

Especies de *Fusarium* presentes en granos de sorgo

María Oliver Mazzuchi

Tutora: Dra. Dinorah Pan
Laboratorio de Micología

Licenciatura en Bioquímica
Facultad de Ciencias
Universidad de la República

Montevideo, Uruguay
2023

Índice

Resumen	3
1. Introducción	4
1.1 Sorgo	4
1.2 Género <i>Fusarium</i>	5
1.3 Micotoxinas	8
1.4 Micotoxinas de <i>Fusarium</i>	9
1.5 Hipótesis	12
1.6 Objetivos	12
1.6.1 Objetivo general	12
1.6.2 Objetivos específicos	12
2. Materiales y métodos	13
2.1 Muestreo	13
2.2 Aislamiento de especies de <i>Fusarium</i>	14
2.3 Cultivos monospóricos	14
2.4 Identificación	15
2.4.1 Morfológica	15
2.4.2 Molecular	15
2.5 Micotoxinas	16
2.6 Precipitaciones	16
2.7 Análisis de datos	17
3. Resultados	18
3.1 Presencia de <i>Fusarium</i> en sorgo	18
3.2 Micotoxinas presentes en sorgo	22
3.3 Efecto de las precipitaciones en el grado de infección por <i>Fusarium</i> spp. y los niveles de micotoxinas	25
3.4 Discusión	25
3.5 Conclusiones	28
3.6 Perspectivas futuras	29
4. Bibliografía	30

Resumen

El sorgo es un cereal ampliamente utilizado tanto a nivel mundial como en nuestro país, donde se usa principalmente para alimentación animal y generación de bioetanol. Si bien es un cultivo que se caracteriza por su robustez, se ve expuesto a la colonización por una gran variedad de hongos, que pueden aparecer en el campo, en el almacenamiento o en el procesamiento posterior. Dentro de estos hongos, el género *Fusarium* es uno de los principales contaminantes fúngicos del sorgo en el campo. Esto puede traer problemas tales como la pérdida de valor nutritivo de los granos o la contaminación con micotoxinas producidas por algunas especies de *Fusarium*, generando perjuicios sanitarios como daños a la salud humana y animal, y económicos, afectando la cantidad y la calidad industrial de las cosechas.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la presencia de especies de hongos toxicogénicos del género *Fusarium* en granos de sorgo de Uruguay. Para eso se analizaron muestras de granos de sorgo de dos años consecutivos de los departamentos del litoral oeste del país. De cada muestra se aislaron e identificaron las especies de *Fusarium* presentes y se determinaron los niveles de las micotoxinas deoxinivalenol (DON), zearalenona (ZEA), nivalenol (NIV) y fumonisinas B1 y B2 (FB1 y FB2).

Se analizaron un total de 108 muestras y la prevalencia de *Fusarium* fue del 99,7%. Se analizaron micotoxinas en 61 muestras, de las cuales 52 presentaron contaminación con DON (hasta 5600 µg/kg) y se detectó ZEA en 57 (hasta 8600 µg/kg). Ninguna muestra presentó contaminación por NIV y 5 mostraron contaminación por FBs. Se encontraron diferencias significativas tanto en la infección por *F. graminearum* como en los niveles de DON, entre los dos años de estudio, siendo mayores los niveles en 2016 que en 2017. La precipitación acumulada en las zonas de los cultivos fue sustancialmente diferente entre los años estudiados, siendo 2016 año de inundaciones.

1. Introducción

1.1 Sorgo

Los sorgos (*Sorghum* spp.) son un género botánico de unas 20 especies de gramíneas oriundas de las regiones tropicales y subtropicales de África oriental (Carrión Sbardelotto, 2013) (Figura 1). Su domesticación se remonta probablemente antes del 3000 a.C. Se cree que la semilla de sorgo ingresó a América con la llegada de los esclavos africanos a Estados Unidos, país que es ahora el mayor productor en el mundo (Acheampong et al., 1984).



Figura 1. Cultivo de sorgo. Fotos tomadas de la galería de imágenes de Alcoholes del Uruguay (ALUR).

Las especies de sorgo cultivadas son diversas, muchas de ellas con varios subgrupos, lo que refleja la presión de selección aplicada a lo largo de miles de años de adaptación a distintas condiciones de producción (ICRISAT, 2021).

El grano de sorgo es un grano robusto, que puede crecer en un amplio rango de temperaturas y alturas, se adapta a diferentes tipos de suelos (desde porosos y arenosos a muy arcillosos) y a variados rangos de acidez, además de tener una alta resistencia a sequías (ICRISAT, 2021; Olij Passanante, 2014). Es una buena fuente de proteína y fibra, y tiene altos niveles de hierro y zinc, por lo que ha llegado a ser el principal elemento en la

dieta de más de 500 millones de personas y su cultivo ocupa 40 millones de hectáreas en 105 países (ICRISAT, 2021; USDA, 2019).

A nivel mundial, el grano se usa principalmente como alimento humano en Asia y África, y como pienso para ganado en América. El sorgo también se usa para una variedad de fines industriales que incluyen la producción de jarabes, almidón para la fermentación y la producción de biocombustible. Los tallos de la planta son usados en algunas poblaciones rurales como material de construcción y como combustible para cocinar (ICRISAT, 2021).

Actualmente existe en el mercado una gran diversidad de híbridos comerciales de sorgo que se utilizan con objetivos productivos diferentes. Dentro de la alimentación ganadera, la elección de sorgos y la forma de utilización de los mismos (en pie verde, diferido, ensilado o grano) depende del tipo de sistemas de producción al que se esté apuntando (cría, recría, engorde) (Carrasco et al., 2011). Entre los distintos tipos se distinguen sorgo granífero, silero y forrajero, que varían en su calidad nutricional, tipo de panoja, producción de forraje, calidad de rebrote, composición de taninos y largo de ciclo.

En Uruguay, el sorgo es un cultivo que deja un alto volumen de rastrojo y es de lenta descomposición, logrando incorporar materia orgánica al suelo (Irigoyen & Perrachon, 2007). El silo de grano húmedo juega un rol protagónico como reserva forrajera, por ser una alternativa tecnológica simple, de bajo costo y bajo riesgo de inversión. Varios productores utilizan el sorgo como suplementación invernal del ganado, algunos incluso lo guardan de un año a otro para usarlo en destete precoz, complementándolo con algún núcleo proteico (Barbat Rodríguez, 2019). En el año 2015, el sorgo granífero comenzó a ser utilizado por la empresa uruguaya Alcoholes del Uruguay (ALUR), para la producción de bioetanol. Además de etanol anhidro, se genera como subproducto el alimento animal “granos secos de destilería con solubles” (DDGS, su sigla en inglés), que presenta un alto valor energético y elevado contenido de proteínas, fósforo y fibra digestible. El 100% del DDGS se comercializa como alimento animal, tanto para ganado cárnico como para ganado lechero (ANII, 2016).

1.2 Género *Fusarium*

Así como otros cereales, los granos de sorgo están expuestos a la colonización fúngica desde su formación en la planta hasta su utilización o consumo final, lo que genera pérdida de masa, densidad, nivel nutricional y viabilidad (Balota, 2012). Uno de los principales

géneros fúngicos presentes en el campo es *Fusarium*. Es un género ubicuo y extremadamente versátil, usualmente saprófito del suelo, asociado a materia orgánica en descomposición e insectos (Burgess et al., 1994).

Fusarium es un género fúngico perteneciente al *phylum* Ascomycota. Por este motivo muchas especies forman como resultado de su reproducción sexual, ascos conteniendo ascosporas (esporas sexuales) dentro de peritecios. *Fusarium* puede producir además, dos tipos de esporas asexuales; microconidios y macroconidios, estos últimos reconocidos por presentar un mayor tamaño y forma curvada. Presenta también esporas de resistencia llamadas clamidosporas (Leslie & Summerell, 2006).

Los principales caracteres micromorfológicos utilizados para su identificación son la forma de los macroconidios, tipo de células conidiógenas (monofiálides o polifiálides), organización en la formación de los microconidios (cadenas o cabezuelas), y presencia o ausencia de clamidosporas. Otras características que también se observan son el aspecto de la colonia, los pigmentos producidos y la tasa de crecimiento, en medio papa dextrosa agar (PDA) (Figura 2) (Burgess et al., 1994; Leslie & Summerell, 2013).

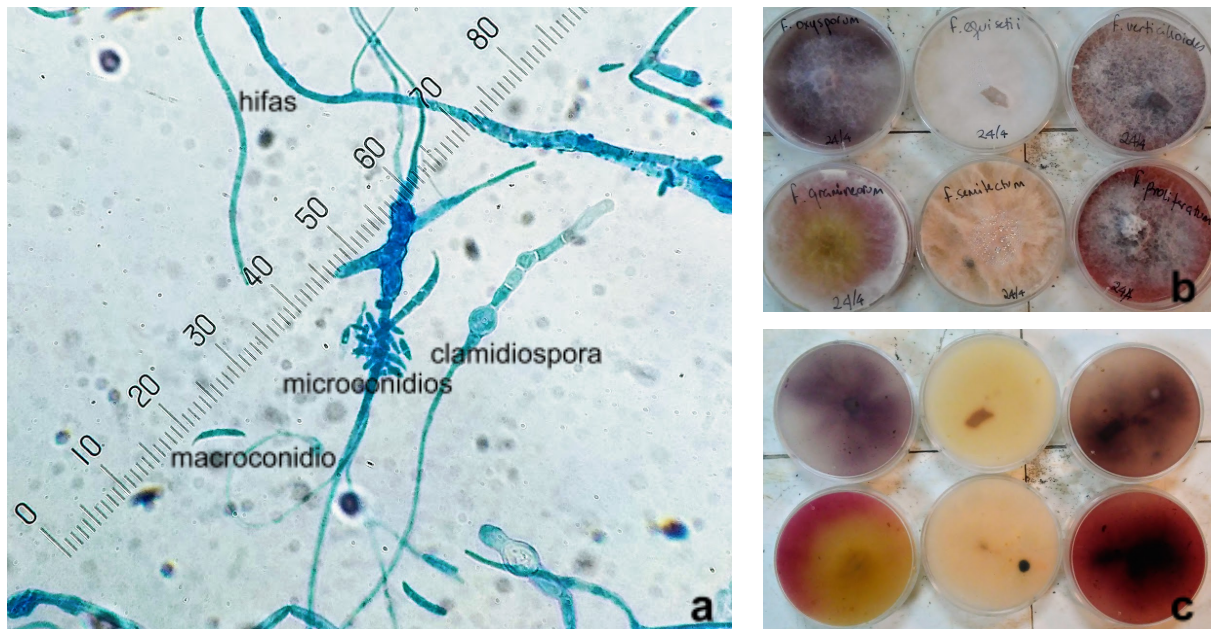


Figura 2. a. Vista al microscopio de *Fusarium* sp. Se observan hifas, macroconidios, microconidios y clamidosporas. **b y c.** Colonias de distintas especies de *Fusarium* en medio PDA: *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. verticillioides*, *F. graminearum*, *F. semitectum* y *F. proliferatum*.

