i>	-	+
<i>Chaetomium</i>	-	+	<i>Phoma</i>	-	+
<i>Cladosporium</i>	+	+	<i>Phomopsis</i>	+	+
<i>Coccomyces</i>	+	-	<i>Phyllosticta</i>	+	-
<i>Colletotrichum</i>	+	+	<i>Pleospora</i>	-	+
<i>Coniothyrium</i>	-	+	<i>Pseudocercospora</i>	+	-
<i>Drechslera</i>	-	+	<i>Stenella</i>	+	-
<i>Diplococcium</i>	+	-	<i>Surculiseria</i>	+	-
<i>Discostroma</i>	+	-	<i>Trichoderma</i>	-	+
<i>Discula</i>	+	-	<i>Trichothecium</i>	-	+
<i>Epicoccum</i>	-	+	<i>Tritirachium</i>	+	-
<i>Fusarium</i>	+	+	<i>Tubakia</i>	+	-
<i>Geniculosporium</i>	+	+	<i>Undifilium</i>	-	+
<i>Guignardia</i>	+	-	<i>Verticillium</i>	-	+
<i>Glomerella</i>	+	-	<i>Xylocoremium</i>	+	-
<i>Leptostroma</i>	+	-	<i>Xylaria</i>	+	-

La composición de la comunidad endofítica dentro de una planta está determinada tanto por el hongo (genotipo, competitividad, especificidad del tejido, lugar de la infección) como por el hospedante (genotipo, variaciones en la defensa de la planta, ubicación geográfica). La interrelación es dinámica pues la composición fúngica varía a lo largo de las estaciones, con infecciones subsecuentes a la inicial. La transmisión generalmente ocurre por las esporas llevadas por el aire o el agua y las hifas entran por los estomas o directamente en el tejido. En contraste con la colonización micorrícica, la infección endofítica de las partes

aéreas es limitada debido a las defensas de la planta, la competencia intra- e interespecífica entre los hongos y otros factores que gobiernan la ocupación del nicho.

Los endófitos colonizan los tejidos del hospedante al menos en parte de su ciclo sin signos patológicos aparentes, simultáneamente pueden beneficiar al hospedante mejorando su tolerancia al estrés biótico tal como sequía, aumentando la fotosíntesis y transpiración, protegiéndolo contra patógenos mediante la inducción de la resistencia sistémica de la planta y desalentando a los invertebrados fitófagos. Estos beneficios surgen directamente del metabolismo del endófito o indirectamente a través de la producción de compuestos que alteran la fisiología del hospedante (Currie y otros, 2014).

Los endófitos verdaderos son los que se transmiten verticalmente, vía las semillas, de una generación a otra. Estos hongos nunca aparecen fuera de sus hospedantes. También hay muchos endófitos que infectan las plantas mediante las esporas llevadas por el aire y a este tipo de transmisión se la llama horizontal. El número de especies endofíticas verdaderas en las plantas herbáceas es comúnmente bajo, aunque en los árboles y arbustos la diversidad foliar de especies suele ser grande (Braga y otros, 2016).

Tabla 2.2. Criterios simbióticos usados para caracterizar los grupos de endófitos fúngicos (Rodríguez y otros, 2009)

Criterios	Clavicipetáceos	No- clavicipetáceos		
	grupo 1	grupo 2	grupo 3	grupo 4
Rango de hospedantes	estrecho	amplio	amplio	amplio
Tejidos colonizados	retoños y rizomas	retoños, raíz y rizoma	retoños	raíz
Colonización <i>in planta</i>	extensiva	extensiva	limitada	extensiva
Biodiversidad <i>in planta</i>	baja	baja	alta	---
Transmisión	vertical y horizontal	vertical y horizontal	horizontal	horizontal
Beneficios	NAH	NAH y AH	NAH	NAH
NAH (no adaptado al hábitat): tolerancia a la sequedad, incremento del crecimiento				
AH (adaptado al hábitat): pH, salinidad, temperatura				

Además de la transmisión por las semillas, la colonización de la planta comienza por penetración del hongo desde las aberturas naturales como los estomas, o las lesiones causadas por las prácticas agrícolas o los insectos. El aislamiento se hace depositando sobre el medio de cultivo los fragmentos de la planta cuya superficie fue desinfectada para eliminar los organismos epífitos (Gundel y otros, 2012).

Los endófitos clavicipitáceos del grupo 1 (tabla 2.2) infectan pastos y los no-clavicipetáceos son recuperados de tejidos asintomáticos de musgos y otras plantas no vasculares, coníferas y angiospermas. La mayoría aumenta la resistencia del hospedante a los insectos y algunos lo protegen de la herbivoría (Rodríguez y otros, 2009; Estrada y otros, 2013).

Los endófitos del grupo 2 son miembros de Dikaria y la mayoría pertenece a Ascomycota como en el grupo 3, teniendo este último un mayor número de especies. Cada grupo de endófitos domina una línea particular de plantas hospedantes o bioma. Así, los Leotiomycetes son aislados con frecuencia en coníferas mientras que los Sordariomycetes se encuentran dentro de plantas tropicales leñosas. Algunas especies de Basidiomycotina y Oomycetes están comúnmente asociadas con árboles o arbustos (Currie y otros, 2014). Algunos endófitos del grupo 2 evitan el estrés del hospedante, tal el caso de *Curvularia protuberata* que al colonizar los tejidos no embrionarios de la planta *Dichanthelium lanuginosum* le permite tolerar temperaturas cercanas a los 65°C. *Leymus mollis* es un pasto de las dunas que al estar colonizado por *Fusarium culmorum* tolera la salinidad del agua de mar (300-500mM NaCl).

El grupo 3 incluye una diversidad de hongos asociados a las hojas de los árboles, hierbas, helechos y musgos, mientras que el grupo 4 abarca a especies de ascomicetos que forman estructuras melanizadas en las raíces, tales como hifas inter e intracelulares y microesclerocios, coexistiendo con las micorrizas (Rodríguez y otros, 2009).

Los hongos producen una gran variedad de metabolitos que no juegan un rol esencial en el crecimiento, desarrollo y reproducción del mismo, sin embargo, tales compuestos son bioactivos y suelen tener una importante función en las interacciones ecológicas. Los endófitos no micorrícicos asociados a las raíces pueden producir fitohormonas como ácido indol-acético y giberelinas promoviendo el crecimiento de la planta (Braga y otros, 2016). Algunos endófitos protegen a las plantas de los animales herbívoros, como es el caso de *Epichloe typhina* que produce una toxina en la *Festuca arundinacea* hospedante (Vega y otros, 2008). El control de las enfermedades por medio de endófitos antagónicos es una alternativa para ayudar a reducir o eliminar el uso de productos químicos en la agricultura. Además, los mismos endófitos son afectados por las modificaciones antropogénicas (Azevedo y otros, 2000).

Muchos metabolitos están implicados en las relaciones mutualistas y endosimbióticas del hábitat natural, y a modo de ejemplo se indican algunos casos en las tablas 2.3 y 2.4.

Tabla 2.3. Ejemplos de interacciones (Braga y otros, 2016)

Organismos	Interacción	Compuestos
<i>Moniliophthora roreri</i> - <i>Trichoderma harzianum</i>	fitopatógeno endófito	--- butenólido T39, harzianolido sorbicillinol
<i>Trichoderma atroviride</i> - <i>Arabidopsis</i> sp.	endófito planta	ácido indol-acético y relacionados ---
<i>Stachybotrys elegans</i> – <i>Rhizoctonia solani</i>	micoparásito hospedante	trichotecenos, atranonas ---

Tabla 2.4. Actividad de metabolitos de algunos hongos endófitos (Mousa y Raizada, 2013; Harris y otros, 1988)

Endófito	Metabolito	Inhibe/ afecta a
diterpenos		
<i>Periconia</i>	periconicinas A y B	<i>Bacillus subtilis</i>
triterpenos		
<i>Pichia guilliermondii</i>	ácido helvólico	<i>Magnapotha oryzae</i>
sesquiterpenos		
<i>Trichoderma harzianum</i>	trichodermina*	<i>Alternaria solani</i> <i>Rhizoctonia solani</i> .
<i>Xylaria</i>	phomenona*	<i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i> <i>C. sphaerospermum</i>
<i>Phomopsis</i> sp.	cycloepoxylactona	<i>Microbotryum violaceum</i> <i>Bacillus megaterium</i>
<i>Phomopsis cassiae</i>	3,12-dihidroxicalaleno	<i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i> <i>C. sphaerospermum</i>
<i>Microdiplodia</i>	phomadecalina E	<i>Pseudomonas</i>
<i>Phoma</i>	phomadecalina C	<i>Bacillus subtilis</i>

<i>Phyllosticta</i> sp.	ácido heptelídico	<i>Choristoneura fumiferana</i> **
<i>Epichlôe typhina</i>	chokols	<i>Cladosporium phlei</i>
derivados isocumarínicos		
<i>Pezicula livida</i>	R-mellein	<i>Ustilago violacea</i>
alcaloides		
<i>Acremonium lolii</i>	peramina	gorgojo del tallo
<i>Epichloe, Neotyphodium</i>	ergovalina y otros	ganado
<i>Cryptosporiopsis quercina</i>	cryptocin	<i>Pyricularia oryzae</i>
<i>Pestalotiopsis adusta</i>	pestalachloride A	<i>Fusarium culmorum</i> <i>Gibberella zeae</i> <i>Verticillium albo-atrum</i>
<i>Neotyphodium uncinatum</i>	loline	insectos áfidos
<i>Rhizoctonia leguminicola</i> <i>Metarhizium anisopliae</i>	swainsonina	<i>Spodoptera</i> sp.** ganado
esteroides		
<i>Colletotrichum</i>	3 β ,5 α -dihidroxi-6 β -acetoxi-ergostan-7,22-dieno y otros	<i>Phytophthora capsici</i> <i>Gaeumannomyces graminis</i> <i>Rhizoctonia cereales</i> <i>Helminthosporium sativum</i>
compuestos fenólicos		
<i>Colletotrichum gloesporoides</i>	ácido colletotrico	<i>Helminthosporium sativum</i>
policetónicos		
<i>Penicillium rugulosum</i> <i>Hormonema dematoides</i> <i>Aschersonia samoensis</i>	rugulosin	<i>Drosophila melanogaster</i> <i>Spodoptera frugiperda</i> **
<i>Nodulisporium</i> sp.	nodulisporinas	<i>Microbotryum violaceum</i>
<i>Acremonium zeae</i>	pyrrocidines A y B	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Curvularia lunata</i> <i>Fusarium verticilloides</i> <i>Fusarium graminearum</i> <i>Nigrospora oryzae</i> <i>Rhizoctonia zeae</i>

		<i>Stenocarpella maydis</i> <i>Bacillus mojavensis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Poecilomorpha adusta</i>	pestalachloride B	<i>Fusarium culmorum</i> <i>Gibberella zeae</i> <i>Verticillium albo-atrum</i>
péptidos		
<i>Acremonium</i>	leucinostatin A	<i>Pythium ultimum</i>
<i>Cryptosporiopsis cf. quercina</i>	cryptocandin A	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
*también tienen un efecto fitotóxico frente a algunas especies vegetales **larvas		

3. Entomopatógenos

La expresión de los fenotipos metabólicos en los hongos es un estricto proceso gobernado por las fuerzas de la selección natural, asegurando la supervivencia bajo condiciones ecológicas alteradas. Los metabolitos secundarios permiten a los hongos sobrevivir y competir en un ambiente ecológico cambiante, debido a la presencia de organismos competidores, nutrientes limitados o protección contra insectos fungívoros (Singh y otros, 2016).

Los hongos simbóticos endofíticos incluyen a todos aquellos que habitan las partes internas de los tejidos vegetales sin dañar a los hospedantes. Se los suele dividir en dos grupos: aquéllos que no generan estructuras externas y los que forman micorrizas. Los primeros tienen un rol importante en la protección frente a predadores y patógenos. El control de insectos por el uso de entomopatógenos es una alternativa para ayudar a reducir o eliminar el uso de productos químicos en la agricultura, pues éstos además de controlar plagas y microorganismos fitopatógenos, eliminan especies de insectos que a su vez afectan a otras plagas y microorganismos inhibidores del crecimiento y la multiplicación de otros que son dañinos (Strobel y Daisy, 2003).

