



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS
LABORATORIO DE MICOLOGÍA**



CONTROL BIOLÓGICO DE *Fusarium nygamai* EN SORGO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Welker Leonardo Amador Vargas

Trabajo de tesis para obtener el título de Magister en Biotecnología

Tutor: **Dra. Lina Bettucci**

Co-Tutor: **Dra. Dinorah Pan**

Montevideo, 2012

CONTROL BIOLÓGICO DE *Fusarium nygamai* EN SORGO

Tesis de maestría en Biotecnología
Facultad de Ciencias-UdelaR

Welker Leonardo Amador Vargas

Tutor: Dra. Lina Bettucci
Co-Tutor: Dra. Dinorah Pan
Laboratorio de Micología
Facultad de Ciencias - Facultad de Ingeniería

Tribunal:

Mónica Marin; Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular,
Facultad de Ciencias-UdelaR.

Sandra Lupo; Laboratorio de Micología, Facultad de Ciencias-
Facultad de Ingeniería-UdelaR.

Sabina Vidal; Laboratorio de Biología Molecular Vegetal,
Facultad de Ciencias-UdelaR.

La realización de esta maestría ha sido posible gracias a la obtención de una beca por la Fundación Gran Mariscal de Ayacucho (FUNDAYACUCHO) de la República Bolivariana de Venezuela.

Un especial agradecimiento a la Dra. Lina Bettucci que más que un tutor académico fue mi guía y apoyo en mis situaciones difíciles. Con amabilidad, comprensión digno de ejemplo. Por aceptarme e incorporarme en su laboratorio, por su confianza, su tiempo, su ayuda y estímulo brindado durante el desarrollo de esta investigación.

A la Dra. Dinorah Pan por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo y otorgarme un importante proyecto. Por su paciencia, tiempo, consejos, confianza, regaños y dedicación en mis ensayos experimentales.

A todos mis compañeros de laboratorio que me aceptaron como uno más del grupo, GRACIAS por su apoyo incondicional, que hicieron de mi estadía una etapa más llevadera: Susana, Raquel, Sandra, Anita, Belén, Silvina, La Coca, Natalia, Agustina, Mariela, Rafael, Cesar, Umberto, Carlos, Eduardo y Sebastian.

A la Dra. Mónica Marin quien nos recibió, nos orientó y nos apoyó en las primeras instancias de nuestra llegada a Uruguay.

Al tribunal por haberme dedicado parte de su tiempo para la evaluación y corrección de la tesis.

A la Facultad de Ciencias, por el financiamiento brindado para la realización de esta tesis.

A cada uno de los profesores de las distintas Facultades de la UdelaR por su disponibilidad, atención y amabilidad.

A mis padres: Mario y Gisela[†].

Mis hermanas: Kelly, Kiara, Maiyivis, Malyury, Guadalupe y Yuring.

Mi novia y prometida Estefany Parra y familia.

Por ser las personas que le debo lo que soy, las personas que me han tenido paciencia, amor y comprensión en el transcurso de este tiempo.

A la señora Aracelis Dodera y familia, quien me ayudo, regaño, aguanto, apoyo y me brindo estadía a pesar de no contar con recursos económicos.

A mis amigos Adriana Fernández y familia, Valentina y Florencia Ocampo y familia, Paola y familia, Pablo Prieto y familia, Anne Marie, Victoria Collazo y Camila Texidor por ofrecerme su amistad, su confianza, tiempo, compañía, apoyo y ayuda.

Y un especial agradecimiento a mis hermanos de Colores del 9º Cursillo de Hombres 2011 de la Arquidiócesis de Montevideo por su confianza, alimentación, apoyo compañía y ayuda en los momentos más difíciles en mi estadía.

RESUMEN

El sorgo, entre otros cultivos, es de gran importancia para la alimentación del ganado en Uruguay. Las especies fitopatógenas del género *Fusarium*, producen grandes pérdidas en los cultivos provocando daños a nivel de raíz, tallo y granos. La resistencia de algunos de estos hongos a los fungicidas ha estimulado la búsqueda de nuevas alternativas para su control. La aplicación de microorganismos a cultivos de importancia económica, constituye una alternativa ecológica que permite la conservación del medio ambiente. El objetivo del presente trabajo consistió en seleccionar y evaluar cepas de bacterias antagónicas, bajo condiciones de laboratorio, para el control de *Fusarium nygamai* en sorgo. Para tal propósito se partió del aislamiento, caracterización e identificación de *F. nygamai*, obteniéndose cepas a partir de raíz, tallo y granos de sorgo infectado. De estas cepas se seleccionaron 2 provenientes del tallo (FnT_1 y FnT_2), 1 de raíz (FnR) y 1 de granos (FnG). De 19 cepas nativas bacterianas la cepa (B10) presentó el mayor efecto inhibitorio contra las 4 cepas de *F. nygamai*, que manifestó en el mayor tamaño de los halos de inhibición en cultivos duales. Se determinó la reducción de la velocidad de crecimiento de *F. nygamai*, al utilizar los cultivos bacterianos autoclavados de las 19 cepas. Las cepas B10 y B18 produjeron una inhibición del crecimiento mayor al 60%. Estas cepas se utilizaron para evaluar la reducción en la producción por *F. nygamai* de fumonisinas en los granos de sorgo. Estas cepas bacterianas, tanto vivas como autoclavadas, ejercieron una reducción significativa sobre la producción de fumonisinas por las 4 cepas de *F. nygamai* entre 74% y 87%. Además, se evaluó el efecto inhibitorio de estas cepas sobre la incidencia de infección, la emergencia y el desarrollo de plantines de sorgo a los 7, 14 y 21 días de incubación. El uso del adherente carboxi-metil-celulosa con que fueron peletizadas las semillas de sorgo interfirió con el efecto inhibitorio de las bacterias sobre *F. nygamai*. La aplicación de los cultivos bacterianos y de los autoclavados directamente sobre las semillas de sorgo produjo una reducción, a partir de los 14 días, del 83% y 90%, respectivamente. Estos resultados indican que las cepas bacterianas estudiadas pueden resultar agentes de biocontrol de *F. nygamai* en sorgo.

INDICE

1 INTRODUCCIÓN	1
2- HIPÓTESIS	11
3- OBJETIVOS	11
3.1- Objetivo general	11
3.2- Objetivos específicos	11
4- MATERIALES Y MÉTODOS	12
4.1- Aislamiento e identificación de <i>F. nygamai</i>	12
4.1.1- Cultivos monospóricos	12
4.2- Selección de antagonistas bacterianos de <i>F. nygamai</i>	13
4.2.1- Cepas de <i>F. nygamai</i> utilizadas	13
4.2.2- Cepas bacterianas utilizadas	13
4.2.3- Efecto de las cepas bacterianas sobre micelio de <i>F. nygamai</i>	13
4.3- Estudio del efecto inhibitorio sobre la velocidad de crecimiento del micelio de <i>F. nygamai</i>	14
4.4- Estudio del efecto de cada antagonista en la producción de fumonisinas por <i>F. nygamai</i>	14
4.4.1- Determinación de la producción de fumonisinas	15
4.5- Bioensayos en semillas de sorgo peleteadas con los antagonistas bacterianos para evaluar la actividad antagónica contra la infección por <i>F. nygamai</i>	15
4.6- Bioensayos en semillas de sorgo para evaluar la actividad antagónica contra la infección por <i>F. nygamai</i> sin adherente (CMC)	16
4.7- Análisis estadístico	17
5- RESULTADOS	18
5.1- Aislamiento e identificación de <i>F. nygamai</i>	18
5.2- Efecto inhibitorio de las cepas bacterianas	19
5.3- Efecto inhibitorio de los cultivos bacterianos autoclavados	22
5.4- Estudio del efecto de cada antagonista en la producción de fumonisinas por <i>F. nygamai</i>	23
5.5- Bioensayos en semillas de sorgo peleteadas con los antagonistas bacterianos contra la infección por <i>F. nygamai</i>	24
5.5.1- Incidencia de Infección	24
5.5.2- Evaluación de la altura y desarrollo radicular de las plántulas de sorgo	26
5.6- Bioensayos en semillas de sorgo inoculados directamente con los caldos bacterianos vivos y autoclavados contra la infección por <i>F. nygamai</i> sin adherente (CMC)	28
5.6.1- Incidencia de Infección	28
5.6.2- Evaluación de la altura y desarrollo radicular de las plántulas de sorgo	29

6- DISCUSIÓN	33
6.1- Aislamiento e identificación de <i>F. nygamai</i>	33
6.2- Efecto inhibitorio de las cepas bacterianas	33
6.3- Estudio del efecto inhibitorio de los cultivos bacterianos autoclavados	34
6.4- Estudio del efecto de cada antagonista en la producción de fumonisinas por <i>F. nygamai</i>	34
6.5- Bioensayos en semillas de sorgo peleteadas con los antagonistas bacterianos contra <i>F. nygamai</i>	35
6.6- Bioensayos en semillas de sorgo inoculados directamente con los caldos bacterianos vivos y autoclavados contra <i>F. nygamai</i> sin adherente (CMC)	35
7- CONCLUSIONES	37
8. PERSPECTIVAS	37
9- BIBLIOGRAFÍA	38

1- INTRODUCCIÓN

La necesidad mundial de aumentar de manera sostenible la producción de cereales libre de patógenos para cubrir las necesidades crecientes de alimentos, ha impulsado la búsqueda de variedades con mayor rendimiento y resistencia. El déficit de granos previsto, a partir del 2050, será de 450 millones de toneladas anuales, lo cual equivale a 220 kg/ha per cápita, por lo que se hace necesario crear estrategias para incrementar la producción con altos rendimientos (Pérez, *et al.*, 2010).

El sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) presenta buena adaptabilidad y rendimientos, por lo que se le ha denominado “el cereal del siglo XXI”. A nivel mundial, a principio de los años sesenta, se empleaba una gran cantidad de sorgo para la alimentación humana. En la actualidad su utilización es fundamentalmente para el consumo animal siendo la producción mundial en el periodo 2011/12 de 62,76 millones de toneladas. Se le ha clasificado como el quinto cereal de mayor importancia en el mundo, después del trigo, el arroz, el maíz y la avena aportando el 3% de la producción total (Dragún *et al.*, 2010).

El sorgo es un cereal de verano originario del continente africano y asiático, y presenta una distribución mundial que se extiende hacia las regiones áridas y semiáridas de los trópicos y subtropicos (Doggett, 1998). En la figura 1, se muestran las principales zonas del mundo donde se cultiva.

Debido fundamentalmente a las características del sistema radicular, enrollamiento de las hojas, cubierta cerosa gruesa, estomas pequeños y numerosos, el sorgo posee una mejor regulación de la pérdida de agua por transpiración que el maíz. Además, de su tendencia a reanudar el crecimiento cuando se reduce el estrés hídrico, la planta de sorgo produce nuevas cañas si la sequía no ha sido prolongada (Irigoyen & Perrachon, 2007).

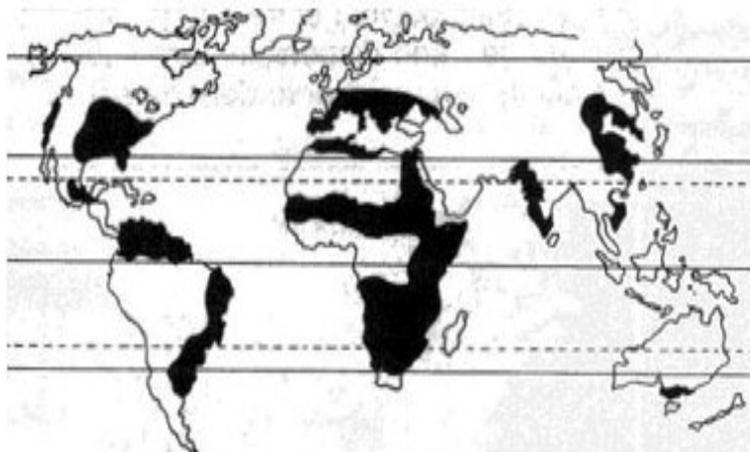


Fig. 1. Principales zonas del mundo donde se cultiva el sorgo
Tomado de: <http://www.monografias.com/trabajos/sorgo/sorgo.shtml>.

En Uruguay, entre los cultivos de secano, el sorgo es relativamente nuevo como cultivo granífero (Figura 2). El 95% se destina para la alimentación animal (aves, vacunos de carne-leche, cerdo), donde el principal rubro demandante es la producción avícola (carne y huevos).

El rendimiento potencial, ha ido aumentando debido a la implementación de tecnología y al manejo del cultivo (56%), preparación de suelo y material genético (44%). Es el cultivo que más responde a la evolución tecnológica.



Fuente: propia

Fig. 2. Cultivo de sorgo granífero

El área de sorgo granífero sembrada supera las 65 000 ha por año (Methol, 2011). Dado que es una especie de origen tropical, el sorgo requiere temperaturas altas para su desarrollo normal, siendo por lo tanto, sensible a las bajas temperaturas (Mari, 2003). En la figura 3, se muestran los Departamentos

productores de sorgo, según datos de la encuesta agrícola de la Dirección de Estadísticas Agropecuarias (DIEA).

De acuerdo con las buenas perspectivas del mercado se prevé un aumento del área para la siembra como también un aumento del volumen de semilla importada. En la tabla 1, se presentan las importaciones de semillas de sorgo y maíz en el período 2002-2011, la estimación del área que potencialmente puede ser sembrada y el área sembrada con destino a grano seco en Uruguay de acuerdo con las estadísticas del DIEA.

Tabla 1. Importaciones de semilla, potencial de siembra y área sembrada estimada por DIEA de maíz y sorgo.

