

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 736**

51 Int. Cl.:

**A01N 63/04** (2006.01)

**C12N 1/14** (2006.01)

**A01P 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2014 PCT/IB2014/061751**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.12.2014 WO14191917**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2014 E 14736972 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019 EP 3003050**

54 Título: **Cepa no tóxigena de Aspergillus flavus**

30 Prioridad:

**27.05.2013 IT RM20130305**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**12.02.2020**

73 Titular/es:

**UNIVERSITA' CATTOLICA DEL SACRO CUORE  
(100.0%)**

**Largo Agostino Gemelli 1  
20123 Milano Mi, IT**

72 Inventor/es:

**BATTILANI, PAOLA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 741 736 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Cepa no tóxigena de *Aspergillus flavus*

## 5 Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a una nueva cepa no tóxigena de *Aspergillus flavus* y también a composiciones que comprenden esta cepa, y al uso de la misma como un agente de biocontrol contra la contaminación por aflatoxinas producidas por cepas tóxicas de *Aspergillus flavus* y/o *Aspergillus parasiticus*. Además, la presente invención también proporciona un método para prevenir y/o reducir y/o eliminar la contaminación por aflatoxinas producidas por cepas tóxicas de *Aspergillus flavus* y/o *Aspergillus parasiticus* en cultivos tales como cultivos de campo completo y/o en ambientes controlados, tal como en túneles o invernaderos y cultivos sin suelo.

## 15 Técnica anterior conocida

*Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* son hongos que producen micotoxinas, tales como aflatoxinas y ácido ciclopiazónico. En particular, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* pueden producir aflatoxinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> y G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> en condiciones ambientales y nutricionales favorables. Aflatoxina B<sub>1</sub> es la sustancia natural más tóxica conocida y está clasificada por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, 2002). IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans: Some Traditional Herbal Medicines, some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene, vol. 82. IARC, Ginebra, págs. 301-366.) como grupo 1, la clase de mayor riesgo, debido a su efecto carcinogénico demostrado en seres humanos y animales. Aunque la aflatoxina B<sub>2</sub> se clasifica en el grupo 1, existen pruebas limitadas con respecto a su efecto carcinogénico. La acción tóxica de las aflatoxinas se manifiesta después de la ingestión de alimentos contaminados con estas toxinas con efectos adversos posteriores, tanto agudos como crónicos.

*Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* son capaces de infectar diversos tipos de cultivos, tales como cultivos de maíz, cultivos de algodón y nueces, con contaminación posterior de los productos alimentarios derivados de dichos cultivos con aflatoxinas. Además, las aflatoxinas también pueden pasar a los animales alimentados con productos contaminados. En particular, se ha informado de una transferencia a leche obtenida de vacas y búfalas y a quesos derivados de la misma, en los que se observa una concentración de toxinas dependiendo tanto del tipo de cuajo como del periodo de envejecimiento.

En el continente africano, por ejemplo, la transferencia de aflatoxinas ha contribuido en los últimos años, específicamente 2004 y 2005, a la muerte de más de 200 personas por toxicidad aguda por aflatoxinas ingeridas de maíz muy contaminado (Probst *et al.*, 2007). Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004: identification of the causal agent. *App. Environ. Microbiol.* 73, 2762-2764).

Debido a la alta toxicidad de las aflatoxinas, actualmente existe un reglamento en Europa (Comisión Europea (CE), 2010. Reglamento n.º 165/2010 de la Comisión por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios en lo que respecta a las aflatoxinas. Diario Oficial de la Unión Europea L50, 8-12) que define los límites máximos para la presencia de aflatoxinas en diversos productos para consumo humano. En particular, la regulación especificada establece 2 valores, uno para la aflatoxina B<sub>1</sub> (5,0 µg/kg) y uno de la suma total de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> (10 µg/kg), en maíz destinado a uso humano antes de la purificación y el contenido máximo de aflatoxina B<sub>1</sub> en leche (0,050 µg/kg). Además, el Reglamento CE 2003 (Comisión Europea (CE), 2003. Directiva n.º 2003/100/CE de la Comisión sobre sustancias indeseables en la alimentación animal. Diario Oficial de la Unión Europea (L285, 33-37) establece los límites máximos para la presencia de aflatoxinas en los alimentos destinados a animales (0,02 mg/kg) con restricciones determinadas para los basados en la leche (0,005 mg/kg).

Entre las aflatoxinas, B<sub>1</sub> es la más habitualmente presente en alimentos contaminados. En particular en Italia, se ha observado que esta aflatoxina representa el 90 % de las aflatoxinas totales identificadas en el maíz (Battilani P., Barbano C., Piva G. 2008. Aflatoxin B1 contamination in maize related to the aridity index in North Italy. *World Mycotoxin J.* 1, 449-456).

En la actualidad, no hay medios directos disponibles para controlar el desarrollo del hongo en el campo. Se han redactado directrices que definen las mejores técnicas de cultivo para minimizar las contaminaciones por aflatoxinas y los criterios a seguir para optimizar la cosecha, el secado y el almacenamiento de los granos para evitar el aumento de las contaminaciones durante estas fases. Sin embargo, en cultivos y áreas geográficas en las que se observan condiciones meteorológicas favorables a los hongos aflatoxígenos, la observancia estricta de las directrices no garantiza la producción de acuerdo con los requisitos legales. Además, los procesos técnicos habitualmente aplicados no permiten disminuir la contaminación y existe una carencia de sistemas eficaces de desintoxicación autorizados para su aplicación al grano durante el periodo posterior a la cosecha.

Entre las estrategias propuestas para limitar la contaminación por aflatoxinas en cultivos destinados al consumo, la más prometedora se basa en el uso de cepas no tóxicas de *Aspergillus flavus* o de cepas de *Aspergillus flavus* que son incapaces de producir aflatoxinas. El principio que forma la base de esta estrategia reside en la exclusión

competitiva entre cepas no toxígenas de *Aspergillus flavus* y cepas toxígenas (cepas de *Aspergillus flavus* que producen aflatoxinas), lo que, de hecho, hace posible en el campo limitar la actividad de las cepas toxígenas y, por lo tanto, la contaminación por aflatoxinas.

5 El uso de cepas no toxígenas de *Aspergillus flavus* en el campo como agentes de biocontrol que actúan mediante la exclusión competitiva se propuso en los Estados Unidos, donde actualmente existen 2 cepas comerciales (*Aspergillus flavus* AF36 y AFLAGUARD®). Además, una mezcla de cepas no toxígenas de *A. flavus* está en proceso de registro en África (AFLASAFE™). Habitualmente, las cepas no toxígenas que se utilizarán como agentes de control biológico, tales como las especificadas anteriormente a modo de ejemplo, se seleccionan de cultivos de maíz. Las cepas  
10 seleccionadas de este modo se pueden usar después como agentes de control biológico y también en diversos tipos de cultivos susceptibles de infección por *Aspergillus flavus* y/o *Aspergillus parasiticus*.

Sin embargo, las cepas disponibles en los Estados Unidos o en África no son transferibles a Europa, incluyendo Italia. De hecho, incluso con independencia de los reglamentos relativos a la introducción de microorganismos originarios de diversos países, la adaptación a ambientes agroclimáticos bastante diferentes, tales como los de África y los  
15 Estados Unidos, significa que las cepas no toxígenas disponibles son apenas competitivas con respecto a las cepas nativas. De hecho, como se observó en un trabajo que describe cepas aisladas en Italia (Giorni P., Magan N., Pietri A., Bertuzzi T., Battilani P. Studies on *Aspergillus* Section Flavi isolated in northern Italy from maize. International Journal of Food Microbiology, 2007, 113, 330-338), las cepas italianas parecen menos termófilas en comparación con las observadas en otros ambientes.

Hay que añadir que, con el uso de dichas cepas, no es posible descartar el riesgo de que la toxigenicidad de la cepa utilizada pueda restablecerse si el grupo de compatibilidad vegetativa (GCV) al que pertenecen las cepas no se verifica de antemano, ya que *Aspergillus flavus* es capaz de intercambiar material genético por fusión de hifas con cepas  
25 pertenecientes al mismo GCV. En otras palabras, si las cepas toxígenas y anti-toxígenas pertenecen al mismo GCV y entran en contacto entre sí, se intercambiará material genético, adquiriendo la cepa no toxígena la capacidad de producir aflatoxinas.