Muchas especies de *Fusarium* son importantes especies fitopatógenas que generan importantes pérdidas en los cultivos y un gran impacto económico a nivel mundial (Leslie & Summerell, 2013; Ma et al., 2013).

Fusarium spp. utilizan múltiples rutas de entrada a la planta colonizando distintos tejidos y causando diversas enfermedades (marchitamientos vasculares, pudriciones del tallo, raíz y semilla, canchros y enfermedades en las hojas) (Figura 3) (Leslie & Summerell, 2013). Durante su fase saprofítica, el hongo se desarrolla sobre tejidos muertos, y se liberan esporas (asexuales y sexuales). Las esporas sexuales de *Fusarium graminearum* pueden persistir en el suelo sobre los rastrojos por un período de aproximadamente 2 años (Díaz de Ackerman & Pereyra, 2010). Así *Fusarium* spp. pueden infectar la plántula, penetrando por la raíz, desde la germinación de la semilla. Además, las esporas o parte del micelio pueden ser transportados por el viento, la lluvia e insectos a las partes aéreas de la planta, donde el hongo penetra a través de la flor, estomas o tejido vegetal dañado (Mills, 1989).

El grado de la infección está determinado por el tamaño del inóculo, las condiciones climáticas, daños mecánicos, resistencia y estado nutricional de la planta, daño por otros hongos e infección por invertebrados (Mills, 1989). La temperatura, humedad relativa y precipitaciones son factores climáticos que afectan la presencia y el desarrollo de las especies de *Fusarium* (Díaz de Ackerman & Pereyra, 2010).



Figura 3. Lesiones en tallo y hojas ocasionadas por *Fusarium* en una planta de sorgo.

En Uruguay, los primeros registros de enfermedad por *Fusarium* datan del año 1928, donde se menciona su aparición como agente causal de espigas blancas en cultivos de trigo. Desde ese entonces se han registrado pérdidas causadas por infecciones de *Fusarium*, principalmente por *F. graminearum* en los cultivos de trigo y cebada, llegando a comprometer la comercialización del trigo en las zafra 2001/2002 y 2002/2003 debido a una gran epidemia (Díaz de Ackerman & Pereyra, 2010). La infección por esta especie fúngica fue asociada a condiciones ambientales de abundantes precipitaciones y altas temperaturas durante la fase de floración del cultivo (Souto, 2003). En los últimos años el problema se ha trasladado a los cultivos de verano como maíz, soja y sorgo, sin embargo en estos cultivos poco se conoce sobre la presencia de especies de *Fusarium* en nuestro país (Barrios Burzaco et al., 2014; Gelezoglo et al., 2019).

1.3 Micotoxinas

Los hongos producen naturalmente una variedad de metabolitos secundarios, llamados así porque no son compuestos esenciales para su crecimiento o reproducción. Algunos de estos metabolitos son altamente tóxicos para humanos y animales (producen efectos a muy bajas concentraciones), por lo que son referidos como micotoxinas (Nishiuchi, 2013).

La contaminación de los cereales por especies fúngicas toxicogénicas frecuentemente implica la contaminación con micotoxinas de los granos y sus derivados, ya que son compuestos estables que prevalecen luego de la muerte del hongo y no se destruyen durante la mayor parte de las operaciones de procesamiento de los alimentos. Incluso pueden llegar a concentrarse en los subproductos obtenidos de la elaboración de alcohol, como los DDGS, luego de la fermentación. Debido a la cría de animales a base de dichos alimentos, también pueden encontrarse micotoxinas en leche, huevos, carne y derivados (Cabella & Eguren, 2012; Martínez-Larrañaga & Anadón, 2012).

El consumo de micotoxinas puede causar serios problemas de salud en humanos, especialmente niños e inmunodeprimidos, y animales. Dado el amplio rango de estructuras químicas de las micotoxinas, sus efectos bioquímicos a nivel celular son variados: interacciones con membranas celulares, interferencia con el metabolismo energético, interacciones con el ADN o proteínas, inhibición de la replicación del ADN, inhibición de la transcripción, interacción con receptores hormonales, etc. Los síntomas, entonces, pueden ser muy diferentes y afectar distintos órganos o sistemas. Las intoxicaciones pueden ser

agudas o crónicas, siendo muchas de las micotoxinas carcinógenas (Martínez-Larrañaga & Anadón, 2012; Ruiz & Font, 2007).

La producción de micotoxinas está condicionada tanto por el sustrato y ambiente en el que se desarrolla el hongo productor como por su genotipo, lo que implica que los metabolitos secundarios puedan ser específicos no solo de especies sino también de cepas. Además, una misma cepa puede tener la capacidad de producir varias micotoxinas. Los principales factores ambientales que afectan la producción de toxinas son la temperatura y la actividad hídrica. Las condiciones para la producción de micotoxinas suelen ser más restringidas que las que permiten el crecimiento del hongo (Basilico, 1995).

1.4 Micotoxinas de *Fusarium*

Entre las principales micotoxinas producidas por *Fusarium* se encuentran los tricotecenos, la zearalenona (ZEA) y las fumonisinas (FBs) (Cabañes Saenz et al., 2007).

Los tricotecenos son moléculas pequeñas y anfipáticas por lo que pueden atravesar las membranas celulares. Se destacan el deoxinivalenol (DON), sus derivados acetilados (3-acetildeoxinivalenol y 15-acetildeoxinivalenol), Toxina T2 y nivalenol (NIV). Son producidos principalmente por *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*, entre otros, y causan gran variedad de efectos tóxicos a nivel gastrointestinal produciendo vómitos o rechazo al alimento, así como lesiones hemorrágicas y problemas inmunológicos (Cabañes Saenz et al., 2007; McCormick et al., 2011).

Zearalenona es una micotoxina estrogénica que es producida también por *F. graminearum* y *F. culmorum*, y en menor medida por especies del complejo *Fusarium equiseti-incarnatum* (Hestbjerg et al., 2002; Kuiper-Goodman et al., 1987). Actúa como disruptor endócrino en machos y hembras de diferentes especies ocasionando síntomas como feminización, atrofia testicular, disminución de la espermatogénesis, prolapso cérvico-vaginal y abortos (Hueza et al., 2014). Los metabolitos derivados de la zearalenona pueden estar presentes en la carne de animales que se alimentan de granos contaminados (Cabella & Eguren, 2012).

Las fumonisinas B1 (FB1) y B2 (FB2), son producidas principalmente por especies del complejo *Fusarium fujikuroi* siendo las principales especies productoras *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. fujikuroi*. Causan diversos efectos tóxicos en animales siendo los caballos y cerdos las especies más susceptibles. Los caballos intoxicados pueden

desarrollar una enfermedad fatal llamada leucoencefalomalacia equina, mientras que en los cerdos se producen edemas pulmonares entre otros efectos. En humanos, el consumo de alimentos contaminados con fumonisinas está asociado a tasas más altas de cáncer esofágico y nacimientos con defectos en el tubo neural (Schmale III & Munkvold, 2009). Por este motivo, las fumonisinas FB1 y FB2 están clasificadas por la *International Agency for Research on Cancer* (IARC) como posibles carcinógenos humanos (grado 2B) (IARC, 1993, 2002).

Existen reglamentaciones que establecen valores máximos permitidos de diferentes micotoxinas en distintos alimentos, sobre todo para la alimentación humana y para las micotoxinas más estudiadas. Una buena recopilación sobre reglamentos a nivel mundial sobre las micotoxinas en los alimentos y en las raciones puede verse en FAO, Nutrition Division, 2004.

En Uruguay existe el Reglamento Bromatológico Nacional (RBN) que establece un nivel máximo de ZEA de 200 µg/kg para maíz y cebada para consumo humano (Decreto N° 315/994, 1994), y una recomendación del Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca (MGAP) de un nivel máximo de 250 µg/kg en granos (comunicación personal). Existen también niveles máximos permitidos para DON en subproductos de trigo para consumo humano (1000 µg/kg) (MSP, 2001), y límites máximos de DON en productos y materias primas destinadas a la alimentación animal (MGAP, 2001). La Tabla 1 muestra estos valores, así como los permitidos en otros países del mundo para alimentos destinados a animales, para algunas micotoxinas producidas por *Fusarium*.

Tabla 1. Contenidos máximos permitidos y recomendados de DON, ZEA y fumonisinas según MGAP en Uruguay, Unión Europea (UE) y *Food and Drug Administration* (FDA), EEUU.

