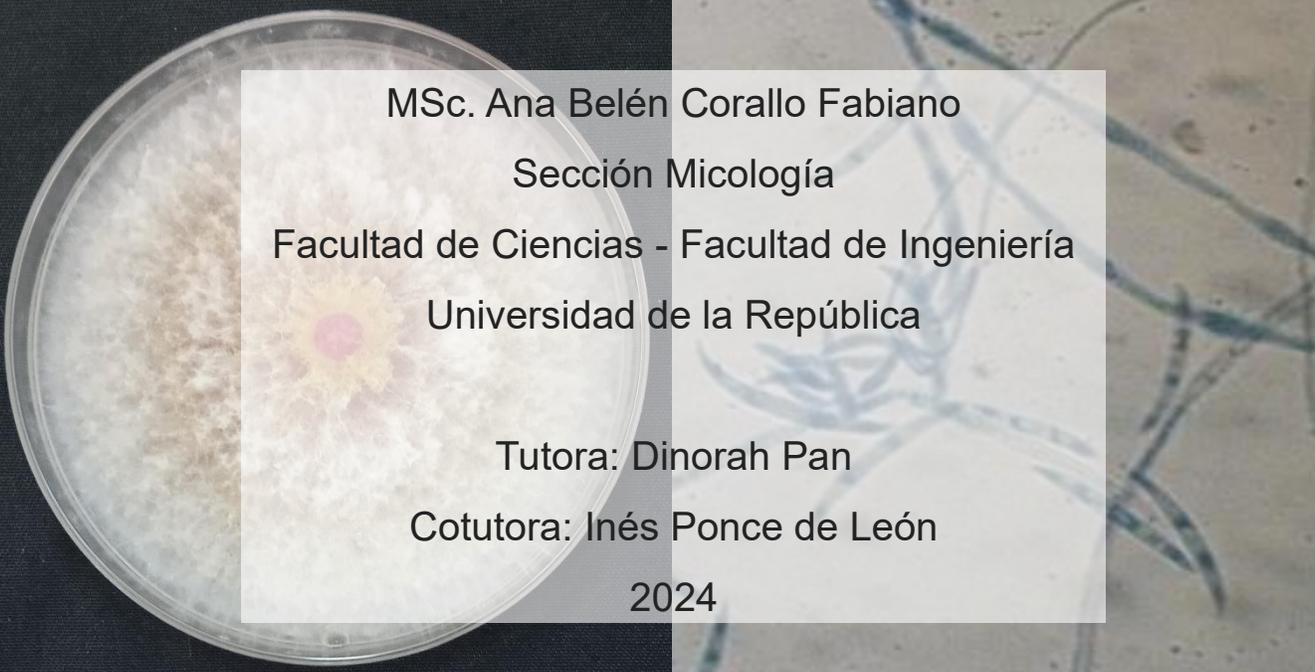


Especies toxicogénicas de *Fusarium* asociadas a granos de sorgo en Uruguay

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas
Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA)
Área Biología

A composite image for the thesis cover. The top half shows a field of sorghum plants. The bottom half is split: the left side shows a petri dish with a white mold culture, and the right side shows a microscope slide with blue-stained fungal structures.

MSc. Ana Belén Corallo Fabiano
Sección Micología
Facultad de Ciencias - Facultad de Ingeniería
Universidad de la República

Tutora: Dinorah Pan
Cotutora: Inés Ponce de León
2024



Sección Micología, Facultad de Ciencias - Facultad de Ingeniería,
Universidad de la República



Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas
Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA), Área Biología

ESPECIES TOXICOGÉNICAS DE *FUSARIUM* ASOCIADAS A GRANOS DE SORGO EN
URUGUAY

MSc. ANA BELÉN CORALLO FABIANO

Tutora: Dra. Dinorah Pan de la Guerra

Cotutora: Dra. Inés Ponce de León

Montevideo, Uruguay

2024

Índice	Páginas
Agradecimientos	i
Resumen	1
1. Introducción general	3
1.1 <i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench	3
1.2 <i>Fusarium</i> spp.	7
1.3 Micotoxinas	9
2. Hipótesis	12
3. Objetivo general	12
4. Capítulo 1. <i>Fusarium</i> spp. patógenas de sorgo y sus toxinas asociadas	13
4.1. Introducción	13
4.2. Objetivos	20
4.3. Metodología	21
4.3.1. Obtención de muestras de sorgo	21
4.3.2. Aislamiento de las especies de <i>Fusarium</i>	21
4.3.3. Identificación molecular de las especies de <i>Fusarium</i>	22
4.3.4. Detección y cuantificación de las micotoxinas presentes en los granos de sorgo	28
4.4. Resultados	29
4.4.1. Aislamiento e identificación de las especies de <i>Fusarium</i>	29
4.4.2. Detección y cuantificación de micotoxinas en granos de sorgo	34
4.5. Discusión	36
5. Capítulo 2. Caracterización toxicogénica de cepas de <i>F. graminearum</i> s.s. y <i>F. proliferatum</i>	39
5.1. Introducción	39
5.1.1. <i>Fusarium graminearum</i> Schwabe	39
5.1.2. <i>Fusarium proliferatum</i> (Matsushima) Nirenberg	44
5.2. Objetivos	45
5.3. Metodología	46
5.3.1. Evaluación de la capacidad toxicogénica de <i>F. graminearum</i> s.s. y <i>F. proliferatum</i>	46

5.3.2. Determinación de los genotipos de <i>F. graminearum</i> s.s. productores de tricotecenos	47
5.3.3. Evaluación de la expresión de genes responsables de la biosíntesis de micotoxinas de <i>F. graminearum</i> s.s. <i>in vitro</i>	48
5.4. Resultados	51
5.4.1. Producción de micotoxinas por <i>F. graminearum</i> s.s. y <i>F. proliferatum</i>	51
5.4.2. Determinación de los genotipos de <i>F. graminearum</i> s.s. en relación a la producción de tricotecenos	52
5.4.3. Evaluación de la expresión de genes responsables de la biosíntesis de micotoxinas de <i>F. graminearum</i> s.s. <i>in vitro</i>	52
5.5. Discusión	55
6. Capítulo 3. Caracterización ecofisiológica de <i>F. graminearum</i> s.s. y <i>F. proliferatum</i>	57
6.1. Introducción	57
6.2. Objetivos	60
6.3. Metodología	61
6.3.1. Efecto de la temperatura y la actividad hídrica sobre la velocidad de crecimiento y la producción de micotoxinas	61
6.4. Resultados	63
6.5. Discusión	71
7. Conclusiones	75
8. Perspectivas	76
Artículo publicado	77
9. Bibliografía	89

TABLAS

Tabla 1. Números de acceso al GenBank del complejo de especies de <i>Fusarium fujikuroi</i> utilizado en el análisis filogenético.	27
Tabla 2. Niveles de micotoxinas presentes en muestras de sorgo de la cosecha 2016 (n=55) y 2017 (n=57) en Uruguay.	34
Tabla 3. Genes analizados y cebadores utilizados.	49

Tabla 4. Cantidades de sorgo o glicerol y agua según las actividades hídricas (aw) evaluadas.	61
Tabla 5. Análisis de varianza sobre el efecto de la temperatura (T°C), la actividad hídrica (aw) y sus interacciones sobre el crecimiento de <i>Fusarium graminearum</i> s.s.	64
Tabla 6. Análisis de varianza sobre el efecto de la temperatura (T°C), la actividad hídrica (aw) y sus interacciones sobre la producción de DON, 15-AcDON, 3-AcDON, NIV y ZEA por <i>Fusarium graminearum</i> s.s.	67
Tabla 7. Análisis de varianza sobre el efecto de la temperatura (T°C), la actividad hídrica (aw) y sus interacciones sobre el crecimiento de <i>Fusarium proliferatum</i> .	68
Tabla 8. Análisis de varianza sobre el efecto de la temperatura (T°C), la actividad hídrica (aw) y sus interacciones sobre la producción de FB1 y FB2 por <i>F Fusarium proliferatum</i> .	70
FIGURAS	
Figura 1. Principales países productores de sorgo.	4
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Sorghum bicolor</i> con sus diferentes etapas de crecimiento: fase vegetativa, fase reproductiva y madurez fisiológica.	5
Figura 3. Diagrama de un corte transversal de un grano de sorgo.	6
Figura 4. Ciclo de enfermedades producidas por <i>Fusarium</i> spp. en cereales, ejemplificado según el ciclo de vida de <i>Fusarium graminearum</i> sobre trigo.	9
Figura 5. Superficie sembrada de sorgo.	13
Figura 6. Precios de exportación de maíz y sorgo (dólares por tonelada).	14
Figura 7. Filogenia de máxima verosimilitud de <i>Fusarium</i> spp., inferida a partir de secuencias exónicas de 19 genes codificadores de proteínas. Entre paréntesis se muestra el número de especies filogenéticamente distintas conocidas en cada complejo de especies. Se utilizaron secuencias de <i>Neonectria</i> para enraizar la filogenia. Mya: millones de años antes.	15
Figura 8. Estructura química de los distintos tipos de tricotecenos (A, B, C o D).	17
Figura 9. Estructura química de la zearalenona y sus derivados.	18

Figura 10. Estructura química de las fumonisinas del tipo B.	19
Figura 11. Mapa de Uruguay mostrando las zonas de colecta de muestras en la zafra 2016: x y 2017: ◊.	21
Figura 12. Izquierda: placa de Petri con PDA y granos de sorgo (día 0), derecha: placa con desarrollo fúngico sobre los granos (día 5).	22
Figura 13. Densidad relativa de especies del complejo <i>Fusarium fujikuroi</i> para cada zafra, 2016 y 2017.	26
Figura 14. Árbol filogenético consenso construido por máxima verosimilitud a partir de secuencias de la región del factor de elongación de los aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. y secuencias de la base de datos GenBank. Como grupo externo se utilizó <i>Fusarium oxysporum</i> CBS 132475 y <i>Fusarium inflexum</i> NRRL 20433.	30
Figura 15. Prevalencia (%) de las especies de <i>Fusarium</i> que infectaron las muestras de sorgo durante 2016 y 2017. FSAMSC: complejo de especies de <i>Fusarium sambucinum</i> ; FFSC: complejo de especies de <i>Fusarium fujikuroi</i> ; FIESC: complejo de especies de <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> .	31
Figura 16. Incidencia (%) de las especies de <i>Fusarium</i> que infectaron las muestras de sorgo durante 2016 y 2017. FSAMSC: complejo de especies de <i>Fusarium sambucinum</i> ; FFSC: complejo de especies de <i>Fusarium fujikuroi</i> ; FIESC: complejo de especies de <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> .	32
Figura 17. Incidencia de <i>Fusarium</i> spp. en granos de sorgo según los distintos departamentos muestreados. FSAMSC: complejo de especies de <i>Fusarium sambucinum</i> ; FFSC: complejo de especies de <i>Fusarium fujikuroi</i> ; FIESC: complejo de especies de <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> . a: zafra 2016; b: zafra 2017.	33
Figura 18. Distribución de toxinas (%) presentes en las muestras positivas de la zafra 2016.	35
Figura 19. Distribución de toxinas (%) presentes en las muestras positivas de la zafra 2017.	35
Figura 20. a y b: macroconidios de <i>Fusarium graminearum</i> s.s., c: cultivo de <i>F. graminearum</i> s.s. en medio de cultivo PDA.	39

Figura 21. Biosíntesis de tricotecenos en <i>Fusarium graminearum</i> .	42
Figura 22. Modelo de biosíntesis de ZEA.	43
Figura 23. <i>Fusarium proliferatum</i> , a: fiálides y microconidios, b: microconidios en cabezuelas y en cadenas, c: cultivo en medio PDA.	44
Figura 24. Distribución del perfil toxicogénico (%) de 93 cepas de <i>Fusarium graminearum</i> s.s. obtenidas de granos de sorgo sobre granos de arroz.	51
Figura 25. Distribución del perfil toxicogénico (%) de 50 cepas de <i>Fusarium proliferatum</i> obtenidas de granos de sorgo sobre granos de arroz.	52
Figura 26. Cambio relativo de los niveles de expresión en el tiempo de A: gen <i>TRI5</i> , B: gen <i>TRI6</i> y C: gen <i>TRI10</i> . Los análisis de RT-qPCR de los genes mencionados se realizaron a las 48, 72, 96 y 144 horas luego de la inoculación con <i>Fusarium graminearum</i> s.s. en el medio con caldo de sorgo. Los niveles de expresión de los genes en medio con sorgo son relativos a los correspondientes niveles de expresión en medio control en los tiempos indicados. Como gen de referencia se utilizó EF1 α A. Los resultados se muestran como promedios \pm desvío estándar de 3 réplicas biológicas.	53
Figura 27. Cambio relativo de los niveles de expresión en el tiempo de A: gen <i>PKs4</i> y B: gen <i>PKs13</i> . Los análisis de RT-qPCR de los genes mencionados se realizaron a las 48, 72, 96 y 144 horas luego de la inoculación con <i>Fusarium graminearum</i> s.s. en el medio con caldo de sorgo. Los niveles de expresión de los genes en medio con sorgo son relativos a los correspondientes niveles de expresión en medio control en los tiempos indicados. Como gen de referencia se utilizó EF1 α A. Los resultados se muestran como promedios \pm desvío estándar de 3 réplicas biológicas	54
Figura 28. Efecto de diferentes actividades hídricas y temperaturas sobre la velocidad de crecimiento de: a: <i>Fusarium graminearum</i> s.s. y b: <i>F. proliferatum</i> en sorgo.	63
Figura 29 a y b. Efecto de la temperatura y la actividad hídrica (a_w) sobre la velocidad de crecimiento de <i>Fusarium graminearum</i> s.s. en granos de sorgo. Representado en una gráfica tridimensional (a) y un mapa de contorno bidimensional donde los números indican la velocidad de crecimiento en milímetros/día (b).	64

Figura 30 a y b. Efecto de la temperatura y la actividad hídrica (a_w) sobre la producción de DON por *Fusarium graminearum* s.s. en granos de sorgo. Representado en una gráfica tridimensional (a) y un mapa de contorno bidimensional donde los números indican la concentración de toxina producida en $\mu\text{g/g}$ (b). 65

Figura 31 a y b. Efecto de la temperatura y la actividad hídrica (a_w) sobre la producción de 15-AcDON por *Fusarium graminearum* s.s. en granos de sorgo. Representado en una gráfica tridimensional (a) y un mapa de contorno bidimensional donde los números indican la concentración de toxina producida en $\mu\text{g/g}$ (b). 65

Figura 32 a y b. Efecto de la temperatura y la actividad hídrica (a_w) sobre la producción de 3-AcDON por *Fusarium graminearum* s.s. en granos de sorgo. Representado en una gráfica tridimensional (a) y un mapa de contorno bidimensional donde los números indican la concentración de toxina producida en $\mu\text{g/g}$ (b). 66

Figura 33 a y b. Efecto de la temperatura y la actividad hídrica (a_w) sobre la producción de NIV por *Fusarium graminearum* s.s. en granos de sorgo. Representado en una gráfica tridimensional (a) y un mapa de contorno bidimensional donde los números indican la concentración de toxina producida en $\mu\text{g/g}$ (b). 66

Figura 34 a y b. Efecto de la temperatura y la actividad hídrica (a_w) sobre la producción de ZEA por *Fusarium graminearum* s.s. en granos de sorgo. Representado en una gráfica tridimensional (a) y un mapa de contorno bidimensional donde los números indican la concentración de toxina producida en $\mu\text{g/g}$ (b). 67

Figura 35. Efecto de la temperatura y la actividad hídrica (a_w) sobre la velocidad de crecimiento de *Fusarium proliferatum* en granos de sorgo. Representado en una gráfica tridimensional (a) y un mapa de contorno bidimensional donde los números indican la velocidad de crecimiento en milímetros/día (b). 68

Figura 36 a y b. Efecto de la temperatura y la actividad hídrica (a_w) sobre la producción de FB1 por *Fusarium proliferatum* en granos de sorgo. Representado en una gráfica tridimensional (a) y un mapa de contorno bidimensional donde los números indican la concentración de toxina producida en $\mu\text{g/g}$ (b).

69

Figura 37 a y b. Efecto de la temperatura y la actividad hídrica (a_w) sobre la producción de FB2 por *Fusarium proliferatum* en granos de sorgo. Representado en una gráfica tridimensional (a) y un mapa de contorno bidimensional donde los números indican la concentración de toxina producida en $\mu\text{g/g}$ (b).

70

Agradecimientos

A mi hijo Manuel por apoyarme y acompañarme día a día

A mi familia, a mi compañero Carlos y a mis amigas todas por sus valiosos consejos y darme siempre para adelante

A mi tutora Dinorah Pan por confiar en mí, apoyarme desde lo académico a lo personal y por enseñarme tanto

A mi cotutora Inés Ponce de León por sus valiosos aportes

A mis compañeras de trabajo: Agustina del Palacio, María Oliver y Eyllin Mena por compartir sus conocimientos

A mis compañeras y compañeros del proyecto dentro del cual se enmarcó mi tesis: Susana Tiscornia, Macarena Simoens, Jaqueline Cea, Inés de Aurrecochea, Inés Martínez, Blanca Gómez, Fernando Villamarzo, Ana Ureta, Alicia Sánchez y Silvina Stewart

A las integrantes de la Sección Micología por su colaboración y momentos compartidos

Al tribunal Sabina Vidal, Federico Battistoni y Silvia Pereyra que aceptaron evaluar la tesis, cuyos aportes y sugerencias permitirán mejorar el trabajo

A PEDECIBA, ANII, CSIC y CAP que aportaron fondos para financiar mis estudios de posgrado

RESUMEN

Las especies de *Fusarium* se encuentran entre los patógenos más comunes que afectan a cultivos agrícolas en todo el mundo. En *Sorghum bicolor* L. Moench, ocasionan importantes pérdidas económicas debido a que producen daños a nivel de tallo y de granos generando una disminución en el rendimiento del cultivo y menor calidad de la semilla. Además, muchas especies son capaces de producir en el grano metabolitos secundarios tóxicos (micotoxinas) por lo que generan un riesgo para la salud humana y animal. En Uruguay, se ha detectado la presencia de *Fusarium* spp. y sus micotoxinas en sorgo, pero la información sigue siendo muy escasa. El objetivo del trabajo fue caracterizar las especies de *Fusarium* presentes en granos de sorgo de Uruguay en dos zafra consecutivas. Para ello, se analizaron 167 muestras de sorgo correspondientes a las cosechas 2016 y 2017. Las especies de *Fusarium* aisladas se identificaron por sus características morfológicas y análisis de la secuencia del factor de elongación (EF). Las principales especies identificadas fueron *F. graminearum sensu stricto* (*F. graminearum* s.s), *F. proliferatum*, *F. andiyazi*, *F. fujikuroi* y *F. thapsinum*. A un total de 115 muestras se les realizó además la detección y cuantificación, mediante HPLC, de las toxinas deoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), zearalenona (ZEA) y fumonisinas (FB1 y FB2). El 95% de las muestras presentaron contaminación con al menos una toxina, siendo las principales detectadas DON y ZEA. La capacidad toxicogénica de los aislamientos de *F. graminearum* s.s. y *F. proliferatum*, se determinó inoculando cada cepa en bolsas con arroz e incubando a 25°C durante 28 días. El 92% de los aislamientos de *F. graminearum* s.s fueron capaces de producir ZEA, el 88% DON y el 6% NIV. El 76% y el 64% de los aislamientos de *F. proliferatum* fueron capaces de producir FB1 y FB2, respectivamente. En base a estos resultados, se evaluó mediante qRT-PCR la expresión de los genes *TRI5*, *TRI6* y *TRI10* de *F. graminearum* s.s. implicados en la biosíntesis de DON y NIV, y de los genes *PKS4*, *PKS13* involucrados en la síntesis de ZEA, en medio de cultivo líquido en presencia y ausencia de sorgo. Se observaron diferencias en la expresión de todos los genes evaluados a diferentes tiempos en presencia de sorgo comparado con el control. Las cepas fueron caracterizadas además en base a sus requerimientos ecofisiológicos, para ello se seleccionaron 3 cepas de *F. graminearum* s.s. y 3 de *F. proliferatum* y se evaluó el efecto de la temperatura y la actividad hídrica (aw) sobre la velocidad de crecimiento micelial y la producción de micotoxinas. Se observó que tanto la aw como la temperatura afectaron el crecimiento y la producción de toxinas de *F. graminearum* s.s y de *F. proliferatum*. Las cepas fueron capaces de crecer en todas las condiciones ambientales ensayadas, pero presentaron una menor velocidad de crecimiento a 15 °C. El efecto de la temperatura, la aw y sus interacciones sobre la producción de micotoxinas fue muy variable y

dependió de cada micotoxina en particular, si bien en términos generales la aw fue el factor más influyente. Este es el primer trabajo que estudia las especies de *Fusarium* y las micotoxinas asociadas a cultivos de sorgo en Uruguay. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y el riesgo existente de contaminación con micotoxinas, resulta necesario continuar con el monitoreo de las especies fúngicas toxicogénicas y establecer reglamentaciones para micotoxinas en sorgo. A su vez, resulta importante desarrollar estrategias de manejo a campo que minimicen la infección fúngica y la contaminación con micotoxinas en los cultivos de sorgo para mejorar la inocuidad de los alimentos.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. *Sorghum bicolor* (L.) Moench

El sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) es un cultivo originario de África y Asia, pero actualmente se encuentra distribuido por todo el mundo (Alves dos Reis et al., 2010). El sorgo pertenece a la familia Poaceae, tribu Andropogoneae, subtribu Sorghinae y género *Sorghum* Moench. Este género comprende aproximadamente 28 especies de las que sólo una, *S. bicolor*, es cultivada para el consumo humano y animal (Astoreca, Emateguy y Alconada, 2019). A nivel mundial, es el quinto cultivo de cereales más importante después del trigo, arroz, maíz y cebada. Actualmente, se estima que el área plantada de sorgo en el mundo ronda las 44 millones de hectáreas con una producción de 62,5 millones de toneladas y una productividad de 1,6 toneladas/ha (Badigannavar et al., 2018). Los principales países productores de sorgo son Estados Unidos, India, México, Nigeria, Sudán, Etiopía y Australia, representando el 77% de la producción mundial (Figura 1). Aproximadamente el 48% de la producción mundial de sorgo es utilizada para alimentación animal, mientras que su uso para alimentación humana es de aproximadamente un 35% y el porcentaje restante es utilizado con fines no alimentarios. En este sentido, el uso de sorgo en la industria alimentaria ha crecido en los últimos años con el descubrimiento de los beneficios para la salud asociados a su consumo y se incluye como ingrediente en alimentos saludables o como sustituto de otros cereales, por ejemplo, en alimentos aptos para celíacos. El sorgo presenta compuestos bioactivos, principalmente compuestos fenólicos, que han mostrado producir cambios benéficos en parámetros relacionados con enfermedades como obesidad, diabetes, dislipidemia, enfermedades cardiovasculares, cáncer e hipertensión (de Morais Cardoso et al., 2017).

Además del grano, la planta de sorgo se utiliza para forraje verde, debido a su rápido crecimiento, alto rendimiento y buena calidad de forraje (Astoreca, Emateguy y Alconada, 2019).

Por otro lado, el sorgo también es utilizado con fines no alimentarios como para producción de biocombustibles, bioenergía, biogás y bioetanol, así como para materiales de construcción, leña, ceras, tintes y aceite vegetal (Coetzee, 2015; Whitfield, Chinn y Veal, 2012; Reddy et al., 2010).