Los hongos entomopatógenos constituyen el grupo de enemigos naturales de muchas variedades de insectos y arácnidos. Comprenden unas 750 especies correspondientes a 90 géneros, distribuidos en el suelo, sobre y dentro de las plantas, y los mismos insectos. Las especies fúngicas actúan sobre la planta hospedante a través de sus interacciones (antagonismo, parasitismo o mutualismo) efectuando la producción de metabolitos

funcionales, así las especies de *Beauveria*, *Lecanicillium* y *Trichoderma* inducen una resistencia sistémica adquirida en su hospedante (Singh y otros, 2016).

Entre los factores abióticos que afectan la viabilidad y la persistencia de los hongos entomopatógenos en el campo están los rayos ultravioletas, la temperatura, la humedad relativa y los fungicidas. La relación con los hospedantes depende de los nutrientes presentes en los insectos, que son el medio para la propagación, dispersión y persistencia de los hongos. A diferencia de otros agentes, la infección puede ocurrir por el contacto y la adhesión de las esporas a las partes bucales, membranas intersegmentales o a través de los espiráculos (Pucheta-Díaz y otros, 2006). El desarrollo de la infección comienza por la adhesión del conidio, continúa con la penetración del apresorio en la cutícula del insecto y el desarrollo del micelio con la intervención de enzimas (proteasas, quitinasas, lipasas, lipooxigenasas) (Sánchez-Pérez y otros, 2014). Una vez que entra en el insecto, crece un propágulo que daña mecánicamente el hemocele y luego libera una batería de metabolitos entomotóxicos, principalmente péptidos no ribosómicos, alcaloides, terpenos y policetónicos.

La mayoría de los hongos asociados con insectos pertenecen al orden *Entomophthorales* (filum *Zoopagomycota*) y al orden *Hypocreales* (filum *Ascomycota*), en cuyo ciclo de vida existe una fase sexual (teleomorfo) o una asexual (anamorfo) o ambas simultáneamente (holomorfo) (Singh y otros, 2016). Los más significativos son *Beauveria*, *Lecanicillium* e *Isaria*, anamorfos del género *Cordyceps*. Otros son *Hirsutella* y *Metarhizium*, anamorfos de *Metacordyceps* y *Ophiocordyceps* respectivamente (Sung y otros, 2007).

Los primeros ácidos nudilospóricos, que exhiben potentes propiedades insecticidas frente a las larvas de *Sarcophaga carnaria*, fueron aislados de *Nodulisporium* sp., endófito de la planta *Bontia daphnoides*. Dos compuestos, 5-hidroxi-2-(1'-hidroxi-5'-metil4'-hexenil) benzofurano y 5-hidroxi-2-(1'-oxo-5'-metil4'-hexenil) benzofurano, que muestran toxicidad frente *Choristoneura occidentalis* fueron obtenidos de un endófito de *Gaultheria procumbens*. Otro endófito, *Muscodor vitigens*, aislado de la liana *Paullina paullinoides* produce naftaleno, un repelente de *Cephus cinctus* y otros insectos (Strobel y Daisy, 2003). Los metabolitos de *Beauveria bassiana* controlan al barrenador *Ostrinia nubilalis* (6) y la efraeptina de *Beauveria nivea* muestra actividad tóxica sobre *Leptinotarsa decemlineata* (Borges y otros, 2010).

Tabla 3.1. Principales grupos fúngicos con miembros entomopatógenos, metabolitos y hospedantes (Singh y otros, 2016; Moore y otros, 2011).

Filum/subfilum	Géneros	Metabolitos	Hospedantes
Ascomycota *teleomorfo, ** anamorfo	<i>Cordyceps</i> *	cordycepinas	larvas de lepidópteros
	<i>Hypocrella</i> * <i>Aschersonia</i> **	ergosterol, dustanin, hipocrelinea, 3- hopane- triterpenos	moscas blancas, cocídeos, nemátodos
	<i>Beauveria</i> **	beauvericina, bassianina, oosporeína, bassianólido	lepidópteros, coleópteros, hemípteros, homópteros, himenópteros
	<i>Metarhizium</i> **	swainsonina, dextruxinas	coleópteros, hemípteros, isópteros, homópteros, heterópteros, lepidópteros, dípteros (mosquitos), himenópteros, sifonápteros
	<i>Isaria</i> ** (ex <i>Paecilomyces</i>)	beauvericina, beauverólidos, ácido dipicolínico	hemípteros
	<i>Verticillium</i> **	ácido hidroxicarboxílico, ciclosporina, ácido dipicolínico, bassianólido	hemípteros, tysanópteros (trips)
	<i>Tolypocladium</i> **	efrapeptinas, tolypin, dicetopiperazinas	dípteros (mosquitos), phemerópteros (efímeras)
	<i>Hirsutella</i> **	hirsutelina A y B	ácaros (<i>Phyllocpruta oleivora</i>), lepidópteros (<i>Galleria melonella</i>)
	<i>Nomuraea rileyi</i> **	ergosterol peróxido	lepidópteros, coleópteros, hemípteros
<i>Torrubiella</i> *	Torrubielin B	hemípteros (cocoideos)	

Pucciniomycotina	<i>Septobasidium</i>	...	hemíperos (cocoideos)
Entomophthoromycotina	<i>Entomophaga</i>	...	ortópteros (saltamontes), coleópteros
	<i>Erynia</i>	...	hemípteros (áfidos)
	<i>Entomophthora</i>	...	thysanópteros (thrips), dípteros (moscas)
	<i>Zoophthora</i>	...	coleópteros, dípteros, hemípteros, himenópteros, lepidópteros, ortópteros, tricópteros
Blastocladiomycota	<i>Coelomyxidium</i>	...	dípteros (moscas negras)
	<i>Myiophagus</i>	...	dípteros
Oomycota	<i>Lagenidium</i>	...	dípteros (larvas de mosquitos)
	<i>Leptolegnia</i>	...	
	<i>Pythium</i>	...	

4. Fitopatógenos

Los hongos fitopatógenos que son clasificados en necrótrofos, hemibiótrofos u biótrofos, causan alteraciones durante todo el desarrollo de las plantas incluyendo el estado post-cosecha y difieren en las estrategias usadas para adquirir nutrientes.

Los necrótrofos tiene un amplio rango de hospedantes y producen enzimas que degradan las paredes celulares y toxinas selectivas que pueden ser péptidos o metabolitos secundarios. En contraste, los biótrofos obligados dependen enteramente del tejido de la planta viva y está caracterizado por estructuras de infección tales como apresorios, hifas de penetración e infección y haustorios que les permiten suprimir las respuestas defensivas de la planta y acceder a los nutrientes. La síntesis de sideróforos es importante para la virulencia de algunos mohos (v.g. *Cochliobolus heterostrophus*, *Fusarium graminearum*, *Alternaria brassicicola*) (Pusztahelyi y otros, 2015).

En muchos casos la invasión comienza tan pronto como las hojas son expuestas al aire y los hongos continúan desarrollándose a lo largo de todo el crecimiento de la planta, especialmente en la senescencia y la maduración de las semillas (Lacey, 1989).

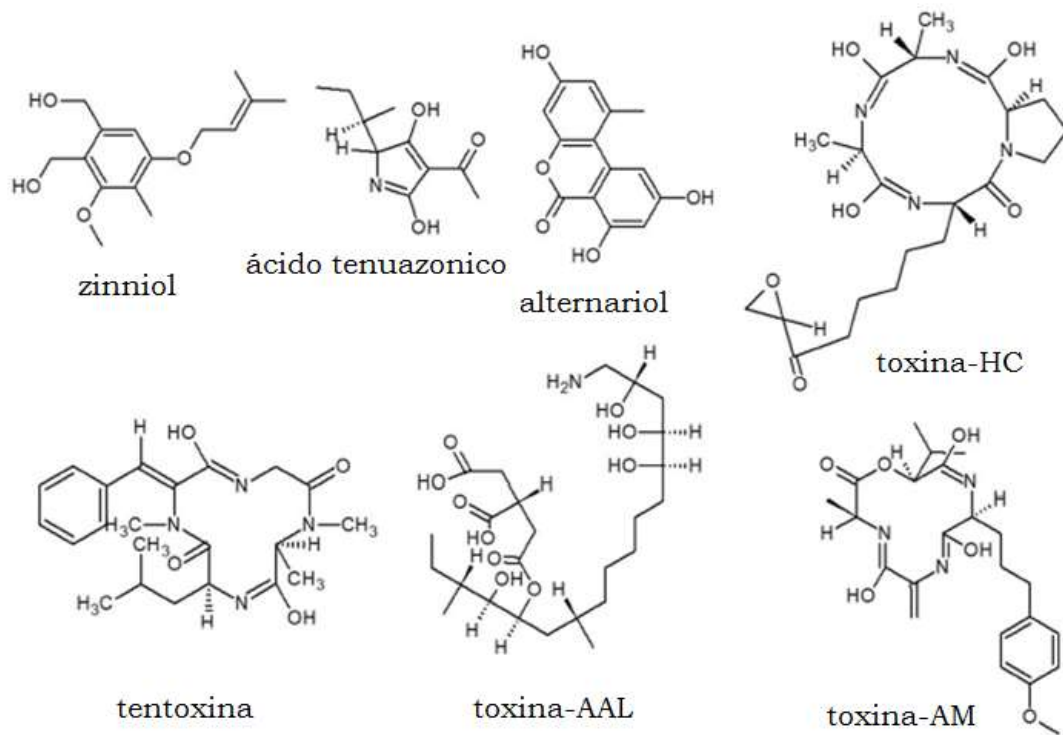


Figura 4.1. Metabolitos secundarios de *Alternaria* spp. (Pusztahelyi y otros, 2015)

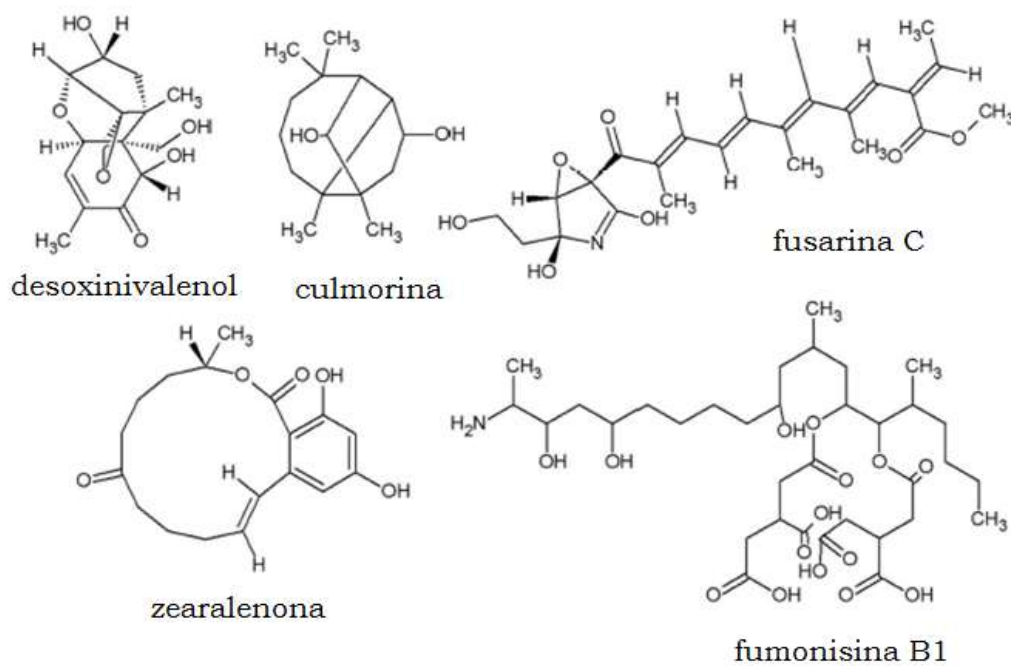


Figura 4.2. Metabolitos secundarios de *Fusarium* spp. (Pusztahelyi y otros, 2015)

Las fuentes de estrés abiótico como la sequedad y el calor afectan las interacciones. Algunos metabolitos secundarios fúngicos, tales como pigmentos, polioles y micosporinas, están asociados con la patogenicidad y/o tolerancia del hongo factores de estrés, incluyendo la temperatura y la luz UV. También la limitación de nitrógeno parece ser un estímulo esencial para la activación de la virulencia induciendo en *Fusarium graminearum*

la síntesis de desoxinivalenol, en *Cochliobolus heterostrophus* la de T-toxina y en *Alternaria alternata* la del péptido cíclico AM-toxina.

