

Tesis de Maestría

Estudio comparativo de las condiciones ambientales que influyen en la producción de tricotecenos en cepas de *Fusarium graminearum* aislados de trigo cultivado en Argentina

Ramírez Albuquerque, L. Diana

2014-04-29

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Ramírez Albuquerque, L. Diana. (2014-04-29). Estudio comparativo de las condiciones ambientales que influyen en la producción de tricotecenos en cepas de *Fusarium graminearum* aislados de trigo cultivado en Argentina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Ramírez Albuquerque, L. Diana. "Estudio comparativo de las condiciones ambientales que influyen en la producción de tricotecenos en cepas de *Fusarium graminearum* aislados de trigo cultivado en Argentina". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-04-29.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Maestría en Bromatología y Tecnología de la Industrialización de los Alimentos

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS CONDICIONES
AMBIENTALES QUE INFLUENCIAN LA PRODUCCIÓN
DE TRICOTECENOS EN CEPAS DE *Fusarium*
graminearum AISLADAS DE TRIGO CULTIVADO EN
ARGENTINA**

Tesis presentada para optar al título de Magíster de la Universidad de Buenos Aires en
Bromatología y Tecnología de la Industrialización de los Alimentos

Autor: L. Diana Ramírez Albuquerque

Director de tesis: Dra. Virginia Fernández Pinto

Co-Director de tesis: Dra. Andrea Patriarca

Lugar de trabajo: Departamento de Química Orgánica, Laboratorio de Microbiología

Buenos Aires, Abril 2014

AGRADECIMIENTO

Te agradezco a ti Dios, por ser mi guía. Por ser mi fortaleza en momentos de debilidad y por darme la bendición de alcanzar esta meta.

A mis padres, José Luis y Gilvanete, el agradecimiento más profundo y sentido. Sin su apoyo, colaboración e inspiración habría sido imposible llevar a cabo la realización de la maestría. Gracias por su ejemplo de lucha y honestidad.

A mis hermanas, por el amor y cariño que siempre me han brindado y que a pesar de la distancia, sus consejos y palabras de aliento me impulsaron a seguir adelante. Gracias porque son ejemplos de valentía, capacidad y superación.

Agradezco de manera especial y sincera a mi directora de tesis, Dra. Virginia Fernández Pinto por su orientación, esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación me permitieron aprender mucho más que lo estudiado en todo el proceso de elaboración de la Tesis. Me llevo el mejor recuerdo de esta gran experiencia y mi eterno agradecimiento.

De igual manera agradecer a mi co-directora de tesis, Dra. Andrea Patriarca por el respaldo y la amistad, por sus enseñanzas, por sus sugerencias e ideas y por todo el apoyo recibido para la realización de esta Tesis.

Gracias también a mis queridas compañeras de laboratorio. A Vero por todos los momentos que pasamos juntas desde el inicio de la maestría. A Lucía y Sandra quienes compartieron sus conocimientos y experiencias desde el primer momento. A Moni por su ayuda durante las innumerables extracciones que llevamos a cabo. A Nilda, Gaby, Stella y Andrea por su colaboración y amistad.

A mis padres que, sin duda, me brindan su apoyo permanente. Gracias por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

INDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	III
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Trigo	1
1.2 Trigo en Argentina	3
1.2.1 Región Triguera Argentina	3
1.3 Fusariosis de la Espiga de trigo o Golpe Blanco	4
1.3.1 Agente Causal	5
1.3.2 Síntomas de la Fusariosis de la Espiga de Trigo (FET)	6
1.3.3 Ciclo de la enfermedad	6
1.3.4 Daños causados por la Fusariosis de la Espiga de Trigo (FET)	7
1.3.5 Control integrado de la enfermedad	11
1.3.6 Condiciones ambientales predisponentes a la Fusariosis de la espiga (FET)	12
1.3.7 Estimación de disminución del rendimiento debido a FET	12
1.4 Clasificación de especies dentro del género <i>Fusarium</i>	15
1.4.1 Características morfológicas de las especies del género <i>Fusarium</i>	16
1.4.2 Características morfológicas: <i>Fusarium graminearum</i> Schwabe	21
1.4.3 Complejo <i>Fusarium graminearum</i> (Complejo Fg)	23
1.4.4 Diversidad genotípica en <i>Fusarium graminearum</i>	25
1.5 Micotoxinas más frecuentes producidas por <i>Fusarium</i>	26
1.5.1 Tricotecenos	27
1.5.1.1 Estructura química de los tricotecenos	28
1.5.1.2 Propiedades Físico-Químicas de los tricotecenos	31
1.5.1.3 Toxicidad de los tricotecenos	31
1.5.1.4 Características de Deoxinivalenol (DON)	32
1.5.1.5 Característica de 3-Acetildeoxinivalenol (3-ADON)	34
1.5.1.6 Característica de 15-Acetildeoxinivalenol (15-ADON)	34
1.5.1.7 Biosíntesis de tricotecenos	34
1.5.1.1.1 Genes involucrados en la síntesis de tricotecenos (genes <i>Tri</i>)	37
1.5.1.8 Quimiotipos y genotipos de <i>Fusarium graminearum</i>	38
1.5.1.9 Determinación y detección de tricotecenos	41

1.6 Factores que determinan el desarrollo fúngico y la producción de micotoxinas en genero <i>Fusarium</i>	43
1.6.1 Actividad del agua (a_w).....	43
1.6.2 Temperatura.....	44
OBJETIVOS	49
2. MATERIALES Y MÉTODOS	50
2.1 Cepas de <i>F. graminearum</i>	50
2.2 Cultivo y mantenimiento de las cepas de <i>F. graminearum</i>	50
2.3 Determinación de la Capacidad Toxicogénica de las cepas seleccionadas ..	52
2.4 Análisis de micotoxinas	52
2.4.1 Extracción.....	52
2.4.2 Limpieza (clean-up).....	52
2.5 Derivatización de las micotoxinas	56
2.6 Determinación de tricotecenos	58
2.6.1 Condiciones del cromatografo.....	58
2.6.2 Cuantificación de toxinas por patrón interno.....	58
2.7 Confirmación por Cromatografía Gaseosa acoplada a un detector de Espectrometría de Masa (GC-MS)	58
2.8 Determinación del efecto de los parámetros ambientales (a_w , temperatura) Sobre el crecimiento y producción de toxinas	59
2.8.1 Aislamiento seleccionado para estudios de influencia de a_w y temperatura.....	59
2.8.2 Medio de cultivo para estudios de influencia de a_w y temperatura.....	59
2.8.3 Inoculación e incubación del medio de cultivo.....	60
2.8.4 Evaluación de la producción de toxinas.....	60
2.8.5 Análisis y determinación de toxinas extraídas.....	60
2.8.6 Análisis estadístico.....	60
3. RESULTADOS	62
3.1 Caracterización morfológica de los aislamientos	62

3.2	Determinación de la capacidad toxicogénica de las cepas de <i>Fusarium</i>	65
3.2.1	Extracción y detección de tricotecenos	65
3.2.2	Curvas de calibración	67
3.2.3	Límite de cuantificación	67
3.2.4	Confirmación por Cromatografía Gaseosa acoplada a un detector de Espectrometría de Masa (GC-MS)	72
3.2.5	Perfil de producción de tricotecenos de las cepas seleccionadas	75
3.3	Efecto de la actividad del agua (a_w) y de la temperatura sobre la producción de tricotecenos en <i>Fusarium graminearum</i>	76
3.3.1	Aislamiento estudiado	76
3.3.2	Efecto de la actividad de agua (a_w) y temperatura sobre la producción simultánea de DON, 3-ADON y 15-ADON	76
4.	DISCUSION	85
4.1	Quimiotipo VS Genotipo	85
4.2	Influencia de los factores ambientales en la producción relativa de DON, 3-ADON y 15-ADON	87
4.3	Efecto del cambio climático sobre la prevalencia de producción de uno u otro derivado Acetilado	89
	CONCLUSIONES	90
	PERSPECTIVAS FUTURAS	92
	BIBLIOGRAFIA	93
	ANEXO I MEDIOS DE CULTIVO	118
	ANEXO II TABLAS DE DATOS	120

INFLUENCIA DE LOS FACTORES AMBIENTALES EN LA PRODUCCIÓN RELATIVA DE TRICOTECENOS POR *Fusarium graminearum*

RESUMEN

El trigo es uno de los cultivos de mayor importancia en Argentina ya sea para consumo local o como producto de exportación. Una de las principales enfermedades que afectan el cultivo es la “Fusariosis de la Espiga de Trigo” (FET). Es una enfermedad endémica en nuestro país causada por *Fusarium graminearum*, el agente más común de la Fusariosis de la espiga (FET) en muchas partes del mundo. La infección está fuertemente influenciada por parámetros ambientales y ocurre principalmente cuando se dan las condiciones favorables de humedad y temperatura durante la anthesis o floración del trigo. Esta destructiva enfermedad afecta al trigo, cebada y otros granos pequeños y tiene la capacidad de destruir cultivos, causando grandes pérdidas económicas debido a la reducción de la calidad de los granos pudiéndose además acumular niveles significativos de micotoxinas, como los tricotecenos.

La presente Tesis abarcó el estudio de la influencia de la temperatura y la a_w sobre el crecimiento y la biosíntesis de micotoxinas utilizando una cepa de *Fusarium graminearum* productora de deoxinivalenol (DON), 3- y 15-acetildeoxinivalenol (3- y 15-ADON). El análisis en este estudio mostró que los factores ambientales tuvieron gran influencia en la síntesis relativa de los derivados acetilados, siendo esta influencia más marcada en el caso de la temperatura. Las interacciones entre estos factores: a_w , temperatura y el tiempo de incubación, resultaron significativos sobre la producción de DON y 3-ADON. En cambio, la a_w no produjo un efecto significativo sobre la producción de 15-ADON, aunque sí lo hicieron la temperatura, y el tiempo de incubación, así como sus interacciones. Las diferentes condiciones estudiadas mostraron que, para DON, no existen diferencias significativas entre las cantidades producidas en las condiciones óptimas (0,99 a_w , 30 °C, 14 días) y las observadas a la misma a_w a 25 y 20 °C, luego de 14 días de incubación, o la producción a 0,95 a_w , 25 °C y 21 días de incubación. El resto de las condiciones resultaron en una acumulación significativamente menor de DON. En cambio, para 3-ADON, las condiciones de máxima producción (0,99 a_w , 30 °C y 21 días) resultaron en una cantidad de toxina significativamente mayor que para el resto de las condiciones estudiadas. Lo mismo se observó para 15-ADON, para el cual las condiciones óptimas de producción fueron de

0,99 a_w , 10 °C y 7 días de incubación y la cantidad de toxina acumulada difirió significativamente con la que se detectó en el resto de las condiciones de estudio.

De acuerdo a estudios realizados los últimos años, se demostró que el quimiotipo 3-ADON está desplazando rápidamente al quimiotipo 15-ADON en poblaciones de *F. graminearum* del oeste de Canadá. Estudios efectuados en invernadero demostraron que aislamientos pertenecientes al quimiotipo 3-ADON producían concentraciones de DON superiores a los aislamientos pertenecientes al quimiotipo 15-ADON, lo cual es motivo de preocupación para los productores de granos y las industrias relacionadas.

Tanto la distribución geográfica de las especies como de los quimiotipos está influenciada fuertemente por los factores climáticos, el calentamiento global tendrá entonces un gran impacto en esta distribución. Por este motivo, el estudio del efecto de los factores climáticos (temperatura y actividad acuosa) sobre la producción relativa de tricotecenos por *Fusarium graminearum* permitirá predecir el riesgo al que están expuestos los cultivos susceptibles en este nuevo escenario.

Palabras clave: *Fusarium graminearum*, parámetros ambientales, deoxinivalenol, actividad acuosa, temperatura

INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL FACTORS IN THE RELATIVE PRODUCTION OF TRICOTHECENES BY *Fusarium graminearum*

ABSTRACT

Wheat is one of the most important crops in Argentina, either for local consumption or export. One of the major diseases affecting the crop is the Fusarium Head Blight (FHB). It is an endemic disease in our country caused by *Fusarium graminearum*, the most common agent of Fusarium head blight (FHB) around the world. The infection is strongly influenced by environmental parameters and occurs mostly when there are favorable conditions of moisture and temperature during wheat anthesis or flowering. This destructive disease affects wheat, barley and other small grains and has the capability of destroying crops, causing great economic losses due to reduced grain quality, and accumulating significant levels of mycotoxins such as trichothecenes.

This thesis involved the study of the influence of temperature and a_w on growth and mycotoxins biosynthesis, using a strain of *Fusarium graminearum* producing deoxynivalenol (DON), 3- and 15 acetyldeoxynivalenol (3- and 15-ADON). The analyses showed that environmental factors greatly influenced the relative synthesis of the acetylated derivatives, this influence being more pronounced in the case of temperature. The interactions between these factors: a_w , temperature and incubation time were significant on DON production and 3-ADON. However, a_w showed no significant effect on the production of 15-ADON, although temperature and incubation time incubation were significant, as well as their interactions. The different conditions studied showed that there are no significant differences between the amount of DON produced under optimal conditions (0.99 a_w , 30 °C, 14 days) and those at the same a_w , 25 and 20 °C, after 14 days of incubation, or 0.95 a_w , 25 °C and 21 days of incubation. The rest of the conditions resulted in significantly lower accumulation of DON. In contrast, for 3-ADON, the maximum production conditions (0.99 a_w , 30 and 21 days) resulted in a significantly greater amount of toxin than for the rest of the conditions studied. The same effect was observed for 15-ADON, for which the optimal production conditions were 0.99 a_w , 10 °C and 7 days of incubation, and the amount of accumulated toxin differed significantly with those detected in the rest of the studied environmental conditions.

According to studies conducted in recent years, it was demonstrated that the 3-ADON chemotype is rapidly displacing the 15-ADON chemotype of *F. graminearum* populations from western Canada. Greenhouse studies showed that isolates belonging to 3-ADON chemotype produced higher concentrations of DON than isolates belonging to the 15-ADON chemotype, which is of concern to grain producers and related industries.

Both the geographical distribution of species and chemotypes is strongly influenced by climatic factors, and thus global warming will have a major impact on this distribution. For this reason, the study of the effect of climatic factors (temperature and water activity) on the relative production of trichothecenes by *Fusarium graminearum* will allow to predict the risk to which susceptible crops are exposed in this new scenario.

Keywords: *Fusarium graminearum*, environmental parameters, deoxynivalenol, water activity, temperature

INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

1.1 TRIGO

El trigo es uno de los cereales más cultivados del mundo y representa una de las principales fuentes de alimento para el consumo humano y animal. Tanto en volumen como en valor, el trigo es tradicionalmente el rubro más importante del comercio exterior de productos agrícolas (Abeledo y Miralles, 2011).

El mayor productor mundial de trigo actualmente es la Unión Europea y la Argentina ocupa el lugar número 13 (Tabla 1).

Tabla 1. Producción Mundial de Trigo

Posición	País productor	Producción (t) tonelada
1	Unión Europea	142.896.000
2	China	121.000.000
3	India	92.460.000
4	Estados Unidos	57.536.000
5	Rusia	54.000.000
6	Canadá	31.500.000
7	Australia	25.500.000
8	Pakistán	24.000.000
9	Ucrania	22.000.000
10	Turquía	18.000.000
11	Kazajstán	17.000.000
12	Irán	14.500.000
13	Argentina	12.000.000
14	Egipto	8.800.000
15	Marruecos	7.000.000
16	Uzbekistán	6.700.000

<http://www.produccionmundialtrigo.com>, 2013

De acuerdo con información del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA, 2013), durante el ciclo comercial 2011/12, la producción mundial de trigo alcanzó un récord de 695 millones de toneladas. Este volumen fue 1,3% más alto que la cosecha récord del 2009/10, situación que se relaciona con los altos precios del grano durante los últimos dos años, así como por las condiciones climáticas que favorecieron al cultivo en las principales regiones productoras.

INTRODUCCION

Por su parte, el consumo reportó un máximo histórico de 687 millones de toneladas, incentivado por mayor uso forrajero del grano, que creció 24,3% para alcanzar 144,8 millones de toneladas, mientras que el consumo humano e industrial creció sólo 0,9%, al reportar un volumen de 542,2 millones de toneladas. El USDA, de acuerdo con sus más recientes estimaciones, señaló que durante el ciclo comercial 2012/13 se cosecharon 655,48 millones de toneladas de trigo a nivel global (figura 1). Esto es un descenso de 5,2% con respecto a la oferta del ciclo anterior.

La disminución en la oferta se deriva de menores cosechas esperadas en algunos de los principales países productores a causa de la sequía y altas temperaturas en sus principales regiones productoras, en particular en Rusia, cuya oferta reportaría su nivel más bajo en nueve años.

En contraste, la producción en China, India y Estados Unidos, que en conjunto aportan 37,3% de la oferta mundial, se incrementaría 0,1, 8,1 y 13,5%, en ese orden.

2012/2013 Wheat Production

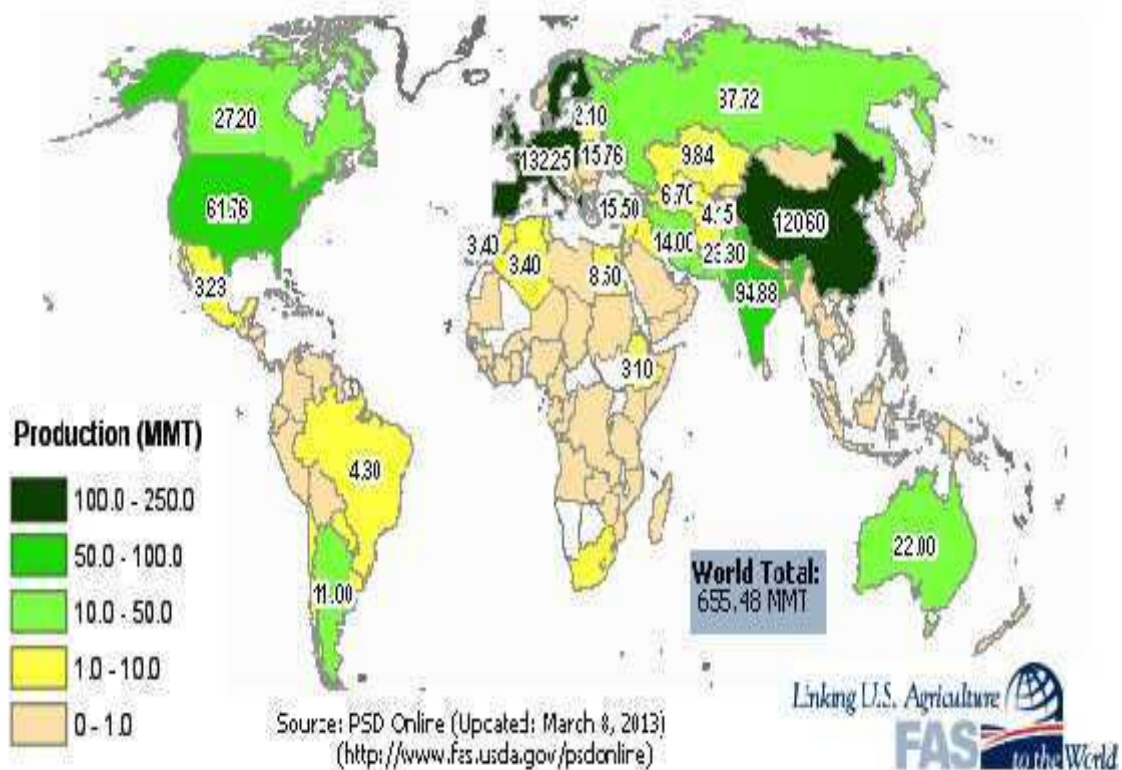


Figura1. Producción mundial de trigo (USDA, 2013)

1.2 Trigo en Argentina

1.2.1 Región Triguera Argentina

La región triguera Argentina ocupa las provincias de Santa Fe, Entre Ríos, Buenos Aires, Córdoba y La Pampa. Basándose en condiciones agroecológicas homogéneas para los requerimientos del cultivo en cuanto a suelo y clima, esta región se ha subdividido en 7 subregiones productivas (Figura 2), siendo las regiones IV y VS las de mayor superficie sembrada y, junto con las regiones IIN y IIS, las de mayor producción. Las precipitaciones anuales disminuyen de Este a Oeste, variando desde 1000 mm al Este hasta 600 mm al Oeste, con una distribución anual uniforme, sin estación seca definida. La cantidad y distribución de las lluvias anuales determinan dos tipos de clima: el templado pampeano húmedo, al Este, y una ancha franja de transición hacia el clima árido, al oeste. Las mayores precipitaciones se registran en verano. En invierno las heladas son frecuentes, en menor cantidad al Este, mientras que se da un aumento hacia el Sur y al Oeste. El suelo de la región es, en su mayoría, oscuro y con un alto porcentaje de materia orgánica. Son los suelos más fértiles del país, aptos para ganadería, agricultura y actividad forestal (Álvarez, 2008).

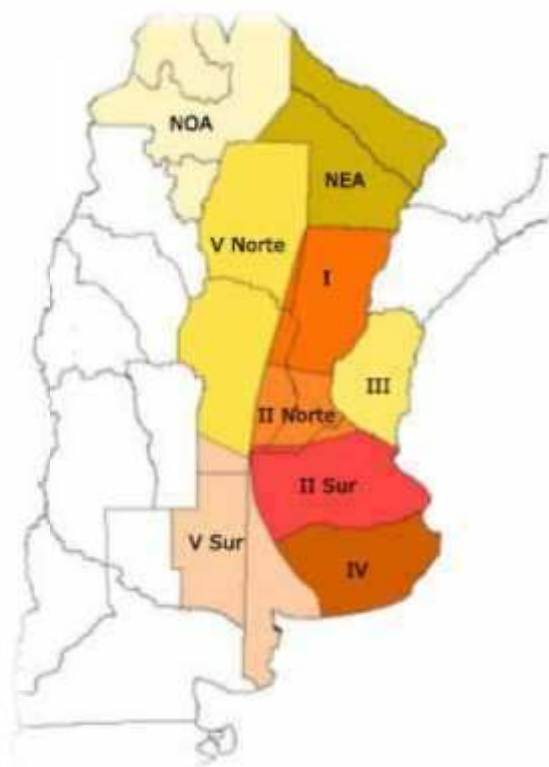


Figura 2. Región triguera Argentina

INTRODUCCION

En Argentina, la cosecha final de trigo 2011/12 fue de 13 millones de toneladas y se estimaron 9,5 millones para esta campaña. Con respecto al área sembrada se pasó de 4,6 millones de hectáreas en 2011/12 a unas escasas 3,6 millones en la actualidad, según datos de la Bolsa de Comercio de Rosario (BCR). En la cosecha de trigo 2012/13 se produjo una pérdida de 26,9% respecto a la cosecha de la campaña anterior, debido a la combinación entre el millón de hectáreas que se dejaron de sembrar y las lluvias que arruinaron el cultivo (Notiagropecuarias, 2013).

El patrón de lluvias sobre la región pampeana quedó muy por encima de los valores históricos. Las abundantes y frecuentes tormentas, acompañadas, en algunos casos, de fuertes vientos y granizo, ocasionaron recurrentes problemas en los lotes por excesos hídricos, entorpeciendo las labores de recolección. Por lo tanto, el ambiente siguió favoreciendo el desarrollo de las enfermedades foliares (mancha amarilla, roya y septoriosis) y fusariosis de la espiga que tuvo un alcance generalizado en estas provincias. El control de enfermedades se volvió muy difícil en estas condiciones y las enfermedades siguieron avanzando a pesar de los tratamientos.

Otro factor negativo fue que, cuando las lluvias comenzaron a espaciarse, hubo una importante ola de calor acompañada con vientos cálidos que acortaron el ciclo del cultivo. Este efecto de “arrebatación” se sumó al efecto de “lavado” y al daño causado por enfermedades fúngicas.

En la Región Pampeana fue muy frecuente observar lotes con anegamientos temporales que dejaron manchones que se “blanquearon”. Además, los fuertes vientos de las tormentas dejaron en su paso lotes que quedaron “revolcados”.

Finalmente, también se agregaron los efectos de las heladas en algunas zonas de Córdoba y Santa Fe.

La influencia del conjunto de estos factores se hizo evidente en los lotes de trigo recogidos en parte de la Región Pampeana, el grano mostró bajo peso hectolítrico y daño por *Fusarium* (Bolsa de Comercio de Rosario, 2013).

1.3 Fusariosis de la Espiga de trigo o Golpe Blanco

El trigo es susceptible a enfermedades, pudiendo ser afectado principalmente por bacterias, hongos, parásitos o por virus. Además puede sufrir el ataque de insectos en la raíz, y de plagas que afectan la hoja, y que finalmente afectarán el llenado del

INTRODUCCION

grano. En su almacenamiento, el grano de trigo también puede ser atacado por cuatro tipos de plagas: los insectos (principalmente gorgojos y polillas), los microorganismos (principalmente hongos y bacterias por efecto de la temperatura y la humedad), los roedores y los pájaros, cualquiera de ellos puede deteriorar el producto e impedir su consumo (Carrasco et al., 2009).

Una de las principales enfermedades del trigo es la “Fusariosis de la Espiga de Trigo” (FET) o “Golpe Blanco”, cuyo nombre se debe a la despigmentación de la espiga (figura 3).

La Fusariosis de la espiga de trigo (FET) es una de las enfermedades más devastadoras; es la que causa, a nivel mundial, mayores pérdidas económicas en trigo, cebada y otros granos (Ward et al., 2008). En los últimos años se han constatado brotes de esta enfermedad en América del Norte, Asia, Europa y América del Sur, por lo cual se la ha considerado una amenaza al suministro mundial de alimentos (Goswani y Kistler, 2004).

La Fusariosis de la espiga de trigo (FET) es una compleja enfermedad fúngica que afecta tanto al rendimiento y calidad de la producción de granos como a la salud humana y animal por acción de las micotoxinas asociadas (Schlatter, 2004). A diferencia de otras enfermedades que ocurren todos los años, la FET es esporádica y depende principalmente de factores climáticos, estando su desarrollo condicionado en cada campaña por la interacción entre éstos, y además depende de diversos factores como genotipo, fecha de siembra, labranza, fertilización y cultivo antecesor (Champeil et al., 2004; Subedi et al., 2007; Lori et al., 2009).

1.3.1 Agente Causal

Se han descrito varias especies de hongos pertenecientes al género *Fusarium* como posibles agentes etiológicos de la FET, entre las que se encuentran *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. pseudograminearum*, *F. crookwellense*, *F. poae*, *F. acuminatum* y *F. sporotrichioides* (Demeke et al., 2005). La severidad de la FET depende de las condiciones climáticas, agronómicas y factores genéticos. Las micotoxinas son algunos de los riesgos asumidos, que dependen de las condiciones climáticas. En efecto, la capacidad de los hongos para producir micotoxinas está

INTRODUCCION

influenciada en gran medida por la temperatura, la humedad, ataque de insectos, el estrés y las condiciones de las plantas (Miraglia et al, 2009).

La incidencia de la FET reduce el rendimiento del grano donde además se acumulan toxinas, principalmente tricotecenos, que contaminan los granos utilizados para el consumo convirtiéndolos en perjudiciales para la salud de los animales y seres humanos (Desjardins, 2006).

En Argentina, el principal patógeno asociado a la Fusariosis de la espiga (FET) es *F. graminearum* Schwabe, cuya etapa perfecta es *Gibberella zeae* (Schwein) Petch (Fernández Pinto et al., 2008, Ramírez et al., 2006; 2007, Lori et al., 2009, Álvarez et al., 2009) y ha sido aislado en el país desde 1928.

1.3.2 Síntomas de la Fusariosis de la Espiga de Trigo (FET)

Los primeros síntomas son pequeñas áreas pardo-oscuro en la base de las glumas. Cuando la infección ocurre en la base del raquis toda la espiga se pone blanca (figura 4). Los granos infectados o granos chuzos son ásperos y de coloración blanco rosada en la superficie (figura 5). La sintomatología aparece en plantas aisladas o en manchones, y dentro de la espiga, a la que puede atacar toda o a cada espiguilla por separado. La enfermedad se favorece con lluvias, temperatura media de 20 °C durante la floración y por el rastroy infectado de maíz o trigo en la superficie del suelo (Carrasco, 2009).

1.3.3 Ciclo de la enfermedad

El ciclo de vida de este patógeno se ilustra en la Figura 6. El hongo puede sobrevivir durante el invierno en el suelo o en residuos de cultivos anteriores (rastroy) en forma de clamidosporas o de micelio (Dill-Macky, 2010). El inóculo primario de la FET consiste principalmente en ascosporas producidas en peritecios, los que se forman sobre los rastroyos en primavera, cuando el clima es más cálido (en el hemisferio norte) (Dill-Macky y Jones, 2000; Wegulo et al., 2013) o luego de la cosecha (diciembre) o incluso inmediatamente antes de la cosecha (en años epidémicos) (Pereyra y Dill-Macky, 2008). Si bien las espigas de trigo son susceptibles a la infección desde su emergencia hasta la cosecha, la infección ocurre generalmente durante la antesis (Dill-Macky, 2010).

INTRODUCCION

Los síntomas se manifiestan de forma repentina, entre 2 a 4 días post infección. Lluvias abundantes, entre una a tres semanas preantesis, pueden conducir a brotes severos de la enfermedad (Wegulo et al., 2013). Las ascosporas y/o conidios son livianos y se dispersan ayudadas por el viento y la lluvia, incluso a grandes distancias. Una vez en la planta, las paredes pegajosas de las ascosporas de *F. graminearum* favorecen su adhesión a la pared celular de plantas, evitando su desplazamiento (Trail, 2009).

El modelo de colonización se basa en la entrada del patógeno a través de anteras expuestas, seguido por la penetración del ovario y las infecciones sucesivas de las brácteas florales (Pritsch et al., 2000). Luego de la entrada, las hifas del patógeno crecen subcuticularmente e intracelularmente colonizando rápidamente el tejido. Esto causa alteraciones que llevan a la muerte de las células (Jansen et al., 2005). A medida que *F. graminearum* esporula en las espiguillas infectadas, lo que se ve favorecido por clima cálido y húmedo, produce masas de esporas (macroconidios) de color rosa-anaranjado, cambiando la coloración de las espiguillas. A su vez puede ocurrir la infección de la base de la espiga (pedúnculo), lo que provoca una decoloración marrón-rojiza y lleva a la esterilidad de la espiga en su totalidad. Las espiguillas infectadas son estériles, y contienen granos color rosado. Sin embargo, los granos visualmente sanos también pueden estar infectados, especialmente si la infección ocurrió en etapas tardías del desarrollo del grano (Wegulo et al., 2013).

La acumulación en los granos de micotoxinas del grupo de Tricotecenos como el Deoxinivalenol, contribuye al daño de membrana plasmática, cloroplastos y ribosomas vegetales (Proctor et al., 1995), además de desencadenar la producción de peróxido de hidrógeno, lo que causa muerte celular y necrosis del tejido (Bushnell et al., 2003; Desmond et al., 2008).

1.3.4 Daños causados por la Fusariosis de la Espiga de Trigo (FET)

La enfermedad es el resultado de la acción individual o combinada de diferentes mecanismos de patogénesis, como la producción y liberación de enzimas extracelulares que degradan los principales constituyentes de la pared celular y permiten la colonización de los tejidos (Martínez et al., 1991; Alconada, 1993; Alconada y Martínez, 1994; 1996; Kikot et al., 2009; 2010).

INTRODUCCION

Entre las principales actividades enzimáticas implicadas en la degradación de la pared celular se encuentran las pectinasas, celulasas y hemicelulasas (De Lorenzo et al., 1997). A las pérdidas en rendimiento como consecuencia de la reducción del número, tamaño y peso de los granos (Bai et al., 2001; Snijders, 2004), se suma la capacidad de este patógeno para producir daños a nivel de calidad de los granos (Sologuk, 2005). El daño observado se debe tanto a las enzimas que degradan sus paredes celulares, sus sustancias de reserva, como a la presencia de micotoxinas. Los granos pierden valor comercial, al resultar alteradas sus proteínas, lípidos y otras reservas, lo cual disminuye su valor nutricional y digestibilidad. Como resultado de este daño, existe rechazo de la materia prima o productos elaborados por países importadores (Lazzari, 2000).

Los efectos tóxicos en animales y humanos dependen de la vía de administración y del tipo de exposición, distinguiéndose efectos agudos y crónicos. En general, los síntomas de intoxicación aguda por ingestión de alimento contaminado en animales de granja incluyen rechazo a alimentos, pérdida de peso, vómitos y diarrea (Eriksen y Pettersson, 2004).

En el caso de humanos los síntomas son similares con aparición de cuadros de gastroenteritis con náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal y fiebre (Pestka, 2010). A su vez, la ingesta crónica de pequeñas cantidades de tricotecenos puede llevar a inmunodepresión, anemia, anorexia y trastornos nerviosos y endócrinos (Pestka, 2007). En humanos la ingesta crónica ha provocado la aparición del síndrome llamado aleukia tóxica alimentaria, que se caracteriza por una leucopenia que puede llevar a la muerte (Wannemacher y Wiener, 1997).

Las micotoxinas del grupo de los Tricotecenos han demostrado además, efectos tóxicos a nivel dérmico pudiendo causar inflamación y necrosis cutánea y a nivel ocular pudiendo provocar daño en la córnea (Wannemacher y Wiener, 1997). Se ha constatado que a nivel celular su efecto tóxico se basa en la inhibición de la síntesis proteica y de ácidos nucleicos, y en la alteración estructural a nivel de membrana celular y mitocondria (Arunachalam y Doohan, 2012), así como su rol en la inducción de apoptosis celular (Yang et al., 2000).

INTRODUCCION



Figura 3. Despigmentación de la espiga (Carmona et al., 2012).



Figura 4. Infección en base del raquis de espiga (Carmona et al., 2012).



Figura 5. Granos de trigo afectados por FET.

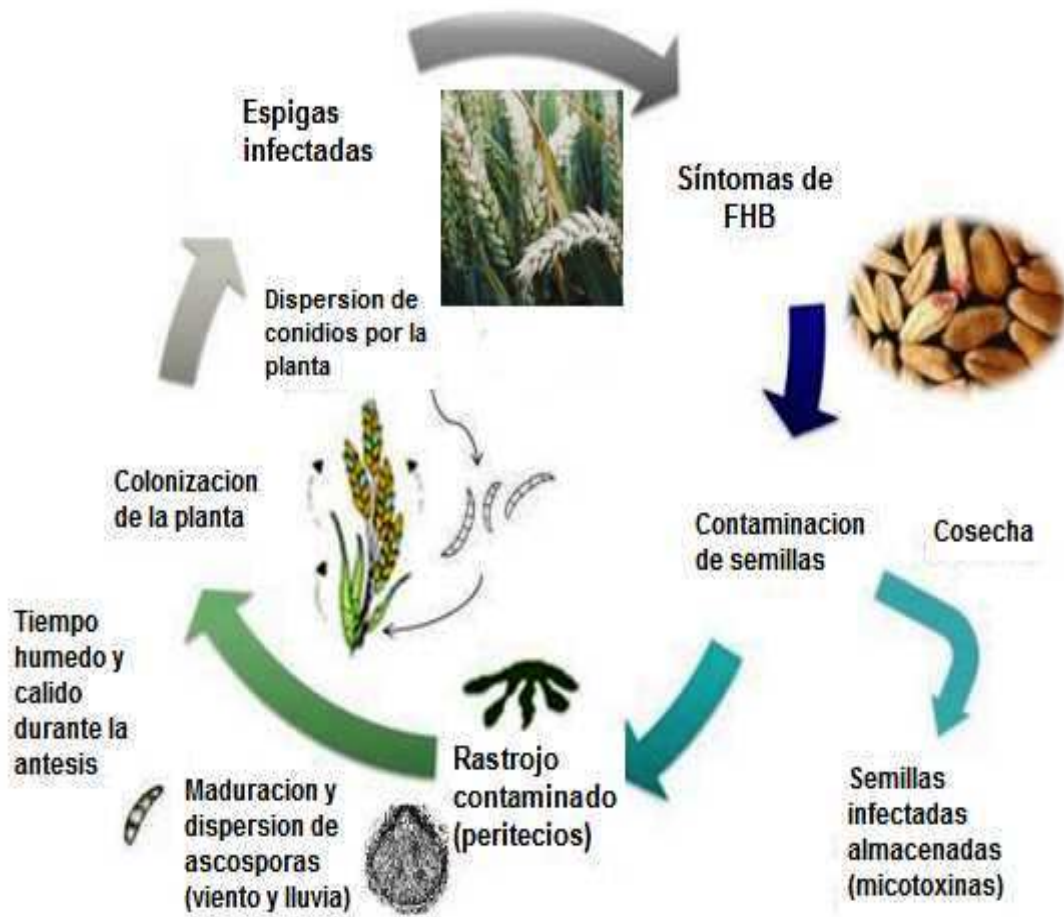


Figura 6. Ciclo de infección de plantas de trigo por *Fusarium graminearum* (Trail, 2009).

1.3.5 Control integrado de la enfermedad

La complejidad de la FET impone el uso de múltiples estrategias integradas de manejo de la enfermedad. Bai y Shaner (2004) consideraron que la utilización de cultivares de trigo resistentes es crucial para reducir daños de la FET, en un enfoque integrado. El cultivar de origen chino Sumai 3 y sus derivados proveen actualmente el máximo grado de resistencia a la propagación de la enfermedad. A la fecha no están disponibles cultivares de trigo altamente resistentes a la enfermedad o tolerantes a las micotoxinas (Goswami y Kistler 2004). Este hecho se explica en la complejidad de la herencia de la resistencia, la pobre aptitud agronómica y la baja calidad de las principales fuentes de resistencia (Galich, 2004). La imposibilidad de un control adecuado de la FET por medio de la rotación de cultivos (control cultural) se fundamenta en la marcada ubicuidad de las especies del género *Fusarium*, su amplia gama de hospedantes y la alta diseminación anemófila de las esporas, que pueden ser transportadas desde fuentes distantes (Reis y Carmona 2002; Saharan et al., 2004).

Schaafsma et al. (2001) en Ontario (Canadá) encontraron que sólo el 27% de la variación del contenido de la micotoxina Deoxinivalenol (DON) ligada a *Fusarium* spp. se asoció a los cultivares, no habiendo detectado efectos por sistemas de labranza y tipo de fertilización nitrogenada (observaciones de 3 años en condiciones naturales de campo).

En Argentina, Lori et al. (2009) concluyeron que las condiciones meteorológicas imperantes en 3 años sucesivos de ensayos de trigo fueron cruciales para explicar las variaciones en los niveles observados de la FET, comparado con el efecto de sistemas de labranza y otras prácticas agronómicas.

En relación al control químico, Bai y Shaner (2004) sostienen que los fungicidas pueden ser útiles cuando las condiciones meteorológicas u otras asociadas a prácticas de cultivo son particularmente favorables para el desarrollo epidémico. Los fungicidas aplicados en antesis pueden ayudar a prevenir pérdidas económicas pero su eficacia depende del momento de aplicación y tecnología para lograr una buena cobertura de la espiga (Del Ponte et al., 2004). Las infecciones establecidas no pueden ser revertidas con los fungicidas actuales (principalmente bencimidazoles y triazoles o sus mezclas), razón por la cual, las aplicaciones deben realizarse en forma preventiva (antes que ocurran) o semi-preventivas (máximo 2 a 3 días posteriores al evento

INTRODUCCION

infectivo). En este último caso pueden darse limitaciones de “piso” para que opere una máquina aplicadora terrestre, normalmente más eficiente que los tratamientos con aviones (Annone, 2003).

1.3.6 Condiciones ambientales predisponentes a la Fusariosis de la espiga (FET)

Para que se presente la FET, es importante que al momento de mayor susceptibilidad de los cultivos (floración en trigo/espigazon en cebada – llenado del grano) ocurran las condiciones climáticas que favorecen la infección y el desarrollo de la enfermedad. Espigas mojadas durante dos a tres días y temperaturas entre 10 °C y 30 °C, con óptimo en el entorno de los 25 °C, son suficientes para producir infección (Diaz et al., 2002).

Las condiciones climáticas inciden en tres fases sobre esta enfermedad:

- En el periodo pre-espigazon, donde inciden en la producción y maduración de las ascosporas.
- En el periodo espigazon-floración y primeras etapas de llenado del grano, donde inciden en la infección
- En el periodo post-infección, donde las condiciones influyen en el desarrollo de la enfermedad.

Las epidemias severas se producen cuando el estado de floración y primeras etapas de formación del grano coinciden con períodos de precipitación frecuente, elevada y continua HR, superior a 80% y temperaturas entre 20–30°C. En condiciones óptimas de temperatura y HR continua (25°C y >90% respectivamente), el período de incubación se reduce a solo dos días, incrementándose este período a medida que las temperaturas se alejan de la óptima.

1.3.7 Estimación de disminución del rendimiento debido a FET

La incidencia de esta enfermedad ha sido informada en todas las regiones del mundo de clima templado caliente, húmedo o semi-húmedo, donde se cultivan cereales de invierno y principalmente en las regiones donde las precipitaciones son elevadas durante la floración (Carranza, 1961; Reis et al., 1988,1995; Parry et al., 1995; Reis y Carmona, 2002).

INTRODUCCION

La Fusariosis de la espiga de trigo (FET) está presente en la mayor parte de la franja húmeda de la región triguera Argentina, con estimaciones de mermas en los rendimientos según los años del 20 al 70%. En Argentina, las regiones húmedas de la región cerealera reúnen las condiciones que más predisponen a la ocurrencia de la enfermedad. El Norte y sudeste de Buenos Aires, sur de Santa Fe, sudeste de Córdoba y la provincia de Entre Ríos son las zonas más afectadas.

En Argentina las epidemias severas se han registrado en la región Pampeana Central en 1967, 1977, 1978, 1985, 1993 y 2001 (Moschini y Fortugno, 1996) y en Entre Ríos durante los años 1993, 2000 y 2001/02 (Formento, 2003). Estimaciones de mermas en el rendimiento indican disminuciones en el Norte de Buenos Aires y Sur de Santa Fe de un 30% en 1978. Durante ese año, las pérdidas ocasionadas en el Sur de Córdoba fueron evaluadas en 10% (Galich, 1989; Annone et al., 1994). Durante la epidemia de 1985, los trigos candeales, sufrieron una pérdida de hasta 70%, hecho que produjo una marcada reducción del área sembrada con ese cultivo (Kohli, 1995). En 1993 la FET causó una pérdida promedio del orden del 20% de producción en el área Centro-Norte (Pioli, 1993; Annone et al., 1994) y hasta un 30% en la zona Sur de Santa Fe y Norte de Buenos Aires. En el Sudeste de Córdoba se estimaron pérdidas en promedio del 8% en el año 1997, del 10% en el año 2000 y, en 2001 en algunos lotes se estimaron pérdidas cercanas al 40% (Galich, 2002).

Durante el año 2001, se observaron síntomas severos tempranos en la región de cultivo de trigo del sudeste argentino (Sur de Buenos Aires y la provincia de La Pampa) y también se registraron informes de infecciones graves de FET en la zona centro-norte (sudeste de Córdoba, el sur de Santa Fe y norte de Buenos Aires) (Carranza et al., 2008).

En el año 2007 la enfermedad revistió importancia en las provincias de Entre Ríos y Santa Fe, aunque los ataques registrados, incluso sobre cultivares que se mostraron susceptibles, no llegaron a provocar pérdidas en el rendimiento (Formento y Souza, 2008).

Respecto a la calidad de la campaña 2010/11 en la región triguera del país, se pudo concluir que la calidad comercial fue muy buena, con excelentes valores (Cuniberti, 2011).

INTRODUCCION

En la campaña 2012/2013 se dieron condiciones ambientales altamente favorables para el desarrollo de la FET, situación que derivó en cultivos de trigo muy afectados con mermas importantes en producción y de impacto directo sobre la calidad comercial. La magnitud de la infecciones por FET en la campaña 2012/2013 tuvieron carácter de moderadas a severas, reflejado en los valores de severidad y pérdidas de rendimiento estimadas superiores a 50% en cultivares susceptibles (Alberione et al., 2012).

En la campaña 2012/13, la Figura 7 permite visualizar niveles epidémicos muy severos en el cuadrante NE de la región pampeana. Incidencias de la FET de hasta 100% se concentraron en el centro-oeste de Entre Ríos, sectores de Santa Fe (centro en Oliveros) y el área ribereña del extremo NE de Buenos Aires (San Pedro) (estimaciones confirmadas por observaciones de referentes locales de INTA: N. Formento; J. Castellarín, F. Ferraguti; L. Couretot; F. Jecke). En todo el sector triguero del sur de la provincia de Buenos Aires y SE de La Pampa, para las tres fechas de espigazón, se estimó un nivel de incidencia de la FET ligero a nulo (valores de incidencia <20%) (Moschini et al., 2012).

Para la FET, conocer las condiciones ambientales es de fundamental importancia ya que es el protagonista directo más relacionado con la severidad de la enfermedad. Para estimar los valores de la enfermedad existen modelos que han sido desarrollados en Argentina por Moschini y Fortugno (1996) y Moschini et al. (2002, 2008).

El uso combinado de sistemas de pronóstico de la FET y de pronósticos meteorológicos específicos puede ayudar a establecer la ocurrencia de eventos infectivos severos en tiempo real y/o anticipadamente. Los estudios en la escala sinóptica se conducen con la idea de aportar nuevos elementos a la toma de decisión respecto al control químico. Asimismo, la identificación y cuantificación del efecto de múltiples predictores meteorológicos de escala hemisférica (fenómeno El Niño-Oscilación del Sur; Oscilación Antártica y otros) sobre la variabilidad espacio-temporal epidémica es de utilidad para la elaboración de pronósticos estacionales de la intensidad esperada de la FET con antelación al período susceptible del cultivo y/o momento de posible control químico.

Estos elementos permiten establecer en cada estación meteorológica el grado de riesgo de la FET, categorizarlo en alto (rojo), moderado (amarillo) o bajo (verde) y

INTRODUCCION

mapearlo. Los mapas y comentarios son volcados en la página del Instituto de Clima y Agua (<http://climayagua.inta.gov.ar>). En la campaña 2012/13, para el centro-norte de la región pampeana, se dieron alarmas rojas en los primeros días de octubre, por la ocurrencia de eventos infectivos severos de la FET.