El objeto de la presente invención es superar las desventajas asociadas con el uso de cepas no toxígenas conocidas de *Aspergillus flavus* y proporcionar una cepa no toxígena alternativa de *Aspergillus flavus* para utilizar en la prevención y/o eliminación parcial o total de la contaminación por aflatoxinas. Esto parece ser aún más apropiado después de los  
30 problemas significativos experimentados en el cultivo agrícola de 2012, con una proporción significativa del maíz producido en Italia, estimado en aproximadamente 60 %, contaminado por encima de los límites legales. Se espera que la alta contaminación, atribuible principalmente a las condiciones meteorológicas experimentadas, con altas temperaturas y falta de lluvia durante el periodo estival, suceda con más probabilidad en un futuro cercano debido al cambio climático actual, con problemas posteriores para la salud pública.

#### Sumario de la invención

40 La presente invención se refiere a una nueva cepa no toxígena de *Aspergillus flavus*. En particular, el inventor ha descubierto que una cepa de este tipo puede usarse como un agente de biocontrol contra la contaminación por aflatoxinas, por ejemplo en cultivos de campo en Italia, lo que da como resultado sorprendentemente reducciones de la contaminación por *Aspergillus flavus* y/o por *Aspergillus parasiticus*, con ventajas mayores que las reconocidas para las cepas no toxígenas conocidas de *Aspergillus flavus*, como se demostrará en la sección posterior que contiene los  
45 ejemplos.

La presente invención se basa en la observación de que las cepas actualmente disponibles en el mercado, es decir, cepas no tóxicas de *Aspergillus flavus* nativo del territorio americano (*Aspergillus flavus* AF36 y AFLAGUARD®) o mezclas de cepas igualmente no tóxicas de *Aspergillus flavus* de origen africano (AFLASAFE™), no pueden utilizarse en Italia por motivos legislativos y también debido a la supuesta escasa capacidad competitiva, según lo indicado por Probst *et al.* (Probst, C., Bandyopadhyay, R., Price, L. E., Cotty, P. J. 2011. Identification of atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates to reduce aflatoxin contamination of maize in Kenya. Plant Dis. 95, 212-218). En particular, el inventor de la presente invención ha seleccionado una nueva cepa no toxígena de *Aspergillus flavus*, nativa del territorio italiano, que ha demostrado ser extremadamente eficaz como agente de control biológico contra la contaminación por  
50 aflatoxinas en Italia. Por tanto, se describe aquí por primera vez una cepa no toxígena italiana de *Aspergillus flavus*, cuyo uso, en el territorio italiano, permite obtener cultivos y también productos posteriores a la cosecha en los que los niveles de aflatoxinas son mínimos. De ello se deduce que existe una alta probabilidad de obtener cultivos y productos derivados que tengan niveles de aflatoxinas dentro de los límites impuestos por los reglamentos europeos sobre este tema (Reglamento Europeo 1881/2006, actualizado por el Reglamento Europeo 165/2010 para productos destinados al uso humano y la Directiva 100/2003 para productos destinados al uso en zoológicos), incluso en años en los que  
60 los cultivos están en alto riesgo.

En particular, la capacidad de la cepa de *Aspergillus flavus* descrita aquí para prevenir y/o eliminar total o parcialmente la contaminación por aflatoxinas, tales como aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>, en diversos cultivos agrícolas italianos se debe a la combinación de sus características genéticas/bioquímicas, que incluyen las siguientes:

- a) origen italiano, por lo tanto, en otras palabras, es una cepa italiana nativa;
- b) incapacidad para producir aflatoxinas y, por lo tanto, es una cepa no toxígena;
- c) incapacidad para producir ácido ciclopiazónico (CPA);
- d) grupo de compatibilidad vegetativa (GCV) IT6 o GCV, que ha demostrado la mejor difusión sobre el territorio italiano;
- e) alelo MAT1-1 en el locus para el tipo de apareamiento génico (MAT).

Como se demuestra en la sección posterior titulada "Ejemplos", se ha demostrado sorprendentemente que la cepa de *Aspergillus flavus* descrita aquí es más eficaz que cualquier otra cepa italiana nativa y como agente de biocontrol en la agricultura. De hecho, la cepa no toxígena descrita aquí es capaz de reducir el contenido de aflatoxina en una medida de 75 % a 100 % en ensayos en cultivos de campo completos contaminados por *Aspergillus flavus* y/o *Aspergillus parasiticus*. Además, con el método de inoculación con alfileres de la mazorca, la cepa de la presente invención ha demostrado ser capaz de reducir el contenido de aflatoxinas en un porcentaje superior al 80 % en mazorcas contaminadas por *Aspergillus flavus*. En particular, como se demostró en el ensayo comparativo indicado en el Ejemplo 5, cuyos resultados se resumen en la Tabla 5, el método de inoculación con alfileres de la mazorca con la cepa de la invención demostró una reducción tangible de la aflatoxina B<sub>1</sub> de aproximadamente 93,2 % en el campo, mientras que la cepa no toxígena A2321 (aparentemente eficaz en ensayos de laboratorio) no pudo en las pruebas en el campo reducir el porcentaje de aflatoxina en comparación con el control.

Además, los inventores de la presente invención también han demostrado (Ejemplo 6) cómo la cepa descrita aquí tiene la capacidad de adaptarse mejor a diferentes condiciones ambientales y meteorológicas, ya que es capaz de competir y difundir más eficazmente que la cepa A2321. Provechosamente, la cepa descrita aquí también se puede usar por tanto de manera eficaz para reducir la contaminación por aflatoxinas en campos que tengan características climáticas/ambientales más bien diversas.

La presente descripción se refiere, por lo tanto, a:

- una cepa no toxígena de *Aspergillus flavus* que tiene el número de depósito MUCL54911, presentada el 13 de mayo de 2013 en "Las colecciones coordinadas belgas de microorganismos (BCCM™) y/o derivados de la misma que mantienen las características de dicha cepa desvelada en la presente descripción;
- una composición que comprende la cepa anterior o derivados de la misma y uno o más diluyentes y/o vehículos;
- uso de la cepa MUCL54911 o de derivados de la misma o de la composición que la comprende como agente de biocontrol contra la contaminación por aflatoxinas producidas por *Aspergillus flavus* y/o *Aspergillus parasiticus*;
- un método para prevenir y/o reducir y/o eliminar la contaminación por aflatoxinas producidas por *Aspergillus flavus* y/o *Aspergillus parasiticus* toxígenos en cultivos de campo que comprende una etapa de distribución de la cepa MUCL54911 o derivados de la misma o la composición anterior a dicho cultivo;
- una matriz inoculada con la cepa MUCL54911 según la reivindicación 1 o derivados o partes de la misma como se ha definido anteriormente.

#### Figuras

La Figura 1 muestra un gráfico que ilustra la evaluación de la eficacia de campo completo de la cepa no toxígena de *Aspergillus flavus* de la invención en la reducción del contenido de aflatoxinas. Los números sobre las barras indican la reducción en % obtenida en los campos tratados con la cepa no toxígena de *Aspergillus flavus* que tiene el número de depósito MUCL54911 en comparación con el control sin tratar.

La Figura 2 muestra un gráfico que ilustra la recuperación en % de la cepa que tiene el número de depósito MUCL54911 (IT6), de la cepa A2321 (IT19) y de otros grupos de compatibilidad vegetativa en las secciones tratadas y de control de 4 campos donde se obtuvo una reducción del contenido de aflatoxina.

#### TABLAS

La [tabla 1](#) presenta los datos relativos a la capacidad de las cepas no toxígenas de *Aspergillus flavus*, en comparación con la cepa de la invención (en negrita), para reducir la producción de aflatoxina B<sub>1</sub> en grano de maíz.