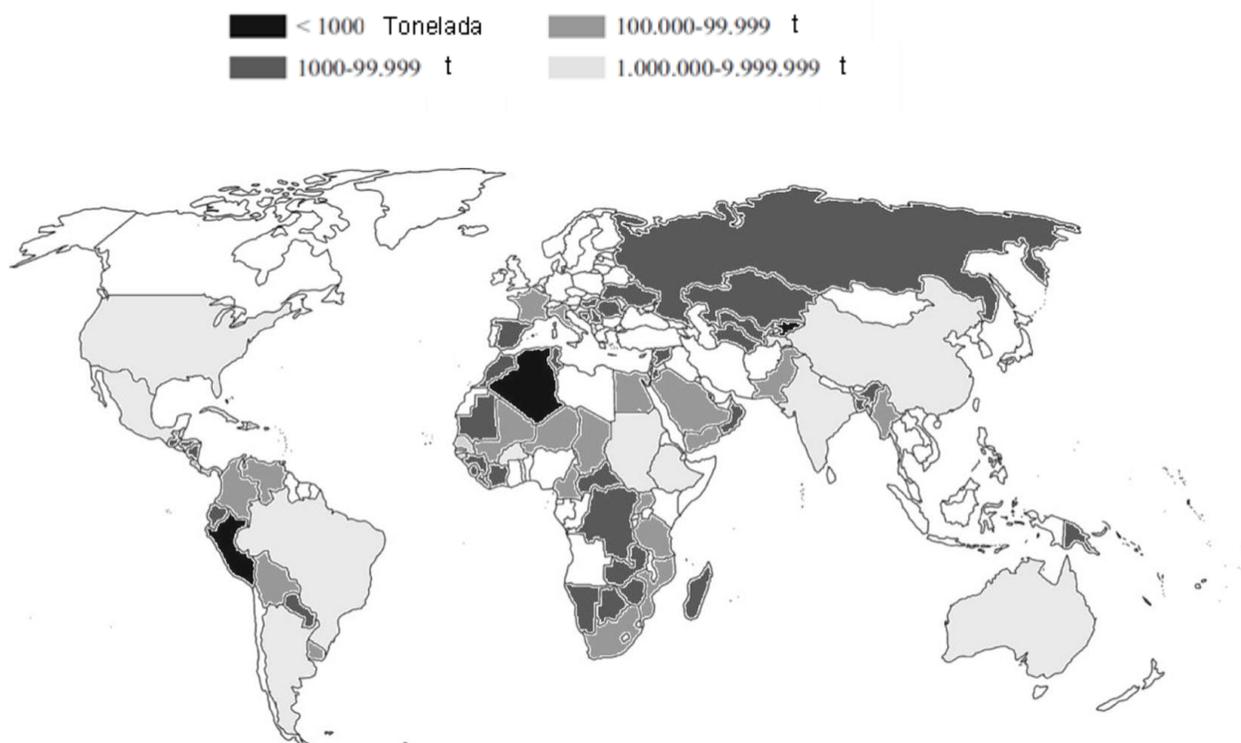


Figura 1. Principales países productores de sorgo. Tomado y modificado de Astoreca, Emateguy y Alconada (2019).

El sorgo presenta características agronómicas favorables para su cultivo como el tiempo de cosecha, la capacidad de crecer en regiones áridas, es fotosintéticamente eficiente y tolerante a la sequía y al estrés por calor. Existen diferentes variedades de sorgo y éstas tienen distintos requerimientos, en general la temperatura óptima de crecimiento es por encima de los 25 °C, pero algunas variedades se adaptan a temperaturas más bajas. Las variedades de ciclo corto tardan entre 90 y 110 días en madurar, mientras que las variedades de ciclo medio tardan entre 110 y 140 días (Figura 2). Si las temperaturas diarias se encuentran cercanas a los 15 °C el cultivo puede demorar de 250 a 300 días en madurar o si las temperaturas son menores pueden generarse problemas en la maduración y la planta solo será útil con fines forrajeros. El cultivo se desarrolla bien en la mayoría de los suelos, es moderadamente tolerante a la salinidad y a períodos cortos de anegamiento (<https://www.fao.org/land-water/databases-and-software/crop-information/sorghum/en/>).

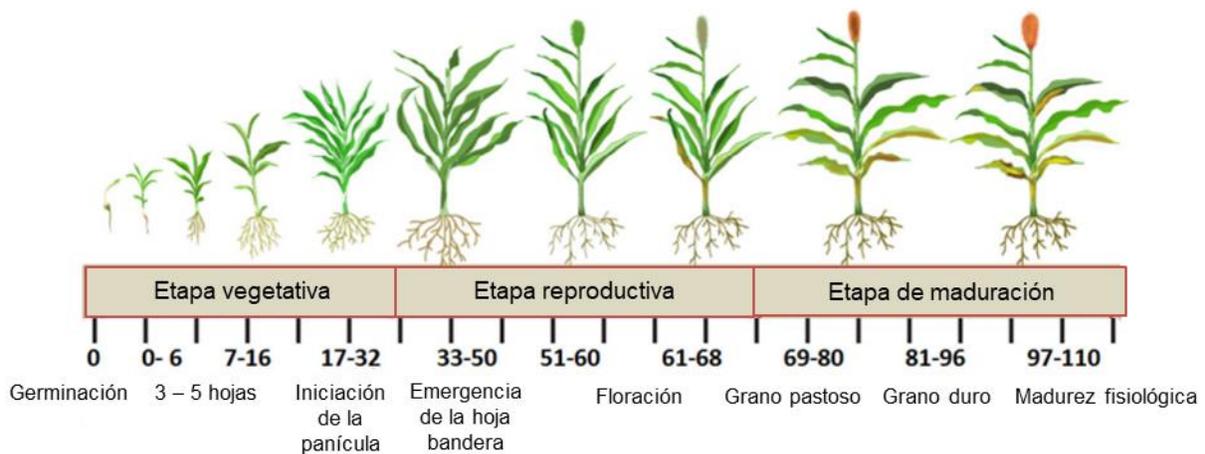


Figura 2. Ciclo de vida de *Sorghum bicolor* con sus diferentes etapas de crecimiento: etapa vegetativa, etapa reproductiva y etapa de maduración. Tomado y modificado de Badigannavar et al. (2018)

Las variedades de sorgo presentan diferencias en la forma, tamaño y color del grano que varía de blanco a tonos de rojo, negro y marrón. El peso de 1000 granos tiene un rango de valores muy amplio, pero en la mayoría de las variedades se encuentra entre 25 y 30 g (<https://www.fao.org/3/t0818e/T0818E01.htm#Sorghum>).

El grano de sorgo presenta tres estructuras anatómicas distintas, el pericarpio, el endospermo y el germen, dado que es del tipo cariósipide, el pericarpio está completamente fusionado con el endospermo (Figura 3). Algunas variedades tienen además una testa, ubicada entre el pericarpio y el endospermo. La proporción y composición química de estas estructuras dependen de la variedad de sorgo y de las condiciones de cultivo (de Morais Cardoso et al., 2017). En términos generales, los componentes del grano son almidón (55,6–75,2%), carbohidratos totales (57,0–80,6%), proteínas (4,4–21,1%), lípidos (2,1–7,6%), fibra (1,0–3,4%) y minerales, vitaminas y aminoácidos (Khalid et al., 2022). El pericarpio y la testa contienen polisacáridos, compuestos fenólicos (3-desoxiantocianidinas, taninos y ácidos fenólicos) y carotenoides; el endospermo contiene el almidón, las proteínas, las vitaminas del complejo B y minerales y el germen contiene lípidos, vitaminas liposolubles, vitaminas del complejo B y minerales (de Morais Cardoso et al., 2017). Los sorgos blancos se caracterizan por no presentar taninos ni antocianinas detectables y por tener bajos niveles de fenol, los sorgos rojos no presentan taninos y tienen un pericarpio con niveles significativos de fenoles extraíbles, los sorgos negros tienen niveles muy altos de antocianinas y los sorgos marrones tienen diversos grados de pigmentación (Khalid et al., 2022).

Los pigmentos responsables del color del grano de sorgo tienen importantes implicancias nutricionales y en particular los taninos son de considerable interés nutricional (Taylor y Emmambux, 2008). Por un lado, los taninos tienen efectos benéficos para la salud debido a acciones inmunomoduladoras, anticancerígenas, antioxidantes, antirradicales, antiinflamatorias, vasodilatadoras, cardioprotectoras, antitrombóticas y anti-UV. Sin embargo, se ha visto que forman complejos con minerales, proteínas, y almidón del sorgo reduciendo su disponibilidad, además pueden unirse a enzimas digestivas como proteasas y amilasas e inactivarlas. La concentración de taninos del sorgo varía de 0,2 a 48,0 mg/g, siendo el sorgo negro el que presenta mayores niveles de taninos (Khalid et al., 2022; de Morais Cardoso et al., 2017; Taylor y Emmambux, 2008). Estos metabolitos secundarios, además actúan en la planta como mecanismo de defensa contra patógenos y depredadores (Kaufman et al., 2013).

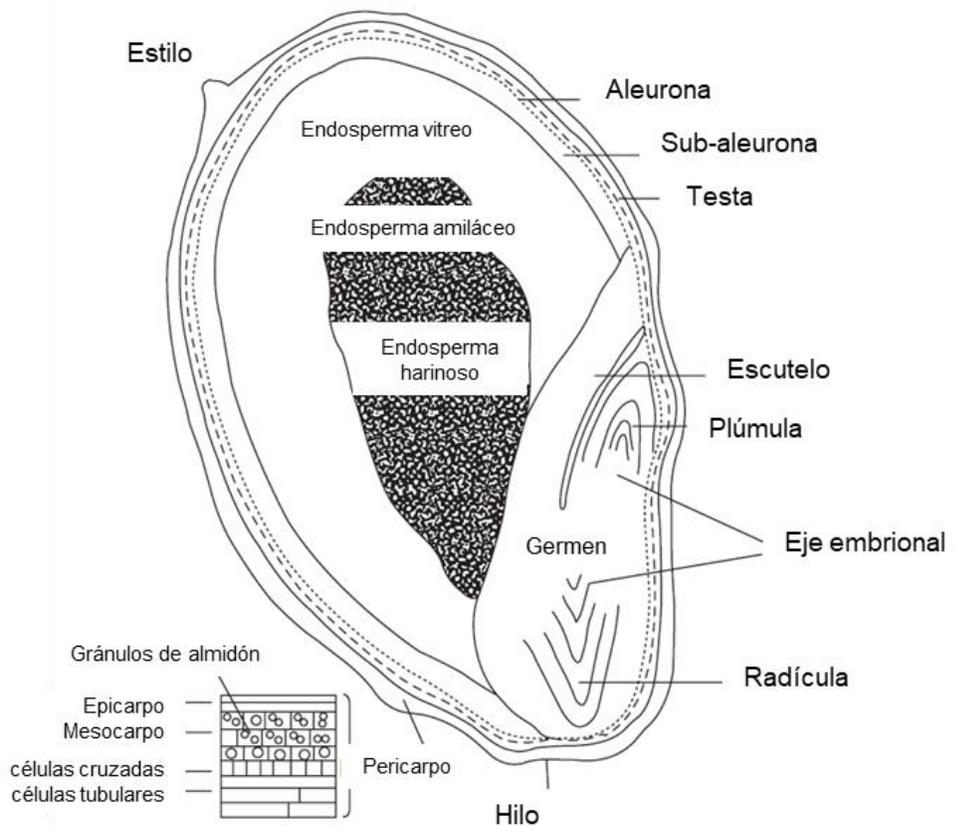


Figura 3. Diagrama de un corte transversal de un grano de sorgo. Tomado y modificado de Taylor y Emmambux (2008).

A pesar de la buena adaptación del cultivo a diferentes ambientes y a su capacidad para resistir condiciones adversas, como el estrés hídrico y las altas temperaturas, la producción de sorgo se encuentra limitada por factores bióticos, como el ataque por hongos, bacterias patógenas, virus, parásitos y/o insectos. En particular, la contaminación con hongos genera importantes pérdidas económicas a nivel mundial. Los hongos patógenos afectan el crecimiento y la productividad del sorgo, pudiendo estar presentes en el exterior o el interior de los tejidos de la planta (Astoreca, Emateguy y Alconada, 2019). Dentro de las principales enfermedades fúngicas que afectan al sorgo se incluyen el cornezuelo, antracnosis, manchas y tizones foliares, royas, enfermedades de plántulas causantes de “damping-off” y mohos de los granos (Coetzee, 2015). Se conocen más de 40 géneros de hongos que ocasionan la contaminación de los granos, donde se incluye *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Curvularia* spp., *Colletotrichum* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Phoma* spp. (Sharma et al., 2011; Alves dos Reis et al., 2010). Dependiendo de la comunidad fúngica presente, de las condiciones ambientales y del estado y etapa del desarrollo de la planta será la gravedad de la enfermedad.

1.2. *Fusarium* spp.

Fusarium spp. (Sordariomycetes: Hypocreales: Nectriaceae) es un género muy diverso capaz de colonizar distintos ambientes, desde áreas tropicales y templadas hasta zonas con condiciones climáticas extremas, como desiertos, regiones alpinas y árticas. *Fusarium* spp. se encuentra comúnmente en plantas y suelo como parásitos, endófitos o saprotrofos (Rana et al., 2017). Las especies de *Fusarium* fitopatógenas se caracterizan por tener un amplio rango de hospederos, involucrando a muchas de las familias de plantas de importancia económica (Voigt, 2002). En particular, se encuentran entre los patógenos más comunes que afectan a cultivos agrícolas en todo el mundo, generando importantes pérdidas económicas no solo por la disminución en el rendimiento del cultivo, sino que además son capaces de producir micotoxinas, metabolitos secundarios, que son dañinos tanto para humanos como para animales que consumen los granos contaminados. En sorgo, *Fusarium* spp. ocasionan podredumbre de tallo y de granos, generando una disminución en el rendimiento, menor calidad de la semilla y menor vigor, y granos contaminados con micotoxinas (Pena, Cavaglieri y Chulze, 2019). Las principales especies de *Fusarium* asociadas a granos de sorgo a nivel mundial pertenecen al complejo *Fusarium fujikuroi* (FFSC, en inglés: *Fusarium fujikuroi* species complex). Entre ellas se encuentran *F. andiyazi*, *F. proliferatum*, *F. thapsinum* y *F. verticillioides*. Estas especies son productoras de micotoxinas del tipo: fumonisinas, moniliformina, beauvericina y fusaproliferina.

También son frecuentes especies del complejo *Fusarium sambucinum* (FSAMSC, en inglés: *Fusarium sambucinum* species complex), principalmente *F. graminearum sensu lato*, capaces de producir tricotecenos (Pena, Cavaglieri y Chulze, 2019, Divakara et al., 2014, Sharma et al., 2011). Las diferentes especies de *Fusarium* difieren en su biología y en el tipo de esporas que originan, pudiendo producir ascosporas de origen sexual y/o conidios de origen asexual, y algunas especies también son capaces de producir clamidosporas. Esto a su vez, puede influenciar en cómo se distribuyen las especies dentro de los agroecosistemas, ya que las esporas están involucradas en la dispersión, sobrevivencia y colonización de la planta. Las ascosporas son liberadas de los peritecios por mecanismos activos y pueden ser transportadas largas distancias por el viento, los conidios se dispersan por mecanismos pasivos y dependen del viento o la lluvia para su liberación. Las esporas a su vez pueden ser dispersadas a mayores distancias al ser transportadas por animales o como consecuencia de la actividad humana. La infección de los granos puede ocurrir por colonización de los tejidos florales durante la anthesis (infección temprana) y posterior colonización del endospermo y pericarpio, o más tardíamente infectando al grano en desarrollo (Figura 4). También puede ocurrir la colonización del grano después de alcanzada la madurez, pero en general la infección queda restringida al pericarpio externo. La infección temprana es responsable principalmente de granos de baja calidad, incluyendo llenado del grano, textura del endospermo y pudrición de la semilla, granos pequeños y malformados o abortados. Los granos infectados pueden presentar síntomas evidentes de enfermedad o parecer asintomáticos. El inóculo de *Fusarium* spp. que origina la infección puede encontrarse en residuos de cultivos contaminados, en el suelo, puede ser introducido en semillas infectadas o por la misma dispersión de las esporas (Karlsson, Persson y Friberg, 2021; Van Rooyen, 2019).

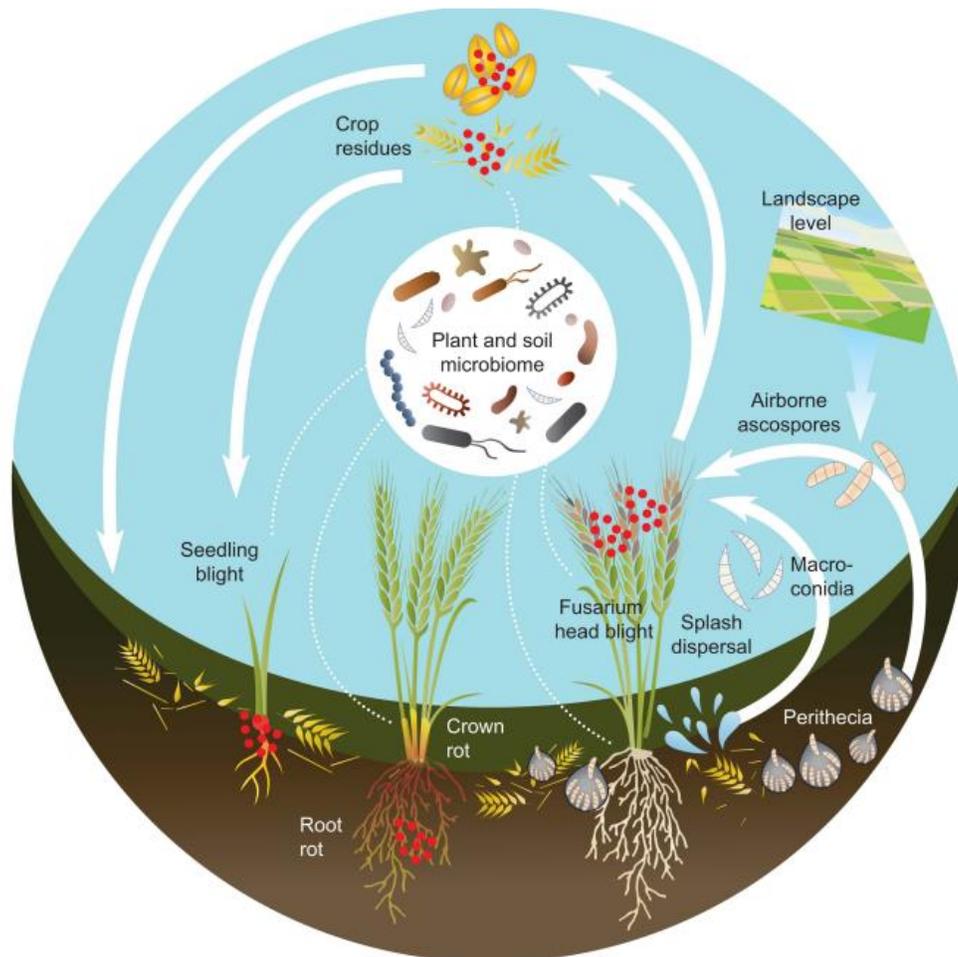


Figura 4. Ciclo de enfermedades producidas por *Fusarium* spp. en cereales, ejemplificado según el ciclo de vida de *Fusarium graminearum* (*) sobre trigo. Tomado de Karlsson, Persson y Friberg (2021).

1.3 Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de bajo peso molecular producidos por una diversidad de hongos y se caracterizan por tener un efecto tóxico en vertebrados y otros grupos de animales, aún en bajas concentraciones. Muchas micotoxinas además de presentar toxicidad en animales también son tóxicas para plantas y microorganismos (Bennett, 1987).

Las micotoxinas generalmente se producen en el último tramo de la fase exponencial o durante la fase estacionaria de crecimiento del hongo (Zain, 2011; Sweeney y Dobson, 1998). Existen varios factores que determinan la producción de micotoxinas, como ser las características

intrínsecas de cada cepa, la disponibilidad de nutrientes, la disponibilidad de agua, la temperatura, la interacción con otros microorganismos, entre otros. Es así que la presencia de una especie fúngica no implica necesariamente la presencia de la o las micotoxina/s que es capaz de producir dicha especie. Por otro lado, sí es posible detectar la toxina sin la presencia del hongo, ya que éstas pueden persistir en el ambiente por largos períodos de tiempo, aún si el hongo ha muerto (Velluti, 2002).

Se han identificado más de 500 micotoxinas, con diversas estructuras químicas y orígenes biosintéticos (policétidos, terpenos, derivados de aminoácidos). Sin embargo, no todas han sido estudiadas en profundidad y la investigación se ha centrado en las que presentan alta toxicidad o han mostrado ser cancerígenas (Awuchi et al., 2021; Zain, 2011). Dada su diversidad estructural, las micotoxinas actúan de diversas formas sobre las células, algunas interfieren con la síntesis de proteínas, inducen la muerte celular apoptótica, inducen el estrés oxidativo, inducen cambios en la expresión de genes como los involucrados en la desintoxicación, la fosforilación oxidativa, la producción de energía, la proliferación celular, la respuesta inmune y el metabolismo. Esto ocasiona modificaciones en el citoesqueleto, en la diferenciación celular, en la síntesis de macromoléculas y en los procesos bioenergéticos (Cimbalo et al., 2020). En consecuencia, las micotoxinas pueden afectar el hígado, los riñones y el sistema nervioso e inmunológico y provocar efectos mutagénicos, carcinogénicos, teratogénicos, embriotóxicos, hepatotóxicos, nefrotóxicos, inmunotóxicos, estrogénicos, eméticos, alucinógenos o incluso la muerte (Cimbalo et al., 2020; Sweeney y Dobson, 1998).

Las enfermedades en animales producidas por las micotoxinas se denominan micotoxicosis. Los signos y síntomas de las micotoxicosis dependen de diversos factores como el tipo de micotoxina, la dosis y el período de exposición; la especie animal; la edad, sexo, estado nutricional y genética del individuo, entre otros (Abd-Elsalam y Rai, 2020; Cimbalo et al., 2020).

Teniendo en cuenta la dosis y el período de exposición, estas se pueden clasificar en agudas o crónicas. Las micotoxicosis agudas son producidas por el consumo de dosis relativamente altas de micotoxinas. En general, los síntomas aparecen rápidamente y, si la exposición continúa, puede ocasionar la muerte. Las micotoxicosis crónicas son producidas por el consumo prolongado de dosis relativamente bajas de micotoxinas y producen, generalmente, una sintomatología inespecífica que aparecen tarde en el tiempo (Cimbalo et al., 2020; Tola y Kebede, 2016).

Las micotoxicosis pueden generarse por el consumo de alimentos contaminados, el contacto de la piel con sustratos infectados y/o la inhalación de toxinas secretadas por las esporas (Abd-El salam y Rai, 2020).

Las micotoxinas generan pérdidas económicas importantes a nivel mundial, tanto en la salud humana y animal, como en productos agrícolas contaminados. Se estima que el 25% de las cosechas de cereales del mundo están contaminadas con micotoxinas (Alves dos Reis et al., 2010). Las micotoxinas pueden formarse en diversas etapas que van desde la fase de crecimiento de la planta y la cosecha, hasta el almacenamiento de los granos. Dentro de las principales micotoxinas que afectan a los cultivos se encuentran los tricotecenos, zearalenona y fumonisinas producidas por especies del género *Fusarium*, y aflatoxinas, ocratoxinas y patulina, producidas por especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (Cimbalo et al., 2020; Zain, 2011). El tipo de micotoxina presente y los niveles producidos dependen de factores bióticos y abióticos como las especies y cepas presentes en la planta, las condiciones ambientales y el manejo del cultivo.

El conocimiento sobre las especies toxicogénicas y las toxinas presentes en los cultivos de sorgo de Uruguay es escaso. Por esta razón, resulta importante conocer cuál es la situación en nuestro país y determinar si existen riesgos por el consumo de granos de sorgo contaminados.

2. HIPÓTESIS

Existen especies pertenecientes al género *Fusarium* capaces de infectar y/o producir micotoxinas en granos de sorgo de Uruguay.

Las cepas de *Fusarium* spp. tienen distintos requerimientos ambientales para su desarrollo y producción de micotoxinas.

3. OBJETIVO GENERAL

Identificar las especies de *Fusarium* presentes en los granos de sorgo de Uruguay, conocer la producción de micotoxinas por estas especies en sorgo y caracterizar a las principales especies encontradas.

4. CAPÍTULO 1.

Fusarium spp. PATÓGENAS DE SORGO Y SUS TOXINAS ASOCIADAS

4.1. Introducción

En Uruguay, el área cultivada y la producción de sorgo ha ido disminuyendo a partir de la zafra 2015/16, sin embargo, se ha mantenido estable en los últimos 5 años. En la zafra 2021/22 la superficie total sembrada, para grano seco y grano húmedo se estimó en 55 mil hectáreas, de las cuales 19,4 mil se destinaron para cosecha de grano seco y 35,5 mil hectáreas para grano húmedo, mientras que la producción total de grano seco y húmedo fue de 216 mil toneladas (Figura 5). En esta zafra si bien la superficie sembrada fue menor que la zafra anterior, se obtuvieron mejores rendimientos, lo que compensó la producción total. La productividad del sorgo se encuentra en el entorno de 4000 kg/ha y se ha mantenido aproximadamente constante en los últimos 10 años (Methol y Pizzanelli, 2022).