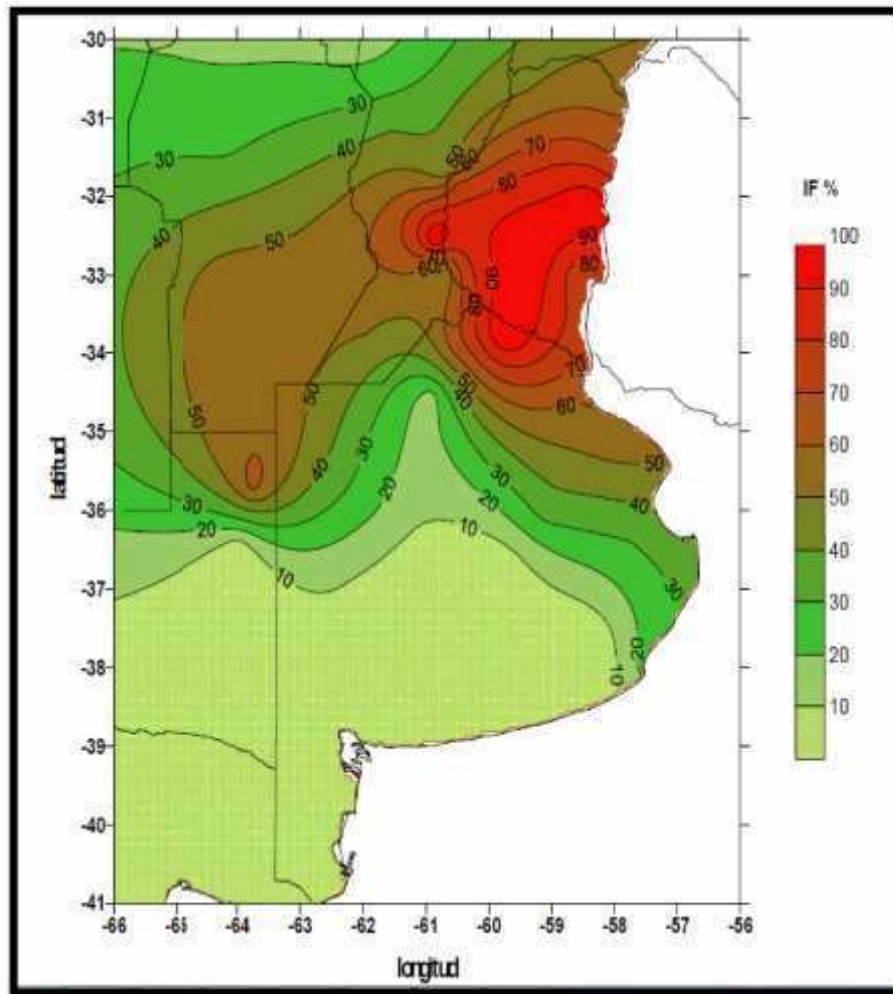


Figura 7. Distribución espacial de la incidencia de la FET. Campaña 2012/13 (Moschini et al., 2012)

1.4 Clasificación de especies dentro del género *Fusarium*.

El género *Fusarium* fue descrito por primera vez en 1809 por Link, quien lo definió como especies de forma hialina, con esporas no septadas que nacían en un estroma, con forma de canoa o banana, el cual era el carácter primario distintivo. Dicha descripción se hizo basándose en las observaciones de *F. roseum*, primera especie

INTRODUCCION

descrita, y debido a su falta de especificidad, se podría aplicar al menos a 50 géneros de Hiphomycetes (Marasas et al., 1984; Nelson et al., 1994). Es por ello que la definición original ha sufrido una serie de modificaciones quedando como: “especies con macroconidios fusoides, ligeramente curvados, septados y con una célula basal pedicelada. Con microconidios y clamidosporas terminales o intercalares, que pueden estar ausentes o presentes” (Nelson et al., 1994).

El género *Fusarium* según la clasificación de Nelson et al., 1994 comprende 70 especies, que a su vez están agrupadas en 12 secciones. Cada sección es en realidad un conjunto de especies relacionadas entre sí. Más de la mitad de las especies son parasitas de plantas y entre ellos se encuentran algunos de los más serios patógenos del mundo agrícola (Leslie y Summerell, 2006).

Según De Hoog et al., (2000) y Leslie y Summerell, (2006), la clasificación de *Fusarium* se ubica en:

División	Ascomycota
Subdivisión	Pezizomycotina
Clase	Sordariomycetes
Subclase	Hypocreomycetidae
Orden	Hipocreales
Familia	Hypocreaceae
Genero	<i>Fusarium</i>

Algunas especies tienen un estado sexual reconocido dentro de la familia Nectriaceae y pertenecen al género *Gibberella* o *Nectria*.

1.4.1 Características morfológicas de las especies del género *Fusarium*

Las características morfológicas son el criterio más comúnmente utilizado para la identificación de las especies de *Fusarium*. Estas pueden producir tres tipos de esporas llamadas macroconidios, microconidios, y clamidosporas. Algunas especies producen los tres tipos de esporas, mientras que otras especies no lo hacen (Nelson et al., 1994).

INTRODUCCION

- **Macroconidios:** Es el órgano principal para la caracterización no sólo de la especie, sino también del género *Fusarium*; su forma y tamaño varía según la especie (figura 8). Este se puede formar en una estructura especializada llamada esporodoquio, como también en monofialides, polifialides (figura 9) y en el micelio aéreo. Para algunas especies es una característica relativamente constante y estable, pero se debe usar cautelosamente como criterio taxonómico. La presencia de una célula basal con forma de pie en los macroconidios se considera característica del género *Fusarium*, pero varios géneros de Coelomycetes también la tienen (Nelson et al., 1983; Seifert, 2001; Samson et al., 2004; Leslie y Summerell, 2006).
- **Microconidios:** La presencia o ausencia de los microconidios es una característica principal en la taxonomía de *Fusarium*. Si el microconidio está presente, las características consideradas son: forma, modo de formación, si está solo, en falsas cabezas, en cabezas o en cadenas (figura 10). Estos se forman en el micelio aéreo a partir de monofialides o polifialides pero no en el esporodoquio. Se pueden ver aislados, en masas o en cadenas (figura 11) (Samson et al., 2004; Leslie y Summerell, 2006).
- **Clamidosporas:** La presencia o ausencia de clamidosporas es una característica principal en la taxonomía de *Fusarium*. Si están presentes, pueden estar solas, en pares, en grupos, o en cadenas. Su pared puede ser gruesa, rugosa o lisa (figura 12). Son esporas de supervivencia ante ambientes adversos que garantizan la propagación y supervivencia del hongo (Samson et al., 2004; Leslie y Summerell, 2006).
- **Conidióforos:** Contienen el microconidio. Son de carácter taxonómico primario y dependiendo de la especie, se pueden encontrar en monofialides o contener monofialides y polifialides produciendo microconidios (figura 11) (Samson et al., 2004; Leslie y Summerell, 2006).
- **Esporodoquios:** Son masas de conidióforos cortos y estrechamente ramificados que nacen directamente de una maraña de hifas (figura 13). Se producen más frecuentemente en la naturaleza que en los cultivos de laboratorio (Samson et al., 2004; Leslie y Summerell, 2006).

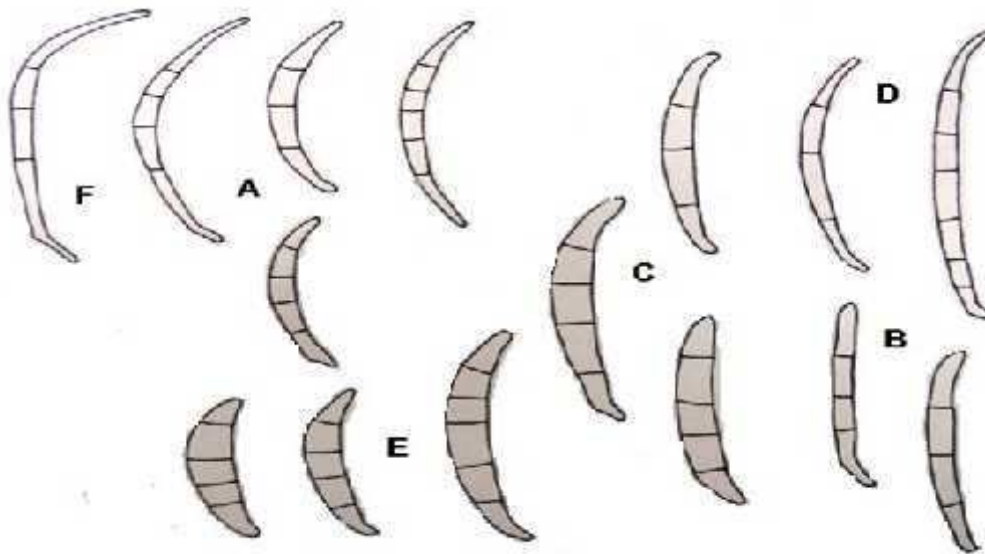


Figura 8. Formas de macroconidios de varias especies de *Fusarium*: A) encorvada; B) paredes paralelas más o menos recta, delgada; C) paredes más o menos paralelas, rectas o curvadas suavemente; D) paredes más o menos paralelas y delgadas; E) célula apical contundente, a menudo carecen de una célula pie bien definida; F) célula apical extendida y célula pie alargada (Samson et al., 2004).

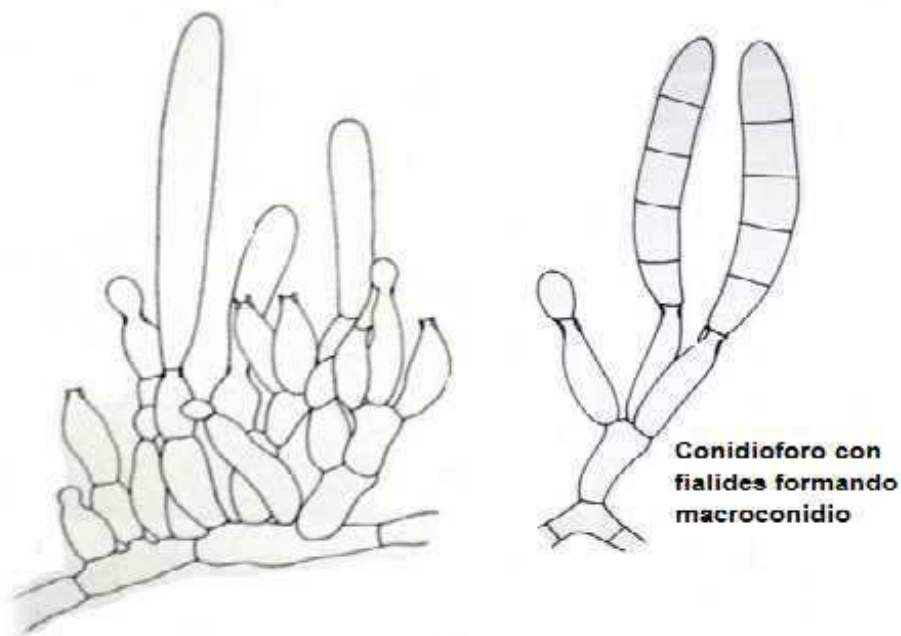


Figura 9. Formación de macroconidio (Samson et al., 2004).

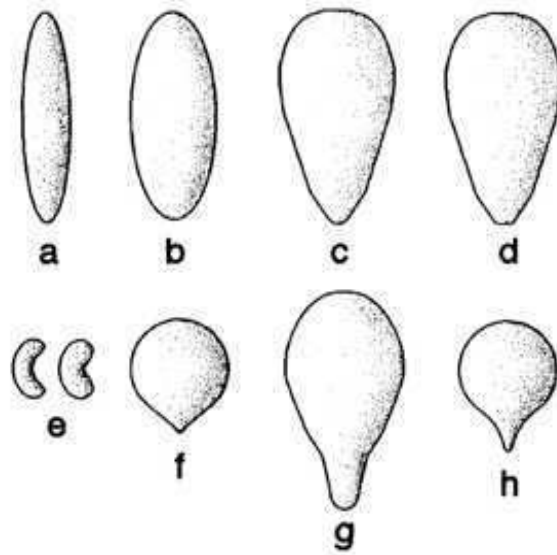


Figura 10. Formas de microconidios de varias especies de *Fusarium*: a) fusiforme; b) ovalada; c) ovoide; d) ovoide con una base truncada, lo que indica que los microconidios se formaron en cadena; e) alantoides; f) napiforme; g) piriforme; h) cornetes (Nelson et al., 1994).

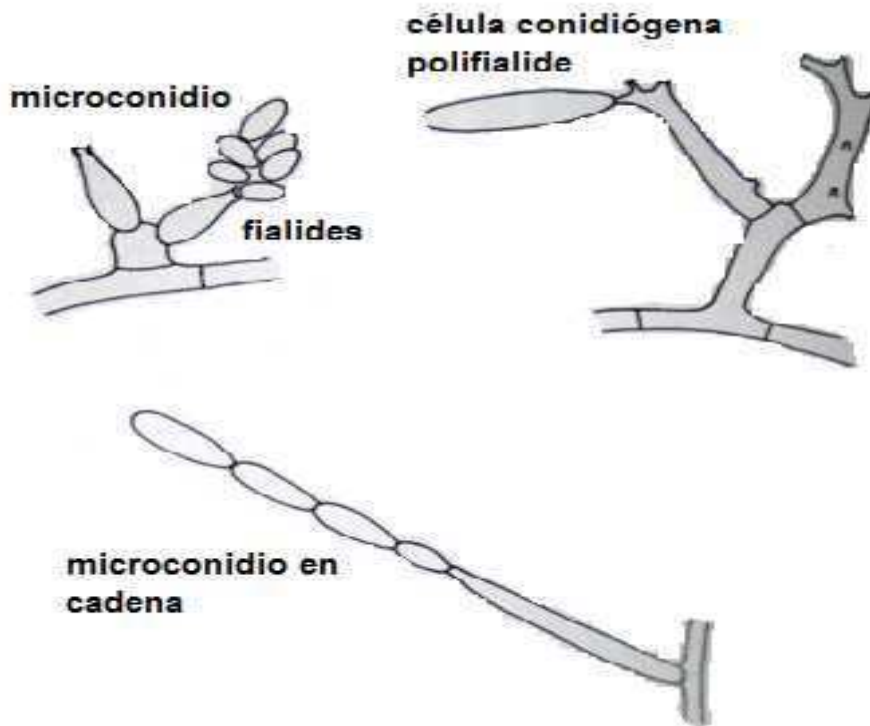


Figura 11. Modo de formación de microconidio (Samson et al., 2004).

INTRODUCCION

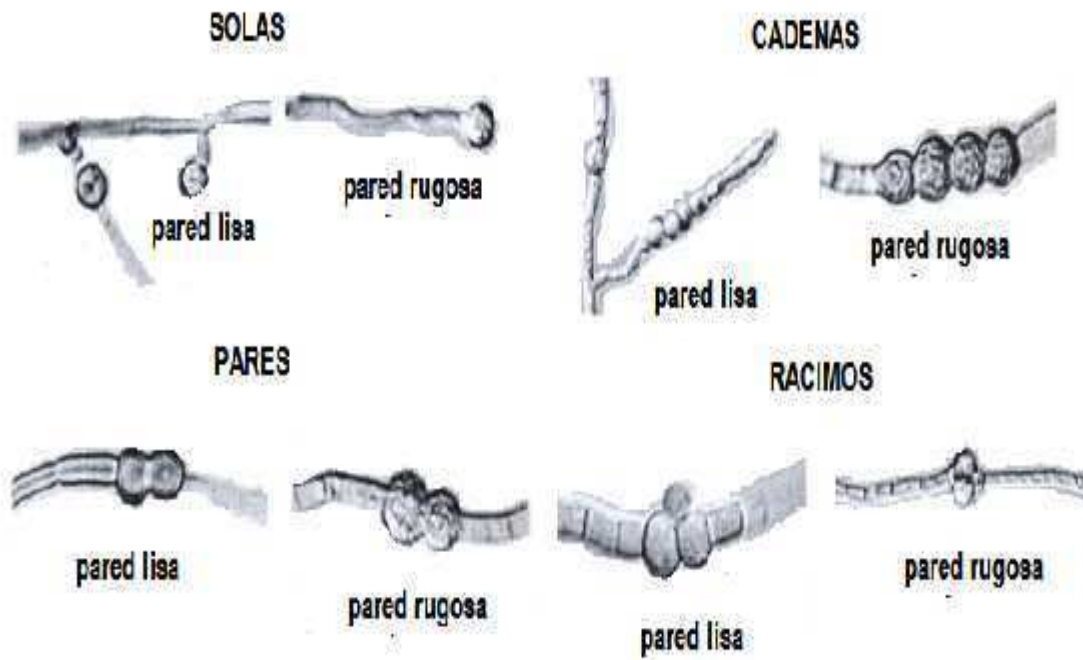


Figura 12. Forma en que se presentan las Clamidosporas (Leslie y Summerell, 2006).

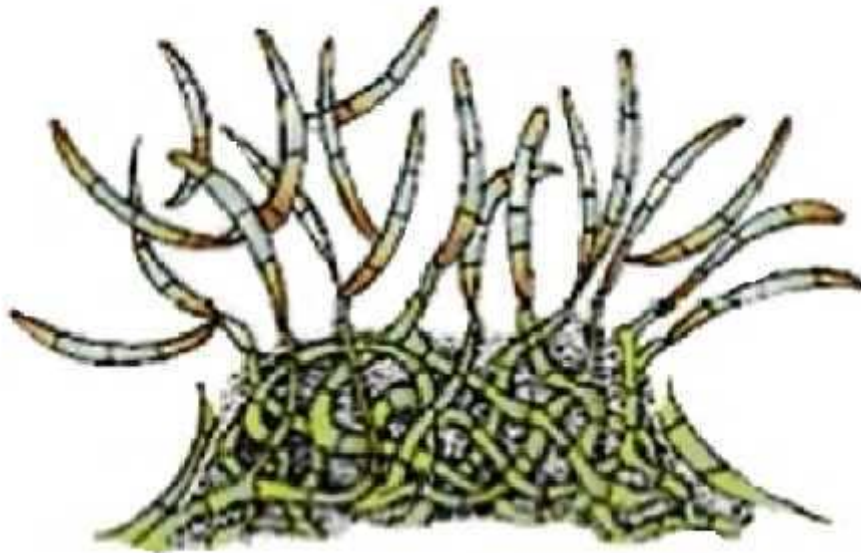


Figura 13. Esporodocio. (http://146.83.42.4/tics22012/172685323/reino_fungi.html)

1.4.2 Características morfológicas: *Fusarium graminearum* Schwabe

Fusarium graminearum Schwabe (Teleomorfo *Gibberella zeae*) es una especie cosmopolita y presenta una amplia gama de hospedantes. Las principales especies de interés económico susceptibles son: trigo, cebada, avena, centeno, maíz, trébol, alfalfa, batata y arroz (Leslie y Summerell, 2006).

Las principales características que presenta esta especie son: esporodocios a menudo escasos pero si están presentes son de color naranja pálido y pueden estar ocultos bajo el micelio. El macroconidio es relativamente delgado en forma de hoz de 2,5 x 35-63 μm , puede contener entre 5 a 6 septos, se caracterizan por presentar una célula basal con forma de pie bien desarrollada (figura 14). Las clamidosporas son globosas, midiendo entre 10 a 12 μm de diámetro, pueden ser simples o en cadena. Microconidios ausentes. Es un hongo homotálico (el único dentro de este género) y sus peritecios son gregarios y de coloración púrpura oscuro a negro. Se forman a partir de un estroma de forma ovoide, papilado, con diámetro de 150-350 μm ; la temperatura para que se forme esta estructura está entre 5-35 $^{\circ}\text{C}$, presentando un óptimo de 29 $^{\circ}\text{C}$, requiere alta humedad relativa e incidencia de luz ultravioleta. Las ascas pueden contener 8 esporas hialinas. Estas esporas miden 3,5 x 17-25 μm , presentan de 0 a 4 septos, normalmente de 4 células. El teleomorfo de esta especie es *Gibberella zeae* (Marasas et al., 1984; Desjardins, 2006; Leslie y Summerell, 2006).

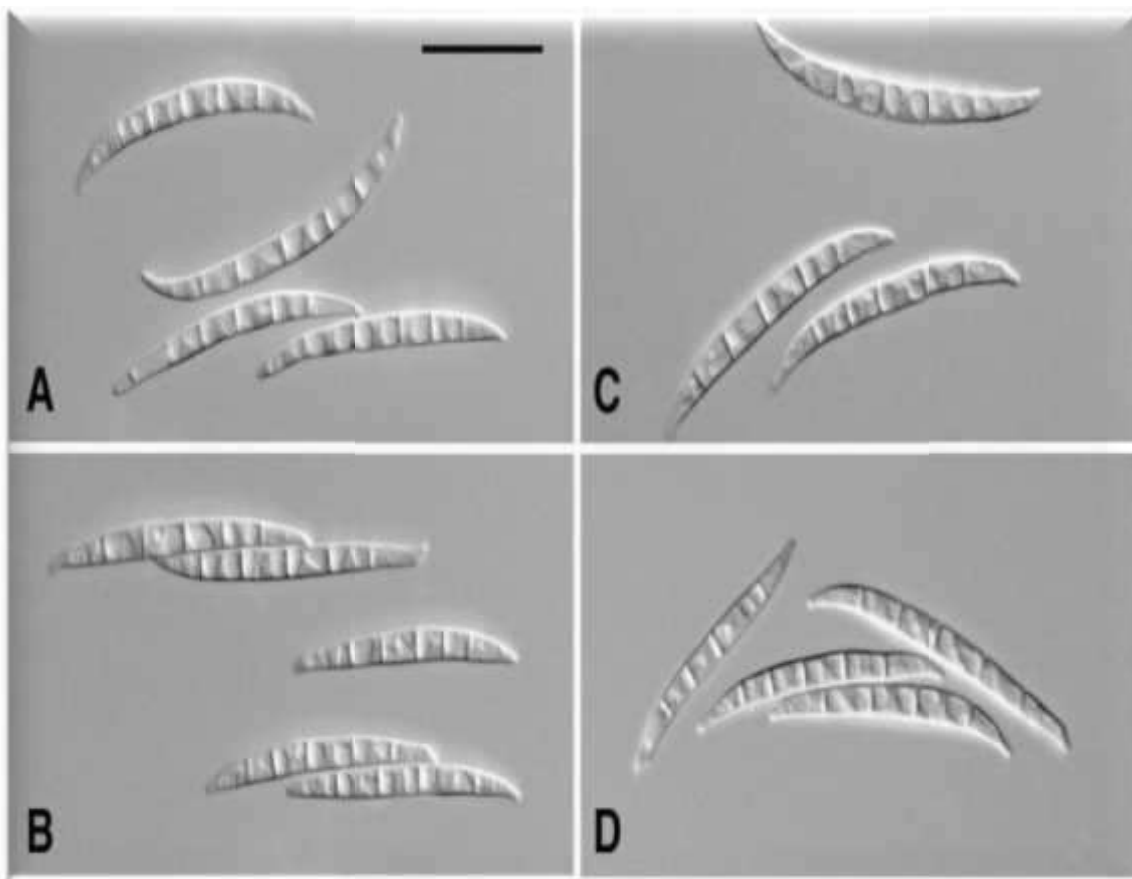


Figura 14. *Fusarium graminearum*. A – D: Macroconidios. Barra de escala = 25 μ m.
(Leslie y Summerell 2006).

1.4.3. Complejo *Fusarium graminearum* (Complejo Fg)

Tradicionalmente se ha utilizado el concepto morfológico y biológico de especie para asignar la especie a aislamientos de *Fusarium*. Actualmente, *Fusarium graminearum* es considerado como un complejo formado por 11 especies definidas por la secuenciación de genes nucleares y de apareamiento; con ciertas diferencias en el ancho y largo de los macroconidios (O'Donnell et al., 2004; Starkey et al., 2007).

En el año 2000, O'Donnell y colaboradores seleccionaron aislamientos de los 5 continentes que representaban la diversidad genética global de *Fusarium graminearum*, y la genealogía resultante de la secuenciación de 6 genes revelaba la misma topología en el árbol producido por cada gen, formándose 7 linajes o clados biogeográficamente estructurados. Posteriormente, Ward et al. (2002) agregaron un octavo linaje, *Fusarium cortaderiae*. Luego, empleando la concordancia filogenética para el reconocimiento de especies (Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition, GCPSR) y, agregando otros genes tanto estructurales como nucleares que totalizaban 13,6 kb, corroboraron los linajes previamente designados y éstos fueron descritos como especies dentro del complejo *Fusarium graminearum* (complejo Fg), reteniendo el nombre de *Fusarium graminearum sensu stricto* (linaje 7) para la especie más comúnmente asociada con la Fusariosis. También describieron otra especie (*Fusarium brasilicum*, Linaje 9) (O'Donnell et al., 2004). Estos linajes/especies provienen de distintas regiones del mundo: linajes 1 a 5 provienen del Hemisferio Sur; dos de América, *Fusarium austroamericanum* (Linaje 1) y *Fusarium mesoamericanum* (Linaje 4) y 3 de África que son *Fusarium meridionale* (Linaje 2), *Fusarium boothii* (Linaje 3) y *Fusarium acaciae-mearnsii* (Linaje 5). Los linajes 6 (*Fusarium asiaticum*) y 7 (*Fusarium graminearum*) provienen del Hemisferio Norte, con el linaje 6 restringido a Asia (Japón). Recientemente, fueron descritas dos nuevas especies dentro del complejo Fg: *Fusarium vorosii* y *Fusarium gerlachii* (Starkey et al., 2007). Al menos 4 de estas especies pueden causar típicos síntomas de Fusariosis en trigo; pero es *Fusarium graminearum sensu stricto* (s.s.) la especie más ampliamente difundida.

Las especies contenidas dentro del complejo Fg se encuentran en la Tabla 2.

Tabla 2. Especies dentro del complejo *Fusarium graminearum*.

Especie	Designación previa de linaje	Autores de la especie
<i>Fusarium brasilicum</i>	No posee	Aoki, Kistler, Geiser y O'Donnell
<i>Fusarium austroamericanum</i>	1	Aoki, Kistler, Geiser y O'Donnell
<i>Fusarium meridionale</i>	2	Aoki, Kistler, Geiser y O'Donnell
<i>Fusarium boothi</i>	3	O'Donnell, Aoki, Kistler y Geiser
<i>Fusarium mesoamericanum</i>	4	Aoki, Kistler, Geiser y O'Donnell
<i>Fusarium acacia-mearnsii</i>	5	O'Donnell, Aoki, Kistler y Geiser
<i>Fusarium asiaticum</i>	6	O'Donnell, Aoki, Kistler y Geiser
<i>Fusarium graminearum</i>	7	Schwabe
<i>Fusarium cortaderiae</i>	8	O'Donnell, Aoki, Kistler y Geiser
<i>Fusarium vorosii</i>	No posee	Tóth, Starkey, O'Donnell, Suga y Aoki
<i>Fusarium gerlachii</i>	No posee	Aoki, Starkey, Gale, Kistler y O'Donnell

F. asiaticum es el agente de la Fusariosis de la espiga más común en ciertas regiones de China y de Asia. *F. graminearum* s.s parecería ser el más difundido a nivel global, predomina en Norteamérica (Goswami y Kistler, 2004; O'Donnell et al, 2004) y en Europa (Láday et al., 2004). Con respecto a Sudamérica, Zeller et al. (2003) encontraron que en el Sur de Brasil y en Uruguay las poblaciones de *F. graminearum* aisladas de trigo y sorgo incluían las especies: *F. graminearum* s.s., *F. meridionale* y *F. asiaticum*.

Estudios en Norte y Sudamérica han demostrado que *F. graminearum* s.s, anteriormente conocido como linaje 7, parece ser la especie dominante asociada con la espiga de trigo y cebada (Ward et al., 2008; Álvarez et al., 2011; Schmale et al., 2011; Astolfi et al., 2012).

1.4.4 Diversidad genotípica en *Fusarium graminearum*

Poblaciones de *Fusarium graminearum* de trigo en Argentina presentan una gran diversidad a nivel genético y pertenecen a *F. graminearum* s.s. Estas poblaciones pueden ser parte de un apareamiento al azar, o de una población más grande con intercambio genético significativo que probablemente se produce entre las diversas sub-poblaciones (Ramírez et al., 2006, 2007, Álvarez et al., 2011).

La estructura de la población de *F. graminearum* en Sudamérica es poco conocida en comparación con otras regiones de producción. La caracterización de quimiotipo y genotipo de tricotecenos se ha utilizado para clasificar a *F. graminearum* por su potencial toxicogénico.

Un genotipo es una secuencia de ADN o una constitución genética y un quimiotipo es la caracterización de un aislamiento de acuerdo al patrón de producción de metabolitos secundarios determinado por métodos químicos. El término quimiotipo debe ser usado solo cuando el fenotipo químico se expresa y es detectado por análisis químicos porque la detección de un dado genotipo de tricotecenos no siempre predice correctamente la presencia de los correspondientes metabolitos (Desjardins, 2008).

Se han utilizado análisis químicos realizados por métodos cromatográficos para determinar el quimiotipo de las cepas autóctonas de *F. graminearum* (Faifer et al., 1990; Lori et al., 1992; Ramírez et al., 2006; Fernández Pinto et al., 2008; Álvarez et al. 2009, Sampietro et al., 2011) mientras que los métodos moleculares basados en el polimorfismo de los genes codificantes e intrones (tal como *Tri3*, *Tri7*, *Tri12* y *Tri13*) de la vía de biosíntesis de tricotecenos (cluster *Tri*) se han utilizado para determinar el genotipo de las cepas (Reynoso et al., 2011; Sampietro et al., 2011).

La diversidad genética en las poblaciones de *F. graminearum* a nivel global se ha evaluado con distintos marcadores moleculares incluyendo los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (Amplified fragment length polymorphism, AFLPs) (Zeller et al., 2003, 2004; Schmale et al., 2006; Ramírez et al., 2007; Lee et al., 2009). La amplificación aleatoria de ADN polimórfico (Random Amplification of Polymorphic DNA, RAPDs) (Ouellet y Seifert 1993; Dusabenyagasani et al., 1999; Fernando et al., 2006), los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLPs) (Gale et al., 2002; Toth et al., 2005), el número variable de repeticiones en tándem (Variable Number of Tandem Repeats,

INTRODUCCION

VNTR) (Zhang et al., 2010 a,b, 2012; Sampietro et al., 2011). Prácticamente todos los estudios han identificado altos niveles de diversidad genética.

Una población de 113 cepas aisladas de *F. graminearum* de San Antonio de Areco y de Alberti, dos localidades de la principal zona de cultivo de trigo de Argentina, se evaluó usando marcadores AFLP (Ramírez et al., 2007). Los 113 aislados tenían perfiles AFLP típicos de *F. graminearum* s.s.

Otro estudio empleando análisis de: AFLP y secuencia del factor de elongación de la traducción 1- y genes -tubulina, para evaluar la identidad de la especie y la diversidad genética, se hizo con 183 cepas aisladas de lugares diferentes que abarcaron una muy amplia zona de la región productora de trigo en Argentina. Estos estudios confirmaron que aunque *F. graminearum sensu stricto* es la especie predominante en el área triguera de Argentina, la población estudiada presenta un alto nivel de diversidad genética (Álvarez et al. 2011).

1.5 Micotoxinas más frecuentes producidas por *Fusarium*

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de origen fúngico que en pequeñas concentraciones resultan tóxicos para vertebrados y otros animales (Frisvad y Thrane, 1996). Las enfermedades que producen se denominan “micotoxicosis” que afectan al hombre y a diferentes especies de animales.

Las micotoxinas producidas por los hongos del género *Fusarium* son un grupo diverso, dentro del cual se incluyen más de 140 metabolitos secundarios (Sobrova et al., 2010). Dada su toxicidad y la alta frecuencia de aparición de hongos productores de las mismas, principalmente en cereales y productos derivados de éstos (Yazar y Omurtag, 2008), son consideradas un riesgo importante para la salud tanto animal como humana (Sobrova et al., 2010).

Dentro de las micotoxinas producidas por hongos de este género, se destacan los Tricotecenos, por su frecuencia de aparición en trigo y otros cereales de consumo masivo. Este grupo de toxinas se puede dividir en cuatro subgrupos (A, B, C y D) según su estructura química, de los cuales los de mayor toxicidad y frecuencia de aparición pertenecen a los grupos A y B. Los Tricotecenos se caracterizan por ser inmunosupresores y citotóxicos (FAO/WHO, 2007).

INTRODUCCION

Como grupo, la toxicidad aguda de los Tricotecenos A es mayor que las de los Tricotecenos B, sin embargo la concentración de Tricotecenos B hallada en cereales contaminados es generalmente mayor que la correspondiente a Tricotecenos A (Visconti et al., 2004).

1.5.1 Tricotecenos

Los Tricotecenos son metabolitos fúngicos de la familia de los sesquiterpenoides, caracterizados por un núcleo 12,13-epoxitricotec-9-eno tetracíclico. Constituyen un grupo de aproximadamente 180 sesquiterpenos, agrupados en 4 tipos: A, B, C y D en función de los grupos funcionales, que tienen diferentes constituyentes en las posiciones 3, 4, 7, 8 y 15 de la molécula. Sus estructuras químicas varían en función de la posición y número de grupos hidroxilos así como del número, posición y complejidad de las esterificaciones. El anillo 12, 13 epoxitricotec, el C₉ y C₁₀ se consideran importantes para su toxicidad. (Desjardins et al., 1993; Eriksen y Pettersson, 2004).

El primer miembro conocido de este grupo fue la "Tricotecina", aislada de *Trichothecium roseum* en 1948 por Freeman y Morison, originalmente descubierta como antifúngico. Su estructura química no se determinó hasta quince años después (Josephs et al., 2004; Eriksen et al., 2004). Hoy en día se sabe que los Tricotecenos más comunes son: el Deoxinivalenol (DON); sus acetilderivados: 3-acetildeoxinivalenol (3-ADON), 15- acetildeoxinivalenol (15-ADON); Nivalenol (NIV); Toxina HT-2; Toxina T-2 y Diacetoxiscirpenol (DAS). Aunque se han identificado más de 45 compuestos de tricotecenos relacionados estructuralmente, los estudios toxicológicos más importantes han sido realizados con Toxina HT-2, Toxina T-2, Deoxinivalenol (DON) y Diacetoxiscirpenol (DAS) (Krska et al., 2001; Desjardins, 2006).

Se ha demostrado que la contaminación por tricotecenos se produce generalmente en cereales como maíz, trigo, cebada, avena, arroz y productos derivados de estos (cereales de desayuno, aperitivos, cerveza, etc.) y los materiales ricos en celulosa como la paja y el heno (Al-Julaifi y Al-Falih, 2001). También es conocida la aparición en sorgo, papas, bananas y semillas de girasol, entre otros. Dentro de los cereales existen cultivos más propensos a sufrir el ataque de determinadas especies de *Fusarium*, tal es el caso de la fuerte afinidad por parte de *F. graminearum* hacia el

INTRODUCCION

cultivo del maíz. Una de las razones de esta afinidad podría recaer en la mayor estabilidad física de los tallos del maíz, en oposición a las cañas de cultivos como el trigo o similares (Obst et al., 1997).

Este tipo de micotoxinas no solamente es producido por hongos del genero *Fusarium*, que son los principales productores de tricotecenos, sino por una diferente gama de hongos, entre los que se encuentran los géneros *Myrothecium*, *Trichothecium*, *Trichoderma*, *Cylindrocarpon*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium* y *Stachybotrys* (Ueno, 1983; Ehrlich y Daigle, 1987; Gledhill et al., 1991).

1.5.1.1 Estructura química de los Tricotecenos

Los Tricotecenos se dividen en cuatro categorías según el grupo funcional, los no macrocíclicos son: tipo A, B y C, y el macrocíclico tipo D (Ueno, 1977; 1985). El tipo A tiene un hidrógeno, hidroxilo o una función éster en el carbono 8 (Figura 15). Este es el grupo más grande e incluye toxinas como: toxina T-2, toxina HT-2, diacetoxiscirpenol (DAS) y neosolaniol (NEO) (Tabla 3). Se encuentran sobre todo, en cereales y derivados contaminados por cepas del genero *Fusarium*, principalmente *F. sporotrichioides*, *F. equiseti* y *F. poae*. El tipo B contiene una función carbonilo en el carbono 8 (Figura 15) e incluye tricotecenos como deoxinivalenol (DON) el más extendido, sus acetilderivados como 3-acetildeoxinivalenol (3-ADON), 15-acetildeoxinivalenol (15-ADON), nivalenol (NIV), y fusarenona X (Tabla 3), producidos por cepas del genero *Fusarium*, principalmente *F. graminearum*, *F. culmorum* y *F. crookwellense* (Logrieco et al., 2003). La tercera categoría tipo C posee un grupo funcional epóxido entre los carbonos 7, 8 o 9, 10. Generalmente son producidos por los géneros *Acremonium* y *Trichothecium*. La cuarta categoría o tipo D contienen un anillo macrocíclico entre el carbono 4 y 15 con dos acoplamiento éster, y son producidos por hongos del género *Myrothecium*, *Stachybotrys* y *Trichothecium* (Desjardins, 2006; 2008).

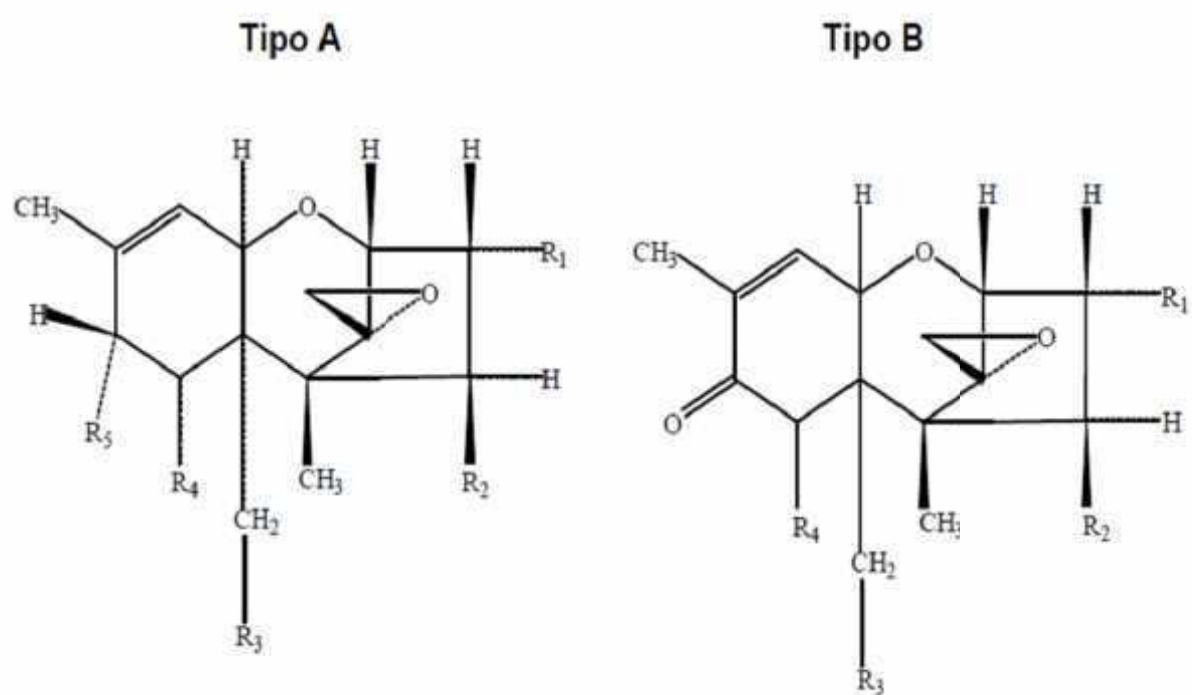


Figura 15. Estructura química de los tricotecenos tipo A y B.

INTRODUCCION

Tabla 3. Estructura química de los sustituyentes R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅ de los tricotecenos Tipo A y Tipo B

TRICOTECENOS	Sustituyentes en				
	C-3(R ₁)	C-4(R ₂)	C-15(R ₃)	C-7(R ₄)	C-8(R ₅)
Tipo A					
Toxina T-2	OH	OAc	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Toxina HT-2	OH	OH	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Acetil T-2 toxina	OAc	OAc	OAc	H	O-Isoval
T-2 triol	OH	OH	OH	H	O-Isoval
T-2 tetraol	OH	OH	OH	H	OH
8-acetoxineosolaniol	OH	OAc	OAc	H	OAc
Acuminatina	OH	OH	OAc	H	OAc
Tetracetoxi T-2 tetraol	OAc	OAc	OAc	H	OAc
Neosolaniol	OH	OAc	OAc	H	OH
4,8-diacetoxi T-2 tetraol	OH	OAc	OH	H	OAc
Diacetoxiscirpenol	OH	OAc	OAc	H	H
Tipo B					
Fusarenona-X	OH	OAc	OH	OH	= O
Nivalenol	OH	OH	OH	OH	= O
Deoxinivalenol	OH	H	OH	OH	= O
15-acetildeoxinivalenol	OH	H	OAc	OH	= O
3-acetildeoxinivalenol	OAc	H	OH	OH	= O

OAc (grupo acetilo): O-acetil, O-COCH₃

O-Isoval (grupo ceto): O-Isovalerilo, O-COCH₂CH(CH₃)₂

(Ueno, 1987; Forsell y Pestka, 1985; Betina, 1989; Feinberg y Mclaughlin, 1989; Weidenbörner, 2001)

1.5.1.2 Propiedades Físico-Químicas de los tricotecenos

Los tricotecenos son incoloros, cristalinos, químicamente estables (Ueno, 1983) y con actividad óptica. Los de tipo A (T-2, HT-2, DAS), tipo B (DON, NIV y fusarenona X) y tipo C no tienen propiedades de absorción ultravioleta, por tanto no se observa fluorescencia bajo lámpara de 366 nm.

No son volátiles y por ello es necesario su derivatización para poder detectarlos en cromatografía de gases. Son las micotoxinas más activas bioquímicamente, muy solubles en agua y pueden hallarse en forma de aerosoles en el medio ambiente. En solución diluida son estables bajo la acción de la luz, al contrario de las aflatoxinas, que se degradan (Cossette et al., 1992). Son estables en el medio ambiente, se sabe que son resistentes a la presión, calor de cocción, autoclavado 120 °C (Hughes et al., 1999; Lauren y Smith, 2001), a la molienda y a otros procesos a los que son sometidos los sustratos contaminados para la elaboración de productos derivados como piensos (Lori y Rizzo, 2007).

La toxina T-2 y el DAS son solubles en solventes no polares (acetil acetato y dietil éter), mientras que el DON y el NIV son solubles en solventes polares tales como acetonitrilo, metanol, acetato de etilo y ligeramente solubles en agua y agua con cloroformo (Alonso et al., 2002).

1.5.1.3 Toxicidad de los tricotecenos

La identificación química de los metabolitos secundarios del género *Fusarium* ha mostrado gran variabilidad en el potencial toxicogénico. El potencial toxicogénico se refiere a la habilidad de una cepa para producir determinadas toxinas. Dicha capacidad está dada por el crecimiento de la cepa bajo condiciones conocidas de cultivo que permitan la formación de cada micotoxina. La variabilidad que presentan diferentes cepas de una misma especie tiene graves implicancias toxicológicas (Miller et al., 1991).

Bioquímicamente los tricotecenos, son altamente tóxicos a nivel subcelular, celular y orgánico. Son citotóxicos sobre células eucariotas, causando lisis celular e inhibición de mitosis. Las principales propiedades tóxicas están atribuidas a la presencia del

INTRODUCCION

grupo 12,13-epóxido que se une irreversiblemente a la subunidad ribosomal 60S en mamíferos, originando una inhibición de la síntesis de proteínas. Los tricotecenos son especialmente tóxicos en tejidos con un alto ratio de división celular, provocando lesiones en células del timo, bazo, medula ósea, ovarios, ganglios linfáticos y mucosa intestinal (Eriksen y Pettersson, 2004). Además de su toxicidad en vertebrados, los tricotecenos han estado implicados en factores de virulencia en algunas enfermedades de plantas (Desjardins et al., 1993).

Hasta el momento el Comité Científico de Alimentación de la Unión Europea (SCF), ha fijado solamente valores máximos aceptables para la ingesta diaria (Ingesta diaria tolerable, IDT) de DON y NIV, pero no para los derivados acetilados, por considerar la información al respecto insuficiente. Es así que la IDT fijada para DON es de 1 g/kg de peso corporal y de 0.7 g/kg de peso corporal para NIV (European Commission, 2006). Recientemente, Del Ponte et al., (2012) demostraron la presencia de ambas toxinas, en concentraciones similares, en la mayoría de las muestras de trigo analizadas provenientes del Sur de Brasil. Estos resultados alertan sobre el riesgo, por lo menos en esta región, de estar minimizando la contaminación del trigo y los potenciales efectos tóxicos, al analizar solamente la concentración de DON.

1.5.1.4 Características de Deoxinivalenol (DON)

Químicamente se denomina 12,13-epoxi-3,7,15-trihidroxitricotec-9-ene-8-ona. Su peso molecular es de 296.3 g mol^{-1} y corresponde a la fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_6$. Cristaliza como agujas sin color con un punto de fusión de 151-153 °C. Fue aislado y caracterizado de hongos procedentes de maíz en Japón (Yoshizawa y Morooka, 1975). Posee dos derivados acetilados: 3-acetildeoxinivalenol (3-ADON) 3-acetoxi-7,15-dihidroxi-12,13-epoxitricotec-9-ene-8-ona un compuesto de forma molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_7$ y punto de fusión entre 185-187 °C; 15-acetildeoxinivalenol (15-ADON) 15-acetoxi-3,7-dihidroxi-12,13-epoxitricotec-9-ene-8-ona cuya forma molecular es $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_7$ y punto de fusión entre 138-140 °C. Ambos metabolitos son solubles en solventes orgánicos polares como el acetonitrilo, metanol y acetato de etilo, ligeramente solubles en agua y cloroformo (Eriksen y Alexander, 1998; Wolf-Hall et al., 1999; Eriksen et al., 2004).

INTRODUCCION

Es producido principalmente por *F. graminearum* y *F. culmorum*. El último tiene un crecimiento óptimo a 21 °C y se encuentra principalmente en Escandinavia y Norte de Europa, mientras que *F. graminearum* tiene un crecimiento óptimo a 25 °C y es más extendido en climas cálidos, por ejemplo Norte América, China y Japón (Scott, 1989; Placinta et al., 1999; JECFA, 2001).

El deoxinivalenol, es probablemente la micotoxina mas común producida por algunas especies de *Fusarium*, contamina diversos cereales como el maíz, trigo, arroz, centeno, cebada y granos procesados como cereales de desayuno, aperitivos extrusionados y fritos, malta, cerveza y pan, tanto en países desarrollados como en desarrollo (European Commission, 1999).

Debido a los brotes de síndromes eméticos en el ganado ocasionados por la presencia de deoxinivalenol en los piensos, se conoce vulgarmente como vomitoxina (Omurtag y Beyoglu, 2003). Químicamente pertenece a los tricotecenos no macrocíclicos y en concreto a los de tipo B, que se caracterizan por tener un carbonilo en el carbono 8. Es un componente muy estable durante el almacenamiento, molienda y procesado para la obtención de alimentos, es estable a 121 °C, moderadamente estable a 180 °C y parcialmente estable a 210 °C. se logra una completa inactivación a 370 °C por 10 minutos, o a 205 °C por 30 minutos. Se mantiene estable bajo condiciones ligeramente ácidas y la inactivación química se logra con una solución de hipoclorito de sodio al 3-5 % (Ehling et al., 1997; Cirillo et al., 2003; Hazel y Patel, 2004; Lori y Rizzo, 2007).

El deoxinivalenol inhibe la síntesis de ADN, ARN y la síntesis de proteínas a nivel ribosomal. La toxina tiene un efecto hemolítico en eritrocitos. A altas dosis puede inducir vómitos en cerdos, mientras que bajas concentraciones en la dieta reducen el crecimiento y el consumo de alimentos (anorexia) (Trenholm et al., 1989).