Producto	Contenido máximo permitido
Normativa MGAP Uruguay	
DON (µg/kg)	
Alimentos para bovinos de carne, ovinos y aves	5000
Alimentos para bovinos lecheros	2000
Alimentos para equinos y porcinos	1000
Alimentos para otros animales	2000
Materias primas (granos y subproductos) destinadas a la elaboración de alimentos para animales	10000
Recomendación MGAP Uruguay	
ZEA (µg/kg)	
Granos	250
Recomendación Comisión UE	
DON (µg/kg)	
Materias primas para piensos: cereales y producto a base de cereales con excepción de subproductos del maíz	8000
Piensos complementarios y complementos para terneros menores de 4 meses, corderos y cabritos	2000
Piensos complementarios y complementos para cerdos	900
Piensos complementarios y complementos para el resto de los animales	5000
ZEA (µg/kg)	
Materias primas para piensos: cereales y producto a base de cereales con excepción de subproductos del maíz	2000
Piensos complementarios y complementos para lechones y cerdas nulíparas	100
Piensos complementarios y complementos para cerdas y cerdos de engorde	250
Piensos complementarios y complementos para terneros, ganado lechero, ovejas y cabras	500
FB1 + FB2 (µg/kg)	
Piensos complementarios y complementos para cerdos y caballos	5000
Piensos complementarios y complementos para aves de corral, terneros, corderos y cabritos	20000
Piensos complementarios y complementos para rumiantes	50000
Recomendación FDA EEUU	
DON (µg/kg)	
Para rumiantes de carne de más de 4 meses de edad	10000 en granos y subproductos y 30000 en granos de destilería, con recomendación de que la ración total no supere los 10000
Para ganado lechero de más de 4 meses de edad	10000 en granos y subproductos y 30000 en granos de destilería, con recomendación de que la ración total no supere los 5000
Granos y subproductos de granos para pollos	10000 (no más del 50% de la dieta)
Granos y subproductos de granos para porcinos	5000 (no más del 20% de la dieta)
Granos y subproductos de granos para todos los otros animales	5000 (no más del 40% de la dieta)

Fuentes: Resolución del MGAP, en vigencia desde 2001 (MGAP, 2001); (Diario Oficial de la Unión Europea, 2006); Documento Guía de la *Food and Drug Administration* (FDA) (Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2010).

1.5 Hipótesis

Los cultivos de sorgo de nuestro país presentan infección por especies de *Fusarium* y contaminación con micotoxinas que afectan su rendimiento e inocuidad.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo general

Identificar las especies de *Fusarium* y micotoxinas presentes en granos de sorgo de diferentes zonas del país.

1.6.2 Objetivos específicos

- Aislar e identificar las distintas especies de *Fusarium* presentes en granos de sorgo provenientes de diferentes zonas del país.
- Determinar los niveles de micotoxinas presentes en las muestras de sorgo.
- Evaluar el efecto de las condiciones climáticas (precipitaciones) en el grado de infección por *Fusarium* spp. y los niveles de micotoxinas.

2. Materiales y métodos

2.1 Muestreo

Muestras de granos de sorgo provenientes de diferentes departamentos del litoral oeste del país correspondientes a las cosechas 2016 y 2017 fueron proporcionadas por ALUR (Figura 4). Cada muestra consistió en 0,5 kg de granos de sorgo. Se analizaron 108 muestras en total, 56 correspondientes a la cosecha 2016 y 52 correspondientes a la cosecha 2017, pertenecientes a los departamentos de Paysandú, Río Negro, Soriano, Colonia, Flores y San José.

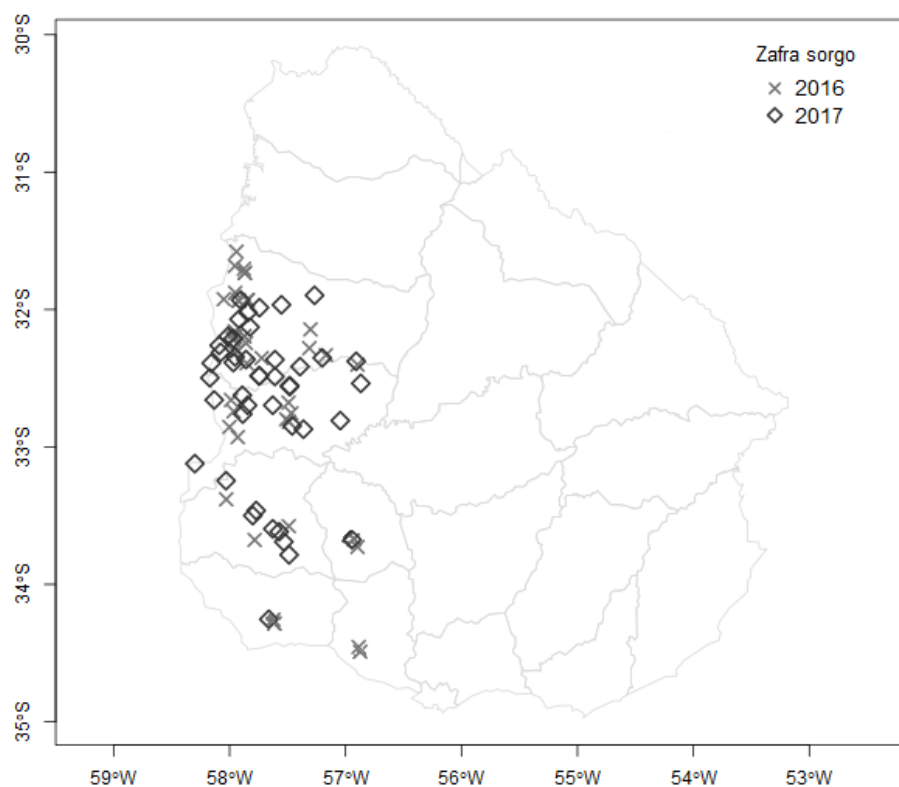


Figura 4. Distribución geográfica de las muestras de sorgo analizadas durante las cosechas 2016 y 2017.

2.2 Aislamiento de especies de *Fusarium*

Se tomaron al azar 100 granos de cada muestra, se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 0,4% durante dos minutos y se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril. Los granos se secaron con papel absorbente estéril y fueron sembrados en placas de Petri (10 granos por placa) conteniendo medio de cultivo PDA (papas 250 g, dextrosa 20 g, agar 20 g, 1000 mL agua destilada). Se incubaron a 25 °C durante 5 días bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 horas cada uno. Las colonias de hongos emergentes pertenecientes al género *Fusarium* fueron contadas y aisladas en placas de Petri conteniendo PDA y agar de hoja de clavel (CLA, por sus siglas en inglés: agar 20 g, 1000 mL agua destilada, 3 hojas de clavel esterilizadas). Luego fueron incubadas nuevamente a 25 °C durante 7 días bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, para su posterior identificación.

2.3 Cultivos monospóricos

Para obtener cultivos monospóricos de las especies aisladas se suspendieron las esporas del cultivo en un tubo conteniendo 10 mL de agua destilada estéril. Esta suspensión se homogeneizó y transfirió a cajas de Petri conteniendo medio Agar-Agua al 2%, donde se diseminaron por rotación, se dejó reposar un minuto para la adhesión de los conidios y se descartó el líquido sobrante. Las placas fueron incubadas en cámara oscura, a 25 °C durante 24 horas para permitir la germinación de las esporas. Luego, bajo lupa estereoscópica y con ayuda de una aguja histológica estéril, las esporas germinadas fueron transferidas individualmente a cajas de Petri conteniendo medio de cultivo PDA, e incubadas a 25 °C durante 7 días bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 horas cada uno. Los cultivos monospóricos de las distintas especies de *Fusarium* aisladas fueron conservados en glicerol al 10% a -80 °C e incorporados a la Colección de la Sección Micología de la Facultad de Ciencias-Facultad de Ingeniería.

2.4 Identificación

2.4.1 Morfológica

A partir de los cultivos monospóricos se llevó a cabo la identificación a nivel de complejo de especie en base a las características macro y micro morfológicas según Leslie & Summerell, 2006; Nelson et al., 1983.

2.4.2 Molecular

Se realizó además la identificación molecular de cada especie. Para ello, los aislamientos monospóricos se cultivaron en Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de medio líquido YEPD (extracto de levadura 10 g, peptona 20 g, dextrosa 20 g agua destilada 1000 mL) y se incubaron 48 horas a 25 °C en agitación a 150 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación los micelios crecidos se filtraron a través de papel Whatman N° 1, y se molieron con nitrógeno líquido. Se realizó la extracción de ADN genómico siguiendo el protocolo propuesto por Astolfi et al., 2012. A tubos Eppendorfs contenido aproximadamente 0,3 mL del micelio molido se les agregó 750 µL de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) al 2% y 15 µL de 2-mercaptoetanol, luego se llevaron a vórtex por 2 minutos y a baño seco a 65 °C por 15 minutos. Posteriormente se agregaron 520 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se llevaron a vórtex por 1 minuto y se centrifugaron a 12000 rpm por 10 minutos. Los sobrenadantes conteniendo el ADN fueron transferidos a un nuevo tubo, se agregaron 500 µL de isopropanol y 250 µL de acetato de sodio 7,5 M y nuevamente se centrifugaron a 12000 rpm por 10 minutos. Se descartaron los sobrenadantes, se agregaron 100 µL de etanol al 70% y se centrifugaron a 12000 rpm por 5 minutos. Se volvieron a descartar los sobrenadantes, y los pellets se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 horas. Luego fueron resuspendidos en 50 µL de agua MiliQ e incubados con 1 µL de RNasa a 37 °C durante 1 hora.

Se amplificó mediante PCR la región parcial del factor de elongación 1 alfa (EF-1 α), mediante el uso de los cebadores específicos EF1 (5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3') y EF2 (5'- GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3'), siguiendo la metodología propuesta por O'Donnell et al., 1998. Se utilizaron 4 µl de ADN fúngico, 5 µL de Buffer 10x, 3 µL MgCl₂ (25 mM), 2,5 µL de cada cebador (10 µM), 5 µL de dNTPs (2,5 µM) y 0,5 µL de Taq polimerasa Thermo Scientific® (5 U/µL) en un volumen final de 50 µL. La amplificación consistió en un

paso de desnaturalización a 95°C durante 2 minutos seguida por 39 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto con 30 segundos, y una extensión final de 10 minutos a 72°C. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador MultiGene Optimax, Labnet international Inc., EEUU. Los productos de amplificación se visualizaron bajo luz UV luego de una electroforesis en gel de agarosa (1,5%), conteniendo el colorante GoodView TM. El tamaño de los amplicones se estimó por comparación con un marcador de peso molecular de 100 pb (Thermo Scientific, Invitrogen C.O., EE.UU).

Los productos de PCR obtenidos fueron luego enviados para su secuenciación a MACROGEN Inc. (Seúl, Korea). Las secuencias consenso fueron obtenidas mediante el programa Seqman (Lasergene, Madison, WI) y comparadas con las secuencias almacenadas en la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) usando la herramienta Nucleotide Blast del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) y con las secuencias almacenadas en la base de datos del CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre's Fusarium MLST website (<https://fusarium.mycobank.org>).