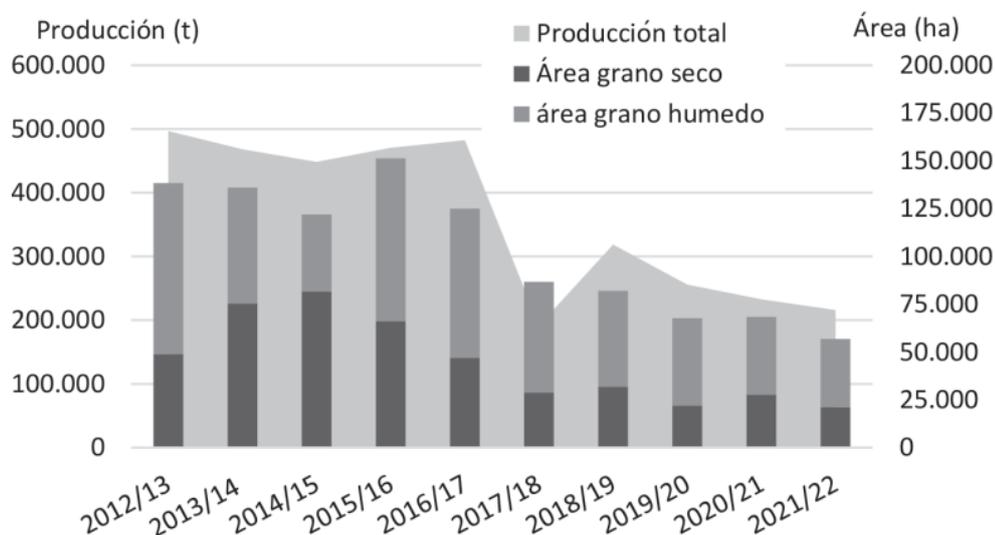


Figura 5. Superficie sembrada de sorgo. Tomado de Methol y Pizzanelli (2022).

Por otro lado, los precios internacionales de granos forrajeros se mantienen altos y en particular en el sorgo se estimó un margen del orden de 300 US\$/ha antes de renta, con un aumento del 26% al comparar el precio durante el periodo de cosecha (marzo a julio) con la zafra anterior (Figura 6). La guerra entre Rusia y Ucrania, importantes productores mundiales de granos, favorece el alza de precios ya que se genera incertidumbre en la producción y comercialización de los granos. Además, la producción de etanol a nivel mundial como energía renovable ha ido en aumento en los últimos años. En particular,

en Uruguay en el periodo 2019-2021 el procesamiento de granos para la elaboración de etanol fue de 123.000 toneladas, observándose un aumento del 48% respecto al periodo anterior. Sumado a ésto, Uruguay firmó con China un protocolo para exportación de sorgo, lo que podría generar un aumento en la superficie sembrada de las próximas zafas. En China el principal destino del grano de sorgo es para consumo animal y humano (Methol y Pizzanelli, 2022). La exportación de sorgo debe cumplir con las normas y requisitos fitosanitarios de importación a China, además de otras normas y requisitos relativos a la inocuidad y calidad de alimentos y raciones que pueden aplicarse para Uruguay (<https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/protocolo-requisitos-fitosanitarios-para-exportacion-sorgo-uruguay-china>).

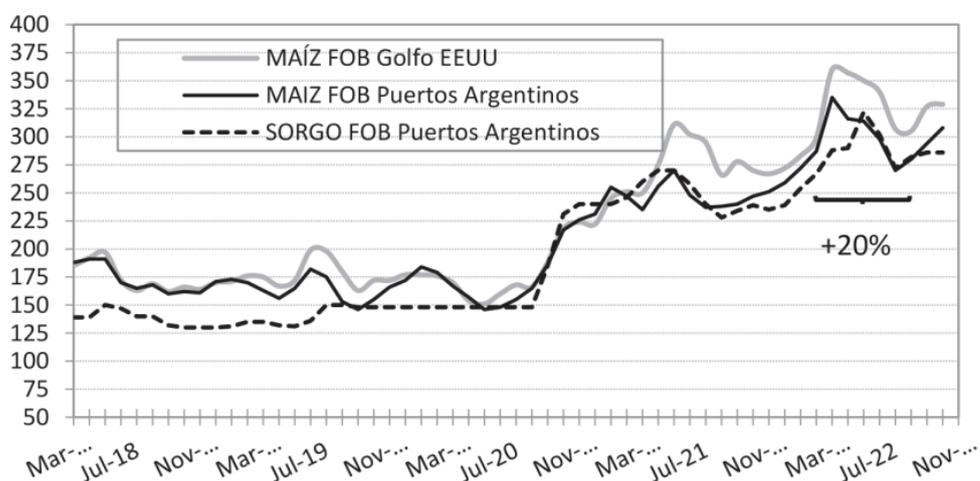


Figura 6. Precios de exportación de maíz y sorgo (dólares por tonelada). Tomado de Methol y Pizzanelli (2022).

El género *Fusarium* está formado por un gran número de especies, muchas de las cuales son fitopatógenas y algunas además son toxicogénicas, lo que las coloca entre los patógenos vegetales más importantes a nivel mundial. Actualmente, se reconocen más de 400 especies filogenéticas dentro de este género monofilético, distribuidas en 23 linajes monofiléticos denominados complejos de especies (Figura 7). Utilizando el reconocimiento de especies filogenéticas basados en análisis multilocus (Multilocus Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition: GCPSR) se han identificado 2/3 del total de especies dentro del género *Fusarium*, quedando el tercio restante aún sin nombrar. La identificación a nivel de especie basada únicamente en características morfológicas no es posible debido a la ausencia de caracteres diagnóstico que distingan especies estrechamente emparentadas, por lo que se utiliza

en combinación con herramientas moleculares. Los genes más frecuentemente utilizados en *Fusarium* spp. incluyen regiones del factor de elongación de la traducción 1- α (TEF1) y dos subunidades de una ARN polimerasa (RPB1 y RPB2) (O'Donnell et al., 2022).

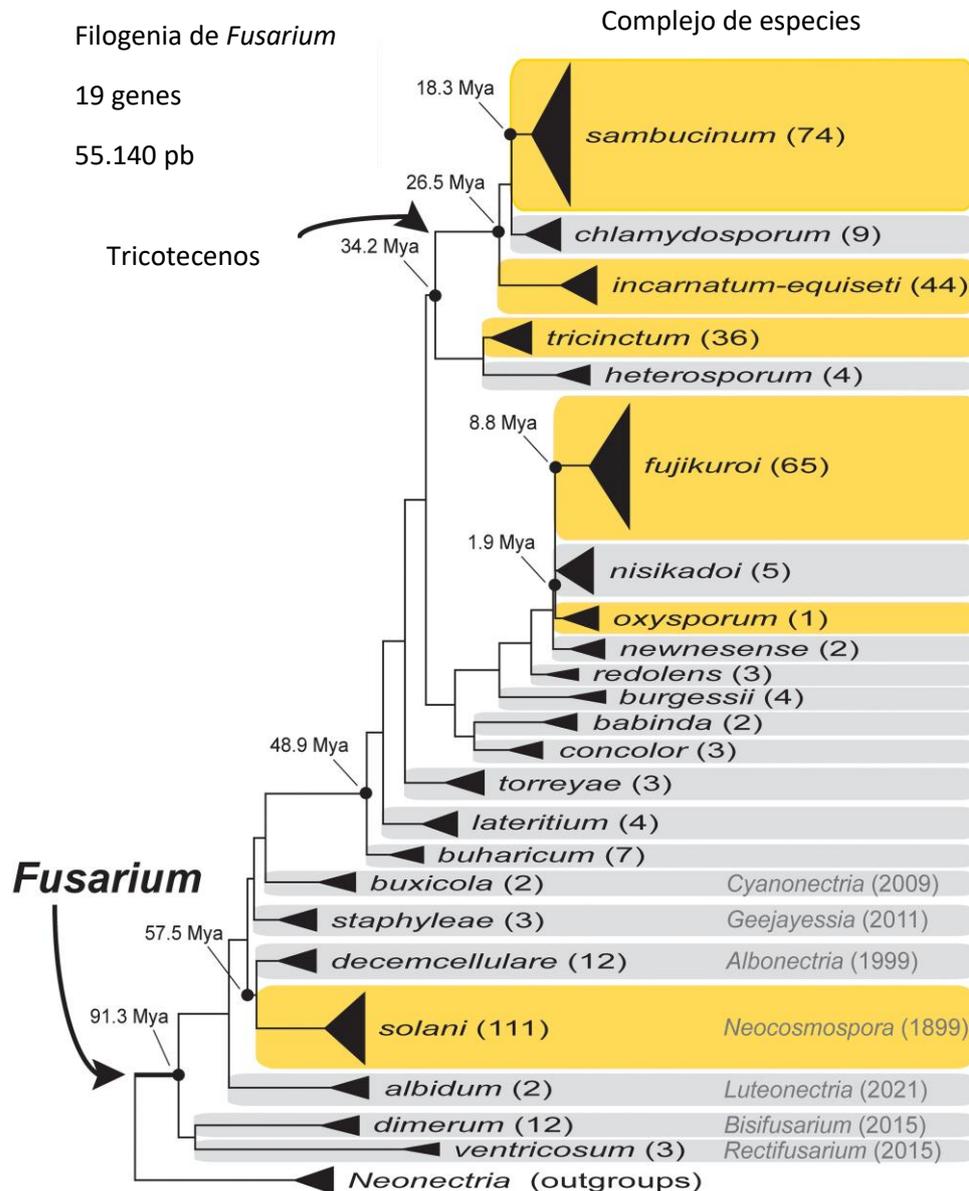


Figura 7. Filogenia de máxima verosimilitud de *Fusarium* spp., inferida a partir de secuencias exónicas de 19 genes codificadores de proteínas. Entre paréntesis se muestra el número de especies filogenéticamente distintas conocidas en cada complejo de especies. Se utilizaron secuencias de *Neonectria* para enraizar la filogenia. Mya: millones de años antes. Tomado y modificado de O'Donnell et al. (2022).

El género *Fusarium* es capaz de producir un gran número de micotoxinas químicamente diferentes y en consecuencia con diversos efectos tóxicos sobre animales. La correcta identificación de las especies es necesaria para determinar el riesgo potencial existente. Los tricotecenos son producidos por especies del complejo *Fusarium sambucinum* (FSAMSC, en inglés: *Fusarium sambucinum* species complex), del complejo *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC, en inglés: *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex) y por *Fusarium chlamydosporum*. Estos son sesquiterpenos que se agrupan en cuatro grupos A, B, C o D según su estructura química (Figura 8), siendo los tricotecenos de los grupos A y B producidos por especies del género *Fusarium*. Todos ellos se caracterizan por presentar una molécula de tres anillos conocida como 12,13-epoxitricotec-9-eno (Kimura et al., 2007). Son compuestos muy estables que resisten altas temperaturas, por lo que además de encontrarse en los granos también se detecta su presencia en alimentos procesados (Gab-Allah, Choi, Kim, 2023). Su biosíntesis diverge del metabolismo isoprenoide, donde se forma el compuesto tricodieno que luego mediante modificaciones consecutivas formará las diferentes toxinas (Kimura et al., 2007). Algunos tricotecenos han sido identificados como factores de virulencia en los cultivos de cereales. Además de afectar a las plantas, causan una variedad de efectos agudos y crónicos cuando son consumidos por animales, incluyendo a los humanos (Wang et al., 2022). En animales, inhiben la síntesis de proteínas y ocasionan efectos citotóxicos, inmunotóxicos (inmunosupresores o inmunoestimuladores), disturbios gastrointestinales, vómitos, diarrea, rechazo al alimento y anemia y afectan al sistema reproductivo en algunas especies animales (Astoreca, Emateguy y Alconada, 2019; Proctor et al., 2002). *Fusarium graminearum* sensu stricto (*F. graminearum* s.s.) es uno de los principales productores de tricotecenos tipo B. Estos incluyen al deoxinivalenol (DON o “vomitoxina”), o sus derivados monoacetilados (3-AcDON, 15-AcDON) y diacetilados (3,15-AcDON), y nivalenol (NIV). Estos tienen la capacidad de ser absorbidos por la vía tópica, además de la vía oral o respiratoria. Son capaces de generar afecciones en la piel, el tracto gastrointestinal, el hígado, los riñones, el sistema inmunológico y las células madre hematopoyéticas. La susceptibilidad a DON de animales sería: cerdos > ratones > ratas > aves de corral ≈ rumiantes. Por otro lado, la micotoxina nivalenol (NIV) es más tóxica que DON, para humanos y animales domésticos (Gab-Allah, Choi y Kim, 2023). De acuerdo con la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) los tricotecenos DON y NIV se clasifican como grupo 3, no cancerígeno para humanos (IARC, 1993).

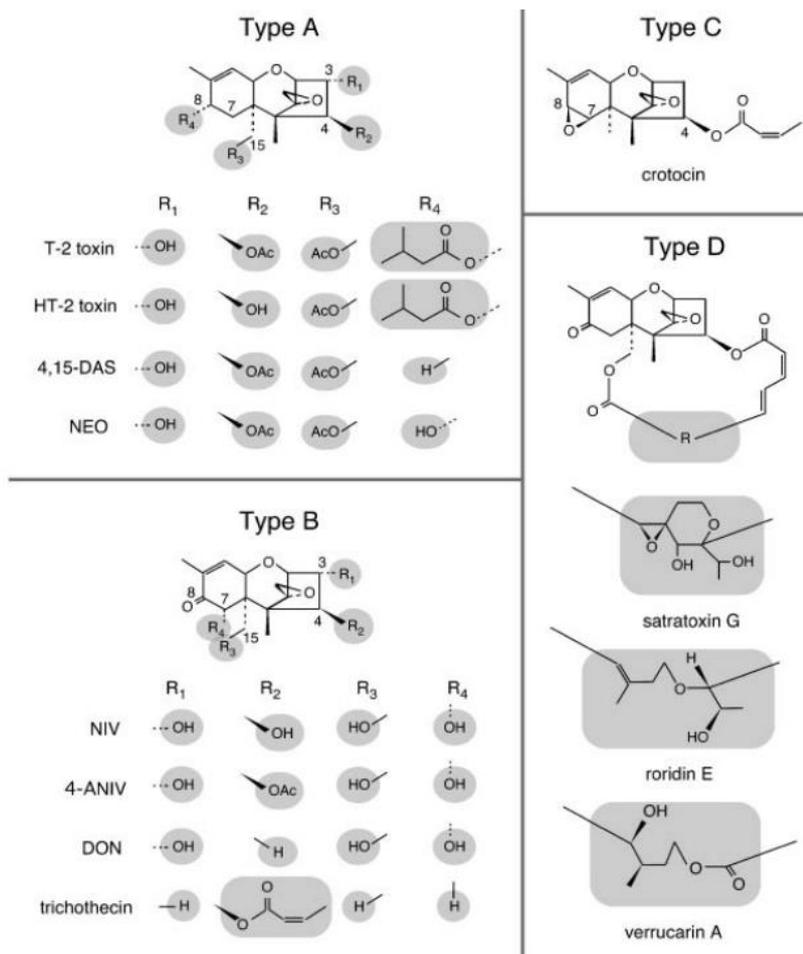


Figura 8. Estructura química de los distintos tipos de tricotecenos (A, B, C o D). Tomado de Kimura et al. (2007).

La zearalenona (ZEA) es una micotoxina estrogénica no esteroidea producida por especies del complejo FSAMSC, FIESC y por especies del complejo *Fusarium oxysporum* (FOSC, en inglés: *Fusarium oxysporum* species complex). Es una lactona del ácido resorcílico sintetizada a partir de la vía de policétidos. Se conocen 5 metabolitos de ZEA, el α -zearalenol (α -ZEA), β -zearalenol (β -ZEA), α -zearalanol (α -ZAL), β -zearalanol (β -ZAL) y zearalenona (ZON) (Figura 9), de los cuales α -ZEA tiene la mayor actividad estrogénica (Han et al., 2022; Rai, Dasa y Tripathia, 2019). La zearalenona puede ocasionar severos problemas reproductivos y de infertilidad, afectando a ambos sexos, además puede generar hepatotoxicidad (lesiones en el hígado y posterior desarrollo de cáncer), inmunotoxicidad, nefrotoxicidad, genotoxicidad (fragmentación de ADN, formación de micronúcleos, formación de aductos de ADN, aberración cromosómica y apoptosis) y posible carcinogenicidad. En dosis bajas ZEA interfiere con el sistema fisiológico, por su similitud al estrógeno y capacidad de unirse

a varios receptores estrogénicos, lo que afecta las funciones vitales del cuerpo (Han et al., 2022). ZEA es un carcinógeno potencial debido a sus efectos estrogénicos, sin embargo, la IARC lo clasifica como sustancia del Grupo 3 (IARC, 1993). La zearalenona y sus derivados han mostrado efectos en varios animales, siendo los cerdos y los rumiantes los más sensibles a los efectos tóxicos y las aves de corral las más resistentes. La actividad y efecto de ZEA depende del estado inmunológico del organismo y de su madurez reproductiva (Han et al., 2022; Ropejko, Twaruzek, 2021).

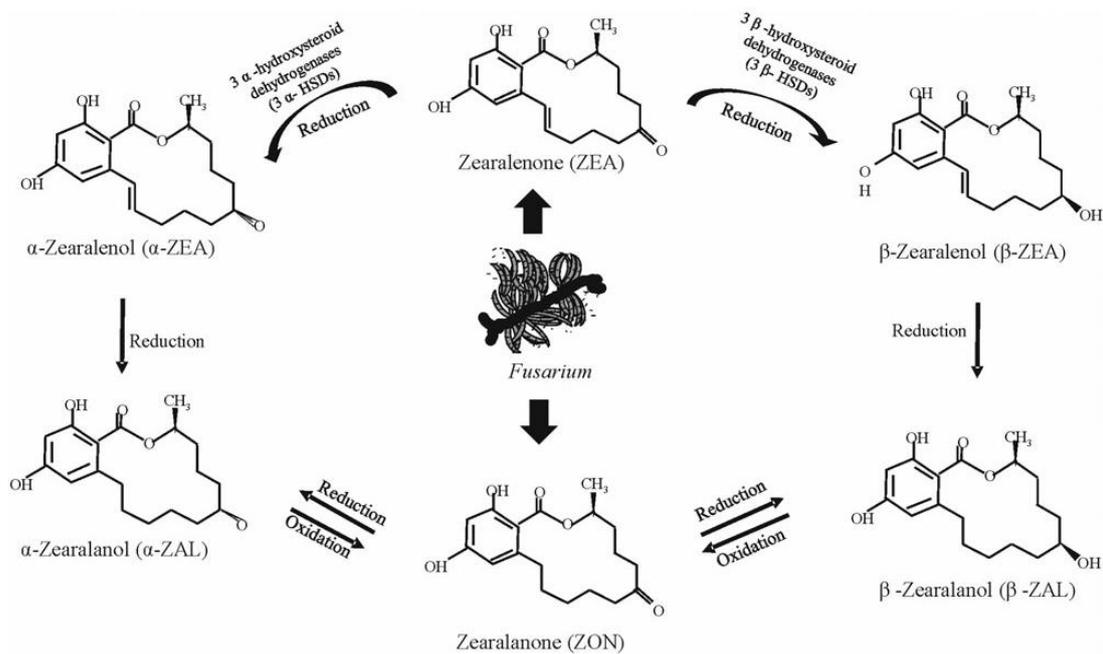


Figura 9. Estructura química de la zearalenona y sus derivados. Tomado de Rai, Dasa y Tripathia (2019).

Las fumonisinas son producidas por especies del complejo *Fusarium fujikuroi* (FFSC en inglés: *Fusarium fujikuroi* species complex). Es un di éster del ácido propano 1, 2, 3-tricarboxílico (TCA) con su origen biosintético a partir de los policétidos. Se conocen 28 análogos estructurales (FA1, FA2, FA3, PHFA3a, PHFA3b, HFA3, FAK1, FBK1, FB1, Iso-FB1, PHFB1a, PHFB1b, HFB1, FB2, FB3, FB4, FB5, FC1, N-acetil-FC1, Iso-FC1, N-acetil-iso-FC1, OH-FC1, N-acetil-OH-FC1, FC3, FC4, FP1, FP2 y FP3) que se agrupan en cuatro categorías A, B, C y P. Dentro de éstas, las fumonisinas del tipo B (Figura 10) son las más comúnmente encontradas en alimentos y la FB1 la que genera mayor toxicidad en animales y la más estudiada hasta el momento (Qu et al., 2022; Farhadi et al., 2021).

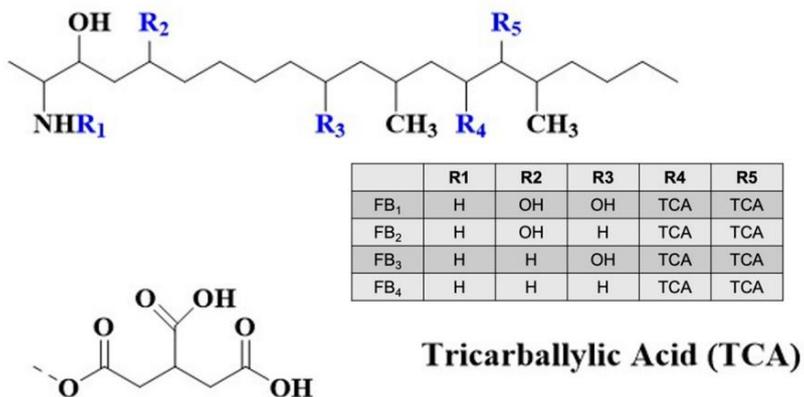


Figura 10. Estructura química de las fumonisinas del tipo B. Tomado de Wangia-Dixon y Nishimwe (2021).

La FB₁ tienen una estructura similar a la de los esfingolípidos y presenta un grupo amino en el segundo carbono que es el principal responsable de su toxicidad. Actúan alterando el metabolismo de esfingolípidos, lo que afecta la integridad de la membrana celular, vías de señalización y comunicación celular, el crecimiento celular, pudiendo incluso desencadenar la inducción de la apoptosis (Wangia-Dixona y Nishimwe, 2021). Las fumonisinas provocan cáncer y defectos del tubo neural en roedores de laboratorio, leucoencefalomalacia equina, edema pulmonar porcino, lesiones hepáticas y pancreáticas en cerdos y mascotas, inmunosupresión y pérdida de peso en aves y en otros animales de granja como ovejas, cabras y vacas provocan lesiones profundas en el hígado, el tracto gastrointestinal, el sistema nervioso y los pulmones. En humanos provocan defectos del tubo neural y cáncer de esófago (Farhadi et al., 2021). La IARC clasificó a las fumonisinas dentro del grupo 2B, como posible carcinógeno humano (IARC, 2002). Los signos clínicos asociados con la toxicidad de las fumonisinas varían entre las especies de animales dependiendo de su sensibilidad y el órgano objetivo, mientras que la gravedad de la enfermedad depende de la cepa y especie fúngica (Farhadi et al., 2021; Wangia-Dixona y Nishimwe, 2021).

Dado la escasa información en Uruguay sobre las especies de *Fusarium* asociadas a los cultivos de sorgo y las toxinas que pueden estar contaminando los granos, resulta de importancia conocer cuál es la situación en nuestro país y evaluar el riesgo que podría tener el consumo de este alimento.

4.2. Objetivos

- 1) Aislar e identificar las especies de *Fusarium* presentes en granos de sorgo de Uruguay en dos zafras.
- 2) Determinar las principales micotoxinas presentes en los granos.

4.3. Metodología

4.3.1. Obtención de muestras de sorgo

Se tomaron muestras de 2 kg aproximadamente de granos de sorgo al momento de cosecha según la norma ISO 24333 en dos zafra consecutivas. Se obtuvieron 95 muestras de sorgo correspondientes a la cosecha 2016: 7 muestras de Colonia, 5 de Flores, 47 de Paysandú, 27 de Río Negro, 2 de San José, 4 de Soriano y 3 que se desconoce su procedencia. A partir de la cosecha 2017 se obtuvieron 72 muestras: 3 muestra de Colonia, 1 de Flores, 13 de Paysandú, 27 de Río Negro, 18 de Soriano y 10 que se desconoce su procedencia (Figura 11). Las muestras fueron transportadas al Laboratorio de Micología de la Facultad de Ingeniería (Udelar) para su procesamiento. Cada muestra se fraccionó en dos submuestras de 1kg. Las submuestras utilizadas para la detección de micotoxinas se almacenaron a -20 °C y las utilizadas para aislamiento fúngico a 5 °C.

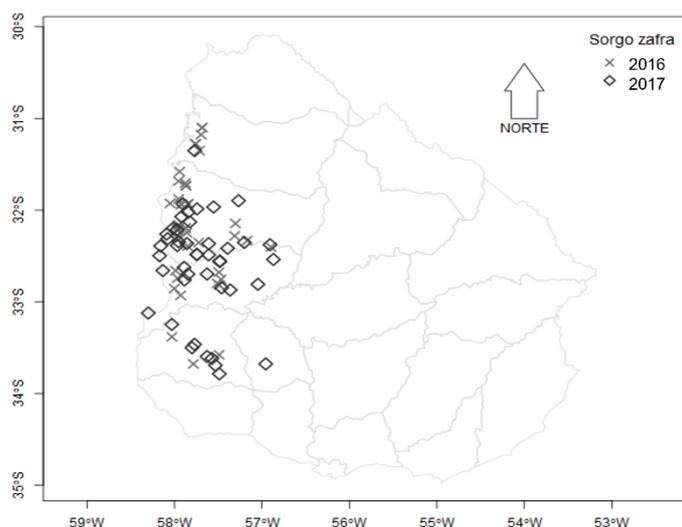


Figura 11. Mapa de Uruguay mostrando las zonas de colecta de muestras en la zafra 2016: x y 2017: ◊.