La presencia de DON en alimentos ha sido sujeto de varias revisiones (Scott, 1989; Placinta et al., 1999). Una compilación exhaustiva de DON en cereales ha sido preparada por JECFA (2001) donde en un promedio mundial, este tricoteceno ha sido encontrado en el 57 % de las muestras de trigo, el 40% de las muestras de maíz, el 68 % de las muestras de avena, el 59 % de muestras de cebada, el 49 % de muestras de centeno y el 27 % de las muestras de arroz. DON también fue encontrado en productos de trigo y maíz, por ejemplo harina, pan y cereales de desayuno. Las concentraciones de DON en muestras de cereal mostraron grandes variaciones

INTRODUCCION

anuales, concentraciones en los límites de detección (5-50 µg/kg) a más de 30 mg/kg (JECFA, 2001). Según Trucksess et al. (1995), aproximadamente el 40 % de las muestras de trigo y el 57 % de las muestras de cebada de la cosecha 1993 en EE.UU contenía DON que excedían los niveles para el consumo humano.

1.5.1.5. Característica de 3-acetildeoxinivalenol (3-ADON)

El tricoteceno 3-acetildeoxinivalenol es sintetizado por las especies *F. culmorum* y *F. graminearum* (Betina, 1989). Químicamente, el 3-acetildeoxinivalenol, pertenece a los tricotecenos no macrocíclicos de tipo B (Krska et al., 2001; Zhang et al., 2007).

El 3-acetildeoxinivalenol cristaliza como agujas. Su fórmula química es $C_{17}H_{22}O_7$ y su punto de fusión está en el intervalo 135-136 °C. Su estructura se presenta en la figura 15 y Tabla 3 (Betina, 1989).

1.5.1.6. Característica de 15-acetildeoxinivalenol (15-ADON)

El 15-acetildeoxinivalenol es producido principalmente por *F. graminearum* y *F. culmorum*. Químicamente pertenece a los tricotecenos no macrocíclicos de tipo B (Krska et al., 2001; Zhang et al., 2007).

Su estructura se presenta en la figura 15 y Tabla 3. La fórmula molecular es $C_{17}H_{22}O_7$ y su punto de fusión se encuentra en el intervalo 138-140 °C. Esta micotoxina es soluble en disolventes orgánicos polares como el acetonitrilo, metanol y acetato de etilo y ligeramente solubles en agua y cloroformo (Eriksen y Alexander, 1998).

1.5.1.7 Biosíntesis de tricotecenos

La biosíntesis de los tricotecenos comienza con la ciclación del farnesil pirofosfato hasta tricodieno. Este paso está catalizado por la enzima tricodieno sintasa que está codificada por el gen *Tri5* (Hohn y Vanmiddlesworth, 1986; Desjardins et al., 1993; Proctor et al., 1995). Una citocromo P450 monooxigenasa con carácter multifuncional, codificada por el gen *Tri4*, cataliza los siguientes 4 pasos (hidroxilaciones y

INTRODUCCION

epoxidaciones en diferentes posiciones) (McCormick et al., 2006), dando lugar al isotricotriol. Tras dos isomerizaciones no enzimáticas y una ciclación, se forma el isotricodermol, que forma el esqueleto de la estructura del tricoteceno. Posteriormente es acetilado y hidroxilado por las enzimas que codifican los genes *Tri101* y *Tri11*, respectivamente, dando lugar a las 15-decalonecetrina (Alexander et al., 1998). Este intermediario puede ser sustrato para producir DON (tras una hidroxilación y la adición del grupo ceto) o tras una acetilación puede dar lugar a la calonectrina (McCormick et al., 1996).

La calonectrina es el sustrato para la formación de NIV y DON, además del 3,15 diacetildeoxinivalenol (3,15-ADON), 15-acetildeoxinivalenol (15-ADON) y 4-acetilnivalenol (4-ANIV). La expresión de los genes *Tri7* y *Tri13* es necesaria para la producción de NIV, la ausencia de funcionalidad de estos genes da lugar a la producción de DON (Lee et al., 2002; Desjardins, 2008). Esto confiere una variabilidad a nivel intraespecífico, ya que especies como *F. culmorum* o *F. graminearum* pueden ser o bien quimiotipo NIV o quimiotipo DON (Chandler et al., 2003). NIV se produce directamente a partir de DON o por medio de la conversión de la calonectrina a 3,15-diacetoxiscirpenol (3,15-DAS), tras añadir un grupo ceto en el carbono 8. Se ha descrito que existe la posibilidad que una cepa produzca tanto NIV como DON simultáneamente (Llorens et al., 2004). (Figura 16). El compuesto 3,15-DAS puede ser también el sustrato que catalicen otras enzimas para dar lugar a los tricotecenos de tipo A (Toxina T-2 y HT-2) en las especies productoras de éstos (Brown et al., 2001).

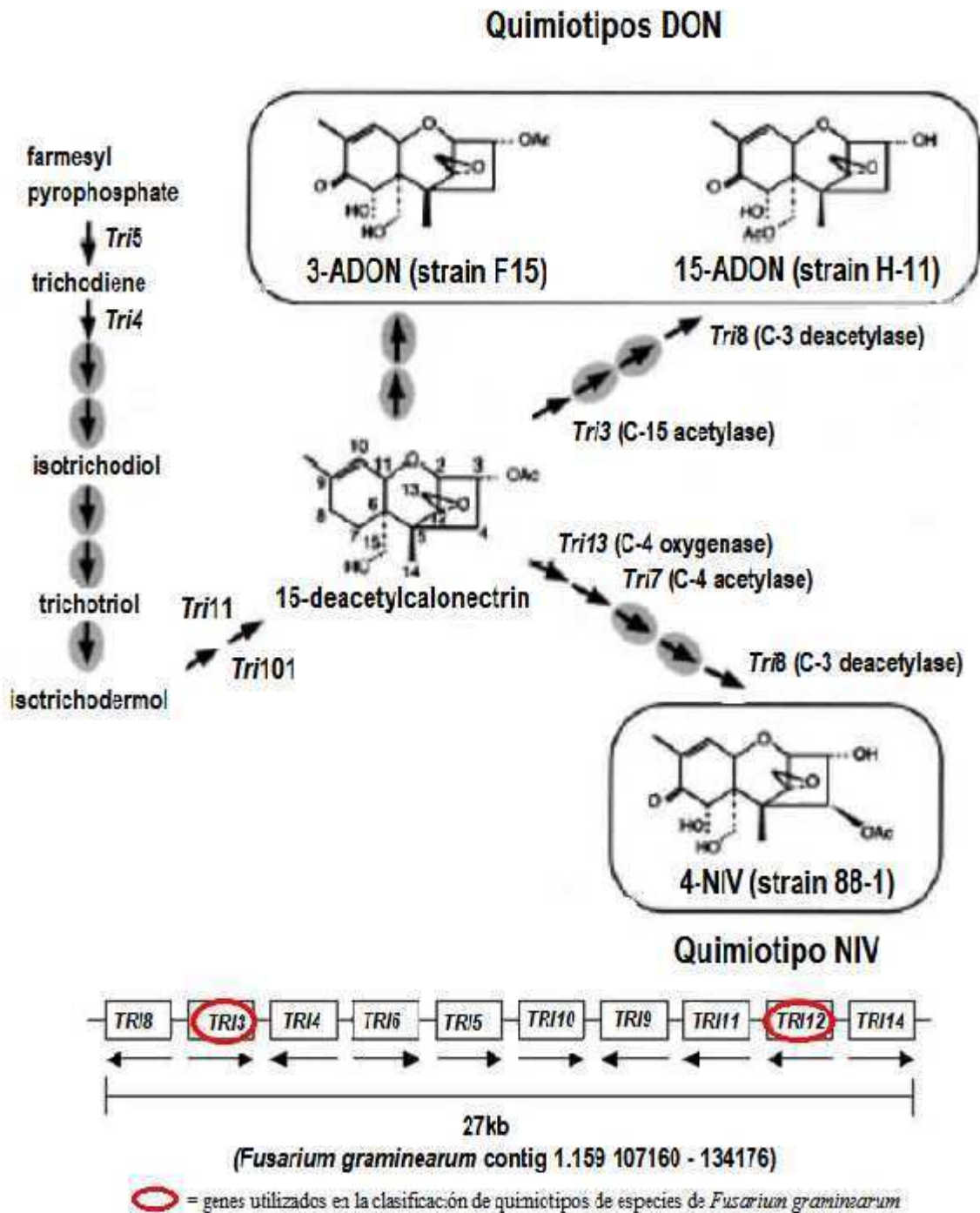


Figura 16. Vía de síntesis de tricotecenos mostrando algunas de las enzimas más importantes y segmento del cluster *Tri* (Hammond-Kosack et al., 2004).

1.5.1.7.1 Genes involucrados en la síntesis de tricotecenos (genes *Tri*)

Los tricotecenos son sintetizados por un complejo que incluyen una serie de pasos como oxigenación, isomerización y esterificación. Pero para que suceda todo esto, la cepa debe tener la información genética necesaria. Hasta el momento se sabe que muchos de los genes de la síntesis de tricotecenos están localizados en un grupo génico de al menos 10 genes, entre los cuales se incluyen los de tricodieno sintetasa (*Tri5*) (aunque su presencia no asegura la producción de DON, su ausencia imposibilita la producción), P450 oxigenasa (*Tri4* y *Tri11*), acetiltransferasa (*Tri3* y *Tri7*), factores de transcripción (*Tri6* y *Tri10*), más de seis genes involucrados en la síntesis de tricotecenos (*Tri3*, *Tri7*, *Tri8*, *Tri9*, *Tri11* y *Tri12*), los cuales son regulados por *Tri10*, una toxina de transporte (*Tri12*), dos proteínas hipotéticamente no identificadas (*Tri8* y *Tri9*), y otra acetiltransferasa (*Tri101*) (Hohn et al., 1995; Desjardins et al., 1996; Lee et al., 2001; Schnerr et al., 2001;2002; Brown et al., 2002; Peplow et al., 2003; Covarelli et al.,2004; Niessen et al., 2004; Desjardins, 2006).

Al menos 12 de los genes de la ruta de síntesis de los tricotecenos se encuentra agrupados en un *cluster* de 25 Kb, y es necesaria la expresión de 10 de ellos para la producción de la toxina. Existen otros 4 genes fuera del *cluster*. La interrupción de los genes *Tri5*, *Tri6* o *Tri10*, da lugar a la reducción completa de la producción de los tricotecenos (Desjardins y Proctor, 2007).

En trabajos realizados por Lee et al. (2001, 2002) y Brown et al. (2001) se ha identificado a los genes *Tri13* y *Tri7* de la biosíntesis de tricotecenos en *Fusarium* como los responsables de la conversión de DON a NIV por el gen *Tri13* y la acetilación de NIV a 4-acetil-nivalenol (4-AcNIV) por el gen *Tri7*. La secuenciación de estos genes en *F. graminearum* reveló que la inserción 11 del nucleótido está repetida dentro de un intrón del gen *Tri7*, interrumpiendo la función génica en la producción de DON (Lee et al., 2001) y tres deleciones dentro de la secuencia génica de *Tri13* en productores de DON (Brown et al., 2002).

En *Fusarium* productores de tricotecenos del tipo B, el gen *Tri1* controla la adición de grupos hidroxilo en posiciones C-7 y C-8. El paso final de biosíntesis es la remoción del grupo acetilo C-3 o C-15 por una estearasa codificada por *Tri8*. La actividad diferencial de esta estearasa determina los quimiotipos 3-ADON y 15-ADON en *F. graminearum* (Alexander et al., 2009; 2011; McCormick et al., 2011).

INTRODUCCION

En *F. graminearum* los genes conocidos involucrados en la síntesis de tricotecenos se encuentran en tres loci. El primero es el *cluster Tri* que incluye siete genes (*Tri8*, *Tri7*, *Tri3*, *Tri4*, *Tri11*, *Tri13*) que catalizan diez reacciones de la vía, dos genes (*Tri6* y *Tri10*) que codifican factores de regulación transcripcional, un gen (*Tri12*) que codifica una proteína transportadora y dos genes (*Tri9* y *Tri4*) con función desconocida. Además, fuera de este *cluster* se encuentra el gen que codifica para la 3-O-acetiltransferasa (*Tri101*) y el *cluster Tri1-Tri16* (Alexander et al., 2009; Cardoza et al., 2011).

1.5.1.8 Quimiotipos y genotipos de *Fusarium graminearum*

Un genotipo es una secuencia de ADN o una constitución genética y un quimiotipo es la caracterización de un aislamiento de acuerdo al patrón de producción de metabolitos secundarios determinado por métodos químicos (Desjardins, 2008).

Ichinoe et al. (1983) propusieron dividir de acuerdo a la producción de tricotecenos tipo B a las cepas de *F. graminearum* en 2 quimiotipos: quimiotipo I, donde las cepas producen DON y sus acetilderivados: 3-acetyldeoxinivalenol (3-ADON), 15-acetyldeoxinivalenol (15-ADON) y el quimiotipo II, que produce NIV y FUS X. Ellos encontraron que el principal quimiotipo hallado en la región central de Japón fue el quimiotipo II. La presencia de ambos quimiotipos fue reportado en Italia (Logrieco et al., 1988).

Sugiura et al. (1990) encontraron cepas de *Gibberella zeae* productoras de ambas toxinas simultáneamente (DON y NIV), aunque NIV se producía en mayor cantidad. También se encontró que los acetilderivados, 3-ADON y 15-ADON, eran producidos por diferentes cepas de *F. graminearum* productoras de DON. Miller et al. (1991) describieron el potencial toxicogénico de cepas de *F. graminearum*, *F. culmorum* y *F. crookwellense* aisladas de diferentes partes del mundo y subdividieron el quimiotipo I en: quimiotipo Ia para aislamientos productores de DON y 3-ADON y quimiotipo Ib para los productores de DON y 15-ADON.

INTRODUCCION

Las diferencias de genotipo tienen una distribución polifilética dentro del complejo de especies de *Fusarium graminearum* (Fg) (Ward et al., 2002). Dichos polimorfismos trans-especies, con niveles sorprendentemente elevados de variación (Ward et al., 2002), han persistido durante múltiples eventos de especiación, y se presume que son mantenidos por una nueva forma de selección balanceadora que actúa sobre las diferencias de quimiotipo (Aoki et al., 2012). Estos genes han evolucionado de forma paralela e independiente al resto del genoma (Ward et al., 2002) y han sido utilizados para inferir las estructuras poblacionales en campos infectados (Lee et al., 2009). Sin embargo no pueden ser utilizados para inferir relaciones evolutivas dentro de Fg (Aoki et al., 2012). Esto concuerda con el hecho de que si bien el quimiotipo está en algunos casos asociado a la especie a la cual pertenece el hongo, en la mayoría de los casos es característico de la cepa, por lo que sólo caracterizando la especie, no puede inferirse *a priori* su quimiotipo (Tabla 4).

Tabla 4. Especies del complejo Fg, quimiotipos asociados y origen geográfico.

Especie Fg	Quimiotipo asociado			Origen geográfico
	NIV	3-ADON	15-ADON	
<i>F. graminearum</i>	+	+	+	América del Norte
<i>F. gerlachii</i>	+	-	-	
<i>F. louisianense</i>	+	-	-	
<i>F. asiaticum</i>	+	+	+	Asia
<i>F. ussurianum</i>	-	+	-	
<i>F. nepalense</i>	-	-	+	
<i>F. verosii</i>	-	-	+	
<i>F. acaciae-maensii</i>	+	+	-	Hemisferio Sur (África y Oceanía)
<i>F. aethiopicum</i>	-	-	+	
<i>F. boothii</i>	-	-	+	América Central
<i>F. mesoamericanum</i>	+	+	-	
<i>F. austroamericanum</i>	+	+	-	América del Sur
<i>F. cortaderiae</i>	+	+	-	
<i>F. brasiliicum</i>	+	+	-	
<i>F. meridionale</i>	+	-	-	

(Aoki et al., 2012).

INTRODUCCION

Sin embargo, en algunos casos se han observado evidencias de evolución adaptativa en los genes de tricotecenos (Ward et al., 2002). Ward et al. (2008) plantean que en general los aislamientos que presentan un quimiotipo 3-ADON producen mayores niveles de tricotecenos y tienen una velocidad de crecimiento mayor que los pertenecientes al quimiotipo 15-ADON. Los mismos autores afirman que recientemente han detectado un cambio en la población de América del Norte de patógenos causantes de la FET, apareciendo en número importante cepas más toxicogénicas, pertenecientes al genotipo 3-ADON. Todo esto remarca la necesidad de monitorear rutinariamente no sólo las especies de *Fg* sino también los quimiotipos y genotipos asociados a FET en una determinada región.

En Argentina, Reynoso et al., (2011) utilizando un ensayo de PCR múltiple encontraron que la mayoría de los aislados de *F. graminearum* evaluados tenían el genotipo 15-ADON. Por otra parte, Fernández Pinto et al. (2008), Álvarez et al. (2009) y Reynoso et al. (2011) determinaron que el 15-ADON era el quimiotipo más común. Sin embargo, en todos estos trabajos también se detectaron productores de DON, 3-ADON y NIV. Un número considerable de los aislamientos que amplifican y producen DON fueron capaces de producir bajas cantidades de NIV no detectándose en la mayoría de los casos reacción de PCR para NIV. Esta situación se puede atribuir a los cambios en los pasos de conversión enzimática o la biosíntesis de los subproductos (Mugrabi de Kuppler et al., 2011; Reynoso et al., 2011).

En otras investigaciones se encontró que aislamientos que producen DON podrían producir 3-ADON y/o 15-ADON y también productores de 3-ADON podrían producir 15-ADON y viceversa aunque solo presentaron genotipo DON y 15-ADON (Yli-Mattila et al, 2009; Álvarez et al., 2011; Mugrabi de Kuppler et al., 2011). Este hecho confirma que solo el genotipo no es suficiente para predecir todo el perfil de tricotecenos que los aislados podrían sintetizar (Mugrabi de Kuppler et al., 2011). Recientemente, Alexander et al. (2011) demostró que *Tri3* no es una región determinante para discriminar entre los genotipos 15-ADON y 3-ADON y que la región *Tri8* es la responsable de esta diferenciación.

1.5.1.9 Determinación y detección de tricotecenos

De forma de garantizar la salud alimentaria tanto animal como humana, proteger al consumidor del riesgo de exposición y de cumplir con los requerimientos impuestos por las normativas, tanto nacionales como internacionales, el desarrollo de técnicas confiables, rápidas, sensibles y precisas para la cuantificación de micotoxinas, en particular tricotecenos, se ha convertido en un área de prioridad en investigación (Lattanzio et al., 2009).

En la actualidad existen trabajos que muestran varios métodos químicos que permiten, a partir de un mismo extracto purificado, determinar la contaminación con DON, 15-ADON y 3-ADON, NIV y zearalenona, realizando la separación de las toxinas en el extracto final por cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía de gases (GC), o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los métodos de detección utilizados incluyen espectrofotometría UV-Visible, fluorescencia (en caso de moléculas fluorescentes o con derivatización pre o post columna), captura electrónica y espectrometría de masa (Krska, 2009). Sin embargo, los nuevos métodos desarrollados para la detección y cuantificación de micotoxinas en alimentos, se basan en el uso de espectrometría de masa (MS), en particular espectrometría de masa en tándem (MS/MS o MS²) para confirmar la presencia de las moléculas de interés (Berthiller et al., 2005, 2007; Krska et al., 2007; Ren et al., 2007).

El procedimiento más común usado para la determinación de tricotecenos es la cromatografía de gases (GC) con detector de captura de electrones (ECD), también se ha reportado el uso de detector de ionización de llama (FID) (Schothorst y Jekel, 2001) como así también del GC con detector de masa (GC-MS) (Tanaka et al., 2000; Jestoi et al., 2004; Szecsi et al., 2005). Para los tricotecenos el análisis por GC tiene mayor sensibilidad y especificidad que la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Gilbert, 1993).

Después de la derivatización de los grupos hidroxilos libres de las micotoxinas a formas trimetilsilil ésteres (TMS), heptafluorobutiril ésteres (HFB), pentafluoropropionil y trifluoroacetil ésteres, éstas llegan a ser lo suficientemente volátiles para el análisis por cromatografía de gases.

INTRODUCCION

El detector de captura de electrones (ECD), mejora la sensibilidad frente al detector de ionización de llama (FID) para los tricotecnos. El sistema se basa en la electronegatividad de las sustancias eluidas y su habilidad para formar iones negativos por captura de electrones. Es un detector muy selectivo, y es sensible a la presencia de moléculas con grupos electronegativos como halógenos, peróxidos, quinonas y grupos nitro. Otros grupos como el alcohol, amina e hidrocarburos no dan señal. Se aplica en la detección de moléculas que contienen halógenos, principalmente cloro, de ahí que sea importante en ensayos medioambientales para la detección y determinación de insecticidas clorados.

El detector de captura de electrones tiene la ventaja de no alterar la muestra de manera significativa (a diferencia del detector de llama). En el caso de los tricotecnos, no son compuestos volátiles, por lo que para realizar un análisis de ellos por GC-ECD deben ser previamente derivatizados.

El detector de espectrometría de masas (MS) es un instrumento que permite analizar con una gran precisión la composición de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación masa-carga (m/z).

En términos generales, las moléculas diferentes tienen masas distintas, hecho utilizado por un espectro de masas para determinar qué moléculas están presentes en una muestra. En el caso de una micotoxina, se vaporiza y se analizan los iones en la primera parte del espectro de masa. Estos iones tienen pesos moleculares específicos. También tienen una carga, que significa que debido a ella tendrán movimientos bajo la influencia de un determinado campo eléctrico. Los iones se envían en un compartimiento de aceleración y se pasan a través de una lámina metálica. Se aplica un campo magnético a un lado del compartimiento que atrae a cada uno de los iones con la misma fuerza (suponiendo carga idéntica) y los desvía sobre un detector. Naturalmente, los iones más ligeros se desviarán más que los iones pesados ya que tienen menos masa. El detector mide exactamente cuán lejos se ha desviado cada ion y dependiendo de esto, se calcula el "coeficiente masa por unidad de carga (m/z)". Con esta información es posible determinar con un alto nivel de la probabilidad la composición química de la muestra original.

El acoplamiento técnico cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) ha revolucionado el análisis de muestras complejas, ya que las características del alto poder de resolución que da la cromatografía de gases con la alta sensibilidad

INTRODUCCION

suministra por el espectrómetro de masas, convierte a este acoplamiento GC-MS en un método poderoso para la identificación y cuantificación de moléculas orgánicas volátiles (Gamiz, 2006).

Otras técnicas utilizadas para la detección y/o cuantificación de micotoxinas son los métodos inmunoquímicos. Entre ellos se encuentran el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA), los inmunoensayos de flujo lateral y los inmunoensayos por detección de fluorescencia polarizada (Flourescence Polarization ImmunoAssay, FPIA). La técnica de ELISA es ampliamente utilizada para el monitoreo de DON y otras toxinas en cereales. No requiere clean-up y representa un método rápido, económico de “screening” (Schneider et al., 2004) a pesar de su falta de precisión a bajas concentraciones y de ser aplicable a un número limitado de matrices (Lattanzio et al., 2009). El FPIA, representa una técnica rápida y sencilla, donde se mide la interacción entre un antígeno marcado con un fluoróforo y su anticuerpo específico. Su uso en el monitoreo de tricotecenos se limita al DON (Pascale et al., 2008) y presenta interferencias con algunas matrices, lo que puede llevar a la sobreestimación del contenido de micotoxinas (Lattanzio et al., 2009).

Otras técnicas que se han desarrollado en los últimos años para la detección y análisis son los biosensores (ópticos y electroquímicos) y las técnicas no invasivas (preservan la muestra) como espectroscopía infrarroja y espectroscopía de transformada de Fourier (Krska y Molinelli, 2009; Lattanzio et al., 2009).

1.6 Factores que determinan el desarrollo fúngico y la producción de micotoxinas en el género *Fusarium*

1.6.1 Actividad del agua (a_w)

El agua es quizás el factor más determinante y limitante de la colonización fúngica de un determinado sustrato, y aun más para el crecimiento de las especies del género *Fusarium*, que necesitan un mayor contenido de agua libre. La disponibilidad de agua determina si las esporas fúngicas podrían o no germinar, la velocidad con que lo harán y su tasa respiratoria. Desde el punto de vista microbiológico el término más adecuado para expresar el agua del sustrato es la actividad de agua (a_w), el término contempla únicamente el agua libre en equilibrio con la humedad relativa ambiental. De ese modo la a_w mínima para el desarrollo de la mayoría de las especies fúngicas que colonizan los granos de cereales es superior a 0.70.

INTRODUCCION

Una a_w de 0.70 puede ser consecuencia del estado de maduración del grano en formación en la planta, así como el resultado de la penetración de agua de lluvia o nieve en el grano, de un secado inadecuado antes del almacenamiento o de la migración de la humedad debido al gradiente de temperaturas en el interior del silo (Lacey, 1989).

Los valores óptimos de a_w para la producción de toxinas por parte del género *Fusarium* oscilan entre 0.93 y 0.98, no detectándose toxinas por debajo de un valor de 0.71. Muchos estudios efectuados han demostrado que la producción de micotoxinas como fumonisinas, zearalenona y tricotecenos aumentan con la actividad de agua, siendo óptima a 0.97, 0.98 y 0.99, respectivamente (Lacey y Magan, 1991; Marín et al., 1999; Velluti et al., 2000; Mateo et al., 2002; Doohan et al., 2003; Soriano y Dragacci, 2004).

Sin embargo, la germinación de las esporas de este género se produce a partir de 0.88, mientras que el crecimiento se produce a partir de 0.90 a_w (Marín et al., 2004; Ramírez et al., 2004; Sanchis et al., 2006; Palmero et al., 2008).

1.6.2 Temperatura

La temperatura es otro de los factores importantes que afectan el crecimiento fúngico y la producción de las toxinas. Como con el agua, cada especie fúngica tiene una temperatura mínima óptima y máxima para su crecimiento. Los hongos en general crecen en un amplio rango de temperaturas, que pueden ir desde -4 °C hasta una temperatura máxima de 50 °C. Diversos estudios han determinado que la mayoría de los hongos que producen toxinas lo hacen entre 12-42 °C, produciendo el máximo entre 25-32 °C según el sustrato. Además, los ciclos de temperatura favorecen la síntesis de toxinas (Marín et al., 2001; Llorens et al., 2004; Belli et al., 2005).

En el caso de las especies del género *Fusarium*, para la producción de micotoxinas la temperatura óptima es de 20-26 °C (figura 17), aunque el crecimiento y la esporulación de los hongos se ven favorecidos a una temperatura de 30 °C (figura 18). No obstante, muchos estudios tratan de determinar las temperaturas que favorecen la producción de micotoxinas específicas, con el fin de evitarlas. Por ejemplo, la producción de tricotecenos y zearalenona, se ve favorecida a temperaturas inferiores a 28 °C y superiores de 15 °C, temperaturas medias frecuentes en las áreas de cultivo y en el almacenamiento de cereales (Velluti et al., 2000; Mateo et al., 2002; Jiménez et al., 2005; Llorens et al., 2006). Otro ejemplo, es el caso de la producción de las

INTRODUCCION

fumonisin, favorecidas en el intervalo de 15-30 °C (Marín et al., 1999; Soriano y Dragacci, 2004).

Se ha demostrado que la temperatura más adecuada para la producción de DON es de 30 °C. El conocimiento acerca de la producción de DON bajo temperatura marginal o sub-óptima y las condiciones de a_w para el crecimiento es importante, ya que el almacenamiento inadecuado acompañado por una temperatura elevada y contenido de humedad en el grano puede favorecer aún más la producción de micotoxinas y conducir a la reducción en la calidad del grano. Los mapas de contorno (figura 19) reportados por Ramírez et al. (2006) para el crecimiento y la producción de DON pueden proporcionar pautas muy útiles para facilitar la gestión eficaz de predecir el riesgo para el crecimiento y la producción de DON durante la maduración, cosecha y almacenamiento de trigo.

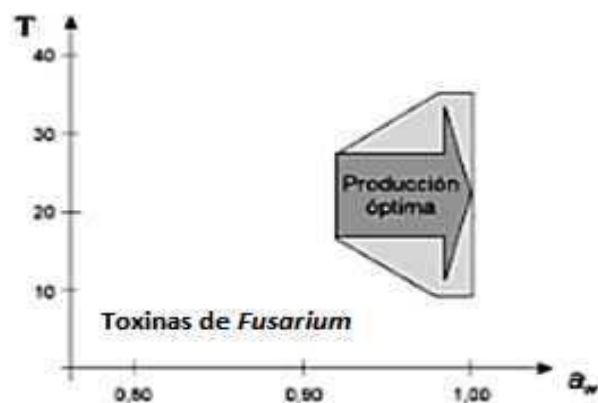


Figura 17. Crecimiento orientativo de los niveles combinados de actividad de agua y temperatura que permiten la producción de toxinas de *Fusarium* (Sanchis et al., 2006).

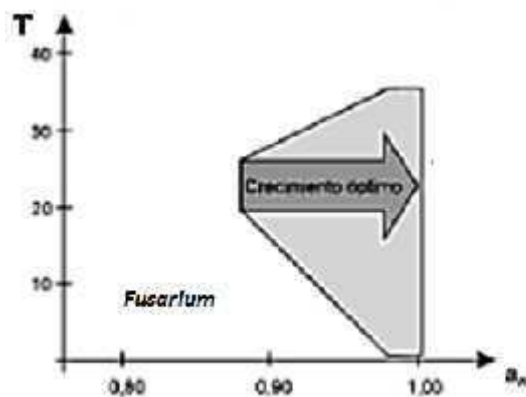


Figura 18. Crecimiento orientativo de los niveles combinados de actividad de agua y temperatura que permiten el crecimiento de *Fusarium* (Sanchis et al., 2006).

INTRODUCCION

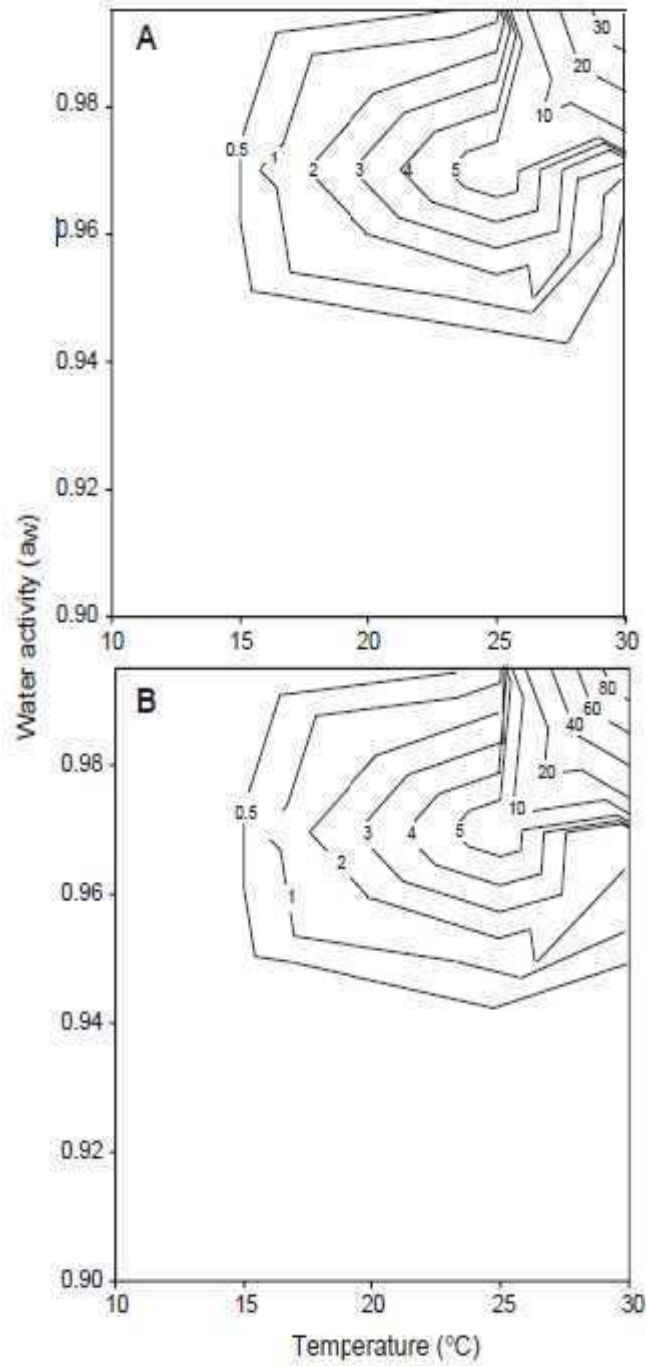


Figura 19. Mapas de contorno de dos cepas de *F. graminearum* en relación con la actividad de agua y la temperatura. Los números de las líneas de contorno se refieren a la concentración media de deoxinivalenol ($\mu\text{g/g}$; $n=6$) (Ramírez et al., 2006).

INTRODUCCION

La temperatura tiene una considerable influencia sobre la disponibilidad de agua, pues los requerimientos mínimos para el crecimiento fúngico y la producción de la toxina son distintos a diferentes temperaturas y en diferentes substratos. Cada factor por separado y su interacción tiene influencia sobre las especies fúngicas que están colonizando el cereal, pudiéndose establecer especies predominantes más tolerantes según sean dichas condiciones (Magan y Aldred, 2007).

Miraglia et al. (2009) señalaron que los impactos potenciales del cambio climático, la inocuidad de los alimentos y la seguridad alimentaria han recibido relativamente poca atención. La agricultura está profundamente afectada por los factores climáticos que pueden cambiar significativamente en un futuro próximo: la temperatura, las precipitaciones, la sequía, y el dióxido de carbono atmosférico. Varias entidades agrícolas podrían verse afectadas por estos factores climáticos, como la calidad del suelo, los rendimientos de los cultivos y el entorno biológico de los mismos, como la abundancia de plagas y patógenos de plantas.

Las micotoxinas son algunos de los riesgos transmitidos por los alimentos que son dependientes de las condiciones climáticas. En efecto, la capacidad de los hongos para producir micotoxinas está influenciada en gran medida por la temperatura, humedad relativa, ataque de insectos y las condiciones de estrés de las plantas (Miraglia et al., 2009). Además, las precipitaciones más extremas y eventos de sequía podrían favorecer la formación de DON y fumonisinas respectivamente (Miller, 2008).

Con respecto a las previsiones del cambio climático para el norte de Europa, a manera de ejemplo, las condiciones cálidas y húmedas esperadas serían favorables para el desarrollo de la FET. La prevalencia de *F. graminearum* en granos de cereales ya ha aumentado en Europa Central y es probable que aumente en el norte debido a estos cambios previstos. Las posibles condiciones climáticas extremas predisponen a las infecciones por *Fusarium* debido al aumento de las poblaciones de las plagas de insectos. Las condiciones adversas pueden incluso crear condiciones adecuadas para el desarrollo de *F. subglutinans* o *F. verticilloides* en maíz y posiblemente otros cereales. La importancia de las especies que infectan en condiciones relativamente secas como *F. poae* y *F. langsethiae*, también puede incrementarse en los cereales de invierno y su presencia sería más frecuente en la agricultura futura. Se espera, además del aumento de *F. graminearum*, la invasión de partes del norte de Europa central y Dinamarca por los productores de fumonisinas (Parikka et al., 2012).

INTRODUCCION

Los diferentes linajes de *F. graminearum* tienen distintas distribuciones y difieren en el tipo de micotoxinas que producen y en su capacidad para causar una enfermedad en los cultivos (Amarasinghe et al., 2011). Los factores del medio ambiente dentro de una cierta área geográfica podrían influir en la prevalencia de un quimiotipo determinado. Zhang et al. (2007) investigaron la frecuencia de los distintos quimiotipos de cepas de *F. graminearum* aisladas de trigo en regiones donde habían desarrollado epidemias de FET en China, y mostraron que los quimiotipos tenían diferentes patrones de distribución, asociados con las temperaturas medias anuales de cada región. El quimiotipo 15-ADON estaba establecido en las regiones más frías y el 3-ADON en las más cálidas. El conocimiento de cómo las variables ambientales afectan la prevalencia de uno u otro quimiotipo son importantes para el desarrollo de la medida de prevención de las epidemias de FET y para la investigación de variedades de plantas resistentes.

Por todo ello, es especialmente aconsejable la detección temprana de las especies toxicogénicas de *Fusarium*. Es importante disponer de métodos que permitan la identificación del material contaminado, con el fin de poder tomar medidas para evitar una nueva contaminación y que el producto pase a la cadena alimentaria. Hasta ahora los principales métodos de análisis utilizados eran químicos o inmunológicos, orientados a la búsqueda de una micotoxina en particular. Sin embargo, en los últimos años se están desarrollando métodos de diagnóstico basados en el ADN para algunas de las especies de *Fusarium* más importantes (Patiño et al., 2004; Jurado et al., 2005, 2006). Además, el conocimiento de los factores que determinan el crecimiento de *Fusarium* sobre el cereal y la producción de las toxinas correspondientes según la especie de *Fusarium*, permiten elaborar estrategias de prevención y control de estas especies durante la fase de campo y almacenamiento del grano.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo 1: Seleccionar cepas de *Fusarium graminearum* de trigo de diferentes regiones geográficas y distintas cosechas que produzcan simultáneamente deoxinivalenol (DON), 3- y 15-acetildeoxinivalenol (3-ADON y 15-ADON) en cantidades significativas.

Objetivo 2: Determinar si las cepas conservan el perfil de producción de toxinas a lo largo del tiempo por métodos químicos.

Objetivo 3: Estudiar la influencia de parámetros ambientales como la actividad acuosa y la temperatura sobre el crecimiento y la biosíntesis de micotoxinas sobre cepas de *Fusarium graminearum*, productoras de DON, 3-ADON y 15-ADON.

Objetivo 4: Determinar los valores de actividad acuosa y temperatura óptimas y limitantes para la producción de cada una de las toxinas.

Objetivo 5: Determinar, correlacionando los resultados obtenidos con datos de literatura, si la prevalencia de la producción de un determinado derivado acetilado podría ser atribuible al efecto del cambio climático.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Cepas de *F.graminearum*

Se utilizaron cepas con capacidad para producir simultáneamente tricotecenos del grupo B que fueron aisladas de muestras de trigo de las cosechas 1993-1994, 2000-2001 y 2001-2002 de las provincias de La Pampa, Santa Fe y Buenos Aires. (Tabla 5) (Álvarez et al., 2008).

Para la realización de este trabajo fueron utilizadas las siguientes cepas de referencia: ITEM N° 8602, 8606, 8607, 8608, 8613, 8614, 8615, 8616, 8618 y 8623 pertenecientes a la colección internacional del ISPA-CNR, Bari, Italia. Los restantes aislamientos fueron suministrados por la colección del laboratorio de Microbiología de Alimentos del Área Química y Microbiología de Alimentos del Departamento de Química Orgánica de la FCEN, UBA. Todas las cepas fueron caracterizadas por métodos moleculares como *F. graminearum sensu stricto* y genotipo 15-ADON (Álvarez et al., 2009).

2.2 Cultivo y mantenimiento de las cepas de *F. graminearum*

Para el cultivo de las cepas se emplearon los siguientes medios: Agar Papa Dextrosa (PDA, Anexo) aconsejado para la medición de tasas de morfología de las colonias, pigmentación y el crecimiento de cultivos, y Agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA, Anexo) que promueve la esporulación y optimiza el desarrollo.

Las cepas con crecimiento característico de *F. graminearum* en PDA y SNA se conservaron tomando cilindros de 0.5 cm de agar que se colocaron en viales con agua destilada estéril.

Tabla 5. Cepas de *F. graminearum* aisladas de trigo cultivado en Argentina

ITEM	Provincia	Subregión	Año de cosecha
10 A4	Santa Fe	I	2001
16 A1	Santa Fe	II N	2001
16 A3	Santa Fe	I	2001
10 A1	Santa Fe	I	2001
11 A2	Santa Fe	I	2001
4-B4	Santa Fe	I	2001
11-B2	Santa Fe	I	2001
7-B9	Santa Fe	I	2001
20B5	Santa Fe	II N	2001
11-B5	Santa Fe	I	2001
I-5	Buenos Aires	II S	2001
9-2	Buenos Aires	II S	2001
9-4	Buenos Aires	II S	2001
I-3	Buenos Aires	II S	2001
I-4	Buenos Aires	II S	2001
III-11	Buenos Aires	II N	2001
9-7B	Buenos Aires	II S	2001
IX-2	Buenos Aires	II S	2001
9-6	Buenos Aires	II S	2001
9-7a	Buenos Aires	II S	2001
9-5	Buenos Aires	II S	2001
8602	Buenos Aires	II S	2002
8615	Buenos Aires	IV	2002
6 A3	Santa Fe	IV	2001
8609	La Pampa	VS	2002
1-24-5	La Pampa	VS	2002
1PSD	La Pampa	VS	2002
8618	Buenos Aires	II N	2002
8607	La Pampa	IV	2002
G-4	Buenos Aires	IV	2002
G06	Buenos Aires	IV	2002
2-29	Buenos Aires	IV	2002
2-24	Buenos Aires	IV	2002
8608	La Pampa	VS	2002
R2-9	Buenos Aires	IIS	1994
L2D5	Buenos Aires	IV	2002
R-7	Buenos Aires	IIS	1994
8623	Buenos aires	IIS	2002
8606	Buenos aires	IV	2002
8616	Buenos aires	IIS	2002
8614	Buenos aires	IIS	2002
L-24-1	Buenos Aires	IIS	1994
G3	Buenos Aires	IIS	1994
8613	La Pampa	VS	2002

2.3 Determinación de la Capacidad Toxicogénica de las cepas seleccionadas

Se procedió a verificar si las cepas seleccionadas conservaban su capacidad toxicogénica. En un erlenmeyer de 250 ml se colocaron 25 g de arroz y 50 ml de agua destilada y se esterilizó a 121 °C por 15 minutos. La inoculación del arroz se realizó colocando para cada aislamiento un cuadrado de agar de 0.5 x 0.5 cm de un cultivo en SNA por erlenmeyer. Se incubó durante 15 días a 15 °C y luego 15 días a 25 °C. Se conservó a -30 °C hasta su extracción (Abbas et al., 1984). El procedimiento de extracción se esquematiza en la figura 20.

2.4 Análisis de micotoxinas

La técnica utilizada para el análisis de tricotecenos fue la descrita por Trucksess et al. (1984) y modificada por Rizzo et al. (1995, 1997). Se efectúa una extracción con Acetato de Etilo-Acetonitrilo-agua (50:41:9) agregando sulfato de amonio al extracto antes de su elución en la columna, así se incrementa la recuperación de los tricotecenos menos polares (3- y 15-ADON) por efecto del salting-out. En estas condiciones fue posible obtener una recuperación del 90 % (en ensayos por triplicado) para todos los tricotecenos analizados.

2.4.1 Extracción

Se colocaron 125 ml de la mezcla Acetonitrilo-Acetato de Etilo-agua (50:41:9, v/v) en cada erlenmeyer con el cultivo correspondiente a cada cepa y se mantuvo en agitación por una hora a 300 rpm. Luego se filtró por papel Whatman #1, tomándose 20 ml del filtrado en una probeta de 100 ml, a este filtrado se le agregó 1.4 g de amonio sulfato para provocar el salting-out (Figura 21).

2.4.2 Limpieza (clean-up)

Se preparó una columna cromatográfica de 10 mm de diámetro interno y 50 mm de alto con 0.7 g de carbón activado (charcoal), 0.5 g de alúmina neutra y 0.3 g de celite. La columna se rellenó con un disco de papel Whatman N°1, sobre el cual se colocaron 0.1 g de celite y 1.5 g de la mezcla golpeándola suavemente para compactarla (Trucksess et al., 1984; Rizzo et al., 1997).

La columna se fijó a un kitasato de 125 ml conectado a una trampa de agua a través de la cual se regula la velocidad de flujo del solvente, que debe ser de 2 a 3 ml por minuto. Se pasaron por la columna 20 ml del extracto, seguido por 2 lavados con 10 ml

MATERIALES Y METODOS

del solvente de extracción. El eluato se evaporó a sequedad a baño María. Se añadieron 3 ml de Acetato de Etilo al residuo, se calentó a ebullición a baño María y se filtró con papel Whatman N°1, este procedimiento se repitió dos veces. El residuo resultante se recolectó en un matraz y se llevó a sequedad en rotavapor. Luego se transfirió a un tubo Eppendorf resuspendiendo con 500 μ l de Acetato de Etilo-Metanol (95:5). Se colocaron 100 μ l del extracto en un vial y los 400 μ l restantes en otro. El primer vial fue utilizado para el análisis de las toxinas y los 400 μ l restantes se utilizaron en aquellas muestras que fueron repetidas, ambos viales fueron secados en corriente suave de Nitrógeno y se almacenaron a -18°C hasta su análisis por Cromatografía Gaseosa (Figura 21).

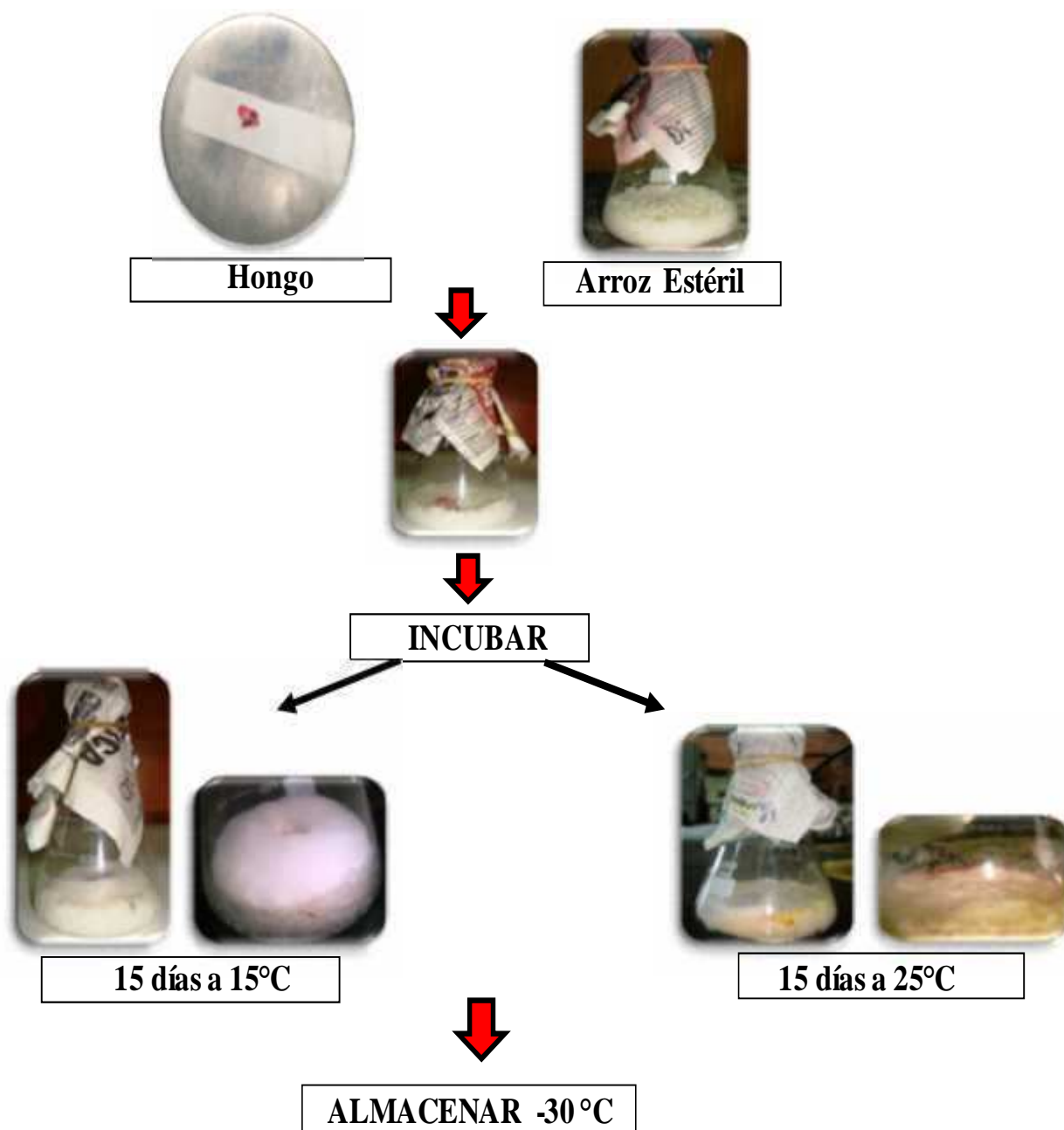


Figura 20. Capacidad Toxicogénica (según Abbas et al., 1984).