2.5 Micotoxinas

La determinación de las micotoxinas DON, NIV, ZEA, FB1 y FB2 en las muestras de sorgo fue realizada mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) según la metodología propuesta por AOAC INTERNATIONAL, 2016; por el Laboratorio de Análisis de Productos Agropecuarios del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU).

La selección de muestras para análisis de toxinas se hizo por juicio, con el objetivo de analizar muestras de todos los departamentos y de todas las variedades de grano.

2.6 Precipitaciones

Los datos de precipitación acumulada, fueron obtenidos del Banco de Datos Agroclimático de la Unidad de Agro-clima y Sistemas de información (GRAS), del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA).

Se determinó una precipitación acumulada para cada muestra, teniendo en cuenta la fecha de siembra y cosecha del cultivo y el departamento de procedencia.

2.7 Análisis de datos

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete RStudio (RStudio Team, 2020). Se analizó la normalidad de los grupos de datos con el test Shapiro Wilk y la existencia de diferencias significativas entre grupos mediante el Test-T. El nivel de significancia estadística se estableció en $p < 0,05$. Las correlaciones entre variables se analizaron mediante el coeficiente de correlación de Spearman.

3. Resultados

3.1 Presencia de *Fusarium* en sorgo

Se analizaron 108 muestras de granos de sorgo, 56 correspondientes a la cosecha 2016 y 52 muestras correspondientes a la cosecha 2017, pertenecientes a los departamentos de Paysandú, Río Negro, Soriano, Colonia, Flores y San José. La prevalencia de *Fusarium* spp. en el total de las muestras fue del 99,7%.

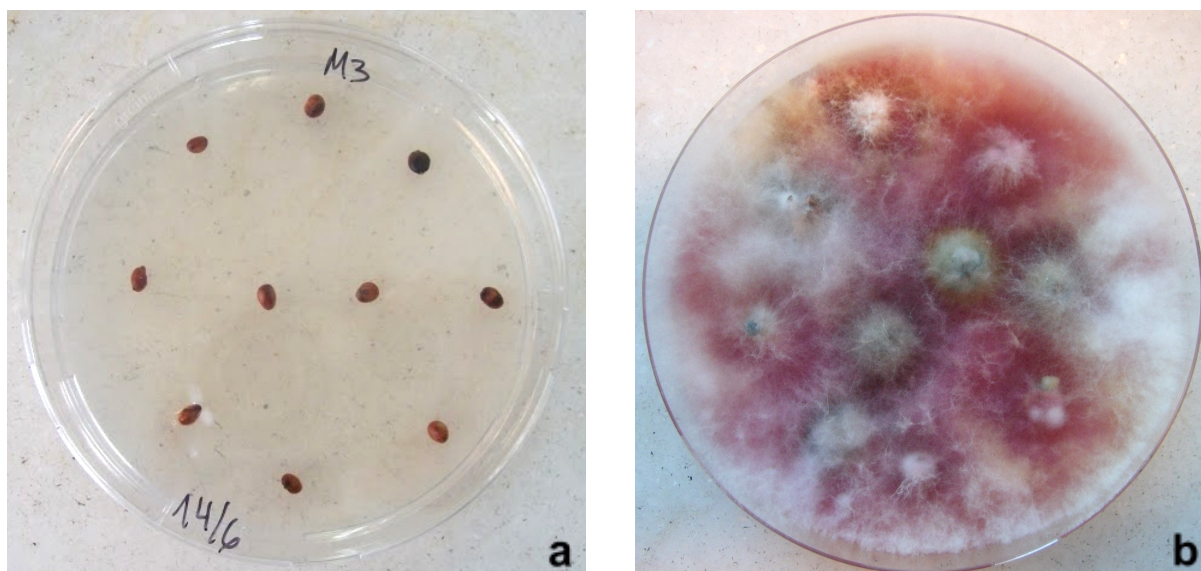


Figura 5. Granos de sorgo en medio PDA. **a.** Granos esterilizados superficialmente previo a la incubación. **b.** Desarrollo de colonias fúngicas presentes en los granos de sorgo luego de 5 días de incubación a 25 °C.

En la Figura 6 se observa la incidencia de *Fusarium* spp. en las muestras de sorgo analizadas.

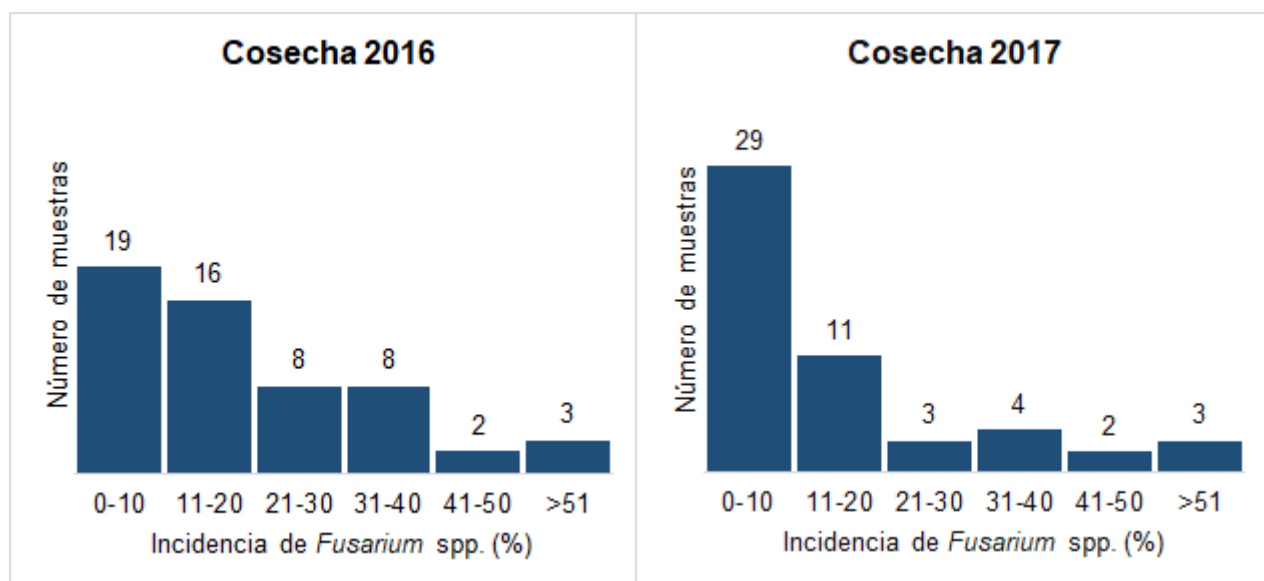


Figura 6. Incidencia de *Fusarium* spp. en las muestras de sorgo provenientes de las cosechas 2016 y 2017.

La incidencia promedio de *Fusarium* spp. fue 19,5% en 2016 y 16,1% en 2017, sin observarse diferencias significativas ($p > 0.05$). Se observaron diferencias entre ambos años en cuanto a la incidencia de los distintos complejos de especies. En la cosecha 2016 el complejo de especies (CE) *F. graminearum* fue el más frecuente (14,7%), seguido por el CE *F. fujikuroi* (3,4%) y el CE *F. incarnatum-equiseti* (1,2%). En 2017, los CE *F. graminearum* (8,5%) y *F. fujikuroi* (5,0%) fueron también los más frecuentes, pero se observó una disminución estadísticamente significativa sólo para el CE *F. graminearum* ($p < 0,05$) (Figura 7). Aunque no se observaron diferencias significativas para los CE *F. fujikuroi* y *F. incarnatum-equiseti* entre un año y el siguiente, ambos presentaron una mayor incidencia en el 2017 (Figura 7).

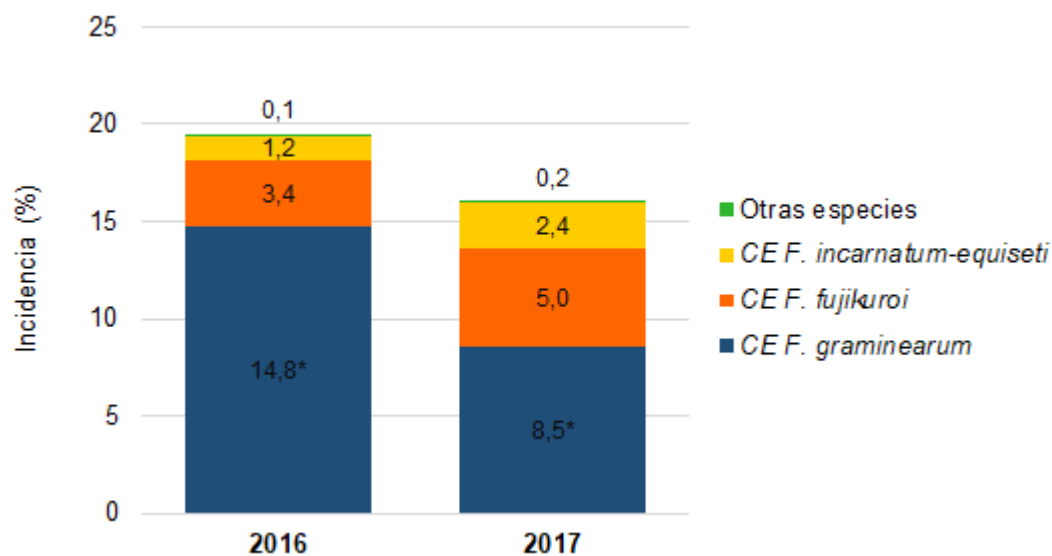


Figura 7. Incidencia promedio de los distintos CE de *Fusarium* en 2016 y 2017. *Presenta diferencias significativas entre años.

Otras especies aisladas en menor frecuencia fueron *F. armeniacum*, *F. chlamydosporum*, *F. heterosporum*, *F. oxysporum*, *F. tricinctum* y *F. pseudograminearum*.

En la Figura 8 se muestra la incidencia promedio en los distintos departamentos en 2016 y 2017. No se observaron diferencias significativas en la incidencia de *Fusarium* según el origen de las muestras ($p > 0.05$).