Tabla 1

Cepa <sup>a</sup>	GCV <sup>b</sup>	mg/kg de AFB1 <sup>ce</sup>		Reducción (%) <sup>de</sup>	
A2321	IT19	15	H	90	A
A2103	IT15	21	GH	85	AB
A2090	IT9	22	FGH	85	ABC
A2066	IT8	23	EFGH	85	ABC
NRRL 21882	n.d.	24	EFGH	84	ABC
MUCL54911	IT6	25	EFGH	83	ABC
A2088	IT9	27	EFG	82	ABC

(continuación)

Cepa <sup>a</sup>	GCV <sup>b</sup>	mg/kg de AFB1 <sup>ce</sup>		Reducción (%) <sup>de</sup>	
A2105	IT6	27	DEFG	81	ABC
A2313	IT23	28	DEFG	81	ABCD
A2098	IT22	29	CDEFG	80	ABCD
A2096	IT6	30	CDEFG	79	BCD
A2102	n.d.	32	BCDEFG	78	BCDE
A2319	IT22	33	BCDEFG	78	BCDE
A2049	IT12	39	BCDE	73	CDEF
A2320	IT9	41	BCDE	72	CDEF
A2087	n.d.	47	BCD	68	DEF
A2322	IT34	51	BC	65	EF
A2323	IT23	54	BC	62	EF
A2100	IT18	57	B	61	F
AF13	YV13	146	A	0	G

<sup>a</sup> Las cepas no tóxicas se inocularon con AF13 a una concentración de  $1 \times 10^5$  esporas/ml. La cepa NRRL21882 es el componente activo del biopesticida AFLAGUARD®. La cepa AF13 es un alto productor de aflatoxinas.

<sup>b</sup> Grupo de compatibilidad vegetativa; n.d. = no disponible.

<sup>c</sup> La concentración de aflatoxina B<sub>1</sub> se midió en el grano de maíz inoculado conjuntamente con las cepas no tóxicas y tóxicas después de 7 días de incubación a 31 °C.

<sup>d</sup> Reducción de aflatoxina B<sub>1</sub> en % =  $[1 - (\text{aflatoxina B}_1 \text{ en el grano inoculado conjuntamente} / \text{aflatoxina B}_1 \text{ producido por AF13 solo})] \times 100$ .

<sup>e</sup> Las letras indican diferencias significativas entre los aislados ( $P < 0,05$ ). Los datos combinados ( $P < 0,05$ ) de dos repeticiones del experimento se muestran en la tabla.

5 La **tabla 2** presenta los datos relativos a la capacidad de la cepa de la invención (en negrita), en comparación con otra cepa no tóxica italiana de *Aspergillus flavus* descrito anteriormente en la bibliografía, para reducir la concentración de aflatoxina B<sub>1</sub> producida por seis cepas tóxicas italianas de *Aspergillus flavus*.

Tabla 2

Cepa <sup>a</sup>	mg/kg de AFB1 <sup>bd</sup>		mg/kg de AFB1 <sup>bd</sup>				Reducción (%) <sup>cd</sup>			
			MUCL54911		A2321		A2321			
A2039	98	A	22	A	17	A	78	A	83	A
A2062	35	BC		BC	8	B	68	B	78	AB*
A2068	41	B	16	AB	166	A	60	B	61	C
A2097	29	C	11	BC	8	B	61	B	71	BC
A2295	23	D	00	CD	7	BC	65	B	71	BC
A2300	17	E	7	D	5	C	60	B	72	BC*

<sup>a</sup> Las cepas no tóxicas MUCL54911 y A2321 (descritas en la bibliografía) se inocularon conjuntamente al mismo tiempo con las cepas tóxicas a una concentración de  $1 \times 10^5$  esporas/ml.

<sup>b</sup> La concentración (mg/kg) de aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB1) del grano de maíz se determinó después de 7 días de incubación a 31 °C.

<sup>c</sup> Reducción de la aflatoxina B<sub>1</sub> en % =  $[1 - (\text{aflatoxina B}_1 \text{ en el grano de maíz inoculado conjuntamente} / \text{aflatoxina B}_1 \text{ producida por cepas tóxicas respectivas})] \times 100$ .

<sup>d</sup> Las letras indican diferencias significativas entre los aislados (columnas);

\* indica diferencias entre las cepas no tóxicas (filas). Se muestran los datos combinados ( $P < 0,05$ ) de dos repeticiones independientes del experimento.

10 La **tabla 3** presenta los datos relativos a la influencia de la relación de no tóxica:tóxica entre cepas de *Aspergillus flavus* en comparación con la cepa de la invención (en negrita) para reducir el contenido de aflatoxina B<sub>1</sub> producido por una cepa tóxica.

Tabla 3

Cepa <sup>a</sup>	mg/kg de AFB1 <sup>cf</sup>				Reducción (%) <sup>df</sup>				Eficacia <sup>cf</sup>			
	(1:4) <sup>b</sup>		(1:1) <sup>b</sup>		(1:4) <sup>b</sup>		(1:1) <sup>b</sup>		(1:4) <sup>b</sup>		(1:1) <sup>b</sup>	
A2066	86	B	44	B*	24*	D	61	B	1,20	C	1,21	B
MUCL54911	70	CD	31	B*	38	BC*	72	AB	1,90	B	1,45	AB
A2090	76	BCD	37	B*	33	BCD*	67	B	1,66	BC	1,35	AB*
A2103	68	D	34	B*	39	AB*	70	AB	1,97	AB	1,39	AB*
A2321	56	E	20	C*	50	A*	83	A	2,52	A	1,65	A*
NRRL21882	83	BC	40	B*	26	CD*	65	B	1,30	C	1,29	B
Media	73		34	*	35	*	70		1,76		1,39	*
AF13	113	A	113	A	...	...	...	...	...	...	...	...

<sup>a</sup> La cepa NRRL21882 es el componente activo del biopesticida AFLAGUARD®. La cepa AF13 es un alto productor de aflatoxinas y representa el control positivo. El resto son cepas italianas no tóxicas.

<sup>b</sup> Las cepas no tóxicas (A) y tóxicas (T) se inocularon conjuntamente a la concentración de 1x10<sup>5</sup> esporas/ml en dos relaciones: (a) 1/5 no tóxica y 4/5 tóxica (1:4) y (b) proporciones iguales (1:1).

<sup>c</sup> La concentración (mg/kg) de aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) del grano de maíz se determinó después de 7 días de incubación a 31 °C.

<sup>d</sup> Reducción de aflatoxina B<sub>1</sub> en % (R) = [1-(aflatoxina B<sub>1</sub> en el grano de maíz inoculado conjuntamente/aflatoxina B<sub>1</sub> producida por la cepa AF13 solo)] x 100.

<sup>e</sup> La eficacia (E) se calculó con la siguiente fórmula: E = R/(A/A+T); donde R es la reducción en % de aflatoxina B<sub>1</sub> y el denominador representa el porcentaje de la cepa no tóxica en cada tratamiento.

<sup>f</sup> Las letras indican diferencias significativas entre los aislados (columnas); \* indica diferencias entre las cepas no tóxicas (filas). Se muestran los datos combinados (P<0,05) de dos repeticiones independientes del experimento.

La **tabla 4** presenta los datos relativos a la producción de ácido ciclopiazónico (CPA) en el grano de maíz y sustrato sintético (CZ) de cepas de *Aspergillus flavus* en comparación con la cepa de la invención mostrada en negrita.

5

Tabla 4

Cepa <sup>a</sup>	mg/kg de CPA <sup>b</sup>	
	Maíz <sup>c</sup>	CZ <sup>e</sup>
Control	n.r.	n.r.
A2062	1108	9873
A2066	n.r.	n.r.
A2068	1165	7089
MUCL54911	n.r.	n.r.
A2090	n.r.	n.r.
A2092	718	7840
A2103	n.r.	n.r.
A2321	n.r.	n.r.

<sup>a</sup> Cepas de *Aspergillus flavus*. Control: maíz no inoculado o CZ.

<sup>b</sup> Concentración (mg/kg) de ácido ciclopiazónico (CPA); n.r. = no revelado.

<sup>c</sup> Maíz = grano de maíz; CZ = sustrato sintético.

Tabla 5

Año	Cepa <sup>a</sup>	Aflatoxina B <sub>1</sub> (µg/kg)	Reducción (%) <sup>b</sup>
2012	A2092	1415,4	
	MUCL54911 + A2092	96,2	93,2
	A2321 + A2092	1381,9	2,4
2013	A2092	132,9	
	MUCL54911 + A2092	2,3	98,3
	A2321 + A2092	176,7	n.o.