Figura 21. Extracción y Purificación de Tricotecenos (según Trucksess et al., 1984).

2.5 Derivatización de las Micotoxinas

Las micotoxinas estudiadas requieren la formación de derivados con el fin de aumentar su volatilidad y poder ser analizados por cromatografía de gases y espectroscopía de masas.

Los reactivos derivatizantes se pueden clasificar en: reactivos silanizantes que tienen como núcleo al átomo de silicio; reactivos acilantes que tienen los grupos N-fluoroacilimidazoles y fluoroalquil anhídridos. A este último pertenece el Anhídrido Trifluoroacético (TFAA), agente derivatizante empleado, el cual fijará los átomos de flúor a las toxinas, dando mayor sensibilidad y especificidad en la detección con ECD.

A 100 μl de producto de extracción secados con N_2 se agregaron 300 μl de TFAA y 30 mg de Bicarbonato de Sodio (NaHCO_3) para destruir restos del derivatizante que no haya reaccionado. Se agitó con vortex por 10 segundos y se colocó en baño de arena a 80 $^\circ\text{C}$ por 30 minutos. Después de transcurrido este tiempo la mezcla se dejó a temperatura ambiente. El residuo fue disuelto en 100 μl de la solución de trabajo, 2-amino-5-clorobenzofenona (ACBP) en tolueno con una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, el cual se utilizó como estándar interno. Se volvió a repetir la agitación por 10 segundos y luego se agregaron 500 μl de agua para remover el exceso de reactivos. Se dejó reposar hasta que se separaron las dos fases, acuosa y orgánica. Se transfirió la capa toluénica a un vial con Sulfato de Sodio Anhidro para eliminar el agua. Se agitó por 10 segundos y se dejó reposar hasta que se separaron las dos fases, acuosa y orgánica. Se transfirió la fase toluénica a otro vial y se analizó con un cromatógrafo gas-líquido (GC) con un detector de captura de electrones (ECD) (Schwadorf y Muller, 1991; Schollenberger et al., 1998). (Figura 22).



Figura 22. Derivatización de micotoxinas (según Schwadorf and Muller, 1991; Schollenberger et al., 1998).

2.6 Determinación de tricotecenos

2.6.1 Condiciones del cromatógrafo

La detección de tricotecenos se realizó con un cromatógrafo gas-líquido Shimadzu GC17 con un detector de captura de electrones (ECD), con una columna capilar RX-5MS (30 m, 0.25 mm x 0.25 µm.). La temperatura del inyector fue de 250 °C y la del detector de 300 °C. Se utilizó un programa de temperatura que consistió en 2 minutos a 90 °C, y luego se incrementó de 90 a 275 °C (2 minutos) a 23 °C por minuto y desde 275 a 290 °C (5 minutos) a 30 °C por minuto. Tanto el gas auxiliar como el carrier utilizado fue Nitrógeno. El volumen de inyección fue de 2 µl y el tiempo de corrida por muestra fue de 27 minutos (Croteau et al., 1994).

2.6.2 Cuantificación de toxinas por patrón interno

Las concentraciones de micotoxinas, tanto en los patrones como en los aislados, se cuantifican mediante la técnica del patrón interno. Un patrón interno es una sustancia empleada para establecer relaciones matemáticas con los analitos a determinar, con el objeto de mejorar la precisión del método y del instrumento. Además, no debe encontrarse en las muestras a analizar, debe ser separable de los otros componentes de la muestra y no debe reaccionar químicamente ni con los componentes de la muestra ni con los analitos a determinar (Woodget y Cooper, 1995).

Como patrón interno se utilizó 2-amino-5-clorobenzofenona (ACBP). Se preparó una solución de 500 µg/ml de 2-amino-5-clorobenzofenona (ACBP) en tolueno, esta solución se mantuvo en heladera a 5 °C envuelta en papel de aluminio hasta el momento de su utilización. De esta solución se tomaron 200 µl, se llevaron a un matraz de 10 ml y luego se enrasó con tolueno, esta última solución se debió preparar el mismo día del análisis y es la que se utilizó en la derivatización.

2.7 Confirmación por Cromatografía Gaseosa acoplada a un detector de Espectrometría de Masa (GC-MS)

La producción de tricotecenos fue confirmada por espectrometría de masa. El equipo empleado fue: GC-MS QP 5050A, Shimadzu® con un potencial de ionización de 70eV. Se utilizó la misma columna capilar que para GC- ECD, RX-5MS (30 m, 0.25 mm x 0.25 µm).

MATERIALES Y METODOS

Las condiciones elegidas para el cromatógrafo y más concretamente para las temperaturas del detector, inyector y horno fueron optimizadas con la finalidad de obtener la máxima separación posible entre las diferentes micotoxinas a estudiar, especialmente 3-ADON y 15-ADON, ya que sus tiempos de retención son muy próximos. Las condiciones fueron: Temperatura del inyector 250 °C y temperatura del detector 300 °C. El programa de corrida consistió en 2 minutos a 90°, luego se incrementó hasta 275 °C a 23 °C por minuto. Pasados 2 minutos a 275 °C la temperatura se aumentó hasta 290°C a 30°C por minuto, manteniéndose así por 15 min. Tanto el gas auxiliar como el carrier utilizados fueron Helio. El volumen de inyección fue de 1 µl y el tiempo de corrida por muestra fue de 27 minutos.

La derivatización se realizó con Anhídrido Trifluoroacético (TFAA) según la metodología detallada anteriormente. (Ítem 2.5)

2.8 Determinación del efecto de los parámetros ambientales (a_w , temperatura) sobre el crecimiento y producción de toxinas

2.8.1 Aislamiento seleccionado para estudios de influencia de a_w y temperatura

Para investigar la influencia de la actividad de agua (a_w) y la temperatura en la producción de las toxinas DON, 3-ADON y 15-ADON de *Fusarium graminearum* se seleccionó el aislamiento ITEM 8606. Esta cepa fue aislada de trigo en la provincia de Buenos aires, subregión IV, en la cosecha 2001-2002. Fue uno de los aislados de referencia con mayor capacidad de producción de DON, 3-ADON y 15-ADON, según resultados obtenidos por GC-ECD y confirmado por GC-MS. Además resultó una cepa estable en el tiempo, ya sea con respecto a sus características morfológicas como a su potencial toxicogénico. Esta cepa fue caracterizada por técnicas moleculares como *F. graminearum* s.s. y genotipo 15-ADON.

2.8.2 Medio de cultivo para estudios de influencia de a_w y temperatura

El cultivo del hongo se realizó en agar trigo molido 2 %. Este medio contenía 20 g de trigo molido y 20 g de agar por litro. La a_w del medio se ajustó con glicerol 87% p.a. (Merck 4094) a 0.99 y 0.95 \pm 0.005 (Ramírez et al., 2004). La actividad de agua se midió en un Aqualab CX-2 (Decagon Devices Inc., EE.UU.).

2.8.3 Inoculación e incubación del medio de cultivo

La inoculación se llevó a cabo a partir de un disco de agar de 3 mm de diámetro, obtenido marginalmente del cultivo puro de la cepa 8606 cultivado durante 7 días a 25 °C en PDA. (Figura 23). Cada disco de agar se inoculó en el centro de la placa de Petri que contenía el medio de cultivo agar trigo molido 2 % (0.99 y 0.95 a_w). Se realizaron tres réplicas que se incubaron a cinco temperaturas diferentes (10, 15, 20, 25 y 30 °C) durante 7, 14, 21 y 28 días (Tabla 6).

2.8.4 Evaluación de la producción de toxinas

Para la extracción las toxinas DON, 3-ADON y 15-ADON se trasladó con una espátula el contenido de la caja de Petri con crecimiento de cada temperatura y a_w en los días establecidos (7, 14, 21, 28), a un erlenmeyer tarado y luego se pesó. A continuación la extracción y purificación o limpieza (clean-up) se realizó de la misma forma que para la determinación de capacidad toxicogénica según se detalla en ítems 2.4.1 - 2.4.2 (Ver procedimiento esquematizado en Figura 21).

2.8.5 Análisis y determinación de toxinas extraídas

Los extractos obtenidos fueron analizados por cromatografía gas-líquido (GC) con un detector de captura de electrones (ECD) siguiendo el método de Schwadorf y Muller, 1991; Schollenberger et al., 1998 (Ver procedimiento esquematizado en Figura 22), según se detalla en el Ítem 2.5 - 2.6 y confirmados por Cromatografía Gaseosa acoplado a un Espectrómetro de masa como fue detallado en el ítem 2.7.

2.8.6 Análisis Estadístico

Los efectos de la actividad acuosa y la temperatura sobre la producción de DON, 3-ADON y 15-ADON a los 7, 14, 21 y 28 días se evaluaron estadísticamente por medio de un ANOVA de 3 factores utilizando el Software estadístico Statistix versión 8.0 (Analytical Software, Florida, E.E.U.U.). Las comparaciones de medias a posteriori se realizaron por medio del test de Tukey a un nivel de significación del 5% ($\alpha=0.05$) para determinar la existencia de diferencias significativas entre las diferentes condiciones estudiadas.

Tabla 6. Modelo de inoculación

A_w	Temperatura °C	Tiempo (días)
0.99	10, 15, 20, 25 y 30 (x3)	7, 14, 21 y 28
0.95	10, 15, 20, 25 y 30 (x3)	7, 14, 21 y 28

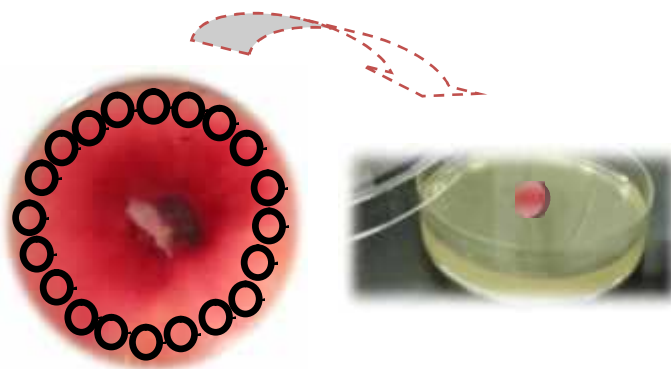


Figura 23. Forma de inoculación

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1 Caracterización morfológica de los aislamientos

La caracterización de los aislados, para comprobar si retuvieron su capacidad de crecimiento y características morfológicas se realizó según Nelson et al. (1983); Samson et al. (2004); Leslie y Summerell (2006).

En primera instancia, se llevó a cabo el examen en medio Agar Papa Dextrosa (PDA), las colonias de las cepas de *F. graminearum* produjeron abundante micelio blanco que se vuelve de color amarillo a marrón o rosa (Figura 24). El reverso de la colonia es generalmente de color rojo por la formación de pigmentos de color rojo oscuro (Figura 25). El pigmento es sensible al pH y puede cambiar de rojo a amarillo a medida que el pH disminuye (Leslie y Summerell, 2006).

En medio Agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA) dichas colonias forman esporodoquios en la superficie del medio de color naranja pálido (Figura 26), los cuales analizados a nivel microscópico revelan los macroconidios (Figura 27). Además se observó pigmentación rosa a rojizo debajo del papel de filtro (Figura 28), la cual analizada en microscopio reveló fialides y clamidosporas (Figura 29 y 30).

De todos los aislamientos se volvieron a realizar cultivos monospóricos (Nelson et al., 1983) para asegurar que no estuvieran contaminados.

4. DISCUSION

4.1 Quimiotipo vs. Genotipo

Los perfiles de producción de tricotecenos por *Fusarium graminearum* generalmente se determinaban por métodos químicos (Miller et al., 1991), es decir que se realizaba la determinación del quimiotipo. Más recientemente, la incorporación de técnicas moleculares dio lugar a un gran número de estudios en los cuales se realiza la determinación del genotipo, es decir que se determina molecularmente la presencia de los genes que regulan la producción de los diferentes tricotecenos y sus derivados acetilados (Desjardins, 2008, Chandler et al., 2003, Ward et al., 2002).

Según estudios basados en análisis químicos realizados en el área de cultivo de trigo de Argentina, los aislamientos de *F. graminearum* encontrados fueron predominantemente productores de DON y 15-ADON (Fernández Pinto et al., 2008, Álvarez et al., 2009, Reynoso et al., 2011). Usando un ensayo de PCR múltiple, Reynoso et al. (2011) y Álvarez et al. (2011) encontraron además que la mayoría de los aislamientos evaluados pertenecían al genotipo 15-ADON.

En los estudios de Fernández Pinto et al. (2008) y Álvarez et al. (2009) se hallaron además, aislamientos de *F. graminearum* s.s. que producían simultáneamente DON, 15-ADON y 3-ADON, y en algunos casos ambos acetilderivados eran producidos en cantidades similares. En estos casos, el análisis químico de los perfiles de producción de tricotecenos de los aislamientos mostraba diferencias con los resultados del genotipo analizados mediante ensayos de PCR, ya que éstos fueron caracterizados molecularmente como genotipo 15-ADON.

La discrepancia encontrada entre el genotipo y los datos químicos confirman que la genotipificación por sí sola no es suficiente para predecir todo el perfil de tricotecenos que los aislados podrían sintetizar, como también fue hallado por Mugarab de Kuppler et al. (2011).

La PCR múltiple tradicionalmente usada (Quarta et al., 2006) para la diferenciación de los genotipos 3-ADON y 15-ADON utiliza primers que amplifican la región *Tri3*. Recientemente, Alexander et al. (2011) postularon que *Tri3* no es una región determinante para discriminar entre genotipos 3-ADON y 15-ADON y que *Tri8* era la responsable de esta diferenciación. *Tri8* se requiere para la conversión de 3,15-diADON a 3-ADON o 15-ADON. En el genotipo 3-ADON, la enzima *Tri8* es una tricotecen-C-15-esterasa (desacetilasa), mientras que en el genotipo 15-ADON es una tricotecen-C-3-esterasa. Según sus resultados, la actividad diferencial de *Tri8*, más que la falta de *Tri3* en algunos aislamientos, es determinante de los genotipos 3-ADON

DISCUSION

o 15-ADON. Los autores sugieren que la baja producción de 3-ADON en un aislamiento genéticamente caracterizado como 15-ADON es más probablemente debida a la actividad de *Tri101*, que actúa como una C-3 acetiltransferasa sobre DON. Como DON no es el sustrato preferido de *Tri101*, la conversión de 3-ADON es lenta. Por otro lado, la producción de cantidades bajas de 15-ADON por aislamientos caracterizados genéticamente como 3-ADON podría explicarse por la acción de *Tri3* acetilando DON en C-15. DON es de nuevo un mal sustrato para *Tri3*, y esto justificaría la baja producción. De acuerdo con sus resultados, *Tri8* es específica para la desacetilación en C-3 o C-15 en los aislados productores de 15-ADON o 3-ADON respectivamente. Todavía queda por investigar si la actividad *Tri8* es la base para la producción de 3-ADON y 15-ADON en cantidades relativamente similares por algunos aislados. Si *Tri8* puede tener ambas actividades, es decir, catalizar la desacetilación de C-3 y C-15 del 3,15-ADON, parece posible que un aislado que puede producir DON también pueda producir ambos derivados acetilados si la actividad *Tri8* se interrumpe o la enzima no cataliza completamente ambas reacciones.

La producción simultánea de 3-ADON y 15-ADON en cantidades comparables por *F. graminearum* s.s. también fue reportada por Szécsi et al. (2005), Fernández Pinto et al. (2008) y Álvarez et al. (2009). Anteriormente, Sugiura et al. (1990) habían informado la coproducción de ambos acetil derivados por cepas de *G. zeae* (teleomorfo de *F. graminearum*) aisladas de cebada y trigo de Japón. Curiosamente, todos estos estudios tienen en común que la incubación de las cepas para la producción de tricotecenos se realizó a dos temperaturas diferentes, diferenciándose de los estudios que solo incuban a 25 °C por 28 días, obteniéndose en este último caso la producción de un único acetil derivado (Ward et al., 2002, Chandler et al., 2003). Sugiura et al. (1990) encontraron diferencias entre la producción de DON y sus acetil derivados cuando los cultivos se incubaron a 25 °C durante 21 días en comparación con la incubación de 2 semanas a 25 °C seguido de dos semanas a 4 °C. Las primeras condiciones de incubación produjeron DON y ambos acetil derivados en cantidades similares, pero no se detectó 3-ADON en el segundo conjunto de condiciones. Las condiciones de incubación para el resto de los estudios que obtuvieron los dos acetil derivados en cantidades similares para un número representativo de cepas, fue de 2 semanas a 10 °C seguido de 2 semanas a 25 °C.

Las condiciones ambientales tienen el potencial de afectar dramáticamente la biosíntesis de metabolitos secundarios, esto podría ser una posible explicación de los resultados observados en dichos estudios. Sugiura et al. (1990) propusieron una actividad enzimática que cataliza la conversión de 3-ADON a 15-ADON regulada por la temperatura. También es posible que, si *Tri8* pudiera tener la doble actividad de

DISCUSION

catalizar la desacetilación C-3 y C-15 de 3,15-ADON, para dar 15-ADON y 3-ADON respectivamente, ésta fuera regulada por la temperatura u otras condiciones ambientales. En consecuencia, la discrepancia entre el genotipo y los análisis químicos se podría explicar por la dependencia con las condiciones de crecimiento. Por lo tanto, ambos tipos de análisis son necesarios para reflejar la posible contaminación con tricotecenos. Además el desarrollo de nuevos conjuntos de primers diseñados sobre la base de la región *Tri8* es necesario para diferenciar los genotipos de los acetilderivados.

De 25 cepas de *F. graminearum* s.s. con genotipo 15-ADON, pero que en el análisis químico demostraban la capacidad de coproducir 3- y 15-ADON, se seleccionó para el análisis de los efectos de los parámetros ambientales la cepa ITEM 8606. Dicho aislamiento fue el que produjo DON, 3-ADON y 15-ADON en mayor cantidad, además de poseer la característica de conservar su capacidad toxicogénica a lo largo del tiempo.

4.2. Influencia de los factores ambientales en la producción relativa de DON, 3-ADON y 15 ADON

Se observó que las condiciones óptimas de temperatura para la producción de DON y 3-ADON por *Fusarium graminearum* s.s. se encuentran entre 25 y 30 °C, dependiendo de la a_w (0,95 y 0,99 respectivamente), siendo 3-ADON la toxina que se acumula en mayor cantidad (61,9 µg/g) a los 21 días de incubación a a_w 0,99 y 30 °C. La máxima cantidad de 15-ADON (34,9 µg/g) se produce a una temperatura mucho menor (10 °C) a ambas actividades acuosas.

Por el contrario las mínimas producciones de 3-ADON se registran a 10 °C y las de 15-ADON a 30 °C, independientemente de la a_w , mientras que para DON los mínimos se encuentran en condiciones intermedias de temperatura y varían según la a_w (25 y 15 °C respectivamente).

El análisis estadístico mostró que tanto la a_w , como la temperatura y el tiempo de incubación, así como las interacciones entre estos factores, resultaron significativos sobre la producción de DON y 3-ADON. La a_w no produjo un efecto significativo sobre la producción de 15-ADON, aunque sí lo hicieron la temperatura, y el tiempo de incubación.

Estos resultados estarían en concordancia con la teoría de que la desacetilación en C-3 y C-15 de 3,15-ADON, para dar 15-ADON y 3-ADON respectivamente está regulada por la temperatura u otras condiciones ambientales como la a_w (Sugiura et al. 1990).

DISCUSION

Comerio et al. (1999) estudiaron la influencia de la a_w (0,98, 0,945, 0,925 y 0,90) a 25 °C en la producción de DON sobre granos de trigo irradiados e inoculados con una cepa de *F. graminearum*. La máxima acumulación de DON se obtuvo a a_w 0,98. No se estudiaron otras temperaturas.

En otro trabajo realizado por Ramírez et al. (2006) sobre trigo irradiado acondicionado a a_w de 0,995, 0,97, 0,95, 0,93 y 0,90 se inocularon dos cepas de *F. graminearum* que fueron incubadas a 5, 15, 25 y 30 °C, por periodos entre 7 y 49 días. Las máximas cantidades de DON fueron acumuladas por las dos cepas a 30 °C y a_w 0,95 a las 6 semanas de incubación.

Mylona et al. (2012) sembrando una cepa de *F. graminearum* sobre trigo irradiado acondicionado a a_w 0,89, 0,94 y 0,97 e incubado a 15, 20, 25 y 30 °C por 10 días obtuvo la máxima acumulación de DON a a_w 0,97 y 30 °C.

Todos estos resultados coinciden con los del presente trabajo.

Kokkonen et al. (2010) sembraron 3 cepas de *F. graminearum* productoras de DON y 3-ADON en una mezcla 1:1:1 de granos de trigo, avena y cebada autoclavados, incubándolos por 4 semanas a tres combinaciones de a_w /temperatura (0,994/15 °C; 0,994/ 25 °C; 0,960/25 °C). Las máximas acumulaciones de DON y 3-ADON se produjeron a la combinación 0,960/25 °C.

Llorens et al. (2006) investigaron la producción de DON y 3-ADON de siete cepas de *F. graminearum* sobre granos de maíz autoclavado acondicionados a a_w 0,960, 0,970 y 0,980 e incubados a 15, 20, 28 y 32 °C por 21 días. Las máximas acumulaciones de toxina se produjeron a 28 °C para DON y a 15 °C para 3-ADON, produciéndose siempre mayores cantidades de 3-ADON que de DON.

Si bien estas dos investigaciones coinciden con algunos de los resultados del presente trabajo, como la mayor producción de 3-ADON y el máximo de producción de DON a 28 °C, otros resultados difieren (máxima producción de DON y 3-ADON a a_w 0,960 y 25 °C y máxima producción de 3-ADON a 15 °C).

Las diferencias pueden ser atribuidas a que estos dos trabajos antes mencionados fueron realizados sobre sustratos distintos al agar trigo empleado (mezclas de granos y granos de maíz autoclavados), pudiéndose considerar que la producción de las diferentes toxinas de *F. graminearum* presenta variación respecto al sustrato sobre el cual el hongo crece. Esto marca la importancia del estudio del comportamiento fisiológico respecto a la producción de estos metabolitos sobre cada sustrato en particular.

DISCUSION

No se han encontrado hasta el presente datos en la literatura sobre la influencia de los parámetros ambientales sobre la producción de 15-ADON, por lo que éste sería el primer trabajo que presenta datos al respecto.

4.3. Efecto del cambio climático sobre la prevalencia de producción de uno u otro derivado acetilado.

F. graminearum parece tener una distribución geográfica definida, ya que es una de las especies más comunes en el norte de Europa (Escandinavia, Finlandia y el noroeste de Rusia) y Asia (Siberia y el este de Rusia), donde es uno de los principales agentes causales de epidemias de FHB. *F. graminearum* s.s. está reemplazando a *F. culmorum* en esta área (Yli-Mattila, 2010).

Es también una de las especies causantes de FHB más frecuentes e importantes en Norte y Sudamérica (Fernández Pinto et al., 2013)

F. asiaticum es la especie más común en China y Japón. Con respecto a los quimiotipos, en China predomina el quimiotipo 3-ADON de dicha especie en regiones con temperaturas medias por encima de los 15°C, mientras que en regiones más frías con temperaturas medias por debajo de 15°C, predominan *F. graminearum* s.s. y el quimiotipo 15-ADON (Zhang et al., 2007).

El quimiotipo 3-ADON es prevalente en Escandinavia, Finlandia y el Noreste de Rusia, mientras que el quimiotipo 15-ADON tiene mayor incidencia en el Reino Unido, Austria, Alemania y el sur de Rusia (Yli-Mattila, 2010).

En Norteamérica se ha producido un cambio sustancial con respecto al quimiotipo de la población de *F. graminearum* s.s. que se encontraba en esta región. El quimiotipo 3-ADON está reemplazando al quimiotipo 15-ADON, siendo los aislamientos de la población pertenecientes al quimiotipo 3-ADON más agresivos y con la particularidad de poder acumular más DON en los granos infectados (Ward et al., 2008).

En Sudamérica predomina el quimiotipo 15-ADON aunque también se aísla el 3-ADON (Fernández Pinto et al., 2013).

Tanto la distribución geográfica de las especies como de los quimiotipos está influenciada fuertemente por los factores climáticos, el calentamiento global tendrá entonces un gran impacto en esta distribución. El estudio de estos factores permitirá predecir el riesgo al que están expuestos los cultivos susceptibles en este nuevo escenario.

RESULTADOS

Fusarium graminearum aislamiento ITEM 8606



Figura 24. Crecimiento en PDA

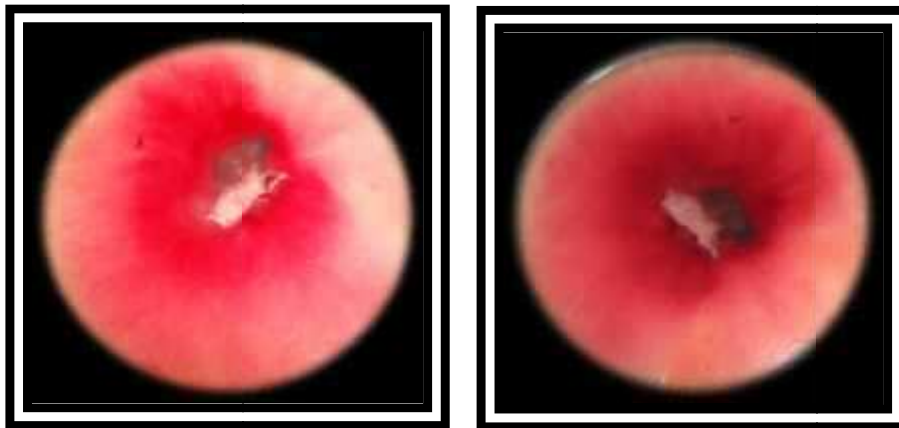


Figura 25. Reverso de placas PDA

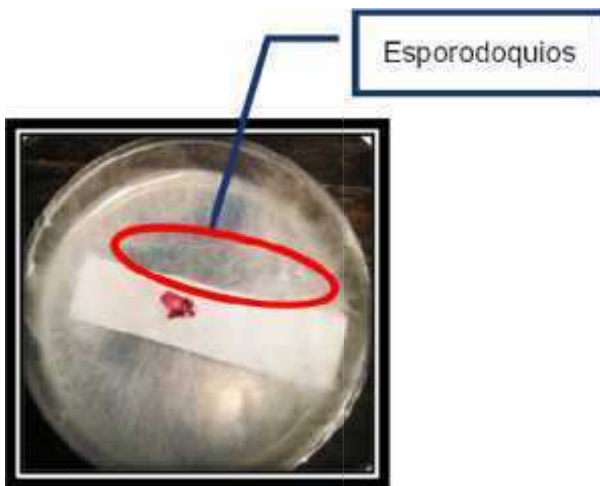


Figura 26. Esporodoquios en SNA

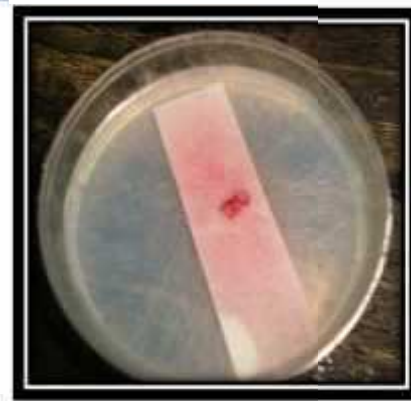


Figura 27. Pigmentación rosa-rojiza en SNA

RESULTADOS

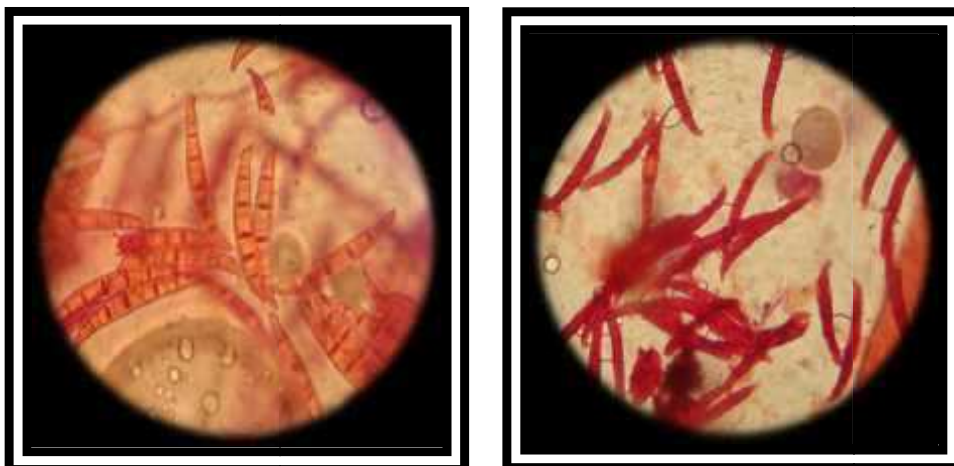


Figura 28. Macroconidios

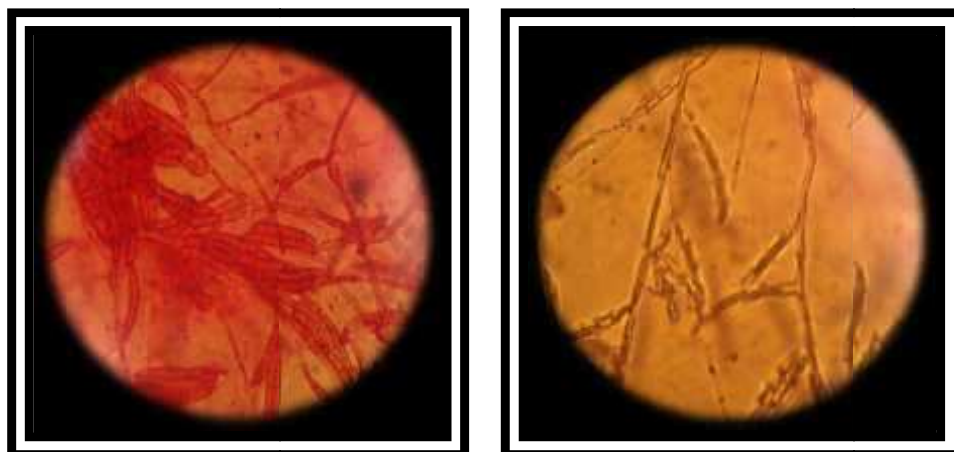


Figura 29. Fiálides

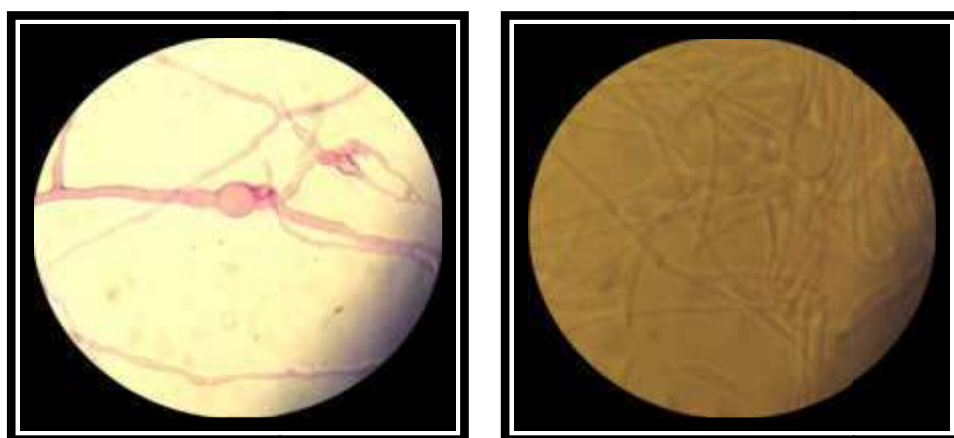


Figura 30. Clamidosporas

RESULTADOS

3.2 Determinación de la capacidad toxicogénica de las cepas de *Fusarium*

3.2.1 Extracción y detección de tricotecenos

Para el análisis de tricotecenos (DON, 3-ADON y 15-ADON) se utilizó la técnica de extracción descrita por Trucksess et al. (1984) realizando modificaciones que incrementen la recuperación de los tricotecenos menos polares (3- y 15-ADON) por efecto del salting-out; para esto se utilizó acetato de etilo-acetonitrilo-agua 50:41:9 en lugar de acetonitrilo-agua 84:168 (Rizzo et al., 1995, 1997). Se incluyó además el agregado de sulfato de amonio al extracto antes de su elución en la columna (Corteau et al., 1994). En estas condiciones fue posible obtener una recuperación del 90% (en ensayos por triplicado) para todos los tricotecenos analizados, como fue reportado por Rizzo et al., (1995, 1997).

La determinación de los tricotecenos se realizó por cromatografía gaseosa (GC) con un detector de captura de electrones (ECD), que tiene una alta sensibilidad y selectividad a los compuestos electronegativos. Se utiliza esta técnica porque los tricotecenos no son analitos fluorescentes, y tampoco absorben intensamente en el rango UV-visible. Todos los métodos de GC requieren derivatización de los grupos hidroxilos de estas toxinas, aumentando de esta manera la sensibilidad. La elección del reactivo para la derivatización depende del tipo de tricoteceno que va a ser analizado y del método de detección. Los derivatizantes reaccionan con los grupos hidroxilos de los tricotecenos formando distintos ésteres según el derivatizante utilizado. Se presenta un inconveniente con los derivados sililados que por las altas temperaturas en la que se encuentra el detector (250-300 °C), se deposita dióxido de silicio. De ahí que para este trabajo se utilizó como derivatizante el anhídrido trifluoroacético (TFAA) que es más reactivo y más volátil y el cual va fijar átomos de flúor en las toxinas haciéndolas más estables térmicamente y fácilmente detectadas por ECD.

Las condiciones del cromatógrafo utilizadas para este trabajo fueron descritas en ítem 2.6.1. Estas mismas fueron elegidas ajustando las temperaturas del horno, inyector y detector.

Para la elección de la temperatura del horno tuvimos en cuenta que estos equipos permiten programar rampas de velocidad de calentamiento del horno con lo que se pueden separar bien los picos de interés de las interferencias presentes. La mayoría eluye en los primeros minutos por lo que con la primera rampa se eliminarán las

RESULTADOS

interferencias del extracto de la muestra y los solventes usados. Con la segunda y/o tercera rampa se separaran las diferentes toxinas entre sí y de los interferentes más específicos. Además consideramos que algunas de estas toxinas pueden ser termosensibles, por lo que incrementamos los cuidados en las temperaturas para que no aparezcan picos de degradación en los cromatogramas.

El inyector es importante en el “modo” en que se trabaja, pues en el análisis de trazas la muestra debe entrar completamente en la columna. Esto permite una mayor concentración de las toxinas. Controlar el modo de inyección se logra por medio del manejo de la válvula de purga en el momento de la inyección. En el presente trabajo utilizamos el modo “splitless” sin división, válvula de purga cerrada, para que entre toda la muestra. Si la válvula se encuentra abierta, modo “Split” con división, parte de la muestra se pierde y disminuye la sensibilidad. La temperatura del inyector fue elegida de modo tal que volatilice la muestra derivatizada pero que no la altere térmicamente (pirolíce) y de esa forma entre intacta a la columna.

La temperatura del detector fue elegida de modo que diferentes sustancias cuando salgan de la columna no queden retenidas por el detector, o sea la temperatura del detector fue superior en unos 20-30 °C a la de la columna, para mantener de esta forma limpio el detector y mantener la sensibilidad del mismo.

En cuanto al uso del gas carrier y/o gas auxiliar se escoge el mismo o diferente gas para ambas funciones según la conveniencia o el grado de exactitud y rapidez del análisis. El gas auxiliar es el que circula por el detector ECD y debe ser de muy buena calidad, puede utilizarse nitrógeno o helio. Además necesita un alto flujo (50-60 ml/min) por ello se decidió utilizar nitrógeno ya que a igualdad de comportamiento éste es más económico que el helio. El gas carrier es el que va por la columna y es el que eluye a la muestra. Puede ser el mismo nitrógeno que se utiliza para el detector o helio o hidrogeno. El hidrogeno es de mejor resolución que el helio y este que el nitrógeno. Debido a que la resolución fue suficiente con nitrógeno como gas carrier, se lo seleccionó, además de por razones económicas y de seguridad.

La columna que se empleó fue una columna capilar de mediana polaridad (RX5-MS), debido a que ésta presenta una excelente performance, permitiendo separar perfectamente DON, 3- y 15-ADON.

Como patrón interno utilizamos el 2-amino-5-clorobenzofenona (ACBP) debido a que tiene una estructura similar a la de los analitos a cuantificar; además porque es

RESULTADOS

detectada con una sensibilidad y reproducibilidad adecuada; y también porque eluye en la mitad del cromatograma y próximo a los analitos de interés. Con la técnica del patrón interno, se estandarizan los parámetros y los resultados y permite asegurarse además que la corrida y el equipo se encuentran en correctas condiciones.

3.2.2 Curvas de calibración

Los estándares de micotoxinas cuantificados se presentaron en envases color ámbar en un volumen de 1 ml con una concentración de 100 µg/ml en acetonitrilo.

Las curvas de calibración fueron realizadas en un rango de concentración tal que la cantidad de masa de toxina inyectada fuese de 50, 100, 200, 300 y 400 pg. Se construyeron las curvas de calibración para cada una de las toxinas graficando el área relativa (AR) (que es la relación del área de la toxina y del estándar interno, ACBP) versus la concentración en cada punto y se comprobó el rango de linealidad mediante una curva de regresión (figura 31). Los datos de las curvas de calibración de los estándares para las diferentes toxinas se detallan en la Tabla 7. La figura 32 muestra los cromatogramas correspondientes a los estándares de las toxinas.

Los datos de tiempos de retención de las toxinas y del estándar interno se detallan en la tabla 8.

3.2.3 Limite de cuantificación

El límite de cuantificación es la mínima concentración cuantificable con una precisión y exactitud aceptable y se define como 3 veces el límite de detección.

El valor del límite de detección fue de 20 µg/kg para DON y 3-ADON y 25 µg/kg para 15-ADON, a una relación señal/ruido de 3.

La figura 33 corresponde al cromatograma por GC-ECD de la cepa estudiada.

RESULTADOS

Tabla 7. Curvas de calibración de los estándares

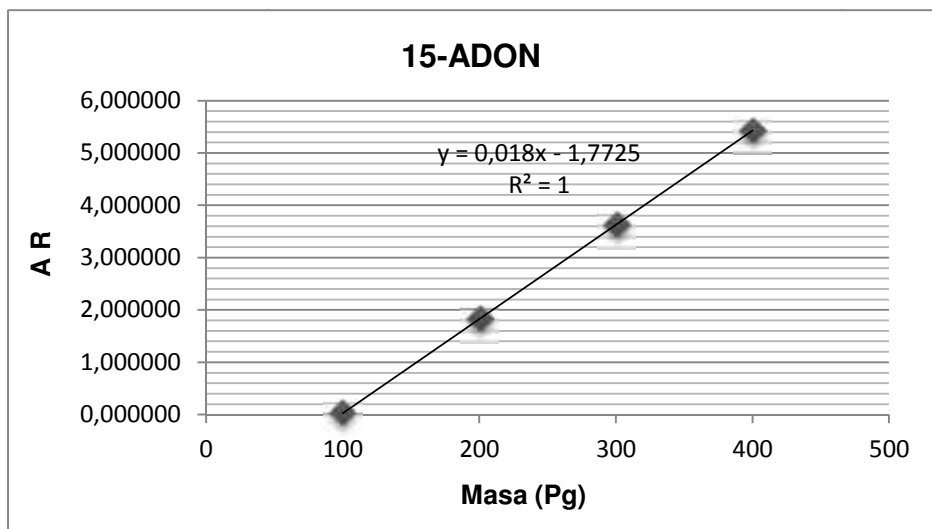
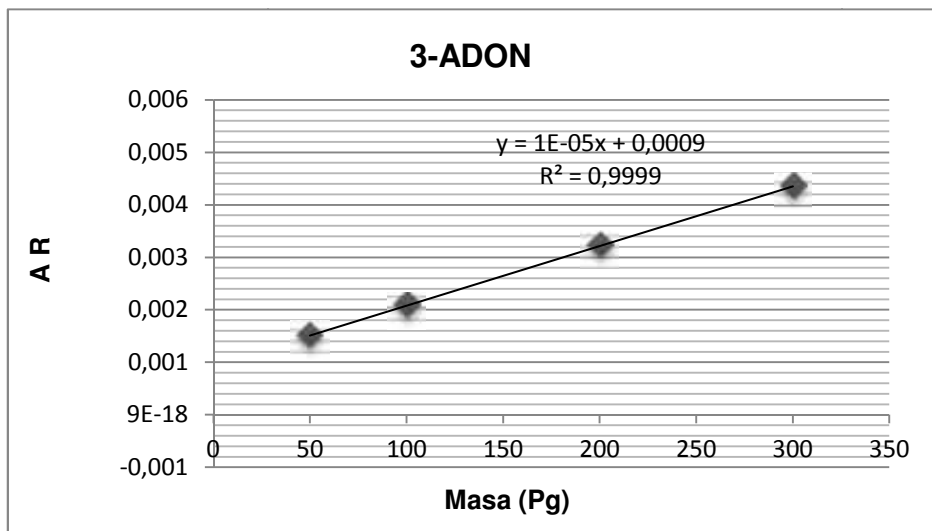
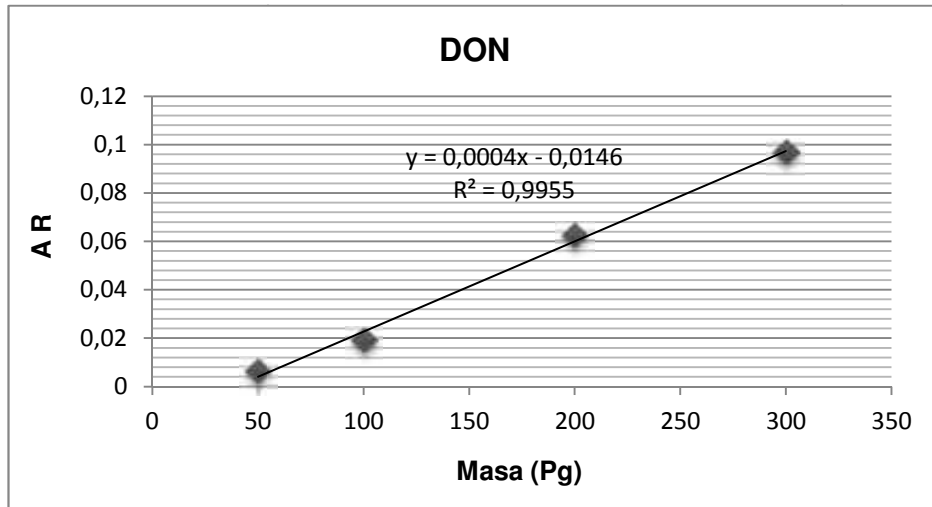
Masa (pg)	Área Relativa		
	DON	3-ADON	15-ADON
50	0,00609	0,00151	
100	0,01906	0,00207	0,02800
200	0,06228	0,00323	1,82800
300	0,09672	0,00434	3,62700
400			5,42900
R²	0,9955	0,9999	1

Tabla 8. Tiempo de retención de las toxinas y del estándar interno (ACBP) por GC-ECD

MICOTOXINA	Tiempo de retención de la toxina (min)	Tiempo de retención del ACBP (min)	Tiempo de retención relativo (TR)
DON	8,7	9,704	0,8965
15-ADON	9,4	9,704	0,9686
3-ADON	10,2	9,704	1,0511

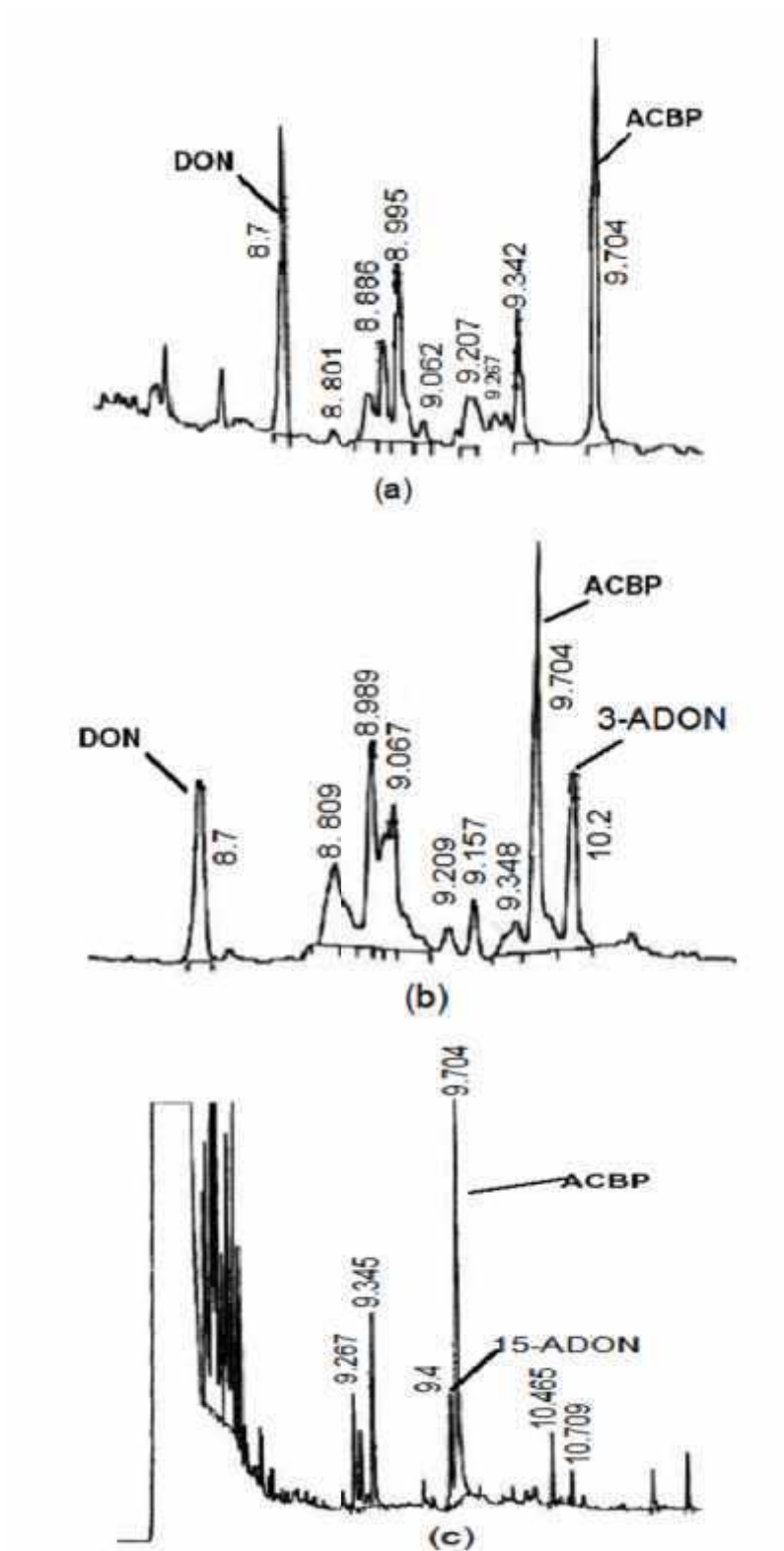
RESULTADOS

Figura 31. Curvas de calibración de las toxinas



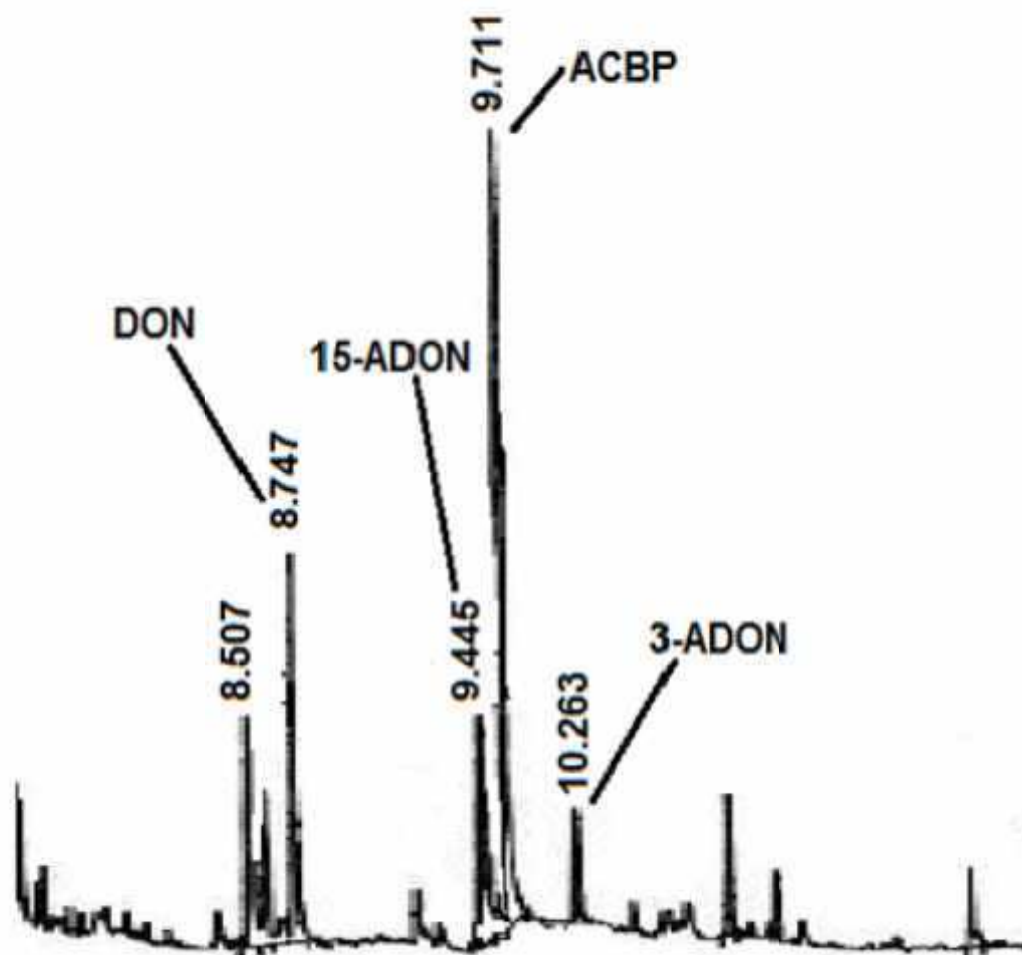
RESULTADOS

Figura 32. Cromatogramas obtenidos para los estándares de toxinas. a) DON; b) 3-ADON; c) 15-ADON



RESULTADOS

Figura 33. Cromatograma del aislamiento ITEM 8606



RESULTADOS

3.2.4 Confirmación por Cromatografía Gaseosa acoplada a un detector de Espectrometría de Masa (GC-MS)

Los iones empleados para confirmar la presencia de las micotoxinas se muestran a continuación en la tabla 9.