Las fitotoxinas fúngicas se suelen dividir en huésped-selectivas (HST) y no selectivas (NHST). Las HST son activas solamente hacia la planta hospedante, con un único modo de acción y toxicidad para la misma y es esencial para la virulencia del hongo. Casi todas las HST conocidas son producidas por patógenos netrótrfos del orden *Pleosporales*, dentro de la clase *Dothideomycetes* y especialmente las especies de *Alternaria* y *Cochliobolus*. Estas HST toxinas son tanto compuestos de bajo peso molecular como péptidos cíclicos. Por el contrario, las toxinas NHT no son esenciales para la patogenicidad, aunque pueden contribuir a la virulencia. Otros compuestos fitotóxicos son la cornexistina de *Paecilomyces variotii*, el tetrapéptido cíclico tentoxina y la AA-toxina de *A. alternata*, la fumonisina B1 de *Fusarium* spp., la fusicoccina de *Fusicoccum amygdali*, el alternariol y el monometil alternariol de *Nimbya* y *Alternaria*, la cerulenina de *Cephalosporium cerulens*, y el zinniol de *Alternaria* sp. y *Phoma* sp. (Pusztahelyi y otros, 2015).

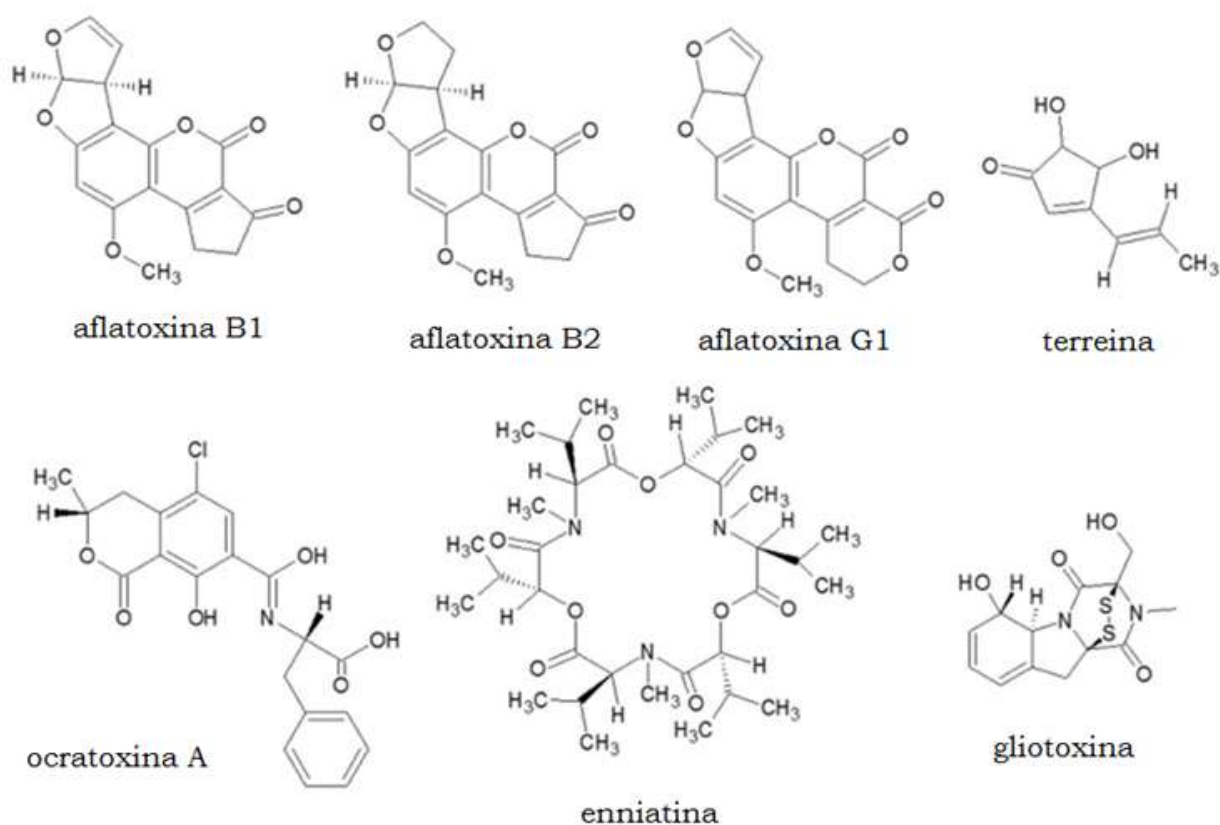


Figura 4.3. Metabolitos secundarios de *Aspergillus* (Pusztahelyi y otros, 2015)

Se suele denominar exometabolitos a los metabolitos secundarios pues estas moléculas son excretada o depositadas en o sobre la pared celular y acumuladas, en contraste con los metabolitos primarios. La naturaleza química de las toxinas de los hongos patógenos

está relacionada con el grupo taxonómico de los mismos y pueden ser producidas solamente en ciertos estados de ciclo de vida del hospedante o del ciclo de la enfermedad fúngica (Frisvad, 2015).

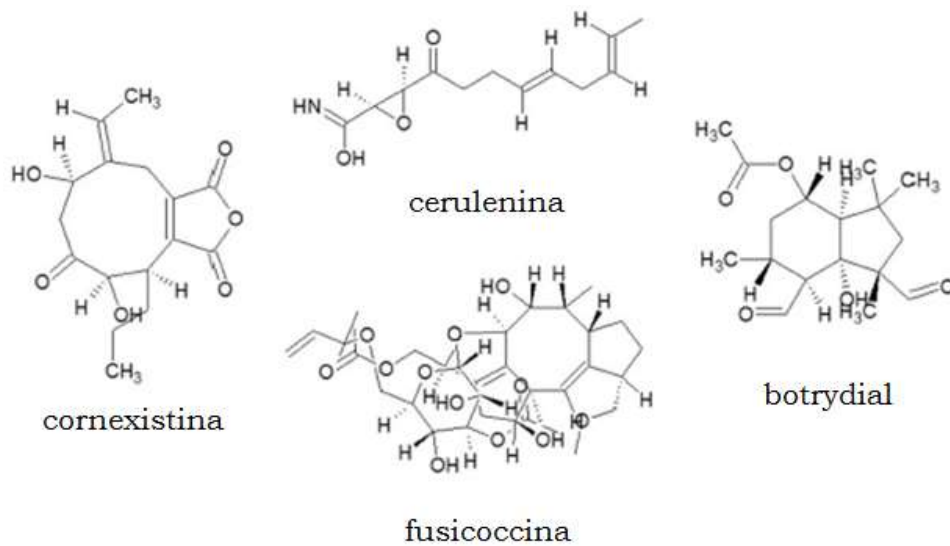


Figura 4.4. Metabolitos de *Paecilomyces variotii* (cornexistina), *Fusicoccum amygdali* (fusicoccina), *Cephalosporium caerulens* (ceruleina), *Botrytis cinerea* (botrydial) (Pusztahelyi y otros, 2015)

Productos agrícolas

El deterioro de estos productos es debido a un amplio rango de hongos que difieren mucho en sus determinantes ecológicas. Va desde patógenos vegetales, endófitos y saprobios superficiales que dañan los productos antes de la cosecha, hasta los mohos que causan pérdidas post-cosecha. Algunos producen metabolitos tóxicos para los animales y humanos.

La cosecha perturba el ecosistema y marca la transición desde la variabilidad del ambiente de campo a las condiciones relativamente estables del almacenamiento. El crecimiento de los mohos antes y después de la cosecha está determinado por el ambiente (especialmente la disponibilidad de agua, la temperatura y la composición gaseosa) y las interacciones con otros microorganismos (pro- y eucariotas) y artrópodos, además de las medidas tomadas para su control (Lacey, 1989).

El almacenamiento es un estado anormal de las plantas, donde se amontonan grandes masas de vegetales en espacios limitados, pues los frutos, las hortalizas y los granos almacenados están vivos. Las especies fúngicas del campo requieren un alto contenido de humedad e invaden las plantas antes de la recolección de los granos y en el acopio

predominan las que son capaces de crecer con bajo contenido de humedad y alta presión osmótica (figura 4.5).

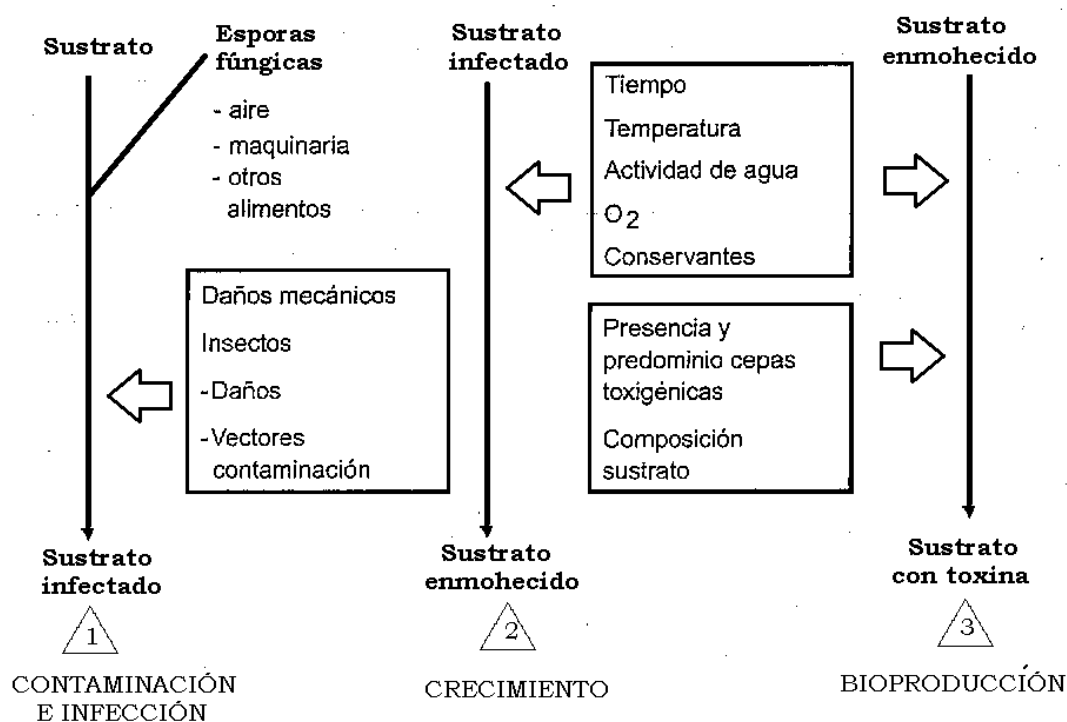


Figura 4.5. Fases en la producción de metabolitos (Sanchis y otros, 2007)

Los factores que influyen sobre la selección de los hongos son intrínsecos (composición del sustrato, a_w , pH), extrínsecos (temperatura, humedad, O_2 , luz), tecnológicos (tratamiento térmico y químico), e implícitos (interrelaciones microbianas) (Sanchis y otros, 2007).

Los hongos rara vez están puros sino que, con frecuencia, hay un grupo de mohos, bacterias e insectos interactuando en los micronichos. Las variaciones de temperatura, a_w y composición gaseosa pueden originar cambios en las especies predominantes (Lacey, 1989).

Metabolitos tóxicos

Aunque hay aproximadamente unos 400 exometabolitos considerados tóxicos, desde el punto de vista de la salud humana o animal, los más importantes son aflatoxinas, ocratoxina A, fumonisinas, zearalenona, desoxinivalenol y otros tricotecenos (5). Estas sustancias pueden ser consecuencia de un almacenamiento inadecuado, pero suelen estar presentes antes del acopio.

Alternaria, *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium* actúan como patógenos pre o post-cosecha de los granos y elaboran metabolitos tóxicos. Aunque *Aspergillus* y *Penicillium* son considerados con frecuencia como hongos del almacenamiento e incapaces de formar

toxinas antes de la cosecha, los *Aspergillus* sección *Flavi* pueden colonizar las plantas de maní durante el ciclo de crecimiento y cuando la planta experimenta estrés por sequía, próximo al tiempo de cosecha, comienzan a formar aflatoxinas en los granos. Lo mismo ocurre con maíz y algodón. *A. flavus* y especies relacionadas crecen bien con a_w reducida (0,80) y las aflatoxinas se producen aproximadamente con $a_w = 0,85$ (Hocking, 2003).