<sup>a</sup> Cepas de *Aspergillus flavus*.

<sup>b</sup> Reducción de aflatoxina B<sub>1</sub> en % = [1-(aflatoxina B<sub>1</sub> en el grano de maíz inoculado conjuntamente/aflatoxina B<sub>1</sub> producida por la cepa A2092 solo)] x 100; n.o. no obtenido.

La **tabla 6** presenta el haplotipo de cepas italianas no tóxicas de *Aspergillus flavus* en comparación con la cepa de la invención (en **negrita** para 19 loci de microsátélites)

Cepa	Locus																		
	AF8	AF11	AF13	AF14	AF17	AF18	AF22	AF28	AF31	AF33	AF34	AF42	AF43	AF53	AF54	AF55	AF63	AF64	AF66
MUCL 54911	166 <sup>a</sup>	135	141	169	367	**	144	119	312	**	**	150	399	131	161	181	127	161	271
A2321	168	126	128	169	364	**	144	119	312	**	**	143	399	131	161	172	127	161	269

<sup>a</sup> Número de pares de bases para cada alelo; \*\* alelo no presente.

## GLOSARIO

Cepa de *Aspergillus flavus* MUCL54911. Esta expresión indica el hongo que tiene el número de depósito MUCL54911, presentado el 13 de mayo de 2013 en "*Las colecciones coordinadas belgas de microorganismos (BCCM™)*" en cualquier momento de la fase vital y también células individuales del mismo. La definición de *Aspergillus flavus* que tiene el número de depósito MUCL54911 incluye por tanto células de hongos individuales, el organismo completo y partes del organismo tales como hifas, esporas, esclerocios y similares.

Cepa inoculada en una matriz/soporte/sustrato. La expresión "cepa inoculada en una matriz/soporte/sustrato" en la presente descripción significa que partes del hongo capaces de permitir su crecimiento, por ejemplo el micelio o esporas de diversos tipos, se ponen en contacto con una matriz o sustrato con el fin de permitir el crecimiento del hongo en la matriz/sustrato/soporte en sí mismo.

Compatibilidad vegetativa (CV). La expresión "compatibilidad vegetativa" en la presente invención, de acuerdo con lo indicado en la bibliografía científica, significa la capacidad de los hongos, incluyendo *Aspergillus flavus*, para fusionar sus propias hifas con las de otros hongos pertenecientes a la misma especie, formando de este modo heterocariones (células provistas de varios núcleos) estables. Los loci génicos que regulan la compatibilidad vegetativa se conocen como loci *vic*. La fusión estable entre las hifas es posible solo entre cepas que tienen los mismos alelos en todos los loci *vic*. Dos cepas que pueden fusionar sus propias hifas se definen como cepas que pertenecen al mismo Grupo de Compatibilidad Vegetativa (GCV) (Barros *et al.* 2006. Genetic diversity within *Aspergillus flavus* strains isolated from peanut-cropped soils in Argentina. Soil Biol. Biochem. 38:145-152).

Toxígeno. El término "toxígeno" en la presente descripción significa una cepa de *Aspergillus flavus* o de *Aspergillus parasiticus* que produce aflatoxinas y que, por lo tanto, es una cepa que forma sustancias tóxicas. Por el contrario, la expresión "no toxígeno" se refiere siempre en la presente descripción a una cepa de *Aspergillus flavus* que es incapaz de producir aflatoxinas que incluyan aflatoxina B<sub>1</sub> y esa es por tanto una cepa que no es toxígena.

Aflatoxinas. El término "aflatoxinas" en la presente descripción significa metabolitos secundarios producidos por diversas especies del hongo *Aspergillus*, incluyendo la especie *Aspergillus flavus* y/o la especie *Aspergillus parasiticus*. En particular, en referencia a las aflatoxinas producidas por *Aspergillus flavus* y/o por *Aspergillus parasiticus*, estas están indicadas como aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>. En la presente descripción, a menos que se indique otra cosa, el término "aflatoxina/s" se refiere indistintamente a aflatoxina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> o mezclas de las mismas.

Derivados. El término "derivados" en la presente descripción se refiere a cepas de *Aspergillus flavus* derivado, por ejemplo, por mutación o transformación o cruzamiento, de la cepa que tiene el número de depósito MUCL54911, presentada el 13 de mayo de 2013 en "*Las colecciones coordinadas belgas de microorganismos (BCCM™)*" que mantienen las características reivindicadas y descritas aquí de la cepa de la descripción y que, por lo tanto, pueden usarse como la cepa de la descripción.

Las características mantenidas incluyen las siguientes:

- a) de origen italiano;
- b) incapacidad para producir aflatoxinas;
- c) incapacidad para producir ácido ciclopiazónico (CPA);
- d) grupo de compatibilidad vegetativa (GCV) IT6;
- e) alelo MAT1-1 en el locus para el tipo de apareamiento genético (MAT);
- f) capacidad de reducir el contenido de aflatoxina en una medida de 75 % a 100 % en ensayos en cultivos de campo completos contaminados por *Aspergillus flavus* y/o *Aspergillus parasiticus*;
- g) capacidad para reducir el contenido de aflatoxinas en un porcentaje superior al 80 % en cultivos contaminados por *Aspergillus flavus* y/o *Aspergillus parasiticus* con el método de inoculación con alfileres como se describe en la presente solicitud.

Italiano nativo. En la presente descripción, la expresión "italiano nativo" debe entenderse, de acuerdo con lo que se conoce habitualmente, como indicativa de una cepa de *Aspergillus flavus* originaria de o que se ha desarrollado en el territorio italiano en el que se ha aislado.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una nueva cepa no toxígena de *Aspergillus flavus*, como se presentó el 13 de mayo de 2013 en "*Las colecciones coordinadas belgas de microorganismos (BCCM™)*" en nombre de la Università Cattolica del Sacro Cuore y a la que se asignó el número de depósito MUCL54911 de acuerdo con las disposiciones del Tratado de Budapest del 28 de abril de 1977, ratificadas por la ley n. 610 del 14 de octubre de 1985.

En particular, esta cepa tiene diversas características, incluyendo las especificadas a continuación. Es una cepa italiana nativa, es decir, una cepa que, en la medida en que esté aislada de las cosechas presentes en particular en el norte de Italia, se origina o se ha desarrollado en el área geográfica italiana.

La cepa MUCL54911 se caracteriza por que es una cepa no toxígena o una cepa de *Aspergillus flavus* carente de la capacidad de producir aflatoxinas. En particular, como se ha indicado en la técnica anterior (Sweeney, M. J., Dobson, A. D. W. 1999. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. FEMS Microbiol. Lett. 175, 149-163), se sintetizan

aflatoxinas de acuerdo con una ruta sintética que implica al menos 23 conversiones enzimáticas, que implican la misma cantidad de genes, en la cepa MUCL54911 y se interrumpe en cuanto se ha suprimido todo el grupo de genes implicados en esta síntesis. Debido a esta característica genética, la cepa MUCL54911 es, por lo tanto, una cepa que no produce ni aflatoxina B1 ni aflatoxina B2 y, por lo tanto, es una cepa no tóxigena.

La cepa MUCL54911 también se caracteriza por que carece de la capacidad para producir ácido ciclopiazónico (CPA), ya que una supresión genética implica los genes implicados en la producción de CPA.

Además, la cepa MUCL54911 presenta, como una característica genotípica, la presencia del alelo MAT1-1 en el locus para el tipo de apareamiento genético (MAT).

Finalmente, la cepa de la invención también se caracteriza por que puede reducir el contenido de aflatoxinas, tales como aflatoxina B<sub>1</sub>, en un porcentaje de 75 % a 100 % en pruebas de campo completo en cultivos contaminados por *Aspergillus flavus* y/o *Aspergillus parasiticus*. En particular, El contenido de aflatoxinas en campo completo puede reducirse en 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

Además, la cepa de la presente invención ha demostrado ser capaz de reducir el contenido de aflatoxinas en un porcentaje superior al 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % y 100 % en cultivos contaminados por *Aspergillus flavus* y/o *Aspergillus parasiticus* utilizando el método de inoculación con afliteres (descrito en la parte titulada "Ejemplos") de la cepa anteriormente mencionada en la planta de interés.