Se confirmaron los perfiles de producción de tricotecenos de las cepas de referencia ITEM 8606, 8602, 8615, 8609 y 8607, obteniéndose resultados similares para todas ellas.

Tabla 9. Tiempo de retención y fragmentos de los iones más característicos de cada una de las micotoxinas por GC-MS

MICOTOXINA	TIEMPO DE RETENCION (min)	MASA DE FRAGMENTOS (m/z)
DON	9.26	117
		145
		231
		194
		259
		343
		371
584		
15-ADON	10.26	133
		145
		221
		277
		344
3-ADON	10.44	123
		163
		221
ACBP	10.37	230

DON: deoxinivalenol

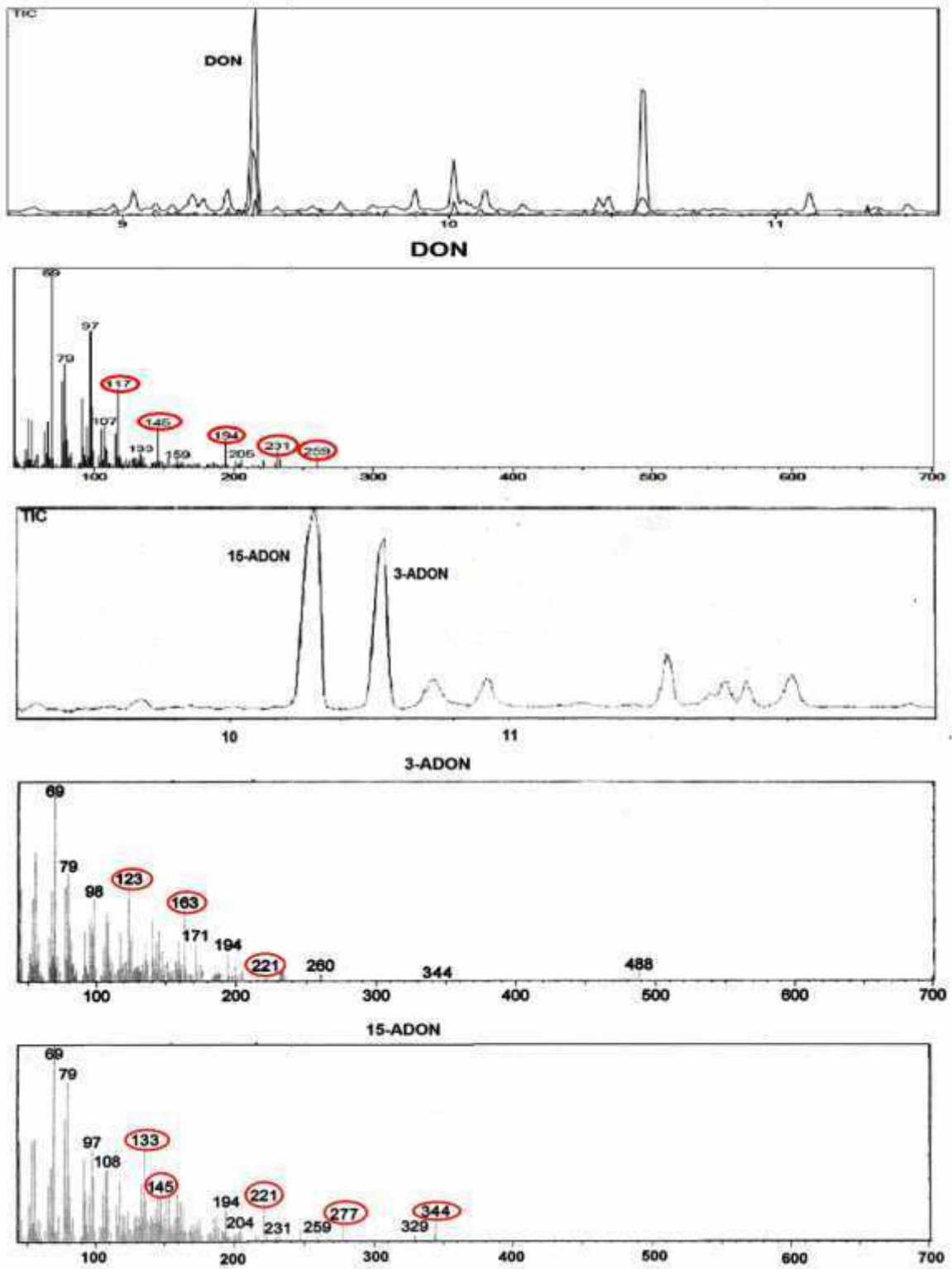
3-ADON: 3-actildeoxinivalenol

15-ADON: 15-acetildeoxinivalenol

Las figuras 34 y 35, muestran los Cromatogramas de los estándares (DON, 3-ADON y 15-ADON) y de la cepa ITEM 8606, obtenidos por Cromatografía Gaseosa con detector de Espectrometría de Masa.

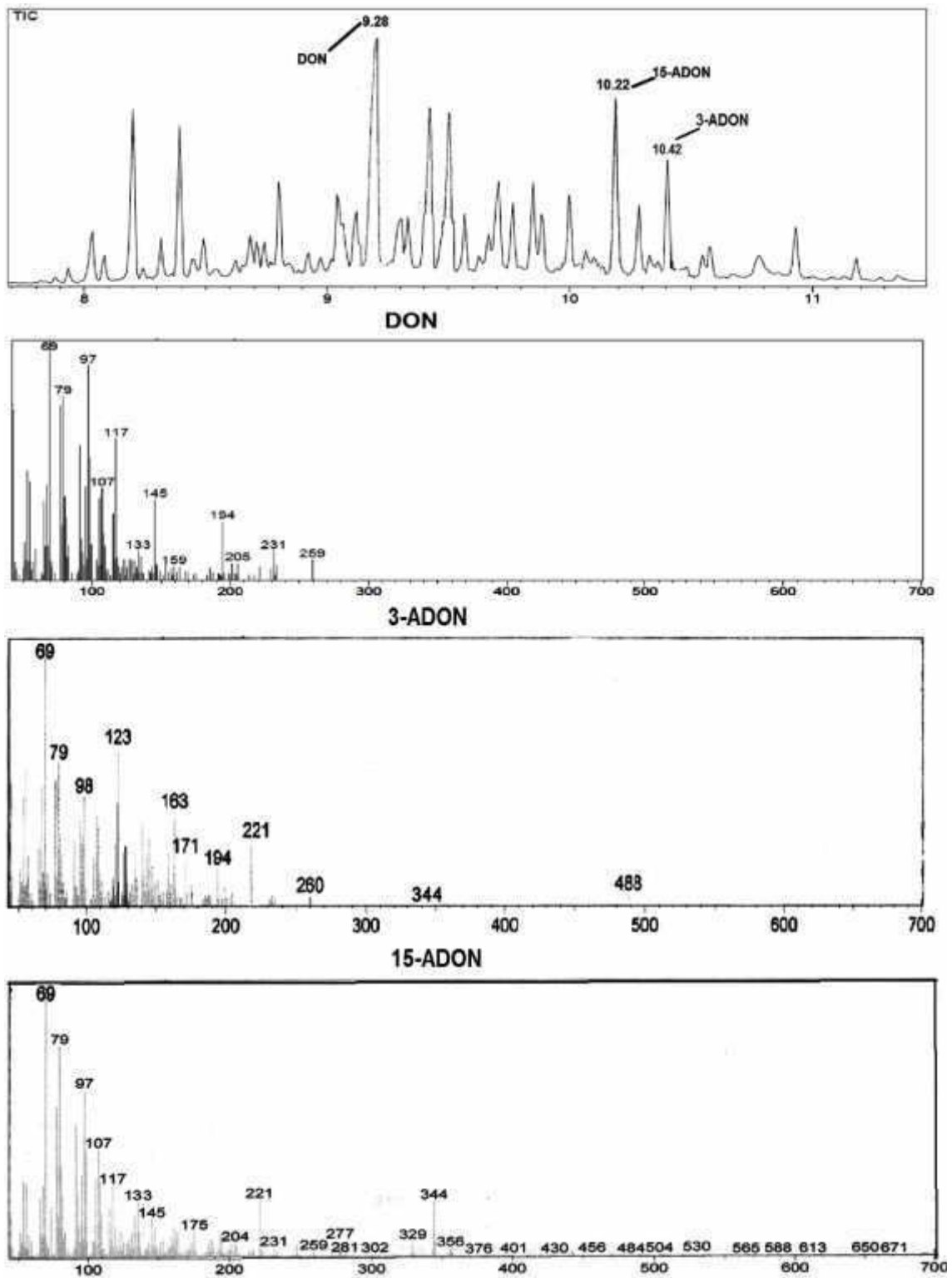
RESULTADOS

Figura 34. Cromatogramas de los estándares DON, 3-ADON y 15-ADON obtenidos por Cromatografía Gaseosa con detector de Espectrometría de Masa



RESULTADOS

Figura 35. Cromatograma del aislamiento ITEM 8606 por GC-MS



RESULTADOS

3.2.5 Perfil de producción de tricotecenos de las cepas seleccionadas

La producción de las cepas estudiadas se detalla en la tabla 10. De las 25 cepas de *F. graminearum*, 21 (84%) produjeron DON en un rango de 12,88-335,69 µg/g; 24 (96%) produjeron 3-DON en un rango de 31,0867-40614,2828 µg/g y 24 (96%) produjeron 15-ADON en un rango de 30,8433-34,5045 µg/g.

Tabla 10. Producción de tricotecenos por aislados de *Fusarium graminearum*

Aislamientos	Toxinas (µg/g)		
	DON	3-ADON	15-ADON
8606	335,6	40614	34,50
8616	31,38	37,05	31,50
8602	48,13	4500	33,15
97 - B	19,47	135,6	31,29
I - 4	17,98	31,08	31,28
8623	18,52	137,9	31,18
11 - B5	27,08	118	
8614	96,19		
8615	60,26	311,4	31,77
8609	18,61	106,5	31,07
6 - A3	21,58	129,08	31,09
11 - A2	14,96	183,2	31,03
1 -24- 5		251,3	31,43
16-A3	23,90	335,2	31,45
L - 24 - 1	118,87	95,60	31,43
4 B 4	14,05	129,2	31,08
I - 3		246,2	31,28
2 - 24	12,88	225,9	31,02
9 - 2		223,8	31,12
9 - 6		157,6	30,95
G - 3	15,19		30,84
R2 - 9	14,54	92,89	31,46
2 - 29	15,06	191,4	31,15
8607	58,15	122,4	31,37
20 - B5	24,44	774,2	31,53

RESULTADOS

3.3 Efecto de la actividad del agua (a_w) y de la temperatura sobre la producción de tricotecenos en *Fusarium graminearum*

3.3.1 Aislamiento estudiado

La cepa utilizada para este estudio fue ITEM 8606 de *Fusarium graminearum*. Esta cepa fue aislada de trigo en la provincia de Buenos aires, subregión IV, en la cosecha 2002. Además fue el aislado de referencia con la mayor capacidad de producción de DON (335,69 $\mu\text{g/g}$), 3-ADON (40614,28 $\mu\text{g/g}$) y 15-ADON (34,504 $\mu\text{g/g}$), en el análisis por GC-ECD y confirmado por GC-MS (Figura 35). Estudios moleculares previos han identificado esta cepa como *F. graminearum* s.s y quimiotipo molecular 15-ADON (Álvarez et al., 2011).

3.3.2 Efecto de la actividad de agua (a_w) y temperatura sobre la producción simultánea de DON, 3-ADON y 15-ADON

La producción de tricotecenos de la cepa ITEM 8606 a las diferentes a_w y temperaturas evaluadas luego de 7, 14, 21 y 28 días de incubación, se detalla a continuación en las Tablas 11, 12 y 13.

Las condiciones de incubación en las cuales se observan los máximos de producción de cada toxina se muestran en la Tabla 14.

Las condiciones de incubación en las cuales se observan los mínimos de producción de cada toxina se detallan en la Tabla 15.

RESULTADOS

Tabla 11. Producción de DON a a_w 0.95 y 0.99 y a diferentes temperaturas luego de 7, 14, 21 y 28 días de incubación.

T (°C)	DON ($\mu\text{g/g}$)							
	0.95 a_w				0.99 a_w			
	7 d	14 d	21 d	28 d	7 d	14 d	21 d	28 d
10	19,313	12,914	13,144	12,927	16,038	18,866	13,471	14,095
15	<LD	13,722	18,815	12,792	18,123	20,366	16,459	13,659
20	17,352	14,145	16,526	15,394	14,474	23,641	15,183	13,269
25	22,514	15,115	25,433	13,911	21,455	28,175	19,200	12,697
30	18,117	15,910	21,822	14,946	20,449	31,174	13,764	13,232

<LD: valor por debajo del Límite de Detección

Tabla 12. Producción de 3-ADON a a_w 0.95 y 0.99 y a diferentes temperaturas luego de 7, 14, 21 y 28 días de incubación.

T (°C)	3-ADON ($\mu\text{g/g}$)							
	0.95 a_w				0.99 a_w			
	7 d	14 d	21 d	28 d	7 d	14 d	21 d	28 d
10	8,0204	8,677	6,848	1,342	21,801	36,760	6,753	14,686
15	12,451	4,834	5,385	4,562	32,730	33,487	17,427	14,798
20	15,515	19,448	3,841	8,892	19,867	27,112	23,084	17,951
25	24,572	6,955	11,317	8,292	32,537	38,529	12,678	16,188
30	11,485	13,786	12,989	3,624	37,924	41,230	61,874	49,988

RESULTADOS

Tabla 13. Producción de 15-ADON a a_w 0.95 y 0.99 y a diferentes temperaturas luego de 7, 14, 21 y 28 días de incubación.

T (°C)	15-ADON ($\mu\text{g/g}$)							
	0.95 a_w				0.99 a_w			
	7 d	14 d	21 d	28 d	7 d	14 d	21 d	28 d
10	33,811	33,374	32,434	34,035	34,962	32,668	31,900	32,087
15	32,813	31,761	32,764	33,561	31,800	33,009	32,317	31,911
20	32,413	31,729	32,540	31,209	32,681	32,507	32,140	32,193
25	31,580	32,310	32,566	31,183	32,433	32,943	31,807	31,897
30	31,975	31,876	32,434	31,160	31,882	32,923	31,930	31,806

Tabla 14. Condiciones de temperatura y tiempo en las cuales se observan los máximos de producción de cada toxina a a_w 0.95 y 0.99 respectivamente.

Toxina	0.95 a_w			0.99 a_w		
	$\mu\text{g/g}$	T (°C)	Tiempo (días)	$\mu\text{g/g}$	T (°C)	Tiempo (días)
DON	25,434	25	21	31,174	30	14
3-ADON	24,572	25	7	61,875	30	21
15-ADON	34,036	10	28	34,962	10	7

RESULTADOS

Tabla 15. Condiciones de temperatura y tiempo en las cuales se observan los mínimos de producción de cada toxina a a_w 0.95 y 0.99 respectivamente.

Toxina	0.95 a_w			0.99 a_w		
	$\mu\text{g/g}$	T ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (días)	$\mu\text{g/g}$	T ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (días)
DON	12,792	15	28	12,697	25	28
3-ADON	1,342	10	28	6,753	10	21
15-ADON	31,160	30	28	31,806	30	28

Se observa que las condiciones óptimas de temperatura para la producción de DON y 3-ADON por *Fusarium graminearum* s.s. se encuentran entre 25 y 30 $^{\circ}\text{C}$, dependiendo de la a_w (0.95 y 0.99 respectivamente), pero la máxima cantidad de 15-ADON se produce a una temperatura mucho menor (10 $^{\circ}\text{C}$) a ambas actividades acuosas.

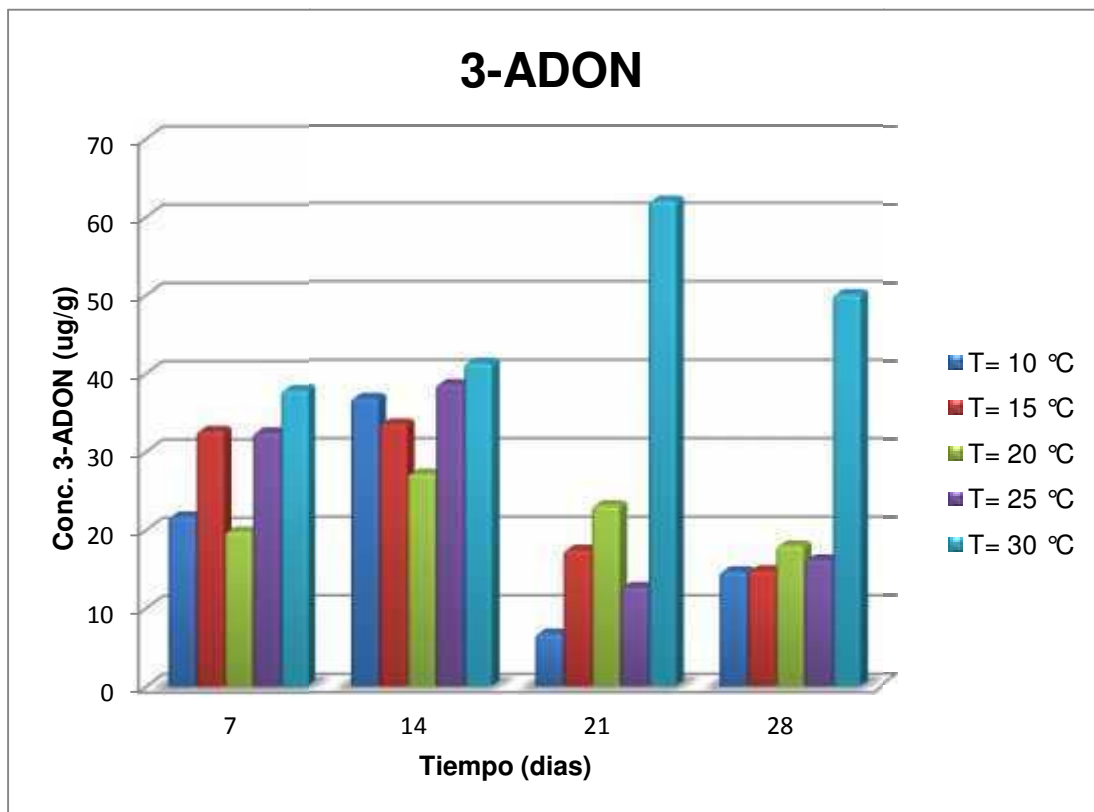
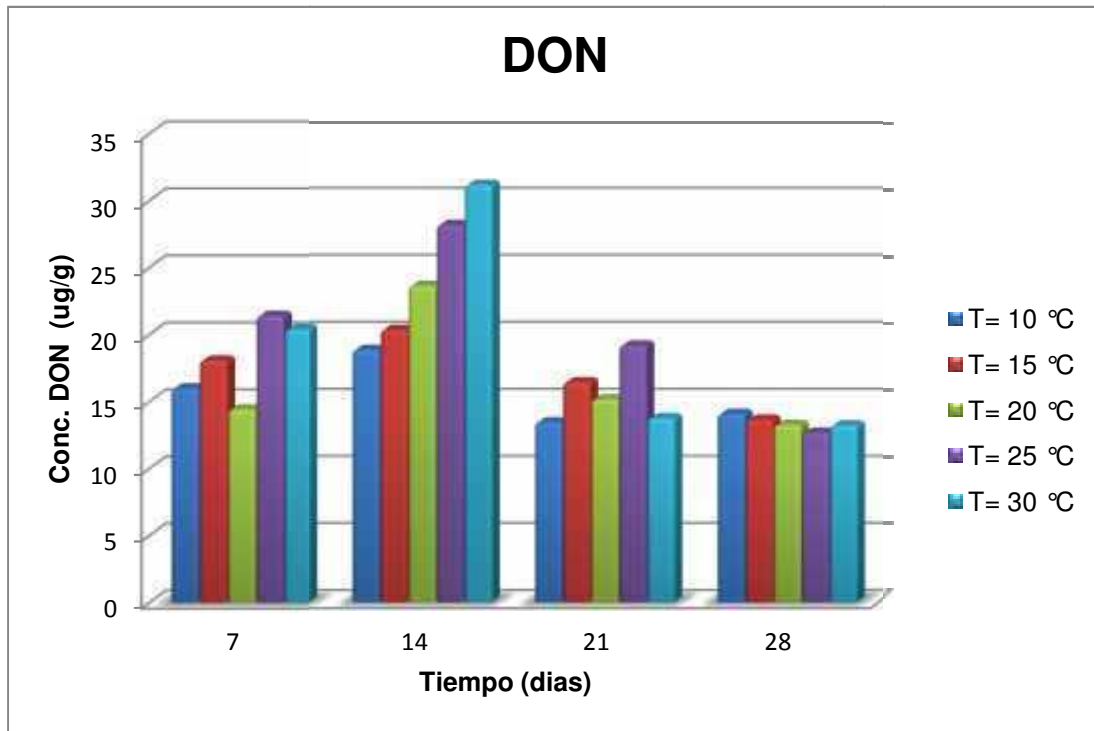
Por el contrario las mínimas producciones de 3-ADON se registran a 10 $^{\circ}\text{C}$ y las de 15-ADON a 30 $^{\circ}\text{C}$, independientemente de la a_w , mientras que para DON los mínimos se encuentran en condiciones intermedias de temperatura, y varían según la a_w .

La figura 36 muestra las cantidades acumuladas de cada una de las toxinas luego de 7, 14, 21 y 28 días de incubación a 10, 15, 20, 25 y 30 $^{\circ}\text{C}$ a una actividad acuosa de 0.99.

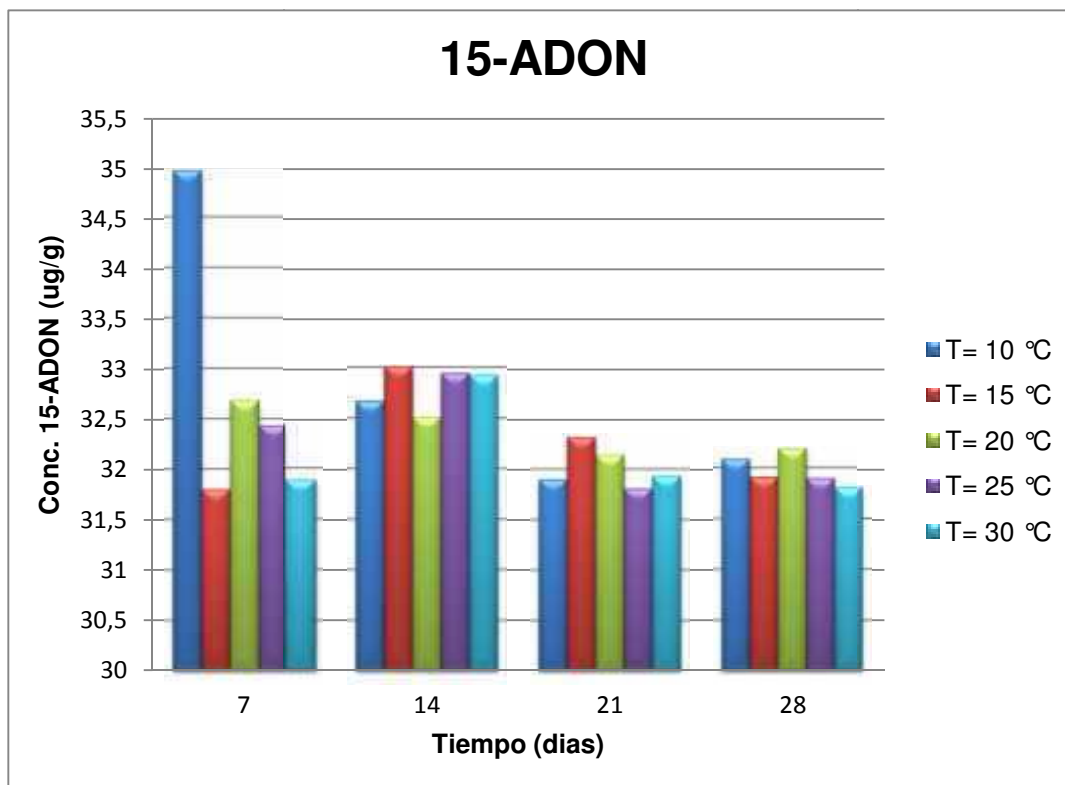
La figura 37 muestra las cantidades acumuladas de cada una de las toxinas luego de 7, 14, 21 y 28 días de incubación a 10, 15, 20, 25 y 30 $^{\circ}\text{C}$ a una actividad acuosa de 0.95.

RESULTADOS

Figura 36. Efecto de a_w 0.99 y diferentes temperaturas sobre la producción de toxinas.

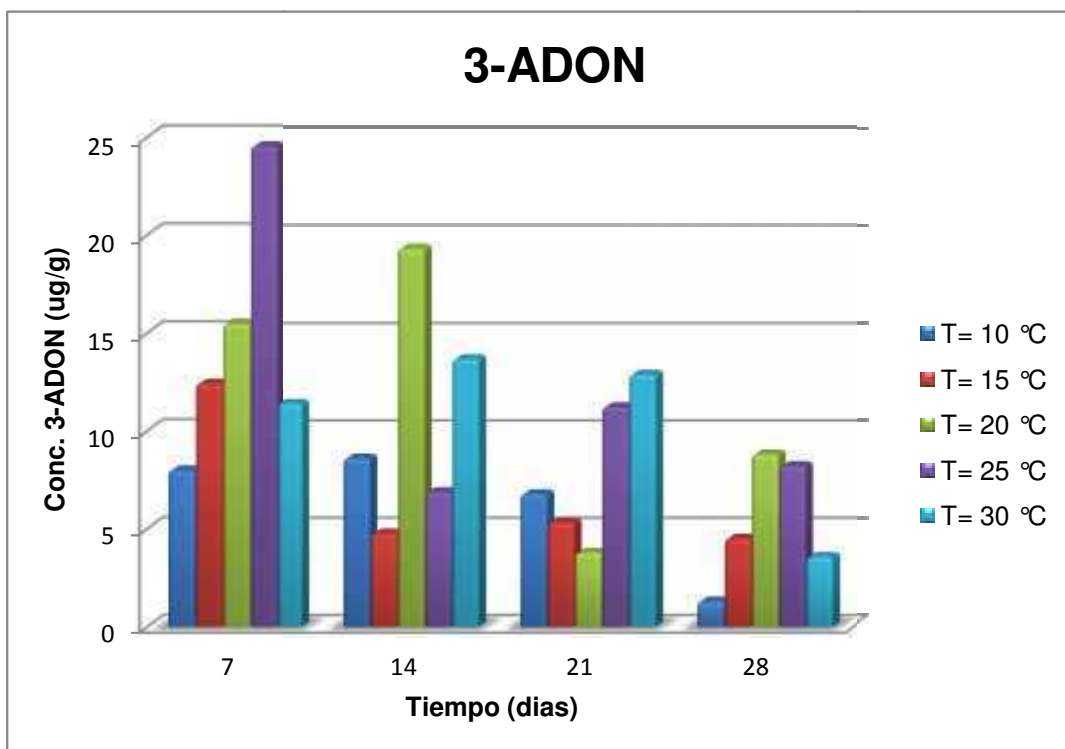
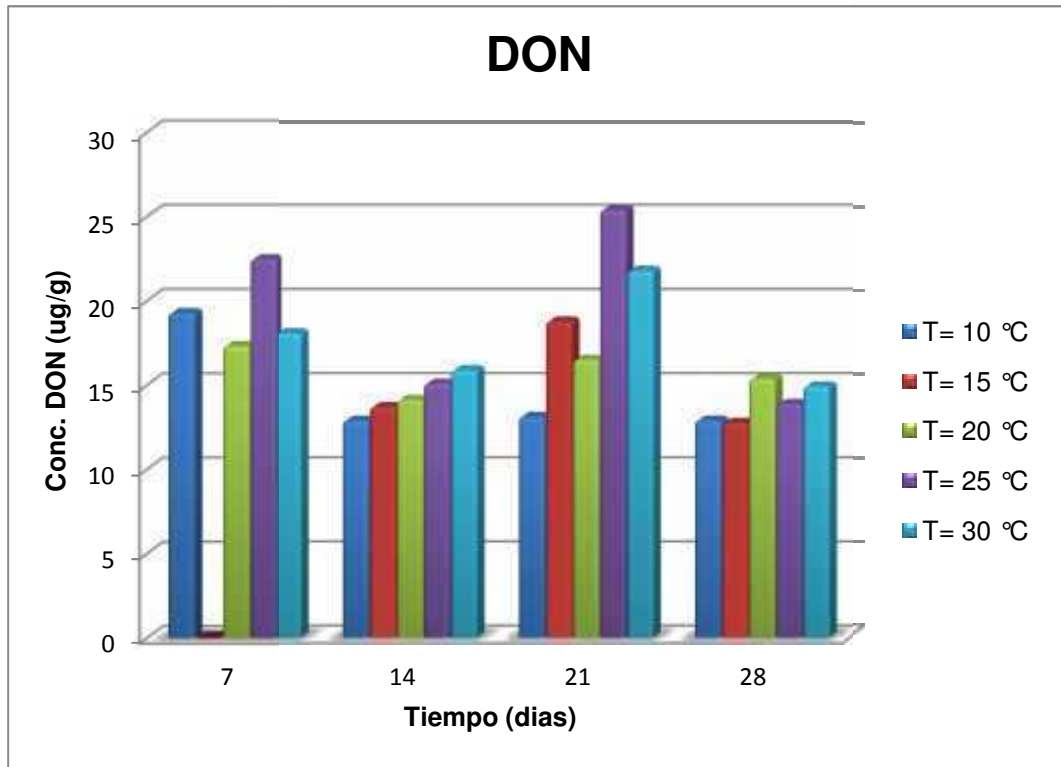


RESULTADOS

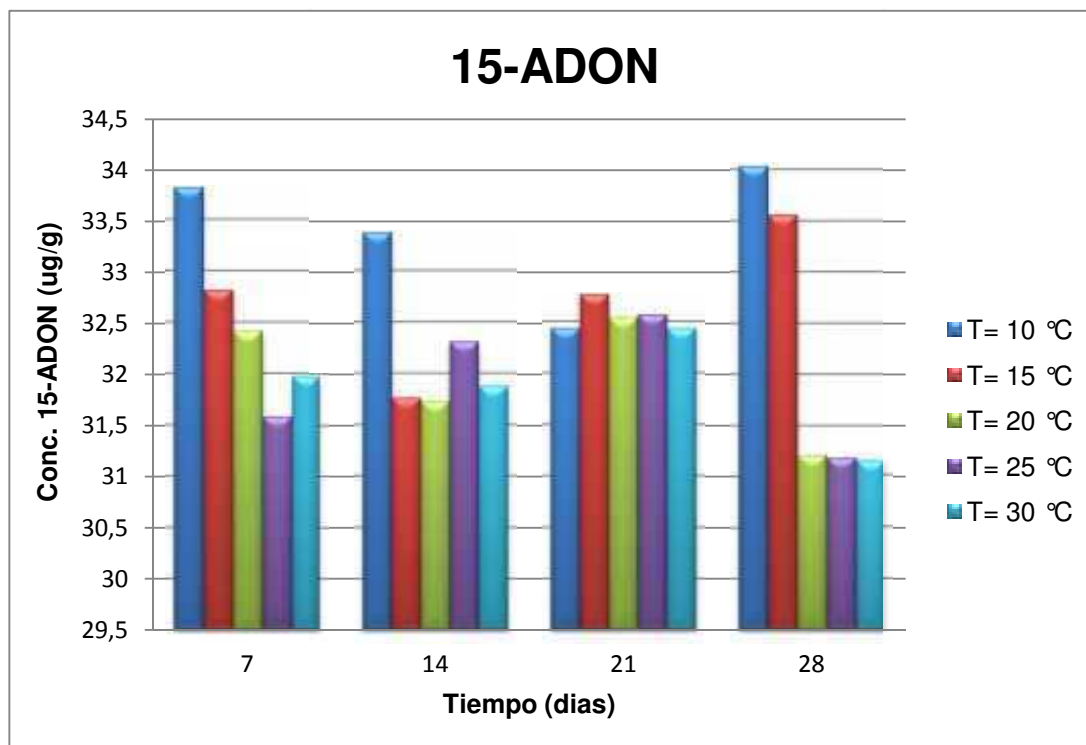


RESULTADOS

Figura 37. Efecto de a_w 0.95 y diferentes temperaturas sobre la producción de toxinas



RESULTADOS



El análisis estadístico (ANOVA) mostró que tanto la a_w , como la temperatura y el tiempo de incubación, así como las interacciones entre estos factores, resultaron significativos sobre la producción de DON y 3-ADON ($p < 0,0001$). En cambio, la a_w no produjo un efecto significativo sobre la producción de 15-ADON ($p = 0,7015$), aunque sí lo hicieron la temperatura, y el tiempo de incubación, así como sus interacciones ($p < 0,0001$).

Las comparaciones a posteriori entre las medias de producción de cada toxina a las diferentes condiciones de a_w , temperatura y tiempo de incubación mostraron que, para DON, no existen diferencias significativas entre las cantidades producidas en las condiciones óptimas ($0,99 a_w$, 30 °C , 14 días) y las observadas a la misma a_w a 25 °C y 20 °C , luego de 14 días de incubación, o la producción a $0,95 a_w$, 25 °C y 21 días de incubación. El resto de las condiciones resultaron en una acumulación significativamente menor de DON.

RESULTADOS

En cambio, para 3-ADON, las condiciones de máxima producción (0.99 a_w , 30 °C y 21 días) resultaron en una cantidad de toxina significativamente mayor que para el resto de las condiciones estudiadas. Lo mismo se observó para 15-ADON, para el cual las condiciones óptimas de producción fueron de 0.99 a_w , 10 °C y 7 días de incubación y la cantidad de toxina acumulada difirió significativamente con la que se detectó en el resto de las condiciones de estudio.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- Se pudieron caracterizar 25 aislamientos pertenecientes a la especie *F. graminearum* s.s. que producían simultáneamente DON, 3-ADON y 15-ADON, pero que fueron caracterizados como genotipo 15-ADON.
- De las 25 cepas de *F. graminearum* s.s. con genotipo 15-ADON, pero que en el análisis químico demostraban la capacidad de coproducir 3- y 15-ADON, se seleccionó para el análisis de los efectos de los parámetros ambientales la cepa ITEM 8606. Dicho aislamiento fue el que produjo DON, 3-ADON y 15-ADON en mayor cantidad, además de poseer la característica de conservar su capacidad toxicogénica a lo largo del tiempo.
- Se observó que las condiciones óptimas de temperatura para la producción de DON y 3-ADON por *Fusarium graminearum* s.s. se encuentran entre 25 y 30 °C, dependiendo de la a_w (0,95 y 0,99 respectivamente), pero la máxima cantidad de 15-ADON se produce a una temperatura mucho menor (10 °C) a ambas actividades acuosas
- Las mínimas producciones de 3-ADON se registran a 10 °C y las de 15-ADON a 30 °C, independientemente de la a_w , mientras que para DON los mínimos se encuentran en condiciones intermedias de temperatura (15 y 25 °C) que varían según la a_w .
- El análisis estadístico (ANOVA) mostró que tanto la a_w , como la temperatura y el tiempo de incubación, así como las interacciones entre estos factores, resultaron significativos sobre la producción de DON y 3-ADON ($p < 0,0001$). En cambio, la a_w no produjo un efecto significativo sobre la producción de 15-ADON ($p = 0,7015$), aunque sí lo hicieron la temperatura, y el tiempo de incubación, así como sus interacciones ($p < 0,0001$).
- Las comparaciones a posteriori entre las medias de producción de cada toxina a las diferentes condiciones de a_w , temperatura y tiempo de incubación mostraron que, para DON, no existen diferencias significativas entre las cantidades producidas en las condiciones óptimas (0,99 a_w , 30 °C, 14 días) y las observadas a la misma a_w a 25 y 20 °C, luego de 14 días de incubación, o

CONCLUSIONES

la producción a 0,95 a_w , 25 °C y 21 días de incubación. El resto de las condiciones resultaron en una acumulación significativamente menor de DON.

- Estos resultados respaldarían la teoría de que la desacetilación C-3 y C-15 de 3,15-ADON, para dar 15-ADON y 3-ADON respectivamente está regulada por la temperatura u otras condiciones ambientales como la a_w .
- La discrepancia entre el genotipo y los análisis químicos se podría explicar por la dependencia con las condiciones ambientales que afectan la biosíntesis de metabolitos secundarios.

PERSPECTIVAS FUTURAS

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Se estudiarán en las mismas condiciones otras cepas de referencia y cepas autóctonas de *F. graminearum s.s.* ya sea individualmente o como “inóculo coctel” para evaluar si se reproducen los resultados.
- Se desarrollarán nuevos conjuntos de primers diseñados sobre la base de la región *Tri8* para diferenciar los genotipos de los acetilderivados.
- Se realizarán más estudios moleculares (secuenciación) sobre la región *Tri8* para determinar si es la responsable de discriminar entre genotipos 3-ADON y 15-ADON.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA

Abbas, H.K., Mirocha, C.J., Shier, W.T., 1984. Mycotoxins produced from fungi isolated from foodstuffs and soil: comparison of toxicity in fibroblasts and rat feeding tests. *Applied and Environmental Microbiology* 48, 654–661.

Abeledo, L.G. y Miralles, D., 2011. ¿Qué cambios presentaron en los últimos años los sistemas de producción de trigo y cebada en Argentina? *INTA*, 1-7.

Alberione, E., Bainotti, C., Frascina, J., Donaire, G., Gómez, D., Formica, B., Salines, J., Arburúa, M., Fissore, G., 2012. Problemas con fusariosis de la espiga en trigo en la Campaña 2012/13. *INTA Marco Juárez*, 1-6.

Alconada, T.M., 1993. Enzimas de *Fusarium oxysporum f. sp. melonis* involucradas en la degradación de la pared celular de las plantas superiores. Tesis Doctoral FCEyN-UBA.

Alconada, T.M. y Martínez, M.J., 1994. Purification and characterization of an extracellular endo-1,4- β -xylanase from *Fusarium oxysporum f. sp. melonis*. *FEMS Microbiol Lett.* 118, 305-310.

Alconada, T.M. y Martínez, M.J., 1996. Purification and characterization of an β -glucosidase from *Fusarium oxysporum f. sp. melonis*. *Lett Appl Microbiol* 22, 106-110.

Alexander, N.J., Hohn, T.M., McCormick, S.P., 1998. The *TRI11* gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P-450 monooxygenase required for C-15 hydroxylation in trichothecene biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 221-225.

Alexander, N.J., Proctor, R.H., McCormick, S.P., 2009. Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. *Toxin Reviews (formerly Journal of Toxicology: Toxin Reviews)* 28, 198-215.

Alexander, N.J., McCormick, S.P., Waalwijk, C., Van der Lee, T., Proctor, R.H., 2011. The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium*. *Fungal Genetics and Biology* 48, 485-495.

BIBLIOGRAFIA

AL-Julaifi, M.Z. y AL-Falih, A.M., 2001. Detection of trichothecenes in animal feeds and foodstuffs during the years 1997 to 2000 in Saudi Arabia. *J. Food Prot.*, Vol., 64 (10), 1603-1606.

Alonso, D.A.J., González, M.J.R., Rejas, L.J., 2002. Micotoxinas en rumiantes: Un problema pasado o presente. Congreso de la sociedad española de medicina interna veterinaria. León: Universidad de león, 66-81.

Álvarez, C.L., 2008. Estudio comparativo de la genética poblacional, capacidad toxicogénica y agresividad de cepas de *Fusarium graminearum* aisladas de trigo. Tesis Doctoral FCEyN-UBA.

Álvarez, C.L., Somma, S., Morettia, A., Fernández Pinto, V., 2009. Aggressiveness of *Fusarium graminearum sensu stricto* isolates in wheat kernels in Argentina. *Journal Phytopathol* 1-9.

Álvarez, C.L., Azcarate, M.P., Fernández Pinto, V., 2009. Toxigenic potential of *Fusarium graminearum sensu stricto* isolates from wheat in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 135, 131-135.

Álvarez, C.L., Somma, S., Proctor, R.H., Stea, G., Mule, G., Logrieco, A., Fernández Pinto, V., Moretti, A., 2011. Genetic diversity in *Fusarium graminearum* from a major wheat-producing region of Argentina. *Toxins* 3, 1294-1309.

Amarasinghe, C., Wang, J.H., Liao, Y.C., Dilantha Fernando, W.G., 2011. Difference in *TRI13* Gene Sequences between the 3-Acetyldeoxynivalenol Producing *Fusarium graminearum* Chemotypes from Canada and China. *Int J Mol Sci.* 12(9), 6164-6175.

Annone, J.G., Galich, M.T., Galich, A.N., 1994. Entre los hongos acecha el golpe blanco. *Revista Campo y Tecnología.* INTA, 6-10.

Annone, J.G., 2003. Particularidades del control químico de la FET. Seminario: Problemas asociados a la Fusariosis en trigo y estrategias para su prevención. Bolsa de Cereales de Buenos Aires 3-4 de julio de 2003.

BIBLIOGRAFIA

Aoki, T. y O'Donnell, K., 1999. Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp. nov., formerly recognized as the Group 1 population of *F. graminearum*. *Mycologia* 91, 597-609.

Aoki, T., Ward, T.J., Kistler, H.C., O'Donnell, K., 2012. Systematics Phylogeny and Trichothecene Mycotoxin Potential of *Fusarium* Head Blight Cereal Pathogens. *Mycotoxins* 62, 91-102.

Arunachalam, C. y Doohan, F.M., 2012. Trichothecene toxicity in eukaryotes: Cellular and molecular mechanisms in plants and animals. *Toxicology letters* 217, 149-158.

Astolfi, P., Reynoso, M.M., Ramirez, M.L., Chulze, S.N., Alves, T.C.A., Tessmann, D.J., Del Ponte, E.M., 2012. Genetic population structure and trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat in southern Brazil *Plant Pathology* 61, 289-295.

Bai, G.H., Desjardins, A.E., Plattner, R.D., 2001. Deoxynivalenol nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. *Mycopathologia* 153, 91-98.

Bai, G.H. y Shaner, G.E., 2004. Management and resistance in wheat and barley to *Fusarium* head blight. *Annu Rev Phytopathol* 42, 135-161.

Belli, N., Ramos, A.J., Coronas, I., Sanchis, V., Marin, S., 2005. *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on a synthetic grape médium in relation to enviromental factor. *J. Apl. Microbiol.* Vol. 98, 839-844.

Betina, V., 1989. Trichothecenes. In bioactive molecules, Vol. 9. Mycotoxins. Chemical, biological and environmental aspects. Elsevier Science Publishing, Inc., New York. 192-241.

Berthiller, F., Schuhmacher, R., Buttinger, G., Krska, R., 2005. Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.* 1062, 209-216.

BIBLIOGRAFIA

Berthiller, F., Sulyok, M., Krska, R., Schuhmacher, R., 2007. Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. *International Journal of Food Microbiology* 119, 33-37.

Bolsa de Comercio de Rosario, 2013.