4.3.2. Aislamiento de las especies de *Fusarium*

A partir de cada muestra, se tomaron 100 granos y se desinfectaron superficialmente colocándolos en hipoclorito de sodio 0,4% durante 2 min, enjuague con agua destilada estéril y secado en papel de filtro estéril. Se colocaron en placas de Petri con medio papa dextrosa agar (PDA: extracto de papa 4 g/L, glucosa 20 g/L y agar 15 g/L)

(Oxoid™) y se incubaron a 24 ± 2 °C durante 5 días (Figura 12). Las colonias se identificaron morfológicamente a nivel de género y/o complejo de especies de *Fusarium* spp. (Leslie y Summerell, 2006) y se cuantificaron las colonias presentes en los granos de sorgo. Se observaron las características macro y micromorfológicas como ser: color, forma y textura de la colonia, color del envés de la colonia, tipo de conidiogénesis y disposición de los conidios, color, tamaño y forma de los conidios y forma de la célula conidiógena. Se obtuvieron cultivos puros de cada aislamiento mediante la realización de cultivos monospóricos. Para ello, se resuspendieron las esporas del cultivo en un tubo con agua destilada estéril y se volcó la suspensión de esporas en una placa de Petri conteniendo agar-agua 2%. Se dejó reposar un minuto para que se adhirieran los conidios al medio y se descartó el exceso de líquido. Las placas se incubaron a 24 ± 2 °C durante 24 hs en un plano inclinado y oscuridad. Luego en condiciones de esterilidad y bajo microscopio estereoscópico se transfirió una espora germinada a una placa de Petri conteniendo PDA y se incubó a 24 ± 2 °C. El micelio con esporas de los distintos aislamientos fue guardado en crioviales con agua destilada estéril a temperatura ambiente y en crioviales con glicerol 10% (v/v) a -80 °C en la colección del Laboratorio de Micología.

La prevalencia de *Fusarium* spp. se calculó como: (número de muestras con *Fusarium* spp. / total de muestras) x 100 y la incidencia como: (número de hongos de una especie o complejo de especies en cada grano / total de granos) x 100.

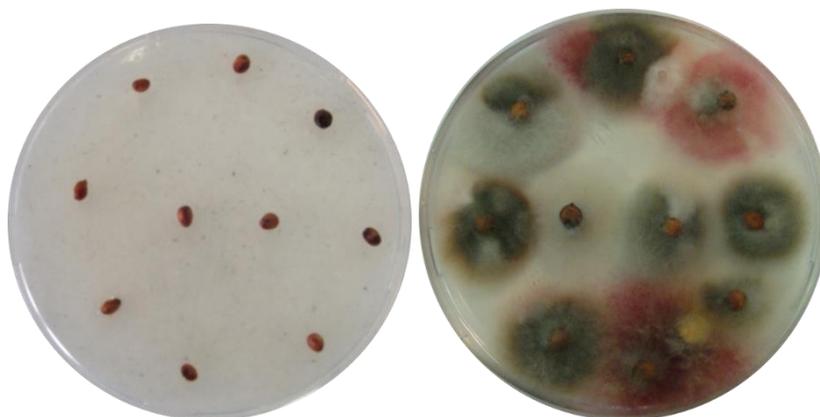


Figura 12. Izquierda: placa de Petri con PDA y granos de sorgo (día 0), derecha: placa con desarrollo fúngico sobre los granos (día 5).

4.3.3. Identificación molecular de las especies de *Fusarium*

Se seleccionó un porcentaje representativo de cada morfotipo para la identificación molecular, 223 aislamientos de la zafra 2016 y 221 de la zafra 2017. Se realizó la extracción de ADN empleando bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB) 2% (p/v) (Leslie

y Summerell, 2006). A partir de los cultivos monospóricos, se inoculó un matraz conteniendo extracto de levadura 0,3%, peptona 1% y dextrosa 2% (YEPD; en inglés: yeast extract peptone dextrose) y se incubó a 24 ± 2 °C en agitación a 150 rpm durante 3 días. Se filtró el micelio utilizando una bomba de vacío y se dejó secar a temperatura ambiente. Luego se machacó en mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se colocaron 200 mg en un eppendorf de 2 mL y se agregaron 750 μ L de buffer CTAB 2% y 15 μ L de 2-mercaptoetanol. Los tubos se agitaron en vortex por 2 min y luego se colocaron en baño seco a 65 °C durante 15 min. Los tubos se retiraron del baño y se adicionaron 520 μ L de coloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se aplicó *vortex* 1 min y se centrifugó a 12.000 rpm por 10 min. Luego, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf y se agregó igual volumen de isopropanol y 50% del volumen de acetato de amonio 7,5 M. Se centrifugó a 12.000 rpm por 10 min. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 100 μ L de etanol 70%. Se centrifugó a 12.000 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el *pellet*. El *pellet* se resuspendió en 50 a 100 μ L de agua mili-Q y se incubó 24 hs en heladera. Luego se adicionó 1 μ L de RNasa y se incubó 1 h a 37 °C.

Los aislamientos se identificaron analizando la secuencia del factor de elongación (TEF 1- α) utilizando los cebadores EF1 (5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3') y EF2 (5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3') (O' Donnell et al., 1998). La mezcla de la reacción contenía 2,5 μ L de Buffer 10X, 2,5 μ L de dNTPs (2,5mM), 1,5 μ L de MgCl₂ (25 mM), 1,25 μ L de cebador EF1 (10 μ M), 1,25 μ L de cebador EF2 (10 μ M), 0,25 μ L de Taq polimerasa NZYTech, 13,75 μ L de agua MQ libre de RNasa y 2 μ L de la muestra de ADN (25 μ L de volumen final). El control negativo se realizó utilizando la misma mezcla, pero sin agregado de ADN y el control positivo se realizó utilizando una muestra que dio positiva en una reacción de PCR previa. La PCR se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp PCR system 9700 (Perkin-Elmer, EE. UU.).

Los parámetros de ciclado utilizados fueron: un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 minutos; 35 ciclos de desnaturalización (1 minuto a 95 °C), hibridación (1 minuto a 55 °C) y extensión (1:30 minutos a 72 °C); seguidos de un ciclo de extensión final de 10 minutos a 72 °C y 5 minutos a 4 °C.

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1% (p/v) en buffer TBE 1X teñidos con GreenSafe Premium (NZYTech) y bajo luz UV en un transiluminador. Como marcador de peso molecular se utilizó DNA GenRuler™ 1Kb DNA ladder (Thermo Scientific™).

A las especies del complejo *Fusarium graminearum* se les realizó una digestión con la enzima *BsaHI* (BioLabs inc.) sobre el producto de amplificación del factor de elongación

para determinar si correspondían a *F. graminearum* s.s (Garmendia et al., 2018a). La mezcla de la reacción incluyó 5 µL de buffer 10X, 1 µL de enzima *Bsa*HI, 34 µL de agua MQ libre de ARNasa y 10 µL del amplicón (TEF 1-α). Luego de 45 min a 37±1 °C, los fragmentos de restricción se separaron en un gel de agarosa al 1,5% (p/v) que contenía GreenSafe Premium (NZYTech) en tampón TBE 1X y se visualizaron en un transiluminador bajo luz ultravioleta. Como marcador de peso molecular, se utilizó DNA mass ruler de 1 Kb (Thermo Scientific™).

Los productos de PCR de las especies de *Fusarium* fueron secuenciados en MACROGEN Inc., Corea. Inicialmente las secuencias obtenidas fueron alineadas mediante la herramienta BLASTn con secuencias registradas en la base de datos GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y MYCOBANK Database, *Fusarium* (<https://fusarium.mycobank.org/page/Pairwise%20alignment>).

Con las secuencias de las especies del FFSC aisladas y secuencias de referencia obtenidas de MYCOBANK Database, *Fusarium* (<https://fusarium.mycobank.org/page/Pairwise%20alignment>) se construyó un árbol filogenético por el método de máxima verosimilitud. Las secuencias se alinearon mediante el algoritmo MUSCLE (Edgard, 2004), utilizando el programa Mega version11 (Tamura, Stecher y Kumar, 2021). El análisis filogenético se realizó mediante el método de Máxima verosimilitud utilizando el modelo de 2 parámetros de Kimura (G+I) y la robustez de los nodos fue evaluada mediante 1.000 réplicas de bootstrap. *Fusarium oxysporum* cepa CBS 144134 y *Fusarium inflexum* NRRL 20433 se utilizaron como grupo externo.

4.3.4. Detección y cuantificación de las micotoxinas presentes en los granos de sorgo

Se seleccionaron al azar 55 muestras de granos de sorgo de la zafra 2016 y 60 muestras de la zafra 2017 para realizar la determinación de micotoxinas. En el Laboratorio de Análisis de Productos Agropecuarios del LATU se realizó la detección y cuantificación, mediante cromatografía líquida de alta resolución HPLC, de deoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), zearalenona (ZEA) y fumonisinas (FB1 y FB2) según los métodos de la AOAC (AOAC 2016). Las toxinas se seleccionaron teniendo en cuenta las especies fúngicas presentes en los granos. Se utilizó una columna analítica Gemini C18 (4,60 mm × 150 mm, 5 µm) de fase reversa (Phenomenex, EE. UU.). Para el análisis de las fumonisinas y ZEA, se utilizó un detector de fluorescencia Waters 2475, mientras que para DON y NIV se utilizó un detector de fotodiodos (PDA) Waters 2996. Para el análisis de las fumonisinas, las longitudes de onda de excitación y emisión fueron de 335 y 440 nm, respectivamente. La fase móvil utilizada fue metanol: NaH₂PO₄ 0,1M (77:23 v/v) pH= 3,3, con un flujo de 1,0 mL/min a 25 °C. Para el análisis de ZEA, las longitudes de onda de excitación y emisión se establecieron en 270 y 465 nm, respectivamente. La fase móvil fue metanol:ácido ortofosfórico 0,01 M (58:42 v/v), el flujo fue de 1,0 mL/min a 25 °C. Para el análisis de DON y NIV la fase móvil fue agua: metanol (86:14 v/v), a un flujo de 1,0 mL/min a 30 °C. Se utilizaron estándares de DON, NIV, FB1 y FB2, ZEA Trilogy (EE.UU.). El porcentaje de recuperación del método fue del 93% para DON; 87% para NIV; 76% para FB1; 77% para FB2 y 77% para ZEA.

4.4. Resultados

4.4.1. Aislamiento e identificación de las especies de *Fusarium*

Un total de 1567 *Fusarium* spp. de la cosecha 2016 y 1098 de la cosecha 2017 fueron identificados en 95 y 72 muestras de granos de sorgo, respectivamente.

Las principales especies identificadas pertenecieron al Clado Graminearum (65%, n = 1744), seguido por las especies del grupo FFSC (23%, n = 609). Otras especies identificadas pertenecieron a FIESC (11%), *F. heterosporum* (2%), *F. armeniacum* (1%), *F. tricinctum* (1%), *F. chlamydosporum* (0,5%), *F. pseudograminearum* (0,5%) y *F. oxysporum* (0,2%).

Dentro del Clado Graminearum la mayoría de las cepas analizadas fueron de *F. graminearum* s.s (99%) y un pequeño porcentaje de *F. boothii* (1%, n = 2). Por otro lado, dentro de FFSC el 28% fue identificado como *F. proliferatum*, el 23% como *F. andiyazi*, el 21% como *F. fujikuroi*, el 18% como *F. thapsinum*, el 5% como *F. verticillioides* y el 5% como *F. subglutinans* (Figuras 13 y 14). Las secuencias del complejo de especies de *Fusarium fujikuroi* fueron depositadas en la base de datos Genbank (Tabla 1).

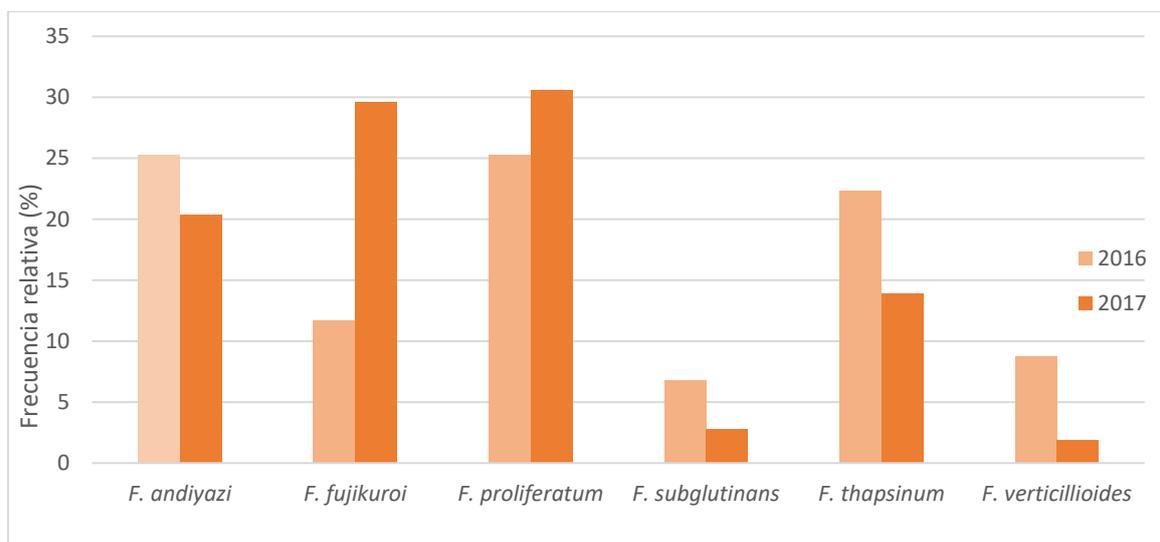


Figura 13. Frecuencia relativa de especies del complejo *Fusarium fujikuroi* para cada zafra, 2016 y 2017.

Tabla 1. Números de acceso al GenBank del complejo de especies de *Fusarium fujikuroi* utilizado en el análisis filogenético

Especie	Código de colección	TEF 1- α	Especie	Código de colección	TEF 1- α
<i>F. andiyazi</i>	NRRL 31727	MN193854	<i>F. bulbicola</i>	NRRL 13618	KF466415
	S104	OQ656380	<i>F. fractiflexum</i>	NRRL 28852	AF160288
	S133	OQ656381	<i>F. fujikuroi</i>	MRC 2386	MH582339
	S139	OQ656382		CBS 221.76	MN534010
	S158	OQ656383		S201	OQ702134
	S241	OQ656384		S403	OQ702135
	S265	OQ656385		S408	OQ702136
	S282	OQ656386		S472	OQ702137
	S315	OQ656387		S498	OQ702138
	S360	OQ656388		S620	OQ702139
	S367	OQ656389		S624	OQ702140
	S392	OQ656390		S648	OQ702141
	S393	OQ656391		S650	OQ702142
	S394	OQ656392		S664	OQ702143
	S448	OQ656393		S151	OQ702144
	S477	OQ656394		S226	OQ702145
	S503	OQ656395		S258	OQ702146
	S513	OQ656396		S325	OQ702147
	S56	OQ656397		S476	OQ702148
	S560	OQ656398		S480	OQ702149
	S6	OQ656399		S486	OQ702150
	S643	OQ656400		S493	OQ702151
	S656	OQ656401		S511	OQ702152
	S703	OQ656402		S528	OQ702153
	S724	OQ656403		S579	OQ702154
	S78	OQ656404		S589	OQ702155
	S793	OQ656405		S600	OQ702156
	S9	OQ656406		S609	OQ702157
	S90	OQ656407		S616	OQ702158
	S98	OQ656408		S617	OQ702159
	S264	OQ702130		S720	OQ702160
	S316	OQ702131		S721	OQ702161
	S389	OQ702132		S727	OQ702162
	S390	OQ702133		S756	OQ702163

Tabla 1 (cont.)

Especie	Código de colección	TEF 1- α	Especie	Código de colección	TEF 1- α
<i>F. globosum</i>	NRRL 26131	KF466417	<i>F. proliferatum</i> (cont.)	S637	OQ702232
<i>F. lactis</i>	NRRL 25200	MN193862		S657	OQ702233
<i>F. madaense</i>	CBS 146669	MW402098		S677	OQ702234
<i>F. musae</i>	NRRL 25059	FN552086		S708	OQ702235
<i>F. nygamai</i>	CBS 749.97	MW402151		S736	OQ702236
<i>F. proliferatum</i>	MRC 2324	MH582344		S741	OQ702237
	NRRL 22944	AF160280		S747	OQ702238
	S131	OQ702205		S766	OQ702239
	S148	OQ702206		S770	OQ702240
	S150	OQ702207		S778	OQ702241
	S156	OQ702208		S788	OQ702242
	S165	OQ702209		S82	OQ702243
	S166	OQ702210		S61	OQ702244
	S195	OQ702211		S490	OQ702245
	S219	OQ702212		S146	OQ702246
	S220	OQ702213		S299	OQ702247
	S223	OQ702214		S558	OQ702248
	S234	OQ702215		S204	OQ702249
	S256	OQ702216		S561	OQ702250
	S260	OQ702217		<i>F. pseudonygamai</i>	NRRL13592
	S271	OQ702218	<i>F. siculi</i>	CPC 27188	LT746214
	S276	OQ702219	<i>F. subglutinans</i>	CBS 747.97	MW40215
	S297	OQ702220			0
	S307	OQ702221		S130	OQ702172
	S321	OQ702222		S221	OQ702173
S322	OQ702223		S461	OQ702174	
S377	OQ702224		S471	OQ702175	
S407	OQ702225		S575	OQ702176	
S478	OQ702226		S583	OQ702177	
S485	OQ702227		S95	OQ702178	
S491	OQ702228	<i>F. thapsinum</i>	CBS 776.96	MN534044	
S497	OQ702229		S10	OQ702179	
S504	OQ702230		S140	OQ702180	
S633	OQ702231		S155	OQ702181	
			S187	OQ702182	

Tabla 1 (cont.)

Especie	Código de colección	TEF 1-α
<i>F. thapsinum</i>		
(cont.)	S248	OQ702183
	S261	OQ702184
	S269	OQ702185
	S285	OQ702186
	S290	OQ702187
	S331	OQ702188
	S344	OQ702189
	S383	OQ702190
	S422	OQ702191
	S427	OQ702192
	S524	OQ702193
	S582	OQ702194
	S60	OQ702195
	S625	OQ702196
	S214	OQ702197
	S409	OQ702198
	S428	OQ702199
	S429	OQ702200
	S706	OQ702201
	S807	OQ702202
	S829	OQ702203
	S85	OQ702204
	S192	OQ702251
	S718	OQ702252
<i>F. verticillioides</i>	CBS 218.76	MW402113
	NRRL22172	AF160262
	S86	OQ702164
	S426	OQ702165
	S66	OQ702166
	S62	OQ702167
	S574	OQ702168
	S53	OQ702169
	S259	OQ702170
	S136	OQ702171

El 87% de las muestras del 2016 y el 79% de las muestras del 2017 presentaron al menos una especie de *Fusarium*. La prevalencia de las distintas especies de *Fusarium* en las muestras de 2016 fue menor a la observada en las muestras de 2017. FSAMSC fueron las especies prevalentes en las muestras de 2016, mientras que en 2017 fue FFSC (Figura 15).

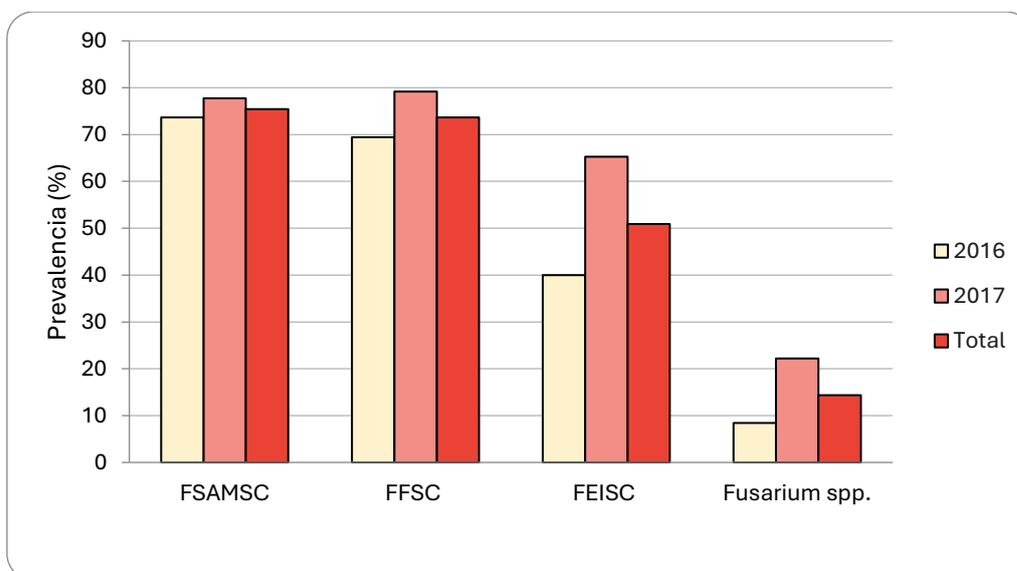


Figura 15. Prevalencia (%) de las especies de *Fusarium* que infectaron las muestras de sorgo durante 2016 y 2017. FSAMSC: complejo de especies de *Fusarium sambucinum*; FFSC: complejo de especies de *Fusarium fujikuroi*; FEISC: complejo de especies de *Fusarium incarnatum-equiseti*.

La incidencia de *Fusarium* spp. en los granos de sorgo de la zafra 2016 y 2017 fue similar (16,5% y 15,3%, respectivamente), con un valor máximo de 84% en las muestras de 2016 y de 100% en las de 2017. En ambos años, la incidencia de *F. graminearum* s.s. fue superior a la de otras especies de *Fusarium* (Figura 16).

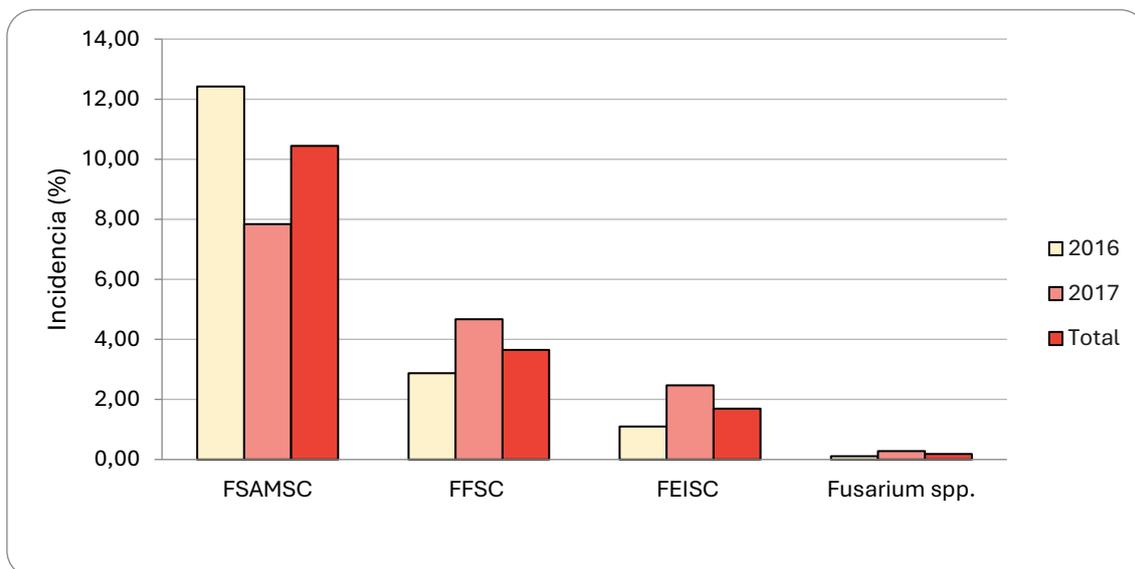


Figura 16. Incidencia (%) de las especies de *Fusarium* que infectaron las muestras de sorgo durante 2016 y 2017. FSAMSC: complejo de especies de *Fusarium sambucinum*; FFSC: complejo de especies de *Fusarium fujikuroi*; FEISC: complejo de especies de *Fusarium incarnatum-equiseti*.