Año	Maíz				Sorgo			
	Importación semilla (kg) (1)	Siembra potencial (ha) (2)	Área sembrada (DIEA) (3)	(3) / (2) * 100	Importación semilla (kg) (1)	Siembra potencial (ha) (2)	Área sembrada (DIEA) (3)	(3) / (2) * 100
2002	882.328	44.116	38.945	88%	1.052.509	87.709	14.825	17%
2003	1.492.081	74.604	44.900	60%	1.251.255	104.271	18.000	17%
2004	2.043.006	102.150	60.600	59%	1.345.987	112.166	19.000	17%
2005	1.418.311	70.916	49.000	69%	1.521.952	126.829	15.850	12%
2006	1.384.673	69.234	58.700	85%	2.367.171	197.264	42.900	22%
2007	2.844.271	142.214	80.600	57%	2.310.897	192.575	37.700	20%
2008	3.197.556	159.878	87.463	55%	3.482.233	290.186	68.057	23%
2009	2.894.141	144.707	96.026	66%	3.547.676	295.640	35.300	12%
2010	1.887.739	94.387	80.900	86%	1.981.106	165.092	31.400	19%
2011	3.664.003	183.200	127.247	69%	3.387.060	282.255	49.971	18%

Notas: Se asume que la cantidad de semilla necesaria para sembrar una hectárea es 20 kg de maíz y 12 kg de sorgo. Para el año 2011*, se estimó el área que se sembraría con grano seco en base a la relación (3)/(2) promedio del período 2002-2010 (cifras en cursiva y negrita)

Fuente: Methol (2011)

Otros de los beneficios de este cultivo es su utilización potencial y real en la producción de biocombustibles (Tabla 2). Tanto el maíz como el sorgo poseen una tasa de conversión a etanol de 400 litros por tonelada, mientras que de la caña de azúcar se pueden extraer 75 litros por tonelada. A pesar de ello, los rendimientos de caña de azúcar por hectárea son de 65 toneladas y la convierten por lo tanto en el cultivo más productivo (Schvarzer & Tavošnanska, 2007).

Tabla 2. Rendimiento de etanol por hectárea de cultivos seleccionados.

Cultivo	Rendimiento tn/ha	Conversión a etanol Lts/tn	Lts etanol/ha
Caña de azúcar	65	75	4.875
Maíz	8	400	3.000
Sorgo	5	400	2.000

Fuente: Schvarzer & Tavošnanska (2007)

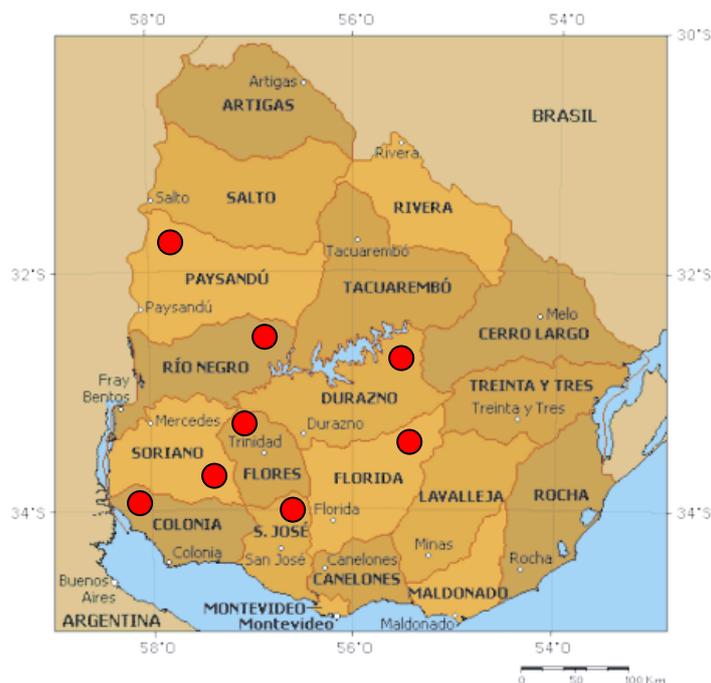


Fig. 3. Principales Departamentos productores de sorgo

Fuente: encuesta agrícola-DIEA (2009)

Fusarium es un género de hongos ubicuos y extremadamente versátiles, usualmente saprofitos del suelo, asociados a materia orgánica en descomposición e insectos (Sapumohotti, 2004), tiene una distribución cosmopolita y se producen en la mayoría de las regiones climáticas del mundo (Burgess, 1981; Nelson, *et al.*, 1983). Sin embargo, muchas especies de este género son parásitos facultativos de numerosos hospederos, en los que se incluyen plantas, humanos y animales (Summerell *et al.*, 2001).

La forma perfecta (teleomorfo) de *Fusarium*, en las especies que la presentan, pertenecen a los géneros *Nectria*, *Calonectria*, *Micronectriella* y *Gibberella* (Ascomycetes, Hypocreales) que se caracterizan por la producción de ascosporas en peritecios (Desjardins, 2003; Leslie & Summerell, 2006).

Las especies de *Fusarium* han sido tradicionalmente definidas por sus caracteres morfológicos. Estas características incluyen la forma y tamaño de los macroconidios, la presencia o ausencia de clamidiosporas, la forma y ontogenia de las microconidios y la pigmentación de la colonia (Llorens *et al.*, 2006; Leslie & Summerell, 2006). Las colonias del género *Fusarium* sp. presentan diversos colores (blanco, rosado pálido), aunque en el reverso de la colonia pueden presentar colores rojos, salmón y violeta. Los pigmentos que

difunden en el agar suelen variar de color o tono con el pH; (Summerell *et al.*, 2001).

El suelo es el medio para el crecimiento de los cultivos agrícolas, pero también es el hábitat para muchas especies de *Fusarium* en zonas templadas, regiones tropicales, árticas y alpinas (Burgues, 1981). Estos hongos pueden estar asociados a eventos patológicos que ocasionan daños severos, invadiendo los tejidos a través de aperturas naturales o heridas, en cultivos agrícolas de importancia económica como el sorgo, maíz, la caña de azúcar, el trigo y el arroz, causando daños económicos significativos (Nirenberg & O'Donnell, 1998; García & Marting, 2010). Pueden producir pudriciones a nivel de tallo, raíz y granos produciendo pérdidas graves en la producción (Frederiksen & Odvody, 2000; Gallardo-Reyes *et al.*, 2006).

Especies de este género pueden producir micotoxinas bajo condiciones ambientales determinadas de humedad, temperatura y oxígeno (Perrou, 2002). La capacidad toxicogénica es cepa específica. En algunos casos la contaminación con micotoxinas se da principalmente en el campo donde hay condiciones favorables de humedad (Magnoli *et al.*, 1999).

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de bajo peso molecular producidos por hongos filamentosos, en la etapa final del crecimiento exponencial o al principio de la fase estacionaria. No tienen aparentemente importancia en el crecimiento o en el metabolismo de estos organismos y poseen distinto tipo de toxicidad tanto en humanos como en animales. Su producción puede ocurrir antes o durante la cosecha de los granos, así como también durante el almacenamiento y transporte de los mismos (Bullerman & Bianchini, 2007). Pitt (1996) las define como “metabolitos fúngicos cuya ingestión, inhalación o absorción cutánea reducen la actividad, pueden causar daños en la salud y/o la muerte de animales y humanos”. Son compuestos estables, no se destruyen durante la mayor parte de las operaciones de procesamiento de los alimentos, por lo que son contaminantes naturales en materias primas, alimentos para humanos y raciones (Bullerman & Bianchini, 2007; García *et al.*, 2009).

Algunas micotoxinas pueden causar enfermedades autoinmunes, ser teratogénicas, carcinogénicas, mutagénicas, etc. (CAST, 2003). Entre las

principales toxinas producidas por especies de *Fusarium* se encuentran los tricotecenos (deoxinivalenol, Toxina T2, nivalenol), la zearalenona y las fumonisinas (Pan *et al.*, 2009; Pacin *et al.*, 2009; Al-Mughrabi, 2010; Pereira *et al.*, 2010).

Las fumonisinas fueron descritas por primera vez en 1988 por dos grupos de trabajo de manera independiente. Uno de ellos estaba investigando la causa del cáncer de esófago en humanos en ciertas partes de Sudáfrica (Bezuidenhout *et al.*, 1988), y el otro estaba buscando encontrar la etiología de una de las enfermedades que afectan a los caballos, la ELEM (leucoencefalomalacia). Según Magnoli *et al.*, (1999) se aislaron y caracterizaron las fumonisinas a partir de cultivos de *Fusarium moniliforme* presentes en maíz Sudáfrica (Bezuidenhout *et al.*, 1988).

Las fumonisinas son producidas por *Fusarium verticillioides* (sinónimo *F. moniliforme* Sheldon), *Fusarium proliferatum*, *F. fujikuroi*, *F. subglutinans*, *F. anthophilum*, *F. nygamai* y *F. napiforme*. Fuera del género *Fusarium* se ha mencionado que *Alternaria alternata*, produce las fumonisinas FB1, FB2, FB3 (Mirocha *et al.*, 1996; Soriano & Dragacci, 2007).

Producen síntomas neurotóxicos (leucoencefalomelacia), nefrotóxicos, edema pulmonar y cerebral y lesiones cardíacas. Entre los animales, los cerdos y los caballos son los más sensibles a la intoxicación por fumonisinas (Hascheck *et al.*, 2001; Foreman *et al.*, 2004; Giannitti *et al.*, 2011). La información acerca del efecto de la fumonisinas sobre la salud humana es limitada y no concluyente. La evidencia epidemiológica ha vinculado esta micotoxina con el consumo de cereales contaminados y con una alta incidencia de cáncer de esófago en humanos (Marasas *et al.*, 1979; Pitt, 2000). El Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC), clasificó las fumonisinas como posibles carcinógenos humanos (Grupo 2B) (IARC, 2002). En las Tabla 3 y 4 se muestran los niveles de fumonisinas máximos permitidos para proteger la salud humana y animal a nivel mundial.

Tabla 3. Contenidos máximos permitidos de fumonisinas en cereales para el consumo humano ($\mu\text{g}/\text{kg}$) (Reglamento CE nº 1126/2007)

Tipo de cereal	Contenido máximo de fumonisinas permitido ($\mu\text{g}/\text{kg}$) Suma de FB1 y FB2
Maíz no elaborado, excepto el destinado a molienda por vía húmeda.	4000
Maíz y alimentos a base de maíz destinados al consumo humano directo a excepción de los productos alimenticios enumerados en los puntos 2.6.3 y 2.6.4 del Reglamento CE nº 1126/2007.	1000
Cereales para el desayuno a base de maíz y apetitivos de maíz.	800
Alimentos elaborados a base de maíz y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad.	200
Fraciones de la molienda de maíz con un tamaño de partícula.	1400
Fraciones de la molienda de maíz con un tamaño de partícula < 500 micras, clasificados en el código NC 110220, y otros productos de la molienda de maíz con un tamaño de partícula < 500 micras no destinados al consumo humano directo, clasificados en el código NC 19041010	2000

Tabla 4. Valores permitidos de fumonisinas en productos destinados a la alimentación animal (mg/kg) (Reglamento CE nº 2006/576).

Micotoxina	Productos destinados a la alimentación animal	Valor orientado en mg/kg (ppm) para raciones con un contenido de humedad del 12%
Fumonisinas B1+B2	a) Materias primas para piensos: - Maíz y productos a base de maíz	60
	b) Raciones complementarios y completos: - Cerdos, caballos, conejos y animales de compañía. - Peces. - Aves de corral, temeros (menores a 4 meses), corderos y cabritos. - Rumiantes mayores de 4 meses.	5 10 20 50

Pocos estudios se han realizado sobre la presencia de *F. nygamai*, como patógeno asociado al cultivo del sorgo granífero y como productor de fumonisinas en Uruguay. Estudios micológicos, realizados por el Laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias-Facultad de Ingeniería de la UdelaR en granos de sorgo dulce y granos de maíz, permitieron poner en evidencia la presencia de especies de *Fusarium*, con niveles de infección elevados (Fornier *et al.*, 1999; Del Palacio *et al.*, 2012).

F. nygamai, se caracteriza por la formación de esporodoquios constituidos por macroconidios rectos a ligeramente curvados, de 3 septos, con una célula apical y una célula basal en forma de pie. Los microconidios son aseptados

pero ocasionalmente pueden tener un septo, ovales a elípticos, se producen en cadenas relativamente cortas o en falsas cabezas, en monofiálides y polifiálides (Figura 4). Forman clamidosporas de pared lisa a rugosa como estructuras de resistencia y propagación (Burgess & Trimboli, 1986). El estado sexual o teleomorfo es *Gibberella fujikuroi* (Sawada) y es poco frecuente en la naturaleza (Perrou, 2002).