Las especies de *Aspergillus* toxigénicas presentes en Argentina son *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. arachidicola*, *A. minisclerotigenes*, *A. pseudocaelatus*, *A. pseudotamarii* y *A. nomius* (Varga y otros, 2011). La aflatoxina B₁ es hepatotóxica y cuando la exposición a la misma está combinada con hepatitis B ó C el riesgo de un cáncer hepatocelular primario es muy alto (Peraica, 2016).

Penicillium verrucosum crece en climas fríos, contamina granos tales como trigo y cebada durante o inmediatamente después de la cosecha a través de la cosechadora, los secaderos y silos, es relativamente xerófilo pues crece con $a_w = 0,80$ y produce ocratoxina A por sobre $a_w = 0,86$. *Aspergillus ochraceus*, contaminante del maíz, produce la misma toxina que provoca una enfermedad renal en cerdos y humanos (Hocking, 2003).

Las ocratoxinas también son generadas por *Penicillium nordicum* y otras especies de *Aspergillus* (*A. alliaceus*, *A. auricomus*, *A. carbonarius*, *A. glaucus*, *A. melleus*, *A. niger*) (Peraica, 2016).

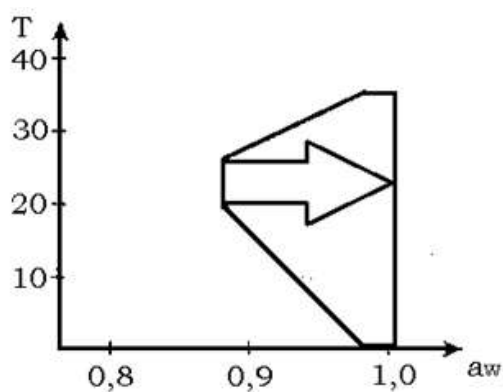
Los granos no son los únicos productos afectados por la contaminación fúngica antes de la cosecha. Las esporas de *A. flavus* llegan a los higos en maduración a través de los insectos. Cuando las frutas son secadas al sol, la temperatura cálida y una a_w relativamente reducida favorece el crecimiento del hongo y la subsecuente formación de aflatoxinas. Los higos también pueden contener ocratoxina A si son colonizados en la fase tardía de maduración por *A. niger*, *A. carbonarius* o *A. ochraceus*.

Las uvas pueden ser contaminadas justo antes de la cosecha por especies de *Aspergillus* negros productores de ocratoxina A (*A. carbonarius* y otros), especialmente si son dañadas por la lluvia.

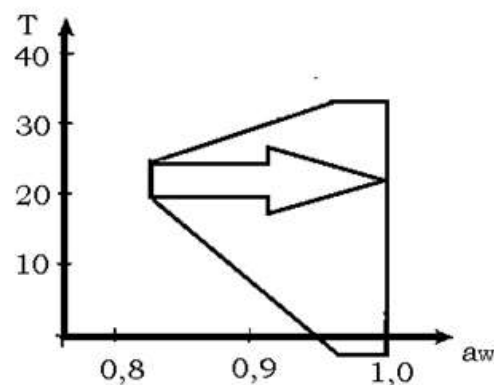
Los mohos xerófilos no suelen ser detectados en los granos recién cosechados pues están en muy pequeño número, y la contaminación ocurre durante el transporte y el almacenamiento. Cuando crecen modifican su microambiente elevando la temperatura y humedad. *Aspergillus penicilloides* suele ser el pionero junto a *Eurotium* y *Wallemia*, seguidos por *A. candidus*. Una vez que la humedad aumentó ($a_w = 0,80-0,82$) pueden desarrollar *A. flavus*, *A. ochraceus*, y *A. versicolor* (productores de aflatoxinas, ocratoxinas y esterigmatocistina respectivamente), así como algunas especies de *Penicillium*, pero son incapaces de generar toxinas por debajo de $a_w = 0,85$ (Hocking, 2003).

Alternaria y *Fusarium* no compiten mucho a baja a_w y no forman toxinas cuando el grano está seco o durante el acopio. *F. culmorum* predomina con $a_w > 0,95$.

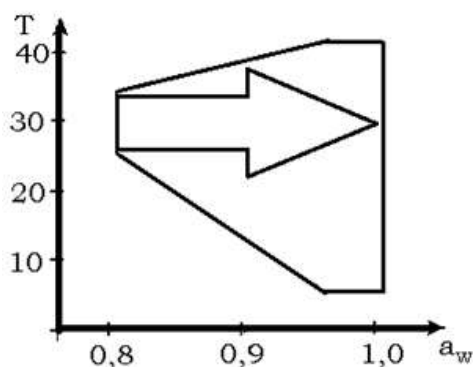
F. graminearum y *F. culmorum* causan enfermedades en diversos cereales, el primero predomina en climas templados y el otro en regiones más frías, y la toxina más importante formada por estas especies es el tricoteceno desoxinivalenol. Una humedad alta favorece la producción de la toxina estrogénica zearalenona (Popovski y Celar, 2013).



Fusarium y Alternaria



Penicillium productores de ocratoxina A y patulina



Aspergillus productores de aflatoxinas y ocratoxina A

Figura 4.2. Niveles combinados de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y a_w que permiten el desarrollo de mohos toxigénicos.

La flecha indica la zona de crecimiento óptimo.

(Sanchis y otros, 2007)

Otros hongos productores de tricotecenos son *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Myrothecium* y *Stachybotrys*. Estos dos últimos, al igual que *F. acuminatum*, producen el tricoteceno T-2 que causa lesiones necróticas y hemorragias (Peraica, 2016).

F. verticilloides y *F. proliferatum* forman fumonisinas responsables de la enfermedad del maíz amohosado o leucoencefalomalacia en los caballos (6). Las fumonisinas, análogos de la esfinganina, constituyen un grupo de 15 metabolitos cuyo miembro más frecuente es la B₁ que interfiere en el metabolismo de los esfingolípidos y está clasificada como posible agente cáncérigeno (Popovski y Celar, 2013). También *Alternaria alternata* produce toxinas análogas de la esfinganina llamadas AAL-toxinas (Mansfield y otros, 2007).

Prevención

Las opciones posibles en el campo son varias: la utilización de fungicidas, el cultivo de variedades resistentes, la modificación genética de las plantas o la aplicación de estrategias biocompetitivas. Aunque hay evidencia limitada y contradictoria sobre el efecto de los fungicidas, se emplean con éxito cepas atoxigénicas de *Aspergillus* sección *Flavi* competidoras de las toxigénicas y semillas genéticamente modificadas para el control de insectos vectores.

Después de la cosecha se puede actuar directamente mediante tratamientos que limiten el crecimiento: variación de la a_w y temperatura, modificación de la atmósfera, aplicación de antimicrobianos (Sanchis y otros, 2007).

Tabla 4.1. Aplicación del sistema de análisis de peligros y control de puntos críticos en productos agrícolas (Park y otros, 2008)

Punto de control crítico	Acción correctiva
Pre-cosecha	Utilizar variedades resistentes Aplicar un programa de control de insectos efectivo Mantener una irrigación adecuada Hacer una buena labranza, rotación de cultivos, práctica de control de malezas, etc.
Cosecha	Cosecha en el momento apropiado Si es posible, mantener a baja temperatura Remover los materiales extraños Secar rápidamente por debajo de 10% de humedad
Post-cosecha y almacenamiento	Proteger los productos almacenados de la humedad, los insectos, otros factores ambientales, etc. Almacenar sobre superficies limpias y secas
Procesamiento y manufactura	Analizar todos los ingredientes añadidos Controlar las operaciones de procesamiento/manufactura para mantener una alta calidad del producto Seguir las buenas prácticas de manufactura

Detoxificación

Las prácticas para descontaminar o inactivar los alimentos y forrajes contaminados con toxinas fúngicas comprenden separación física, inactivación térmica, irradiación, el uso de compuestos adsorbentes inorgánicos y la degradación biológica.

La limpieza por flotación permite reducir el contenido de aflatoxinas en un lote de maníes de 300 a 20 µg/kg. También se logra reducir un 25% el contenido de desoxinivalenol en harina de trigo por limpieza y pulido de los granos y la cantidad de patulina en manzanas disminuye 93-99% separando las porciones alteradas.

La distribución de toxinas en gluten, germen, fibras y almidón es variable, alcanzando un valor mínimo en el almidón producido por molienda húmeda. Por contrario, el salvado resultante de la molienda seca es la más contaminada.

El tratamiento de forrajes con amoníaco reduce el contenido de aflatoxinas en casi 99%. Los materiales adsorbentes, como el carbón activado, las zeolitas y las arcillas, disminuyen el contenido de aflatoxinas pero no de zearalenona.

Por otra parte, el control biológico es un medio para prevenir la producción de toxinas (Doko y Park, 2008).

5. Análisis

Muestreo

La muestra es una pequeña porción obtenida de una gran cantidad de material y su distribución puede ser uniforme, selectiva o azarosa. Cuando el lote no es uniforme el muestreo al azar es la técnica apropiada. Se recolectan pequeñas porciones en diferentes áreas o secciones de manera que todos los componentes individuales tengan la misma probabilidad de formar parte de la muestra (Njapau, 2008).

La concentración de un metabolito en un lote es estimada por la medición en una pequeña porción del mismo, para luego decidir la calidad de dicho lote. Por tal motivo, hay planes de muestreo para minimizar la clasificación errónea del lote a la hora de decidir si es aceptable o no.

El procedimiento utilizado para la toma de la muestra es extremadamente importante. Si el lote ha sido cuidadosamente mezclado, las partículas contaminadas están probablemente distribuidas de manera uniforme. En este caso poco importa de cual lugar se toma la muestra. Sin embargo, si la muestra tiene grumos, causados por la humedad u otra razón, dichas partículas estarán repartidas irregularmente (Zeng y otros, 2006). En las tablas 5.1 y 5.2 se dan ejemplos del tamaño de las muestras.

Tabla 5.1. Protocolo para la recolección de mazorcas (Njapau, 2008).

Producto	Muestreo
Campo, 2 a 5 ha	Dividir el campo en secciones de ½ ha. Recoger 3 mazorcas en cada una. Desgranar y reducir a una muestra de 5 kg
Campo, mayor a 5 ha	Recolectar 2 mazorcas cada ½ ha.
Depósito en hogar	Estimar la cantidad total, tomar las mazorcas de zonas accesibles, desgranar y mezclar. Obtener 1 kg/100 kg de granos.
Camión o vagón	Tomar 10 muestras y mezclar (mínimo total 5 kg).
Supermercado	Tomar 10 envases de 0,5 kg.
Alimento preparado	Un plato es toda la muestra

En general, la FAO recomienda tomar 200 g de muestra cada 200 kg del producto a analizar. Cuando el lote es muy grande, la muestra también lo es, y en este caso debe ser mezclada y molida antes de obtener la sub-muestra representativa para el análisis. Cuando un gran lote está contenido en bolsas o cajas, se deben tomar varias de éstas dispersas en el mismo. Por otra parte, para tomar la muestra de un lote que se desplaza, tal como una corriente de granos, se debe hacer a intervalos periódicos (Njapau, 2008).