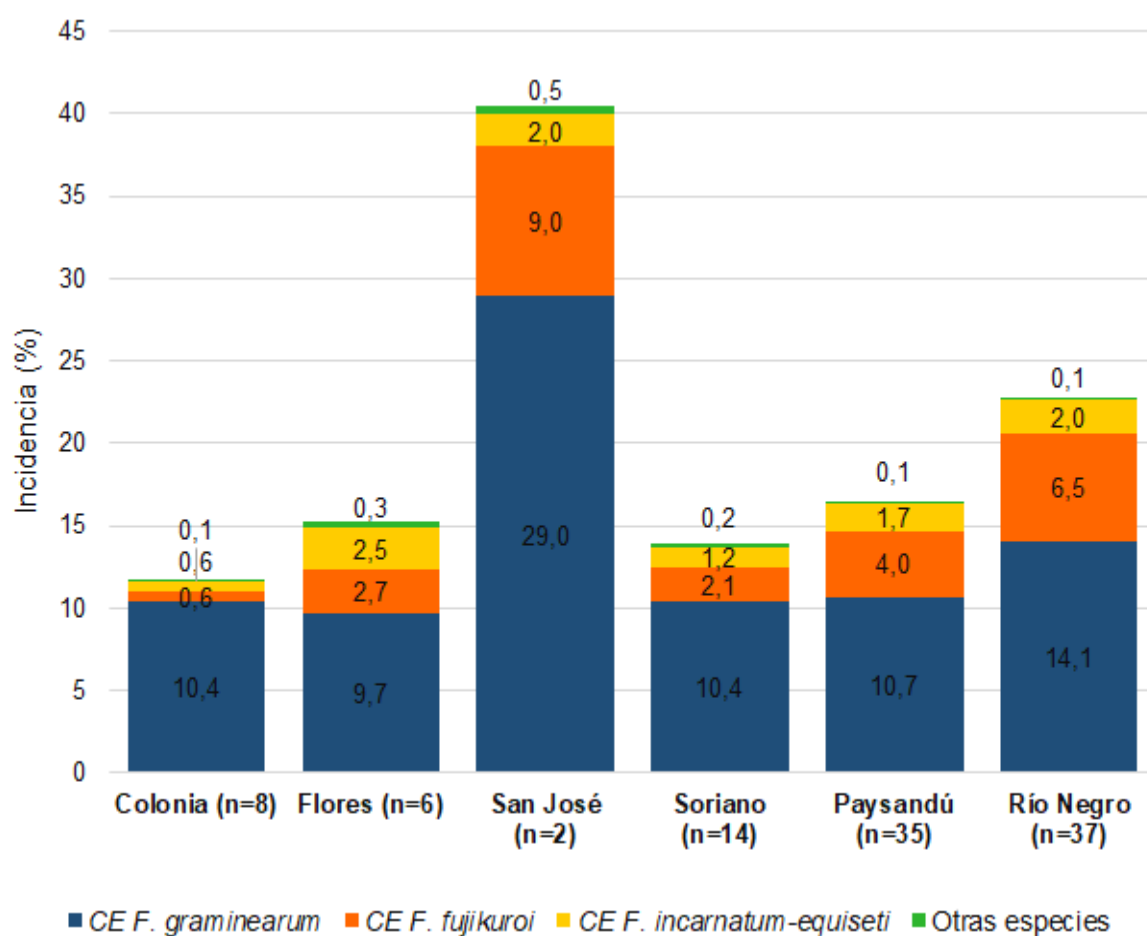


Figura 8. Incidencia de las diferentes especies de *Fusarium* en las muestras de sorgo provenientes de las cosechas 2016 y 2017, según el departamento. n: número de muestras.

Con respecto a la identificación de especies, dentro del CE *F. graminearum*, el 98,4% fueron identificadas como *F. graminearum sensu stricto* (*F. graminearum* s.s.), 0,8% como *F. cortaderiae* y 0,8% como *F. boothii*. En cuanto al CE *F. fujikuroi*, se determinó la presencia de *F. proliferatum*, *F. thapsinum*, *F. andiyazi*, *F. fujikuroi*, *F. verticillioides* y *F. subglutinans* (Figura 9).

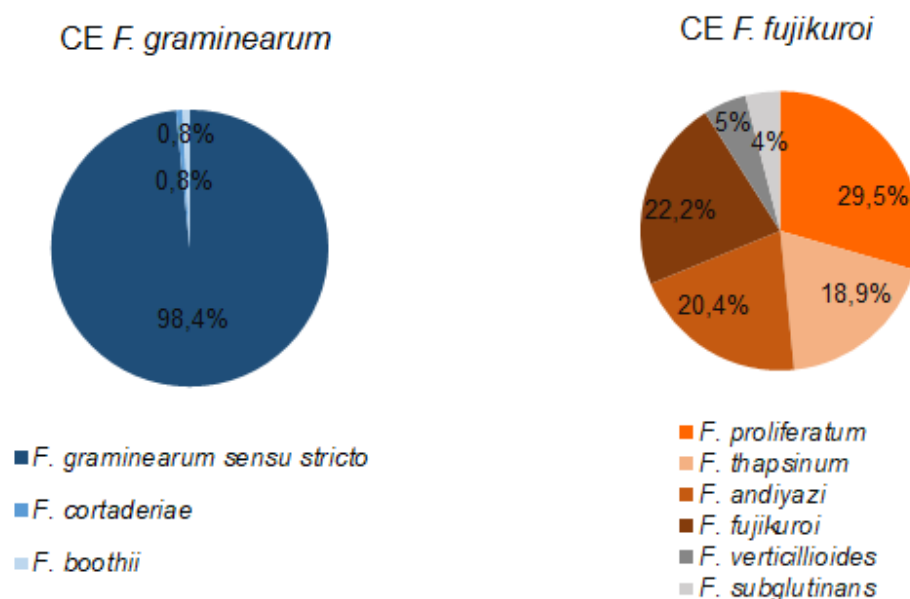


Figura 9. Distribución de las especies de los CE *F. graminearum* y *F. fujikuroi* identificadas molecularmente.

3.2 Micotoxinas presentes en sorgo

Se analizaron los niveles de las micotoxinas DON, ZEA, FB1, FB2 y NIV presentes en 32 muestras de la cosecha de 2016 y 29 muestras de la cosecha 2017 (Tabla 2). Si bien los valores promedio presentan un panorama general de la contaminación por micotoxinas en los años estudiados, es necesario tener en cuenta los valores máximos alcanzados en cada muestra.

Tabla 2. Niveles de micotoxinas presentes en las cosechas de sorgo 2016 (n=32) y 2017 (n=29).

	Contaminación promedio total (µg/kg)		Muestras positivas		Contaminación promedio de las muestras positivas (µg/kg)			
	2016	2017	2016	2017	2016	Rango	2017	Rango
DON	1454	395	87,5%	83%	1662*	153-6071	477*	90-2133
ZEA	1337	743	94%	93%	1426	35-8607	797	76-6560
FB1	-	61	0%	17%	-	-	351	128-753
FB2	-	26	0%	3,5%	-	-	742	80-742

*Presentan diferencias significativas.

El porcentaje de muestras positivas para DON fue alto durante los dos años de estudio (87,5% y 83%), mientras que el contenido promedio de DON fue bajo, variando de 1454 µg/kg a 395 µg/kg, respectivamente. Se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los niveles promedio entre ambos años. En cuanto a los niveles de ZEA, tanto el porcentaje de muestras positivas (94% y 93%) como el contenido promedio (1337 µg/kg y 743 µg/kg) fueron elevados en ambos años de estudio. Además, se encontraron muestras con niveles máximos de 8607 µg/kg en el 2016 y de 6560 µg/kg en el 2017. Solo cuatro muestras del 2017 presentaron contaminación por FB1 y FB2 (Tabla 2). No se encontraron muestras contaminadas con NIV.

Cabe mencionar que algunas muestras presentaron contaminación por más de una toxina. En las Tablas 3a y 3b se presenta la cantidad de muestras distribuidas según su contaminación simultánea con DON y ZEA para cada año de estudio. Los valores de los límites de los rangos fueron seleccionados de acuerdo a la normativa del MGAP para DON (MGAP, 2001), la recomendación del MGAP para ZEA (comunicación personal) y la recomendación de la UE para ZEA (Diario Oficial de la Unión Europea, 2006), que hacen referencia a los límites máximos permitidos y recomendados en cuanto a consumo animal.

Tabla 3a. Distribución de las muestras según límites permitidos de DON en Uruguay y límites recomendados de ZEA en Uruguay y UE, para la cosecha 2016.

Cantidad de muestras 2016 (n total=32)				
Contaminación ZEA (µg/kg)	Contaminación DON (µg/kg)			
	0-1000	1001-2000	2001-5000	>5000
0-100	6	0	0	0
101-250	5	0	0	0
251-500	3	1	1	0
501-2000	2	2	3	1
>2000	3	3	1	1

Tabla 3b. Distribución de las muestras según límites permitidos de DON en Uruguay y límites recomendados de ZEA en Uruguay y UE, para la cosecha 2017.

Cantidad de muestras 2017 (n total=29)				
Contaminación ZEA (µg/kg)	Contaminación DON (µg/kg)			
	0-1000	1001-2000	2001-5000	>5000
0-100	4	0	0	0
101-250	5	0	0	0
251-500	8	0	0	0
501-2000	8	1	1	0
>2000	1	1	0	0

Se observó una correlación positiva entre la incidencia de *F. graminearum* s.s. y la contaminación por DON ($r = 0,498$; $p < 0,01$) y la contaminación por ZEA ($r = 0,446$; $p < 0,01$).

3.3 Efecto de las precipitaciones en el grado de infección por *Fusarium* spp. y los niveles de micotoxinas

Se observaron diferencias significativas entre las precipitaciones acumuladas en 2016 y 2017 ($p < 0,05$). En 2016 el promedio de la precipitación acumulada durante el período de desarrollo de los cultivos fue de 1306 mm, mientras que en 2017 fue de 787 mm.

No se observó correlación entre la incidencia de *Fusarium* spp., *F. graminearum* s.s. y las precipitaciones acumuladas ($p > 0,05$). En cambio, se observó una correlación positiva entre las precipitaciones y la contaminación por DON ($r = 0,662$; $p < 0,01$).