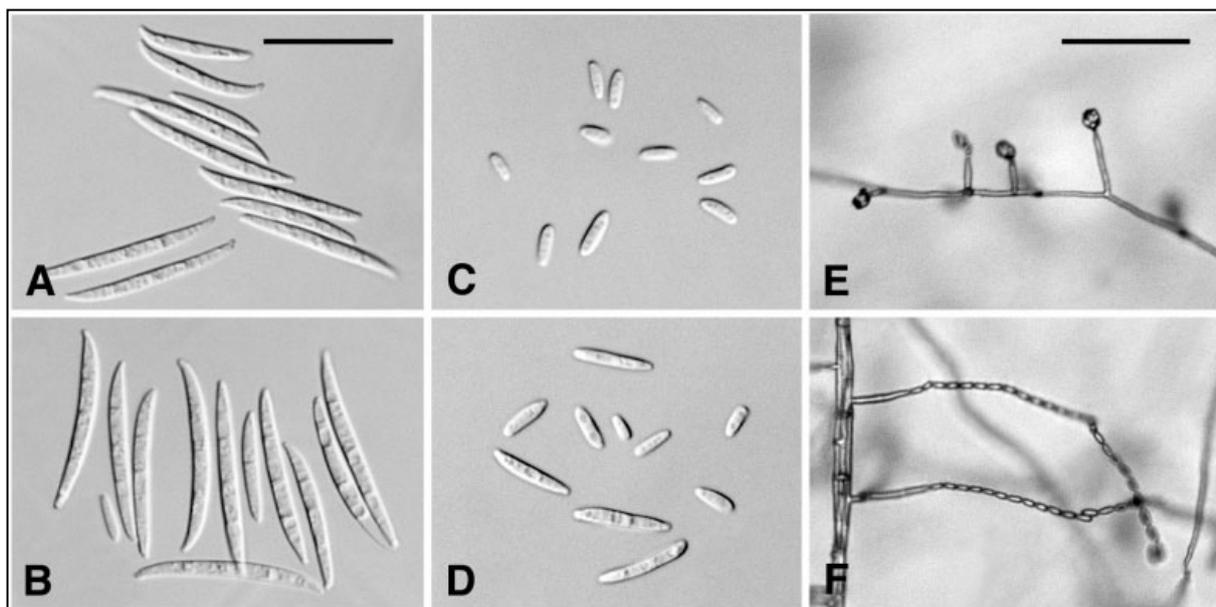


Fig. 4. *Fusarium nygamai* Burgess & Trimboli (1986).
Tomado de: Leslie *et al.*, (2006).

A – B: Macroconidia; **C – D:** Microconidia; **E – F:** Microconidia in situ en CLA.
A – D, barra de escala = 25 μm ; **E – F,** barra de escala = 50 μm .

Esta especie fue aislada por primera vez en raíces y granos de sorgo, puede colonizar tejidos aéreos y subterráneos de muchos cultivos, afectando principalmente su raíz (Burgess & Trimboli, 1986; Balmas *et al.*, 2000; Kurmut, *et al.*, 2002). Otros síntomas los producen en el tallo, hojas y granos, afectando el rendimiento en grano e influyendo en el valor nutritivo y palatabilidad de los mismos (Burgess & Trimboli, 1986).

El ciclo de Fusarium nygamai en el cultivo del sorgo

El cultivo de sorgo puede infectarse por esporas *F. nygamai* provenientes de rastrojo presentes en el suelo y alcanzar las espiguillas. Además el inóculo del suelo puede penetrar por el sistema radicular de la planta e iniciar una infección

sistémica, limitando la absorción de agua y nutrientes. Se producen así los primeros síntomas de marchitamiento y necrosis. Por otro lado, el daño generado por la actividad de insectos en tallo, hojas y panoja favorecen la entrada de esporas, afectando su calidad y rendimiento.

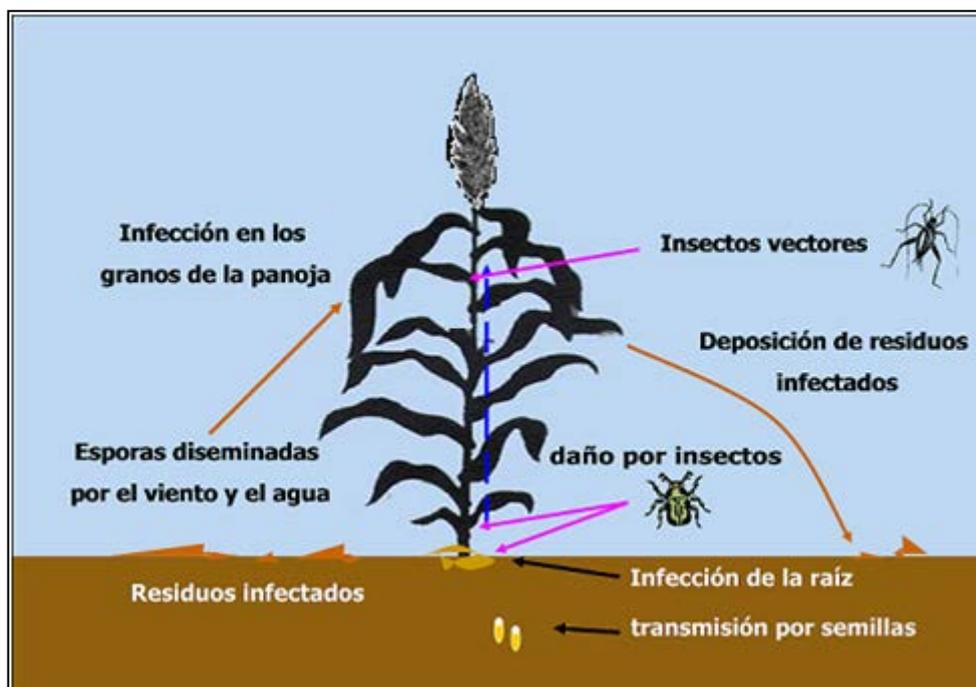


Fig. 5. Ciclo de infección de *Fusarium nygamai* en sorgo

El control biológico, en un sentido amplio y según la definición de Baker & Cook (1974) consiste en la reducción de la densidad del inóculo o de las actividades de un patógeno productor de enfermedad, por uno o más organismos. Se conocen numerosos grupos de bacterias: *Actinomicetales*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y de hongos como *Trichoderma* y *Gliocladium* con capacidad antagonista frente a otros microorganismos patógenos. Estos antagonistas actúan de diferente forma: por antibiosis, competencia o hiperparasitismo. En el caso de las bacterias muchas pertenecen al género *Bacillus* y su acción principal está dada por la producción de metabolitos secundarios (Silo *et al.*, 1994; Berg & Hallmann 2006). El rápido crecimiento que muestran estas bacterias en cultivo líquido, la formación de endosporas resistentes al calor y la desecación y la producción de metabolitos termostables son características que permiten considerar a estos microorganismos como potenciales agentes de control biológico (Shoda, 2000; Alabouvette *et al.*, 2006;

Kinsella *et al.*, 2009).

Las investigaciones desarrolladas acerca del control biológico de patógenos en el cultivo del sorgo son muy escasas constituyendo un desafío encontrar alternativas efectivas y viables. No se ha encontrado un fungicida eficiente y fácilmente degradable que reduzca la población fúngica y disminuya la contaminación con micotoxinas (Albarracín, 2010). Por ello se ha propuesto aprovechar la actividad antagónica de algunos microorganismos sobre *F. nygamai*.

2- HIPÓTESIS

Metabolitos bacterianos pueden reducir el crecimiento micelial y la producción de fumonisinas por *Fusarium nygamai*.

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo general

El principal objetivo de este trabajo fue seleccionar y evaluar la efectividad de antagonistas bacterianos bajo condiciones de laboratorio, para el control de *Fusarium nygamai* en sorgo granífero.

3.2- Objetivos específicos

- 1) Aislamiento e identificación de *Fusarium nygamai*.
- 2) Seleccionar antagonistas bacterianos con el fin de determinar su capacidad como inhibidores del crecimiento micelial y la producción de fumonisinas por *F. nygamai* bajo condiciones de laboratorio.
- 3) Evaluar la efectividad de la peletización en semillas de sorgo, para el control de *F. nygamai*.
- 4) Evaluar la capacidad antagónica de las cepas seleccionadas en el desarrollo de la infección por *F. nygamai* en plántulas de sorgo.

4- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1- Aislamiento e identificación de *Fusarium nygamai*

Para el aislamiento de las cepas de *F. nygamai* se seleccionaron granos de sorgo de forma aleatoria y pequeños trozos de raíces y tallos con síntomas de infección de aproximadamente 1 cm de longitud. A dichas muestras se les realizó una desinfección superficial con NaClO al 4% durante un minuto y por último se hicieron tres lavados con agua destilada estéril. El material vegetal fue secado con papel absorbente estéril y finalmente sembrado en cajas de Petri conteniendo medio de cultivo de agar-papa-glucosa (APG) (Agar 20 g; Dextrosa 20 g; Papas blancas 250 g; 1000 ml agua destilada), e incubado a una temperatura de 25 °C bajo ciclos de 12h\12h de luz blanca y luz negra durante 7-10 días. Pasado este tiempo, las colonias desarrolladas se observaron bajo microscopio óptico (40x).

Las colonias pertenecientes al género *Fusarium*, se sembraron en cajas de Petri conteniendo medio de cultivo agar-hojas de clavel 2% (AHC) (Agar 20gr; 1000 ml agua destilada; hojas de clavel esterilizadas superficialmente) y APG, incubándose a una temperatura de 25 °C bajo ciclos de 12h\12h de luz blanca y luz negra durante una semana, para su posterior identificación. Una vez obtenidos los distintos aislamientos, la identificación de las cepas de *F. nygamai* se realizó observando las características macro y micromorfológicas según la metodología propuesta por Nelson *et al.*, (1983); Burgess & Trimboli (1986).

4.1.1- Cultivos monospóricos

Se realizaron cultivos monospóricos a todas las cepas de *F. nygamai* aisladas. Para ello se tomo una pequeña cantidad de propagulos fúngicos de las colonias desarrolladas en AHC y se realizó una suspensión en 10 ml de agua destilada estéril. Esta suspensión se homogeneizó y transfirió a cajas de Petri conteniendo agar-agua al 2% donde se diseminó por rotación y se descartó el líquido sobrante. Las placas fueron incubadas de forma inclinada en cámara oscura, a 25 °C durante 24 horas para permitir la germinación de las esporas. Luego las esporas germinadas bajo microscopio estereoscópico (10X) y con ayuda de una aguja histológica estéril fueron transferidas a cajas de Petri

conteniendo medio de cultivo APG, incubándose a 25 °C bajo ciclos de 12h\12h de luz blanca y luz negra durante 7-10 días.

Las cepas de *F. nygamai* fueron conservadas en glicerol al 10% a -80 °C, e incorporadas a la Micoteca del Laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias-Facultad de Ingeniería.

4.2- Selección de antagonistas bacterianos de *F. nygamai*

4.2.1- Cepas de *F. nygamai* utilizadas

Se seleccionaron para los ensayos *in vitro* 4 cepas de *F. nygamai* obtenidas del material vegetal estudiado: 2 provenientes del tallo (*FnT₁* y *FnT₂*), 1 de raíz (*FnR*) y 1 de granos (*FnG*).

4.2.2- Cepas bacterianas utilizadas

Se utilizaron para los ensayos *in vitro* 19 cepas bacterianas obtenidas de diferentes sustratos vegetales y depositadas en la colección del Laboratorio de Micología. Los cultivos se mantienen conservados en glicerol al 10% a -80 °C.

4.2.3- Efecto de las cepas bacterianas sobre micelio de *F. nygamai*

La actividad antagónica se determinó mediante la observación de un halo de inhibición del crecimiento micelial adyacente a la cepa bacteriana como resultado de la actividad de metabolitos bacterianos extracelulares que difunden en el agar. Para ello se inocularon discos de 7 mm de diámetro de micelio del hongo en el centro de cajas de Petri conteniendo medio de cultivo APG y en puntos equidistantes se inocularon puntualmente diferentes cepas bacterianas. Las cajas se incubaron a 25 °C bajo ciclos de 12h\12h de luz blanca y luz negra. La medición de los halos de inhibición producidos se realizó diariamente durante 8 días. Los ensayos se realizaron por duplicado.

4.3- Estudio del efecto inhibitorio de los cultivos bacterianos autoclavados sobre la velocidad de crecimiento del micelio de *F. nygamai*

Se evaluó el efecto sobre la velocidad de crecimiento de *F. nygamai* en presencia de cada cepa bacteriana. Para ello se inocularon 3 anzadas de las

bacterias que presentaron efecto antagónico en Erlenmeyers de 250 ml conteniendo 50 ml de caldo-papa-dextrosa (PDB) (Dextrosa 20g; Papas blancas 250g; 1000 ml de agua destilada) y se incubaron en un agitador mecánico orbital (marca New Brunswick Scientific), a una temperatura de 28 °C y 180 rpm durante 5 días. Posteriormente cada cultivo bacteriano se autoclavó para evaluar el efecto de la termoestabilidad de los metabolitos producidos. Para ello, el caldo bacteriano se esterilizó en autoclave (marca P-Selecta) a una temperatura de 121 °C, 1 atm durante 15 minutos.

Se vertió una alícuota de 500 µL de cada una de las 19 cepas directamente en las cajas de Petri con medio de cultivo APG solidificado y se dispersó circularmente con una asa de vidrio esterilizada, en el centro de la placa se inoculó un disco de 7 mm de diámetro con micelio de las cepas de *F. nygamai* y se incubó a 25 °C bajo ciclos de 12h\12h de luz blanca y luz negra. El control consistió en cajas de Petri con medio de cultivo APG sembradas solo con *F. nygamai*. Los ensayos se realizaron por triplicado. En todos los casos el diámetro de crecimiento se midió diariamente, en dos direcciones en ángulo recto. La velocidad de crecimiento (mmh^{-1}) se calculó por regresión lineal del radio de la colonia en función del tiempo, para cada aislamiento de *F. nygamai* en cada una de las condiciones evaluadas.

4.4- Estudio del efecto de cada antagonista en la producción de fumonisinas por *F. nygamai*

Para evaluar el efecto de los antagonistas bacterianos seleccionados sobre la producción de fumonisinas, se depositaron 20 g de granos de sorgo de la variedad "Milo" en bolsas plásticas y se esterilizaron en autoclave. Finalmente se colocaron los granos en Erlenmeyers de 250 ml conteniendo 50 ml de medio PDB inoculado con 3 anzadas de cada antagonista bacteriano y en Erlenmeyers conteniendo 50 ml de medio PDB con los antagonistas bacterianos autoclavados. Estos se incubaron en un agitador mecánico orbital, a 28 °C, 120 rpm durante 30 minutos. Pasado este tiempo, los granos fueron transferidos a cajas de Petri sobre los cuales se colocaron 4 discos de 7 mm de diámetro con micelio de cada una de las cepas de *F. nygamai*. Las cajas de Petri fueron incubados en cámara húmeda y oscura a una temperatura de 25 °C durante 21 días. El control consistió en cajas de Petri con granos de sorgo

autoclavados sembrados con cada una de las cepas de *F. nygamai*. Los ensayos se realizaron por triplicado. Finalmente los granos fueron molidos y conservados a -20 °C hasta el momento de su análisis.