Dicho efecto, que es sorprendentemente pronunciado, es una característica única de la cepa descrita aquí.

Las características descritas anteriormente para la cepa de la invención también pueden estar presentes en derivados de la cepa.

Los experimentos realizados por el inventor en la cepa MUCL54911 seleccionada también han demostrado que esta cepa pertenece al grupo de compatibilidad vegetativa (GCV) IT6 o al GCV que tiene la mayor difusión de cepas de *Aspergillus flavus* en territorio italiano.

La cepa MUCL54911 descrita aquí, y también los derivados de la misma, también se puede formular como una composición junto con uno o más diluyentes y/o vehículos. Cualquier diluyente y/o vehículo descrito en la técnica anterior y considerado adecuado por un experto en la materia para su inclusión en la composición que comprende la cepa MUCL54911 debe entenderse como incluida dentro del alcance de la presente invención. Simplemente a modo de ejemplo no limitante, los diluyentes y los vehículos pueden seleccionarse del grupo que comprende: agua, medios adecuados para el cultivo de hongos, conservantes, aditivos, aminoácidos, sales, etc., materiales de origen vegetal y/o productos derivados de los mismos, cualquier soporte sólido y/o líquido capaz de portar el hongo. En particular, tanto diluyentes como vehículos serán preferentemente estériles con el fin de evitar la introducción de microorganismos indeseables en la composición.

Cuando se indica que la composición de la invención "puede comprender" la cepa MUCL54911, se entiende también que dicha composición "consiste en" esta cepa MUCL54911 y, opcionalmente, un vehículo/diluyente adecuado.

En una realización de la presente composición, la cepa se inocula en una matriz o soporte que debe poder permitir que la cepa mantenga todas las características asociadas con la misma y descritas aquí. La matriz en la que se va a inocular la cepa MUCL54911 puede ser cualquier matriz de origen natural, sintético o también seminatural/semisintético considerado adecuado por un experto en la materia de acuerdo con lo indicado en la presente descripción. La matriz/soporte es preferentemente estéril y procedente de materiales de origen vegetal, tales como semillas o productos obtenidos del procesamiento de los materiales de origen vegetal, tales como almidones vegetales.

A modo de ejemplo, la matriz puede ser una matriz natural seleccionada principalmente de materiales vegetales obtenidos de plantas tales como sorgo, maíz, soja y trigo.

En una realización, dicho material vegetal comprende semillas, tales como semillas de trigo y/o semillas de sorgo.

Como se demuestra en la sección posterior titulada "Ejemplos", la cepa MUCL54911 descrita aquí ha demostrado ser particularmente eficaz si se usa como agente de biocontrol contra la contaminación por aflatoxinas producidas por cepas tóxicas de *Aspergillus flavus* y/o *Aspergillus parasiticus*.

El uso de la cepa MUCL54911 como un agente de biocontrol, por ejemplo, en el campo de la agricultura, y específicamente en el caso de contaminación por aflatoxinas, que dañan cultivos de maíz, algodón y nueces, incluyendo pistachos, cacahuets, nueces, avellanas, almendras y castañas, es particularmente ventajoso. De hecho, como se ha observado anteriormente, la cepa descrita aquí es capaz de reducir la contaminación por aflatoxinas

producidas por las cepas toxígenas de *Aspergillus flavus* y/o *Aspergillus parasiticus* en un porcentaje entre 75 y 100 % en ensayos de campo completo y/o es capaz de reducir el contenido de aflatoxinas en un porcentaje mayor de 80 % en cultivos contaminados por cepas toxígenas de *Aspergillus flavus* y/o *Aspergillus parasiticus* con el método de inoculación con aflileres.

La presente invención también se refiere a un método para prevenir y/o reducir y/o eliminar la contaminación por aflatoxinas producidas por cepas toxígenas de *Aspergillus flavus* y/o *Aspergillus parasiticus* en cultivos de campo completo o en ambientes controlados, tal como túneles o invernaderos y cultivos sin suelo, que comprende al menos una etapa de distribución de la cepa MUCL54911 o de la composición como se ha descrito anteriormente en el cultivo.

El método descrito aquí se usa preferentemente para prevenir y/o eliminar parcial o completamente la contaminación por aflatoxina B<sub>1</sub>.

En particular, la etapa de distribución se puede realizar de acuerdo con cualquier técnica conocida por un experto en la materia y adecuada para permitir la difusión del agente de biocontrol, o de la composición que lo comprende, en el campo que se va a tratar. A modo de ejemplo no limitante, la etapa de distribución se puede realizar utilizando medios habitualmente disponibles para fertilización de los cultivos, tales como esparcidores de fertilizantes. La distribución también se puede realizar por medio de una aplicación desde el aire y/o directamente al suelo o, en cualquier caso, de acuerdo con técnicas consideradas por un experto en la materia eficaces para garantizar el uso de la cepa MUCL54911 de acuerdo con lo descrito aquí. Los cultivos agrícolas que pueden someterse al método descrito anteriormente se seleccionan, por ejemplo, del grupo que comprende cultivos de maíz, cultivos de algodón y cultivos de nueces, tales como pistachos, cacahuetes, nueces, avellanas, almendras y castañas.

En una realización del presente método, la cepa MUCL54911 o esporas de la misma se inoculan antes de la etapa de distribución en una matriz, preferentemente una matriz natural, del tipo descrito anteriormente.

La invención se describirá a continuación en algunas de sus formas ejemplares con el objetivo de ilustrar lo descrito en la presente solicitud de patente. No se considera de ninguna manera que dichos ejemplos limiten el alcance de la protección conferida.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### *Eficacia de cepas no toxígenas para reducir el contenido de aflatoxina B<sub>1</sub> En grano de maíz.*

Dieciocho (18) cepas italianas no toxígenas de *Aspergillus flavus* se compararon con la cepa de *Aspergillus flavus* NRRL21882 para evaluar la capacidad de reducir el contenido de aflatoxina B<sub>1</sub> producido por la cepa toxígena de *Aspergillus flavus* AF13 en grano de maíz *in vitro*. La tensión de *Aspergillus flavus* NRRL21882 es el componente activo del producto comercial AFLAGUARD® (patente de los Estados Unidos 6306386 del 23 de octubre de 2001), mientras que la cepa AF13 se usa habitualmente en ensayos de laboratorio y en ensayos de campo como un productor alto de aflatoxinas (Cotty, P. J. 1989. Virulencia y características de cultivo de dos cepas de *Aspergillus flavus* patógenas en algodón. *Phytopathology* 79, 808-814). Las esporas de cada cepa se recogieron utilizando tapones de algodón de cultivos de 6 días (31 °C en oscuridad), se suspendieron en agua destilada estéril y la concentración se determinó como se ha descrito en Probst *et al.* (Probst, C., Bandyopadhyay, R., Price, L. E., Cotty, P. J. 2011. Identification of atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates to reduce aflatoxin contamination of maize in Kenya. *Plant Dis.* 95, 212-218). La concentración de las esporas se ajustó a 10<sup>5</sup> esporas/ml. El grano de maíz intacto se esterilizó en agua caliente durante 45 s a 80 °C (Mehl, H. L., Cotty, P. J. 2010. Variation in competitive ability among isolates of *Aspergillus flavus* from different vegetative compatibility groups during maize infection. *Phytopathology* 100, 150-159) y se distribuyó entre matraces estériles (10 g de maíz por matriz de 150 ml). Los matraces se cerraron utilizando tapones permeables a gases (Bugstoppers; Whatman, Piscataway, NJ) para prevenir la pérdida de humedad y para permitir el intercambio gaseoso. Después de la esterilización, la cantidad de humedad del maíz se cuantificó utilizando un analizador de humedad halógeno HB43 (Mettler Toledo, Columbus, OH) y el volumen de agua en el que la suspensión de esporas de las cepas no toxígenas y toxígenas se aplicó al grano se ajustó para llevar el contenido de agua del grano al 25 %. Las esporas de las cepas no toxígenas y toxígenas se añadieron a los matraces al mismo tiempo y se agitaron suavemente para permitir la distribución sobre el grano. Se añadió la misma cantidad de agua a los controles, pero que contenía solo las esporas de las cepas toxígenas. El maíz inoculado se incubó a 31 °C durante 7 días en oscuridad. El diseño experimental del experimento fue completamente aleatorio con cuatro repeticiones. El experimento se repitió dos veces. Al final del periodo de incubación, el contenido de aflatoxina B<sub>1</sub> se cuantificó como se describe en Probst *et al.* (Probst, C., Bandyopadhyay, R., Price, L. E., Cotty, P. J. 2011. Identification of atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates to reduce aflatoxin contamination of maize in Kenya. *Plant Dis.* 95, 212-218).