3.4 Discusión

Lo primero que cabe destacar es que casi la totalidad (99,7%) de las muestras de sorgo analizadas estaban contaminadas por hongos del género *Fusarium*. Si bien hay algunos estudios en el país que analizaron las poblaciones fúngicas en este grano, estos refieren a sorgo ensilado (Basilio Santurio & Orihuela Barusso, 2012; del Palacio et al., 2016; Mionetto Cabrera, 2017). No se han hecho estudios sobre especies de *Fusarium* en muestras de sorgo granífero de Uruguay, por lo que este trabajo puede considerarse como el primer aporte en el tema y ayudar a generar información nacional para comenzar a desarrollar estrategias para el manejo en el cultivo.

Las principales especies encontradas fueron las del complejo *F. graminearum*, *F. fujikuroi* y *F. incarnatum-equiseti*, a diferencia de lo reportado en la región en países como Brasil y Argentina (Alves dos Reis et al., 2010; González et al., 1997; Pena et al., 2019), y en otras partes del mundo como Australia, India y Tailandia (Divakara et al., 2014; Kelly et al., 2017; Marikunte Yanjarappa et al., 2010; Mohamed Nor et al., 2019), donde el complejo encontrado con mayor frecuencia fue el *F. fujikuroi*. La alta presencia de especies del complejo *F. graminearum* encontrada en nuestro país puede deberse a que es común la rotación del sorgo con cultivos de invierno como trigo o cebada, donde se ha reportado a *F. graminearum* como el principal causante de la fusariosis de la espiga (Garmendia et al., 2018; Umpiérrez-Failache et al., 2013).

Dentro de las especies del complejo *F. graminearum* encontradas, *F. graminearum* s.s. fue la especie predominante. Esto concuerda con lo reportado en Uruguay por Calero (2016) en

granos de sorgo, donde *F. graminearum* s.s. fue también la especie predominante dentro del complejo. En otros granos como trigo y cebada *F. graminearum* s.s. también ha sido la especie predominante (Calero, 2016; Garmendia et al., 2018; Umpiérrez-Failache et al., 2013). Otras especies del complejo encontradas en bajas frecuencias fueron *F. cortaderiae* y *F. boothii*. En nuestro país, *F. cortaderiae* ha sido encontrada en trigo y sorgo (Calero, 2016; Garmendia et al., 2018; Umpiérrez-Failache et al., 2013), mientras que *F. boothii* ha sido encontrada en cebada (Garmendia et al., 2018) y es reportada por primera vez en este trabajo en granos de sorgo. La presencia de especies del complejo *F. graminearum* en los granos de sorgo representa un riesgo toxicológico ya que son capaces de producir diferentes micotoxinas como DON y sus derivados acetilados, ZEA y NIV (Cabañes Saenz et al., 2007).

Se encontró una gran diversidad de especies del complejo *F. fujikuroi* siendo *F. proliferatum* la más frecuente, seguida por *F. andiyazi*, *F. fujikuroi*, *F. thapsinum*, *F. verticillioides* y *F. subglutinans*. Excepto esta última, las especies mencionadas se reportan por primera vez en Uruguay. Este resultado difiere de lo encontrado anteriormente en silos de sorgo de Uruguay, donde la especie predominante fue *F. nygamai* (Basilio Santurio & Orihuela Barusso, 2012; Calero, 2016; Mionetto Cabrera, 2017), y concuerda en gran medida con las especies aisladas de cultivos de sorgo en Argentina, Brasil, Estados Unidos, Australia, India, Tailandia (Alves dos Reis et al., 2010; Divakara et al., 2014; Funnell-Harris & Pedersen, 2011; Kelly et al., 2017; Mohamed Nor et al., 2019; Pena et al., 2019). Sin embargo, *F. fujikuroi* no ha sido hasta el momento encontrada como contaminante del sorgo. Esta especie es conocida como causante de la fusariosis en arroz, y también se ha encontrado en cebada, maíz y soja (Choi et al., 2018; Pedrozo et al., 2015). El reporte de nuevas especies patógenas y toxicogénicas en Uruguay es de gran importancia para desarrollar estrategias de manejo a futuro.

Se pudo determinar además, la presencia de especies del complejo *F. incarnatum-equiseti*. Estas especies han sido reportadas en granos de sorgo en Argentina, Australia, Corea, India, siendo el complejo predominante en Egipto y Túnez (Choi et al., 2019; Divakara et al., 2014; González et al., 1997; Kelly et al., 2017; Lahouar et al., 2015; Marikunte Yanjarappa et al., 2010; Pena et al., 2019). Poco se sabe de la diversidad de especies incluídas y su capacidad toxicogénica, y muchas de ellas no pueden distinguirse mediante métodos tradicionales de identificación basados en la morfología (O'Donnell et al., 2012). Un aporte en este sentido puede verse en Avila et al., 2019; donde se hizo un análisis filogenético de

cepas aisladas de granos de arroz en Brasil y se demostró su capacidad de producción de DON y ZEA. Por este motivo sería relevante continuar con el monitoreo de este complejo de especies en Uruguay.

Respecto a los niveles de DON encontrados en las muestras de sorgo analizadas, las muestras presentaron un nivel promedio de contaminación por debajo de los límites permitidos para alimentación animal, excepto en el 2016 donde el valor promedio (1454 µg/kg) excedió el nivel máximo para equinos y bovinos (1000 µg/kg) (MGAP, 2001). Ninguna muestra superó el nivel máximo permitido para materias primas destinadas a la elaboración de alimentos para animales (10000 µg/kg) (MGAP, 2001). A nivel mundial se ha encontrado contaminación de granos de sorgo con DON con un amplio rango de valores (entre 30 y 2340 µg/kg), aunque con niveles máximos menores que lo reportado en este trabajo (Ayalew et al., 2006; Chala et al., 2014; Hanvi et al., 2019; Huerta-Treviño et al., 2016; Mohammed et al., 2022).

En lo que respecta a ZEA, el valor promedio de todas las muestras analizadas supera ampliamente el límite recomendado por el MGAP (250 µg/kg) y los límites recomendados por la Unión Europea para piensos complementarios para animales (100, 250 y 500 µg/kg) (Diario Oficial de la Unión Europea, 2006), tanto en la cosecha 2016 (1337 µg/kg) como en la 2017 (743 µg/kg), encontrándose muestras con valores máximos muy superiores (8607 µg/kg en 2016 y 6560 µg/kg en 2017). A nivel internacional se han encontrado muestras de sorgo contaminadas con ZEA con valores muy variables (entre 32 y 6900 µg/kg) (Ayalew et al., 2006; Chala et al., 2014; Makun et al., 2009; McMillan et al., 1983; Njumbe Ediage et al., 2015; Oueslati et al., 2014; Shotwell et al., 1980). Los altos valores de contaminación por DON y ZEA encontrados en las muestras analizadas pueden explicarse por la alta incidencia de *F. graminearum* s.s. en las muestras, ya que se determinó una correlación positiva entre *F. graminearum* s.s. y la contaminación por DON ($r = 0,498$; $p < 0,01$) y ZEA ($r = 0,446$; $p < 0,01$).

Se detectó una baja contaminación por fumonisinas en las muestras analizadas y ninguna de las muestras superó el límite establecido por la Unión Europea para alimentación animal (Diario Oficial de la Unión Europea, 2006). Esto podría deberse a la baja incidencia de especies del complejo *F. fujikuroi* que se observó en las muestras de sorgo en ambos años de estudio (3,4% en 2016 y 5% en 2017). Cabe destacar que en nuestro país no existe hasta el momento reglamentación para estas micotoxinas.

Las precipitaciones acumuladas fueron diferentes en los dos años evaluados y aunque se observó una mayor incidencia de *F. graminearum* s.s. en 2016, año de mayor precipitación acumulada (más aún, hubo inundaciones que retrasaron algunas cosechas), no se encontró una correlación estadísticamente significativa entre ambas variables. Sin embargo, se pudo determinar una correlación positiva entre las precipitaciones y la contaminación por DON ($r = 0,662$; $p < 0,01$). Resultados similares se han observado antes para cultivos de cebada de nuestro país, donde niveles muy altos de contaminación por DON se correlacionaron con altas precipitaciones durante el desarrollo del cultivo (Pan et al., 2007).

Este trabajo demuestra que el cultivo de sorgo en Uruguay está expuesto a la colonización por una amplia variedad de especies toxicogénicas de *Fusarium* que pueden causar la contaminación del grano con diferentes micotoxinas, principalmente de ZEA y DON. Estos resultados indican la necesidad de establecer programas de monitoreo de los niveles de micotoxinas en el sorgo para garantizar la salud animal e implementar estrategias para minimizar la infección fúngica en el campo.

3.5 Conclusiones

La prevalencia de *Fusarium* spp. en el total de las muestras de sorgo analizadas fue de 99,7% y la incidencia promedio de 17,8%.

En ambas cosechas (2016 y 2017), *F. graminearum* s.s. fue la especie más frecuente, seguido por *F. proliferatum*.

Se encontraron micotoxinas en el 93% de las muestras analizadas. Las principales micotoxinas encontradas fueron DON y ZEA.

Existió una correlación positiva entre los niveles de DON y las precipitaciones bajo las cuales se desarrolló el cultivo.

Los altos niveles de contaminación con ZEA encontrados constituyen un alto riesgo para la salud animal y expresan la necesidad de realizar un monitoreo continuo e implementar estrategias para minimizar la infección fúngica en el campo.