4.4.1- Determinación de la producción de fumonisinas

La detección y cuantificación de fumonisinas, se realizó mediante inmunoensayo enzimático competitivo (ELISA) de uso comercial, Marca R-Biopharm (RIDASCREEN^R FAST Fumonisin), con un límite de detección de 222 µg/kg.

Las muestras de sorgo molidas (20 g) antes descritas se mezclaron con 100 ml de metanol al 70% durante 2 minutos y se filtraron a través de papel de filtro Whatman N° 1. Cada extracto obtenido, se diluyó 1:14 con agua destilada y se sembraron 50 µL de este filtrado diluido y de cada uno de los estándares de reacción en pocillos para ELISA. Los estándares corresponden a concentraciones de fumonisinas de 0 µg/kg, 222 µg/kg, 666 µg/kg, 2 µg/kg y 6 µg/kg. Luego se agregó a cada posillo 50 µL del conjugado enzima-fumonisina y 50 µl del anticuerpo anti-fumonisina. Se incubaron los pocillos a temperatura ambiente por 10 minutos y luego se descartó el contenido de los pocillos y se le realizaron 3 lavados con una solución tampón fosfato 10 mM (pH 7,4) - Tween 20 al 0,05%. Se agregó a cada uno de los pocillos 100 µL de sustrato cromógeno y se incubaron nuevamente las muestras a temperatura ambiente por 3 minutos, en condiciones de oscuridad. Finalizado este tiempo de incubación se detuvo la reacción mediante el agregado de 100 µL de una solución de H₂SO₄ 1 N a cada pocillo y se midió la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro para ELISA (Microwell EL 301). Para el análisis de los resultados se utilizó el software RIDASOFT Win[®], donde se ingresaron las absorbancias dadas por el espectrofotómetro, y se obtuvo una curva de calibración realizada con los estándares. A partir de la curva de calibración se determinaron los niveles de fumonisinas presentes en cada muestra.

4.5- Bioensayos en semillas de sorgo peleteadas con los antagonistas bacterianos para evaluar la actividad antagónica contra la infección por *Fusarium nygamai*

Para los bioensayos de sorgo, se utilizaron los antagonistas bacterianos que

presentaron mayor capacidad antagónica frente a las cepas de *F. nygamai*. Para ello se utilizaron semillas de la variedad "Milo" estilizadas superficialmente con una solución de alcohol al 80% durante 1 minuto, NaClO al 4% durante 2 minutos, y por último tres lavados de 1 minuto con agua destilada estéril. Estas semillas se sembraron en cajas de Petri con medio fresco de APG durante 7 días a 25 °C para verificar su esterilidad.

Las semillas de sorgo estériles y germinadas se transfirieron a Erlenmeyers conteniendo 100 ml del cultivo bacteriano vivo y del cultivo autoclavado de las cepas antagónicas y 1,5 g de carboximetil-celulosa (CMC) (15 g/L). Estos fueron incubados a 28 °C en un agitador orbital a 120 rpm durante 30 minutos, para permitir que las células bacterianas se adhieran a las semillas de sorgo. Pasado este tiempo, las semillas fueron sembradas en tubos de ensayos de 25 x 150 mm (una semilla por tubo) conteniendo como soporte 5 ml de agar-agua al 2% (Agar 20 g; 1000 ml de agua destilada) y se inocularon con 2 discos de 7 mm de diámetro de micelio de *F. nygamai* al momento y a las 24 horas. Los tubos se incubaron a 25 °C bajo ciclos de 12h\12h de luz blanca y luz negra durante 21 días. Los ensayos se realizaron por triplicado y se utilizaron 10 semillas por tratamiento. El control consistió en semillas germinadas inoculadas solo con *F. nygamai*. A los 7, 14 y 21 días de incubación se evaluó, la incidencia de infección, el desarrollo foliar, y el desarrollo del sistema radicular de las plántulas. La incidencia se determinó como el número de plántulas con síntomas sobre el total de plántulas evaluadas.

4.6- Bioensayos en semillas de sorgo para evaluar la actividad antagónica contra la infección por *F. nygamai* sin adherente (CMC)

Semillas de sorgo estériles y germinadas se sembraron en tubos de vidrio de 25 x 150 mm (una semilla por tubo) conteniendo como soporte 5 ml de agar-agua al 2%, y se inocularon con 100 µL de los cultivos bacterianos vivos y de los autoclavados, luego se inocularon los tubos con 2 discos de 7 mm de diámetro de micelio de *F. nygamai* al momento y a las 24 horas. Los tubos se incubaron a 25 °C bajo ciclos de 12h\12h de luz blanca y luz negra durante 21 días. Los ensayos se realizaron por triplicado y se utilizaron 10 semillas por tratamiento. El control consistió en semillas germinadas inoculadas solo con *F. nygamai*. A los 7, 14 y 21 días de incubación se evaluó, la incidencia de

infección, el desarrollo foliar, y el desarrollo del sistema radicular de las plántulas. La incidencia se determinó como el número de plántulas con síntomas sobre el total de plántulas evaluadas.

4.7- Análisis estadístico

Los resultados de las velocidades de crecimiento y la cuantificación de fumonisinas en los diferentes casos, se analizaron mediante análisis de varianza. Los promedios fueron comparados usando el test de Fisher LSD ó de Tukey para determinar si existieron diferencias significativas entre los controles y los tratamientos.

5- RESULTADOS

5.1- Aislamiento e identificación de *F. nygamai*

Con el propósito de aislar cepas de *F. nygamai* se seleccionaron granos de sorgo y pequeños trozos de tallos y raíces con síntoma de infección. De estos materiales se obtuvieron 11 cepas de *F. nygamai* a partir de raíz (3), tallo (5) y granos (3) de sorgo. De estas cepas se seleccionaron 2 provenientes del tallo (FnT_1 y FnT_2), 1 de raíz (FnR) y 1 de granos (FnG) (Figura 6a, b, c y d).

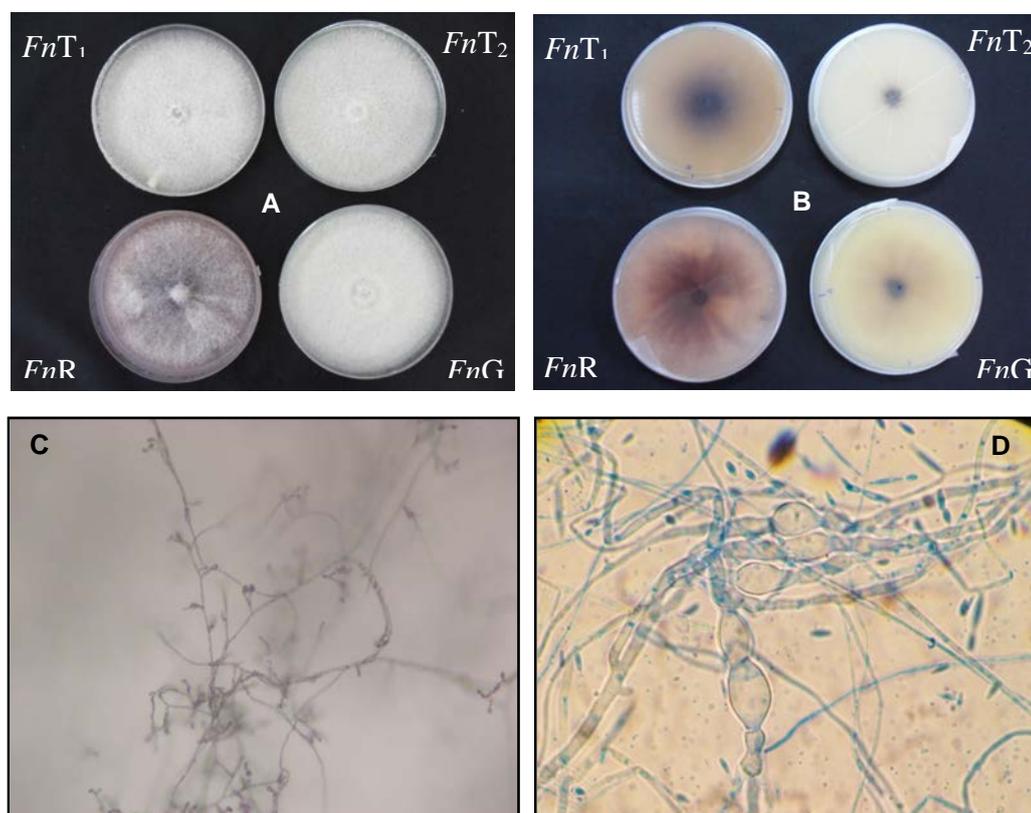


Fig. 6. Características macro y micromorfológicas de *F. nygamai*: (A= Cepas de *F. nygamai*, B= Pigmentos difundidos en el medio APG, C= Micelio aéreo, D= Clamidiosporas)

5.2- Efecto inhibitorio de las cepas bacterianas

A fin de seleccionar cepas bacterianas con actividad antagónica se sembró un disco de micelio de *F. nygamai* en el centro de cajas de Petri y las bacterias en el margen de las mismas y se midieron los halos de inhibición producidos. De las 19 cepas bacterianas utilizadas 7 presentaron inhibición del crecimiento de las cepas de *F. nygamai* (Tabla 5).

Los valores muestran que la cepa B10 fue la más eficiente por inhibir en mayor grado al micelio de las 4 cepas de *F. nygamai* evaluadas (Figura 7).

Tabla 5. Actividad inhibitoria de las cepas bacterianas analizadas contra *F. nygamai*

Cepa bacteriana	Halos de inhibición (mm)			
	<i>FnT</i> ₁	<i>FnT</i> ₂	<i>FnR</i>	<i>FnG</i>
B1	7	2	1	2
B2	9	4	2	9
B3	2	2	1	2
B4	6	6	6	8
B5	3	5	0	1
B6	1	2	6	7
B7	6	8	1	7
B8	0	0	1	6
B8	3	3	2	2
B10	10	10	9	9
B11	3	2	2	2
B12	2	2	1	2
B13	7	7	7	1
B14	5	8	4	7
B15	0	0	9	3
B16	5	1	4	0
B17	8	1	1	3
B18	4	5	5	3
B19	6	6	4	5

Los valores de los halos de inhibición frente a las cepas de *F. nygamai* *FnT*₁, *FnT*₂, *FnR* y *FnG* representan el grado de antagonismo de las cepas bacterianas.

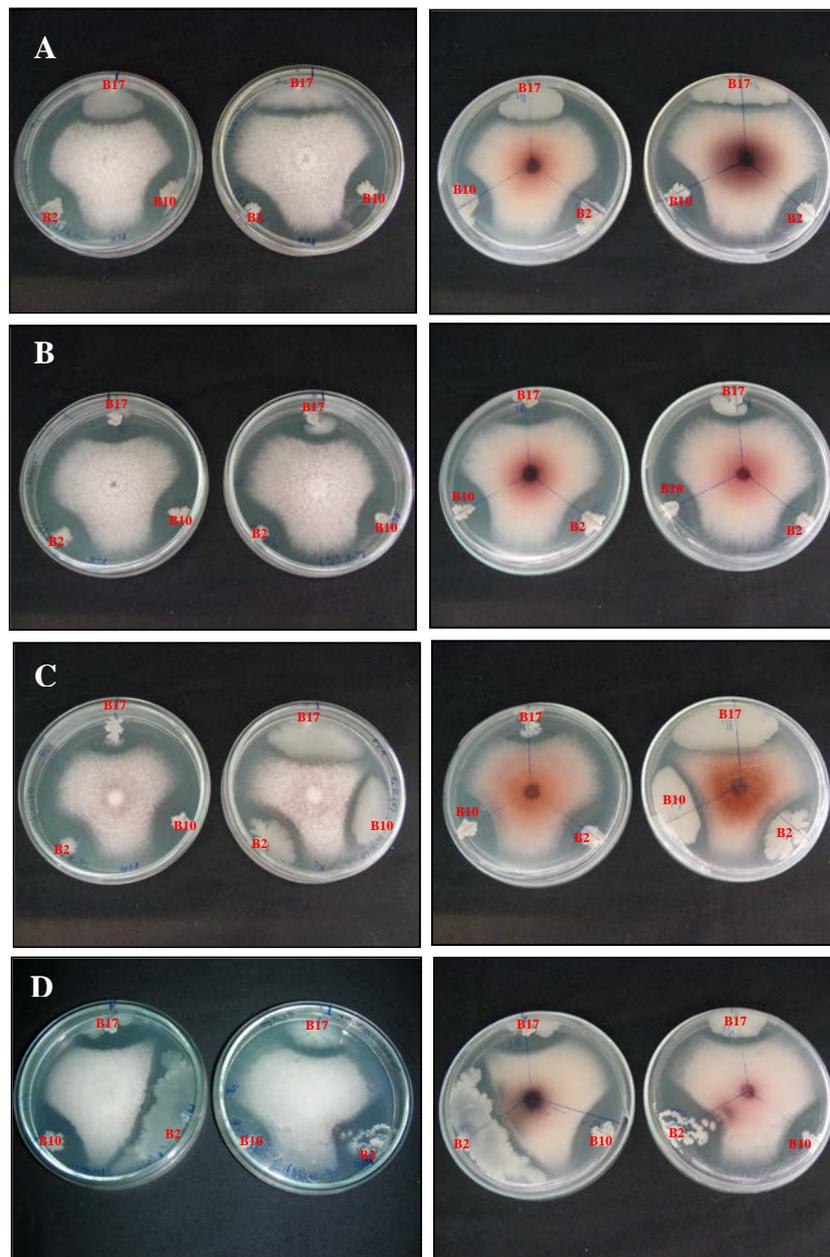


Fig. 7. Halos de inhibición del crecimiento micelial de cepas de *F. nygamai* producidos por las bacterias antagonistas. **A.** *FnT₁* vs B17, B2 y B10. **B.** *FnT₂* vs B17, B2 y B10. **C.** *FnR* vs B17, B2 y B10. **D.** *FnG* vs B17, B2 y B10. Las figuras de la izquierda corresponden al anverso y las de la derecha al reverso.