Tabla 5.2. Tamaño de la muestra según el producto (Whitaker, 2008)

Producto	Envase	Nº unidades de muestra	Tamaño de la unidad (kg)	Muestra total (kg)
maníes	consumidor y a granel	50	0,5	25
nueces	consumidor	10	0,5	5
	a granel	50	0,5	25
maíz	consumidor y a granel	10	0,5	5
leche	consumidor y a granel	10	1	10
frutas secas	consumidor y a granel	50	0,5	25

Suponiendo que el muestreador (figura 5.1) tiene una abertura de 6 cm, se mueve a una velocidad de 30 cm/seg y se quiere obtener 10 kg de un lote a granel de 30.000 kg, el tiempo entre cada toma está dado por la ecuación siguiente:

$$T = (6 \text{ cm} \times 30.000 \text{ kg}) / (10 \text{ kg} \times 30 \text{ cm/seg}) = 10 \text{ minutos}$$

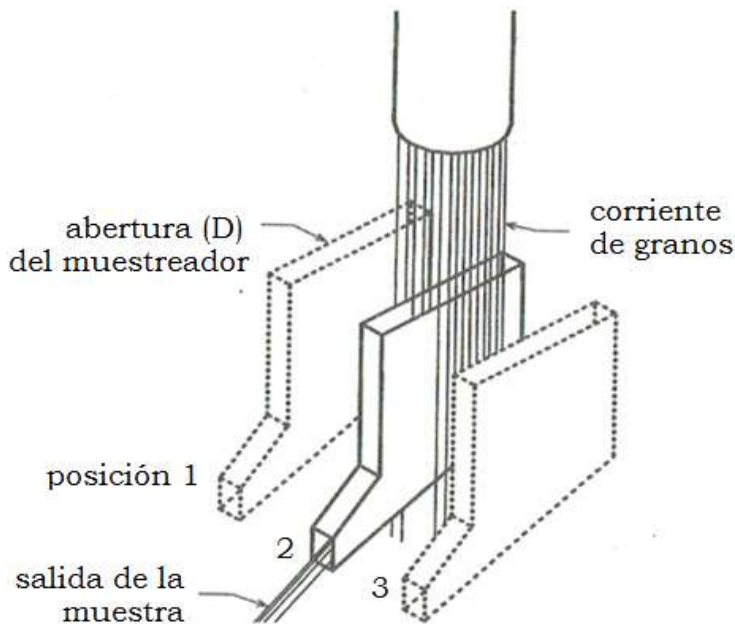


Figura 5.1. Muestreador automático (Whitaker, 2008)

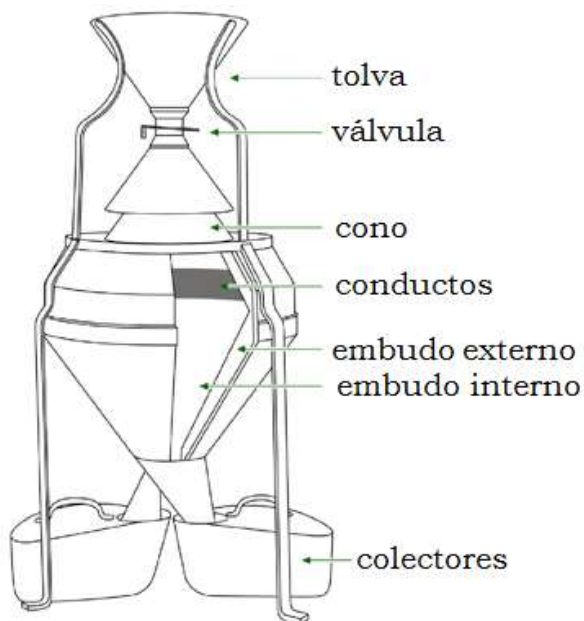


Figura 5.2. Cuarteador del material para análisis.

Cuando la muestra total es homogénea y mucho mayor que la de análisis se suele usar un separador como el de la figura 5.2 u otro, y se hace un cuarteado o sea, una de las dos muestras recogidas se vierte nuevamente en la tolva y otra vez es dividida, luego se repite el proceso hasta obtener dos alícuotas de unos 200 g, una de las cuales es molida y utilizada para el análisis. En el caso de material no homogéneo, tal como nueces, la muestra total se somete a molienda y luego se obtiene la alícuota analítica (Whitaker, 2008).

Curvas de operación

Dos tipos de errores están asociados con cualquier programa de muestreo (figura 5.3): lotes buenos pueden ser rechazados (riesgo del vendedor) y lotes malos pueden ser aceptados (riesgo del comprador). Sin embargo, hay métodos para predecir tales riesgos, el número de lotes aceptados y rechazados, y la cantidad de metabolito en ambos lotes, lo que permite elaborar un plan aceptable de investigación de un metabolito en un producto determinado.

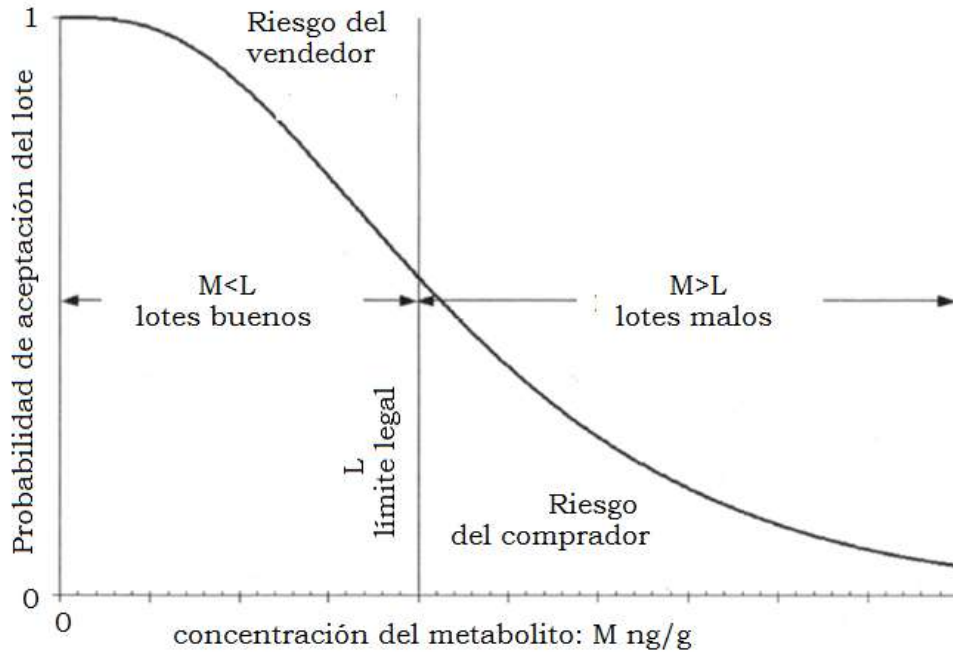


Figura 5.3. Forma típica de una curva característica de operación (Whitaker, 2008)

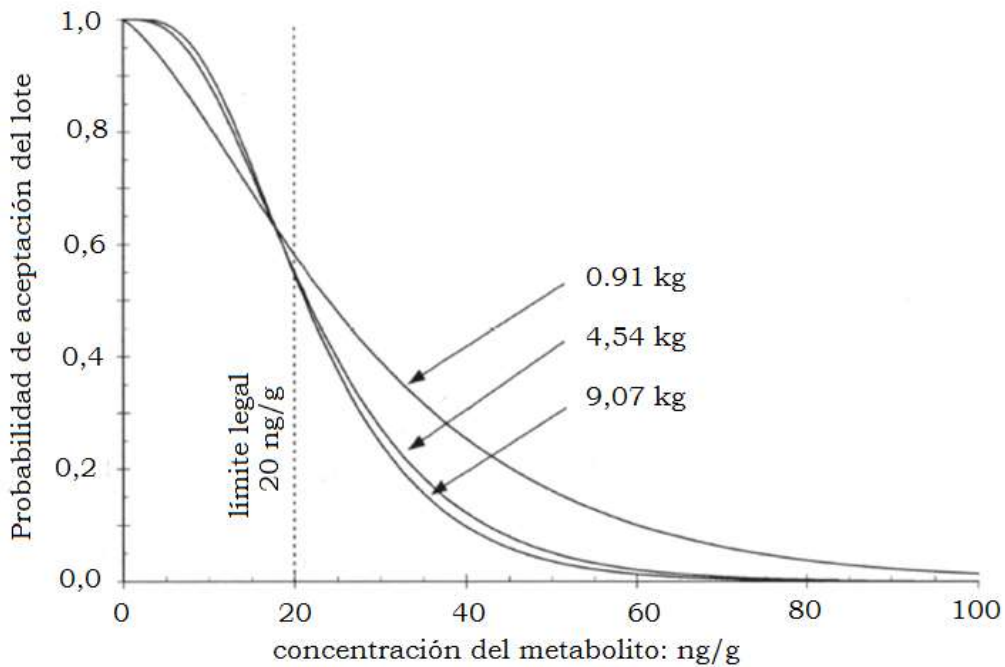


Figura 5.4. Ejemplo del efecto del tamaño de muestra sobre los riesgos asociados (Whitaker, 2008)

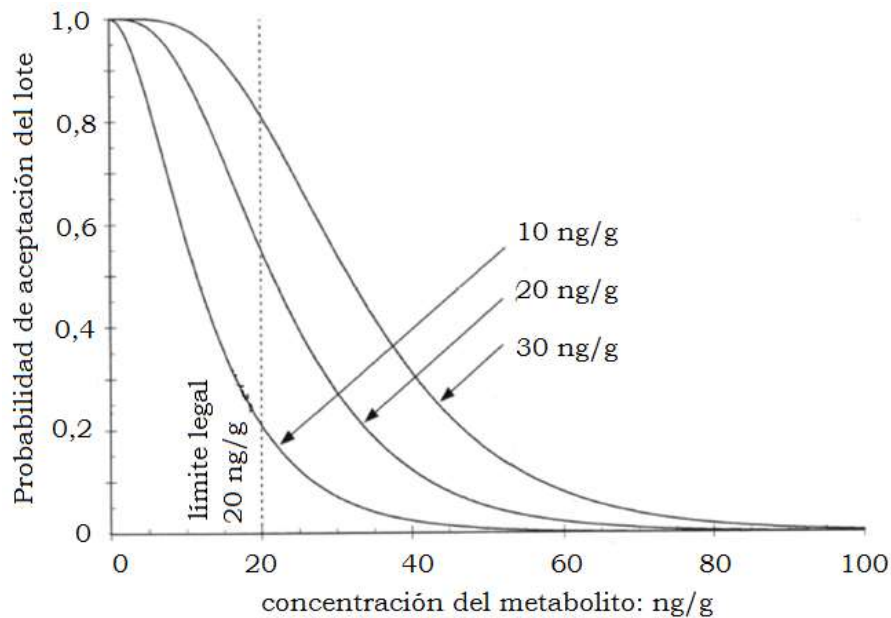


Figura 5.5. Ejemplo del efecto del límite de aceptación/rechazo (Whitaker, 2008)

Aun cuando se empleen procedimientos de muestreo, preparación de la muestra y técnicas analíticas aceptados, hay errores asociados con cada uno de estos pasos. Aumentando el tamaño de la muestra, el de la sub-muestra, el grado de molienda, el número de alícuotas analizadas y usando un método analítico más preciso, se puede reducir la variabilidad del resultado como se observa en las figuras 5.4 y 5.5 (Whitaker, 2008).

Extracción de metabolitos

Las diversas técnicas usadas para el análisis de los metabolitos incluyen molienda, extracción con una mezcla disolvente, purificación y detección. La complejidad del sustrato y el método para la detección influyen sobre el tratamiento que se aplica.

En la extracción se emplean diversos solventes orgánicos y sus mezclas, principalmente acetonitrilo, metanol, acetona y acetato de etilo, así como agua, según las propiedades fisicoquímicas del metabolito y la matriz del producto analizado. Las mezclas acetonitrilo-agua (84:16 v/v), acetonitrilo-metanol-agua (25:25:50 v/v/v) y acetona-agua (70:30 v/v; 60:40 v/v) son usadas para la extracción simultánea de aflatoxinas, ocratoxinas, desoxinivalenol, trichotecenos, zearalenona y fumonisinas presentes en cereales o harinas, pero la eficiencia de la misma depende de la naturaleza del sustrato. La mezcla más conveniente para la determinación de aflatoxina B₁ en granos es metanol-agua (80-20 v/v). Comúnmente se agita el producto molido con la mezcla disolvente, pero se suelen emplear otras técnicas que usan temperatura, ultrasonido, presión o fluidos supercríticos (Trombete y otros, 2013). El siguiente paso es la purificación o limpieza del extracto y el enriquecimiento del o los metabolitos a analizar.