3.6 Perspectivas futuras

Una vez finalizado este trabajo me gustaría reflexionar acerca de posibles líneas de investigación a futuro. La primera sería realizar una evaluación sistemática durante más años. Los resultados presentados en esta tesina muestran la importancia de realizar un monitoreo de rutina del sorgo durante la cosecha y el almacenamiento del mismo para establecer medidas de control para la contaminación por hongos y sus micotoxinas asociadas. Hace varios años se realiza la Evaluación Nacional de Cultivares (ENC), bajo la responsabilidad del Instituto Nacional de Semillas (INASE), en convenio con el INIA, con el objetivo de proveer información sobre el comportamiento de algunos cultivares, incluido el sorgo granífero (INASE, 2014). Entiendo que podría aprovecharse esta evaluación para realizar análisis de hongos toxicogénicos y buscar relaciones con las variables estudiadas en la ENC, como temperatura, precipitaciones y ciclo del cultivo. En segundo lugar, estudiar la contaminación de los granos durante toda la etapa del cultivo, y no solamente al momento de la cosecha, permitiría obtener información sobre en qué etapa se producen las infecciones por las diferentes especies de *Fusarium* y con qué factores se relacionan. Asimismo, se podría realizar un estudio más en profundidad de las variables agroclimáticas y su influencia en el desarrollo de *Fusarium* y la producción de micotoxinas en granos de sorgo en Uruguay. Con respecto al género *Fusarium*, varias especies fueron reportadas por primera vez en el país, se podría profundizar en la caracterización de los complejos de especies *F. fujikuroi* y *F. incarnatum-equiseti*.

4. Bibliografía

- Acheampong, E., Murthi Anishetty, N., & Williams, J. T. (1984). *A world survey of sorghum and millets germplasm* (p. 43). International board for plant genetic resources (IBPGR).
- Alves dos Reis, T., Zorzete, P., Pozzi, C. R., Nascimento da Silva, V., Ortega, E., & Corrêa, B. (2010). Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian sorghum from sowing to harvest. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(9), 1445-1451.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.3962>
- ANII. (2016). *ANII | Agencia Nacional de Investigación e Innovación. Extracción y purificación de proteínas del DDGS de sorgo: ALUR*.
<https://www.anii.org.uy/apoyos/innovacion/desafios/3/extraccion-y-purificacion-de-proteinas-del-ddgs-de-sorgo--alur/>
- AOAC INTERNATIONAL. (2016). *Official methods of analysis of AOAC International* (G. W. J. Latimer, Ed.; 20th ed). AOAC International.
- Astolfi, P., Reynoso, M. M., Ramirez, M. L., Chulze, S. N., Alves, T. C. A., Tessmann, D. J., & Del Ponte, E. M. (2012). Genetic population structure and trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat in southern Brazil. *Plant Pathology*, 61(2), 289-295. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02515.x>
- Avila, C. F., Moreira, G. M., Nicolli, C. P., Gomes, L. B., Abreu, L. M., Pfenning, L. H., Haidukowski, M., Moretti, A., Logrieco, A., & Del Ponte, E. M. (2019). *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex associated with Brazilian rice: Phylogeny, morphology and toxigenic potential. *International Journal of Food Microbiology*, 306, 108267. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108267>
- Ayalew, A., Fehrmann, H., Lepschy, J., Beck, R., & Abate, D. (2006). Natural Occurrence of Mycotoxins in Staple Cereals from Ethiopia. *Mycopathologia*, 162(1), 57-63.

<https://doi.org/10.1007/s11046-006-0027-8>

Balota, M. (2012). *Sorghum (Sorghum vulgare, L.) Diseases: Head Mold (Fusarium spp., Alternaria spp., Helminthosporium spp., Curvularia spp.)*.

<https://vtechworks.lib.vt.edu/handle/10919/55794>

Barbat Rodríguez, R. (2019). Emprendimientos colectivos Dos experiencias en Maldonado: Engorde de corderos y Operativo sorgo. *Revista Plan Agropecuario*, 169, 36-39.

Barrios Burzaco, A. I., Larzabal Pérez, J. C., & Schaffner Delmonte, S. R. (2014).

Relevamiento de las principales enfermedades de hoja, tallo y raíz en el cultivo de soja. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/8768>

Basílico, J. C. (1995). *Micotoxinas en alimentos. El riesgo sobre la mesa*. Centro de Publicaciones Universidad Nacional del Litoral.

Basilio Santurio, J. J., & Orihuela Barusso, D. M. (2012). *Dinámica de los taninos condensados en cuatro genotipos de sorgo y su efecto en el tiempo y el desarrollo fúngico* [Tesis de grado, Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Veterinaria]. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/10174>

Burgess, L. W., University of Sydney, Department of Crop Sciences, Fusarium Research Laboratory, & Royal Botanic Gardens, S. (1994). *Laboratory manual for fusarium research*. Fusarium Research Laboratory, Dept. of Crop Sciences, University of Sydney : Royal Botanic Gardens.

Cabañes Saenz, F. J., Abarca Salat, M. L., Bragulat Arara, M. R., & Castellá Gomez, G. (2007). Especies productoras de micotoxinas. En *Micotoxinas en alimentos* (pp. 29-61). Ediciones Díaz de Santos, S.A. <http://portalrecerca.csuc.cat/62011113>

Cabella, D., & Eguren, E. (2012). *Buenas prácticas en la elaboración de alimentos para animales*. Servicios Agrícolas, Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/buenas-practicas-elaboracion-alimentos-para-animales/buenas-practicas>

- Calero, N. (2016). *Caracterización de las poblaciones de Fusarium graminearum sensu lato de nuestro país* [Tesis de Maestría, Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias - PEDECIBA]. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/10174>
- Carrasco, N., Zamora, M., & Melin, A. (2011). *Manual de sorgo*. Publicaciones regionales. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_manual_de_sorgo_renglon_191.pdf
- Carrión Sbardelotto, L. (2013). *Impacto de la variedad, densidad de siembra y momento de cosecha de sorgo dulce en la producción de etanol en el norte uruguayo* [Tesis de grado, Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Agronomía]. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/8746>
- Center for Food Safety and Applied Nutrition. (2010). *Guidance for Industry and FDA: Advisory Levels for Deoxynivalenol (DON) in Finished Wheat Products for Human Consumption and Grains and Grain By-Products used for Animal Feed*. U.S. Food and Drug Administration; FDA. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-and-fda-advisory-levels-deoxynivalenol-don-finished-wheat-products-human>
- Chala, A., Taye, W., Ayalew, A., Krska, R., Sulyok, M., & Logrieco, A. (2014). Multimycotoxin analysis of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) and finger millet (*Eleusine coracana* L. Gaertn) from Ethiopia. *Food Control*, 45, 29-35. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.04.018>
- Choi, J.-H., Lee, S., Nah, J.-Y., Kim, H.-K., Paek, J.-S., Lee, S., Ham, H., Hong, S. K., Yun, S.-H., & Lee, T. (2018). Species composition of and fumonisin production by the *Fusarium fujikuroi* species complex isolated from Korean cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 267, 62-69. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.006>

- Choi, J.-H., Nah, J.-Y., Jin, H.-S., Lim, S.-B., Paek, J.-S., Lee, M.-J., Jang, J.-Y., Lee, T., Hong, S. K., Choi, H.-W., & Kim, J. (2019). Occurrence of *Fusarium* Species in Korean Sorghum Grains. *Res. Plant Dis*, 25(4), 213-219.
<https://doi.org/10.5423/RPD.2019.25.4.213>
- Decreto N° 315/994. (1994, julio 5). *Reglamento bromatológico nacional (Uruguay)*.
<https://www.impo.com.uy/bases/decretos-reglamento/315-1994>
- del Palacio, A., Mionetto, A., Bettucci, L., & Pan, D. (2016). Evolution of fungal population and mycotoxins in sorghum silage. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 33(12), 1864-1872. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1244732>
- Diario Oficial de la Unión Europea. (2006). *RECOMENDACIÓN DE LA COMISIÓN de 17 de agosto de 2006 sobre la presencia de deoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina A, toxinas T-2 y HT-2 y fumonisinas en productos destinados a la alimentación animal*.
<https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:229:0007:0009:ES:PDF>
- Díaz de Ackerman, M., & Pereyra, S. (2010). Fusariosis de la espiga de trigo y la cebada. En *Seminario de Actualización Manejo de Enfermedades en Trigo y Cebada* (pp. 95-109). INIA.
<http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/582/1/112761220910153559.pdf>
- Divakara, S. T., Santosh, P., Aiyaz, M., Ramana, M. V., Hariprasad, P., Nayaka, S. C., & Niranjana, S. R. (2014). Molecular identification and characterization of *Fusarium* spp. Associated with sorghum seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(6), 1132-1139. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6380>
- FAO, Nutrition Division. (2004). *Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y las raciones en el año 2003*. Food & Agriculture Organization.
<https://www.fao.org/3/y5499s/y5499s.pdf>
- Funnell-Harris, D. L., & Pedersen, J. F. (2011). Presence of *Fusarium* spp. In Air and Soil

- Associated with Sorghum Fields. *Plant Disease*, 95(6), 648-656.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-09-10-0671>
- Garmendia, G., Pattarino, L., Negrín, C., Martínez-Silveira, A., Pereyra, S., Ward, T. J., & Vero, S. (2018). Species composition, toxigenic potential and aggressiveness of *Fusarium* isolates causing Head Blight of barley in Uruguay. *Food Microbiology*, 76, 426-433. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.07.005>
- Gelezoglo, R., Álvarez, R., Rodríguez, B., Vidal, R., & Garmendia, G. (2019). *Determinación de susceptibilidad diferencial de variedades nativas de maíz a la infección por Fusarium en grano*. Proyecto PAIE CSIC, Facultad de Química, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay.
<https://www.estudiantes.csic.edu.uy/2020/07/30/determinacion-de-susceptibilidad-diferencial-de-variedades-nativas-de-maiz-a-la-infeccion-por-fusarium-en-grano/>
- González, H. H. L., Martínez, E. J., & Resnik, S. L. (1997). Fungi associated with sorghum grain from Argentina. *Mycopathologia*, 139(1), 35-41.
<https://doi.org/10.1023/A:1006803901969>
- Hanvi, D. M., Lawson-Evi, P., De Boevre, M., Goto, C. E., De Saeger, S., & Eklú-Gadegbeku, K. (2019). Natural occurrence of mycotoxins in maize and sorghum in Togo. *Mycotoxin Research*, 35(4), 321-327.
<https://doi.org/10.1007/s12550-019-00351-1>
- Hestbjerg, H., Nielsen, K. F., Thrane, U., & Elmholt, S. (2002). Production of Trichothecenes and Other Secondary Metabolites by *Fusarium culmorum* and *Fusarium equiseti* on Common Laboratory Media and a Soil Organic Matter Agar: An Ecological Interpretation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(26), 7593-7599.
<https://doi.org/10.1021/jf020432o>
- Huerta-Treviño, A., Dávila-Aviña, J. E., Sánchez, E., Heredia, N., & García, S. (2016). Occurrence of mycotoxins in alfalfa (*Medicago sativa* L.), sorghum [*Sorghum bicolor*