(<http://www.bcr.com.ar/Pages/GEA/infDetalle.aspx?idInforme=397>).

Brown, D. W., McCormick, S. P., Alexander, N. J., Proctor, R. H., Desjardins, A. E., 2001. A genetic and biochemical approach to study trichothecene diversity in *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics Biology* 32, 121-133.

Brown, D. W., McCormick, S. P., Alexander, N. J., Proctor, R. H., Desjardins, A. E., 2002. Inactivation of a cytochrome P-450 is a determinant of trichothecene diversity in *Fusarium* species. *Fungal Genet. Biol.*, Vol. 36, 224-233.

Bushnell, W.R, Hazen, B.E., Pritsch, C., 2003. Histology and Physiology of Fusarium Head Blight. Pages 44–82 in: *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*. eds. APS Press. USA.

Carmona, M.A, Formento, A.N., Luque, A., Scandiani, M.M., 2012. Año niño: preocupación y alerta por la fusariosis en trigo y cebada: ¿Qué tomar en cuenta? ¿Cómo decidir la aplicación? ¿Que aplicar? Artículo INTA, 1-7.

Cardoza, R.E., Malmierca, M.G., Hermosa, M.R., Alexander, N.J., McCormick, S.P., Proctor, R.H., Tijerino, A.M., Rumbero, A., Monte, E., Gutiérrez, S., 2011. Identification of Loci and Functional Characterization of Trichothecene Biosynthesis Genes in Filamentous Fungi of the Genus *Trichoderma*. *Applied and environmental microbiology* 77, 4867-4877.

Carranza, J.M., 1961. Podredumbre radical y tizón de los cereales en la República Argentina, producido por *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*). *Rev Fac Agron* 37, 33-58.

Carranza, M., Lori, G., Sisterna, M., 2008. Wheat Fusarium head blight 2001 epidemic in the southern Argentinian pampas. *Summa Phytopathol* 34(1), 93-94.

BIBLIOGRAFIA

Carrasco, N., Baez, A., Belmonte, M.L., 2009. Trigo: manual de campo. INTA, RIAN, 1-82.

Cirillo, T., Ritieni, A., Visone, M., Amodio-cocchieri, R., 2003. Evaluation of conventional and organic Italian foodstuffs for Deoxynivalenol and Fumonisin B1 and B2. *J. Agric. Food Chem.*, Vol., 51 (27), 8128-8131.

Comerio, R.M., Fernandez Pinto, V.E., Vaamonde, G., 1999. Influence of water activity on deoxynivalenol accumulation on wheat. *Mycotoxin Research* 15, 24–31.

Cossette, B., Smoragiewicz, W., Boutard, A., Bouchard, G., 1992. La Détection des Mycotoxines Trichothécènes. *Travail et Santé*, Vol. 8 (1), 2-6.

Croteau, S.M., Prelusky, D.B., Trenholm, L., 1994. Analysis of Trichotecene mycotoxins by gas chromatography with electron capture detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42, 928-933.

Covarelli, L., Turner, A.S., Nicholson, P., 2004. Repression of deoxynivalenol accumulation and expression of Tri genes in *Fusarium culmorum* by fungicides in vitro. *Plant Pathol.* Vol., 53, 47-51.

Cuniberti, M., Mir, L., Berra, O., Macagno, S. (2007, 2008, 2009, 2010, 2011). Calidad del trigo en la región central del país. TRIGO, Informe de actualización técnica N° 4, N° 8, N° 11, N° 15 y N° 18. INTA-EEA Marcos Juárez.

Cuniberti, M. y Mir, L., 2011. Wheat quality evolution in central region of Argentina. 2^a Conf. Latinoamérica de Cereales ICC 2011. Abstracts Book, pág. 116.

Chandler, E.A., Simpson, D.R., Thomsett, M.A., Nicholson, P., 2003. Development of PCR assays to Tri7 and Tri13 trichothecene biosynthetic genes, and characterization of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62, 355–367.

Champeil, A., Fourbet, J.F., Dore, T., 2004. Effects of grain sampling procedures on *Fusarium* mycotoxin assays in wheat grains. *Journal of agricultural and food chemistry* 52, 6049-6054.

BIBLIOGRAFIA

De Hoog, G.S., Guarro, J., Gene, J., Figueras, M.J., 2000. Atlas of clinical fungi, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands. p 1126.

De Lorenzo, G., Castoria, R., Bellicampi, D., Cervone, F., 1997. Fungal invasion enzymes and their inhibition. En *The Mycota. Plant Relationships, Part B*, pp. 61-83. Edited by: Carroll G.C. and Tudzinsky P. Berlin: Springer-Verlag.

Del Ponte, E.M., Fernandes, J.M.C., Pierobom, C.R., Bergstrom, G.C., 2004. Gibberella do trigo. Aspectos epidemiológicos e modelos de previsão. *Fitopatologia Brasileira* 29, 587-605.

Del Ponte, E.M., Garda-Buffon, J., Badiale-Furlong, E., 2012. Deoxynivalenol and nivalenol in commercial wheat grain related to *Fusarium* head blight epidemics in southern Brazil. *Food Chemistry* 132, 1087-1091.

Demeke, T., Clear, R.M., Patrick, S.K., Gaba, D., 2005. Species-specific PCR-based assays for the detection of *Fusarium* species and a comparison with the whole seed agar plate method and trichothecene analysis. *International journal of food microbiology* 103, 271-284.

Desjardins, A.E., Hohn, T. M., McCormick, S.P., 1993. Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: Chemistry, genetics, and significance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 57, 595-604.

Desjardins, A.E., Proctor, R.H., Bai, G., McCormick, S.P., Shaner, G., Buechley, G., Hohn, T.M., 1996. Reduced virulence of trichothecenes antibiotic-nonproducing mutants of *Gibberella zeae* in wheat field tests. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9, 775-781.

Desjardins, A.E., 2006. *Fusarium* Mycotoxins: Chemistry, Genetics and Biology. The American Phytopathological Society St Paul, Minnesota USA.

Desjardins, A.E. y Proctor, R.H., 2007. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology* 119, 47-50.

Desjardins, A.E., 2008. Natural product chemistry meets genetics: When is a genotype a chemotype? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 7587-7592.

BIBLIOGRAFIA

Desmond, O.J., Manners, J.M., Stephens, A.E., Maclean, D.J., Schenk, P.M., Gardiner, D.M., Munn, A.L., Kazan, K., 2008. The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defence responses in wheat. *Molecular Plant Pathology* 9, 435-445.

Díaz de Ackermann, M., Pereyra, S., Stewart, S., 2002. Antecedentes y perspectivas de control de Fusariosis de la espiga de trigo. In *Jornada Técnica Cultivos de Invierno (Actividades de Difusión; 282)*, 1-9.

Dill-Macky, R. y Jones, R., 2000. The effect of previous crop residues and tillage on *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Disease* 84, 71-76.

Dill-Macky, R., 2010. *Fusarium* Head Blight (Scab), pp. 34-36. In: *Compendium of Wheat Diseases and Pests*, 3rd ed.; Bockus, W.W., Bowden, R.L., Hunger, R.M., Morrill, W.L., Murray, T.D., and Smiley, R.W. Eds.; The American Phytopathological Society, St. Paul, MN; p 171.

Doohan, F.M., Brennan, J., Cooke, B.M., 2003. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology* 109, 755-768.

Dusabenyagasani, M., Dostaler, D., Hamelin, R.C., 1999. Genetic diversity among *Fusarium graminearum* strains from Ontario and Quebec. *Can J Plant Pathol* 21, 308-314.

Ehling, G., Cockburn, A., Snowdon, P., Buschhaus, H., 1997. The significance of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol (DON) for human and animal health. *Cereal Research Communications*. Vol. 25, 443-447.

Ehrlich, K.C. y Daigle, K.W., 1987. Protein synthesis inhibition by 8-oxo-12, 13-epoxytrichothecenes. *Biochem. Biophys. Acta.*, Vol. 923, 206-213.

Eriksen, G.S. y Alexander, J., 1998. *Fusarium* toxins in cereals—a risk assessment. Nordic Council of ministers; Tema Nord 1998:502. Store Strandstraede 18, DK01255 Copenhagen. K Denmark In: Summerell B. A.; Leslie J.F.; Backhouse D.; Bryden W.L.; Burges L.W. 2001: *Fusarium* – Paul E. Nelson. Memorial Symposium. APS pres, St Paul, Minnesota, S. p 332-356.

Eriksen, G.S. y Pettersson, H., 2004. Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Anim. Feed Sci. Technol.*, Vol., 114, P 205-239.

BIBLIOGRAFIA

Eriksen, G.S., Pettersson, H., Lundh, T., 2004. Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites. *Food Chem. Toxicol.*, Vol., 42 (4), 619-624.

European Commission, 1999. Evaluating socio-economic programmes: glossary of 300 concepts and technical terms, Luxemburgo: Oficina de publicaciones Oficiales de las comunidades Europeas. European Mycotoxin Awareness Network: <http://www.mycotoxins.org>

European Commission, 2006. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, 5-24.

Faifer, G., De Miguel, M., Godoy, H., 1990. Patterns of mycotoxin production by *Fusarium graminearum* isolated from Argentine wheat. *Mycopathologia* 109: 165-170.

FAO/WHO ECoFAJ, 2007. Evaluation of certain food additives and contaminants: sixty-eighth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Vol. 947: World Health Organization.

Feinberg, B. y McLaughlin, C.S., 1989. Biochemical mechanism of action of trichothecene mycotoxins; p. 27-35. In V. R. Beasley (ed.). *Trichothecene mycotoxicoses: pathophysiologic effects*, Vol., I. CRC Press, Boca Raton, Fla.

Fernández Pinto, V, Terminiello, L.A, Basilico, J.C., Rittieni, A., 2008. Natural occurrence of nivalenol and micotoxigenic potencial of *fusarium graminearum* strains in wheat affected by head blight in argentina. *Braz J Microbiol* 39: 157-162.

Fernández Pinto, V., Patriarca, A., Pose, G., 2013. Mycotoxins associated to *Fusarium* species that caused FHB in wheat in Latin-America. En: *Fusarium head blight in wheat in Latin-America*. Alconada, T., Chulze, S. (eds.). Springer, NY, USA, pp 59-74.

Fernando, W.G.D., Zhang, J.X, Dusabenyagasani, M., Guo, X.W., Ahmed, H., McCallum, B., 2006. Genetic diversity of *Gibberella zeae* isolates from Manitoba. *Plant Dis* 90, 1337-1342.

BIBLIOGRAFIA

Formento, A.N., 2003. Enfermedades de trigo en la subregión triguera III. Entre Ríos. http://www.inta.gov.ar/parana/info/documentos/produccion_vegetal/trigo/otros_documentos/66.pdf

Formento, A.N. y Souza, J., 2008. Control químico de la Fusariosis de la espiga del trigo (*Fusarium graminearum* y *Fusarium spp.*). Momentos, dosis y eficacia de fungicidas. HM 19. Libro de Resúmenes 1° Congreso Argentino de Fitopatología. 28 al 30 mayo de 2008. Córdoba. Argentina. p. 205.

Forsell, J.H. y Pestka, J.J., 1985. Relation of 8-ketotrichothecene and zearalenone analog structure to inhibition of mitogen-induced human lymphocyte blastogenesis. *Appl Environ Microbiol.* Vol. 50, 1304-1307.

Freeman, G.G. y Morrison, R.I., 1948. Trichothecin: an antifungal metabolic product of *Trichothecium roseum* Link. *Nature, Lond.* 162, 30.

Frisvad, J.C. y Thrane, U., 1996. Mycotoxin production by food-borne fungi. En "Introduction to food-borne fungi" Samson R.A, Hoekstra E.S., Frisvad J.C. y Filtenborg O. (Editores) 5th Edition. Baarn, The Netherlands, Centraalbureau voor Schimmelcultures. 251-260.

Gale, L.R., Chen, L.F., Hernick, C.A., Takamura, K., Kistler, H.C., 2002. Population Analysis of *Fusarium graminearum* from Wheat Fields in Eastern China. *Phytopathology* 92, 1315-1322.

Galich, M.T.V., 1989. Avances en el Control de la Fusariosis del Trigo en Argentina. En Taller Sobre la Fusariosis de la Espiga en América del Sur. M. M. Kohli(editor) Mexico, D. F. CIMMYT. 27-31.

Galich, M.T.V., 2002. Fusariosis de la espiga de trigo. En: Trigo: Actualización 2002. Fraschina J, Saavedra A y L Segura (editores). Información para Extensión N° 71. p 6.

Galich, M.T.V., 2004. Fusariosis de la espiga del trigo. Desarrollo de cultivares resistentes. IDIA XXI . INTA Año IV N°6. p 50-57.

Gamiz, I., 2006. Estudio de la presencia de tricotecenos tipo B en cereales para desayuno mediante análisis por cromatografía de gases con detector de masas. Trabajo fin de carrera. Universidad Politecnica de Valencia. p 91.

BIBLIOGRAFIA

Geiser, D.M., Giménez-Gasco, M.M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghava, N., Ward, T.J., Zhang, N., Kuldau, G.A., O'Donnell, K., 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA Sequence Database for Identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 110, 473-479.

Gilbert, J., 1993. Recent advances in analytical methods for mycotoxins. *Food Addit. Contam.* Vol., 10 (1), p 37-48.

Gledhill, K.R., Randall, M.J., Chadwick, M., 1991. The EARSS digital seismograph: system description and field trials. *Bulletin of the Seismological Society of America.*, Vol., 81, p 1380-1390.

Goswami, R.S. y Kistler, C., 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology* 5, 515-525.

Hammond-Kosack, K, Urban, M., Baldwin, T., Daudi, A., Rudd, J., Keon, J., Lucas, J., Maguire, K., Korniyukhin, D., Jing, H., 2004. Plant pathogens: how can molecular genetic information on plant pathogens assist in breeding disease resistant crops. In 4th International Crop Science Congress. Disponible en: http://www.cropscience.org.au/icsc2004/pdf/2138_hammond-kosack.pdf.

Hazel, C.M. y Pate, I S., 2004. Influence of processing on trichothecene levels. *Toxicol. Lett.*, Vol., 153 (1), 51-57.

Hohn, T.M. y Vanmiddlesworth, F., 1986. Purification and characterization of the sesquiterpene cyclase trichodiene synthetase from *Fusarium sporotrichioides*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 251, 756-761.

Hohn, T.M., Desjardins, A.E., McCormick, S.P., 1995. The *Tri4* gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P450 monooxygenase involved in trichothecene biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.*, Vol. 248, p 95-102.

Hughes, D.M, Gahl, M.J, Graham, C.H., Grieb, S.L., 1999. Overt signs of toxicity to dogs and cats of dietary deoxynivalenol. *Journal of Animal Science* 77, 693-700

http://146.83.42.4/tics22012/172685323/reino_fungi.html

BIBLIOGRAFIA

Ichinoe, M., Kurata, H., Sugiura, Y., Ueno, Y., 1983. Chemotaxonomy of *Gibberella zeae* with special reference to production of trichothecenes and zearalenone. *Applied and Environmental Microbiology* 4, 1364-1369.

INTA, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Instituto de Clima y Agua (http://climayagua.inta.gob.ar/mapas_del_grado_de_riesgo_de_la_fet?page=1)

Jansen, C., von Wettstein, D., Schafer, W., Kogel, K.H., Felk, A., Maier, F.J., 2005. Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 16892-16897.

JECFA: Joint FAO/WHO expert committee on food additives, 2001. Fifty-sixth meeting. Summary and conclusions. Genf, 6-15. Februar.

Jestoi, M., Ritieni, A., Rizzo, A., 2004. Analysis of the *Fusarium* Mycotoxins proliferin and Trichothecenes in grains using Gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* Vol 52, p 1464-1469.

Jimenez, M., Valle-Algarra, F.M., Medina, A., Llorens, A., Gimeno-Adelantado, J.V., Mateo, R., 2005. Tricotecenos de tipo B y hongos productores en cereales. XX Congreso Nacional de Microbiología Cáceres: Control del riesgo por micotoxinas en alimentos. P 147-153.

Josephs, R.D., Koeber, R., Bernreuther, A., Linsinger, T.P.J., Schimmel, H., 2004. Developmente of certified reference materials for mycotoxins. In: Barug D.; Van Egmond H.P.; Lopez G.R., Van Osenbruggen W.A. & Visconti A. Meeting the mycotoxin menace. Wageningen Academic Publishers, the Netherlands, p 237-254.

Jurado, M., Vázquez, C., Patiño, B., González-Jaén, M.T., 2005. PCR detection assay for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides*. *Systematic and Applied Microbiology*, 28, 562-568.

Jurado, M., Vázquez, C., Marín, S., Sanchis, V., González-Jaén, M.T., 2006. PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in maize. *Systematic and Applied Microbiology* 29, 681-689.

BIBLIOGRAFIA

Kikot, G.E., Hours, R.A., Alconada, T.M., 2009. Contribution of cell degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: a review. *J Basic Microbiol* 4, 31–241.

Kikot, G.E., Hours, R.A., Alconada, T.M., 2010. Extracellular enzymes of *Fusarium graminearum* isolates. *Braz Arch Biol Technol* 53(4), 779-783.

Kokkonen, M., Ojala, L., Parikka, P., Jestoi, M., 2010. Mycotoxin production of selected *Fusarium* species at different culture conditions. *International Journal of Food Microbiology* 143, 17–25.

Kohli, M.M., 1995. Conceptos básicos en el manejo de las enfermedades de cultivo. En "Curso de manejo de las enfermedades de trigo" Centro Internacional de capacitación INTA-CIMMYT. p 20.

Krska, R., Baumgartner, S., Josephs, R., 2001. The state-of-the-art in the analysis of type A and B trichothecene mycotoxins in cereals. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 371: 285-299.

Krska, R., Schubert-Ullrich, P., Josephs, R.D., Emteborg, H., Buttinger, G., Pettersson, H., van Egmond, H.P., Schothorst, R.C., Macdonald, S., Chan, D., 2007. Determination of molar absorptivity coefficients for major type-B trichothecenes and certification of calibrators for deoxynivalenol and nivalenol. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388, 1215-1226.

Krska, R., 2009. Mycotoxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395, 1203-1204

Krska, R. y Molinelli, A., 2009. Rapid test strips for analysis of mycotoxins in food and feed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393, 67-71.

Láday, M., Juhász, Á., Mulè, G., Moretti, A., Szécsi, Á., Logrieco, A., 2004. Mitochondrial DNA diversity and lineage determination of European isolates of *F. graminearum* (*Gibberella zeae*). *European Journal of Plant Pathology*, 110, 545-550.

Lacey, J., 1989. Prevention of mold growth and mycotoxin production through control environmental factors. En: *Mycotoxins and Phytotoxins*. Natori, S., Hashimoto, K. y Ueno, Y. (Eds.). Elsevier, Amsterdam. Págs.161-168.

BIBLIOGRAFIA

Lacey, J. y Magan, N., 1991. Fungi in cereal grains: their occurrence and water and temperature relationship. En: *Cereal Grain. Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage*. Chelkowski, J. (Ed.). Elsevier, Amsterdam. Pags.77-118.

Lauren, D.R. y Smith, W.A., 2001. Stability of the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxinivalenol and zearalenone in ground maize under typical cooking environments. *Food Additives and Contaminants* Vol., 18 (11), p 1011-1016.

Lattanzio, V.M.T, Pascale, M., Visconti, A., 2009. Current analytical methods for trichothecene mycotoxins in cereals. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 28, 758-768.

Lazzari, F.A., 2000. Control integrado de plagas, manejo de hongos e insectos. Granos y post-cosecha Latinoamericana VI n° XXIII.

Leslie, J. y Summerell, B., 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual, Blackwell Publishing, Iowa, USA. 388 páginas.

Lee T., Oh D.W., Kim H.S., Lee J., Kim Y.H., Yun S.H., Lee Y.W. (2001). Identification of deoxynivalenol and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae* by using PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 67, 2966-2972.

Lee, T., Han, Y.K., Kim, K.H., Yun, S.H., Lee, Y.W., 2002. *Tri13* and *Tri7* determine deoxinivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2148-2154.

Lee, J., Chang, I.Y, Kim, H., Yun, S.H., Leslie, J.F., Lee, Y.W., 2009. Genetic diversity and fitness of *Fusarium graminearum* populations from rice in Korea. *Applied and environmental microbiology* 75, 3289-3295.

Link, J.H.F., 1809. Observationes in Ordines plantarum naturalis. Dissetatio I. *Mag. Ges. Naturf. Freunde, Berlin* 3, 3-42.

Llorens, A., Mateo, R., Hinojo, M.J., Valle-Algarra, F.M., Jiménez, M., 2004. Influence of environmental factors on the biosynthesis of type B trichothecenes by isolates of *Fusarium* spp. from Spanish crops. *International Journal of Food Microbiology* 94, 43-54.

BIBLIOGRAFIA

Llorens, A., Hinojo, M.J., Mateo, R., Gonzalez-Jaen, M.T., Valle-Algarra, F.M., Logrieco, A., Jiménez, M., 2006. Characterization of *Fusarium* spp. Isolates by PCR-RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rRNA gene (rDNA). *Int. J. Food Microbiol.* Vol., 106 (3), 297-306.

Logrieco, A., Bottalico, A., Altomare, C., 1988. Chemotaxonomic observations on zearalenone and trichothecene production by *Gibberella zeae* from cereals in Southern Italy. *Mycologia* 80, 892-895.

Logrieco, A., Bottalico, A., Mulé, G., Moretti, A., Perrone, G., 2003. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 645-667.

Lori, G.A, Carranza, M.R, Violante, A., Rizzo, I., Alippi, H.E., 1992. *Fusarium* spp en trigo, capacidad toxicogénica y quimiotaxonomía de las cepas aisladas en la Argentina. *Agronomie* 12, 459-467.

Lori, G.A y Rizzo, I., 2007. Deoxinivalenol. En micotoxinas en alimentos. Cord. Soriano del Castillo, J.M. Ediciones Díaz de Santos. España. P 396.

Lori, G.A, Sisterna, M.N, Sarandon, S.J., Rizzo, I., Chidichimo, H., 2009. *Fusarium* head blight in wheat: Impact of tillage and other agronomic practices under natural infection. *Crop Protection* 28, 495-502.

Magan, N. y Aldred, D., 2007. Environmental fluxes and fungal interactions: Maintaining a competitive edge. En: *Stress in yeast and filamentous fungi*. Van West, P., Avery, S. y Stratford, M. (Eds.). Elsevier Ltd., Amsterdam, Holland. Págs.19-35.

Marín, S., Magan, N., Serra, J., Ramos, A.J., Canela, R., Sanchis, V., 1999. Fumonisin B1 production and growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* on maize, wheat, and barley grain. *Journal of Food Science* 64, 921- 924.

Marín, S., Albareda, X., Ramos, A.J., Sanchis, V., 2001. Impact of environmental and interactions of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* with *Aspergillus parasiticus* on fumonisin B1 and aflatoxins on maize grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81, 1060-1068.

Marín, S., Magan, N., Ramos, A.J., Sanchis, V., 2004. Fumonisin-producing strains of *Fusarium*: A review of their ecophysiology. *Journal of Food Protection* 67, 1792-1805.

BIBLIOGRAFIA

Martinez, M.J., Aconada, T.M., Guillen, F., Vazquez, C., Reyes, F., 1991. Pectic activities from *Fusarium oxysporum f. sp. melonis*. Purification and characterization of an exopolysaccharidase. *FEMS Microbiol Lett* 81, 145-150.

Marasas, W.F.O, Nelson, P.E., Toussoun, T.A., 1984. Toxigenic *Fusarium* species: Identity and Mycotoxicology. Pennsylvania State University Press, University Park PA.

Mateo, J.J., Mateo, R., Jimenez, M., 2002. Accumulation of type A trichothecene in corn, wheat and rice by five *Fusarium sporotrichioides* isolates under diverse cultural conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, Vol. 72, p 115-123.

McCormick, S.P., Hohn, T.M., Desjardins, A.E., 1996. Isolation and characterization of Tri3, a gene encoding 15-O-acetyltransferase from *Fusarium sporotrichioides*. *Applied Environmental Microbiology* 62, 353– 359.

McCormick, S.P., Alexander, N.J., Proctor, R.H., 2006. *Fusarium Tri4* encodes a multifunctional oxygenase required for trichothecene biosynthesis. *Canadian Journal of Microbiology* 52, 636-642.

McCormick, S.P., Stanley, A.M., Stover, N.A., Alexander, N.J., 2011. Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins* 3, 802-814

Miller, J.D., Greenhalgh, R., Wang, Y.Z., Lu, M., 1991. Trichothecene chemotype of three *Fusarium* species. *Mycologia* 83, 121-130.

Miller, J.D., 2008. Mycotoxins in small grains and maize: old problems, new challenges. *Food Addit Contam.* 25(2), 219–230.

Miraglia, M., Marvin, H.J.P., Kleter, G.A., Battilani, P., Brera, C., Coni, E., Cubadda, F., Croci, L., De Santis, B., Dekkers, S., Filippi, L., Hutjes, R.W.A., Noordam, M.Y., Pisante, M., Piva, G., Prandini, A., Toti, L., Van Den Born, G.J., Vespermann, A., 2009. Climatic change and food safety: An emerging issue with special focus on Europe. *Food and Chemical Toxicology* 47, 1009-1021.

Mylona, K., Sulyok, M., Magan, N., 2012. Relationship between environmental factors, dry matter loss and mycotoxin levels in stored wheat and maize infected with *Fusarium* species. *Food Additives and Contaminants* 29, 1118–1128.

BIBLIOGRAFIA

Moschini, R.C. y Fortugno, C., 1996. Predicting wheat head blight incidence using models based on meteorological factors in Pergamino, Argentina. *European Journal of Plant Pathology* 102, 211-218.

Moschini, R.C, Galich, M.T.V. de, Annone, J.G., Polidoro, O., 2002. Enfoque Fundamental-Empírico para estimar la evolución del Índice de Fusarium en trigo. *Revista RIA*, 31(3),39-53

Moschini, R., Conti, H., Cazenav, G., 2002. Estimación de la incidencia de Fusariosis en trigo. Region pampeana-Campaña 2001. Available from: http://www.sinavimo.gov.ar/fito/Publicados_V/fusariosis.htm.

Moschini, R.C., Bischoff, S., Martinez, M.I., 2008. Variabilidad climática y ocurrencia de enfermedades: caso de estudio: Fusariosis de la espiga de trigo. *Horizonte A. Magazine de las Ciencias Agrarias*. Año 5 N°21. Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, p. 10–5.

Moschini, R.C., Martínez, M.I., Cazenave, G., 2012. Estimación de la distribución espacial de la incidencia de la FET en la región pampeana para la campaña 2012/13. INTA Castelar, p 1-5.

Mugrabi de Kuppler, A.L., Steiner, U., Sulyok, M., Krska, R., Oerke, E.C., 2011. Genotyping and phenotyping of *Fusarium graminearum* isolates from Germany related to their mycotoxin biosynthesis. *International Journal of Food Microbiology* 151, 78–86

Nelson, P.E, Toussoun, T.A., Marasas, W.F.O., 1983. *Fusarium* species: An Illustrated Manual for Identification, The Pennsylvania State University Press, Pennsylvania, USA. 193 páginas.

Nelson, P., Dignani, C., Anaissi, e E., 1994. Taxonomy, Biology, and Clinical Aspects of *Fusarium* Species, *Clinical Microbiology Reviews* 479-504.

Niessen, L., Schmidt, H., Vogel, R.F., 2004. The use of Tri5 gene sequences for PCR detection and taxonomy of trichothecene- producing species in the *Fusarium* section Sporotrichiella. *Int. J. Food Microbiol Vol.*, 95 (3), p 305-319.

Notiagropecuarias, 2013.

(<http://www.notiagropecuarias.com.ar/index.php/component/content/article/72internacionales/1957-se-proyecta-una-mayor-produccion-global-de-trigo>).

BIBLIOGRAFIA

Obst, A., Lepschy-von, G.J., Beck, R., 1997. On the etiology of *Fusarium* head blight of wheat in South Germany – preceding crops, weather conditions for inoculum production and head infection, proneness of the crop to infection and mycotoxin production. *Cereals Res. Commun.*, Vol. 25, 699-703.

O'Donnell, K., Kistler, H.C., Tacke, B.K., Caspar, H.H., 2000. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of The National Academy of Sciences USA* 97, 7905-7910.

O'Donnell, K., Ward, T.J., Geiser, D.M., Kistler, H.C., Aoki, T. (2004). Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genetics and Biology* 41, 600-623.

Omurtag, G.Z. y Beyoglu, D., 2003. Occurrence of deoxynivalenol (vomitoxin) in processed cereals and pulses in Turkey. *Food Addit. Contam. Vol.*, 20, p 405-409.

Ouellet, T. y Seifert, K.A., 1993. Genetic characterization of *Fusarium graminearum* strains using RAPD and PCR amplification. *Phytopathology* 83: 1003-1007

Palmero, D., González M., de C., Iglesias, C., Ruiz, G., Tello, J.C., 2008. Effects of water potential on spore germination and viability of *Fusarium* species. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35,1411-1418.

Pascale, M., Lippolis, V., Maragos, C.M., Visconti, A., 2008. Recent Developments in Trichothecene Analysis. Symposium In *American Chemical Society Symposium Series* Sianta DP, Trucksess MW, Scott PM, Hermann EM (eds), Vol. 1001, pp 192-210. Washington DC, USA: American Chemical Society

Parikka, P., Hakala, K., Tiilikkala, K., 2012. Expected shifts in *Fusarium* species composition on cereal grain in Northern Europe due to climatic change. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2012; 29(10),1543-55.

Parry, D.W., Jenkinson, P., McLeod, L., 1995. *Fusarium* Head Blight (scab) in small grain cereals-a review. *Plant Pathology* 44, 207-238.

Patiño, B., Mirete, S., González-Jaén, M.T., Mulé, G., Rodríguez, M.T., Vázquez, C., 2004. PCR detection assay of fumonisin-producing *Fusarium verticillioides*. *Journal of Food Protection*, 67, 1278-1283.

BIBLIOGRAFIA

Peplow, A.W., Tag, A.G., Garifulina, G.F., Beremand, M.N., 2003. Identification of new genes positively regulated by Tri10 and has regulatory network for trichothecene mycotoxin production. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 69 (5), 2731-2736.

Pereyra, S.A. y Dill-Macky, R., 2008. Colonization of the residues of diverse plant species by *Gibberella zeae* and their contribution to *Fusarium* head blight inoculum. *Plant Dis.* 92, 800-807.

Proctor, R.H., Hohn, T.M., McCormick, S.P., 1995. Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8, 593-601.

Producción mundial de Trigo, 2013. ([http:// www.produccionmundialtrigo.com](http://www.produccionmundialtrigo.com))

Pestka, J.J., 2007. Deoxynivalenol :toxicity, mechanisms and animal health risks. *Animal Feed Science and Technology* 137, 283-298.

Pestka, J.J., 2010. Toxicological mechanisms and potential health effects of deoxynivalenol and nivalenol. *World Mycotoxin Journal* 3, 323-347.

Pioli, R., 1993. La Fusariosis en el cultivo de trigo. Hoja Informativa N°4. Fac. Cs. Agrarias UNR. Noviembre -Diciembre 1993. Difundida en Diario La Tierra (Federación Agraria Argentina) y Revista ACAECER (Asociación de Cooperativas Argentinas).

Placinta, C.M., D'Mello, J.P.F., MacDonald, A.M.C., 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 78, 21-37.

Pritsch, C., Muehlbauer, G.J., Bushnell, W.R., Somers, D.A., Vance, C.P., 2000. Fungal development and induction of defense response genes during early infection of wheat spikes by *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* 13, 159-169.

Quarta, A., Mita, G., Haidukowski, M., Logrieco, A., Mulè, G., Visconti, A., 2006. Multiplex PCR assay for the identification of nivalenol, 3- and 15 acetyldeoxynivalenol chemotypes in *Fusarium*. *FEMS microbiology letters*, 259, 7-13.

BIBLIOGRAFIA

Ramírez, M.L., Chulze, S., Magan, N., 2004. Impact of environmental factors and fungicides on growth and deoxinivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentinian wheat. *Crop Protection*, 23, 117-125.

Ramírez, M.L., Chulze, S., Magan, N., 2006. Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxinivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grains. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 291-296.

Ramirez, M.L., Reynoso, M.M., Farnochi, M.C., Torres, A.M., Leslie, J.F., Chulze, S., 2007. Population genetic structure of *Gibberella zeae* isolated from wheat in Argentina. *Food Addit Contam* 24, 1115-1120.

Reynoso, M.M., Ramirez, M.L., Torres, A.M., Chulze, S.N., 2011. Trichothecene genotypes and chemotypes in fusarium graminearum strains isolated from wheat in argentina. *Int J Food Microbiol* 145, 444-448

Reis, E.M., Fernandes, J.M.C., Picinini, E.C., 1988. Estrategias para o controle de doenças do trigo. EMBRAPA-CNPT, Passo Fundo, 50 pp.

Reis, E.M., Casa Trezzi, R., Silva, M.S., 1995. Efeito do tratamento de sementes de cevada no controle e no desenvolvimento da mancha em rede, causada por *Drechslera teres*. *Fitopatologia Brasileira* 20, 561-565.

Reis, E.M. y Carmona, M., 2002. Fusariosis del trigo: Biología, epidemiología y estrategias para su manejo. Buenos Aires, Argentina. 26 páginas.

Ren, Y., Zhang, Y., Shao, S., Cai, Z., Feng, L., Pan, H., Wang, Z., 2007. Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, 1143, 48-64.

Rizzo, I., Kneteman, E., Salom, R., Frade, H., 1995. Thin layer chromatography for the determination of T-2, neosolaniol and DON in wheat flour and by-products. *International Seminar on Fusarium*, Martina Franca, Italy, p. 54.

Rizzo, I., Lori, G., Vedoya, G., Carranza, M., Haidukowski, M., Frade, H., Chiale, C., Alippi, H., 1997. Sanitary factors and mycotoxin contamination in the Argentinian wheat crop 1993/1994. *Mycotoxin Research* 13, 67-72.

BIBLIOGRAFIA

Saharan, M.S., Kumar, J., Sharma, A.K., Nagarajan, S., 2004. Fusarium Head Blight (FHB) or Head Scab of Wheat - A review. *Proc. Indian Natl.Sci.Acad.* B70 N°3. 255-268.

Sanchis, V., Marín, S., Magan, N., Ramos, A.J., 2006. Ecophysiology of fumonisina producers in *Fusarium* section *Liseola*. En: *Advances in Experimental Medicine and Biology. Advances in Food Mycology.* Hocking, A. D., Samson, R. A., Pitt, J. I. y Thrane, U. (Eds.). Springer US. Págs.115-122.

Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., 2004. Introduction to food borne fungi, 7th edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.

Sampietro, D.A., Diaz, C.G., Gonzalez, V., Vattuone, M.A., Ploper, L.D., Catalan, C.A., Ward, T.J., 2011. Species diversity and toxigenic potential of *Fusarium graminearum* complex isolates from maize fields in northwest Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 145, 359-364.

Scott, P.M., 1989. The natural occurrence of trichothecenes. En: *Trichothecene mycotoxicosis: pathophysiological effects.* Beasley, V. H. (Ed.). CRC Press, Boca Raton, Fla. Págs. 1-26.

Schaafsma, A.W., Tamburic-Ilinic, L., Miller, J.D., Hooker, D.C., 2001. Agronomic considerations for reducing deoxynivalenol in wheat grain. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23, 279– 285.

Schnerr, H., Niessen, L., Vogel, R.F., 2001. Real detection of the Tri5 gene in *Fusarium* species by LightCycler – PCR using SYBR Green I for continuous fluorescence monitoring. *Int. J. Food Microbiol.*, Vol. 71, p 53.61.

Schnerr, H., Vogel, R.F., Niessen, L., 2002. Correlation between DNA of trichothecene-producing *Fusarium* species and deoxynivalenol concentrations in wheat-samples. *Letters in Applied Microbiology* 35, 121-125.

Schneider, E., Curtui, V., Seidler, C., Dietrich, R., Usleber, E., Martlbauer, E., 2004. Rapid methods for deoxynivalenol and other trichothecenes. *Toxicology letters* 153, 113-121.

Schmale, D.G., Leslie, J.F., Zeller, K.A., Saleh, A.A., Shields, E.J., Bergstrom, G.C., 2006. Genetic structure of atmospheric populations of *Gibberella zeae*. *Phytopathology* 96, 1021-1026.

BIBLIOGRAFIA

Schmale, D.G., Wood-Jones, A.K., Cowger, C., Bergstrom, G.C., Arrellano, C., 2011. Trichothecene genotypes of *Gibberella zeae* from winter wheat fields in the eastern United States. *Plant Pathology* 60, 909-917

Schlatter, J., 2004. Toxicity data relevant for hazard characterization. *Toxicology letters* 153, 83-89

Schothorst, R.C. y Jekel, A.A., 2001. Determination of trichothecenes in wheat by capillary gas chromatography with flame ionisation detection. *Food Chemistry* 73.

Schollenberger, M., Lauber, U., Terry Jara, H., Suchy, S., Drochner, W., Müller, H.M., 1998. Determination of eight trichothecenes by gas chromatography mass-spectrometry after sample clean-up by a two-stage solid phase extraction. *Journal of Chromatography A* 815, 123-132.

Schwadorf, K. y Muller, H.M., 1991. Determination of trichothecenes in cereals by gaschromatography with ion trap detection. *Chromatographia* 32, 137-142.

Seifert, K., 2001. Fusarium and anamorph generic concepts. En: Fusarium. Summerell BA et al., eds. APS Press. St. Paul, Minnesota. P 15-28.

Snijders, C.H.A., 2004. Resistance in wheat to Fusarium infection and trichothecene formation. *Toxicol Lett* 153 (1): 37- 46.

Starkey, D.E., Ward, T.J., Aoki, T., Gale, L.R., Kistler, H.C., Geiser, D.M., Suga, H., Toth, B., Varga, J., O'Donnell, K., 2007. Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity. *Fungal Genetics and Biology* 12, 1745-1776.

Sobrova, P., Adam, V., Vasatkova, A., Beklova, M., Zeman, L., Kizek, R., 2010. Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdisciplinary Toxicology*, Vol. 3, p. 94.

Sologuk, S., 2005. Diseases Can Bewitch Durum Millers *Fusarium* head blight, ergot, and black point are the most common wheat-related fungi. *Milling Journal*. Pages 44-45. www.northern-crops.com/technical/durumdisease.pdf. Verificado 20/07/07.

Soriano, J.M. y Dragacci, S., 2004. Occurrence of fumonisins in foods, *Food Res. Int.*, Vol. 37, p 985-1000

BIBLIOGRAFIA

Subedi K.D., Ma B.L., Xue A.G. (2007). Planting date and nitrogen effects on *Fusarium* head blight and leaf spotting diseases in spring wheat. *Agron. Journal* 99:113-121.

Sugiura, Y., Watanabe, Y., Tanaka, T., Yamamoto, S., Ueno, Y., 1990. Occurrence of *Gibberella zeae* strains that produce both nivalenol and deoxynivalenol. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 3047-3051.

Szecsí, A., Bartók, T., Varga, M., Magyar, D., Mesterházy, A., 2005. Determination of trichothecene chemotypes of *Fusarium graminearum* strains isolates in Hungary. *J. Phytopathology*. Vol. 153, p 445-448

Tanaka, T., Yoneda, A., Inoue, S., Sugiura, Y., Ueno, Y., 2000. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 882, 23-28.

Trenholm, H.L., Friend, D., Hamilton, R.M.G., Prelusky, D.B., Foster, B.C., 1989. Lethal toxicity and nonspecific effects. En: *Trichothecene mycotoxicosis: pathophysiological effects*. Beasley, V. L. (Ed.). CRC Press, Boca Raton, Fla. Págs. 107-142.

Trail, F., 2009. For Blighted Waves of Grain: *Fusarium graminearum* in the Postgenomics Era. *Plant physiology* 149, 103-110

Tóth, B., Mesterházy, A., Horváth, Z., Bartók, T., Varga, M., Varga, J., 2005. Genetic variability of central European isolates of the *Fusarium graminearum* species complex. *Eur J Plant Pathol* 13, 35-45

Trucksess, M.W., Nesheim, S., Epply, R., 1984. Thin layer determination of deoxynivalenol in wheat and corn. *Journal of association of official analytical chemists* 67, 40-43.

Trucksess, M.W., Thomas, F., Young, K., Stack, M.E., Fulgueras, W.J., Page, S.W., 1995. Survey of Deoxynivalenol in U.S. 1993 Wheat and Barley Crops by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J Assoc Off Anal Chem*. 78 (3), 631-636.

Ueno, Y., 1977. Trichothecenes: overview address. In *Mycotoxins in human and animal health*. Edited by J.V. Rodricks, C.W. Hesseltine, and M.A. Mehlman. Pathotox Publishers Inc., Park Forest South, Ill. P 189-207.

BIBLIOGRAFIA

Ueno, Y., 1983. Trichothecenes-Chemical, Biological and Toxicological Aspects. Amsterdam. Elsevier. 313 páginas.

Ueno, Y., 1985. The toxicology of mycotoxins Critical Reviews in Toxicology 14, 99–132.

Ueno, Y., 1987. Trichothecenes in food. Mycotoxins in Food. Krogh P (Editor) Academic Press London.

USDA, 2013. (<http://agriculturayganaderiasatelital.blogspot.com.ar/2013/03/evolucion-del-mercado-mundial-de-maiz-y.html>)

USDA, 2013. (<http://eleconomista.com.mx/columnas/agro-negocios/2012/10/01/trigo-perspectivas2012/13>)

Velluti, A., Marín, S., González, R., Ramos, A.J., Sanchis, V., 2000. Fumonisin B1, zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* in mixed cultures on irradiated maize kernels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 88-94.

Visconti, A., Haidukowski, E.M., Pascale, M., Silvestri, M., 2004. Reduction of deoxynivalenol during durum wheat processing and spaghetti cooking. *Toxicology letters* 153, 181-189

Wannemacher, R.W. y Weiner, S.L., 1997. Trichothecene mycotoxins. In: Textbook of Military Medicine, Part I Warfare, Weaponry, and the Casualty, Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare. Sidell, F.R., Takafugi, ET, and Franz, DR (eds), Office of the Surgeon General, Department of the Army, Washington, D.C., pp. 655–676.

Ward, T.J., Bielawski, J.P., Kistler, H.C., Sullivan, E., O'Donnell, K., 2002. Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. *Proceedings of the National Academy Sciences* 99, 9278–9283.

Ward, T.J., Clear, R.M., Rooney, A.P., O'Donnell, K., Gaba, D., Patrick, S., Starkey, D.E., Gilbert, J., Geiser, D.M., Nowicki, T.W., 2008. An adaptive evolutionary shift in *Fusarium* head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America. *Fungal Genetics and Biology* 45, 473–484.

BIBLIOGRAFIA

Weidenbörner, W., 2001. Encyclopedia of food mycotoxins. Springer, Berlin, Germany.

Wegulo, S., Bockus, W., Hernandez, Nopsa, J., Peiris, K.H., Dowell, F., 2013. Integration of Fungicide Application and Cultivar Resistance to Manage Fusarium Head Blight in Wheat. Book Chapter, 35-54.

Wolf-Hall, C.E., Hanna, M.A., Bullerman, L.B., 1999. Stability of deoxynivalenol in heat-treated foods. *J. Food Prot.*, Vol. 62. P 962-964.

Woodget, B.W. y Cooper, D., 1995. In: Samples and Standards, ed. N.B. Chapman, Analytical Chemistry Open Learning, John Wiley & Sons, Chichester.

Yang, G.H., Li, S., Pestka, J.J., 2000. Down-regulation of the endoplasmic reticulum chaperone GRP78/BiP by vomitoxin (Deoxynivalenol). *Toxicology and applied pharmacology* 162, 207-217

Yazar, S. y Omurtag, G.Z., 2008. Fumonisin, trichothecenes and zearalenone in cereals. *International Journal of Molecular Sciences* 9, 2062-2090.

Yli-Mattila, T., Gagkaeva, T., Ward, T.J., Aoki, T., Kistler, H.C., O'Donnell, K., 2009. A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East. *Mycologia* 101, 841-852

Yli-Mattila, T. 2010. Ecology and evolution of toxigenic *Fusarium* species in cereals in northern Europe and Asia. *Journal of Plant Pathology* 92 (1), 7-18.

Yoshizawa, T. y Morooka, N., 1975. Biological modification of trichothecene mycotoxins: acetylation and deacetylation of deoxynivalenol by *Fusarium* spp. *Appl. Microbiol.* 29, 54-58.

Zhang, J.B., Li, H.P., Dang, F.J., Qu, B., Xu, Y.B., Zhao, C.S., Liao, Y.C., 2007. Determination of the trichothecene mycotoxin chemotypes and associated geographical distribution and phylogenetic species of the *Fusarium graminearum* clade from China. *Mycological research* 111, 967-975.

BIBLIOGRAFIA

Zhang, H., Zhang, Z., Van der Lee, T., Chen, W.Q., Xu, J., Xu, J.S., Yang, L., Yu, D., Waalwijk, C., Feng, J., 2010a. Population genetic analyses of *Fusarium asiaticum* populations from barley suggest a recent shift favoring 3 ADON producers in southern China. *Phytopathology* 100, 328-336.

Zhang, Z., Zhang, H., Van der Lee, T., Chen, W.Q., Arens, P., Xu, J., Xu, J.S., Yang, L.J., Yu, D., Waalwijk, C., Feng, J., 2010b. Geographic substructure of *fusarium asiaticum* isolates collected from barley in China. *Eur J Plant Pathol* 127, 239-248.

Zhang, H., Van der Lee, T., Waalwijk, C., Chen, W., Xu, J., Xu, J.S., Zhang, Y., Feng, J., 2012. Population analysis of the *fusarium graminearum* species complex from wheat in china show a shift to more aggressive isolates. *PLoS One* 7.

Zeller, K.A, Vargas, J.I., Valdovino Ponce, G., Leslie, J.F., Bowden, R.L., 2003. Population genetic and lineage composition among *Gibberella zeae* in North and South America. *XXII Fungal Genetics Newsletter* 50 Supplement. 446 páginas.

Zeller, K.A., Bowden, R.L., Leslie, J.F., 2004. Population differentiation and recombination in wheat scab populations of *Gibberella zeae* in the United States. *Molecular Ecology* 13, 563-571.