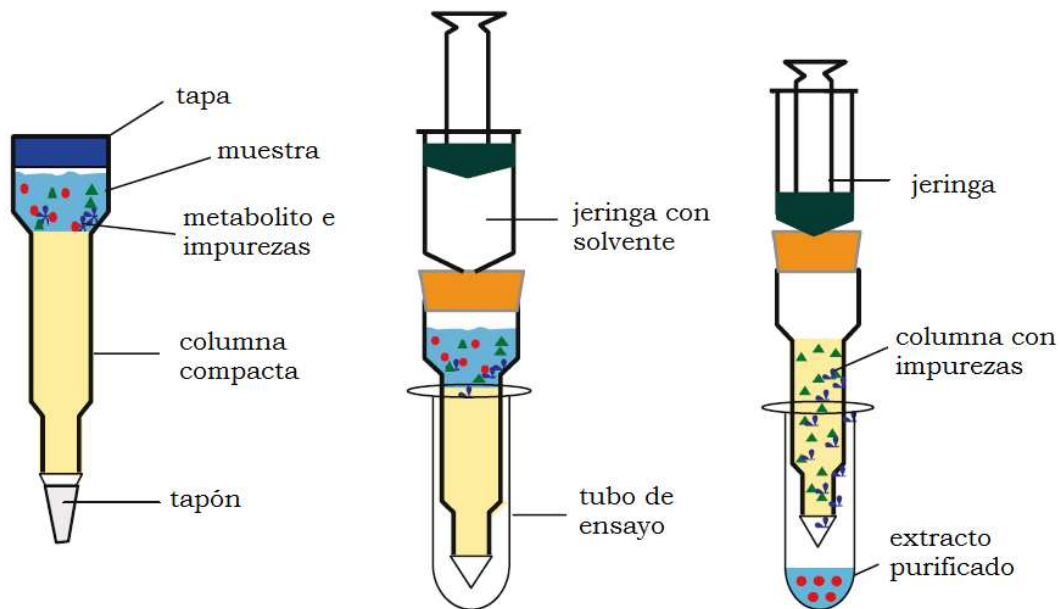


Figura 5.6. Columna de extracción en fase sólida (Zeng y otros, 2006)

Las columnas de purificación por extracción en fase sólida (figura 5.6) contienen gel de sílice, florisil o resinas de intercambio iónico para retener al metabolito sobre el adsorbente, el que luego es eluido con la mezcla disolvente (Zeng y otros, 2006).

La columna de purificación por inmunoafinidad (figura 5.7) contiene un anticuerpo específico inmovilizado sobre un soporte sólido y al agregar el extracto de la muestra, el metabolito se une al mismo dejando pasar el disolvente. Luego se agrega agua para eliminar las impurezas y finalmente se añade un eluyente para recuperar el metabolito purificado.

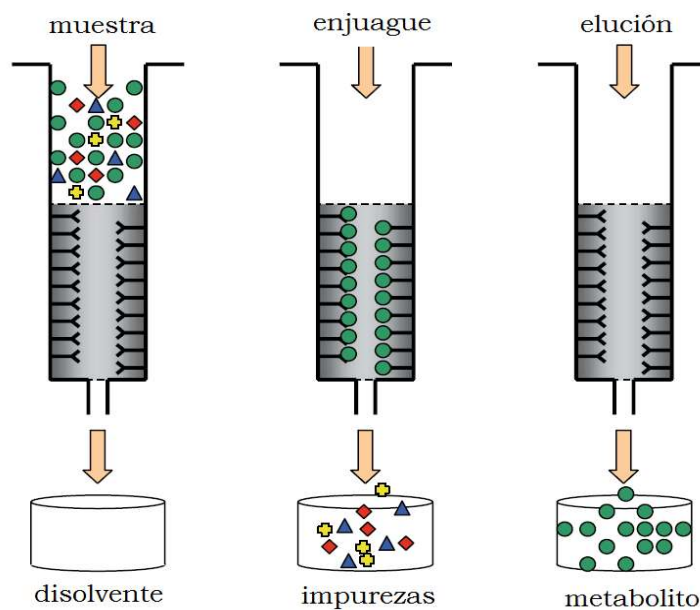


Figura 5.7. Columna de inmunoafinidad para purificar la muestra (Zeng y otros, 2006).

Análisis

La identificación de los metabolitos presentes en el eluato de la columna de purificación se hace mediante técnicas inmunológicas, o cromatográficas: capa fina (hoy, poco usada), líquida de alta resolución (HPLC) o gaseosa. La cuantificación, directa o previa derivatización, se lleva a cabo por detección de fluorescencia, espectroscopía en el infrarrojo cercano, espectrometría de masas u otra, alcanzando un límite menor que 1 ng/g en algunos casos (Trombete y otros, 2013). Por otra parte, el uso de la columna de inmunoafinidad (figura 5.7) es un método selectivo y eficiente para la recuperación de un metabolito, el que puede ser cuantificado por espectrometría o fluorimetría, considerando la variación de la concentración del mismo durante el proceso.

El término “método rápido” se refiere a un método más simple, desde el punto de vista operativo, que las respectivas técnicas de referencia. Algunos pueden desarrollarse en menos de 30 minutos con la muestra pre-molida, y por lo tanto son útiles en el campo.

El inmunoensayo de flujo lateral o ‘método de las tiras’ está basado en la técnica de la inmunocromatografía. La tira de una membrana transportadora contiene los reactivos secos que son activados al aplicar la solución de la muestra. Cada tira está compuesta por varias almohadillas como se observa en la figura 5.8. Cuando se deposita el extracto, la zona destinada a la muestra se satura y llega por capilaridad a la almohadilla del conjugado que contiene el reactivo específico para la detección (anticuerpo anti-metabolito conjugado con un marcador) y luego migra a lo largo de la membrana hacia la zona de prueba y control (Zeng y otros, 2006). Hay dos tipos de formato, en el sandwich el color indica la presencia del metabolito.

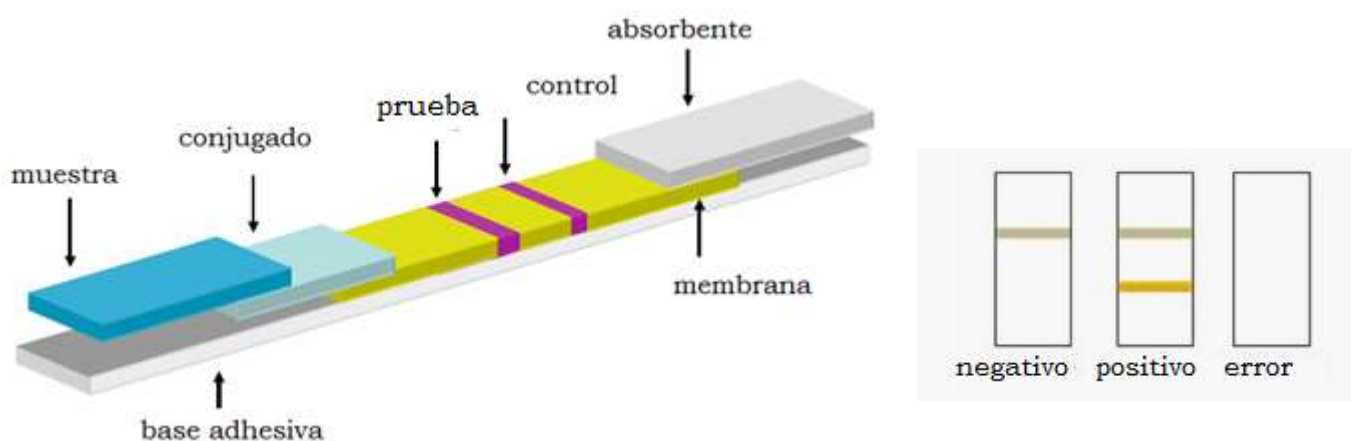


Figura 5.8. Tira de inmunocromatografía y resultado en el formato sandwich (Zeng y otros, 2006)

En cambio, en el formato competitivo el color es inversamente proporcional a la concentración del metabolito y la zona de prueba será invisible con una muestra de concentración mayor o igual al nivel de corte previsto, mientras que la zona de control siempre estará invisible indicando la validez del ensayo (Yu y otros, 2015). Sin embargo, es más bien una técnica de presencia/ausencia antes que una cuantitativa rigurosa.

El método ELISA está basado en la capacidad de un anticuerpo específico para distinguir la estructura tridimensional de un metabolito específico. La técnica ELISA clásica usa una placa de microtitulación y requiere 1-2 horas para el equilibrio de la reacción antígeno-anticuerpo, pero los equipos comerciales corrientes trabajan con la fase cinética de dicha reacción reduciendo el tiempo de incubación a minutos, y aunque hay alguna pérdida de sensibilidad el resultado es exacto y reproducible (Zeng y otros, 2006). Hay dos formas de ELISA, competitivo y no competitivo, y en cada caso puede ser directo o indirecto. Con el ensayo competitivo se obtiene la máxima sensibilidad con una mínima cantidad de anticuerpo (Niapau, 2008).

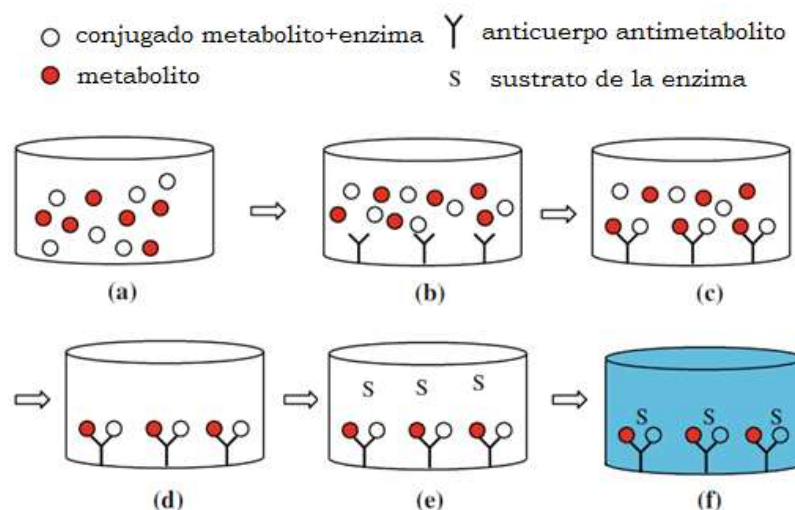


Figura 5.9. Principio de ELISA competitivo: (a) muestra mezclada con el conjugado; (b) mezcla agregada al pocillo revestido con el anticuerpo; (c) unión del metabolito (libre o conjugado) al anticuerpo; (d) lavado para eliminar material sobrante; (e) se añade sustrato para desarrollar color; (f) se detiene la reacción y se hace la lectura (Zeng y otros, 2006).

En el método de ELISA competitivo, directo y cuantitativo (figura 5.9), el pocillo de la placa está recubierto con un anticuerpo que reconoce al metabolito. Se agrega una mezcla del extracto de la muestra y una enzima conjugada con el metabolito. Este conjugado compite con el metabolito libre presente en la muestra, por la unión con el anticuerpo. El exceso de reactantes se lava y se añade el sustrato de la enzima, entonces se desarrolla un color azul. La reacción se detiene por agregado de una solución ácida y la lectura se hace bajo

luz de 450 nm con un límite de detección de 2,5 µg/kg. La intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración del metabolito en la muestra.

Una vez conocida la concentración del metabolito en la muestra, el valor es comparado con el límite aceptación/rechazo predefinido por las normas legales en el caso de sustancias tóxicas para humanos, ganado y animales de granja (Whitaker, 2008).

Determinación de la exposición

La OMS define la exposición dietaria como una valoración cuali y/o cuantitativa de la ingesta probable de agentes físicos, químicos o biológicos a través de los alimentos. Otra definición establece que corresponde al proceso dirigido a estimar o medir la extensión, frecuencia, y tiempo de exposición a un agente según las características de la población expuesta, y describe las fuentes, rutas e incertidumbres en la determinación. Es importante obtener información segura de la concentración de los metabolitos en los alimentos y del consumo de los mismos.

$$\text{Exposición (ng/kg) / día} = [\text{concentración} \times \text{consumo}] / \text{peso corporal}$$

Tabla 5.3. Análisis de biomarcadores de exposición (Brera y otros, 2016)

Biomarcador	País	Muestra	Grupo humano	Nivel
AFM1	Brasil	orina	...	1,8-3,9 pg/mL
AFM1 AFB1	Ghana	suero	niños 1-2,5 años	189 pg/mL 5,0-6,2 pg/mL
AFM1	Turquía	leche	mujeres	60,1-299,9 ng/ml
OTA	Rep. Checa	suero	adultos	0,28 ng/mL
OTA	Sierra Leona	suero	niños	2,4 ng/mL
OTA	Italia	orina	...	0,01-0.046 ng/mL
OTA	Turquía	leche	mujeres	0,62-13 ng/mL
DON	China	orina	adultos	4-94 ng/mL
DON	Reino Unido	orina	adultos	1-61 ng/mL
FB1	Sudáfrica	orina	adultos	225 pg/mL
FB1	México	orina	adultos	147 pg/mL
ZEA	Nigeria	orina	...	0,3 ng/mL
ZEA	Italia	orina	adultos	0,056 ng/mL
AFM1: aflatoxina M ₁ ; AFB1: aflatoxina B ₁ ; OTA: ocratoxina A; FB1: fumonisina B ₁ ; ZEA: zearalenona				

Los datos de toxicidad y estimación de la exposición a un biomarcador particular ayudan a interpretar e interrelacionar los efectos adversos para la salud. Los biomarcadores o sus metabolitos se pueden medir en los tejidos o fluidos corporales (tabla 5.3). Para ser funcional deben estar correlacionados con la ingesta, tener una vida media de días y poder ser medido con la precisión y especificidad necesarias.