- (L.) Moench], and grass (*Cenchrus ciliaris* L.) retailed in the state of Nuevo León, México. *Agrociencia*, 50(7), 825-836.
- Hueza, I., Raspantini, P., Raspantini, L., Latorre, A., & Górniak, S. (2014). Zearalenone, an Estrogenic Mycotoxin, Is an Immunotoxic Compound. *Toxins*, 6(3), 1080-1095.
<https://doi.org/10.3390/toxins6031080>
- IARC. (1993). *Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins* (Vol. 56).
<https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Some-Naturally-Occurring-Substances-Food-Items-And-Constituents-Heterocyclic-Aromatic-Amines-And-Mycotoxins-1993>
- IARC. (2002). *Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene* (Vol. 82).
<https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Some-Traditional-Herbal-Medicines-Some-Mycotoxins-Naphthalene-And-Styrene-2002>
- ICRISAT. (2021). *Sorghum*. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.
<http://exploreit.icrisat.org/profile/Sorghum/193>
- INASE. (2014, 2021). *Instituto Nacional de Semillas. Resultados ENC-INASE-INIA*.
<https://www.inase.uy/Publicaciones/Publicaciones.aspx?s=dt-enc>
- Irigoyen, A., & Perrachon, J. (2007). Sorgo granífero. *Revista Plan Agropecuario*, 123, 52-55.
- Kelly, L. A., Tan, Y. P., Ryley, M. J., & Aitken, E. A. B. (2017). Fusarium species associated with stalk rot and head blight of grain sorghum in Queensland and New South Wales, Australia. *Plant Pathology*, 66(9), 1413-1423. <https://doi.org/10.1111/ppa.12697>
- Kuiper-Goodman, T., Scott, P. M., & Watanabe, H. (1987). Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 7(3), 253-306.

[https://doi.org/10.1016/0273-2300\(87\)90037-7](https://doi.org/10.1016/0273-2300(87)90037-7)

- Lahouar, A., Crespo-Sempere, A., Marín, S., Saïd, S., & Sanchis, V. (2015). Toxigenic molds in Tunisian and Egyptian sorghum for human consumption. *Journal of Stored Products Research*, 63, 57-62. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2015.07.001>
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The fusarium laboratory manual* (1st ed). Blackwell Pub.
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2013). An Overview of Fusarium. En D. W. Brown & R. H. Proctor (Eds.), *Fusarium: Genomics, molecular and cellular biology* (pp. 1-11). Caister Academic Press.
- Ma, L.-J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F., Gardiner, D. M., Manners, J. M., & Kazan, K. (2013). *Fusarium* Pathogenomics. *Annual Review of Microbiology*, 67(1), 399-416. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155650>
- Makun, H. A., Gbodi, T. A., Akanya, O. H., Salako, E. A., & Ogbadu, G. H. (2009). Fungi and Some Mycotoxins Found in Mouldy Sorghum in Niger State, Nigeria. *World Journal of Agricultural Sciences*, 5, 5-17.
- Marikunte Yanjarappa, S., Regina Sharmila, D., & Gottravalli Ramanayaka, J. (2010). Survey of postharvest fungi associated with sorghum grains produced in Karnataka (India). *Journal of Plant Protection Research*, 50(3), 335-339. <https://doi.org/10.2478/v10045-010-0057-6>
- Martínez-Larrañaga, M. R., & Anadón, A. (2012). Micotoxinas. En M. Repetto & A. M. Cameán (Eds.), *Toxicología alimentaria*. <http://www.ebooks7-24.com/?il=4980>
- McCormick, S. P., Stanley, A. M., Stover, N. A., & Alexander, N. J. (2011). Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins*, 3(7), 802-814. <https://doi.org/10.3390/toxins3070802>
- McMillan, W. W., Wilson, D. M., Mirocha, C. J., & Widstrom, N. W. (1983). Mycotoxin contamination in grain sorghum from fields in Georgia and Mississippi [Aflatoxin,

- zearalenone, animal feed]. *Cereal Chemistry (USA)*.
- https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Mycotoxin+contamination+in+grain+sorghum+from+fields+in+Georgia+and+Mississippi+%5BAflatoxin%2C+zearalenone%2C+animal+feed%5D&author=McMillan%2C+W.W.&publication_year=1983
- MGAP. (2001, diciembre 26). *Resolución S/N/0001. Límites máximos de DON en alimentos para animales*. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca.
- <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/institucional/normativa/resolucion-sn001-limites-maximos-don-alimentos-para-animales>
- Mills, J. T. (1989). Ecology of Mycotoxigenic Fusarium species on Cereal Seeds. *Journal of Food Protection*, 52(10), 737-742. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-52.10.737>
- Mionetto Cabrera, A. C. (2017). *Hongos toxicogénicos y producción de micotoxinas en silos de sorgo húmedo* [Tesis de Maestría, Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias - PEDECIBA]. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/10220>
- Mohamed Nor, N. M. I., Salleh, B., & Leslie, J. F. (2019). Fusarium Species from Sorghum in Thailand. *The Plant Pathology Journal*, 35(4), 301-312.
- <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.03.2019.0049>
- Mohammed, A., Bekeko, Z., Yusufe, M., Sulyok, M., & Krska, R. (2022). Fungal Species and Multi-Mycotoxin Associated with Post-Harvest Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) Grain in Eastern Ethiopia. *Toxins*, 14(7), 473.
- <https://doi.org/10.3390/toxins14070473>
- MSP. (2001). *Decreto N° 533/001*.
- <https://www.impo.com.uy/bases/decretos-originales/533-2001>
- Nelson, P. E., Marasas, W. F. O., & Toussoun, T. A. (1983). *Fusarium species: An illustrated manual for identification*. Pennsylvania State University Press.
- [//catalog.hathitrust.org/Record/008364701](https://catalog.hathitrust.org/Record/008364701)
- Nishiuchi, T. (2013). Plant responses to Fusarium Metabolites. En D. W. Brown & R. H.

- Proctor (Eds.), *Fusarium: Genomics, molecular and cellular biology* (pp. 165-178). Caister Academic Press.
- Njumbe Ediage, E., Van Poucke, C., & De Saeger, S. (2015). A multi-analyte LC-MS/MS method for the analysis of 23 mycotoxins in different sorghum varieties: The forgotten sample matrix. *Food Chemistry*, 177, 397-404.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.060>
- O'Donnell, K., Humber, R. A., Geiser, D. M., Kang, S., Park, B., Robert, V. A. R. G., Crous, P. W., Johnston, P. R., Aoki, T., Rooney, A. P., & Rehner, S. A. (2012). Phylogenetic diversity of insecticolous fusaria inferred from multilocus DNA sequence data and their molecular identification via FUSARIUM-ID and Fusarium MLST. *Mycologia*, 104(2), 427-445. <https://doi.org/10.3852/11-179>
- Olij Passanante, V. (2014). *Aislamiento y selección de levaduras a partir de materiales del procesamiento industrial de sorgo dulce para la producción industrial de bioetanol combustible* [Tesis de grado, Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias]. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/1598>
- Oueslati, S., Blesa, J., Moltó, J. C., Ghorbel, A., & Mañes, J. (2014). Presence of mycotoxins in sorghum and intake estimation in Tunisia. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 31(2), 307-318.
<https://doi.org/10.1080/19440049.2013.867367>
- Pan, D., Bonsignore, F., Rivas, F., Perera, G., & Bettucci, L. (2007). Deoxynivalenol in barley samples from Uruguay. *International Journal of Food Microbiology*, 114(2), 149-152.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.08.006>
- Pedrozo, R., Fenoglio, J. J., & Little, C. R. (2015). First Report of Seedborne Fusarium fujikuroi and its Potential to Cause Pre- and Post-emergent Damping-off on Soybean (Glycine max) in the United States. *Plant Disease*, 99(12), 1865-1865.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-03-15-0321-PDN>

- Pena, G. A., Cavaglieri, L. R., & Chulze, S. N. (2019). *Fusarium* species and moniliformin occurrence in sorghum grains used as ingredient for animal feed in Argentina. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(1), 47-54.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.9140>
- Pereyra, S., & Dill-Macky, R. (2010). *Fusarium* Species Recovered from Wheat and Barley Grains in Uruguay, Pathogenicity and Deoxynivalenol Content. *Agrociencia (Uruguay)*, 14(2), 33-44.
- RStudio Team. (2020). *RStudio: Integrated Development Environment for R* [Software]. RStudio, PBC. <http://www.rstudio.com/>
- Ruiz, M. J., & Font, G. (2007). Toxicidad y evaluación de riesgos. En *Micotoxinas en alimentos* (pp. 15-27). Ediciones Díaz de Santos, S.A.
<http://portalrecerca.csuc.cat/62011113>
- Schmale III, D. G., & Munkvold, G. P. (2009). Mycotoxins in Crops: A Threat to Human and Domestic Animal Health. *Plant Health Instructor*.
<https://doi.org/10.1094/PHI-I-2009-0715-01>
- Shotwell, O. L., Bennett, G. A., Goulden, M. L., Plattner, R. D., & Hesseltine, C. W. (1980). Survey for Zearalenone, Aflatoxin, and Ochratoxin in U.S. Grain Sorghum from 1975 and 1976 Crops. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 63(4), 922-926. <https://doi.org/10.1093/jaoac/63.4.922>
- Souto, M. (2003). Fusariosis en granos y contaminación de cosechas: Diseño de una estrategia para su prevención y control. *Anuario OPYPA 2003*.
<https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/anuario-opypa-2003>
- Umpiérrez-Failache, M., Garmendia, G., Pereyra, S., Rodríguez-Haralambides, A., Ward, T. J., & Vero, S. (2013). Regional differences in species composition and toxigenic potential among *Fusarium* head blight isolates from Uruguay indicate a risk of

nivalenol contamination in new wheat production areas. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), 135-140. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.029>

USDA. (2019). *Grain: World Markets and Trade*.

<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/grain-corn-coarsegrains.pdf>