Las observaciones microscópicas de las zonas de interacción entre antagonista bacteriano y *F. nygamai*, permitieron determinar que algunas cepas bacterianas producen engrosamientos de la pared hifal y/o vacuolización del citoplasma, explicando en parte el efecto antagónico que tienen los metabolitos bacterianos producidos por las bacterias sobre el micelio de *F. nygamai* (Figura 8).

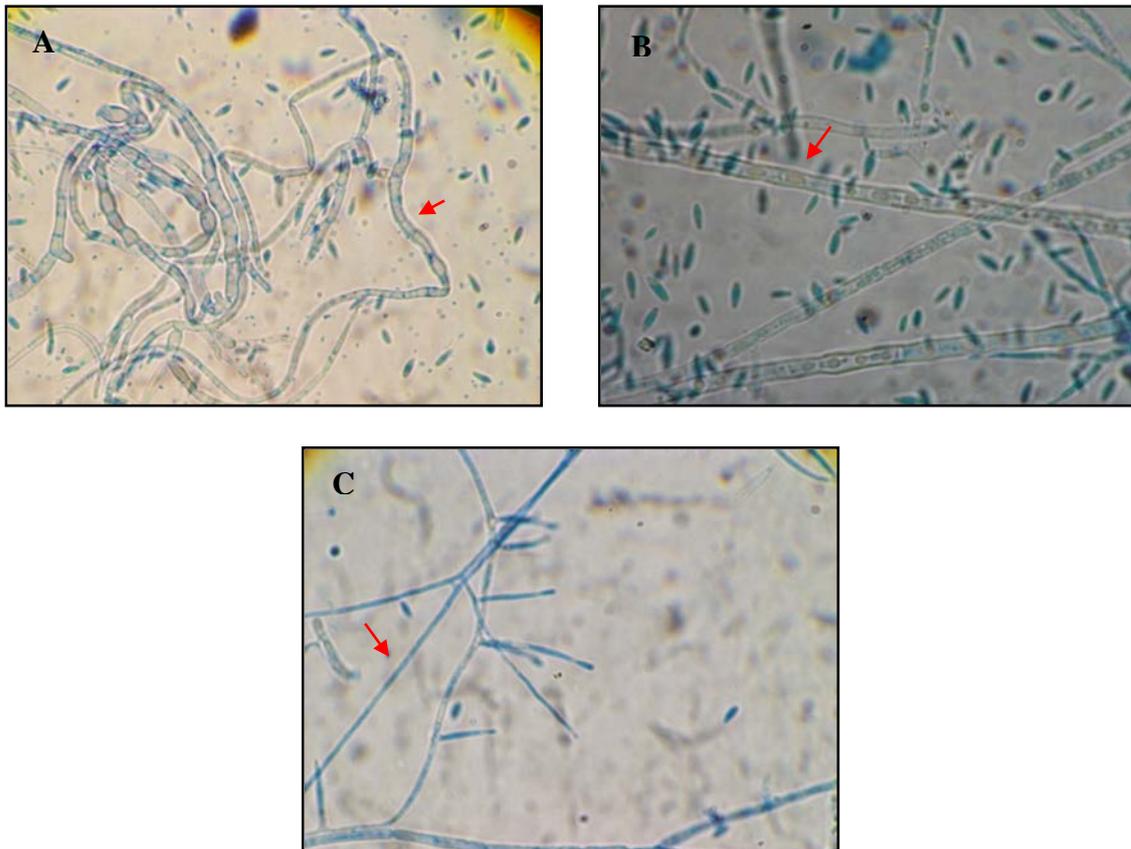


Fig. 8. Observación microscópica del micelio de *F. nygamai* de la zona de interacción con las bacterias antagonistas. Las flechas indican en: **A-** engrosamiento de las paredes de las hifas en la interfase, **B-** vacuolización del citoplasma y **C-** micelio normal.

5.3- Efecto inhibitorio de los cultivos bacterianos autoclavados

Para evaluar el efecto de los cultivos bacterianos autoclavados sobre la velocidad de crecimiento de *F. nygamai* se inoculó un disco de micelio sobre cajas de Petri conteniendo el medio de cultivo con los autoclavados bacterianos. En la figura 9, se muestran los porcentajes de inhibición de la velocidad de crecimiento de *F. nygamai* que presentaron diferencias significativas en presencia de 13 cepas bacterianas respecto al control con *F. nygamai* solo (Fisher LSD, $p \leq 0.05$).

De los 19 cultivos bacterianos autoclavados probados, 13 mantuvieron un efecto inhibitorio sobre la velocidad de crecimiento de los 4 aislamientos de *F. nygamai*. Los metabolitos retienen su actividad después del autoclavado reflejando que son termoestables.

Se observó que los cultivos bacterianos autoclavados que presentaron la mayor inhibición en la velocidad de crecimiento de *F. nygamai* fueron las cepas B6 (47%), B10 (69 %) y B18 (60%).

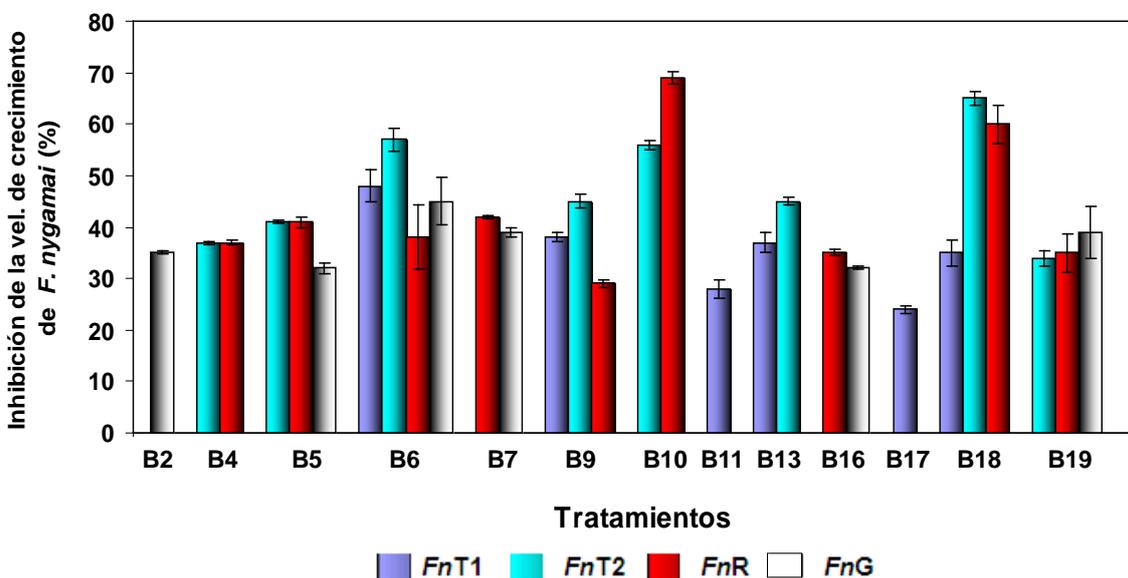


Fig. 9. Porcentajes de inhibición de la velocidad de crecimiento de *F. nygamai* en relación al crecimiento de las cuatro cepas de *F. nygamai*.

5.4- Estudio del efecto de cada antagonista en la producción de fumonisinas por *F. nygamai*

Se evaluó el efecto de las cepas bacterianas sobre la producción de fumonisinas en granos de sorgo por parte de las cuatro cepas de *F. nygamai*.

Las cepas antagonistas seleccionadas ejercen un efecto inhibitorio *in vitro* sobre la producción de fumonisinas por las 4 cepas de *F. nygamai* (Tabla 6a, b).

En presencia de la cepa bacteriana B10 viva y el autoclavado se observó una reducción de la producción de fumonisinas en grano que varió del 74% al 83.8% con respecto a los granos inoculados solo con *F. nygamai* ($p \leq 0.05$).

Sin embargo, en presencia de la cepa B18v hay una leve reducción del 17.2% y con el cultivo bacteriano autoclavado se observó una importante reducción en la producción de este metabolito tóxico (87.2%), aun mayor que la presentada por la cepa B10t, resultados que alcanzaron significancia estadística al ser comparados con el control de *F. nygamai*.

Tabla 6a. Valores de fumonisinas con los distintos tratamientos bacterianos vivos (v) y autoclavados (t)

Tratamientos	Fumonisinias ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
B10v	3 253,3*
B18v	10 386,6*
B10t	2 030*
B18t	1 635*
<i>F. nygamai</i> solo	12 543,3

Los promedios marcados con asterisco (*) son significativamente diferentes del control con *F. nygamai* solo (Test de Tukey, $p \leq 0.05$)

Tabla 6b. Desarrollo de *F. nygamai* sobre los granos de sorgo tratados con las distintas cepas bacterianas.



Control: *F. nygamai* solo; v: vivas; t: autoclavados

5.5- Bioensayos en semillas de sorgo peleteadas con los antagonistas bacterianos contra la infección por *Fusarium nygamai*

Se evaluó el efecto del adherente CMC sobre la capacidad inhibitoria de las bacterias vivas y autoclavadas sobre el grado de infección y el desarrollo foliar y radicular en plántulas de sorgo. De todas las cepas bacterianas con resultados significativos en la inhibición de la velocidad de crecimiento, se seleccionaron las B10 y B18 que mostraron un mayor efecto inhibitorio en la cepa de *F. nygamai* aislada de raíz (*FnR*). Se eligió esta cepa ya que la infección por *F. nygamai* generalmente se produce a través de la raíz de la planta.

5.5.1 Incidencia de Infección. Los primeros síntomas de infección causados por *F. nygamai* (*FnR*) tales como el marchitamiento en hojas, daños a nivel del tallo y raíz fueron observados a partir de los 7 días en los plantines inoculados

con el hongo y tratados con los antagonistas bacterianos peletizados vivos y los cultivos autoclavados. A los 14 y 21 días (Figura 10), si bien se observó una ligera disminución en la incidencia de infección con las cepas B10v y B18v, no se observó diferencias significativas en relación al control de *F. nygamai* ($p > 0.05$). En la figura 11, se observa que los metabolitos termoestables producidos por las cepas B10 y B18 a los 14 y 21 días, produjeron niveles de infección menores respecto al control ($p > 0.05$).

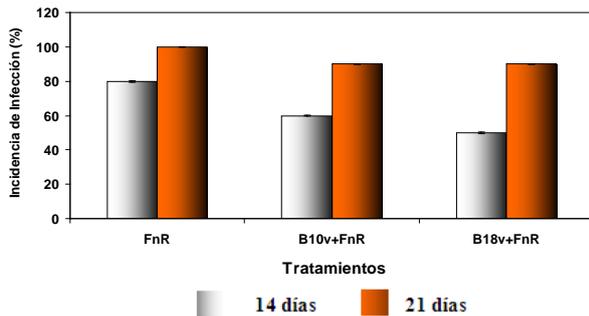


Fig. 10. Efecto de los antagonistas bacterianos vivos sobre la incidencia de infección. (v: vivos)

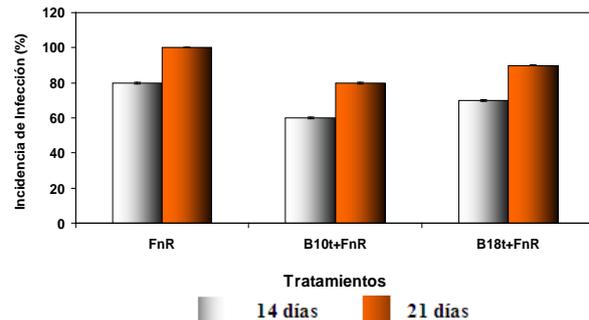


Fig. 11. Efecto de los antagonistas bacterianos autoclavados sobre la incidencia de infección. (t: autoclavados)

Cuando las inoculaciones con *F. nygamai* se efectuaron 24 horas después de aplicadas las bacterias, la incidencia de infección a los 14 días, tanto de las cepas vivas como autoclavadas, fue menor (Figura 12). Sin embargo sólo los tratamientos con los metabolitos autoclavados de las cepas B10 y B18 presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control de *F. nygamai* ($p < 0.05$).

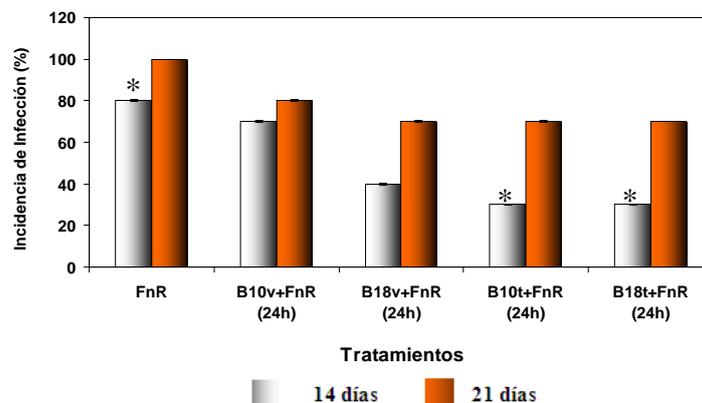


Fig. 12. Efecto de los antagonistas bacterianos vivos y los autoclavados sobre la incidencia de infección en plantines inoculados a las 24 horas con *F. nygamai*. Los porcentajes de infección marcados con asterisco (*) indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control de *FnR* (Fisher LSD, $p < 0.05$). (v: vivos, t: autoclavados)

5.5.2 Evaluación de la altura y desarrollo radicular de las plántulas de sorgo. Se evaluó el efecto de la capacidad inhibitoria de las bacterias vivas y autoclavadas sobre el grado de infección y el desarrollo foliar y radicular en plántulas de sorgo.