La exposición a metabolitos tóxicos de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Tabla 5.4) representa un peligro para la salud y una preocupación sanitaria pues inevitablemente se encuentran en cereales y oleaginosas (Brera y otros, 2016).

Tabla 5.4. Evaluación de la exposición (Brera y otros, 2016)

Metabolito		País	Grupo humano	Exposición (ng/kg corporal)/día
Aflatoxinas		Francia	niños	0.32-0,89
			veganos	0,9-2,1
		Suecia	adultos	0,76-2,10
Ocratoxinas		Italia	niños	1,16-2,42
		España	adultos	0,37-1,31
Fumonisina B ₁		Francia	niños	15-44,6
			adultos	7,45-29,1
Fumonisina B ₂		Francia	niños	6,48-30,4
			adultos	2,44-15,89
Zearalenona		Italia	ancianos	12-111
		Noruega	adultos	8-19
		Holanda	niños	21-55
				(µg/kg corporal)/día
Tricotecenos	T-2	Francia	niños	4,00-38
			adultos	0,11-1,92
	HT-2	Francia	niños	10,5-53,1
			adultos	0,07-1,82
Alcaloides del ergot		Dinamarca	niños	0,075-0,170

Tabla 5.5. Ingesta diaria tolerable en la Unión Europea (Vettorazzi y López, 2016)

Metabolitos	Ingesta tolerable /kg peso corporal	Año	Metabolitos	Ingesta tolerable /kg peso corporal	Año
Ocratoxina A	120 ng semanal	2006	Zearalenona	0,25 µg diario	2011
Patulina	0,4 µg máx diario	2000	T-2 y HT-2	0,1 µg diario	2011
Desoxinivalenol	1 µg diario	1999	Nivalenol	1,2 µg diario	2013
Fumonisinias	2 µg diario	2003	Alcal. ergot	0,6 µg diario	2012

Tabla 5.6. Niveles máximos permitidos en alimentos en la Unión Europea (Vettorazzi y López, 2016)

Aflatoxinas Producto	Nivel máximo (µg/kg)			Ocratoxinas Producto	Nivel máximo µg/kg	
	total	B1	M1			
Maníes, nueces y otros	4-15	2-12	-	Cereales y derivados	3	
Frutas desecadas	4-10	2-5	-	Alimentos para niños	0,50	
Leche	-	-	0,050	Vino y jugo de uva	2	
Maíz y arroz	10	5	-	Frutas desecadas	10	
Cereales y derivados	4	2	-	Café	5	
Alimentos para niños	-	0,1	-	Café soluble	10	
Lácteos para bebés	-	-	0,025	Desoxinivalenol		
Alimentos dietéticos	-	0,1	0,025	Cereales	750-1750	
Espicias	10	5	-	Alimento paraniños	200	
Licores de raíces	20-	-	-	Pastas secas	750	
	80			Pan y bizcochos	500	
Patulina Producto	Nivel máx. µg/kg	Zearalenona Producto		Nivel máx. µg/kg	Fumonisinias Producto	Nivel máx. µg/kg
Jugo frutas conc.	50	Cereales		75-350	Maíz	1000-4000
Puré manzanas	25	Aceite maíz		400	Cereales desay.	800
Jugos p/ niños	10	Alimento niños		20	Alimento niños	200

La concentración sin efecto adverso observable (NOAEL) y el nivel menor al cual se observan (LOEL) pueden ser determinados experimentalmente bajo condiciones controladas y sirven para determinar la exposición diaria tolerable (TDA). Para agentes sin

nivel de umbral (genotóxicos) se calculan unos parámetros que permiten predecir el nivel de riesgo asociado a la exposición.

En la determinación de riesgos se consideran los grupos vulnerables: niños, ancianos, con deficiencias metabólicas u otros. Para poder extrapolar los resultados obtenidos en animales al hombre, se consideran las diferencias cuali- y cuantitativas en la respuesta a la sustancia tóxica, y además las que surgen de resultados obtenidos en períodos cortos cuando se aplican a situaciones de exposición crónica (Ruiz y Font, 2007).

Las aflatoxinas están entre las más importantes sustancias genotóxicas pero aún no se ha fijado el valor de la ingesta diaria tolerable. Se hallan en granos y productos alimenticios en concentraciones que van desde 1 µg/kg a 1 mg/kg (Brera y otros, 2016).

6. Contaminación ambiental

Bioaerosol

Es una colección de virus, bacterias, esporas fúngicas y otros microorganismos, viables o no, transportados por el aire cuyo tamaño varía de 0,02 a 100 µm, que pueden estar adheridos a las partículas de polvo y gotas. Las fuentes incluyen la actividad agrícola, el tratamiento de aguas cloacales y la deposición de residuos municipales, entre otras.

El transporte de bioaerosoles puede ser definido en términos de tiempo y distancia. La microescala implica corto tiempo (< 10 minutos) y corta distancia (< 100 m) y es común en los espacios cerrados. El transporte a mesoescala dura entre 10 minutos y 1 hora, alcanzando desde 100 m a 1 km. La macroescala se refiere a días y distancias de hasta 100 km. La difusión o disipación responde al gradiente de concentración y la gravedad, ayudada por el flujo de aire y la turbulencia atmosférica. Finalmente se depositan por gravedad, difusión descendente, impacto, lluvia o fuerzas electrostáticas. Los factores ambientales más importantes que influyen en la supervivencia son la humedad relativa, la temperatura y la radiación UV.

La atmósfera es un ambiente inadecuado para los microorganismos, sin embargo, las esporas fúngicas, cuyo tamaño varía entre 0,5 a 30 µm, resisten al estrés ambiental y están adaptados al transporte por el aire. La inhalación de las mismas puede causar enfermedades alérgicas o infecciosas, así como intoxicación. Numerosos patógenos vegetales, así como patógenos animales, son diseminados por aerosoles (Pepper y Gerba, 2015).

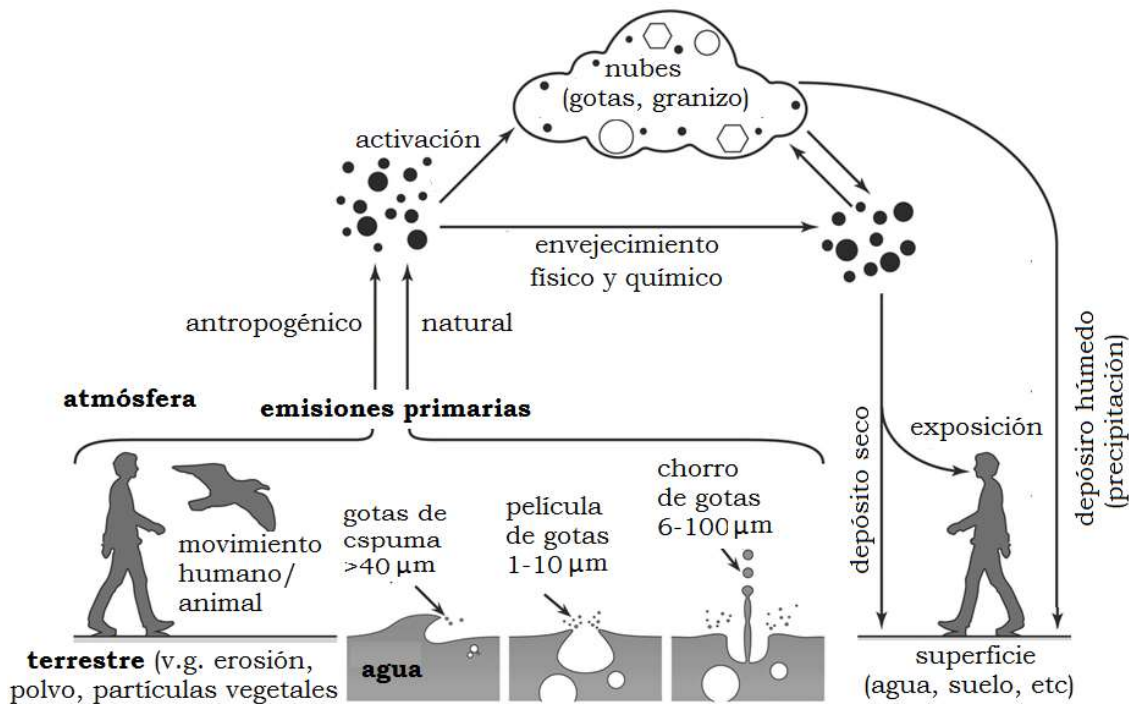


Figura 6.1. Formación de aerosoles (Tesson y otros, 2016)

Exposición ocupacional

Las rutas típicas de exposición ocupacional a los metabolitos fúngicos son la inhalación y el contacto dérmico (Mayer y otros, 2008). Una característica de esta exposición es la manipulación de productos y materiales a escala industrial generando grandes cantidades de polvo. Así la concentración de toxinas fúngicas en el aire de un granero suele llegar a ser 15 veces mayor que la presente en el material embolsado (Straumfors y otros, 2008). Para que haya exposición a los metabolitos debe haber condiciones favorables para el desarrollo fúngico: nutrientes, humedad, temperatura, pH y a veces luz (Magan y Aldred, 2007). Si se conocen las especies fúngicas que predominan en una zona se pueden predecir los problemas, sin embargo, no es necesario que haya mohos visibles pues un grano limpio puede transportar 10^3 - 10^4 esporas y la fricción con otros granos los libera al aire (Halstensen y otros, 2013).

Más obvia es la presencia de mohos sobre residuos y materiales orgánicos húmedos, tal como macetas de cartón reciclado donde crece fácilmente *Stachybotrys chartarum* (Dill y otros, 1997).

Para determinar el riesgo potencial en la exposición ocupacional a metabolitos fúngicos hay que considerar no solo la concentración de los mismos sino también la duración y frecuencia de la exposición, así como el volumen de aire respirado por hora en las condiciones del trabajo, y que no todo el metabolito inhalado es absorbido (Bünger y otros, 2004). Además, algunos metabolitos lipofílicos de bajo peso molecular pueden penetrar la piel humana (Boonen y otros, 2012).

Cuadro 6.1. Metabolitos en diferentes ambientes (WHO, 2009)

Lugar	Concentración del metabolito
Molino de maníes	250-410 ng AfB1/g polvo 0,9-72 ng AfB1/m ³ aire
Zona de descarado de maníes	0,4-7,6 ng AfB1/m ³ aire
Elevador de granos	2-128 ng OTA/g polvo 2-600 pg/m ³ aire
	0,07-690 pg OTA/m ³ aire 0,2-720 ng DON/m ³ aire 0,1-501 ng ZEA/m ³ aire
Cosecha de granos	0,4-2,8 ng OTA/g polvo 0,1-239 ng DON/g polvo 4-339 ng NIV/ g polvo
Manipulación de trigo a granel	36 ng OTA/m ³ aire
Manipulación de maíz a granel	127 pg fumonisinas/m ³ aire
Porqueriza	5-421 ng AfB1/m ³ aire
Establo	0,2-70ng OTA/g polvo
Gallinero	0,08 ng AfB1/m ³ aire
Interior (alfombra)	2-4 ng esterigmatocistina/g polvo
Interior	<10- >1300 pg tricotecenos/m ³ aire 0,25 ng satratoxina G/m ³ aire 0,43 ng satratoxina H/m ³ aire 0,009-4 ng roquefortina C/m ³ aire
Tratamiento de residuos	1,1-6,1 pg AfB1/m ³ aire 3,3-31 pg OTA/ m ³ aire
AfB1: aflatoxina B1; OTA: ocratoxina A; DON: desoxinivalenol; NIV: <i>nivalenol</i> ; ZEA: <i>zearalenona</i>	

La humedad es el principal factor el desarrollo fúngico en los interiores y éstos pueden producir compuestos orgánicos volátiles (ácidos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres, fenoles, hidrocarburos, lactonas, terpenoides) durante su metabolismo primario y secundario. El patrón de emisión de las especies de *Aspergillus* incluye 2-heptanona, 2-hexanona, 3-octanol y α -terpineol. Entre los mohos que requieren una humedad relativa en equilibrio superior a 80% se encuentran especies de: *Cladosporium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Sporobolomyces*, *Alternaria*, *Exophiala*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Ulocladium*,

Rhodotorula y *Stachybotrys*. Sin embargo, otros se desarrollan a valores menores, tal como especies de *Aspergillus* y *Penicillium* (Mayer, 2016).