La incidencia de las especies de *Fusarium* varió entre departamentos y entre los dos años de muestreo (Figura 17 a y b). La mayor incidencia de *Fusarium* spp. se encontró en las muestras provenientes de San José y Río Negro (21% y 20%, respectivamente), seguido de Soriano (16%), Paysandú y Flores (15%) y Colonia (10%).

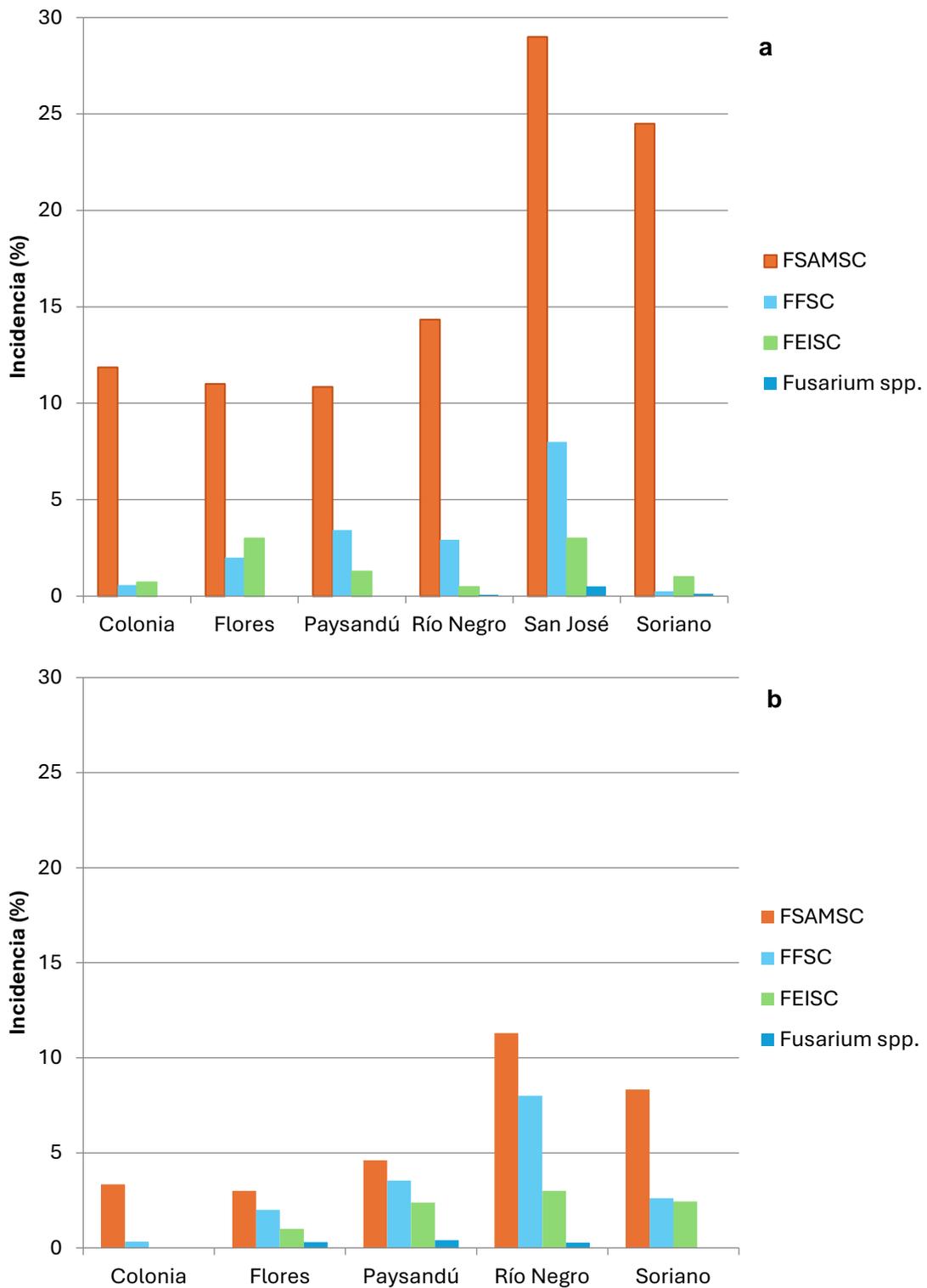


Figura 17. Incidencia de *Fusarium* spp. en granos de sorgo según los distintos departamentos muestreados. FSAMSC: complejo de especies de *Fusarium sambucinum*; FFSC: complejo de especies de *Fusarium fujikuroi*; FEISC: complejo de especies de *Fusarium incarnatum-equiseti*. a: zafra 2016; b: zafra 2017

4.4.2. Detección y cuantificación de micotoxinas en granos de sorgo

El 95% de las muestras en ambos años de cosecha presentaron al menos una toxina (n=52, 2016 y n=54, 2017). El 92% de las muestras positivas del 2016 y el 91% de las muestras positivas del 2017 (n=48, 2016 y n=49, 2017) presentaron co-ocurrencia de toxinas (Figuras 18 y 19). Las muestras estaban contaminadas principalmente con DON y ZEA. Las fumonisinas B1 y B2 y NIV se detectaron en un bajo porcentaje de muestras (Tabla 2). Los niveles de contaminación fueron en general superiores en las muestras de 2016, con excepción de FB2 que fue superior en 2017 y NIV que solo se detectó en las muestras de dicho año.

Tabla 2. Niveles de micotoxinas presentes en muestras de sorgo de la cosecha 2016 (n=55) y 2017 (n=57) en Uruguay.

Toxina	Concentración total promedio ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) \pm SD		Muestras positivas (%)		Concentración de las muestras positivas ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)			
	2016	2017	2016	2017	Promedio \pm SD	Rango	Promedio \pm SD	Rango
					2016		2017	
DON	1315 \pm 1597	565 \pm 567	87	91	1507 \pm 1623	59-6071	619 \pm 564	59-2133
NIV	0	4 \pm 19	0	5	-	-	79 \pm 36	50-120
ZEA	1453 \pm 2194	752 \pm 1297	93	89	1567 \pm 2239	30-9280	841 \pm 1344	30-6560
FB1	67 \pm 244	58 \pm 148	16	23	411 \pm 493	80-1693	255 \pm 217	80-753
FB2	5 \pm 36	13 \pm 98	2	2	-	80-270	-	80-742

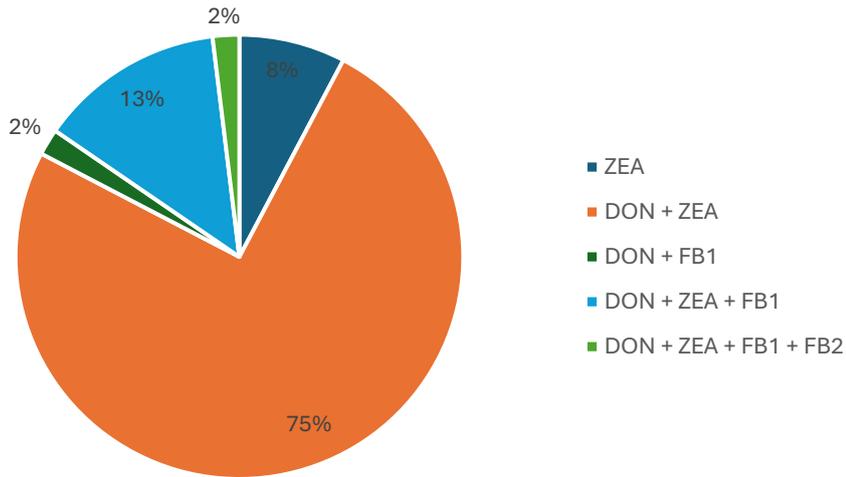


Figura 18. Distribución de toxinas (%) presentes en las muestras positivas de la zafra 2016.

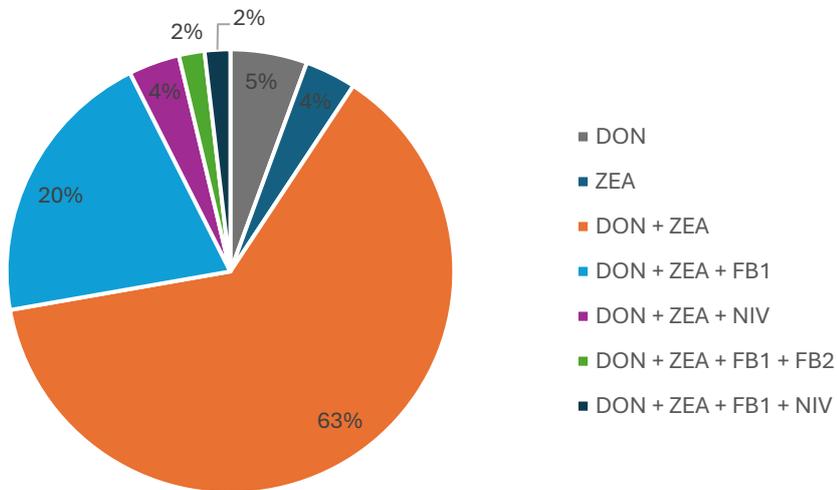


Figura 19. Distribución de toxinas (%) presentes en las muestras positivas de la zafra 2017.

4.5. Discusión

En Uruguay existe poca información sobre la presencia de hongos y micotoxinas en los cultivos de sorgo. La mayoría de los estudios que se han realizado se han centrado en describir la aparición e incidencia de especies de *Fusarium* en trigo y cebada (Garmendia et al., 2018b; Pan et al., 2013; Umpiérrez-Failache et al., 2013). En sorgo cultivado en Uruguay, sólo se encontró un estudio focalizado en granos ensilados (del Palacio et al., 2016). Por consiguiente, el presente trabajo representaría el primer estudio sobre la ocurrencia de especies de *Fusarium* a campo en granos de sorgo en Uruguay. Un total de 2665 cepas de *Fusarium* fueron identificadas, de las cuales *Fusarium graminearum* s.s. apareció como la especie predominante, seguida de *F. proliferatum*, *F. andiyazi*, *F. fujikuroi* y *F. thapsinum*. Si bien estas especies se han descrito previamente en el sorgo en otras partes del mundo, en este trabajo *F. graminearum* s.s. apareció como el principal contaminante, lo cual difiere de lo reportado en otros estudios donde FFSC son los principales contaminantes de granos de sorgo (Mohamed Nor, Salleh y Leslie, 2019; Pena, Cavaglieri y Chulze, 2019; Kelly et al., 2017; Lahouar et al., 2015; Divakara et al., 2014; Sharma et al., 2011; Alves dos Reis et al., 2010). Esto podría explicarse en parte por las secuencias de cultivos en los sistemas agrícolas de Uruguay, donde el sorgo generalmente se siembra en secuencia con trigo o cebada, en los que *F. graminearum* s.s. es de los principales patógenos en estos cultivos (Garmendia et al., 2018b; Umpiérrez-Failache et al., 2013). Se ha reportado que trigo y cebada son los mayores contribuidores de inóculo de *F. graminearum* en secuencias agrícolas (Pereyra y Macky, 2008). En este trabajo se reportó por primera vez a *F. boothii* en sorgo, si bien fue hallado en una muy baja frecuencia, similar a lo reportado por Garmendia et al. (2018b) en cebada. La presencia de *F. graminearum* s.s. en granos de sorgo tiene un gran riesgo toxicológico ya que esta especie puede producir DON, 15-AcDON, 3-AcDON, NIV y ZEA. Además, la infección del sorgo por especies dentro del Clado *Graminearum* puede causar una reducción de la germinación, vigor y calidad nutricional de los granos (Balota, 2012). Dentro de FFSC, *F. proliferatum*, *F. andiyazi* y *F. thapsinum* fueron las especies más frecuentes, siendo todas estas especies reportadas por primera vez en Uruguay. Estas especies han sido aisladas de sorgo en Argentina, Australia, Brasil, Etiopía, Nigeria, Sudáfrica, Túnez y Estados Unidos y están bien documentadas como patógenos del sorgo que causan las enfermedades de moho en el grano y pudrición del tallo (Mohamed Nor, Salleh y Leslie, 2019; Kelly et al., 2017; Lahouar et al., 2015; Funnell-Harris y Pedersen, 2011; Sharma et al., 2011; Petrovic et al., 2009). Sin embargo, las frecuencias de las especies de FFSC obtenidas en este estudio difieren con las encontradas en otras áreas, incluidas

Argentina y Brasil, donde *F. thapsinum* y *F. verticillioides* son las especies más frecuentes (Mohamed Nor, Salleh y Leslie, 2019; Pena, Cavaglieri y Chulze, 2019; Alves dos Reis et al., 2010). Dentro de FFSC, *Fusarium fujikuroi* también se recuperó con alta frecuencia y, según nuestro conocimiento, este sería el primer reporte de dicha especie en sorgo. La misma, ha sido aislada a partir de arroz, donde causa la enfermedad *Bakanae*, y de otros cultivos como la soja, el maíz, la cebada, el trigo y el maní. Estas diferencias en la recuperación y composición de las especies dentro de FFSC pueden estar asociadas con diferencias en las condiciones agroclimáticas y de rotación de cultivos asociados a nuestro país (Petrovic et al., 2009). Además, poco se sabe sobre las condiciones de crecimiento, el rango de huéspedes y la patogenicidad de las especies de *Fusarium* asociadas con el sorgo en Uruguay. Este conocimiento es esencial para desarrollar estrategias de manejo adecuadas.

Las micotoxinas en muestras de sorgo mostraron contaminación con FB1 y FB2, pero en niveles bajos, y ninguna de las muestras superó el límite establecido por la FDA para alimentación animal y la normativa vigente para otros granos (FDA, 2010). La incidencia y los niveles de DON encontrados en el presente estudio fueron altos en comparación con otros reportes de esta toxina en sorgo (Hanvi et al., 2019; Chilaka et al., 2017). Sin embargo, sólo el 27% (n = 30) de las muestras tenían niveles de DON que excedían los niveles recomendados en Uruguay para cerdos y equinos (1000 µg/kg); 10% (n = 11), los niveles para el consumo de vacas lecheras (2000 µg/kg); y 3% (n = 3), los niveles para bovinos de carne, ovinos y aves (5000 µg/kg) (Resolución S/N/001, 2001). Ninguna muestra superó los niveles recomendados en Uruguay para materias primas destinadas a la producción de ración para animales o los niveles de la FDA para cereales destinados a rumiantes y pollos (10.000 µg/kg) (Resolución S/N/001, 2001; FDA, 2010). La zearalenona fue la micotoxina predominante y se presentó en niveles y tasas de incidencia elevadas, con el 64% (n = 72) de las muestras excediendo los niveles recomendados en Uruguay de 250 µg/kg (Resolución S/N/001, 2001). Aunque son muy pocos los trabajos publicados a nivel mundial sobre la contaminación con ZEA en sorgo, se ha reportado que esta es la micotoxina dominante lo que concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo (Chala et al., 2014; Aoyama et al., 2009; Ayalew et al., 2006). Las altas concentraciones de DON y ZEA en nuestro país podrían explicarse por el hecho de que *F. graminearum* s.s. fue la principal especie contaminante del sorgo. Los niveles de micotoxinas encontrados en Uruguay también podrían explicarse por las condiciones climáticas y las prácticas agrícolas y las variedades de sorgo utilizadas. Además, se observó una alta frecuencia en la co-ocurrencia de toxinas en las muestras analizadas. Sería importante profundizar en el conocimiento sobre los efectos sinérgicos

de estas micotoxinas, y el riesgo en el consumo de alimentos, ya que podría tener mayores efectos nocivos para la salud humana y animal. También sería interesante analizar otras toxinas que pueden estar contaminando los granos, como las moniliforminas producidas por *F. thapsinum*, que han sido detectadas en granos de sorgo en Argentina (Pena, Cavaglieri y Chulze, 2019). A su vez, es importante continuar con el monitoreo de especies patógenas y toxicogénicas en el sorgo y las toxinas presentes en los granos, para poder diseñar modelos predictivos que permitan prevenir la contaminación de los cultivos. Por otro lado, no existen regulaciones o recomendaciones sobre estas toxinas específicamente para el sorgo. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente trabajo, donde se observaron distintas especies toxicogénicas y distintas toxinas y combinaciones de toxinas en los granos de sorgo, es evidente la necesidad de establecer regulaciones en alimentos como el sorgo.

5. CAPÍTULO 2. CARACTERIZACIÓN TOXICOGÉNICA DE CEPAS DE *F. graminearum* s.s. y *F. proliferatum*

5.1. Introducción

Las principales especies de *Fusarium* asociadas a los cultivos de sorgo de Uruguay, en los años de estudio, fueron *F. graminearum* s.s. y *F. proliferatum*. Por esta razón, se seleccionaron dichas especies para profundizar en el conocimiento de su capacidad toxicogénica.

5.1.1. *Fusarium graminearum* Schwabe

Fusarium graminearum sensu stricto (Clase: Sordariomycetes, Familia: Nectriaceae) es una especie cosmopolita, capaz de colonizar diversos ambientes. Es patógeno principalmente de gramíneas como maíz, trigo y cebada, pero también es patógeno de otros cultivos.

En medio de cultivo CLA (de sus siglas en inglés: Carnation Leaf Agar) forma escasos esporodocios de color naranja pálido. Los macroconidios (esporas asexuales) son delgados, con forma de hoz a casi rectos, de pared gruesa y presentan de 5 a 6 septos (Figura 20 a y b). Presentan una célula apical ahusada y una célula basal en forma de pie. No forman microconidios, pero pueden presentar clamidosporas. En PDA las colonias presentan rápido crecimiento, formando abundante micelio aéreo, denso y algodonoso de color que va desde blanco a amarillo o naranja (Figura 20 c). Los cultivos, además, producen pigmentos rojos en el agar (Leslie y Summerell, 2006). La fase sexual o telomorfo, se denomina *Gibberella zeae*, es homotálica y autofértil, pero puede también entrecruzarse, y forma peritecios que contienen ascos con ascosporas (esporas sexuales) (Desjardins, 2003).

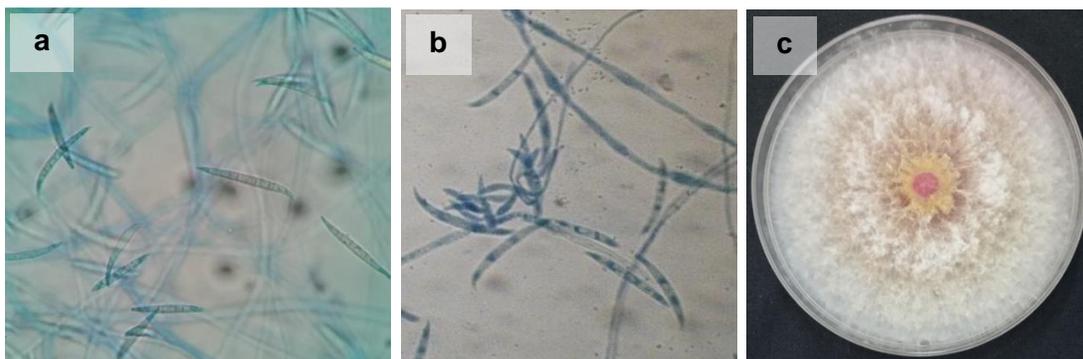


Figura 20. a y b: macroconidios de *Fusarium graminearum* s.s., c: cultivo de *F. graminearum* s.s. en medio de cultivo PDA

Los diferentes tipos de esporas presentan distintos mecanismos de dispersión. Las ascosporas son expulsadas de los ascos, mediante mecanismos activos de liberación, mientras que los

macroconidios, dependen de la velocidad del viento para su liberación. Una vez liberadas las esporas, serán diseminadas por el viento y la lluvia para la colonización de nuevos sustratos y hábitats. Ambos tipos de esporas presentan capacidad infectiva, pudiendo causar epidemias en sus plantas hospederas. Los macroconidios se producen en condiciones de humedad a temperaturas entre 16 y 36 °C, y las ascosporas se producen dentro de los peritecios entre 13 y 33 °C en condiciones de sequedad. Para la germinación de las esporas, los macroconidios requieren aprox. 80% de humedad relativa, mientras que las ascosporas requieren aprox 50%, lo que le ofrece una ventaja a estas últimas en la colonización de huéspedes susceptibles (Keller, Bergstrom y Shields, 2014).

Fusarium graminearum s.s. pertenece al Clado *Graminearum* dentro de FSAMSC. Este complejo de especies incluye seis clados fuertemente sustentados: *Brachygibbosum*, *Graminearum*, *Longipes*, *Novel*, *Sambucinum* y *Sporotrichoides*. Muchas especies del FSAMSC son capaces de producir micotoxinas. En particular las especies del Clado *Graminearum*, producen los tricotecenos tipo B, deoxinivalenol (DON), 3-acetildeoxinivalenol (3-AcDON), 15-acetildeoxinivalenol (15-AcDON) o nivalenol (NIV) y recientemente algunas cepas de *F. graminearum* mostraron capacidad de producir el tricoteceno tipo A, NX-2 y sus derivados (Laraba et al., 2021; Varga et al., 2015).

DON es la micotoxina más comúnmente detectada en los cereales a nivel mundial, con una tasa de incidencia promedio del 59% y un nivel de contaminación promedio en materias primas y piensos de entre 794 y 1.304 mg/kg (Wang et al., 2022; Chen, Kistler y Ma, 2019). Además, *F. graminearum* s.s. es capaz de producir la micotoxina estrogénica ZEA, muy frecuentemente detectada en los cultivos de cereales infectados por este hongo. Tanto los tricotecenos como la ZEA son principalmente contaminantes de campo, pero al ser toxinas muy estables, pueden permanecer durante el almacenamiento de los granos e incluso durante el procesamiento de alimentos y piensos (Wang et al., 2022).

Los tricotecenos además de causar problemas en la salud humana y animal pueden actuar como factores de virulencia y contribuir a la patogenicidad facilitando la colonización de los tejidos de las plantas hospederas (Laraba et al., 2021; Rauwane et al., 2020; Gardiner et al., 2010).

Los tricotecenos son sesquiterpenoides que se forman a partir de pirofosfato de farnesilo por medio de una serie de oxigenaciones, ciclaciones, isomerizaciones y esterificaciones, que terminan formando los compuestos bioactivos (Figura 21) (Proctor, et al. 2002). Las enzimas implicadas en la biosíntesis de tricotecenos están codificadas por genes *TRI* ubicados en cuatro

loci diferentes, en cromosomas diferentes: un locus *TRI* de 12 genes ubicados en el cromosoma 2, con siete genes que codifican enzimas (*TRI3*, *TRI4*, *TRI5*, *TRI7*, *TRI8*, *TRI11*, *TRI13*), un gen que codifica un transportador (*TRI12*), dos genes reguladores (*TRI6* y *TRI10*) y dos genes (*TRI9*, *TRI14*) de función desconocida; un locus con 2 genes que codifican enzimas *TRI1-TRI16* en el cromosoma 1; un locus con un gen *TRI101* que codifica una enzima en el cromosoma 4 y un locus con un gen *TRI15* en el cromosoma 3. Los genes *TRI6* y *TRI10* codifican proteínas que regulan positivamente la expresión de la mayoría de los genes *TRI* y de genes involucrados en la síntesis de farnesilo difosfato. El gen *TRI5* codifica la enzima tricodieno sintasa implicada en el ciclado de farnesilo difosfato para formar tricodieno, el primer paso en la biosíntesis de tricotecenos (Liew et al., 2023; Brown et al., 2020; Amarasinghe y Fernando, 2016.). En los pasos siguientes el tricodieno es convertido a calonectrina. Estos pasos de la ruta biosintética son compartidos por las especies de *Fusarium* que producen tricotecenos tipo A (toxina T-2 y NX-2) y tricotecenos tipo B (NIV y DON). En los productores de DON la calonectrina es hidroxilada y desacetilada para formar 3-AcDON o 15-AcDON seguido de DON. El NIV puede formarse por dos vías, o partir de calonectrina o a partir de 3,15-acetil DON como sustrato (Chen, Kistler y Ma, 2019).