Se observó que a los 21 días (Figura 13), existe una disminución en la altura de las plántulas en comparación con el control de *F. nygamai* cuando se utilizaron las dos cepas bacterianas vivas ($p < 0.05$). En cuanto al desarrollo radicular no se observaron diferencias significativas con el control de *F. nygamai* (Figura 14). Los tratamientos con las bacterias autoclavadas produjeron una ligera disminución en el desarrollo foliar y radicular de las plántulas ($p > 0.05$) (Figura 15 y 16).

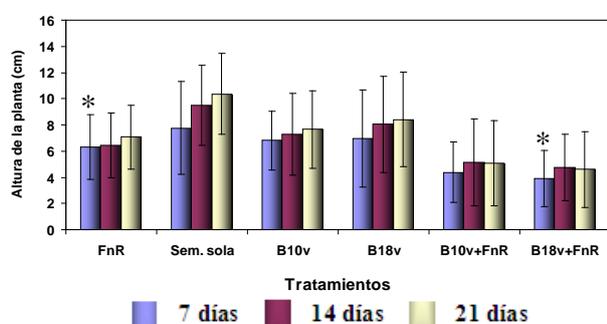


Fig. 13. Altura de las plántulas tratadas con los antagonistas bacterianos vivos. Los porcentajes de infección marcados con asterisco (*) indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control de *FnR* solo (Tukey, $p < 0.05$). (v: vivas)

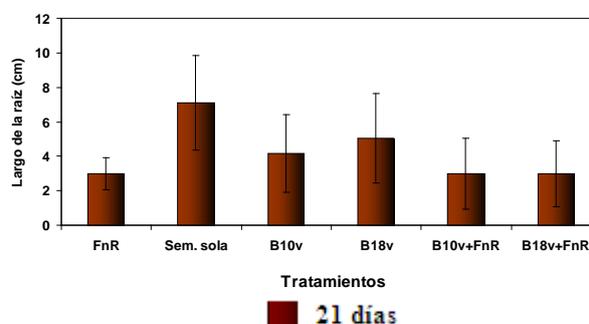


Fig. 14. Efecto del pelletizado de los antagonistas bacterianos vivos sobre el desarrollo radicular. (v: vivas)

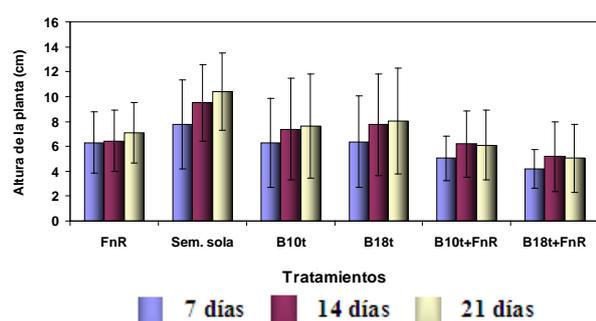


Fig. 15. Altura de las plántulas tratadas con los antagonistas bacterianos autoclavados. (t: autoclavados)

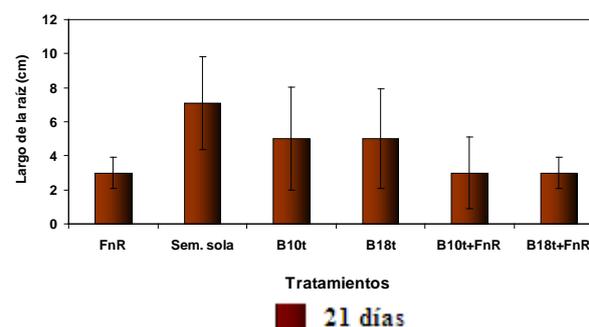


Fig. 16. Efecto del pelletizado de los antagonistas bacterianos autoclavados sobre el desarrollo radicular. (t: autoclavados)

Cuando las inoculaciones con *F. nygamai* se efectuaron 24 horas después de aplicadas las bacterias vivas y las autoclavadas, el desarrollo foliar y radicular de las plántulas fue ligeramente inferior en comparación al control de

F. nygamai ($p < 0.05$) (Figura 17 y 18).

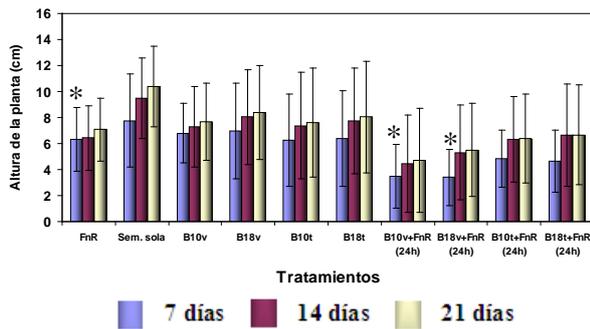


Fig. 17. Altura de las plántulas tratadas con los antagonistas bacterianos vivos y los cultivos autoclavados inoculadas a las 24 horas con *F. nygamai*. Los porcentajes de infección marcados con asterisco (*) indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control de *FnR* solo (Tukey, $p < 0.05$). (v: vivas, t: autoclavados)

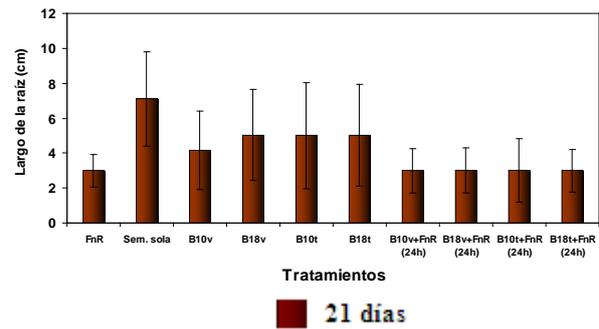


Fig. 18. Efecto del peleteado de los antagonistas bacterianos vivos y autoclavados sobre el desarrollo radicular inoculados a las 24 horas con *F. nygamai*. (v: vivas, t: autoclavados)

La figura 19a-i, muestra el aspecto de las plántulas de sorgo cuyas semillas fueron peleteadas con CMC y luego tratadas con bacterias vivas o con los autoclavados. En la mayor parte de las plántulas están muertos o con reducción en la altura respecto a los tratados solo con *F. nygamai*.



Fig. 19a. Control (*FnR*)



Fig. 19b. B10v + *FnR*



Fig. 19c. B18v + *FnR*



Fig. 19d. B10t + *FnR*



Fig. 19e. B18t + *FnR*



Fig. 19f. B10v + *FnR* (24h)



Fig. 19g. B18v + *FnR* (24h)

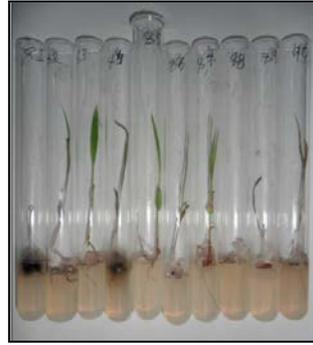


Fig. 19h. B10t + *FnR* (24h)



Fig. 19i. B18t + *FnR* (24h)

Fig. 19. Plantines de sorgo peleteados con CMC, 21 días.

5.6- Bioensayos en semillas de sorgo tratados con los caldos bacterianos vivos y autoclavados contra la infección por *F. nygamai* sin adherente (CMC)

5.6.1 Incidencia de Infección. En este caso se trabajó aplicando directamente 100 μ L del cultivo bacteriano vivo o autoclavado sobre las semillas germinadas de sorgo.

A los 14 días, los tratamientos con las cepas B10 y B18 vivas produjeron una baja infección por *F. nygamai*. Se observaron porcentajes de reducción de la infección por *F. nygamai* del 67% y 83% con B10 y B18, respectivamente. A los 21 días la reducción de la infección fue de 40% y 30% para las bacterias vivas B10 y B18 respectivamente (Figura 20). La incorporación de los cultivos bacterianos autoclavados de las cepas B10t y B18t, muestra que a los 14 días hay una reducción de la infección del 30% y 20%, respectivamente, pero sin mostrar diferencias significativas con el control ($p > 0.05$). Sin embargo, a los 21 días se observó una reducción de la infección de 40% y 30%, respectivamente, siendo estadísticamente significativa con respecto al control de *F. nygamai* (100%) ($p < 0.05$). El tratamiento con la cepa B18t es el que presenta un mayor efecto antagónico (Figura 21).

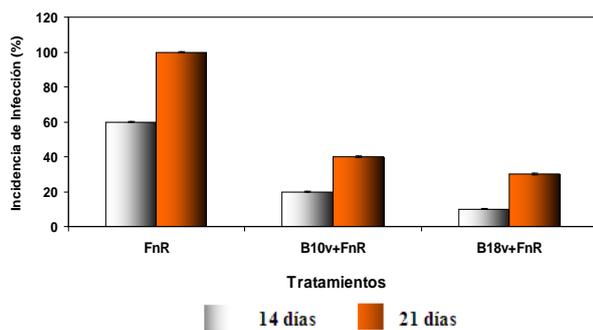


Fig. 20. Efecto de los antagonistas bacterianos vivos sobre la incidencia de infección. (v: vivas)

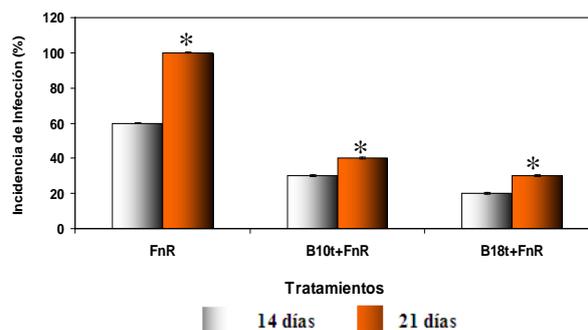


Fig. 21. Efecto de los antagonistas bacterianos autoclavados sobre la incidencia de infección. Los porcentajes de infección marcados con asterisco (*) indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control de *FnR* solo (Fisher LSD, $p < 0.05$). (t: autoclavados)

Se observó que existe una importante reducción de la incidencia a los 14 días, por las bacterias vivas y con las autoclavadas (83%, 83%, 100% y 83%) cuando se inoculó *F. nygamai* 24 horas después que las bacterias. Se demostró que en ambos casos existen diferencias estadísticamente significativas con respecto al control de *F. nygamai* ($p < 0.05$). Se observó además que el efecto inhibitor solo se mantiene diferente al control con las cepas autoclavadas (80% y 80%, $p < 0.05$) (Figura 22).

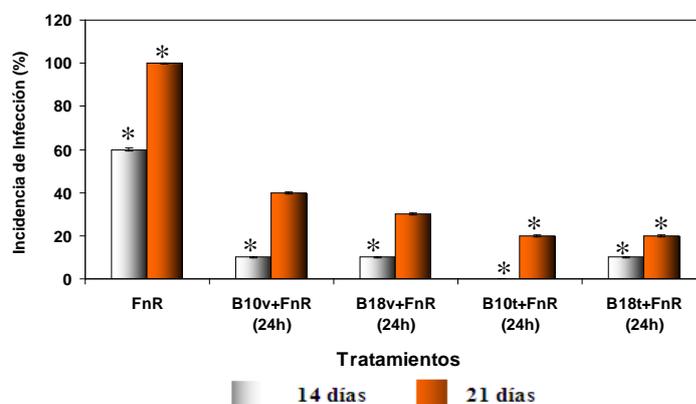


Fig. 22. Efecto de los antagonistas bacterianos vivos y con los autoclavados a las 24 horas sobre la incidencia de infección. Los porcentajes de infección marcados con asterisco (*) indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control de *FnR* solo (Fisher LSD, $p < 0.05$). (v: vivas, t: autoclavados)

5.6.2 Evaluación de la altura y desarrollo radicular de las plántulas de sorgo. Se evaluó el efecto de la capacidad inhibitoria de las bacterias vivas y autoclavadas sobre el desarrollo foliar y radicular en plantines de sorgo. A los

14 y 21 días solo se observó un incremento mayor de las plántulas respecto al control de *F. nygamai* ($p < 0.05$) (Figura 23). En cambio, sobre la longitud de la raíz de las plántulas de sorgo no se observó diferencias significativas con respecto al control de *F. nygamai* ($p > 0.05$) (Figura 24). En los tratamientos a los 7, 14 y 21 días con las bacterias autoclavadas el desarrollo foliar y radicular no presentó diferencias significativas con respecto al control ($p > 0.05$) (Figura 25 y 26).