ANEXO I

MEDIOS DE CULTIVO

AGAR PAPA DEXTROSA (PDA)

Papa	200g
D-Glucosa	15 g
Agar	20 g
Agua destilada	1 litro

SPEZIELLER NÄHRSTOFFARMER AGAR (SNA)

KH_2PO_4	1 g
KNO_3	1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
KCl	0,5 g
Glucosa	0,2 g
Sacarosa	0,2 g
Agar	20 g
Agua destilada	1 litro

AGAR TRIGO (TA)

Trigo molido	20g
Agar	20 g
Agua destilada	1 litro

ANEXO II

TABLAS DE DATOS

1. Producción de DON, 3-ADON y 15-ADON por cepas de *Fusarium graminearum*

☐ DON

MUESTRAS	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
8606	1/1000	8,757	536685	0,89375383	0,415093682	9,798	1292925
8616	1/1000	8,811	24934	0,90055192	0,025571654	9,784	975064
8602	1/1000	8,813	53920	0,90029625	0,047017296	9,789	1146812
97 - B	1/1000	8,751	11247	0,89387130	0,01032333	9,79	1089474
I - 4	1/1000	8,752	7449	0,89406477	0,008423307	9,789	884332
8623	1/1000	8,751	7254	0,89414529	0,009112275	9,787	796069
11 - B5	1/1000	8,809	19319	0,89988763	0,020063579	9,789	962889
8614	1/1000	8,809	32886	0,89988763	0,108530713	9,789	303011
8615	1/1000	8,811	29506	0,89916421	0,062542658	9,791	471774
8609	1/1000	8,823	7383	0,90085767	0,009229546	9,794	799931
6 - A3	1/1000	8,816	7550	0,90069473	0,013034073	9,788	579251
11 A2	1/1000	8,804	3342	0,89983647	0,004560316	9,784	732844
1 -24- 5	1/1000	-	-	-	-	9,783	338974
16 A3	1/1000	8,811	5542	0,90055192	0,015998984	9,784	346397
L - 24 - 1	1/1000	8,748	102299	0,89411284	0,137563	9,784	743652
4 B 4	1/1000	8,804	2273	0,90002045	0,003394924	9,782	669529
I - 3	1/1000	-	-	-	-	9,794	693166
2 -24	1/1000	8,813	1476	0,90011235	0,00189333	9,791	779579
9 -2	1/1000	-	-	-	-	9,79	623122
9 - 6	1/1000	-	-	-	-	9,79	937336
G - 3	1/1000	8,835	2491	0,89233411	0,004855845	9,901	512990
R2 - 9	1/1000	8,823	1782	0,90067374	0,004011553	9,796	444217
2 -29	1/1000	8,806	2070	0,89985694	0,004685739	9,786	441766
8607	1/1000	8,818	40516	0,90043909	0,059832417	9,793	677158
20 B5	1/1000	8,809	5155	0,90025549	0,016685008	9,785	308960

$$X_{\text{DON}} = (Y+0,0146)/0,0004$$

ANEXO II

MUESTRAS	DON		
	X	X*312,5*1000	Y=AR
8606	1074,234205	335698189,062500	0,415093682
8616	100,429135	31384104,687500	0,025571654
8602	154,043240	48138512,500000	0,047017296
97 - B	62,308325	19471351,562500	0,01032333
I - 4	57,558268	17986958,593750	0,008423307
8623	59,280688	18525214,843750	0,009112275
11 - B5	86,658948	27080921,093750	0,020063579
8614	307,826783	96195869,531250	0,108530713
8615	192,856645	60267701,562500	0,062542658
8609	59,573865	18616832,812500	0,009229546
6 - A3	69,085183	21589119,531250	0,013034073
11 A2	47,900790	14968996,875000	0,004560316
1 -24- 5	-	-	-
16 A3	76,497460	23905456,250000	0,015998984
L - 24 - 1	380,407500	118877343,750000	0,137563
4 B 4	44,987310	14058534,375000	0,003394924
I - 3	-	-	-
2 -24	41,233325	12885414,062500	0,00189333
9 -2	-	-	-
9 -6	-	-	-
G - 3	48,639613	15199878,906250	0,004855845
R2 - 9	46,528883	14540275,781250	0,004011553
2 -29	48,214348	15066983,593750	0,004685739
8607	186,081043	58150325,781250	0,059832417
20 B5	78,212520	24441412,500000	0,016685008

ANEXO II

MUESTRAS	DON		
	pg/g	µg/g	µg/kg
8606	335698189,062500	335,6982	335698,1891
8616	31384104,687500	31,3841	31384,10469
8602	48138512,500000	48,1385	48138,5125
97 - B	19471351,562500	19,4714	19471,35156
I - 4	17986958,593750	17,9870	17986,95859
8623	18525214,843750	18,5252	18525,21484
11 - B5	27080921,093750	27,0809	27080,92109
8614	96195869,531250	96,1959	96195,86953
8615	60267701,562500	60,2677	60267,70156
8609	18616832,812500	18,6168	18616,83281
6 - A3	21589119,531250	21,5891	21589,11953
11 A2	14968996,875000	14,9690	14968,99688
1 -24- 5	-	-	-
16 A3	23905456,250000	23,9055	23905,45625
L - 24 - 1	118877343,750000	118,8773	118877,3438
4 B 4	14058534,375000	14,0585	14058,53438
I - 3	-	-	-
2 - 24	12885414,062500	12,8854	12885,41406
9 -2	-	-	-
9- 6	-	-	-
G - 3	15199878,906250	15,1999	15199,87891
R2 - 9	14540275,781250	14,5403	14540,27578
2 -29	15066983,593750	15,0670	15066,98359
8607	58150325,781250	58,1503	58150,32578
20 B5	24441412,500000	24,4414	24441,4125

 3-ADON

MUESTRAS	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
8606	1/1000	10,348	1900025	1,05613390	1,469555465	9,798	1292925
8616	1/1000	10,26	2226	1,04865086	0,002282927	9,784	975064
8602	1/1000	10,151	187701	1,03698028	0,163671988	9,789	1146812
97 - B	1/1000	10,264	6371	1,04841675	0,005847776	9,79	1089474
I - 4	1/1000	10,268	1828	1,04893248	0,002067096	9,789	884332
8623	1/1000	10,264	4722	1,04873812	0,005931646	9,787	796069
11 - B5	1/1000	10,269	5018	1,04903463	0,0052114	9,789	962889
8614	1/1000	10,249	12887	1,04699152	0,042529809	9,789	303011
8615	1/1000	10,257	5758	1,04759473	0,012204996	9,791	471774
8609	1/1000	10,272	3835	1,04880539	0,004794163	9,794	799931
6 - A3	1/1000	10,268	3250	1,04903964	0,005610693	9,788	579251
11 A2	1/1000	10,261	5548	1,04875307	0,007570506	9,784	732844
1 -24- 5	1/1000	10,261	3400	1,04886027	0,010030267	9,783	338974
16 A3	1/1000	10,264	4526	1,04905969	0,013065933	9,784	346397
L - 24 - 1	1/1000	10,262	3272	1,04885527	0,004399907	9,784	743652
4 B 4	1/1000	10,259	3761	1,04876303	0,005617381	9,782	669529
I - 3	1/1000	10,275	6825	1,04911170	0,009846126	9,794	693166
2 -24	1/1000	10,271	7105	1,04902461	0,009113893	9,791	779579
9 -2	1/1000	10,272	5631	1,04923391	0,009036753	9,79	623122
9- 6	1/1000	10,214	6227	1,0433095	0,006643295	9,79	937336
G - 3	1/1000	-	-	-	-	9,901	512990
R2 - 9	1/1000	10,28	1911	1,04940792	0,004301951	9,796	444217
2 -29	1/1000	10,269	3475	1,04935622	0,007866155	9,786	441766
8607	1/1000	10,272	3637	1,04891249	0,005370976	9,793	677158
20 B5	1/1000	10,266	8941	1,04915687	0,028939021	9,785	308960

$$X_{3-ADON} = (Y - 0,000943) / 0,0000113$$

ANEXO II

MUESTRAS	3-ADON		
	X	X*312,5*1000	Y=AR
8606	129965,7049	40614282771	1,469555465
8616	118,5776106	37055503,32	0,002282927
8602	14400,7954	4500248562	0,163671988
97 - B	434,0509735	135640929,2	0,005847776
l - 4	99,47752212	31086725,66	0,002067096
8623	441,4730973	137960342,9	0,005931646
11 - B5	377,7345133	118042035,4	0,0052114
8614	3680,248584	1150077683	0,042529809
8615	996,6368142	311449004,4	0,012204996
8609	340,810885	106503401,5	0,004794163
6 - A3	413,070177	129084430,3	0,005610693
11 A2	586,5049558	183282798,7	0,007570506
1 -24- 5	804,1829204	251307162,6	0,010030267
16 A3	1072,825929	335258102,9	0,013065933
L - 24 - 1	305,9209735	95600304,2	0,004399907
4 B 4	413,6620354	129269386,1	0,005617381
l - 3	787,8872566	246214767,7	0,009846126
2 -24	723,0878761	225964961,3	0,009113893
9 -2	716,2613274	223831664,8	0,009036753
9 -6	504,450885	157640901,5	0,006643295
G - 3	-	-	-
R2 - 9	297,2523009	92891344,03	0,004301951
2 -29	612,6685841	191458932,5	0,007866155
8607	391,8562832	122455088,5	0,005370976
20 B5	2477,523982	774226244,5	0,028939021

ANEXO II

MUESTRAS	3-ADON		
	pg/g	µg/g	µg/kg
8606	40614282771	40614,2828	40614282,77
8616	37055503,32	37,0555	37055,50332
8602	4500248562	4500,2486	4500248,562
97 - B	135640929,2	135,6409	135640,9292
l - 4	31086725,66	31,0867	31086,72566
8623	137960342,9	137,9603	137960,3429
11 - B5	118042035,4	118,0420	118042,0354
8614	1150077683	1150,0777	1150077,683
8615	311449004,4	311,4490	311449,0044
8609	106503401,5	106,5034	106503,4015
6 - A3	129084430,3	129,0844	129084,4303
11 A2	183282798,7	183,2828	183282,7987
1 -24- 5	251307162,6	251,3072	251307,1626
16 A3	335258102,9	335,2581	335258,1029
L - 24 - 1	95600304,2	95,6003	95600,3042
4 B 4	129269386,1	129,2694	129269,3861
l - 3	246214767,7	246,2148	246214,7677
2 -24	225964961,3	225,9650	225964,9613
9 -2	223831664,8	223,8317	223831,6648
9 -6	157640901,5	157,6409	157640,9015
G - 3	-	-	-
R2 - 9	92891344,03	92,8913	92891,34403
2 -29	191458932,5	191,4589	191458,9325
8607	122455088,5	122,4551	122455,0885
20 B5	774226244,5	774,2262	774226,2445

ANEXO II

▣ 15-ADON

MUESTRAS	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
8606	1/1000	9,438	277929	0,96325781	0,214961424	9,798	1292925
8616	1/1000	9,417	41315	0,96248978	0,042371578	9,784	975064
8602	1/1000	9,421	164427	0,96240678	0,137231893	9,789	1146812
97 - B	1/1000	9,423	32815	0,96251277	0,03012004	9,79	1089474
l - 4	1/1000	9,422	25989	0,96250894	0,029388284	9,789	884332
8623	1/1000	9,421	19101	0,96260345	0,023994151	9,787	796069
11 - B5	1/1000	-	-	-	-	9,789	962889
8614	1/1000	9,419	45037	0,96220247	0,148631567	9,789	303011
8615	1/1000	9,419	27344	0,96200592	0,057959955	9,791	471774
8609	1/1000	9,428	14134	0,96263018	0,017669023	9,794	799931
6 - A3	1/1000	9,422	10851	0,96260727	0,018732811	9,788	579251
11 A2	1/1000	9,416	11212	0,96238757	0,015299299	9,784	732844
1 -24- 5	1/1000	9,422	12986	0,96309925	0,038309722	9,783	338974
16 A3	1/1000	9,422	13645	0,96300082	0,039391218	9,784	346397
L - 24 - 1	1/1000	9,418	28534	0,96259199	0,038370097	9,784	743652
4 B 4	1/1000	9,416	12221	0,96258434	0,01825313	9,782	669529
l - 3	1/1000	9,428	20332	0,96263018	0,029332079	9,794	693166
2 -24	1/1000	9,427	11245	0,96282300	0,014424452	9,791	779579
9 -2	1/1000	9,425	12478	0,96271706	0,020024971	9,79	623122
9 -6	1/1000	9,421	10090	0,96230848	0,01076455	9,79	937336
G - 3	1/1000	9,41	2091	0,95040905	0,004076102	9,901	512990
R2 - 9	1/1000	9,431	17622	0,96273989	0,039669801	9,796	444217
2 -29	1/1000	9,424	9628	0,96300838	0,021794344	9,786	441766
8607	1/1000	9,427	23331	0,96262637	0,034454292	9,793	677158
20 B5	1/1000	9,425	13641	0,96320899	0,044151346	9,785	308960

$$X_{15-ADON} = (Y+1,7725)/0,0180$$

ANEXO II

MUESTRAS	15-ADON		
	X	X*312,5*1000	Y=AR
8606	110,4145236	34504538,61	0,214961424
8616	100,8261988	31508187,12	0,042371578
8602	106,0962163	33155067,59	0,137231893
97 - B	100,1455578	31295486,81	0,03012004
I - 4	100,1049047	31282782,71	0,029388284
8623	99,80523061	31189134,57	0,023994151
11 - B5	-	-	-
8614	106,7295315	33352978,59	0,148631567
8615	101,6922197	31778818,66	0,057959955
8609	99,45383461	31079323,32	0,017669023
6 - A3	99,51293394	31097791,86	0,018732811
11 A2	99,32218328	31038182,27	0,015299299
1 -24-5	100,6005401	31437668,78	0,038309722
16 A3	100,6606232	31456444,76	0,039391218
L - 24 - 1	100,6038943	31438716,96	0,038370097
4 B 4	99,486285	31089464,06	0,01825313
I - 3	100,1017822	31281806,93	0,029332079
2 -24	99,27358067	31022993,96	0,014424452
9 -2	99,58472061	31120225,19	0,020024971
9- 6	99,07025278	30959453,99	0,01076455
G - 3	98,69867233	30843335,1	0,004076102
R2 - 9	100,6761001	31461281,27	0,039669801
2 -29	99,68301911	31150943,47	0,021794344
8607	100,3863496	31370734,24	0,034454292
20 B5	100,9250748	31539085,87	0,044151346

ANEXO II

MUESTRAS	15-ADON		
	pg/g	µg/g	µg/kg
8606	34504538,61	34,50453861	34504,53861
8616	31508187,12	31,50818712	31508,18712
8602	33155067,59	33,15506759	33155,06759
97 - B	31295486,81	31,29548681	31295,48681
I - 4	31282782,71	31,28278271	31282,78271
8623	31189134,57	31,18913457	31189,13457
11 - B5	-	-	-
8614	33352978,59	33,35297859	33352,97859
8615	31778818,66	31,77881866	31778,81866
8609	31079323,32	31,07932332	31079,32332
6 - A3	31097791,86	31,09779186	31097,79186
11 A2	31038182,27	31,03818227	31038,18227
1 -24- 5	31437668,78	31,43766878	31437,66878
16 A3	31456444,76	31,45644476	31456,44476
L - 24 - 1	31438716,96	31,43871696	31438,71696
4 B 4	31089464,06	31,08946406	31089,46406
I - 3	31281806,93	31,28180693	31281,80693
2 -24	31022993,96	31,02299396	31022,99396
9 -2	31120225,19	31,12022519	31120,22519
9 -6	30959453,99	30,95945399	30959,45399
G - 3	30843335,1	30,8433351	30843,33510
R2 - 9	31461281,27	31,46128127	31461,28127
2- 29	31150943,47	31,15094347	31150,94347
8607	31370734,24	31,37073424	31370,73424
20 B5	31539085,87	31,53908587	31539,08587

ANEXO II

2. Producción de DON, 3-ADON y 15-ADON con $a_w = 0,99$ y diferentes temperatura luego de 7, 14, 21 y 28 días de incubación.

DON

$$[X_{\text{DON}} = (Y + 0,0146) / 0,0004]$$

☐ 7 días

➤ T= 10 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,78	2144	0,90552805	0,00594858	9,696	360422
2	1/1000	8,79	2284	0,90590539	0,00591024	9,703	386448
3	1/1000	8,79	1560	0,90553209	0,00593068	9,707	263039

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	51,3714562	0,00594858
2	51,2755972	0,00591024
3	51,3266987	0,00593068

Repetición	DON
	X*312,5*dilución
1	16053580,07
2	16023624,14
3	16039593,34

Repetición	DON
	µg/g
1	16,05358007
2	16,02362414
3	16,03959334
PROMEDIO	16,03893252

➤ T= 15 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,796	3751	0,90596354	0,00857652	9,709	437357
2	1/1000	8,787	4021	0,90559621	0,00837546	9,703	480093
3	1/1000	8,798	4015	0,90579636	0,00884166	9,713	454100

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	57,941294	0,00857652
2	57,438651	0,00837546
3	58,604162	0,00884166

ANEXO II

Repetición	DON	
	X*312,5*dilución	
1	18106654,36	
2	17949578,58	
3	18313800,65	

Repetición	DON µg/g	
1	18,10665436	
2	17,94957858	
3	18,31380065	
PROMEDIO	18,12334453	

➤ T= 20 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,797	1568	0,90643998	0,00340791	9,705	460106
2	1/1000	8,797	1651	0,90587993	0,0039068	9,711	422596
3	1/1000	8,796	1941	0,90587024	0,00446873	9,71	434352

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	45,0197759	0,00340791
2	46,2670115	0,0039068
3	47,6718146	0,00446873

Repetición	DON	
	X*312,5*dilución	
1	14068679,96	
2	14458441,1	
3	14897442,05	

Repetición	DON µg/g	
1	14,06867996	
2	14,4584411	
3	14,89744205	
PROMEDIO	14,47485437	

➤ T= 25 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		Tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,796	3381	0,90596354	0,00952491	9,709	354964
2	1/1000	8,794	6276	0,90557100	0,01275651	9,711	491984
3	1/1000	8,796	5645	0,90605686	0,01630758	9,708	346158

ANEXO II

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	60,3122739	0,00952491
2	68,391281	0,01275651
3	77,2689552	0,01630758

Repetición	DON
	X*312,5*dilución
1	18847585,6
2	21372275,32
3	24146548,51

Repetición	DON
	µg/g
1	18,8475856
2	21,37227532
3	24,14654851
PROMEDIO	21,45546981

➤ T= 30 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,794	6256	0,90547776	0,01256969	9,712	497705
2	1/1000	8,798	5647	0,90570311	0,01036809	9,714	544652
3	1/1000	8,793	5674	0,90556128	0,01178922	9,71	481287

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	67,9242372	0,01256969
2	62,4202206	0,01036809
3	65,9730587	0,01178922

Repetición	DON
	X*312,5*dilución
1	21226324,14
2	19506318,94
3	20616580,84

Repetición	DON
	µg/g
1	21,22632414
2	19,50631894
3	20,61658084
PROMEDIO	20,44974131

ANEXO II

☐ 14 días

➤ T= 10 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,797	3138	0,90606654	0,00980812	9,709	319939
2	1/1000	8,789	2424	0,90561566	0,00649760	9,705	373061
3	1/1000	8,789	4097	0,90598907	0,01234159	9,701	331967

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	61,0202992	0,00980812
2	52,7439923	0,00649760
3	67,3539704	0,01234159

Repetición	DON
	X*312,5*dilución
1	19068843,49
2	16482497,58
3	21048115,76

Repetición	DON
	µg/g
1	19,06884349
2	16,48249758
3	21,04811576
PROMEDIO	18,86648561

➤ T= 15 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,789	3259	0,90580233	0,01115943	9,703	292040
2	1/1000	8,789	4014	0,90589569	0,01272718	9,702	315388
3	1/1000	8,789	3562	0,90580233	0,01052097	9,703	338562

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	64,3985755	0,01115943
2	68,3179512	0,01272718
3	62,8024202	0,01052097

ANEXO II

Repetición	DON	
	X*312,5*dilución	
1	20124554,86	
2	21349359,76	
3	19625756,32	

Repetición	DON µg/g	
1	20,12455486	
2	21,34935976	
3	19,62575632	
PROMEDIO	20,36655698	

➤ T= 20 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,741	7884	0,90066976	0,02164156	9,705	364299
2	1/1000	8,738	6222	0,89961907	0,01385074	9,713	449218
3	1/1000	8,75	2096	0,90104006	0,01149072	9,711	182408

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	90,6039092	0,02164156
2	71,1268404	0,01385074
3	65,2268102	0,01149072

Repetición	DON	
	X*312,5*dilución	
1	28313721,61	
2	22227137,63	
3	20383378,2	

Repetición	DON µg/g	
1	28,31372161	
2	22,22713763	
3	20,3833782	
PROMEDIO	23,64141248	

➤ T= 25 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,748	5884	0,90074135	0,02129207	9,712	276347
2	1/1000	8,745	5549	0,90089626	0,02275178	9,707	243893
3	1/1000	8,75	4051	0,90085452	0,02035014	9,713	199065

ANEXO II

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	89,730178	0,02129207
2	93,379451	0,02275178
3	87,375342	0,02035014

Repetición	DON	
	X*312,5*dilución	
1	28040680,63	
2	29181078,51	
3	27304794,45	

Repetición	DON	
	µg/g	
1	28,04068063	
2	29,18107851	
3	27,30479445	
PROMEDIO	28,17551786	

➤ T= 30 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		Tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,808	6935	0,90673255	0,02834569	9,714	244658
2	1/1000	8,806	5319	0,90643335	0,02243679	9,715	237066
3	1/1000	8,795	6079	0,90604718	0,02512586	9,707	241942

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	107,364227	0,02834569
2	92,5919744	0,02243679
3	99,3146415	0,02512586

Repetición	DON	
	X*312,5*dilución	
1	33551320,87	
2	28934992	
3	31035825,48	

Repetición	DON	
	µg/g	
1	33,55132087	
2	28,934992	
3	31,03582548	
PROMEDIO	31,17404612	

ANEXO II

☐ 21 días

➤ T= 10 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,798	2162	0,90570311	0,00253496	9,714	852872
2	1/1000	8,741	2428	0,90011327	0,00276363	9,711	878556
3	1/1000	8,8	2318	0,905909	0,0026336	9,714	880165

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	42,8374105	0,00253496
2	43,4090644	0,00276363
3	43,0839928	0,0026336

Repetición	DON
	X*312,5*dilución
1	13386690,79
2	13565332,63
3	13463747,74

Repetición	DON
	µg/g
1	13,38669079
2	13,56533263
3	13,46374774
PROMEDIO	13,47192372

➤ T= 15 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,755	2417	0,90062751	0,00644729	9,721	374886
2	1/1000	8,747	1980	0,90045295	0,00423609	9,714	467412
3	1/1000	8,752	3899	0,90106043	0,00872260	9,713	447000

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	52,6182333	0,00644729
2	47,0902287	0,00423609
3	58,3064877	0,00872260

ANEXO II

Repetición	DON	
	X*312,5*dilución	
1	16443197,9	
2	14715696,48	
3	18220777,4	

Repetición	DON µg/g
1	16,4431979
2	14,71569648
3	18,2207774
PROMEDIO	16,4598906

➤ T= 20 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,749	2574	0,90047345	0,00482836	9,716	533100
2	1/1000	8,751	2219	0,90067929	0,00502234	9,716	441835
3	1/1000	8,753	2721	0,90032915	0,00465495	9,722	584539

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	48,570906	0,00482836
2	49,055592	0,00502234
3	48,1373758	0,00465495

Repetición	DON	
	X*312,5*dilución	
1	15178408,13	
2	15329872,51	
3	15042929,93	

Repetición	DON µg/g
1	15,17840813
2	15,32987251
3	15,04292993
PROMEDIO	15,18373686

➤ T= 25 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,748	6340	0,9005559	0,00997914	9,714	635325
2	1/1000	8,748	6958	0,9000000	0,00996544	9,72	698213

ANEXO II

3	1/1000	8,748	7154	0,9004632	0,00998455	9,715	716507
---	--------	-------	------	-----------	------------	-------	--------

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	61,44786133	0,00997914
2	61,41360086	0,00996544
3	61,46137512	0,00998455

Repetición	DON	
	X*312,5*dilución	
1	19202456,67	
2	19191750,27	
3	19206679,72	

Repetición	DON	
	µg/g	
1	19,20245667	
2	19,19175027	
3	19,20667972	
PROMEDIO	19,20029555	

➤ T= 30 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,748	2241	0,90037052	0,00303652	9,716	738015
2	1/1000	8,748	1778	0,9004632	0,00250359	9,715	710181
3	1/1000	8,751	2882	0,9005866	0,00351525	9,717	819856

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	44,0913091	0,00303652
2	42,7589678	0,00250359
3	45,2881286	0,00351525

Repetición	DON	
	X*312,5*dilución	
1	13778534,1	
2	13362177,43	
3	14152540,2	

Repetición	DON	
	µg/g	
1	13,7785341	
2	13,36217743	
3	14,1525402	
PROMEDIO	13,76441724	

ANEXO II

☐ 28 días

➤ T= 10 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,806	2312	0,90587388	0,00373277	9,721	619379
2	1/1000	8,803	601	0,90631113	0,00134785	9,713	445895
3	1/1000	8,795	2434	0,90576725	0,00524739	9,71	463850

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	45,8319276	0,00373277
2	39,8696274	0,00134785
3	49,6184650	0,00524739

Repetición	DON
	X*312,5*dilución
1	14322477,38
2	12459258,56
3	15505770,32

Repetición	DON
	µg/g
1	14,32247738
2	12,45925856
3	15,50577032
PROMEDIO	14,09583542

➤ T= 15 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,787	1614	0,90559621	0,00276971	9,703	582732
2	1/1000	8,79	1238	0,90581204	0,00284710	9,704	434829
3	1/1000	8,8	1579	0,90646889	0,00303474	9,708	520308

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	43,4242808	0,00276971
2	43,6177405	0,00284710
3	44,0868524	0,00303474

Repetición	DON
	X*312,5*dilución
1	13570087,75
2	13630543,92
3	13777141,38

ANEXO II

Repetición	DON µg/g
1	13,57008775
2	13,63054392
3	13,77714138
PROMEDIO	13,65925768

➤ T= 20 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,799	1051	0,90636588	0,00156384	9,708	672065
2	1/1000	8,795	1686	0,90614053	0,00319076	9,706	528400
3	1/1000	8,743	2152	0,90031923	0,00239864	9,711	897175

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	40,4095921	0,00156384
2	44,4769114	0,00319076
3	42,4966004	0,00239864

Repetición	DON
	X*312,5*dilución
1	12627997,52
2	13899034,82
3	13280187,64

Repetición	DON µg/g
1	12,62799752
2	13,89903482
3	13,28018764
PROMEDIO	13,26907333

➤ T= 25 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,745	1069	0,90061792	0,00143242	9,71	746289
2	1/1000	8,75	1780	0,9002058	0,00167866	9,72	1060369
3	1/1000	8,744	2643	0,89995883	0,00184547	9,716	1432157

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	40,0810524	0,00143242
2	40,6966523	0,00167866
3	41,1136701	0,00184547

ANEXO II

Repetición	DON	
	X*312,5*dilución	
1	12525328,87	
2	12717703,84	
3	12848021,92	

Repetición	DON µg/g
1	12,52532887
2	12,71770384
3	12,84802192
PROMEDIO	12,69701821

➤ T= 30 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,746	2951	0,89988682	0,00216559	9,719	1362677
2	1/1000	8,746	4968	0,89997942	0,00254386	9,718	1952935
3	1/1000	8,742	3838	0,8998456	0,00230296	9,715	1666548

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	41,9139756	0,00216559
2	42,8596587	0,00254386
3	42,2574099	0,00230296

Repetición	DON	
	X*312,5*dilución	
1	13098117,37	
2	13393643,33	
3	13205440,6	

Repetición	DON µg/g
1	13,09811737
2	13,39364333
3	13,2054406
PROMEDIO	13,23240043

ANEXO II

3-ADON

$$[X_{3-ADON} = (Y - 0,000943) / 0,0000113]$$

☐ 7 días

➤ T= 10 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,267	3225	1,05889026	0,008947844	9,696	360422
2	1/100	10,274	3415	1,05884778	0,008836894	9,703	386448
3	1/100	10,283	2287	1,05933862	0,008694528	9,707	263039

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	708,393316	0,00894784
2	698,574687	0,00883689
3	685,975946	0,00869453

Repetición	3-ADON	
	X*312,5*dilución	
1	22137291,13	
2	21830458,98	
3	21436748,31	

Repetición	3-ADON	
	µg/g	
1	22,13729113	
2	21,83045898	
3	21,43674831	
PROMEDIO	21,80149947	

➤ T= 15 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,282	5215	1,05901741	0,0119239	9,709	437357
2	1/100	10,272	6512	1,05864166	0,01356404	9,703	480093
3	1/100	10,285	5834	1,05889015	0,01284739	9,713	454100

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	971,760833	0,0119239
2	1116,90607	0,01356404
3	1053,48588	0,01284739

Repetición	3-ADON	
	X*312,5*dilución	
1	30367526,03	
2	34903314,81	
3	32921433,75	

ANEXO II

Repetición	3-ADON µg/g
1	30,36752603
2	34,90331481
3	32,92143375
PROMEDIO	32,73075819

➤ T= 20 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,277	3803	1,05893869	0,00826549	9,705	460106
2	1/100	10,281	3229	1,05869632	0,00764087	9,711	422596
3	1/100	10,281	3681	1,05880536	0,00847469	9,71	434352

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	648,007668	0,00826549
2	592,731628	0,00764087
3	666,521534	0,00847469

Repetición	3-ADON
	X*312,5*dilución
1	20250239,63
2	18522863,39
3	20828797,94

Repetición	3-ADON µg/g
1	20,25023963
2	18,52286339
3	20,82879794
PROMEDIO	19,86730032

➤ T= 25 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,282	4459	1,05901741	0,01256184	9,709	354964
2	1/100	10,283	5634	1,05890228	0,01145159	9,711	491984
3	1/100	10,281	4885	1,05902349	0,01411205	9,708	346158

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	1028,21569	0,01256184
2	929,963887	0,01145159
3	1165,40291	0,01411205

ANEXO II

Repetición	3-ADON	
	X*312,5*dilución	
1	32131740,2	
2	29061371,46	
3	36418840,92	

Repetición	3-ADON	
	µg/g	
1	32,1317402	
2	29,06137146	
3	36,41884092	
PROMEDIO	32,53731753	

➤ T= 30 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,282	6820	1,05869028	0,0137029	9,712	497705
2	1/100	10,282	7994	1,05847231	0,01467726	9,714	544652
3	1/100	10,28	7503	1,05870237	0,01558945	9,71	481287

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	1129,19436	0,0137029
2	1215,4214	0,01467726
3	1296,14609	0,01558945

Repetición	3-ADON	
	X*312,5*dilución	
1	35287323,82	
2	37981918,73	
3	40504565,22	

Repetición	3-ADON	
	µg/g	
1	35,28732382	
2	37,98191873	
3	40,50456522	
PROMEDIO	37,92460259	

ANEXO II

☐ 14 días

➤ T= 10 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,283	4499	1,0591204	0,01406206	9,709	319939
2	1/100	10,278	4494	1,05904173	0,01204629	9,705	373061
3	1/100	10,274	5510	1,05906608	0,01659804	9,701	331967

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	1160,97837	0,01406206
2	982,5918	0,01204629
3	1385,40136	0,01659804

Repetición	3-ADON
	X*312,5*dilución
1	36280574,06
2	30705993,74
3	43293792,44

Repetición	3-ADON
	µg/g
1	36,28057406
2	30,70599374
3	43,29379244
PROMEDIO	36,76012008

➤ T= 15 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,28	3653	1,05946614	0,01250856	9,703	292040
2	1/100	10,276	4627	1,05916306	0,01467082	9,702	315388
3	1/100	10,276	4055	1,0590539	0,01197713	9,703	338562

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	1023,50093	0,01250856
2	1214,85117	0,01467082
3	976,471397	0,01197713

Repetición	3-ADON
	X*312,5*dilución
1	31984403,96
2	37964098,91
3	30514731,16

ANEXO II

Repetición	3-ADON µg/g
1	31,98440396
2	37,96409891
3	30,51473116
PROMEDIO	33,48774468

➤ T= 20 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,278	4296	1,05904173	0,01179251	9,705	364299
2	1/100	10,288	4659	1,05919901	0,01037136	9,713	449218
3	1/100	10,288	1838	1,05941716	0,01007631	9,711	182408

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	960,133725	0,01179251
2	834,367827	0,01037136
3	808,257738	0,01007631

Repetición	3-ADON
	X*312,5*dilución
1	30004178,92
2	26073994,6
3	25258054,32

Repetición	3-ADON
	µg/g
1	30,00417892
2	26,0739946
3	25,25805432
PROMEDIO	27,11207595

➤ T= 25 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,288	3998	1,05930807	0,01446732	9,712	276347
2	1/100	10,283	3800	1,05933862	0,0155806	9,707	243893
3	1/100	10,286	2902	1,0589931	0,01457815	9,713	199065

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	1196,84232	0,01446732
2	1295,36309	0,0155806
3	1206,6507	0,01457815

ANEXO II

Repetición	3-ADON	
	X*312,5*dilución	
1	37401322,63	
2	40480096,71	
3	37707834,25	

Repetición	3-ADON µg/g	
1	37,40132263	
2	40,48009671	
3	37,70783425	
PROMEDIO	38,5297512	

➤ T= 30 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,29	4108	1,05929586	0,01679079	9,714	244658
2	1/100	10,292	3522	1,05939269	0,01485662	9,715	237066
3	1/100	10,284	3849	1,05944164	0,01590877	9,707	241942

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	1402,458894	0,01679079
2	1231,294001	0,01485662
3	1324,404560	0,01590877

Repetición	3-ADON	
	X*312,5*dilución	
1	43826840,44	
2	38477937,52	
3	41387642,49	

Repetición	3-ADON µg/g	
1	43,82684044	
2	38,47793752	
3	41,38764249	
PROMEDIO	41,23080682	

ANEXO II

☐ 21 días

➤ T= 10 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,283	2965	1,05857525	0,00347649	9,714	852872
2	1/100	10,28	2742	1,05859335	0,00312103	9,711	878556
3	1/100	10,284	3131	1,0586782	0,00355729	9,714	880165

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	224,202553	0,00347649
2	192,746055	0,00312103
3	231,352881	0,00355729

Repetición	3-ADON
	X*312,5*dilución
1	7006329,789
2	6023314,209
3	7229777,528

Repetición	3-ADON
	µg/g
1	7,006329789
2	6,023314209
3	7,229777528
PROMEDIO	6,753140509

➤ T= 15 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,298	2722	1,05935603	0,00726087	9,721	374886
2	1/100	10,291	3195	1,05939881	0,00683551	9,714	467412
3	1/100	10,288	3414	1,05919901	0,00763758	9,713	447000

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	559,103891	0,00726087
2	521,461176	0,00683551
3	592,441052	0,00763758

Repetición	3-ADON
	X*312,5*dilución
1	17471996,6
2	16295661,74
3	18513782,89

ANEXO II

Repetición	3-ADON µg/g
1	17,4719966
2	16,29566174
3	18,51378289
PROMEDIO	17,42714708

➤ T= 20 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,291	5239	1,05918073	0,00982742	9,716	533100
2	1/100	10,297	3948	1,05979827	0,00893546	9,716	441835
3	1/100	10,296	5324	1,05904135	0,00910803	9,722	584539

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	786,232256	0,00982742
2	707,297552	0,00893546
3	722,569216	0,00910803

Repetición	3-ADON
	X*312,5*dilución
1	24569758,01
2	22103048,49
3	22580288

Repetición	3-ADON µg/g
1	24,56975801
2	22,10304849
3	22,58028800
PROMEDIO	23,08436484

➤ T= 25 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,286	3640	1,05888408	0,00572935	9,714	635325
2	1/100	10,295	3574	1,05915638	0,00511878	9,72	698213
3	1/100	10,288	4109	1,05898096	0,00573477	9,715	716507

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	423,570896	0,00572935
2	369,538213	0,00511878
3	424,050091	0,00573477

ANEXO II

Repetición	3-ADON	
	X*312,5*dilución	
1	13236590,49	
2	11548069,15	
3	13251565,33	

Repetición	3-ADON µg/g	
	1	13,23659049
2	11,54806915	
3	13,25156533	
PROMEDIO	12,67874166	

➤ T= 30 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,286	16003	1,05866612	0,02168384	9,716	738015
2	1/100	10,288	16674	1,05898096	0,02347852	9,715	710181
3	1/100	10,285	20323	1,05845426	0,0247885	9,717	819856

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	1835,47266	0,02168384
2	1994,29395	0,02347852
3	2110,22119	0,0247885

Repetición	3-ADON	
	X*312,5*dilución	
1	57358520,78	
2	62321686,04	
3	65944412,18	

Repetición	3-ADON µg/g	
	1	57,35852078
2	62,32168604	
3	65,94441218	
PROMEDIO	61,874873	

ANEXO II

☐ 28 días

➤ T= 10 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,293	3893	1,05884168	0,00628533	9,721	619379
2	1/100	10,288	2956	1,05919901	0,00662936	9,713	445895
3	1/100	10,284	2712	1,05911432	0,00584672	9,71	463850

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	472,772365	0,00628533
2	503,218001	0,00662936
3	433,957318	0,00584672

Repetición	3-ADON
	X*312,5*dilución
1	14774136,4
2	15725562,54
3	13561166,18

Repetición	3-ADON
	µg/g
1	14,7741364
2	15,72556254
3	13,56116618
PROMEDIO	14,68695504

➤ T= 15 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,275	3293	1,05895084	0,00565097	9,703	582732
2	1/100	10,276	2479	1,05894477	0,00570109	9,704	434829
3	1/100	10,28	3918	1,05892048	0,00753016	9,708	520308

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	416,634354	0,00565097
2	421,070061	0,00570109
3	582,934090	0,00753016

Repetición	3-ADON
	X*312,5*dilución
1	13019823,56
2	13158439,42
3	18216690,31

ANEXO II

Repetición	3-ADON µg/g
1	13,01982356
2	13,15843942
3	18,21669031
PROMEDIO	14,79831776

➤ T= 20 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,28	5200	1,05892048	0,00773735	9,708	672065
2	1/100	10,277	3918	1,05882959	0,00741484	9,706	528400
3	1/100	10,279	6415	1,05849037	0,00715022	9,711	897175

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	601,269631	0,00773735
2	572,728960	0,00741484
3	549,31164	0,00715022

Repetición	3-ADON
	X*312,5*dilución
1	18789675,98
2	17897779,99
3	17165988,74

Repetición	3-ADON
	µg/g
1	18,78967598
2	17,89777999
3	17,16598874
PROMEDIO	17,95114824

➤ T= 25 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,279	4555	1,05859938	0,00610353	9,71	746289
2	1/100	10,289	8175	1,05853909	0,00770958	9,72	1060369
3	1/100	10,281	9420	1,0581515	0,00657749	9,716	1432157

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	456,684391	0,00610353
2	598,81242	0,00770958
3	498,627536	0,00657749

ANEXO II

Repetición	3-ADON	
	X*312,5*dilución	
1	14271387,22	
2	18712888,12	
3	15582110,49	

Repetición	3-ADON µg/g	
1	14,27138722	
2	18,71288812	
3	15,58211049	
PROMEDIO	16,18879528	

➤ T= 30 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,289	24395	1,05864801	0,01790226	9,719	1362677
2	1/100	10,277	39772	1,05752212	0,02036525	9,718	1952935
3	1/100	10,276	31313	1,05774575	0,01878914	9,715	1666548

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	1500,8196	0,01790226
2	1718,78275	0,02036525
3	1579,30423	0,01878914

Repetición	3-ADON	
	X*312,5*dilución	
1	46900612,57	
2	53711961,09	
3	49353257,15	

Repetición	3-ADON µg/g	
1	46,90061257	
2	53,71196109	
3	49,35325715	
PROMEDIO	49,98861027	

ANEXO II

15-ADON**[X_{15-ADON} = (Y+1,772)/0,018]**

☐ 7 días

➤ T= 10 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,437	97802	0,97328795	0,27135413	9,696	360422
2	1/1000	9,444	81750	0,97330722	0,21154204	9,703	386448
3	1/1000	9,448	63831	0,97331822	0,24266744	9,707	263039

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	113,519674	0,27135413
2	110,19678	0,21154204
3	111,925969	0,24266744

Repetición	15-ADON
	X*312,5*dilución
1	35474898,17
2	34436493,83
3	34976865,23

Repetición	15-ADON
	µg/g
1	35,47489817
2	34,43649383
3	34,97686523
PROMEDIO	34,96275241

➤ T= 15 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,449	30208	0,97322072	0,06906943	9,709	437357
2	1/1000	9,447	23675	0,97361641	0,04931336	9,703	480093
3	1/1000	9,456	27572	0,97354062	0,0607179	9,713	454100

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	102,281635	0,06906943
2	101,184076	0,04931336
3	101,817661	0,06071790

Repetición	15-ADON
	X*312,5*dilución
1	31963010,99
2	31620023,65
3	31818019,16

ANEXO II

Repetición	15-ADON µg/g
1	31,96301099
2	31,62002365
3	31,81801916
PROMEDIO	31,80035127

➤ T= 20 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,443	50201	0,97300361	0,10910747	9,705	460106
2	1/1000	9,449	47916	0,97302029	0,11338489	9,711	422596
3	1/1000	9,449	47261	0,97312049	0,10880806	9,71	434352

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	104,505970	0,10910747
2	104,743605	0,11338489
3	104,489337	0,10880806

Repetición	15-ADON
	X*312,5*dilución
1	32658115,74
2	32732376,52
3	32652917,77

Repetición	15-ADON µg/g
1	32,65811574
2	32,73237652
3	32,65291777
PROMEDIO	32,68113668

➤ T= 25 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,451	35933	0,97342672	0,10122998	9,709	354964
2	1/1000	9,448	45439	0,97291731	0,09235869	9,711	491984
3	1/1000	9,453	32844	0,973733	0,09488153	9,708	346158

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	104,068332	0,10122998
2	103,575483	0,09235869
3	103,715640	0,09488153

ANEXO II

Repetición	15-ADON	
	X*312,5*dilución	
1	32521353,89	
2	32367338,45	
3	32411137,64	

Repetición	15-ADON µg/g	
	1	32,52135389
2	32,36733845	
3	32,41113764	
PROMEDIO	32,43327666	

➤ T= 30 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,447	33105	0,97271417	0,06651531	9,712	497705
2	1/1000	9,451	33874	0,97292567	0,06219384	9,714	544652
3	1/1000	9,452	31049	0,97342945	0,06451244	9,71	481287

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	102,139739	0,06651531
2	101,899658	0,06219384
3	102,028469	0,06451244

Repetición	15-ADON	
	X*312,5*dilución	
1	31918668,49	
2	31843643,08	
3	31883896,57	

Repetición	15-ADON µg/g	
	1	31,91866849
2	31,84364308	
3	31,88389657	
PROMEDIO	31,88206938	

ANEXO II

☐ 14 días

➤ T= 10 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,452	36118	0,97352971	0,11289027	9,709	319939
2	1/1000	9,446	39468	0,97331273	0,10579503	9,705	373061
3	1/1000	9,446	36657	0,97371405	0,11042363	9,701	331967

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	104,716126	0,11289027
2	104,321946	0,10579503
3	104,579090	0,11042363

Repetición	15-ADON
	X*312,5*dilución
1	32723789,4
2	32600608,17
3	32680965,74

Repetición	15-ADON
	µg/g
1	32,7237894
2	32,60060817
3	32,68096574
PROMEDIO	32,66845444

➤ T= 15 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,447	48008	0,97361641	0,16438844	9,703	292040
2	1/1000	9,448	38927	0,97381983	0,12342575	9,702	315388
3	1/1000	9,449	33946	0,97382253	0,10026524	9,703	338562

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	107,577136	0,16438844
2	105,301430	0,12342575
3	104,014736	0,10026524

Repetición	15-ADON
	X*312,5*dilución
1	33617854,86
2	32906697,02
3	32504604,85

ANEXO II

Repetición	15-ADON µg/g
1	33,61785486
2	32,90669702
3	32,50460485
PROMEDIO	33,009718912

➤ T= 20 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,451	36431	0,97382792	0,10000302	9,705	364299
2	1/1000	9,452	45320	0,9731288	0,10088643	9,713	449218
3	1/1000	9,46	18322	0,97415302	0,10044516	9,711	182408

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	104,000168	0,10000302
2	104,049246	0,10088643
3	104,024731	0,10044516

Repetición	15-ADON
	X*312,5*dilución
1	32500052,42
2	32515389,4
3	32507728,4

Repetición	15-ADON µg/g
1	32,50005242
2	32,5153894
3	32,5077284
PROMEDIO	32,50772341

➤ T= 25 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,459	32533	0,97394975	0,11772518	9,712	276347
2	1/1000	9,456	31426	0,97414237	0,12885159	9,707	243893
3	1/1000	9,461	25883	0,97405539	0,13002286	9,713	199065

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	104,984732	0,11772518
2	105,602866	0,12885159
3	105,667936	0,13002286

ANEXO II

Repetición	15-ADON	
	X*312,5*dilución	
1	32807728,8	
2	33000895,6	
3	33021230,15	

Repetición	15-ADON µg/g
1	32,8077288
2	33,0008956
3	33,02123015
PROMEDIO	32,94328485

➤ T= 30 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,461	29629	0,97395512	0,12110374	9,714	244658
2	1/1000	9,461	29528	0,97385486	0,12455603	9,715	237066
3	1/1000	9,457	30860	0,97424539	0,12755123	9,707	241942

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	105,172430	0,12110374
2	105,364224	0,12455603
3	105,530624	0,12755123

Repetición	15-ADON	
	X*312,5*dilución	
1	32866384,46	
2	32926319,98	
3	32978319,99	

Repetición	15-ADON µg/g
1	32,86638446
2	32,92631998
3	32,97831999
PROMEDIO	32,92367481

ANEXO II

☐ 21 días

➤ T= 10 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,453	55821	0,97313156	0,06545062	9,714	852872
2	1/1000	9,451	56998	0,97322624	0,06487691	9,711	878556
3	1/1000	9,455	58221	0,97333745	0,06614782	9,714	880165

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	102,080590	0,06545062
2	102,048717	0,06487691
3	102,119324	0,06614782

Repetición	15-ADON
	X*312,5*dilución
1	31900184,35
2	31890224,16
3	31912288,62

Repetición	15-ADON
	µg/g
1	31,90018435
2	31,89022416
3	31,91228862
PROMEDIO	31,90089904

➤ T= 15 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,475	38716	0,97469396	0,10327406	9,721	374886
2	1/1000	9,465	40475	0,97436689	0,08659384	9,714	467412
3	1/1000	9,47	35144	0,97498198	0,07862192	9,713	447000

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	104,181892	0,10327406
2	103,255213	0,08659384
3	102,812329	0,07862192

Repetición	15-ADON
	X*312,5*dilución
1	32556841,35
2	32267254,17
3	32128852,85

ANEXO II

Repetición	15-ADON µg/g
1	32,55684135
2	32,26725417
3	32,12885285
PROMEDIO	32,31764946

➤ T= 20 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,466	40268	0,97426925	0,07553555	9,716	533100
2	1/1000	9,47	42766	0,97468094	0,09679179	9,716	441835
3	1/1000	9,472	38342	0,97428513	0,06559357	9,722	584539

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	102,640864	0,07553555
2	103,821766	0,09679179
3	102,088532	0,06559357

Repetición	15-ADON
	X*312,5*dilución
1	32075269,91
2	32444301,89
3	31902666,15

Repetición	15-ADON µg/g
1	32,07526991
2	32,44430189
3	31,90266615
PROMEDIO	32,14074598

➤ T= 25 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,465	38606	0,97436689	0,06076575	9,714	635325
2	1/1000	9,466	48213	0,97386831	0,06905199	9,72	698213
3	1/1000	9,464	36140	0,97416366	0,05043914	9,715	716507

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	101,820319	0,06076575
2	102,280666	0,06905199
3	101,246619	0,05043914

ANEXO II

Repetición	15-ADON	
	X*312,5*dilución	
1	31818849,82	
2	31962708,23	
3	31639568,48	

Repetición	15-ADON µg/g	
	1	31,81884982
2	31,96270823	
3	31,63956848	
PROMEDIO	31,80704218	