Todas las cepas no toxígenas pudieron reducir el contenido de toxina en el grano en comparación con el producido por la cepa toxígena. En particular, la contaminación por medio de aflatoxina B<sub>1</sub> en el grano inoculado solo con la cepa toxígena AF13 fue de 146 ppm, mientras que en el grano inoculado conjuntamente con la cepa AF13 y la cepa MUCL54911, el contenido de aflatoxina se redujo en 83 % (Tabla 1).

## Ejemplo 2

5 *Evaluación de la eficacia de la cepa no tóxigena MUCL54911 en la reducción del contenido de aflatoxina B<sub>1</sub> producido por 6 cepas tóxicas italianas*

10 La cepa que forma la base de la presente descripción y la cepa no tóxigena A2321 utilizada como control positivo se ensayaron para determinar la capacidad para reducir el contenido de aflatoxina B<sub>1</sub> producido por 6 diferentes cepas tóxicas italianas en grano de maíz vivo *in vitro*. El experimento se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 1 utilizando 6 cepas tóxicas italianas en lugar de la cepa tóxigena AF13. La cepa que forma la base de la presente descripción y la cepa A2321 fueron capaces de reducir la contaminación por aflatoxina B<sub>1</sub> en el grano de maíz vivo inoculado con 6 cepas tóxicas diferentes (Tabla 2). La contaminación del grano inoculado solo con las cepas tóxicas varió entre 17 y 98 mg/kg. La medida en que la contaminación en el contenido de aflatoxina B<sub>1</sub> se redujo por la cepa MUCL54911 estaba entre 60 % y 78 %, con reducciones similares (de 60 % a 68 %) en el grano inoculado con 5 de las cepas que producen aflatoxinas y una reducción significativamente mayor (78 %) en el grano inoculado con 1 de las cepas. La capacidad de la cepa MUCL54911 para reducir en la misma medida el contenido de aflatoxina B<sub>1</sub> producido por diversas cepas tóxicas italianas la hace sorprendentemente adecuada para su uso como un agente de biocontrol para reducir la contaminación por aflatoxinas en cultivos de maíz.

## Ejemplo 3

*Influencia de la relación entre cepa no tóxigena y tóxigena en la reducción de la contaminación por aflatoxina B<sub>1</sub>.*

25 La cepa MUCL54911 se ensayó para determinar la capacidad de reducir el contenido de aflatoxina B<sub>1</sub> producido por la cepa tóxigena AF13 en dos relaciones diferentes de no tóxigena:tóxigena en grano de maíz vivo *in vitro*. Además, La cepa NRRL21882 se usó como control positivo, siendo esta una cepa estadounidense conocida por su eficacia para reducir la contaminación por aflatoxinas. También en este caso, el análisis se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 1, pero utilizando dos relaciones diferentes de no tóxigena:tóxigena (1:1 y 1:4). Además de la reducción en % del contenido de aflatoxina B<sub>1</sub>, la eficacia (E) de cada cepa también se calculó utilizando la siguiente fórmula:  $E = R/(A/A+T)$ , donde R es la reducción en % de aflatoxina B<sub>1</sub> y el denominador representa el porcentaje de la cepa no tóxigena en cada tratamiento.

35 En particular, la cepa MUCL54911 demostró una mayor reducción (72 %) (Tabla 3) en el contenido de aflatoxina B<sub>1</sub> en el grano de maíz inoculado con cantidades iguales de las cepas no tóxicas y tóxicas en comparación con el grano inoculado con una dosis de la cepa no tóxigena igual a un cuarto de la cepa tóxigena. Además, la cepa MUCL54911 demostró una mayor eficacia en comparación con la cepa NRRL21882 cuando se ensayó en la relación de no tóxigena:tóxigena 1:4. Este resultado muestra sorprendentemente que la cepa MUCL54911 aumenta su eficacia para reducir el contenido de aflatoxina B<sub>1</sub> a medida que su concentración disminuye en comparación con la cepa tóxigena. Por tanto, incluso si se encontró en concentraciones menores que las cepas tóxicas en el campo, sería capaz de producir un resultado óptimo con respecto a reducción de la concentración de aflatoxinas.

## Ejemplo 4

45 *Producción de ácido ciclopiazónico*

La cepa no tóxigena de *Aspergillus flavus* MUCL54911 que forma la base de la presente descripción se ensayó en grano de maíz intacto y en un sustrato de agar Czapek (CZ) sintético para la producción de ácido ciclopiazónico (CPA).

50 El CPA del grano se extrajo siguiendo la metodología descrita por Urano *et al.* (Urano, T., Trucksess, M. W., Beaver, R. W., Wilson, D. M., Dorner, J. W., Dowell, F. E., 1992. Co-occurrence of cyclopiazonic acid and aflatoxins in corn and peanuts. J. AOAC Int. 75, 838-841) y se cuantificó según lo indicado por Zambonin *et al.* (2001; Zambonin, C. G., Monaci, L., Aresta, A. 2001. Determination of cyclopiazonic acid in cheese samples using solid phase microextraction and high performance liquid chromatography. Food Chem. 75, 249-254). La metodología indicada por Giorni *et al.* (2007; Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., Bertuzzi, T., Battilani, P. 2007. Studies on *Aspergillus section Flavi* isolated from maize in northern Italy. Int. J. Food Microbiol. 113, 330-338) se siguió en cambio para la extracción y la cuantificación de CPA del medio de cultivo CZ. El experimento se realizó en ambos casos con 4 repeticiones.

60 En particular, la cepa MUCL54911 no produjo cantidades notables de ácido ciclopiazónico (CPA) (Tabla 4) ya sea en sustrato natural (grano de maíz) o en sustrato sintético (CZ), en contraste con lo observado para las cepas utilizadas como control positivo A2062, A2068 y A2092.

## Ejemplo 5

65 *Ensayo en mazorcas de maíz*

La cepa no tóxigena italiana MUCL54911 que forma la base de la presente descripción se ensayó en mazorcas de

maíz en campo completo para determinar la capacidad de reducir el contenido de aflatoxina B<sub>1</sub> producido por una cepa toxígena utilizando 2 métodos de inoculación (gota y orificio).

La cepa se evaluó para determinar la capacidad de reducir el contenido de aflatoxina B<sub>1</sub> producido por la cepa toxígena A2092 (GCV IT3) en mazorcas de maíz. Se realizaron dos tipos de inoculación en las mazorcas de maíz. En el primero (orificio), se siguió la metodología descrita por Atehnkeng *et al.* (Atehnkeng, J., Ojiambo, P. S., Donner, M., Ikotun, T., Sikora, R. A., Cotty, P. J., Bandyopadhyay, R. 2008. Distribution and toxigenicity of *Aspergillus* species isolated from maize kernels from three agro-ecological zones in Nigeria. *Int. J. Food Microbiol.* 122, 74-84). Después de la floración femenina, se realizó un orificio (de 3 mm de diámetro) en cada mazorca de maíz a través de las brácteas hasta una profundidad de aproximadamente 5 mm antes de realizar la inoculación con 10 µl de una suspensión de 10<sup>6</sup> esporas/ml de una sola cepa toxígena (A2092) en el control o con la cepa toxígena y no toxígena, distribuidas al mismo tiempo, en el experimento de inoculación conjunta. En el segundo tipo de inoculación (gota), las cepas de hongos se inocularon en la punta de las mazorcas, en el punto de salida de la seda, con 1 ml de una suspensión de 10<sup>6</sup> esporas/ml de solo una cepa toxígena (A2092) en el control o con la cepa toxígena y no toxígena al mismo tiempo en el experimento de inoculación conjunta. El experimento, llevado a cabo en 2012 y 2013, se realizó en 5 mazorcas de maíz para cada tratamiento. Las aflatoxinas se cuantificaron siguiendo la metodología indicada por Stroka *et al.* (2003; Stroka, J., von Holst, C., Anklam, E. 2003. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using postcolumn bromination for determination of aflatoxin B<sub>1</sub> in cattle feed: collaborative study. *J. AOAC Int.* 86, 1179-1186). Los aislados se recuperaron del grano cosechado por medio de sucesivas atribuciones a los GCV.