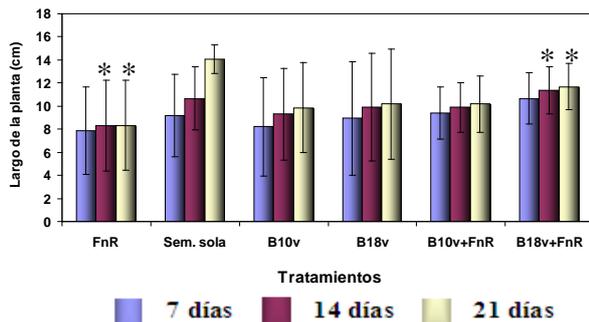


Fig. 23. Altura de las plántulas tratadas con los antagonistas bacterianos vivos. Los porcentajes de infección marcados con asterisco (*) indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control de *FnR* solo (Tukey, $p < 0.05$). (v: vivas)

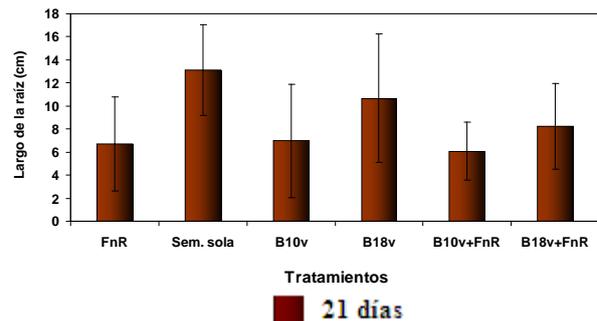


Fig. 24. Efecto de los antagonistas bacterianos vivos sobre el desarrollo radicular. (v: vivas)

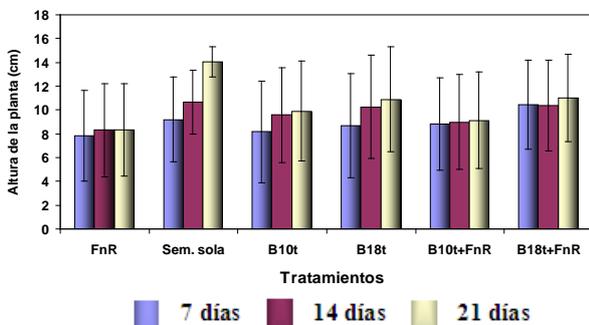


Fig. 25. Altura de las plántulas tratadas con los antagonistas bacterianos autoclavados. (t: autoclavados)

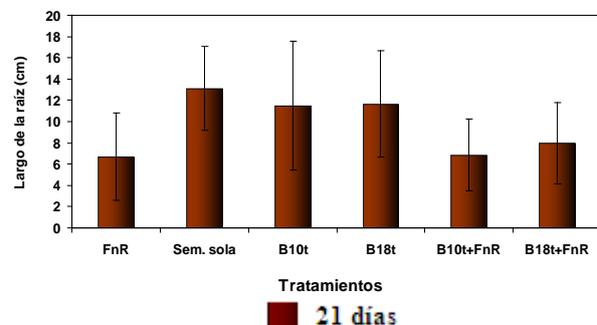


Fig. 26. Efecto de los antagonistas bacterianos autoclavados sobre el desarrollo radicular. (t: autoclavados)

En la figura 27, se puede observar que cuando se trataron las plántulas con bacterias vivas y cultivos autoclavados y se inoculó a las 24 horas con *F. nygamai*, no existió diferencias con el control a los 7, 14 y 21 días ($p > 0.05$). Sin embargo, se observó una mayor longitud radicular con la cepa B18 viva y con la autoclavada. El desarrollo radicular varió dependiendo del tratamiento no habiendo diferencias significativas con respecto al control de *F. nygamai* ($p > 0.05$) (Figura 28).

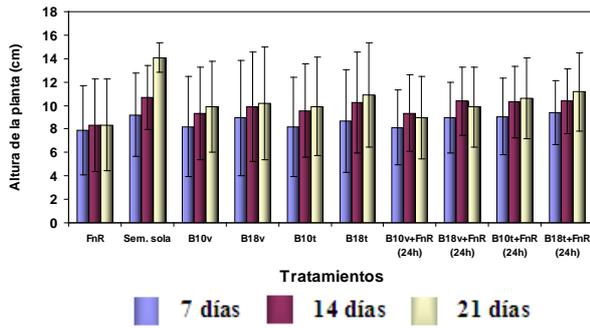


Fig. 27. Altura de las plántulas tratadas con los antagonistas bacterianos vivos y autoclavados inoculados con *F. nygamai* a las 24 horas. (v: vivas, t: autoclavados)

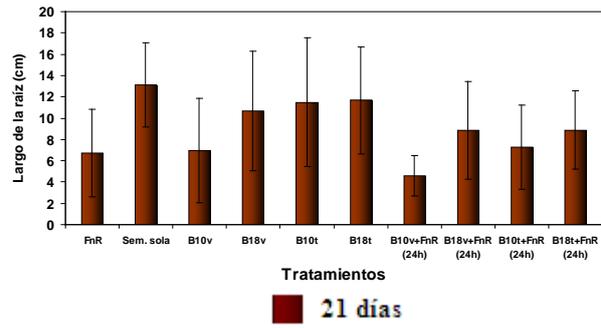


Fig. 28. Efecto del sistema radicular tratado con los antagonistas bacterianos vivos y autoclavados inoculados con *F. nygamai* a las 24 horas. (v: vivas, t: autoclavados)

Las figuras 29a-i, muestran el efecto inhibitorio sobre *F. nygamai* en las plántulas de sorgo tratadas con las bacterias vivas y con las autoclavadas aplicadas directamente, sin adherente (CMC) sobre las semillas de sorgo. Es evidente que el adherente CMC tiene efecto negativo sobre la actividad inhibitoria de las bacterias vivas y autoclavadas.



Fig. 29a. *F. nygamai* solo

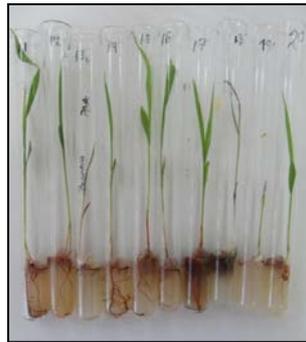


Fig. 29b. B10v+FnR



Fig. 29c. B18v+FnR



Fig. 29d. B10t+FnR



Fig. 29e. B18t+FnR

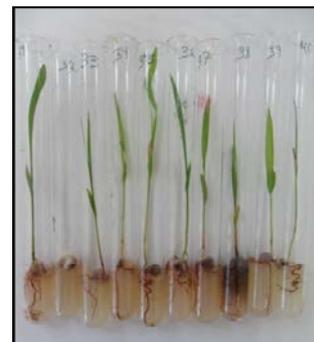


Fig. 29f. B10v+FnR (24)



Fig. 29g. B18v+FnR (24)



Fig. 29h. B10t+FnR (24)

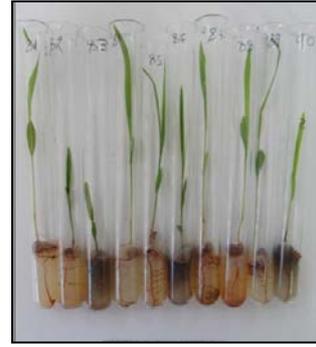


Fig. 29i. B18t+FnR (24)

Fig. 29. Plántulas de sorgo tratados con los antagonistas bacterianos vivos (v) y con los autoclavados (t) B10 y B18 a los 21 días.

6- DISCUSIÓN

6.1- Aislamiento e identificación de *Fusarium nygamai*

Los aislamientos de *Fusarium nygamai* provenientes de distintas partes de la planta de sorgo granífero corroboran la existencia de esta especie toxicogénica en el país. Nuestros resultados confirman lo descrito por otros investigadores acerca de la presencia de este hongo en sorgo (Burgess *et al.*, 1989; Klaasen & Nelson 1998). Su presencia ya fue detectada en varios países siendo el sorgo el cultivo principal (Sapumohotti, 2004).

6.2- Efecto inhibitorio de las cepas bacterianas

Debido a que se trata de un hongo toxicogénico ha surgido la necesidad de investigar nuevos agentes para su control (López *et al.*, 2004; Yassin *et al.*, 2010). A partir de los resultados obtenidos con cepas bacterianas nativas *in vitro*, se demostró que el crecimiento de *F. nygamai* puede ser controlado. Si bien no se encontraron antecedentes en la literatura sobre el antagonismo contra *F. nygamai*, estudios realizados previamente por Amézquita *et al.*, (2010) mostraron que aislamientos de bacterias de sustratos naturales redujeron el crecimiento micelial *in vitro* de *Fusarium oxysporum*.

El efecto de metabolitos secundarios liberados al medio por las bacterias fue evidente por los halos de inhibición del crecimiento de *F. nygamai*. El micelio mostró un engrosamiento de las paredes y vacuolización del citoplasma reflejando características típicas de senescencia en los hongos. Estas modificaciones en las hifas de *F. nygamai* concuerdan con los resultados de Chan *et al.*, (2003) y Basurto-Cadena *et al.*, (2010) quienes observaron los mismos cambios en las hifas de otras especies de *Fusarium* tales como *F. verticilloides*, *F. solani* y *F. oxysporum*. Es importante señalar el efecto sobre *F. verticilloides* porque pertenece a la misma sección (Liseola) que *F. nygamai* y ambos son importantes productores de fumonisinas.

6.3- Estudio del efecto inhibitorio de los cultivos bacterianos autoclavados

Algunos de los metabolitos producidos por las bacterias son termoestables, ya que al menos 13 cultivos bacterianos autoclavados inhibieron el crecimiento micelial. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Kupper *et al.*, (2003) quienes encontraron una disminución en la velocidad de crecimiento de diferentes hongos fitopatógenos con metabolitos termoestables producidos por *Bacillus subtilis*. Varios autores han demostrado que bacterias del genero *Bacillus* producen un grupo de metabolitos termoestables descritos como lipopéptidos cíclicos de la clase Iturin que son potentes agentes fungicidas debido a la interacción con las membranas fúngicas (Gueldner *et al.*, 1988). Es probable que las bacterias utilizadas en este trabajo correspondan al género *Bacillus* y que los metabolitos termoestables pertenecieran a la clase Iturin. Más aun en el año 2007 se registró en España una patente sobre la efectividad de metabolitos termoestables para uso como agentes de control biológico de hongos.

6.4- Estudio del efecto de cada antagonista en la producción de fumonisinas por *F. nygamai*

Los resultados obtenidos indican que los antagonistas bacterianos (B10 y B18) vivos y sus cultivos autoclavados podrían utilizarse como agentes de biocontrol por la habilidad de inhibir la producción de fumonisinas en granos de sorgo. Cavaglieri *et al.*, (2005) y Pereira *et al.*, (2010) encontraron resultados similares en cuanto a la reducción de la producción de fumonisinas por *F. verticillioide* debido a la producción de metabolitos secundarios producidos por cepas de *Bacillus*. Una reducción en la contaminación con fumonisinas también se encontró al utilizar *Pseudomonas fluorescens* en semillas de maíz (Nayaka *et al.*, 2009).

6.5- Bioensayos en semillas de sorgo peleteadas con los antagonistas bacterianos contra *F. nygamai*

En este estudio se muestra que las semillas peletizadas con CMC no mejoran el comportamiento de los antagonistas frente a la infección por *F. nygamai*. Si bien la adherencia parecería ser importante a los efectos de preservar los antagonistas sobre las semillas, en este caso no produjeron resultados significativamente positivos. De todas formas estos resultados constituyen un dato interesante, puesto que el CMC está descrito como un importante adherente derivado de la celulosa. Contrariamente a lo observado en este trabajo, Egamberdiyeva (2007) y Nayaka *et al.*, (2009), inocularon bacterias con CMC en cultivos de maíz provocando incrementos en el largo de la raíz, hecho que contribuiría a una mayor absorción de nutrientes del suelo. Esto hace pensar que algunos adherentes comerciales a base de celulosa pueden aumentar o disminuir la emergencia de las plántulas.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se sugiere optimizar la técnica de peletizado en semillas de sorgo con los antagonistas bacterianos.

6.6- Bioensayos en semillas de sorgo inoculados directamente con los caldos bacterianos vivos y autoclavados contra *F. nygamai* sin adherente (CMC)

Al estudiar el efecto antagónico que las cepas B10 y B18 podrían tener sobre *F. nygamai*, se pudo comprobar que la incidencia de la infección fue reducida en más del 83% con la cepa B18 viva. Otros trabajos de investigación han señalado que ciertas bacterias del género *Bacillus* inoculadas en forma simultánea promueven la reducción de la severidad de la enfermedad y la incidencia de algunas especies de *Fusarium* en más del 50% de los casos (Tschen *et al.*, 1985; Pusey, 1989; Yang, 1992).

Estos resultados fueron aún mayores cuando se utilizaron los cultivos bacterianos autoclavados e inoculados con *F. nygamai* 24 horas después, alcanzándose valores de reducción de la infección entre 83 y 100%. Resultados similares a los obtenidos en este trabajo han sido reportados previamente por Khan & Fiona, (2009) quienes demostraron que la aplicación

de agentes biocontroladores 24 horas antes de inocularse *F. culmorum* en semillas reducen los síntomas de infección. Por su parte, Baro *et al.*, (2008) informaron que con una incubación previa de 24 horas con *Trichoderma lignorum* resultaba una inhibición completa del crecimiento del patógeno *F. oxysporum* en cultivos duales en cajas de Petri.

La efectividad de las bacterias vivas y autoclavadas aplicadas sobre las semillas germinadas de sorgo presentó un importante control de los daños provocados por *F. nygamai*. Este hecho junto con la significativa reducción de la producción de fumonisinas son resultados que hacen muy promisorio el uso de estas cepas bacterianas nativas.

7- CONCLUSIONES

1. Los síntomas que presentaban las plantas de sorgo granífero que fueron estudiadas son los típicos producidos por *F. nygamai*.
2. Las cepas B10 y B18 fueron efectivas en reducir la incidencia de infección por *F. nygamai* y la producción de fumonisinas.
3. Existe la posibilidad de efectuar el biocontrol de *F. nygamai* en sorgo con antagonistas bacterianos nativos.
4. El proceso de autoclavado a 121 °C por 15 minutos, no inactiva la capacidad antagónica de los cultivos bacterianos contra *F. nygamai* ni la producción de fumonisinas.
5. Las semillas peletizadas con CMC no mejoran el comportamiento de los antagonistas frente a la infección por *F. nygamai*.

8. PERSPECTIVAS

1. Se propone realizar el ensayo en condiciones de invernadero y a campo.
2. De manera general, la evaluación de la producción de metabolitos termoestables de las cepas bacterianas (B10 y B18) brindó una idea del valor potencial que podrían tener para realizar un escalado dado que los mejores resultados se han obtenido con los autoclavados.
3. Las grandes posibilidades del uso de agentes bacterianos antagonistas en el control de enfermedades vegetales producidas por el género *Fusarium* estimulan las investigaciones al respecto.