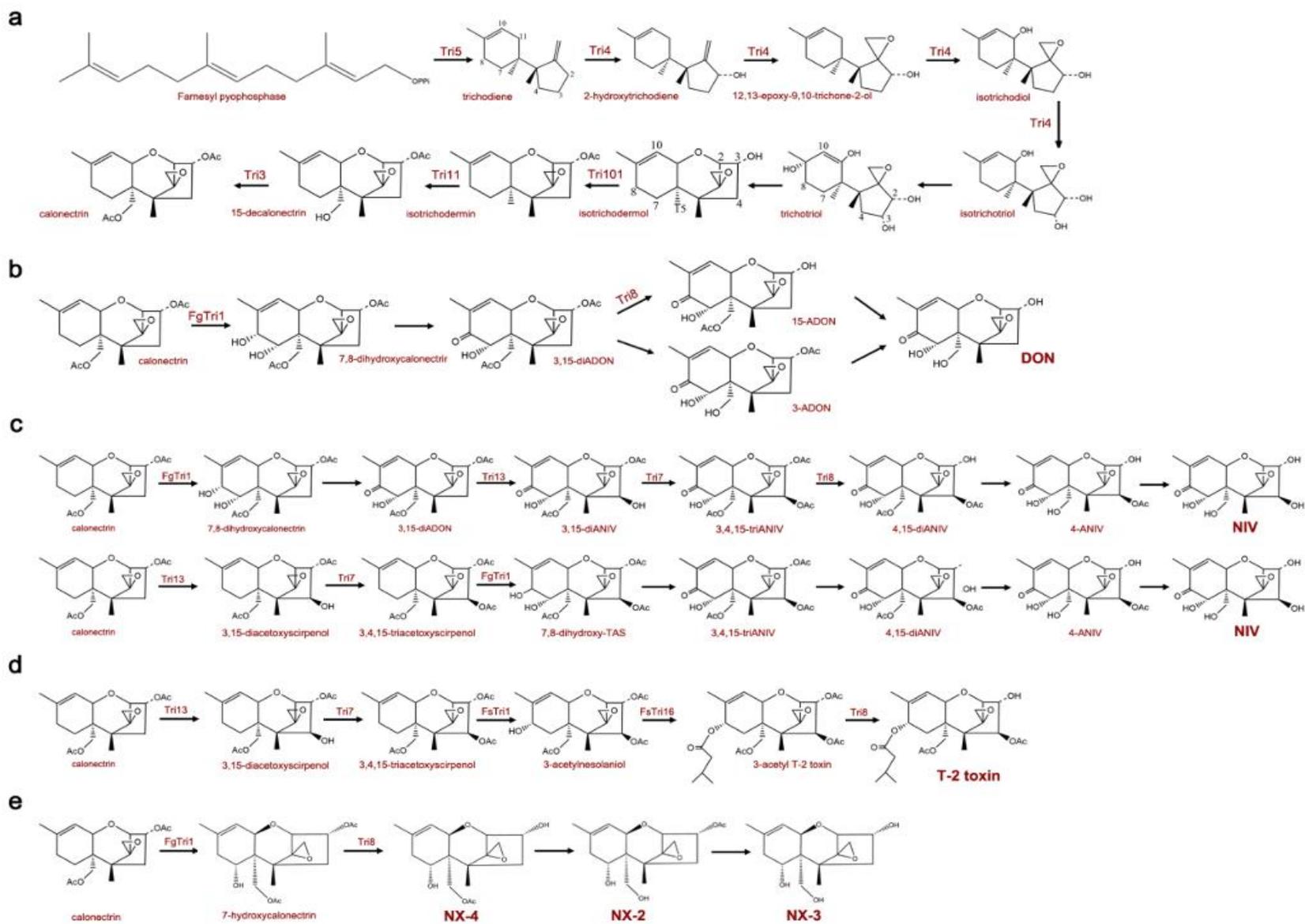


Figura 21. Biosíntesis de tricotecenos en *Fusarium graminearum*. Tomado de Chen, Kistler y Ma (2019).

Zearalenona, una lactona del ácido resorcíclico, se forma a partir de la vía de los policétidos mediante la condensación de unidades de acetato-malonato. Las reacciones son catalizadas por policétido sintasas (PKs), que son enzimas grandes multidominio (Figura 22). En análisis genómicos se identificaron 15 PKs, de las cuales solo 8 presentan función conocida hasta el momento. Los genes se encuentran en grupos o “clusters” y codifican las enzimas metabólicas, factores de transcripción y transportadores. Para la biosíntesis de ZEA se requieren de los genes *PKS4*, *PKS13*, *ZEB1* y *ZEB2*. El gen *PKS4* codifica una enzima policétido sintasa que cataliza la condensación de carbonos de un acetil-CoA y cinco moléculas de malonilCoA, paso inicial de la biosíntesis. Otra PKS, *PKS13*, cataliza las reacciones siguientes agregando tres moléculas de malonil-CoA, para luego formar un anillo aromático y una estructura de anillo macrólido que contiene un enlace lactona. El gen *ZEB1* codifica una enzima alcohol isoamílico oxidasa que cataliza la reacción de conversión de β -zearalenol en ZEA. El gen *ZEB2* codifica un factor de transcripción que regula la actividad de otros genes implicados en la biosíntesis de ZEA (Kim, Son y Lee, 2018; Kim et al., 2005).

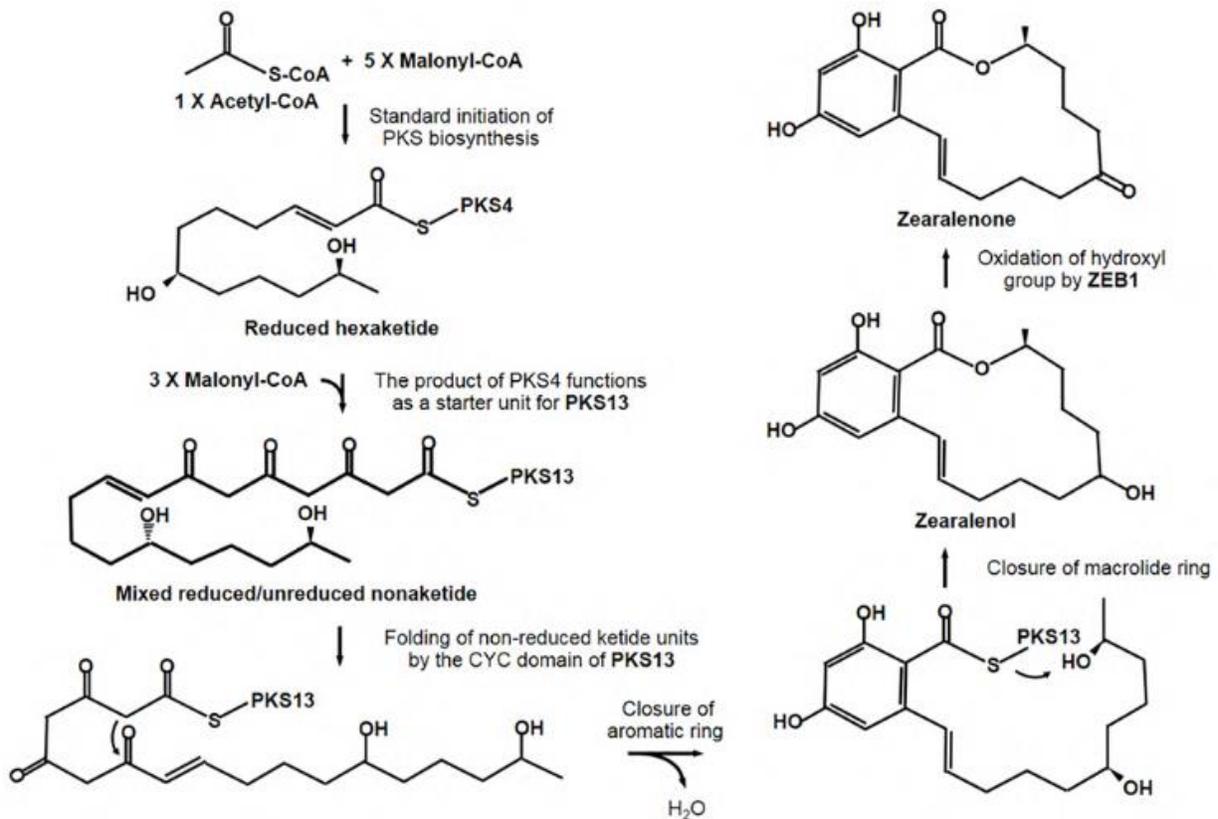


Figura 22. Modelo de biosíntesis de ZEA. Tomado de Kim, Son y Lee (2018).

5.1.2. *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg

Fusarium proliferatum (Clase: Sordariomycetes, Familia: Nectriaceae) es una especie con distribución mundial capaz de crecer sobre diversos sustratos (Leslie y Summerell, 2006). Es patógeno en cultivos de gran importancia económica como trigo, maíz, arroz, sorgo, mijo, espárragos, palmera datilera, ajo, cebolla, entre otros. Además, esta especie es capaz de producir una gran variedad de micotoxinas incluidas las fumonisinas, moniliformina, beauvericina, fusaproliferina y ácido fusárico, que representan un riesgo para la salud al ser ingeridas por humanos u otros animales (Ferrara et al., 2019; Vismer et al., 2019). En medio de cultivo CLA, *F. proliferatum* forma macronidios delgados, casi rectos, generalmente con 3 a 5 septos, la célula apical es curvada y la basal poco desarrollada. Puede formar esporodoquios de color naranja pálidos. Los microconidios son abundantes y se generan a partir de monofiálides y polifiálides, formando principalmente cadenas de largo moderado, o en menor medida formando falsas cabezas (Figura 23 a y b). Los microconidios tienen forma de clava con la base aplanada y no presentan septos (Figura 23 a). No forma clamidosporas. En PDA forma abundante micelio de color violáceo, pudiendo formar pigmentos violetas en el agar (Figura 23 c) (Leslie y Summerell, 2006). El teleomorfo, *Gibberella intermedia*, es heterotálico y forma peritecios (Desjardins, 2003).

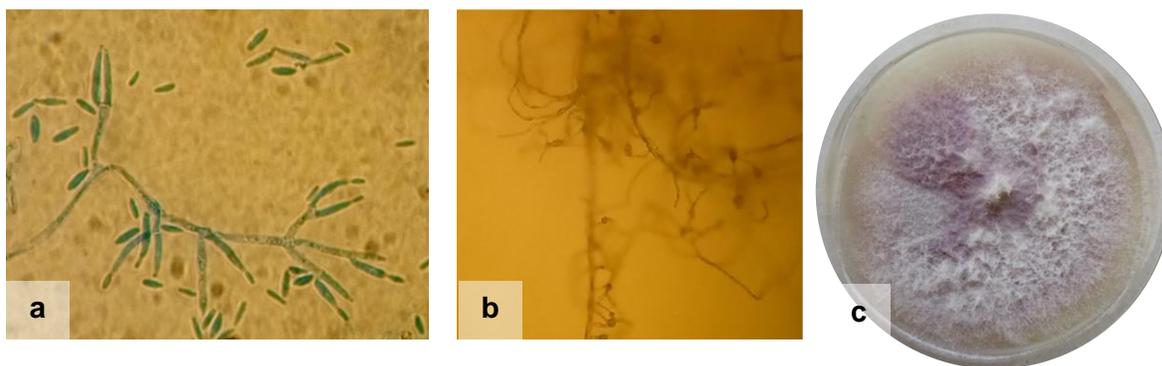


Figura 23. *Fusarium proliferatum*, a: fiálides y microconidios, b: microconidios en cabezuelas y en cadenas, c: cultivo en medio PDA

Considerando que existen diferencias entre cepas de una misma especie en cuanto a la capacidad de producir micotoxinas, resulta importante conocer cómo son las poblaciones de *F. graminearum* s.s. y *F. proliferatum* aisladas de sorgo de Uruguay.

5.2. Objetivos

- 1) Determinar la capacidad toxicogénica de cepas de *F. graminearum* s.s. aisladas de los granos de sorgo estudiados.
- 2) Determinar la capacidad toxicogénica de cepas de *F. proliferatum* aisladas de los granos de sorgo estudiados.
- 3) Evaluar la expresión de genes *TRI* y *PKs* de *F. graminearum* s.s. implicados en la biosíntesis de las micotoxinas DON, NIV y ZEA mediante qRT-PCR

5.3. Metodología

5.3.1. Evaluación de la capacidad toxicogénica de *F. graminearum* s.s. y *F. proliferatum*

Se analizó la capacidad de producir micotoxinas de las especies más frecuentemente encontradas en los granos de sorgo estudiados. Se utilizaron 25 g de granos de arroz para la determinación de las toxinas DON, NIV y ZEA o 20 g de arroz para FB1 y FB2 en bolsas con 10 mL de agua destilada y se autoclavaron dos veces a 121 °C durante 30 min. Luego, las bolsas esterilizadas se inocularon con 3 discos de micelio tomados de cultivos puros de cada aislamiento y se incubaron a 25 °C en oscuridad durante 28 días. Transcurrido este tiempo, el contenido de las bolsas se secó a 50 °C, se molió finamente con una licuadora y se almacenó a -20 °C hasta su procesamiento. Las toxinas se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con una bomba Shimadzu LC-10ADvp. Se utilizó un detector SPD para las toxinas DON, NIV y ZEA y un detector de fluorescencia RF-10Axl para las FBs (Shimadzu). Todas las evaluaciones de toxinas se realizaron utilizando una columna C18 (150 mm x 4,6 mm de d.i., tamaño de partícula de 5 µm; Nucleodur®, Macherey-Nagel, Düren, Alemania) conectada a una precolumna Security Guard (8 mm x 4 mm de d.i., 5 µm de partículas tamaño; Nucleodur®, Macherey-Nagel, Düren, Alemania). Los estándares de DON, NIV y ZEA y de fumonisinas B1 y B2 fueron suministrados por Trilogy Analytical Laboratory Inc., Washington, MO.

La producción de DON y NIV se detectó utilizando el método descrito por Reynoso et al. (2011). En matraces de 250 mL, se colaron 7,5 g de arroz molido, se agregaron 20 mL de acetonitrilo: metanol (14:1 v/v) y los matraces se agitaron a 150 rpm durante 2 h. El extracto se filtró a través de papel de filtro Whatman No. 1 y 2 mL de extracto se filtraron a través de una columna de laboratorio con aluminio y C-activado (20:1, p/p). El eluido se evaporó a sequedad y se resuspendió en 500 µL de metanol:agua (5:95 v/v) y se inyectó en el sistema de HPLC. Se utilizó un detector UV (220 nm). La fase móvil fue metanol:agua (12:88 v/v), a un caudal de 1,5 mL/min. El volumen de inyección fue de 50 µL. La producción de DON y NIV se determinó por comparación con los estándares.

La producción de ZEA se determinó según la metodología para HPLC de la AOAC: 985.18 (AOAC, 2016). Para la extracción de la toxina se colocaron 5 g de arroz molido en matraces de 250 mL con 25 mL de metanol:agua (80:20 v/v) y se agitó a 240 rpm durante 1 h. Luego, se centrifugó a 2000 g por 10 min y se pasaron 5 mL del sobrenadante por una columna MycoSep®226 (Romer Labs Inc., MO, USA). El eluido se evaporó a sequedad y luego se disolvió en 400 µL de metanol:agua (70:30 v/v), la misma solución se utilizó como fase móvil, el caudal

fue de 1 mL/min a 40 °C y la inyección el volumen fue de 50 µL. Se utilizó un detector UV (236 nm). La presencia de ZEA se determinó por comparación con los estándares.

La extracción de FBs se realizó según el método AOAC: 995.15 (AOAC, 2016)., las toxinas se extrajeron de 5 g de arroz molido con 15 mL de metanol:agua (3:1 v/v) a 150 rpm durante 30 min en un agitador oscilatorio. El extracto se filtró a través de papel de filtro Whatman No. 1 y 2 mL de extracto se pasaron por una columna de intercambio aniónico (SAX) (Strata® SAX, 55 µm, 70Å, Phenomenex) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante, y las fumonisinas se eluyeron con 1 mL de ácido acético:metanol (1:99 v/v). El eluido se evaporó hasta sequedad y luego se disolvió en 1 mL de metanol. Se añadió una solución de reactivo de O-ftaldialdehído (Sigma-Aldrich, Milán, Italia) para formar derivados de fumonisina fluorescentes. Se utilizó un detector de fluorescencia con longitudes de onda de excitación y emisión de 335 nm y 440 nm, respectivamente. La fase móvil fue metanol: solución NaH₂PO₄ 0.1M (77:23 v/v) pH 3.5, a un caudal de 1 mL/min, el volumen de inyección fue de 20 µL. La presencia de fumonisinas se determinó por comparación con estándares externos.

5.3.2. Determinación de los genotipos de *F. graminearum* s.s. productores de tricotecenos

Se determinaron los genotipos de tricotecenos de 93 aislamientos de *F. graminearum* s.s. utilizando tres ensayos de PCR diferentes. Primero, dos ensayos multiplex se dirigieron a una región de los genes de biosíntesis de tricoteceno *TRI3* y *TRI12* para determinar los genotipos NIV, 15-AcDON y 3-AcDON (Ward et al., 2002), mientras que el tercer ensayo se centró en regiones del gen *TRI13* para determinar el genotipo DON (Chandler et al., 2003). La multiplex *TRI3* incluyó un cebador común a todos los genotipos 3CON (5'-TGGCAAAGACTGGTTCAC-3') y tres cebadores específicos: (5'-GTGCACAGAATATACGAGC-3'), 3D15A (5'-ACTGACCCAAGCTGCCATC-3') y 3D3A (5'-CGCATTGGCTAACACATG-3'). Esta reacción produce amplicones de aproximadamente 840, 610 y 243 pb para aislamientos que coinciden con los genotipos NIV, 15-AcDON y 3-AcDON, respectivamente. La multiplex *TRI12* también incluía un cebador común a todos los genotipos, 12CON (5'-CATGAGCATGGTGATGTC-3'), y tres cebadores específicos: (5'-TCTCCTCGTTGTATCTGG-3'), 12-15F (5'-TACAGCGGTCGCAACTTC-3') y 12-3F (5'-CTTTGGCAAGCCCGTGCA-3'). Esta multiplex genera amplicones de aproximadamente 840, 670 y 410 pb para aislamientos que coinciden con los genotipos NIV, 15-AcDON y 3-AcDON, respectivamente. La amplificación del gen *TRI13* se realizó utilizando los cebadores (5'-CATCATGAGACTTGTGKCRAGTTTGGG-3') y Tri13_DON_R (5'-GCTAGATCGATTGTTGCATTGAG-3'). La PCR amplifica un fragmento de 282 pb para las cepas que tienen los genes de biosíntesis de DON.

La mezcla de la reacción de PCR en ambas multiplex se realizó en un volumen final de 25 μ L que contenía: 50 ng de ADNg, buffer de PCR 1X (Nzytech), $MgCl_2$ 2 mM, 0,2 mM de cada dNTP, Taq polimerasa 0,5U (Nzytech) y 0,2 mM de cada cebador. La PCR para *TRI3* y *TRI12* consistió en una desnaturalización inicial de 2 min a 94 °C, seguida de 25 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 52 °C y 1 min a 72 °C.

La mezcla de reacción de PCR para *TRI13* se realizó en un volumen final de 25 μ L que contenía: 50 ng de ADNg, buffer de PCR 1,5X (Nzytech), $MgCl_2$ 2 mM, 0,2 mM de cada dNTP, Taq polimerasa 0,75 U (Nzytech) y 0,4 mM de cada cebador. La amplificación por PCR de *TRI13* consistió en una desnaturalización inicial de 2 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 65 °C y 30 s a 72 °C.

Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 1,5 % (p/v) que contenían GreenSafe Premium (NZYTech). Como marcador de peso molecular se utilizó DNA mass ruler 100pb (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA).

5.3.3. Evaluación de la expresión de genes responsables de la biosíntesis de micotoxinas de *F. graminearum* s.s. in vitro

Se evaluó mediante qRT-PCR (QuantStudio 5 Real-Time PCR Systems, ThermoFisher Científico) la expresión de los genes *TRI5*, *TRI6* y *TRI10* de *F. graminearum* s.s. implicados en la biosíntesis de DON y NIV, y la expresión de los genes *PKS4*, *PKS13* involucrados en la síntesis de ZEA, usando *EF1 α A* como gen de referencia endógeno (Kim et al., 2005; Kim y Yun, 2011; Lee et al., 2014; Amarasinghe y Fernando, 2016).

Se realizó una prueba de amplificación de los oligos (Tabla 3) mediante RT-PCR a tiempo final. Para ello, se inocularon dos discos de micelio de *F. graminearum* s.s. en un matraz de 250 mL con 100 mL de medio líquido adicionado con caldo de sorgo y se incubó en agitación a 25 °C durante 4 días. El caldo se preparó con 250g de semillas de sorgo hervidas en 500mL de agua destilada durante 20min. Luego, se filtró el caldo y se añadieron 20 g de dextrosa, 10 g de peptona, 3 g de extracto de levadura y se completó a un volumen final de 1000 mL y se esterilizó durante 15 min en autoclave. El control se realizó inoculando dos discos de micelio de *F. graminearum* s.s. en matraces con medio YEPD. Luego, se filtró el micelio a través de papel de filtro Whatman No. 1 y se almacenó a -80 °C hasta su análisis. Se realizó la extracción de ARN con RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el

fabricante. La concentración de ARN obtenido de las muestras se midió con un NanoDrop y la integridad del mismo se evaluó visualizando los productos en un gel de agarosa 1% (p/v).

Se realizó un tratamiento con ADNasal (New England BioLabs_{inc}) colocando en un tubo de PCR, 2 µg de ARN, 1 µL ADNasa y 1 µL de Buffer 10X y agua en un volumen final de 9 µL. Los tubos correspondientes a cada muestra se incubaron a 37 °C durante 30 min. La reacción se finalizó agregando 1 µL de EDTA 25 mM e incubando a 65 °C durante 10 min. Luego, se agregó 1 µL de Oligo dT 50 µM y se incubó a 65 °C durante 5 min. Al finalizar se colocó en hielo durante 10 min.

Se realizó la retrotranscripción a ADNc colocando a cada tubo: 4 µL de Buffer 5X, 2 µL de dNTP 10 mM y 1 µL de enzima RT 200U/ µL (ProtoScript® II Reverse transcriptase, New England BioLabs, Inc), e incubando a 42 °C durante 1 hora.

Se realizó una PCR a tiempo final colocando: 2 µL Buffer (NH₄SO₄), 2 µL de dNTP 10 mM, 1,6 µL MgCl₂ 25 mM, 0,4 µL de cada cebador 10 mM ,0,2 µL Taq polimerasa (TopTaq®, Qiagen), 1 µL ADNc (25 ng) y 12,5 µL de agua. La amplificación por PCR consistió en una desnaturalización inicial de 3 min a 95 °C, seguida de 40 ciclos de 20 s a 95 °C, 20 s a 60 °C y 20 s a 72 °C; y una extensión final de 5 min a 72 °C.

Tabla 3. Genes analizados y cebadores utilizados.

Gen	Función	Cebador directo (5'→3')
		Cebador reverso (5'→3')
<i>TRI5</i>	Tricodieno sintasa	CCAGGAAACCTTACACTCGTCTAAG TGGCCGCCTGCTCAAAGAAC
<i>TRI6</i>	Factor de transcripción	GGCATTACCGCAACTTCAA CATGTTATCCACCCTGCTAAAGACC
<i>TRI10</i>	Gen regulador	GTGGCCGGGACGCTTCAAT ATCCGTCAAGTCTTCCCATCTCAT
<i>PKS4</i>	Policétido sintasa	GTGGGCTTCGCTAGACCGTGAGTT ATGCCCTGATGAAGAGTTTGAT
<i>PKS13</i>	Policétido sintasa	CCCCCAACTCGACGTCAAATCTAT TTCTTCCCGCCGACTTCAAACA
<i>EF1 α A</i>	Factor de elongación	GGCTTTCACCGACTACCCTCCTCT ACTTCTCGACGGCCTTGATGACAC

La eficiencia de los oligos se determinó realizando 5 diluciones consecutivas del producto de amplificación para construir una curva de calibración. La mezcla de la reacción contenía: 10 µL SYBR®Green (QuantilNova®, Qiagen) Mix 2x, 1,4 µL de cada cebador 10 mM, 5,2 µL agua y 2

μL RT-ADNc, 0,1 μL ROX. Las condiciones de qRT-PCR fueron: 3 min a 95 °C, seguida de 40 ciclos de 20 s a 95 °C y 30 s a 60 °C. En todas las reacciones se realizó un control sin ADNc para confirmar la ausencia de contaminación de ADN en las mezclas de reacción.

Utilizando los valores umbrales de ciclo (Ct) y el logaritmo de la concentración de ADNc, se construyó una curva de calibración para cada oligo. La eficiencia (E) de amplificación se determinó como: $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$, y el porcentaje de eficiencia como: $\%E = (E-1) * 100$.

La evaluación de la expresión de genes se realizó inoculando dos discos de micelio de *F. graminearum* s.s. en matraces de 250 mL con 100 mL de medio líquido adicionado con caldo de sorgo. Los matraces se incubaron en agitación a 25 °C durante 24, 48, 72, 96 y 144 hs. Los controles se realizaron utilizando YEPD como medio de cultivo. En cada tiempo, se filtró el micelio a través de papel de filtro Whatman No. 1 y se almacenó a -80 °C hasta su análisis. Se realizó la extracción de ARN con RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Se realizaron 3 réplicas por tratamiento. Se realizaron las qRT-PCR para cada tratamiento según los distintos genes analizados de igual forma a la descrita anteriormente.