Las cepas no toxígenas MUCL54911 (IT6) y A2321 (IT19) no pudieron reducir el contenido de aflatoxina B<sub>1</sub> producido por la cepa toxígena (A2092) cuando se inoculó utilizando el método en el que se deposita una gota en el punto de salida de la seda de las brácteas. Por lo tanto, este tipo de inoculación no se repitió en el segundo año (2013) de experimentación.

En 2012, las cepas A2321 y MUCL54911, cuando se inocularon conjuntamente con la cepa toxígena A2092 por medio del método de orificio, fueron capaces de reducir el contenido de aflatoxina B<sub>1</sub>, respectivamente, en 2,4 % y en 93,2 % (Tabla 5). En 2013, la cepa A2321 no pudo reducir el contenido de aflatoxina B<sub>1</sub> producido por la cepa toxígena A2092 y, de hecho, la cantidad de aflatoxina fue considerablemente mayor en la inoculación conjunta en comparación con la única cepa toxígena (Tabla 5). Por el contrario, la cepa MUCL54911 que forma la base de la presente descripción redujo el contenido de aflatoxina B<sub>1</sub> en 98,3 % cuando se inoculó conjuntamente con la cepa toxígena A2092.

El experimento, realizado durante dos años con resultados similares, demuestra que la cepa A2321, aunque es capaz de reducir el contenido de aflatoxina más eficazmente en experimentos realizados en un laboratorio, cuando se ensaya en campo completo no puede limitar la producción de aflatoxinas de una cepa toxígena.

Por el contrario, la cepa MUCL54911 que forma la base de la presente descripción ha demostrado poder reducir significativamente el contenido de aflatoxina en los dos años considerados.

#### Ejemplo 6

##### *Ensayos en campo completo*

La cepa no toxígena MUCL54911 que forma la base de la presente descripción y que pertenece al GCV IT6 y la cepa A2321 que pertenece al GCV IT19 se ensayaron en 8 campos de maíz, que medían aproximadamente 2 hectáreas cada uno, para evaluar la eficacia en la reducción de la contaminación por aflatoxina B<sub>1</sub> en condiciones de inoculación naturales. Los campos estaban localizados en la provincia de Verona (2 campos; VR1, VR2), Rovigo (3 campos; RO1, RO2, RO3), Mantova (2 campos, MN1, MN2) y Parma (PR). El experimento se organizó con 3 repeticiones del tratamiento y del control para cada campo. Tras cosechar, se tomaron muestras de 10 mazorcas de maíz de cada repetición y se descascaron, y el grano se secó antes de molerlo. La harina obtenida se utilizó para estimar la recuperación de las 2 cepas aplicadas y para realizar el análisis de aflatoxina B<sub>1</sub>. En cada repetición, la aflatoxina se cuantificó siguiendo la metodología indicada por Stroka *et al.* (2011; Stroka, J., von Holst, C., Anklam, E., 2003. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxin B<sub>1</sub> in cattle feed: collaborative study. *J. AOAC Int.* 86, 1179-1186). La estimación de la recuperación de las 2 cepas aplicadas se evaluó en 30 aislados de *Aspergillus flavus* para cada grupo (tratado y de control) por medio de análisis de la compatibilidad vegetativa que utiliza mutantes de *nit*. Los mutantes de *nit* y el análisis de la compatibilidad vegetativa se realizaron siguiendo el procedimiento descrito por Mauro *et al.* (2013, Mauro, A., Battilani, P., Callicott, K. A., Giorni, P., Pietri, A., Cotty, P. J. 2013. Structure of an *Aspergillus flavus* population from maize kernels in northern Italy. *Int. J. Food Microbiol.* 162, 1-7).

En particular, se observó que en 4 de los campos analizados (MN1, MN2, RO1, RO2) la contaminación por aflatoxina B<sub>1</sub> fue menor que el límite de detección del método de análisis utilizado y también menor que los límites impuestos legalmente (Figura 1). En los campos restantes (RO3, PR, VR1 y VR2), donde la contaminación estuvo entre 9.97 µg/kg y 156.42 µg/kg, la reducción de la contaminación por aflatoxina B<sub>1</sub> estuvo en general entre 83,3 % y 99,6 % (Figura 1).

El análisis de la compatibilidad vegetativa para estimar la recuperación de las 2 cepas aplicadas demostró en promedio que, en los 8 campos analizados, el porcentaje de recuperación de la cepa MUCL54911 (IT6) en el grupo tratado fue de 61,9 % y el de la cepa A2321 fue de 30,0 %. En el grupo de control, donde no se aplicaron las 2 cepas, el porcentaje medio de recuperación en los 8 campos de la cepa MUCL54911 (IT6) fue de 53,5 % y el de la cepa A2321 fue de 25,2 %.

En particular en los 4 campos (RO3, PR, VR1 y VR2) donde se obtuvo una reducción del contenido de aflatoxina B<sub>1</sub>, la cepa que tenía el número de depósito MUCL54911 siempre se recuperó en un porcentaje mayor en comparación con la cepa A2321 (Figura 2).

Teniendo en cuenta que la cepa MUCL54911 se recuperó en promedio en cantidades mayores que la cepa A2321, tanto en el grupo tratado como en el grupo de control, se puede concluir que la cepa que forma la base de la presente invención es capaz de adaptarse a las diferentes condiciones agroambientales y competir y difundir mejor en el ambiente que la cepa A2321 y es por tanto más adecuada para su uso en diferentes ambientes y en diferentes condiciones meteorológicas.

#### Ejemplo 7

##### *Microsatélites*

El genoma de la cepa MUCL54911 (IT6) que forma la base de la presente patente y la cepa A2321 (IT19) se amplificó con 19 pares de cebadores para identificar la presencia de microsatélites de acuerdo con la metodología descrita por Grubisha y Cotty (2009; Grubisha, L. C., Cotty, P. J. 2009. Twenty-four microsatellite markers for the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. Mol. Ecol. Resour. 9, 264-267).

La amplificación del genoma de la cepa MUCL54911 que forma la base de la presente descripción demostró una característica de perfil de alelos como se indica en la Tabla 5. En particular, no se identificaron alelos para tres loci (AF18, AF33, AF34), mientras que el tamaño en pares de bases de cada alelo para los loci AF8, AF11, AF13, AF17, AF42, AF55 y AF66, que son polimorfos con la cepa A2321, fue, respectivamente, 141, 367, 150, 181 y 271.

#### Ejemplo 8

##### *Perfil genético de los genes MAT*

El genoma de la cepa MUCL54911 (IT6) que forma la base de la presente patente fue amplificado por genes MAT como se indica en Ramirez-Prado *et al.* (Ramirez-Prado, J. H., Moore, G. G., Horn, B. W., Carbone, I. 2008. Characterization and population analysis of the mating-type genes in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Fungal Genet. Biol. 45, 1292-1299). En particular, los análisis moleculares de los genes MAT mostraron que la cepa MUCL54911 (IT6) que forma la base de la presente patente tiene el alelo MAT1-1.