9- BIBLIOGRAFÍA

Alabouvette C., Lemanceau P. & Steinberg C. 2006. Biological control of plant pathogens: the European situation. *European Journal of Plant Pathology*, 114: 329-341.

Albarracín N. 2010. Control de Enfermedades. Facultad de Agronomía. Manual práctico. Cátedra de Fitopatología. UCV. Caracas. Venezuela.

Algorta E. & Carcabelos J. 2007. Efecto de distintas distancias entre hileras, población e híbrido de sorgo granífero en siembra directa. Tesis Ing. Agr. Facultad de Agronomía, UdelaR, Montevideo, Uruguay.

Al-Mughrabi K. 2010. Biological control of *Fusarium* dry rot and other potato tuber diseases using *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter cloacae*. *Biological Control*, 53: 280-284.

Amézquita R., Jorge V. & Rosero V. 2010. Evaluación de Microorganismos Aislados de Gallinaza por su Potencial para el Biocontrol de *Fusarium* (*F. oxysporum*) en Plántulas de Uchuva (*Physalis peruviana*). *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín*, 63: 5499-5509.

Baker K. & Cook R. 1974. Biological control of plant pathogens. First Edition. CRC Press. Freeman, San Francisco, CA. USA.

Balmas V., Santori A. & Corazza L. 2000. Ruolo di alcune specie di *Fusarium* nel determinare sintomi di "mal del piede" del frumento duro. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2:247-252.

Baro A., Lara J. & Fernández C. 2008. Evaluación *in vitro* de la capacidad antagonista de *Trichoderma lignorum* FEEP TL0601 frente a *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*. I+D en las empresas. *Control Biológico*. <http://www.futurecobioscience.com/media/publications/0e75cfad9c3fb1a2f2a005e71dd79ea6.pdf>

Basurto-Cadena M., San Ambrosio M., García-Jiménez J., Vázquez-Arista M. 2010. Cambios en la estructura celular durante la actividad antagónica de *Bacillus subtilis* contra *Rhizoctonia solani* y *Fusarium verticillioides*. *Acta Microscópica*, 19: 138-144.

Berg G. & Hallmann J. 2006. Control of plant pathogenic fungi with bacteria endophytes. In Schulz, B; Boyle C & Sieber, T. eds. *Microbial root endophytes*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 9: 53-69.

Bezuidenhout S., Gelderblom W., Gorst-Allman C., Horak R., Marasas W., Spiteller G. & Vlegaar R. 1988. Structure elucidation of fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *Journal of Chemical Communication*, 11: 743-745.

- Bullerman L. & Bianchini A. 2007.** Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 140-146.
- Burgess L. 1981.** General ecology of the Fusaria. In *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy* Nelson P. E., Toussoun T. A. & Cook R. J eds. University Park, The Pennsylvania State University, USA, 225-235.
- Burgess L., Nelson P. & Toussoun T. 1989.** Stability of morphological characters of *Fusarium nygamai*. *Mycologia*, 81: 480-482.
- Burgess L. & Trimboli D. 1986.** Characterization and distribution of *Fusarium nygamai* sp. nov. *Mycologia*, 78: 223-229.
- CAST (Council for Agricultural Science and Technology). 2003.** Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems. Task Force Report No, 139. Council for Agricultural Science and Technology. Ames, Iowa.
- Cavaglieri L., Orlando J., Rodríguez M., Chulze S. & Etcheverry M. 2005.** Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Research in Microbiology*, 156: 748-754.
- Chan Y., McCormick W. & Seifert K. 2003.** Characterization of an antifungal soil bacterium and its antagonistic activities against *Fusarium* species. *Canadian Journal of Microbiology*, 49: 253-262.
- Dragún P., Moreno A., Picasso S., Lardizabal J., Gatti N., Telechea J. & Conti A. 2010.** Monitoreo y estudios de cadenas de valor ONCCA. Informe de Sorgo. XLI Congreso de la Asociación Argentina de Economía Agraria (AAEA), 1-18.
- Del Palacio A., Calero N. & Mionetto A. 2012.** Determinación de la microflora en cereales y oleaginosas y micotoxinas asociadas. Programa de Apoyo a la investigación estudiantil (PAIE), Expo Cierre, Montevideo, Uruguay.
- Desjardins A. 2003.** *Gibberella* from A (*venaceae*) to Z (*eeae*). *Annual Review of Phytopathology*, 41: 177-198.
- Doggett H. 1998.** Sorghum. 2nd edition. Longman Scientific and Technical, London.
- Egamberdiyeva D. 2007.** The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied Soil Ecology*, 36: 184-189.
- Foreman J., Constable P., Waggoner A., Levy M., Eppley R., Smith G., Tumbleson M. & Haschek W. 2004.** Neurologic abnormalities and cerebrospinal fluid changes in horses administered fumonisin B1 intravenously. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18: 223-230.

Fornier G., Pan D., Rivas F. & Bettucci L. 1999. Presencia de *Fusarium nygamai* en granos de maíz en Uruguay. III Congreso Latinoamericano de Micología, Caracas, Venezuela.

Frederiksen R. & Odvody. 2000. Compendium of sorghum diseases. Second Edition. APS Press, Saint Paul, Minnesota.

Gallardo-Reyes E., Ibarra-Moreno G. & Sánchez-Martínez R. 2006. Microbiota de Maíz (*Zea mays* L.) recién cosechado y producción de fumonisina B1 por cepas de *Fusarium verticillioides* (Sacc) Nirenb. Revista Mexicana de Fitopatología, 24: 27-34.

García D., Ramos A., Sanchis V. & Marín S. 2009. Predicting mycotoxins in foods: A review. Food Microbiology, 26: 757-769.

García-Aguirre G. & Martínez-Flores R. 2010. Especies de *Fusarium* en granos de maíz recién cosechado y desgranado en el campo en la región de Ciudad Serdán, Puebla. Revista Mexicana de Biodiversidad, 81: 15-20.

Giannitti F., Sain Diab S., Pacin A., Barrandeguy M., Larrere C., Ortega J. & Alejandro U. 2011. Equine leukoencephalomalacia (ELEM) due to fumonisins B1 and B2 in Argentina. Pesquisa Veterinária Brasileira, 31: 407-412.

Gueldner R., Reilly C., Pusey P., Costello C., Arrendale R., Cox R., Himmelsbach D., Crumly G., & Cutler H. 1988. Isolation and identification of iturins as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with *Bacillus subtilis*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 36: 366-370.

Hascheck W., Gumprecht L., Smith G., Tumbleson M. & Constable P. 2001. Fumonisin Toxicosis in Swine: An Overview of Porcine Pulmonary Edema and Current Perspectives. In: Environmental Health Perspectives, 109: 251-257.

IARC (International Agency for Research on Cancer). 2002. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 82: 1-590.

Irigoyen A. & Perrachon J. 2007. Sorgo granífero. Revista del Plan Agropecuario.
http://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R123/R123_52.pdf

Khan R. & Fiona M. 2009. Bacterium-mediated control of *Fusarium* head blight disease of wheat and barley and associated mycotoxin contamination of grain. Biological Control, 48: 42-47.

Kinsella K., Schulthess C., Morris T. & Stuart J. 2009. Rapid quantification of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere. Soil Biology & Biochemistry, 41: 374-379.

Klaasen J. & Nelson, P. 1998. Fumonisin production by field strains of *Fusarium nygamai* (*Gibberella nygamai*) and ascospore progeny of laboratory crosses. *Journal World of Microbiology and Biotechnology*, 14: 873-877.

Kurmut A., Nirenberg H., Bochow H. & Buttner C. 2002. *Fusarium nygamai*. A causal agent of root rot of *Vicia faba* L. in the Sudan. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet*, 67: 269-274.

Kupper K., Nelson G. & de Goes A. 2003. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. *Fitopatologia Brasileira*, 28: 251-257.

Leslie J. & Summerell B. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell publishing.

Llorens A., Hinojo M., Mateo R., González-Jaén M., Valle-Algarra F., Logrieco A. & Jiménez M. 2006. Characterization of *Fusarium* spp. isolates by PCR-RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rRNA gene (rDNA). *International Journal of Food Microbiology*, 106: 297-306.

López A., Theumer M., Zygodlo J. & Rubinstein H. 2004. Aromatic plants essential oils activity on *Fusarium verticillioides* Fumonisin B1 production in corn grain. *Mycopathology*, 158: 343-349.

Magnoli C., Saenz M., Chiacchiera S. & Dalcero M. 1999. Natural occurrence *Fusarium* species and fumonisin-production by toxigenic strains isolated from poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia*, 145: 35-41.

Marasas W. , Kriek N., Wiggins V., Steyn P., Towers D. & Hastie T. 1979. Incidence, geographic distribution, and toxigenicity of *Fusarium* species in South African corn. *Phytopathology*, 69: 1181-1185.

Mari S. 2003. Sorgo: Planificando la siembra. *Agar-Cross Uruguay* S. A. revista del Plan Agropecuario, 56-59.

Methol M. 2011. Maíz y sorgo: situación y perspectivas. Anuario (Dirección de Estadísticas Agropecuarias, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). <http://www.mgap.gub.uy/opypa/ANUARIOS/Anuario06/docs/12%20-%20MAIZ%20Y%20SORGO%20METHOL.pdf>

Mirocha C., Chen J., Xie W., Xu Y., Abbas H. & Hogge L. 1996. Biosynthesis of fumonisin and aal derivatives by *Alternaria* and *Fusarium* in laboratory culture. *Advances in Experimental Medicine and Biology* , 392: 213-224.

Nayaka C., Shankar U., Reddy S., Niranjana R., Prakash S., Shetty S. & Mortensenc C. 2009. Control of *Fusarium verticillioides*, cause of ear rot of maize, by *Pseudomonas fluorescens*. *Pest Management Science*, 65: 769-775.

Nelson P., Tousoun, T. & Marasas, W. (eds). 1983. *Fusarium* species. The Pennsylvania State University Press, University Park and London.

Nirenberg I. & O'Donnell K.. 1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujukuroi* species complex. *Mycologia*, 90: 434-458.

Pacin A., Ciancio E., González H., Whitechurch E., Martínez E. & Resnik S. 2009. Fungal and fumonisins contamination in Argentine Maize (*Zea mays* L.) Silo Bags. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 2778-2781.

Pan D., Graneri J. & Bettucci L. 2009. Correlation of rainfall and levels of deoxynivalenol in wheat from Uruguay, 1997-2003. *Food Additives and Contaminants*, 2: 162-165.

Patente ES Nº 2268774T3. 2007. Nueva cepa de *Bacillus* destinada a luchar contra las enfermedades de las plantas y del gusano de las raíces del maíz. http://www.espatentes.com/pdf/2268774_t3.pdf

Pérez A., Saucedo O., Iglesias J., Wencomo H., Reyes F., Oquendo G. & Milián I. 2010. Characterization and potential of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) grain. *Pastos y Forrajes*, 33: 1-26.

Pereira P., Nesci A., Castillo C. & Etcheverry M. 2010. Impact of bacterial biological control agents on fumonisin B1 content and *Fusarium verticillioides* infection of field-grown maize. *Biological Control*, 53: 258-266.

Perrou A. 2002. Ecofisiología de especies de *Fusarium* productoras de fumonisinas, zearalenona y deoxinivalenol en maíz: aceites esenciales como inhibidores fúngicos. Tesis Doctoral. Escola técnica superior d' Enginyeria Agrària. Lleida. España, 1-151.

Pitt J. 1996. What are mycotoxins? *Australian Mycotoxin Newsletter*, 7: 1-2.

Pitt J. 2000. Toxigenic fungi: which are important? *Revista Medical Mycology*, 38: 17-22.

Pusey P. 1989. Use of *Bacillus subtilis* and related organism as biofungicides. *Pesticides Science*, 27: 133-140.

Reglamento (CE) Nº 576/2006, 2006. Comisión Europea.

Reglamento (CE) Nº 1126/2007, 2007. Comisión Europea.

Sapumohotti W. 2004. Existence of *Fusarium nygamai* in the southern region of Sri Lanka and key for their characterization. *Tropical Agricultural Research and Extension*, 7: 150-153.

Schvarzer, J. & Tavošnanska, A. 2007. Biocombustibles: Expansión de una Industria Naciente y Posibilidades para Argentina, CESP, FCE-UBA, Argentina, 1-65.

Shoda M. 2000. Bacterial Control of Plant Diseases. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89: 515-521.

Silo-suh L., Lethbridge B., Raffel S., He H., Clardy J. & Handesman J. 1994. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Applied. Environmental Microbiology*, 60: 2023-2030.

Soriano J. & Dragacci S. 2007. Fumonisin. En *Micotoxinas en alimentos*, Soriano, J. M. & Díaz de Santos eds., Madrid, España, 223.

Summerell B., Leslie J., Backhouse D., Bryden W. & Buergués L. 2001. *Fusarium*: Paul E. Nelson. Memorial symposium: American Phytopathological Society Press. St, Paul, Minnesota, USA.

Tschen J. & Kuo W. 1985. Antibiotic inhibition and control of *Rhizoctonia solani* by *Bacillus subtilis*. *Plant Protection Bulletin*, 27: 95-99.

Yang Z. 1992. Screening of *Bacillus subtilis* strain PR55 and test of its antifungal activities to *Rhizoctonia solani*. *For Abst*, 53: 3409.

Yassin M., El-Samawaty A., Bahkali A., Moslem M., Abd-Elsalam K. & Hyde K. 2010. Mycotoxin-producing fungi occurring in sorghum grains from Saudi Arabia. *Fungal Diversity*, 44: 45-52.