5.4. Resultados

5.4.1. Producción de micotoxinas por *F. graminearum* s.s. y *F. proliferatum*

Se analizó la capacidad de producir micotoxinas de 93 aislamientos de *F. graminearum* s.s. y 50 aislamientos de *F. proliferatum*. La mayoría de las cepas de *F. graminearum* s.s. y *F. proliferatum* fueron capaces de producir las micotoxinas estudiadas.

El 92% (n = 86) de los aislamientos de *F. graminearum* s.s. fueron capaces de producir ZEA, el 88% (n = 83) de producir DON y el 6% (n = 6) fueron productores de NIV. Cinco aislamientos fueron capaces de producir todas las micotoxinas estudiadas, mientras que en 2 aislamientos no se detectó producción (Figura 24).

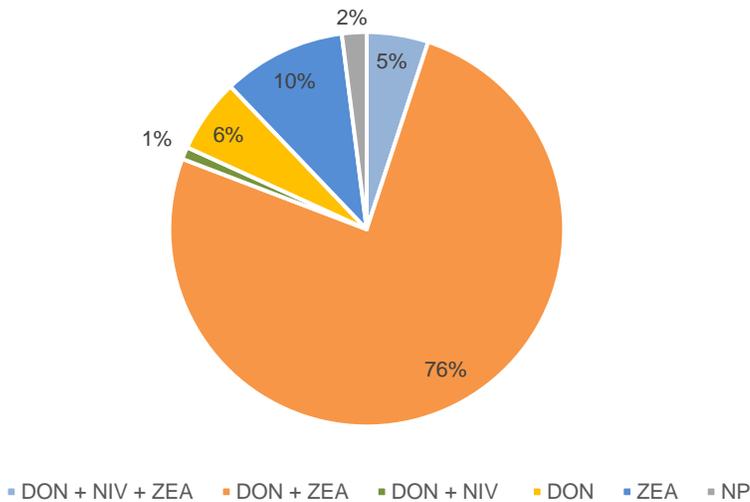


Figura 24. Distribución del perfil toxicogénico (%) de 93 cepas de *Fusarium graminearum* s.s. obtenidas de granos de sorgo sobre granos de arroz.

Se detectó la producción de FB1 y FB2 en 76% (n = 38) y 64% (n = 32) de los aislamientos de *F. proliferatum*, respectivamente. Doce aislamientos de *F. proliferatum* (24%) no fueron capaces de producir fumonisinas en las condiciones evaluadas (Figura 25).

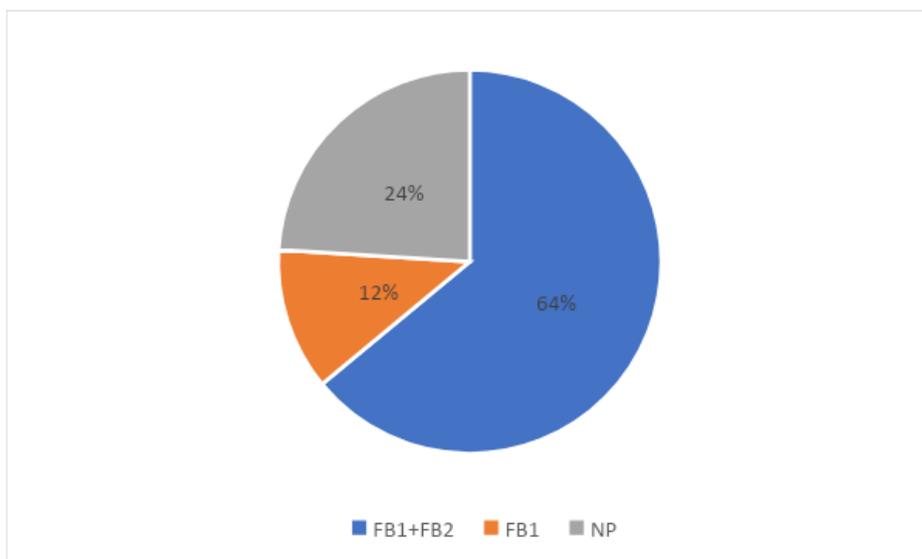


Figura 25. Distribución del perfil toxicogénico (%) de 50 cepas de *Fusarium proliferatum* obtenidas de granos de sorgo sobre granos de arroz.

5.4.2. Determinación de los genotipos de *F. graminearum* s.s. en relación a la producción de tricotecenos

Los ensayos de PCR indicaron que la mayoría de los aislamientos de *F. graminearum* s.s. tenían genotipo 15-AcDON (98%), con solo dos aislamientos del genotipo NIV (1 aislamiento del 2016 y 1 aislamiento del 2017). No se observaron genotipos 3-AcDON en los años estudiados.

5.4.3. Evaluación de la expresión de genes responsables de la biosíntesis de micotoxinas de *F. graminearum* s.s. *in vitro*

La eficiencia de los cebadores fue cercana al 99%.

Se observaron diferencias en la expresión de los genes evaluados entre el tratamiento con sorgo y el control. A las 48hs después de inoculado se observó acumulación de transcritos, mostrando una inducción temprana en los genes *TRI5* y *TRI6*, *TRI10*, *PKs4* y *PKs13*. A los diferentes tiempos la expresión de estos genes fue mayor en presencia del caldo de sorgo comparado con el control. La expresión de los genes *TRI5* y *TRI6* aumentó con el tiempo a partir de las 72hs después de inoculado (Figuras 26 A y B, respectivamente), mientras que la expresión del gen *TRI10* mostró un pico de expresión a las 96hs y luego una disminución de la expresión a las 144hs (Figura 26 C). Respecto a la expresión de los genes *PKs4* y *PKs13*, se observó una pequeña disminución en la expresión de ambos genes de las 48 a las 72hs, seguidas por un pico de expresión a las 96hs y luego una disminución a las 144hs (Figuras 27 A y B, respectivamente).

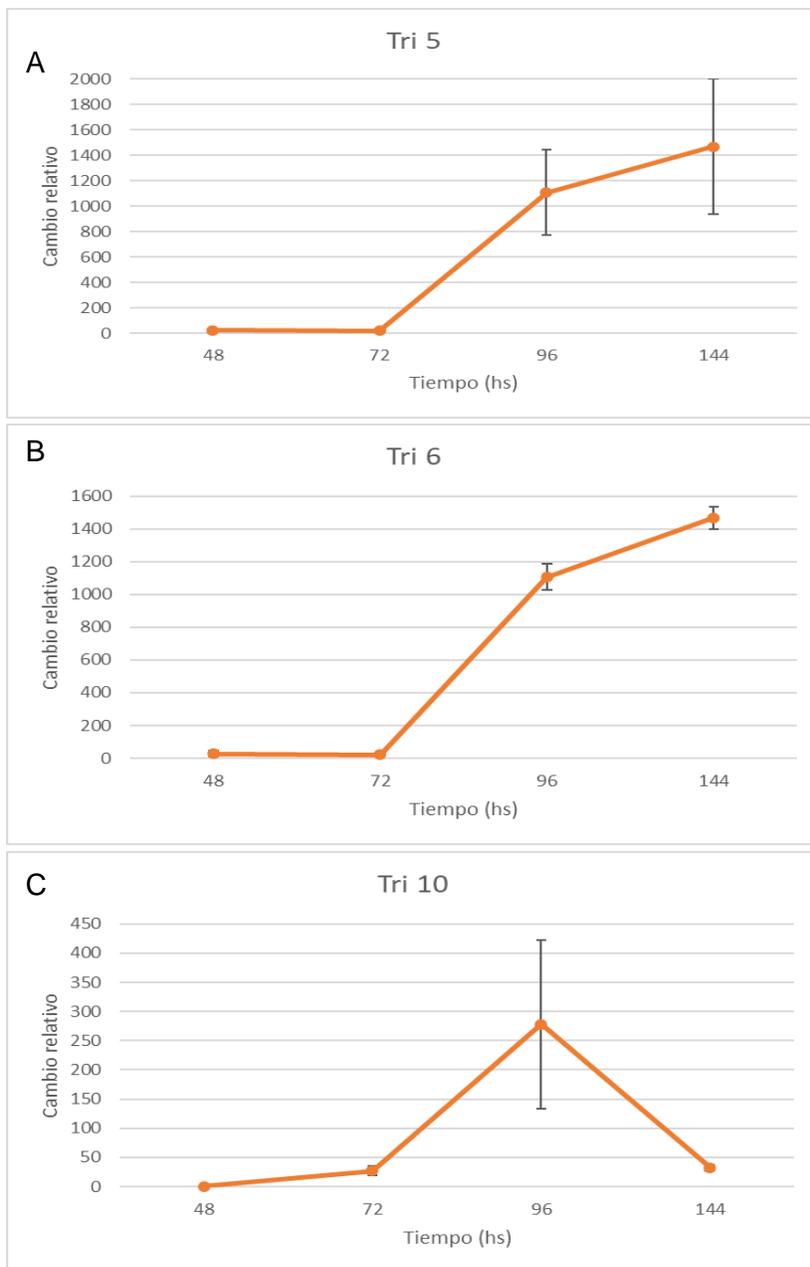


Figura 26. Cambio relativo de los niveles de expresión en el tiempo de A: gen *TRI5*, B: gen *TRI6* y C: gen *TRI10*. Los análisis de RT-qPCR de los genes mencionados se realizaron a las 48, 72, 96 y 144 horas luego de la inoculación con *Fusarium graminearum* s.s. en el medio con caldo de sorgo. Los niveles de expresión de los genes en medio con sorgo son relativos a los correspondientes niveles de expresión en medio control en los tiempos indicados. Como gen de referencia se utilizó EF1 α A. Los resultados se muestran como promedios \pm desvío estándar de 3 réplicas biológicas.

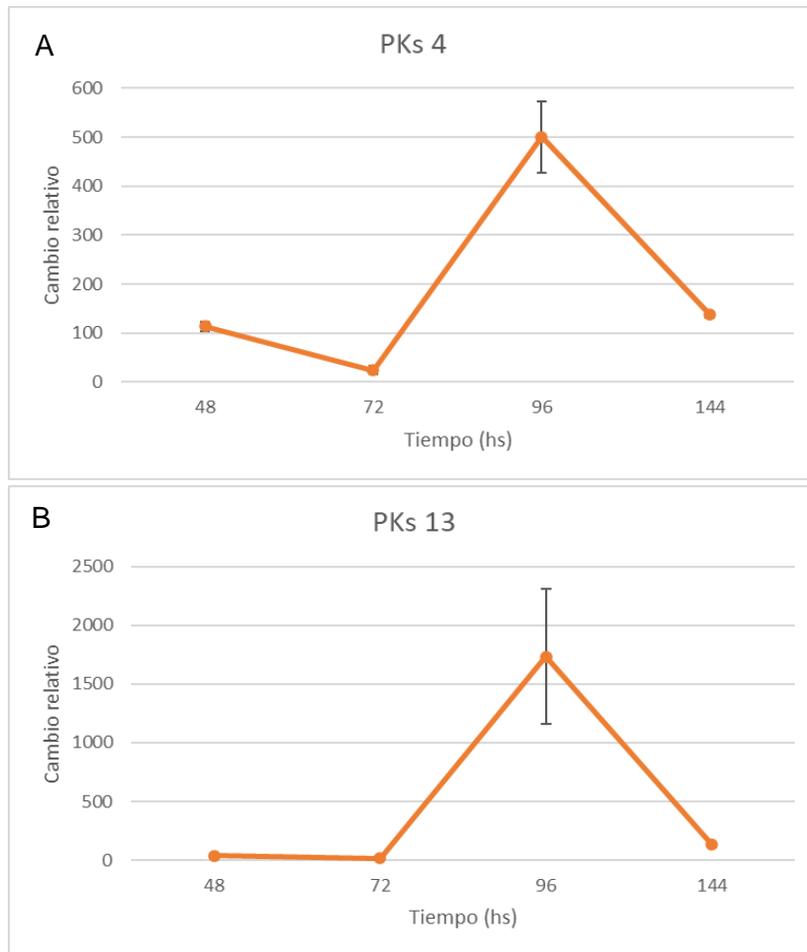


Figura 27. Cambio relativo de los niveles de expresión en el tiempo de A: gen *PKs4* y B: gen *PKs13*. Los análisis de RT-qPCR de los genes mencionados se realizaron a las 48, 72, 96 y 144 horas luego de la inoculación con *Fusarium graminearum* s.s. en el medio con caldo de sorgo. Los niveles de expresión de los genes en medio con sorgo son relativos a los correspondientes niveles de expresión en medio control en los tiempos indicados. Como gen de referencia se utilizó EF1 α A. Los resultados se muestran como promedios \pm desvío estándar de 3 réplicas biológicas.

5.5. Discusión

En este trabajo se determinó la capacidad toxicogénica de diferentes cepas de *F. graminearum* s.s. y *F. proliferatum* provenientes de granos de sorgo en Uruguay. La mayoría de las cepas, en ambas especies, fueron productoras de al menos una de las toxinas analizadas, denotando el riesgo potencial existente de contaminación en los cultivos. En cuanto a las cepas de *F. proliferatum* la mayoría fueron capaces de producir FBs (76%), aunque se obtuvo un pequeño porcentaje de cepas no productoras (24%). Resultados similares fueron reportados para cepas de *F. proliferatum* aisladas de sorgo de Nigeria e India, donde la mayoría eran capaces de producir fumonisinas, mientras que otras cepas producían en niveles bajos o insignificantes (Vismer, et al., 2019; Srinivas et al., 2013). Si bien no se considera que las fumonisinas cumplan un rol en la patogénesis (Desjardins et al., 2002), se obtuvo una alta proporción de cepas productoras de fumonisinas lo que podría sugerir que estas toxinas desempeñan algún papel ecológico para *F. proliferatum* durante la colonización de los granos de sorgo. En este sentido, sería interesante evaluar la virulencia en plantas de sorgo de cepas productoras y no productoras de fumonisinas; así como estudiar en las cepas no productoras si esto se debe a las condiciones del ensayo o a mutaciones o deleciones en genes de la ruta biosintética de fumonisinas. Por otro lado, las cepas no productoras podrían utilizarse en estrategias de control biológico como las cepas no toxicogénicas de *Aspergillus flavus* utilizadas para reducir la contaminación por aflatoxinas (Abbas et al., 2017; Ojiambo et al., 2018).

Respecto a las cepas de *F. graminearum* s.s. se obtuvo un alto número de cepas productoras de ZEA (92%), seguidas por DON (88%) y pocas cepas capaces de producir NIV. Resultados similares se encontraron en cepas de *F. graminearum* s.s. aisladas de granos de maíz en Uruguay, sin embargo, la mayoría de las cepas fueron productoras de DON, y en menor medida productoras de ZEA (del Palacio et al., 2023). Incluso en otros estudios realizados en Sudamérica sobre la contaminación de granos por *F. graminearum* encontraron a DON como la principal toxina producida (Del Ponte et al., 2022). Esta diferencia en el perfil de toxinas producidas puede deberse a variaciones en las poblaciones de *F. graminearum* s.s. asociadas a los distintos hospederos.

En cuanto a la determinación del genotipo, la mayoría de las cepas de *F. graminearum* s.s. presentaron genotipo 15-AcDON, con solo dos cepas de genotipo NIV y ninguna del genotipo 3-AcDON. Estos resultados son importantes ya que se ha observado que las cepas productoras de DON son más virulentas en trigo que las cepas productoras de NIV, pero estas últimas presentan mayor toxicidad (Desjardins y Proctor, 2011). Los datos aquí presentados representan

el primer reporte para cepas de *F. graminearum* s.s. aisladas de sorgo en Uruguay. Este resultado es consistente con lo reportado en trabajos previos sobre diferentes cultivos en Uruguay (del Palacio et al., 2023; Garmendia et al., 2018b; Pan et al. 2013, 2016; Umpiérrez-Failache et al., 2013), e incluso en otras regiones de América del Sur (Del Ponte et al., 2022), donde 15-AcDON es el genotipo que prevalece para *F. graminearum* s. s., lo que muestra la estabilidad de la composición del genotipo entre cultivos y años. El genotipo y el quimiotipo NIV fue encontrado en una baja proporción en coincidencia con los bajos niveles detectados en las muestras de sorgo analizadas. Si bien la proporción fue baja, estos resultados indican que existe riesgo de contaminación por esta toxina y debe ser monitoreada. Más aún, teniendo en cuenta que no existe reglamentación en Uruguay para NIV y que puede ser más tóxica que DON (Desjardins, 2006).

La expresión de los genes *TRI5*, *TRI6*, *TRI10*, *PKs4* y *PKs13* asociados con las rutas biosintéticas de tricotecenos y ZEA, mostraron una inducción temprana y mayor en presencia de sorgo. Este es el primer trabajo realizado en Uruguay sobre la expresión de genes relacionados con la producción de toxinas de *F. graminearum* s.s. Como se ha visto en trabajos anteriores, las fuentes de carbono y nitrógeno tienen un efecto sobre el crecimiento y desarrollo de los hongos, y son uno de los factores críticos para la biosíntesis de metabolitos secundarios (Chen, Kistler y Ma, 2019). Esto podría explicar en parte, las diferencias observadas en la expresión de genes en presencia de sorgo y el control sin sorgo. En cuanto a la expresión de los genes durante los diferentes tiempos de crecimiento, *TRI5* y *TRI6* aumentaron con el tiempo, mientras que la expresión de los genes *TRI10*, *PKs4* y *PKs13* fue fuertemente inducida al inicio (96hs) y luego los niveles de expresión disminuyeron. Resultados similares fueron obtenidos en trabajos anteriores realizados con diferentes cepas de *F. graminearum* donde, si bien existieron diferencias entre las cepas, la inducción de los genes *TRI* y *PKs* se observó tempranamente (Amarasinghe y Fernando, 2016; Lee et al., 2014; Lysøe, Bone y Klemsdal, 2009). Dado la alta expresión de genes *TRI* y *PKs* encontrada en este trabajo, sería importante evaluar la expresión de estos genes durante la infección de *F. graminearum* s.s. en plantas de sorgo de diferentes variedades y correlacionarlo con la producción de toxinas y la agresividad en cepas con diferentes perfiles toxicogénicos. Esta información sería de utilidad para proponer mejores estrategias para el manejo de enfermedades acorde con las características de las poblaciones fúngicas presentes en nuestro territorio.

6. CAPÍTULO 3. CARACTERIZACIÓN ECOFISIOLÓGICA DE *F. graminearum* s.s. y *F. proliferatum*

6.1. Introducción

El sorgo es susceptible a la infección por diferentes especies de hongos fitopatógenos, quedando expuesto, además, a la contaminación por una diversidad de micotoxinas que algunas de estas especies son capaces de producir. Las especies fúngicas presentes, su abundancia relativa y su capacidad infectiva depende de la interacción de diversos factores como las características intrínsecas de cada cepa, la interacción entre ellas, las condiciones ambientales y el estado y etapa del desarrollo de la planta.

Los factores ecofisiológicos como la humedad relativa y la temperatura influyen en el crecimiento de los hongos, la colonización de los tejidos vegetales y la producción de micotoxinas (Lahouar et al., 2015). Las condiciones que favorecen el crecimiento fúngico no siempre coinciden con la producción de micotoxinas. Si bien, en términos generales se considera que temperaturas entre 25 y 30 °C y actividad hídrica (*aw*) superior a 0,78 son favorables para el crecimiento y la producción de micotoxinas (Daou et al., 2021).

La disponibilidad de agua incide en la germinación de las esporas, determina la velocidad metabólica y de crecimiento de los hongos e influye en la esporulación.

Los granos son sustratos higroscópicos y parte del agua que poseen no está disponible para su uso por los microorganismos, en este caso se utiliza la actividad hídrica (*aw*) como indicador de la disponibilidad de agua. La *aw* se define como la relación entre la presión de vapor de agua sobre un sustrato y la presión de agua pura a la misma presión y temperatura (Velluti, 2002). Los hongos presentan un límite de *aw* por debajo del cual no son capaces de crecer y producir micotoxinas. En general, los valores de *aw* mínimos para la producción de toxinas son mayores a los valores de *aw* mínimos requeridos para el crecimiento fúngico (Tapia, Alzamora y Chirife, 2020). Dependiendo de los requerimientos de *aw* los hongos pueden clasificarse en: xerófilos, si son capaces de crecer a *aw* menores de 0,95; mesófilos capaces de crecer entre 0,95 y 1 de *aw*; e higrófilos los que solo son capaces de crecer a 1 de *aw* (Pelhate, 1968). En términos generales, se ha visto que los hongos requieren valores de *aw* más altos para la formación de esporas que para la germinación, e independientemente de la temperatura una disminución de *aw* genera una disminución en la tasa de germinación (Tapia, Alzamora y Chirife, 2020).

Por otro lado, si bien la temperatura afecta el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas, es menos restrictiva que la aw. La mayoría de los hongos son mesófilos y crecen en un rango de temperatura de 5 – 35 °C, con un óptimo de crecimiento entre 25 y 30 °C. Algunas especies son termófilas y crecen entre 20 - 60 °C con un óptimo de crecimiento entre 40 - 50°C, o psicrófilas cuando crecen entre 0 - 20 °C con un óptimo de crecimiento a 10 °C. Las condiciones de temperatura que favorecen el crecimiento están relacionadas con el metabolismo fúngico. Las reacciones químicas que ocurren dentro de la célula serán más eficientes en los rangos óptimos de temperatura, por lo tanto, un descenso o un aumento en la temperatura pueden ocasionar un enlentecimiento o mal funcionamiento del metabolismo celular y en consecuencia disminuir o detener el crecimiento del hongo (Daou et al., 2021).

A su vez, la interacción entre los diferentes factores también puede tener un efecto sobre el desarrollo fúngico. Se ha observado que una mayor tolerancia a aw bajas suele ocurrir cuando las temperaturas son cercanas al óptimo de crecimiento (Velluti, 2002). Por otro lado, en sustratos con los nutrientes apropiados se amplía el rango de aw y de temperatura a la que las esporas pueden germinar y el hongo crecer (Tapia, Alzamora y Chirife, 2020).

Las variaciones en las comunidades fúngicas debido a diferencias en las condiciones climáticas y los distintos requisitos para el crecimiento que presentan las especies, se ve reflejado en la distribución geográfica de las mismas. Por esta razón, es importante conocer las poblaciones locales de cada especie (Gab-Allah, Choi, Kim, 2023; Keller, Bergstrom y Shields, 2014).

Los hongos son capaces de contaminar los alimentos en diversas fases de la producción, que van desde el campo hasta la cosecha, transporte, almacenamiento y el procesamiento. En general los hongos que infectan a las plantas en el campo requieren altos niveles de humedad ($\geq 20\%$), mientras que los que infectan durante el almacenamiento requieren un menor contenido de humedad (13-18%). Dentro del primer grupo se incluyen especies del género *Fusarium*, *Cladosporium*, *Claviceps*, *Helminthosporium*, *Neoitphodium*, *Cladosporium* y *Alternaria* y dentro de las principales especies que afectan a los granos almacenados se encuentran *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. (Gab-Allah, Choi, Kim, 2023). En las plantas, la mayoría de los hongos son capaces de crecer entre 0 – 30 °C, si bien las temperaturas óptimas para *Fusarium* spp. se encuentran entre 22 - 28 °C. A su vez, se ha observado que en épocas de lluvia existe mayor riesgo de contaminación por especies de *Fusarium* (Munkvold, 2014). En poscosecha, tanto la temperatura como la aw juegan un rol importante en la determinación de la aparición de hongos micotoxigénicos, el nivel de colonización y la acumulación de micotoxinas, es así que a

temperaturas entre 5 - 10 °C y una aw de 0,90 - 0,91 se reduce el crecimiento de especies de *Fusarium* (Gab-Allah, Choi, Kim, 2023).

En los cultivos de sorgo de nuestro país al igual que en otras regiones del mundo, las principales especies de *Fusarium* encontradas son las pertenecientes al complejo *Fusarium fujikuroi* y *F. graminearum* (Pena, Cavaglieri y Chulze, 2019). Dentro de los factores abióticos de mayor importancia para el crecimiento y producción de toxinas de *F. proliferatum* y *F. graminearum* se encuentran la temperatura y la actividad hídrica (Gab-Allah, Choi, Kim, 2023; Marín et al., 2004). *Fusarium proliferatum* tiene una temperatura óptima de crecimiento a 30 °C y 0.99 de aw, siendo el mínimo de aw necesario para su crecimiento de 0,90 (Marín, 1998). *Fusarium graminearum* tiene un óptimo de crecimiento entre 24 - 26 °C y 0,99 – 0,98 de aw, siendo el mínimo de aw necesaria de 0,89 (Lacey y Magan, 1991).