**REIVINDICACIONES**

1. Una cepa de *Aspergillus flavus* atoxígena que tiene el número de depósito MUCL54911.
- 5 2. Una composición que comprende la cepa de *Aspergillus flavus* atoxígena según la reivindicación 1 y uno o más diluyentes y/o vehículos.
3. La composición según la reivindicación 3, en donde dicha cepa se inocula en una matriz.
- 10 4. La composición según la reivindicación 3, en donde dicha matriz es una matriz natural y, opcionalmente, en donde dicha matriz natural comprende material vegetal obtenido de planta seleccionada del grupo de sorgo, maíz, soja y trigo, comprendiendo dicho material vegetal opcionalmente semillas de trigo y/o semillas de sorgo.
- 15 5. Uso de la cepa de *Aspergillus flavus* atoxígena según la reivindicación 1 o la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 como agentes de biocontrol contra la aflatoxina producida por contaminación de cepas de *Aspergillus flavus* y/o cepas de *Aspergillus parasiticus* toxígenas y en donde dichas aflatoxinas comprenden opcionalmente aflatoxinas B1, B2, G1, G2 o mezclas de las mismas.
- 20 6. Uso según la reivindicación 5, en donde dicho biocontrol es en agricultura.
7. Uso según la reivindicación 6, en donde dicho biocontrol agrícola comprende biocontrol en cultivos de maíz, cacahuete, pistacho, nuez, avellana, almendra, castaña, algodón.
- 25 8. Un método para prevenir y/o reducir y/o eliminar las aflatoxinas producidas por cepas de *Aspergillus flavus* y/o cepas de *Aspergillus parasiticus* toxígenas en cultivos de campo completo y/o en ambientes controlados y/o en cultivos sin suelo que comprenden al menos una etapa de distribuir en su cultivo la cepa según la reivindicación 1 o la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4.
- 30 9. El método según la reivindicación 8, en donde dichas aflatoxinas comprenden aflatoxinas B1, B2, G1, G2 o mezclas de las mismas.
10. El método según la reivindicación 8 o 9, en donde dicho cultivo se selecciona del grupo que comprende cultivos de maíz, cacahuete, pistacho, nuez, avellana, almendra, castaña, algodón.
- 35 11. Una matriz inoculada con la cepa *Aspergillus flavus* atoxígena según la reivindicación 1.
12. La matriz según la reivindicación 11, en donde dicha matriz es una matriz natural.
- 40 13. La matriz según la reivindicación 12, en donde dicha matriz natural comprende material vegetal obtenido de planta seleccionada del grupo de sorgo, maíz, soja y trigo.
14. La matriz según la reivindicación 13, en donde dicho material vegetal comprende semillas de trigo y/o semillas de sorgo.

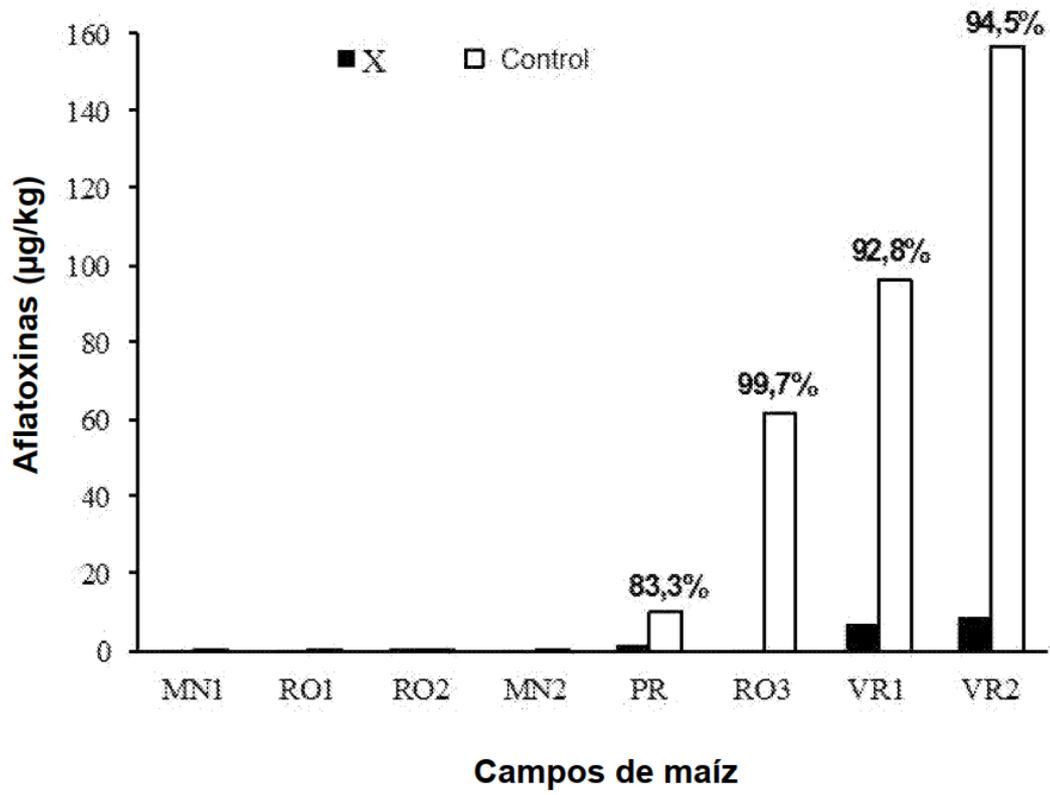


Figura 1

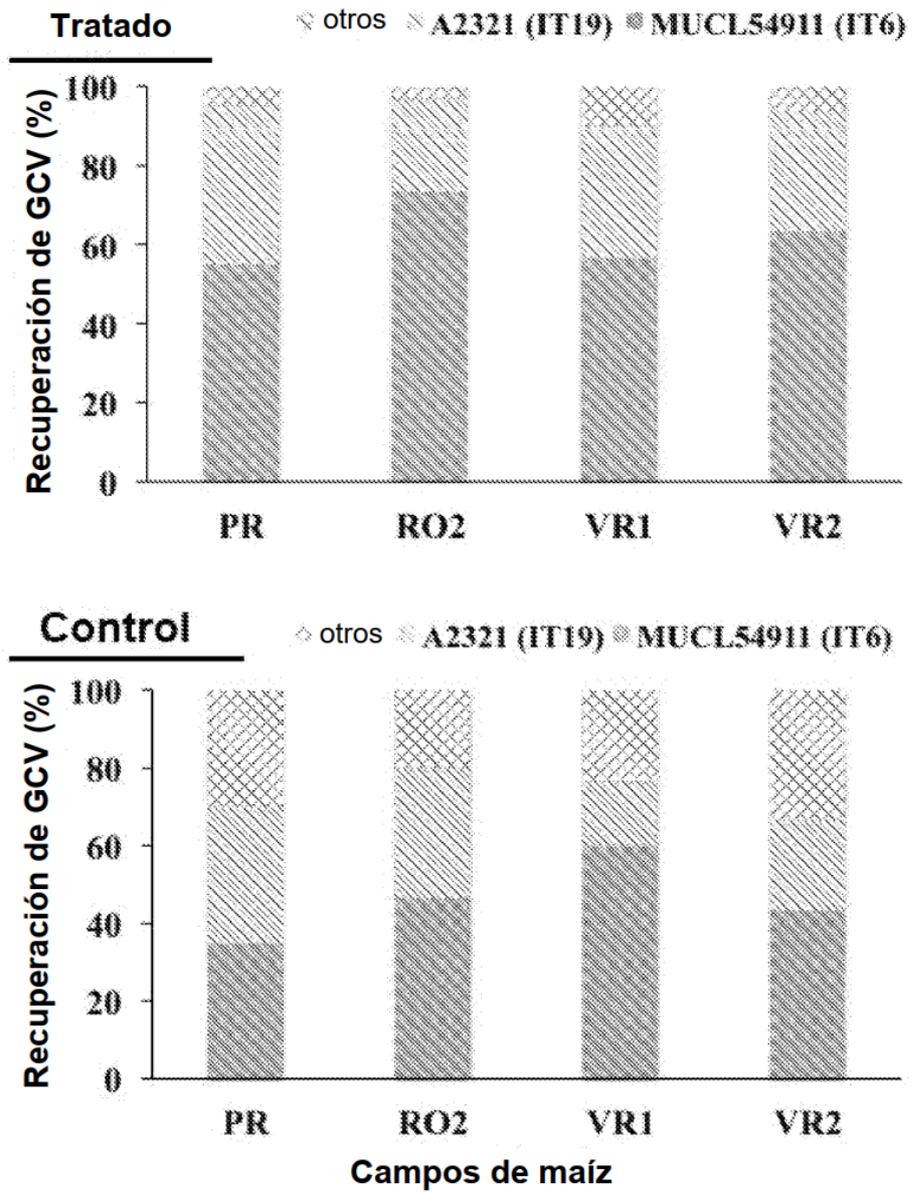


Figura 2