7. Referencias

- Arnold AE. 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi. *Fungal Biology Reviews* 21: 51-66.
- Azevedo JL, W Maccheroni, JO Pereira, WL de Araujo. 2000. Endophytic microorganisms. *Electron. J. Biotechnol.* 3 (1): 15-16.
- Bejarano NV, L Carrillo. 2016. Fungal endophytes in sweet orange *Citrus sinensis* in Jujuy-Argentina. *Asian J. of Agriculture and Food Science* 4 (1): 54-59.
- Bing LA, LC Lewis. 1993. Occurrence of the entomopathogenic *Beauveria bassiana* in different tillage regimes in *Zea mays* and virulence towards *Ostrinia nubilalis*. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 45: 147-156.
- Boonen J, SV Malysheva, L Taevernier, JD Di Mavungu, S De Sager, Bart De Spiegeleer. 2012. Human skin penetration of selected model mycotoxinas. *Toxicology* 301: 21-32.
- Borges D, AO Díaz, AN San-Juan, E Gómez. 2010. Metabolitos secundarios producidos por hongos entomopatógenos. *ICIDCA* 44 (3): 49-55.
- Braga RM, MN Dourado, WL Araújo. 2016. Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. *Brazilian Journal of Microbiology* 475: 86-98.
- Brera C, F Debegnach, E Gregori, S Colicchia, S Soricelli, B Miano, B De Santis, 2016. Dietary exposure assessment of European population to mycotoxins. Pp. 223-260 en: *Environmental Mycology in Public Health*. C Viegas, AC Pinheiro, R Sabino, S Viegas, J Brandao, C Verissimo, eds. Academic Press-Elsevier, Amsterdam.
- Bünger J, G Westphal, A Mönnich, B Hinnendahl, E Hallier, M Müller. 2004. Citotoxicity of occupationally and environmentally relevant mycotoxinas. *Toxicology* 202 (3): 199-211.
- Carlile MJ, SC Watkinson, GW Gooday. 2001. Fungal cells and vegetative growth. Pp. 85-184 en: *The Fungi*, Academic Press, San Diego.
- Currie AF, J Wearn, S Hogson, H Wendt, S Broughton, L Jin. 2014. Foliar fungal endophytes in herbaceous plants. Pp. 61-84 en: *Advances in Endophytic Research*. VC Verma, AC Gange, eds. Springer, India.
- Dill I, C Trautmann, R Szewzyk. 1997. Mass development of *Stachybotrys chartarum* on compostable plants pots made from recycled paper. *Mycoses* 40 Suppl 1: 110-114.

- Doko B, Park DL. 2008. Mycotoxin reduction and decontamination. Pp. 231-243 en: Mycotoxin contamination and control. H Njapau, S Trujillo, AE Pohland, DL Park, eds. Author House, Bloomington.
- Estrada C, WT Wcislo, SA Van Bael. 2013. Symbiotic fungi alter plant chemistry that discourages leaf-cutting ants. *New Phytologist* 198 (1): 241-251.
- Frisvad JC. 2015. Taxonomy, chemodiversity, and chemoconsistency of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces*. *Frontiers in Microbiology* 5: artículo 773.
- Gouda S, G Das, SK Sen, HS Shin, JK Patra. 2016. Endophytes: a treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. *Frontiers in Microbiology* 7: artículo 1538.
- Gundel PE, MA Martínez-Ghersa, M Omacini, R Cuyeu, E Pagano, R Ríos, CM Ghersa. 2012. Mutualism effectiveness and vertical transmission of symbiotic fungal endophytes in response to host genetic background. *Evolutionary Applications* 5 (8): 838-849.
- Halstensen AS, KK Heldal, IM Wouters, M Skogstad, DG Ellingsen, W Eduard. 2013. Exposure to grain dust and microbial components in the Norwegian grain and compound feed industry. *Ann. Occup. Hyg.* 57 (9): 1105-1114.
- Harris CM, BC Campbell, RJ Molyneux, TH Harris. 1988. Biosynthesis of swainsonine in the diablo locoweed (*Astragalus oxyphyrus*) *Tetrahedron Letters* 29(38): 4815-4818.
- Hocking AD. 2003. Microbial facts and fictions in grain storage. Pp. 55-58 en: *Proceedings of the Australian Postharvest Technical Conference*, Canberra.
- Kale S, JW Bennett. 1992. Strain instability in filamentous fungi. Pp. 311-331 en: *Handbook of Applied Mycology*, vol. 5. D Bhatnagar, EB Lillehoj, DK Arora, eds. M. Dekker, New York.
- Lacey J. 1989. Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. *J. Appl. Bact. Symp. Suppl.* 11S-25S, 1989
- Magan N, Aldred D. 2007. Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *Int J Food Microbiol* 119(1-2): 131-139.
- Mansfield MA, DD Archibald, AD Jones, GA Kuldau. 2007. Relationship of sphinganine analog mycotoxin contamination in maize silage to seasonal weather conditions and to agronomic and ensiling practices. *Phytopathology* 97: 504-511.
- Mayer S. 2016. Occupational exposure to mycotoxins and preventive measures. Pp. 325-342 en: *Environmental Mycology in Public Health*. C Viegas, AC Pinheiro, R

- Sabino, S Viegas, J Brandao, C Verissimo, eds. Academic Press-Elsevier, Amsterdam.
- Mayer S, S Engelhart, A Kolk, H Blome. 2008. The significance of mycotoxins in the framework of assessing workplace related risks. *Mycotoxin Research* 24 (3): 151-164.
 - Moore D, GD Robson, APJ Trinci. 2011. Nature and origins of fungi, pp. 3-17; Fungi as saprotrophs, symbionts and pathogens pp. 325-366; Outline classification of fungi pp. 575-588. En: 21st Century Guidebook to Fungi. Cambridge University Press, New York.
 - Moss MO. 1987. Food mycology. Pp. 3-30 en: *Mycotoxins in Foods*. P. Krogh, ed. Academic Press, San Diego.
 - Moss MO. 1991. Los factores ambientales que controlan la formación de micotoxinas. Pp. 37-56 en: *Mycotoxins and animal foods*. JE Smith, HS Henderson, eds. CRC Press, Boca Raton.
 - Mousa WK, MN Raizada. 2013. The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes. *Frontiers in Microbiology* 4: artículo 65.
 - Njapau H. 2008. Sampling village corn for aflatoxin analysis, pp. 113-132; Immunoassay procedures for screening food commodities for mycotoxins, pp. 181-191. En: *Mycotoxin Contamination and Control*. H Njapau, S Trujillo, AE Pohland, DL Park, eds. Author House, Bloomington.
 - Osono T. 2014. Diversity and ecology of endophytic and epiphytic fungi of tree leaves. Pp. 3-26 en: *Advances in Endophytic Research*. VC Verma, AC Gange, eds. Springer, India.
 - Park DL, H Njapau, E Boutrif. 2008. The HACCP concept and mycotoxins. Pp. 275-289 en: *Mycotoxin Contamination and Control*. H Njapau, S Trujillo, AE Pohland, DL Park, eds. Author House, Bloomington.
 - Peraica M. 2016. Mycotoxicoses. Pp. 45-52 en: *Environmental Mycology in Public Health*. C Viegas, AC Pinheiro, R Sabino, S Viegas, J Brandao, C Verissimo, eds. Elsevier, Amsterdam.
 - Pepper IL, CP Gerba. 2015. Aeromicrobiology. Pp. 89-110 en: *Environmental Microbiology*. 3^a ed. IL Pepper IL, CP Gerba, TJ Gentry, eds. Academic Press-Elsevier, Amsterdam.
 - Popovski S, FA Celar. 2013. The impact of environmental factors on the infection of cereals with *Fusarium* species and mycotoxin production. *Acta agriculturae Slovenica* 101 (1) 105-116.

- Pucheta Diaz MP, AF Macías, SR Navarro, M de la Torre. 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia* 31 (12): 856-860.
- Pusztahelyi T, IJ Holb, I Pócsi. 2015. Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Frontiers in Plant Science* 6: artículo 573.
- Rodriguez RJ, JE White, AE Arnold, RS Redman. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* 182 (2): 314-330.
- Ruiz MJ, G Font. 2007. Toxicidad y evaluación de riesgos. Pp.15-27 en: Soriano del Castillo JM, ed. *Micotoxinas en Alimentos*. Diaz de Santos, España, 2007
- Samson RA. 2016. Cellular constitution, water and nutritional needs, and secondary metabolites. Pp. 5-16 en: *Environmental Mycology in Public Health*. C Viegas, AC Pinheiro, R Sabino, S Viegas, J Brandao, C Verissimo, eds. Elsevier, Amsterdam.
- Sánchez-Pérez LC, JE Barranco, S Rodríguez, y otros. 2014. Enzymes of entomopathogenic fungi. *Adv. Enzyme Res.* 2: 65-76.
- Sanchis V, S Marin, AJ Ramos. 2007. Factores determinantes en la producción de micotoxinas. Pp.63-89 en: *Micotoxinas en Alimentos*. Soriano del Castillo JM, ed. Diaz de Santos, España.
- Schmidt-Heydt M, B Cramer, I Graf , S Lerch, HU Humpt, R Geisen. 2012. Wavelength-dependent degradation of ochratoxin and citrinin by light in vitro and in vivo and its implications on *Penicillium*. *Toxins* 4: 1535-1551, 2012.
- Singh D, SY Soon, CH Lee. 2016. Perplexing metabolomes in fungal-insect trophic interactions. *Frontiers in Microbiology* 7: artículo 1678.
- Spatafora JW, Y Chang, GL Benny, K Lazarus, ME Smith, ML Berbee, G Bonito, N Corradi, I Grigoriev, A Gryganskyi, TY James, K O'Donnell, RW Roberson, TN Taylor, J Uehling, R Vilgalys, MM White. 2016. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia* 108 (5): 1028-1046.
- Straumfors A, KC Nordby, P Kristensen, W Eduard. 2008. Mycotoxins in grain dust. *Stewart Postharvest Review* 4 (6): 1-9.
- Strobel G, Daisy B. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(4): 491-502, 2003
- Sung GH, NL Hywel-Jones, JM Sung, J Luangsaard, B Shrestha, JW Spatafora. 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology* 57: 5-59.
- Swanson BG. 1987. Mycotoxins on fruits and vegetables. *Acta Horticulturae* 207: 49-61.

- Tesson SVM, CA Skjoth, T Santi-Temkiv, J Londahi. 2016. Airborne microalgae: insights, opportunities and challenges. *Appl. Environ. Microbiol.* 82: 1978-1991.
- Trombete FM, T Saldanha, GM Direito, ME Fraga. 2013. Aflatoxinas y tricotecenos en trigo y derivados. *Revista Chilena de Nutrición* 40 (2): 181-188.
- Varga J, JC Frisvad, RA Samson. 2011. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Studies in Mycology* 69: 57-80.
- Vega FE, F Posada, MC Aime, M Pava-Ripoll, F Infante. 2008. Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control* 46: 72-82.
- Vettorazzi A, Lopez de Cerain A. 2016. Mycotoxins as food carcinogens. Pp. 261-290 en: *Environmental Mycology in Public Health*. C Viegas, AC Pinheiro, R Sabino, S Viegas, J Brandao, C Verissimo, eds. Elsevier, Amsterdam.
- Webster J, RWS Weber. 2007. Introduction. Pp. 1-40 en: *Introduction to fungi*. Cambridge University Press, New York.
- Whitaker TB. 2008. Mycotoxins sampling plans. Pp. 89-112 en: *Mycotoxin Contamination and Control*. H Njapau, S Trujillo, AE Pohland, DL Park, eds. Author House, Bloomington.
- WHO. Pp. 2 y 12 en: *Guidelines for indoor air quality: dampness and mould*. 2009.
- Yu HW, MJ Halonen, IL Pepper. 2015. Immunological methods. Pp. 245-270 en: *Environmental Microbiology*. 3ª ed. IL Pepper IL, CP Gerba, TJ Gentry, eds. Academic Press-Elsevier, Amsterdam.
- Zeng MZ, JL Richard, J Binder. 2006. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia* 161: 261-273, 2006