➤ T= 30 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,464	50824	0,9740634	0,06886581	9,716	738015
2	1/1000	9,464	49426	0,97416366	0,06959634	9,715	710181
3	1/1000	9,463	51756	0,97386024	0,06312816	9,717	819856

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	102,270323	0,06886581
2	102,310908	0,06959634
3	101,951564	0,06312816

Repetición	15-ADON	
	X*312,5*dilución	
1	31959475,85	
2	31972158,72	
3	31859863,87	

Repetición	15-ADON µg/g	
	1	31,95947585
2	31,97215872	
3	31,85986387	
PROMEDIO	31,93049948	

ANEXO II

☐ 28 días

➤ T= 10 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,469	46663	0,97407674	0,07533836	9,721	619379
2	1/1000	9,469	36604	0,97487903	0,08209108	9,713	445895
3	1/1000	9,465	33103	0,97476828	0,07136574	9,71	463850

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	102,629909	0,07533836
2	103,005060	0,08209108
3	102,409208	0,07136574

Repetición	15-ADON
	X*312,5*dilución
1	32071846,58
2	32189081,17
3	32002877,49

Repetición	15-ADON
	µg/g
1	32,07184658
2	32,18908117
3	32,00287749
PROMEDIO	32,08793508

➤ T= 15 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,454	37283	0,97433783	0,06397967	9,703	582732
2	1/1000	9,461	29885	0,97495878	0,06872817	9,704	434829
3	1/1000	9,462	34115	0,97466007	0,06556693	9,708	520308

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	101,998870	0,06397967
2	102,262676	0,06872817
3	102,087052	0,06556693

Repetición	15-ADON
	X*312,5*dilución
1	31874647,02
2	31957086,23
3	31902203,71

ANEXO II

Repetición	15-ADON µg/g
1	31,87464702
2	31,95708623
3	31,90220371
PROMEDIO	31,91131232

➤ T= 20 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,46	56522	0,97445406	0,08410198	9,708	672065
2	1/1000	9,458	43745	0,97444879	0,08278766	9,706	528400
3	1/1000	9,45	71895	0,97312326	0,08013487	9,711	897175

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	103,116777	0,08410198
2	103,043759	0,08278766
3	102,896382	0,08013487

Repetición	15-ADON
	X*312,5*dilución
1	32223992,78
2	32201174,67
3	32155119,23

Repetición	15-ADON µg/g
1	32,22399278
2	32,20117467
3	32,15511923
PROMEDIO	32,19342889

➤ T= 25 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,457	47735	0,97394439	0,06396316	9,71	746289
2	1/1000	9,457	68204	0,97294239	0,06432101	9,72	1060369
3	1/1000	9,454	96941	0,97303417	0,06768881	9,716	1432157

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	101,997953	0,06396316
2	102,017834	0,06432101
3	102,204934	0,06768881

ANEXO II

Repetición	15-ADON	
	X*312,5*dilución	
1	31874360,35	
2	31880573,01	
3	31939041,8	

Repetición	15-ADON µg/g	
	1	31,87436035
2	31,88057301	
3	31,9390418	
PROMEDIO	31,89799172	

➤ T= 30 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,451	84501	0,97242515	0,06201103	9,719	1362677
2	1/1000	9,451	114683	0,97252521	0,05872341	9,718	1952935
3	1/1000	9,451	99026	0,97282553	0,05941983	9,715	1666548

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	101,889501	0,06201103
2	101,706856	0,05872341
3	101,745546	0,05941983

Repetición	15-ADON	
	X*312,5*dilución	
1	31840469,22	
2	31783392,51	
3	31795483,17	

Repetición	15-ADON µg/g	
	1	31,84046922
2	31,78339251	
3	31,79548317	
PROMEDIO	31,8064483	

ANEXO II

3. Producción de DON, 3-ADON y 15-ADON con $a_w = 0,95$ y diferentes temperaturas luego de 7, 14, 21 y 28 días de incubación

DON

$$[X_{\text{DON}} = (Y + 0,0146) / 0,0004]$$

7 días

➤ T= 10 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,797	534	0,90550695	0,00259243	9,715	205984
2	1/1000	8,797	2991	0,90587993	0,01380759	9,711	216620
3	1/1000	8,805	2741	0,90651704	0,01396546	9,713	196270

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	42,9810859	0,00259243
2	71,0189733	0,01380759
3	71,4136394	0,01396546

Repetición	DON
	X*312,5*dilución
1	13431589,35
2	22193429,16
3	22316762,3

Repetición	DON
	µg/g
1	13,43158935
2	22,19342916
3	22,3167623
PROMEDIO	19,31392694

➤ T= 15 °C

NO PRESENTO PRODUCCION

➤ T= 20 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,78	2808	0,90599525	0,00754530	9,691	372152
2	1/1000	8,786	5382	0,90530654	0,00825372	9,705	652070
3	1/1000	8,79	1851	0,90599876	0,00703340	9,702	263173

ANEXO II

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	55,3632602	0,00754530
2	57,1342877	0,00825372
3	54,0834907	0,00703340

Repetición	DON
	X*312,5*dilución
1	17301018,8
2	17854464,92
3	16901090,85

Repetición	DON µg/g
1	17,3010188
2	17,85446492
3	16,90109085
PROMEDIO	17,35219152

➤ T= 25 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,794	26558	0,90445336	0,01234176	9,723	2151881
2	1/1000	8,786	5043	0,90595999	0,01630872	9,698	309221
3	1/1000	8,801	3379	0,90619852	0,01400407	9,712	241287

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	67,3544013	0,01234176
2	77,2718105	0,01630872
3	71,5101746	0,01400407

Repetición	DON
	X*312,5*dilución
1	21048250,42
2	24147440,77
3	22346929,56

Repetición	DON µg/g
1	21,04825042
2	24,14744077
3	22,34692956
PROMEDIO	22,51420692

ANEXO II

➤ T= 30 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,795	4615	0,90651412	0,00856188	9,702	539017
2	1/1000	8,791	6648	0,90582174	0,00875757	9,705	759115
3	1/1000	8,782	4521	0,90610813	0,00845266	9,692	534861

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	57,9047052	0,00856188
2	58,3939159	0,00875757
3	57,6316585	0,00845266

Repetición	DON
	X*312,5*dilución
1	18095220,38
2	18248098,73
3	18009893,28

Repetición	DON
	µg/g
1	18,09522038
2	18,24809873
3	18,00989328
PROMEDIO	18,11773747

☒ 14 días

➤ T= 10 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,749	1183	0,90093708	0,00222253	9,711	532277
2	1/1000	8,753	1062	0,9005144	0,00193561	9,72	548664
3	1/1000	8,804	920	0,90585451	0,00163216	9,719	563669

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	42,0563175	0,00222253
2	41,3390272	0,00193561
3	40,5804089	0,00163216

Repetición	DON
	X*312,5*dilución
1	13142599,21
2	12918445,99
3	12681377,78

ANEXO II

Repetición	DON µg/g
1	13,14259921
2	12,91844599
3	12,68137778
PROMEDIO	12,91414099

➤ T= 15 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,755	1482	0,90034965	0,00301314	9,724	491845
2	1/1000	8,807	1640	0,90597675	0,00289631	9,721	566238
3	1/1000	8,808	2100	0,90589324	0,00298496	9,723	703526

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	44,0328610	0,00301314
2	43,7407715	0,00289631
3	43,9624108	0,00298496

Repetición	DON
	X*312,5*dilución
1	13760269,05
2	13668991,11
3	13738253,37

Repetición	DON µg/g
1	13,76026905
2	13,66899111
3	13,73825337
PROMEDIO	13,72250451

➤ T= 20 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,799	2099	0,90515379	0,00318470	9,721	659089
2	1/1000	8,806	3255	0,90568754	0,00365602	9,723	890313
3	1/1000	8,816	3010	0,90615685	0,00367736	9,729	818521

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	44,4617472	0,00318470
2	45,640044	0,00365602
3	45,693411	0,00367736

ANEXO II

Repetición	DON	
	X*312,5*dilución	
1	13894296	
2	14262513,75	
3	14279190,95	

Repetición	DON µg/g	
1	13,894296	
2	14,26251375	
3	14,27919095	
PROMEDIO	14,1453357	

➤ T= 25 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	8,811	2887	0,906295	0,00453621	9,722	636434
2	1/100	8,819	2970	0,90683805	0,00498378	9,725	595933
3	1/100	8,802	3540	0,90574192	0,00472382	9,718	749394

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	47,8405318	0,00453621
2	48,9594543	0,00498378
3	48,3095421	0,00472382

Repetición	DON	
	X*312,5*dilución	
1	14950166,18	
2	15299829,48	
3	15096731,91	

Repetición	DON µg/g	
1	14,95016618	
2	15,29982948	
3	15,09673191	
PROMEDIO	15,11557586	

➤ T= 30 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,757	3347	0,90055533	0,00585267	9,724	571876
2	1/1000	8,805	3666	0,9058642	0,00578635	9,72	633560
3	1/1000	8,757	3848	0,90009251	0,00565729	9,729	680184

ANEXO II

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	51,1316684	0,00585267
2	50,9658754	0,00578635
3	50,6432318	0,00565729

Repetición	DON
	X*312,5*dilución
1	15978646,38
2	15926836,05
3	15826009,95

Repetición	DON
	µg/g
1	15,97864638
2	15,92683605
3	15,82600995
PROMEDIO	15,91049746

☐ 21 días

➤ T= 10 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,758	1584	0,90084345	0,00204720	9,722	773740
2	1/1000	8,758	1624	0,90065817	0,00241386	9,724	672780
3	1/1000	8,798	1866	0,90551667	0,00221279	9,716	843279

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	41,6179983	0,00204720
2	42,5346621	0,00241386
3	42,031977	0,00221279

Repetición	DON
	X*312,5*dilución
1	13005624,47
2	13292081,92
3	13134992,8

Repetición	DON
	µg/g
1	13,00562447
2	13,29208192
3	13,1349928
PROMEDIO	13,14423306

ANEXO II

➤ T= 15 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	-	-	-	-	9,719	412864
2	1/1000	8,752	3486	0,90078221	0,00948362	9,716	367581
3	1/1000	-	-	-	-	9,713	418430

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	-	-
2	60,20906004	0,00948362
3	-	-

Repetición	DON
	X*312,5*dilución
1	-
2	18815331,26
3	-

Repetición	DON
	µg/g
1	-
2	18,81533126
3	-
PROMEDIO	18,81533126

➤ T= 20 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,748	3426	0,90083411	0,00659592	9,711	519412
2	1/1000	8,748	3511	0,9005559	0,00672276	9,714	522256
3	1/1000	8,748	3093	0,90083411	0,00634339	9,711	487594

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	52,989800	0,00659592
2	53,3068916	0,00672276
3	52,3584806	0,00634339

Repetición	DON
	X*312,5*dilución
1	16559312,5
2	16658403,64
3	16362025,19

ANEXO II

Repetición	DON µg/g
1	16,5593125
2	16,65840364
3	16,36202519
PROMEDIO	16,52658044

➤ T= 25 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,815	13285	0,90726636	0,02688711	9,716	494103
2	1/1000	8,805	4555	0,90661038	0,01129152	9,712	403400
3	1/1000	8,801	7616	0,90610522	0,01568611	9,713	485525

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	103,717766	0,02688711
2	64,7288052	0,01129152
3	75,7152824	0,01568611

Repetición	DON
	X*312,5*dilución
1	32411801,98
2	20227751,61
3	23661025,76

Repetición	DON µg/g
1	32,41180198
2	20,22775161
3	23,66102576
PROMEDIO	25,43352645

➤ T= 30 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		Tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,796	6997	0,90596354	0,01248203	9,709	560566
2	1/1000	8,796	7203	0,90587024	0,01325672	9,71	543347
3	1/1000	8,796	7727	0,90577695	0,01425917	9,711	541897

ANEXO II

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	67,7050677	0,01248203
2	69,6418044	0,01325672
3	72,1479183	0,01425917

Repetición	DON
	X*312,5*dilución
1	21157833,67
2	21763063,88
3	22546224,48

Repetición	DON µg/g
1	21,15783367
2	21,76306388
3	22,54622448
PROMEDIO	21,82237401

☐ 28 días

➤ T= 10 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,749	1045	0,90149408	0,00195212	9,705	535316
2	1/1000	8,749	1262	0,90084432	0,00203464	9,712	620256
3	1/1000	8,749	1161	0,90065884	0,00185358	9,714	626356

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	41,3802950	0,00195212
2	41,5866094	0,00203464
3	41,1339462	0,00185358

Repetición	DON
	X*312,5*dilución
1	12931342,19
2	12995815,44
3	12854358,18

Repetición	DON µg/g
1	12,93134219
2	12,99581544
3	12,85435818
PROMEDIO	12,92717194

ANEXO II

➤ T= 15 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		Tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,733	891	0,89947471	0,00125564	9,709	709601
2	1/1000	8,747	1150	0,90073113	0,00179777	9,711	639681
3	1/1000	8,745	1775	0,90033975	0,00226926	9,713	782193

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	39,6390880	0,00125564
2	40,9944277	0,00179777
3	42,1731523	0,00226926

Repetición	DON	
	X*312,5*dilución	
1	12387215,01	
2	12810758,65	
3	13179110,09	

Repetición	DON	
	µg/g	
1	12,38721501	
2	12,81075865	
3	13,17911009	
PROMEDIO	12,79236125	

➤ T= 20 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,777	10235	0,90531202	0,00679322	9,695	1506650
2	1/1000	8,757	4829	0,90362192	0,00368887	9,691	1309074
3	1/1000	8,728	6262	0,90025786	0,00483279	9,695	1295733

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	53,4830418	0,00679322
2	45,7221677	0,00368887
3	48,5819644	0,00483279

Repetición	DON	
	X*312,5*dilución	
1	16713450,58	
2	14288177,42	
3	15181863,88	

ANEXO II

Repetición	DON µg/g
1	16,71345058
2	14,28817742
3	15,18186388
PROMEDIO	15,39449729

➤ T= 25 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,733	4709	0,90030928	0,00316501	9,7	1487832
2	1/1000	8,733	6044	0,9004949	0,00335693	9,698	1800453
3	1/1000	8,733	5057	0,9004021	0,00309822	9,699	1632227

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	44,4125197	0,00316501
2	44,8923324	0,00335693
3	44,2455525	0,00309822

Repetición	DON
	X*312,5*dilución
1	13878912,4
2	14028853,87
3	13826735,17

Repetición	DON µg/g
1	13,8789124
2	14,02885387
3	13,82673517
PROMEDIO	13,91150048

➤ T= 30 °C

Repetición	Dilución	DON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	8,762	6940	0,90320586	0,0043321	9,701	1601995
2	1/1000	8,762	7625	0,90311276	0,00474095	9,702	1608327
3	1/1000	8,762	9217	0,90413786	0,00452166	9,691	2038411

Repetición	DON	
	X	AR=Y
1	47,3302460	0,0043321
2	48,3523783	0,00474095
3	47,8041482	0,00452166

ANEXO II

Repetición	DON	
	X*312,5*dilución	
1	14790701,89	
2	15110118,21	
3	14938796,31	

Repetición	DON µg/g	
1	14,79070189	
2	15,1101182	
3	14,93879631	
PROMEDIO	14,9465388	

3-ADON

$$[X_{3-ADON} = (Y - 0,000943) / 0,0000113]$$

☐ 7 días

➤ T= 10 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,295	792	1,05970149	0,00384496	9,715	205984
2	1/100	10,29	766	1,05962311	0,00353615	9,711	216620
3	1/100	10,29	815	1,05940492	0,00415244	9,713	196270

Repetición	3- ADON	
	X	AR=Y
1	256,810516	0,00384496
2	229,481969	0,00353615
3	284,02151	0,00415244

Repetición	3-ADON	
	X*312,5*dilución	
1	8025328,628	
2	7171311,523	
3	8875672,188	

Repetición	3-ADON µg/g	
1	8,025328628	
2	7,171311523	
3	8,875672188	
PROMEDIO	8,024104113	

ANEXO II

➤ T= 15 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,272	1030	1,05962451	0,00472481	9,694	217998
2	1/100	10,284	1219	1,05987839	0,00541215	9,703	225234
3	1/100	10,27	1924	1,05909044	0,00619945	9,697	310350

Repetición	3- ADON	
	X	AR=Y
1	334,673804	0,00472481
2	395,499924	0,00541215
3	465,172764	0,00619945

Repetición	3-ADON
	X*312,5*dilución
1	10458556,39
2	12359372,63
3	14536648,87

Repetición	3-ADON
	µg/g
1	10,45855639
2	12,35937263
3	14,53664887
PROMEDIO	12,45152596

➤ T= 20 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,264	2432	1,05912703	0,00653496	9,691	372152
2	1/100	10,272	3928	1,05842349	0,00602389	9,705	652070
3	1/100	10,276	1869	1,05916306	0,00710179	9,702	263173

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	494,864089	0,00653496
2	449,636561	0,00602389
3	545,025872	0,00710179

Repetición	3- ADON
	X*312,5*dilución
1	15464502,79
2	14051142,53
3	17032058,51

ANEXO II

Repetición	3-ADON µg/g
1	15,46450279
2	14,05114253
3	17,03205851
PROMEDIO	15,51590128

➤ T= 25 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,278	20990	1,05708115	0,00975426	9,723	2151881
2	1/100	10,273	2741	1,05929058	0,00886421	9,698	309221
3	1/100	10,289	2622	1,05941104	0,01086673	9,712	241287

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	779,757244	0,00975426
2	700,99207	0,00886421
3	878,205945	0,01086673

Repetición	3-ADON	
	X*312,5*dilución	
1	24367413,87	
2	21906002,18	
3	27443935,77	

Repetición	3-ADON µg/g
1	24,36741387
2	21,90600218
3	27,44393577
PROMEDIO	24,57245061

➤ T= 30 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,272	2704	1,05875077	0,00501654	9,702	539017
2	1/100	10,275	4647	1,05873261	0,0061216	9,705	759115
3	1/100	10,264	2220	1,05901775	0,00415061	9,692	534861

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	360,490209	0,00501654
2	458,283374	0,0061216
3	283,859389	0,00415061

ANEXO II

Repetición	3-ADON	
	X*312,5*dilución	
1	11265319,05	
2	14321355,44	
3	8870605,9	

Repetición	3-ADON µg/g	
1	11,26531905	
2	14,32135544	
3	8,8706059	
PROMEDIO	11,48576013	

📅 14 días

➤ T= 10 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,285	2552	1,05910823	0,0047945	9,711	532277
2	1/100	10,295	1911	1,05915638	0,00348301	9,72	548664
3	1/100	10,291	2235	1,05885379	0,00396509	9,719	563669

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	340,840363	0,00479450
2	224,779291	0,00348301
3	267,441857	0,00396509

Repetición	3-ADON	
	X*312,5*dilución	
1	10651261,34	
2	7024352,856	
3	8357558,045	

Repetición	3-ADON µg/g	
1	10,65126134	
2	7,024352856	
3	8,357558045	
PROMEDIO	8,677724079	

ANEXO II

➤ T= 15 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,301	1400	1,05933772	0,00284643	9,724	491845
2	1/100	10,295	1462	1,05904742	0,00258195	9,721	566238
3	1/100	10,296	1867	1,05893243	0,00265378	9,723	703526

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	168,179221	0,00284643
2	144,774617	0,00258195
3	151,130567	0,00265378

Repetición	3- ADON
	X*312,5*dilución
1	5255600,65
2	4524206,78
3	4722830,23

Repetición	3-ADON µg/g
1	5,25560065
2	4,52420678
3	4,72283023
PROMEDIO	4,834212553

➤ T= 20 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,294	6033	1,05894455	0,00915354	9,721	659089
2	1/100	10,294	6010	1,05872673	0,00675043	9,723	890313
3	1/100	10,304	6567	1,05910165	0,00802301	9,729	818521

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	726,596792	0,00915354
2	513,932297	0,00675043
3	626,549323	0,00802301

Repetición	3-ADON
	X*312,5*dilución
1	22706149,77
2	16060384,29
3	19579666,35

ANEXO II

Repetición	3-ADON µg/g
1	22,70614977
2	16,06038429
3	19,57966635
PROMEDIO	19,44873347

➤ T= 25 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		Tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,298	2208	1,05924707	0,00346933	9,722	636434
2	1/100	10,305	2177	1,0596401	0,0036531	9,725	595933
3	1/100	10,288	2437	1,05865404	0,00325196	9,718	749394

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	223,569086	0,00346933
2	239,831436	0,0036531
3	204,332825	0,00325196

Repetición	3-ADON
	X*312,5*dilución
1	6986533,952
2	7494732,385
3	6385400,768

Repetición	3-ADON µg/g
1	6,986533952
2	7,494732385
3	6,385400768
PROMEDIO	6,955555702

➤ T= 30 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,299	3402	1,05913204	0,00594884	9,724	571876
2	1/100	10,294	3937	1,0590535	0,00621409	9,72	633560
3	1/100	10,304	3824	1,05910165	0,00562201	9,729	680184

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	442,994872	0,00594884
2	466,468301	0,00621409
3	414,071519	0,00562201

ANEXO II

Repetición	3-ADON	
	X*312,5*dilución	
1	13843589,76	
2	14577134,4	
3	12939734,96	

Repetición	3-ADON	
	µg/g	
1	13,84358976	
2	14,5771344	
3	12,93973496	
PROMEDIO	13,78681971	

☐ 21 días

➤ T= 10 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,292	2641	1,05862991	0,00341329	9,722	773740
2	1/100	10,296	2572	1,05882353	0,00382294	9,724	672780
3	1/100	10,286	2548	1,05866612	0,00302154	9,716	843279

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	218,609848	0,00341329
2	254,862266	0,00382294
3	183,941464	0,00302154

Repetición	3-ADON	
	X*312,5*dilución	
1	6831557,761	
2	7964445,816	
3	5748170,746	

Repetición	3-ADON	
	µg/g	
1	6,831557761	
2	7,964445816	
3	5,748170746	
PROMEDIO	6,848058108	

ANEXO II

➤ T= 15 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,298	1284	1,05957403	0,00310998	9,719	412864
2	1/100	10,29	1034	1,05907781	0,00281299	9,716	367581
3	1/100	10,289	1150	1,05930197	0,00274837	9,713	418430

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	191,768403	0,00310998
2	165,485437	0,00281299
3	159,767160	0,00274837

Repetición	3-ADON
	X*312,5*dilución
1	5992762,578
2	5171419,904
3	4992723,736

Repetición	3-ADON
	µg/g
1	5,992762578
2	5,171419904
3	4,992723736
PROMEDIO	5,385635406

➤ T= 20 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		Tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,284	1203	1,05900525	0,00231608	9,711	519412
2	1/100	10,289	991	1,05919292	0,00189754	9,714	522256
3	1/100	10,285	1357	1,05910823	0,00278305	9,711	487594

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	121,511548	0,00231608
2	84,4722867	0,00189754
3	162,836559	0,00278305

Repetición	3-ADON
	X*312,5*dilución
1	3797235,871
2	2639758,961
3	5088642,461

ANEXO II

Repetición	3-ADON µg/g
1	3,797235871
2	2,639758961
3	5,088642461
PROMEDIO	3,841879098

➤ T= 25 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,293	2482	1,05938658	0,00502324	9,716	494103
2	1/100	10,287	2227	1,05920511	0,00552058	9,712	403400
3	1/100	10,288	2215	1,05919901	0,00456207	9,713	485525

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	361,083552	0,00502324
2	405,095143	0,00552058
3	320,271857	0,00456207

Repetición	3-ADON
	X*312,5*dilución
1	11283861,01
2	12659223,21
3	10008495,53

Repetición	3-ADON µg/g
1	11,28386101
2	12,65922321
3	10,00849553
PROMEDIO	11,31719325

➤ T= 30 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,281	2731	1,05891441	0,00487186	9,709	560566
2	1/100	10,283	3495	1,05901133	0,00643235	9,71	543347
3	1/100	10,285	3043	1,05910823	0,00561546	9,711	541897

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	347,686872	0,00487186
2	485,783499	0,00643235
3	413,491884	0,00561546

ANEXO II

Repetición	3-ADON	
	X*312,5*dilución	
1	10865214,75	
2	15180734,35	
3	12921621,37	

Repetición	3-ADON µg/g	
1	10,86521475	
2	15,18073435	
3	12,92162137	
PROMEDIO	12,98919016	

☐ 28 días

➤ T= 10 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,278	751	1,05904173	0,00140291	9,705	535316
2	1/100	10,278	884	1,05827842	0,00142522	9,712	620256
3	1/100	10,298	913	1,06011942	0,00145764	9,714	626356

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	40,6999720	0,00140291
2	42,674157	0,00142522
3	45,5431424	0,00145764

Repetición	3-ADON	
	X*312,5*dilución	
1	1271874,124	
2	1333567,407	
3	1423223,201	

Repetición	3-ADON µg/g	
1	1,271874124	
2	1,333567407	
3	1,423223201	
PROMEDIO	1,342888244	

ANEXO II

➤ T= 15 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,294	1988	1,06025337	0,00280157	9,709	709601
2	1/100	10,294	1534	1,06003501	0,00239807	9,711	639681
3	1/100	10,294	2017	1,05981674	0,00257865	9,713	782193

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	164,475611	0,00280157
2	128,767282	0,00239807
3	144,747564	0,00257865

Repetición	3-ADON
	X*312,5*dilución
1	5139862,848
2	4023977,567
3	4523361,364

Repetición	3-ADON
	µg/g
1	5,139862848
2	4,023977567
3	4,523361364
PROMEDIO	
	4,562400593

➤ T= 20 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		Tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,248	6258	1,05703971	0,00415359	9,695	1506650
2	1/100	10,245	6254	1,05716644	0,00477742	9,691	1309074
3	1/100	10,251	4593	1,05734915	0,00354471	9,695	1295733

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	284,122634	0,00415359
2	339,329453	0,00477742
3	230,239979	0,00354471

Repetición	3-ADON
	X*312,5*dilución
1	8878832,328
2	10604045,41
3	7194999,33

ANEXO II

Repetición	3-ADON µg/g
1	8,878832328
2	10,60404541
3	7,19499933
PROMEDIO	8,892625689

➤ T= 25 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		Tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,257	6313	1,05742268	0,00424309	9,7	1487832
2	1/100	10,252	6577	1,05712518	0,00365297	9,698	1800453
3	1/100	10,254	6412	1,05722239	0,00392838	9,699	1632227

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	292,043061	0,00424309
2	239,820315	0,00365297
3	264,192492	0,00392838

Repetición	3-ADON
	X*312,5*dilución
1	9126345,644
2	7494384,84
3	8256015,372

Repetición	3-ADON µg/g
1	9,126345644
2	7,49438484
3	8,256015372
PROMEDIO	8,292248619

➤ T= 30 °C

Repetición	Dilución	3-ADON				ACBP	
		Tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/100	10,255	3356	1,05710751	0,00209489	9,701	1601995
2	1/100	10,257	3924	1,0572047	0,0024398	9,702	1608327
3	1/100	10,244	4538	1,05706325	0,00222624	9,691	2038411

ANEXO II

Repetición	3-ADON	
	X	AR=Y
1	101,936986	0,00209489
2	132,460385	0,0024398
3	113,561405	0,00222624

Repetición	3-ADON
	X*312,5*dilución
1	3185530,798
2	4139387,04
3	3548793,897

Repetición	3-ADON
	µg/g
1	3,185530798
2	4,13938704
3	3,548793897
PROMEDIO	3,624570578

15-ADON

[X 15-ADON = (Y+1,772)/0,018]

☐ 7 días

➤ T= 10 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,468	41067	0,9745754	0,19936985	9,715	205984
2	1/1000	9,464	33537	0,97456493	0,1548195	9,711	216620
3	1/1000	9,467	33857	0,97467312	0,17250217	9,713	196270

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	109,520547	0,19936985
2	107,045528	0,1548195
3	108,027898	0,17250217

Repetición	15-ADON
	X*312,5*dilución
1	34225171,08
2	33451727,42
3	33758718,15

Repetición	15-ADON
	µg/g
1	34,22517108
2	33,45172742
3	33,75871815
PROMEDIO	33,81187222

ANEXO II

➤ T= 15 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,449	24356	0,97472664	0,1117258	9,694	217998
2	1/1000	9,454	28491	0,97433783	0,12649511	9,703	225234
3	1/1000	9,449	35994	0,97442508	0,11597873	9,697	310350

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	104,651433	0,1117258
2	105,471951	0,12649511
3	104,887707	0,11597873

Repetición	15-ADON
	X*312,5*dilución
1	32703572,84
2	32959984,58
3	32777408,57

Repetición	15-ADON
	µg/g
1	32,70357284
2	32,95998458
3	32,77740857
PROMEDIO	32,81365533

➤ T= 20 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,444	34048	0,97451243	0,09148950	9,691	372152
2	1/1000	9,447	57415	0,97341577	0,08805036	9,705	652070
3	1/1000	9,459	27756	0,97495362	0,10546675	9,702	263173

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	103,527194	0,09148950
2	103,336131	0,08805036
3	104,303708	0,10546675

Repetición	15-ADON
	X*312,5*dilución
1	32352248,25
2	32292541,02
3	32594908,79

ANEXO II

Repetición	15-ADON µg/g
1	32,35224825
2	32,29254102
3	32,59490879
PROMEDIO	32,41323268

➤ T= 25 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,449	78255	0,9718194	0,03636586	9,723	2151881
2	1/1000	9,447	13148	0,97411837	0,04251975	9,698	309221
3	1/1000	9,465	15007	0,97456755	0,06219564	9,712	241287

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	100,464770	0,03636586
2	100,806653	0,04251975
3	101,899758	0,06219564

Repetición	15-ADON
	X*312,5*dilución
1	31395240,6
2	31502079,01
3	31843674,35

Repetición	15-ADON µg/g
1	31,3952406
2	31,50207901
3	31,84367435
PROMEDIO	31,58033132

➤ T= 30 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,45	39283	0,97402597	0,07287896	9,702	539017
2	1/1000	9,451	53020	0,97382792	0,06984449	9,705	759115
3	1/1000	9,443	35652	0,97430871	0,06665657	9,692	534861

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	102,493276	0,07287896
2	102,324694	0,06984449
3	102,147587	0,06665657

ANEXO II

Repetición	15-ADON	
	X*312,5*dilución	
1	32029148,66	
2	31976466,84	
3	31921121,02	

Repetición	15-ADON µg/g	
1	32,02914866	
2	31,97646684	
3	31,92112102	
PROMEDIO	31,97557884	

📅 14 días

➤ T= 10 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,457	79070	0,97384409	0,14855047	9,711	532277
2	1/1000	9,465	87475	0,97376543	0,15943273	9,72	548664
3	1/1000	9,464	80631	0,97376273	0,14304672	9,719	563669

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	106,697248	0,14855047
2	107,301818	0,15943273
3	106,391484	0,14304672

Repetición	15-ADON	
	X*312,5*dilución	
1	33342890,15	
2	33531818,25	
3	33247338,84	

Repetición	15-ADON µg/g	
1	33,34289015	
2	33,53181825	
3	33,24733884	
PROMEDIO	33,37401575	

ANEXO II

➤ T= 15 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,473	33624	0,97418758	0,06836300	9,724	491845
2	1/1000	9,471	33220	0,97428248	0,05866791	9,721	566238
3	1/1000	9,469	31904	0,97387638	0,04534871	9,723	703526

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	102,242389	0,06836300
2	101,703773	0,05866791
3	100,963817	0,04534871

Repetición	15-ADON
	X*312,5*dilución
1	31950746,54
2	31782428,99
3	31551192,97

Repetición	15-ADON
	µg/g
1	31,95074654
2	31,78242899
3	31,55119297
PROMEDIO	31,76145617

➤ T= 20 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,468	33297	0,97397387	0,05051973	9,721	659089
2	1/1000	9,466	40460	0,97356783	0,04544469	9,723	890313
3	1/1000	9,47	58008	0,97337856	0,07086929	9,729	818521

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	101,251096	0,05051973
2	100,969150	0,04544469
3	102,381627	0,07086929

Repetición	15-ADON
	X*312,5*dilución
1	31640967,58
2	31552859,23
3	31994258,46

ANEXO II

Repetición	15-ADON µg/g
1	31,64096758
2	31,55285923
3	31,99425846
PROMEDIO	31,72936176

➤ T= 25 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,466	58723	0,97366797	0,09226880	9,722	636434
2	1/1000	9,473	60943	0,9740874	0,10226485	9,725	595933
3	1/1000	9,465	54485	0,97396584	0,07270541	9,718	749394

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	103,570489	0,09226880
2	104,125825	0,10226485
3	102,483634	0,07270541

Repetición	15-ADON
	X*312,5*dilución
1	32365777,74
2	32539320,35
3	32026135,64

Repetición	15-ADON µg/g
1	32,36577774
2	32,53932035
3	32,02613564
PROMEDIO	32,31041124

➤ T= 30 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,472	40848	0,97408474	0,07142807	9,724	571876
2	1/1000	9,472	30494	0,9744856	0,04813120	9,72	633560
3	1/1000	9,472	49456	0,97358413	0,07270974	9,729	680184

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	102,412671	0,07142807
2	101,118400	0,04813120
3	102,483874	0,07270974

ANEXO II

Repetición	15-ADON	
	X*312,5*dilución	
1	32003959,58	
2	31599499,92	
3	32026210,72	

Repetición	15-ADON	
	µg/g	
1	32,00395958	
2	31,59949992	
3	32,02621072	
PROMEDIO	31,87655674	

 21 días

➤ T= 10 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,462	50693	0,97455969	0,09043181	9,709	560566
2	1/1000	9,463	51565	0,97456231	0,09490252	9,71	543347
3	1/1000	9,461	56031	0,974256	0,10339788	9,711	541897

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	103,468434	0,09043181
2	103,716807	0,09490252
3	104,188771	0,10339788

Repetición	15-ADON	
	X*312,5*dilución	
1	32333885,65	
2	32411502,1	
3	32558990,94	

Repetición	15-ADON	
	µg/g	
1	32,33388565	
2	32,4115021	
3	32,55899094	
PROMEDIO	32,4347929	

ANEXO II

➤ T= 15 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,47	48652	0,97438008	0,11784026	9,719	412864
2	1/1000	9,473	41705	0,97498971	0,11345799	9,716	367581
3	1/1000	9,469	47880	0,97487903	0,11442774	9,713	418430

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	104,991125	0,11784026
2	104,747666	0,11345799
3	104,801541	0,11442774

Repetición	15-ADON
	X*312,5*dilución
1	32809726,69
2	32733645,59
3	32750481,63

Repetición	15-ADON
	µg/g
1	32,80972669
2	32,73364559
3	32,75048163
PROMEDIO	32,76461797

➤ T= 20 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,466	47790	0,97477088	0,09200789	9,711	519412
2	1/1000	9,467	56390	0,97457278	0,10797387	9,714	522256
3	1/1000	9,464	52216	0,97456493	0,10708909	9,711	487594

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	103,555994	0,09200789
2	104,442993	0,10797387
3	104,393839	0,10708909

Repetición	15-ADON
	X*312,5*dilución
1	32361248,02
2	32638435,19
3	32623074,56

ANEXO II

Repetición	15-ADON µg/g
1	32,36124802
2	32,63843519
3	32,62307456
PROMEDIO	32,54091926

➤ T= 25 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,466	46177	0,97426925	0,09345622	9,716	494103
2	1/1000	9,468	49466	0,97487644	0,12262271	9,712	403400
3	1/1000	9,467	46361	0,97467312	0,09548633	9,713	485525

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	103,636457	0,09345622
2	105,256817	0,12262271
3	103,749241	0,09548633

Repetición	15-ADON
	X*312,5*dilución
1	32386392,76
2	32892755,33
3	32421637,66

Repetición	15-ADON µg/g
1	32,38639276
2	32,89275533
3	32,42163766
PROMEDIO	32,56692858

➤ T= 30 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,462	50693	0,97455969	0,09043181	9,709	560566
2	1/1000	9,463	51565	0,97456231	0,09490252	9,711	543347
3	1/1000	9,461	56031	0,974256	0,10339788	9,711	541897

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	103,468434	0,09043181
2	103,716807	0,09490252
3	104,188771	0,10339788

ANEXO II

Repetición	15-ADON	
	X*312,5*dilución	
1	32333885,65	
2	32411502,1	
3	32558990,94	

Repetición	15-ADON µg/g	
1	32,33388565	
2	32,4115021	
3	32,55899094	
PROMEDIO	32,4347929	

☐ 28 días

➤ T= 10 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,456	94782	0,97434312	0,17705804	9,705	535316
2	1/1000	9,459	127251	0,97394975	0,20515884	9,712	620256
3	1/1000	9,462	114704	0,97405806	0,18312908	9,714	626356

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	108,281002	0,17705804
2	109,842158	0,20515884
3	108,618282	0,18312908

Repetición	15-ADON	
	X*312,5*dilución	
1	33837813,14	
2	34325674,26	
3	33943213,25	

Repetición	15-ADON µg/g	
1	33,83781314	
2	34,32567426	
3	33,94321325	
PROMEDIO	34,03556688	

ANEXO II

➤ T= 15 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,454	113525	0,97373571	0,15998427	9,709	709601
2	1/1000	9,454	103139	0,97353516	0,16123505	9,711	639681
3	1/1000	9,457	126848	0,97364357	0,16216969	9,713	782193

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	107,332460	0,15998427
2	107,401947	0,16123505
3	107,453872	0,16216969

Repetición	15-ADON
	X*312,5*dilución
1	33541393,63
2	33563108,56
3	33579334,98

Repetición	15-ADON
	µg/g
1	33,54139363
2	33,56310856
3	33,57933498
PROMEDIO	33,56127905

➤ T= 20 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,42	32795	0,97163486	0,02176683	9,695	1506650
2	1/1000	9,418	37492	0,97182953	0,02864009	9,691	1309074
3	1/1000	9,422	34480	0,97184116	0,02661042	9,695	1295733

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	99,6537130	0,02176683
2	100,0355607	0,02864009
3	99,9228011	0,02661042

Repetición	15-ADON
	X*312,5*dilución
1	31141785,31
2	31261112,71
3	31225875,36

ANEXO II

Repetición	15-ADON µg/g
1	31,14178531
2	31,26111271
3	31,22587536
PROMEDIO	31,20959112

➤ T= 25 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,427	37686	0,97185567	0,02532947	9,7	1487832
2	1/1000	9,422	39254	0,97154052	0,02180229	9,698	1800453
3	1/1000	9,424	41547	0,97164656	0,02545418	9,699	1632227

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	99,8516374	0,02532947
2	99,6556828	0,02180229
3	99,8585656	0,02545418

Repetición	15-ADON
	X*312,5*dilución
1	31203636,68
2	31142400,88
3	31205801,74

Repetición	15-ADON µg/g
1	31,20363668
2	31,14240088
3	31,20580174
PROMEDIO	31,18394643

➤ T= 30 °C

Repetición	Dilución	15-ADON				ACBP	
		tpo	Área	Relación Tr	AR	tpo	Área
1	1/1000	9,427	39400	0,97175549	0,02459433	9,701	1601995
2	1/1000	9,427	40814	0,97165533	0,02537668	9,702	1608327
3	1/1000	9,415	37841	0,97151997	0,01856397	9,691	2038411

Repetición	15-ADON	
	X	AR=Y
1	99,8107963	0,02459433
2	99,8542600	0,02537668
3	99,4757761	0,01856397

ANEXO II

Repetición	15-ADON
	X*312,5*dilución
1	31190873,85
2	31204456,25
3	31086180,03

Repetición	15-ADON
	µg/g
1	31,19087385
2	31,20445625
3	31,08618003
PROMEDIO	31,16050338

4. ANALISIS ESTADISTICO

▣ Análisis de varianza para DON, 3-ADON y 15-ADON

Tabla de Análisis de Varianza para DON

Factor	DF	SS	MS	F	P
aw	1	231.21	231.213	39.86	0.0000
Temp	4	777.39	194.348	33.50	0.0000
tiempo	3	495.78	165.259	28.49	0.0000
aw*Temp	4	290.92	72.731	12.54	0.0000
aw*tiempo	3	594.48	198.160	34.16	0.0000
Temp*tiempo	12	468.13	39.011	6.72	0.0000
aw*Temp*tiempo	12	605.02	50.419	8.69	0.0000
Error	80	464.10	5.801		
Total	119	3927.03			

Grand Mean 16.502 CV 14.60

Tabla de Análisis de Varianza para 3-ADON

Source	DF	SS	MS	F	P
aw	1	9968.2	9968.16	1984.07	0.0000
Temp	4	3640.1	910.04	181.13	0.0000
tiempo	3	1682.0	560.66	111.59	0.0000
aw*Temp	4	2915.0	728.75	145.05	0.0000
aw*tiempo	3	446.8	148.93	29.64	0.0000
Temp*tiempo	12	2141.0	178.42	35.51	0.0000
aw*Temp*tiempo	12	2097.0	174.75	34.78	0.0000
Error	80	401.9	5.02		
Total	119	23292.0			

Grand Mean 18.756 CV 11.95

ANEXO II

Tabla de Análisis de Varianza para 15-ADON

Source	DF	SS	MS	F	P
aw	1	0.0056	0.00560	0.15	0.7015
Temp	4	21.3680	5.34199	141.03	0.0000
tiempo	3	5.0217	1.67391	44.19	0.0000
aw*Temp	4	5.0772	1.26930	33.51	0.0000
aw*tiempo	3	5.6771	1.89235	49.96	0.0000
Temp*tiempo	12	19.5691	1.63076	43.05	0.0000
aw*Temp*tiempo	12	15.0785	1.25654	33.17	0.0000
Error	80	3.0303	0.03788		
Total	119	74.8275			

Grand Mean 32.383 CV 0.60

ANEXO II

▣ Comparaciones de Medias para DON, 3-ADON y 15-ADON

Comparaciones de medias para DON por aw*Temperatura*tiempo
 Test de Tukey ($\alpha=0,05$)

aw	Temp	tiempo	Media	Grupos Homogéneos
99	30	14	31.177	A
99	25	14	28.173	AB
95	25	21	25.433	ABC
99	20	14	23.640	ABCD
95	25	7	22.517	BCDE
95	30	21	21.823	BCDEF
99	25	7	21.457	BCDEFG
99	30	7	20.453	BCDEFGH
99	15	14	20.367	BCDEFGH
95	10	7	19.313	CDEFGH
99	25	21	19.200	CDEFGH
99	10	14	18.867	CDEFGH
99	15	7	18.123	CDEFGH
95	30	7	18.120	CDEFGH
95	20	7	17.350	DEFGH
95	20	21	16.527	DEFGH
99	15	21	16.460	DEFGH
99	10	7	16.037	DEFGH
95	30	14	15.913	DEFGH
95	20	28	15.393	EFGH
99	20	21	15.183	EFGH
95	25	14	15.117	EFGH
95	30	28	14.947	EFGH
99	20	7	14.477	FGH
95	20	14	14.143	FGHI
99	10	28	14.097	FGHI
95	25	28	13.913	FGHI
99	30	21	13.763	GHI
95	15	14	13.723	GHI
99	15	28	13.660	GHI
99	10	21	13.473	HI
99	20	28	13.270	HI
99	30	28	13.233	HI
95	10	21	13.147	HI
95	10	28	12.927	HI
95	10	14	12.913	HI
95	15	28	12.793	HI
99	25	28	12.700	HI
95	15	21	6.2733	IJ
95	15	7	0.0000	J

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 1.9666
 Critical Q Value 5.710 Critical Value for Comparison 7.9399
 Error term used: Error, 80 DF
 There are 10 groups (A, B, etc.) in which the means
 are not significantly different from one another.

ANEXO II

Comparaciones de medias para 3-DON por aw*Temperatura*tiempo
 Test de Tukey ($\alpha=0,05$)

aw	Temp	tiempo	Media	Grupos Homogéneos
99	30	21	61.877	A
99	30	28	49.987	B
99	30	14	41.233	C
99	25	14	38.530	CD
99	30	7	37.923	CD
99	10	14	36.757	CD
99	15	14	33.487	DE
99	15	7	32.730	DE
99	25	7	32.540	DE
99	20	14	27.110	EF
95	25	7	24.573	FG
99	20	21	23.083	FGH
99	10	7	21.803	FGHI
99	20	7	19.867	FGHIJ
95	20	14	19.450	GHIJK
99	20	28	17.953	GHIJKL
99	15	21	17.427	GHIJKL
99	25	28	16.187	HIJKLM
95	20	7	15.513	IJKLMN
99	15	28	14.800	IJKLMNO
99	10	28	14.683	IJKLMNO
95	30	14	13.787	JKLMNOP
95	30	21	12.990	JKLMNOP
99	25	21	12.680	JKLMNOPQ
95	15	7	12.447	KLMNOPQ
95	30	7	11.487	LMNOPQR
95	25	21	11.320	LMNOPQR
95	20	28	8.890	MNOPQRS
95	10	14	8.677	NOPQRST
95	25	28	8.297	NOPQRST
95	10	7	8.020	OPQRST
95	25	14	6.957	PQRST
95	10	21	6.850	PQRST
99	10	21	6.753	PQRST
95	15	21	5.383	QRST
95	15	14	4.833	RST
95	15	28	4.560	RST
95	20	21	3.843	ST
95	30	28	3.627	ST
95	10	28	1.340	T

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 1.8301
 Critical Q Value 5.710 Critical Value for Comparison 7.3890
 Error term used: Error, 80 DF
 There are 20 groups (A, B, etc.) in which the means
 are not significantly different from one another.

ANEXO II

Comparaciones de medias para 15-DON por aw*Temperatura*tiempo
 Test de Tukey ($\alpha=0,05$)

aw	Temp	tiempo	Media	Grupos Homogéneos
99	10	7	34.963	A
95	10	28	34.037	B
95	10	7	33.813	BC
95	15	28	33.560	BCD
95	10	14	33.373	CDE
99	15	14	33.010	DEF
99	25	14	32.943	DEFG
99	30	14	32.927	DEFG
95	15	7	32.813	EFGH
95	15	21	32.763	EFGHI
99	20	7	32.680	FGHIJ
99	10	14	32.667	FGHIJ
95	25	21	32.567	FGHIJK
95	20	21	32.540	FGHIJKL
99	20	14	32.510	FGHIJKLM
95	10	21	32.433	FGHIJKLMN
95	30	21	32.433	FGHIJKLMN
99	25	7	32.433	FGHIJKLMN
95	20	7	32.410	FGHIJKLMN
99	15	21	32.320	GHIJKLMNO
95	25	14	32.313	GHIJKLMNO
99	20	28	32.193	HIJKLMNOP
99	20	21	32.140	IJKLMNOP
99	10	28	32.087	JKLMNOP
95	30	7	31.977	KLMNOP
99	30	21	31.930	KLMNOP
99	15	28	31.910	LMNOP
99	10	21	31.900	LMNOP
99	25	28	31.897	MNOP
99	30	7	31.880	MNOP
95	30	14	31.877	MNOP
99	25	21	31.807	NOPQ
99	30	28	31.807	NOPQ
99	15	7	31.800	NOPQR
95	15	14	31.760	OPQR
95	20	14	31.727	OPQR
95	25	7	31.580	PQR
95	20	28	31.210	QR
95	25	28	31.183	QR
95	30	28	31.160	R

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1589
 Critical Q Value 5.710 Critical Value for Comparison 0.6416
 Error term used: Error, 80 DF
 There are 18 groups (A, B, etc.) in which the means
 are not significantly different from one another.