Para desarrollar estrategias de prevención y control eficientes, resulta importante conocer el rango de condiciones en las que cada especie es capaz de crecer y producir micotoxinas. A su vez, cepas de una misma especie presentan una gran variabilidad en cuanto a la capacidad de producir micotoxinas, pudiéndose encontrar cepas capaces de producir varias micotoxinas, mientras que otras solo producen una única o ninguna micotoxina. Por esta razón, es necesario estudiar la ecofisiología de las principales especies de *Fusarium* aisladas en granos de sorgo de Uruguay.

6.2. Objetivos

- 1) Evaluar el efecto de la actividad hídrica y la temperatura sobre el crecimiento de *F. graminearum* s.s. y la producción de DON, 15-AcDON, 3-AcDON, NIV y ZEA en granos de sorgo
- 2) Evaluar el efecto de la actividad hídrica y la temperatura sobre el crecimiento de *F. proliferatum* y la producción de FB1 y FB2 en granos de sorgo

6.3. Metodología

6.3.1. Efecto de la temperatura y la actividad hídrica sobre la velocidad de crecimiento y la producción de micotoxinas

De las cepas estudiadas, se seleccionaron 3 cepas de *F. graminearum* s.s. y 3 cepas de *F. proliferatum*, para evaluar el efecto de la temperatura (T) y la actividad hídrica (aw) sobre la velocidad de crecimiento micelial y la producción de micotoxinas (Fumero et al., 2016; Lahour et al., 2017). Para ello, se utilizaron granos de sorgo libres de toxinas esterilizados con rayos gamma a los que se les agregó agua destilada estéril para obtener las diferentes aw (Tabla 4). El sorgo se equilibró a 4 °C durante 72 h y la aw final (0,950, 0,980 o 0,995) se confirmó utilizando un Aqualab CX-2 (Decagon Devices Inc).

Tabla 4. Cantidades de sorgo o glicerol y agua según las actividades hídricas (aw) evaluadas.

aw	0.950	0.980	0.995
Sorgo (g) / agua (mL)	10 / 1,5	10 / 2,5	10 / 3,5
Glicerol (g) / agua (mL)	18,3 / 100	7,3 / 100	2,2 / 100

Se colocó un disco de micelio de cada cepa en el centro de cada placa de Petri con los granos de sorgo a distintas aw. Las placas de cada aw inoculadas con las distintas cepas de *Fusarium* spp., se colocaron en una caja cerrada conteniendo un frasco con glicerol / agua con la misma aw (Tabla 4) para mantener el equilibrio atmosférico. Las placas se incubaron a 15 °C, 25 °C y 30 °C durante 28 días. Los ensayos se realizaron por triplicado. Se midió diariamente el diámetro de crecimiento de la colonia y se determinó la velocidad de crecimiento como la pendiente de la recta del crecimiento vs tiempo, utilizando la fase exponencial del crecimiento del hongo. Al finalizar, las placas se secaron a 50 °C y se molieron los granos para su posterior determinación del contenido de micotoxinas. A los granos inoculados con *F. graminearum* s.s. se les determinó la presencia de DON, 15-AcDON, 3-AcDON, NIV y ZEA, y a los granos inoculados con *F. proliferatum* se les determinó la presencia de FB1 y FB2. Las muestras fueron enviadas al laboratorio del Departamento de Química del CENUR, Litoral Norte, para la determinación por HPLC-MS. El límite de cuantificación del método fue de 1 µg/g para DON, 0, 25 µg/g para 15-AcDON, 0, 25 µg/g para 3-AcDON, 0, 25 µg/g para NIV y 0, 25 µg/g para ZEA. El efecto de cada

factor, aw y T, y sus interacciones con la velocidad de crecimiento y producción de micotoxinas por *F. graminearum* s.s. y *F. proliferatum* se determinó mediante un análisis de varianza de doble entrada (Two Way - ANOVA). Los análisis estadísticos se realizaron con SigmaStat® v4.0 (Systat Software Inc., Hounslow, Londres, UK). Los análisis fueron realizados por especie, considerando un nivel de significancia de $p < 0,001$. Se realizaron mapas de contorno y gráficos tridimensionales utilizando el software SigmaPlot® v.10.0 (Systat Software Inc., Hounslow, Londres, UK).

6.4. Resultados

Se observó que tanto *F. graminearum* s.s. como *F. proliferatum* pudieron crecer en todas las condiciones ambientales ensayadas. Sin embargo, ambas especies fueron significativamente afectadas por la aw y la temperatura (Figura 28 a y b, Tabla 5 y 7). La menor velocidad de crecimiento fue a la temperatura de 15 °C para ambas especies, independientemente de la aw. La aw, por otro lado, afectó en diferente forma la velocidad de crecimiento de ambas especies fúngicas (Figura 28 a y b).

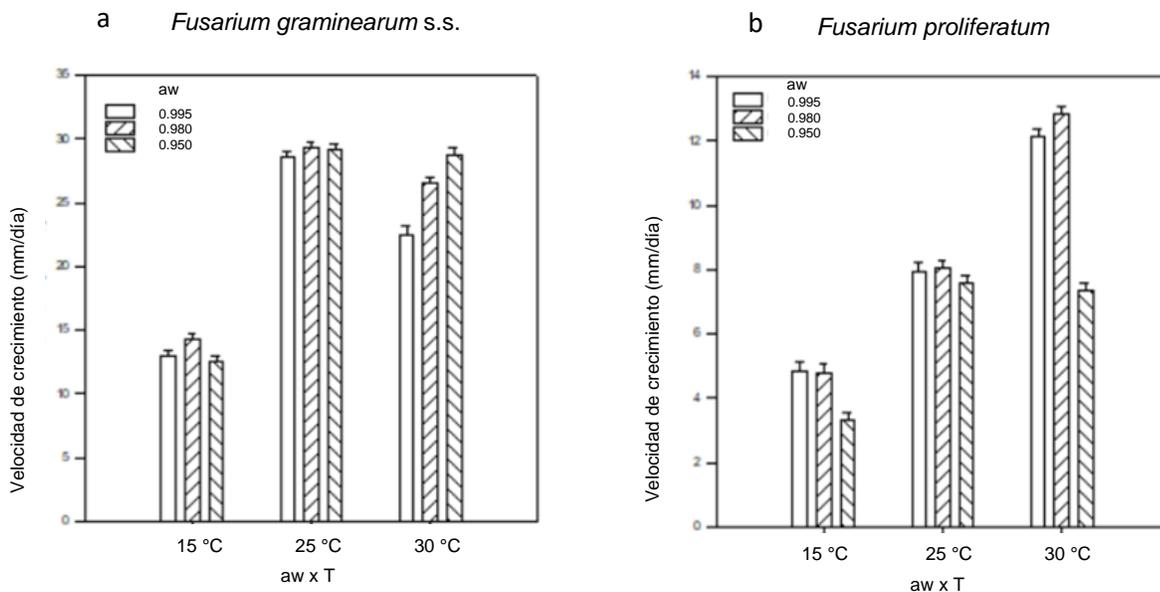


Figura 28. Efecto de diferentes actividades hídricas y temperaturas sobre la velocidad de crecimiento de: a: *Fusarium graminearum* s.s. y b: *F. proliferatum*, en sorgo.

Teniendo en cuenta el crecimiento de *F. graminearum* s.s., se observó que la temperatura es el factor que más lo afecta, seguido de la aw (Tabla 5). La velocidad de crecimiento mostró diferencias significativas entre las temperaturas evaluadas para todas las aw, con excepción del crecimiento a 25 y 30 °C en las aw 0,980 y 0,950. El rango de crecimiento óptimo para *F. graminearum* s.s. fue de 24 - 30 °C y aw de 0,950 - 0,995 (Figura 29 a y b).

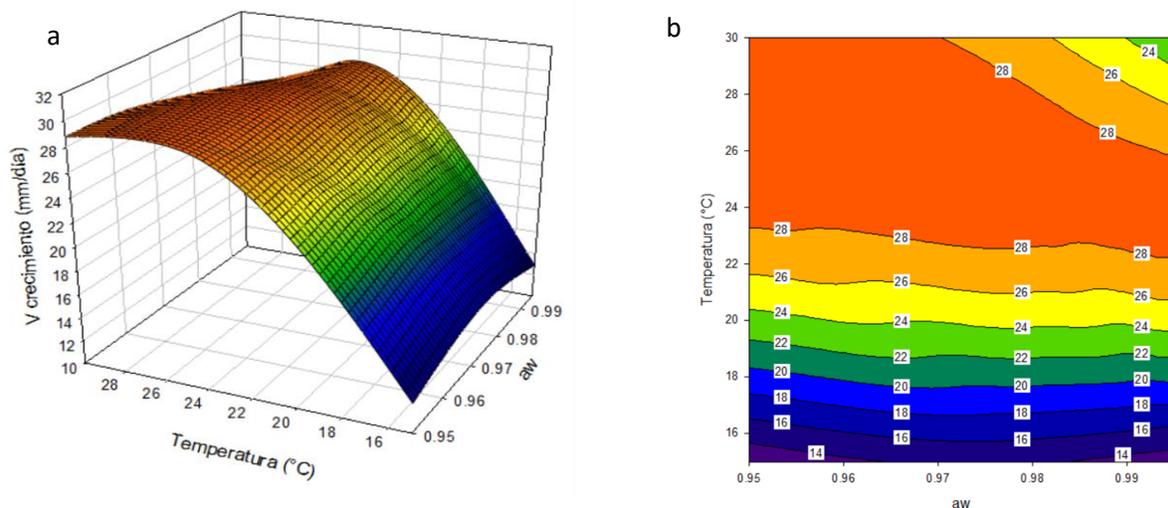


Figura 29 a y b. Efecto de la temperatura y la actividad hídrica (aw) sobre la velocidad de crecimiento de *Fusarium graminearum* s.s. en granos de sorgo. Representado en una gráfica tridimensional (a) y un mapa de contorno bidimensional donde los números indican la velocidad de crecimiento en milímetros/día (b).

Tabla 5. Análisis de varianza sobre el efecto de la temperatura (T°C), la actividad hídrica (aw) y sus interacciones sobre el crecimiento de *Fusarium graminearum* s.s.

Fuente de variación	g.l.	M.S.	F	P
aw	2	87	16	<0,001
T	2	1674	312	<0,001
T x aw	4	107	20	<0,001

g.l.: grados de libertad, M.S.: media cuadrática, F: Snedecor-F., P = p-valor a 0,001.

El efecto de la temperatura, la aw y sus interacciones sobre la producción de micotoxinas en *F. graminearum* s.s. fue muy variable y dependió de cada micotoxina en particular, si bien en términos generales la aw fue el factor más influyente (Tabla 6 y Figuras 30-34). La producción de DON fue afectada significativamente por la aw y la temperatura (Tabla 6). El rango de producción de esta toxina fue amplio, 22 - 26 °C, con un óptimo a 24 °C y aw de 0,970 – 0,995 (Figura 30 a y b). La aw y la temperatura también afectaron la producción de 15-AcDON de forma significativa (Tabla 6). El rango de temperatura y aw para la producción de 15-AcDON por *F.*

graminearum s.s. fue más restringido, siendo entre 20 – 26 °C y 0,995, respectivamente (Figura 31 a y b).

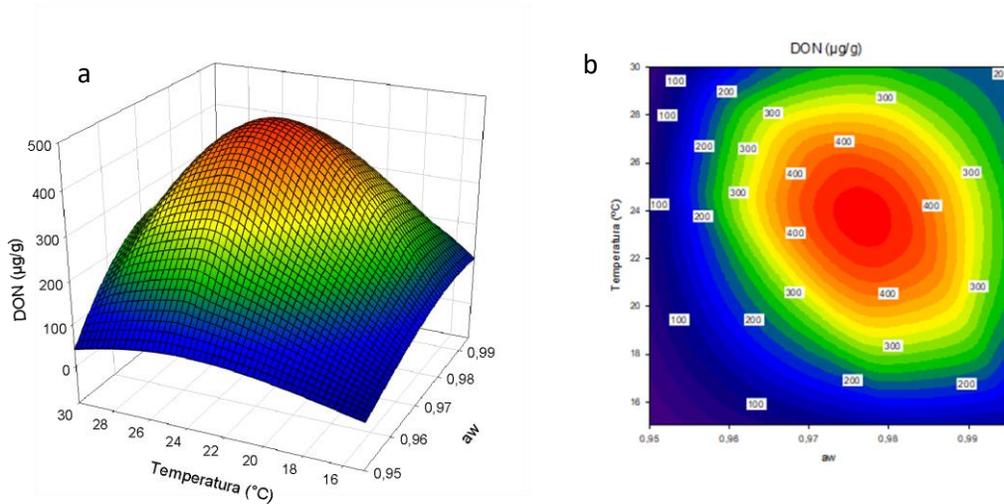


Figura 30 a y b. Efecto de la temperatura y la actividad hídrica (aw) sobre la producción de DON por *Fusarium graminearum* s.s. en granos de sorgo. Representado en una gráfica tridimensional (a) y un mapa de contorno bidimensional donde los números indican la concentración de toxina producida en µg/g (b).

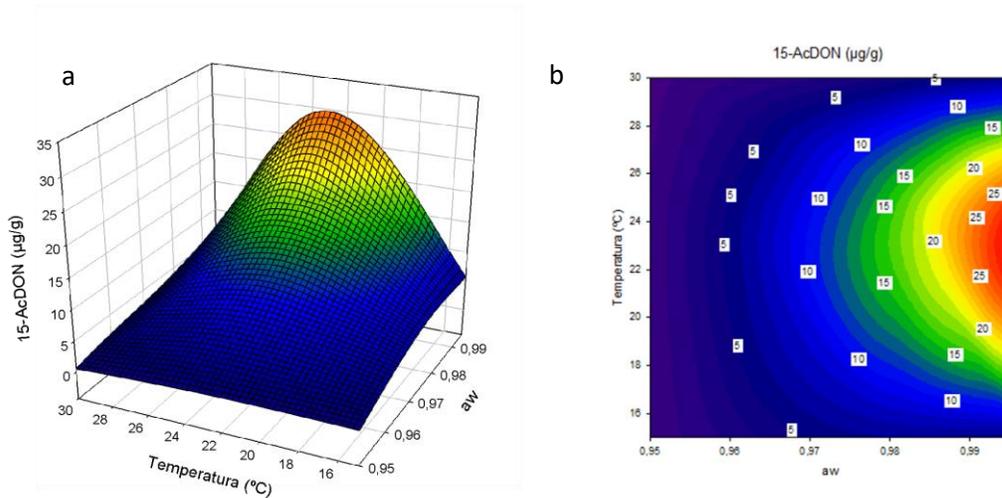


Figura 31 a y b. Efecto de la temperatura y la actividad hídrica (aw) sobre la producción de 15-AcDON por *Fusarium graminearum* s.s. en granos de sorgo. Representado en una gráfica tridimensional (a) y un mapa de contorno bidimensional donde los números indican la concentración de toxina producida en µg/g (b).

La producción de 3-AcDON por *F. graminearum* s.s. solo se vio afectada en forma significativa por la aw (Tabla 6). El rango de temperatura para su producción fue amplio, entre 20 – 26 °C, mientras que la aw resultó más acotada 0,970 – 0,995 (Figura 32 a y b). Ninguna de las variables evaluadas afectó de forma significativa la producción de NIV (Tabla 6). El rango óptimo para su producción fue entre 16 – 30 °C y aw de 0,995 (Figura 33 a y b).

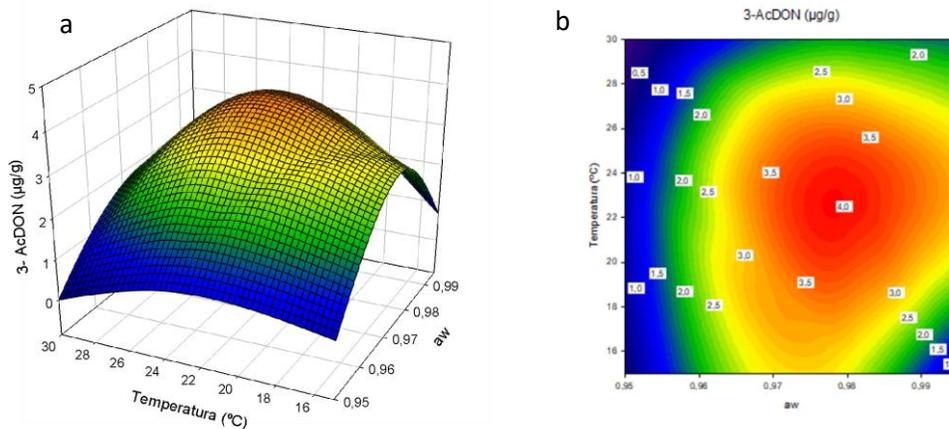


Figura 32 a y b. Efecto de la temperatura y la actividad hídrica (aw) sobre la producción de 3-AcDON por *Fusarium graminearum* s.s. en granos de sorgo. Representado en una gráfica tridimensional (a) y un mapa de contorno bidimensional donde los números indican la concentración de toxina producida en µg/g (b).

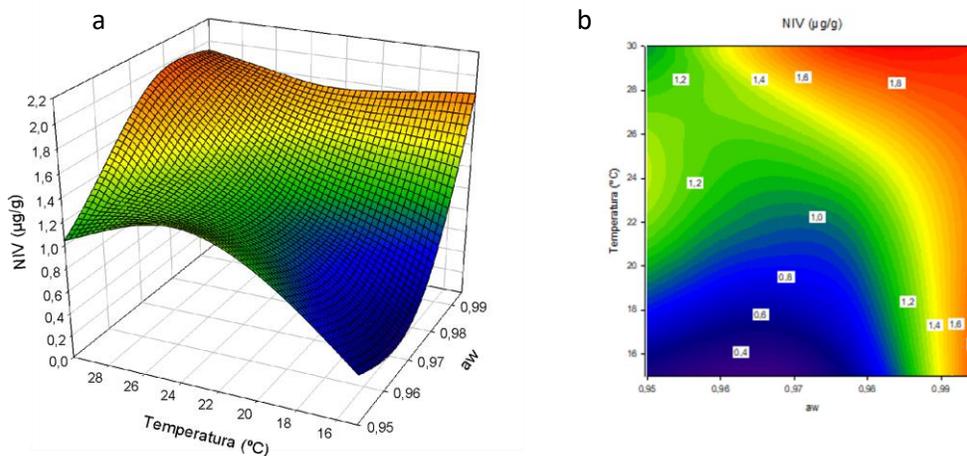


Figura 33 a y b. Efecto de la temperatura y la actividad hídrica (aw) sobre la producción de NIV por *Fusarium graminearum* s.s. en granos de sorgo. Representado en una gráfica tridimensional (a) y un mapa de contorno bidimensional donde los números indican la concentración de toxina producida en µg/g (b).

La producción de ZEA se vio afectada significativamente por ambas variables (T y aw). El rango de temperaturas y aw para su producción fue amplio, entre 22 – 30 °C y 0,970 – 0,995, respectivamente (Figura 34 a y b).

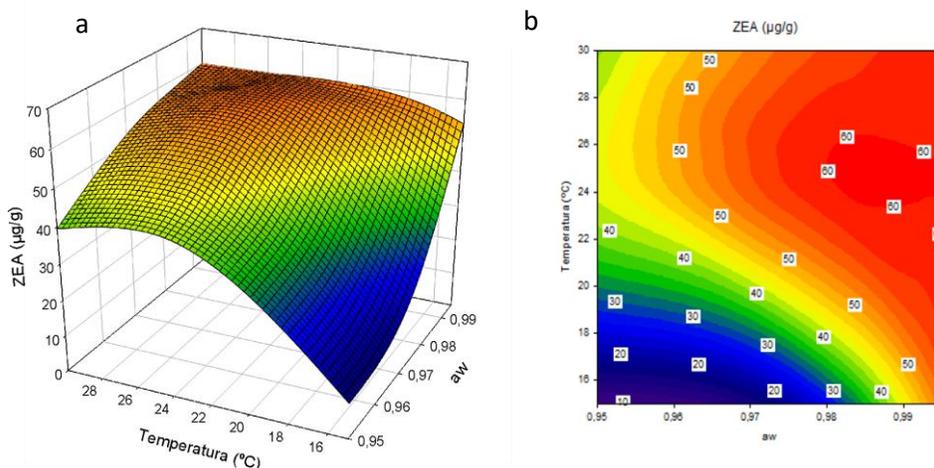


Figura 34 a y b. Efecto de la temperatura y la actividad hídrica (aw) sobre la producción de ZEA por *Fusarium graminearum* s.s. en granos de sorgo. Representado en una gráfica tridimensional (a) y un mapa de contorno bidimensional donde los números indican la concentración de toxina producida en µg/g (b).

Tabla 6. Análisis de varianza sobre el efecto de la temperatura (T°C), la actividad hídrica (aw) y sus interacciones sobre la producción de DON, 15-AcDON, 3-AcDON, NIV y ZEA por *Fusarium graminearum* s.s.

Toxina	Fuente de variación	g.l.	M.S.	F	P
DON	aw	2	318724	17	<0,001
	T	2	178455	10	<0,001
	T x aw	4	45498	2	0,056
15-AcDON	aw	2	318724	17	<0,001
	T	2	178455	10	<0,001
	T x aw	4	45498	2	0,056
3-AcDON	aw	2	36	11	<0,001
	T	2	13	4	0,022
	T x aw	4	3	1	0,402
NIV	aw	2	5	3	0,045
	T	2	3	2	0,166
	T x aw	4	1	1	0,553
ZEA	aw	2	4567	28	<0,001
	T	2	4666	29	<0,001
	T x aw	4	614	4	0,007

g.l.: grados de libertad, M.S.: media cuadrática, F: Snedecor-F., P = p-valor a 0,001.

En el caso de *F. proliferatum*, se determinó que la temperatura es el factor más influyente en el crecimiento, seguido de la aw (Tabla 7). Se obtuvo un óptimo de crecimiento a 30 °C y un rango de aw de 0,970 - 0,995 (Figura 35).

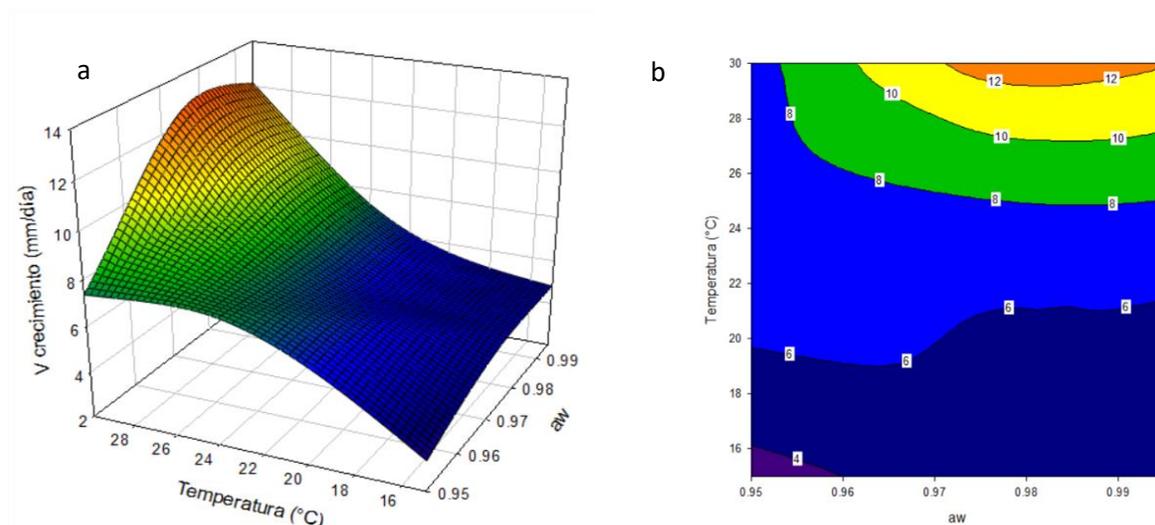


Figura 35. Efecto de la temperatura y actividad hídrica (aw) sobre la velocidad de crecimiento de *Fusarium proliferatum* en granos de sorgo. Representado en una gráfica tridimensional (a) y un mapa de contorno bidimensional donde los números indican la velocidad de crecimiento en milímetros/día (b).

Tabla 7. Análisis de varianza sobre el efecto de la temperatura (T°C), la actividad hídrica (aw) y sus interacciones sobre el crecimiento de *Fusarium proliferatum*.

Fuente de variación	g.l.	M.S.	F	P
aw	2	48	92	<0,001
T	2	251	484	<0,001
T x aw	4	18	35	<0,001

g.l.: grados de libertad, M.S.: media cuadrática, F: Snedecor-F., P = p-valor a 0,001.

Se determinó que la a_w es el factor más influyente en la producción de FBs. En este sentido, se obtuvo que la máxima producción de FB1 y FB2 fue a a_w entre 0,970 y 0,980, y a una temperatura de 30 °C (Figuras 35 y 36, a y b).

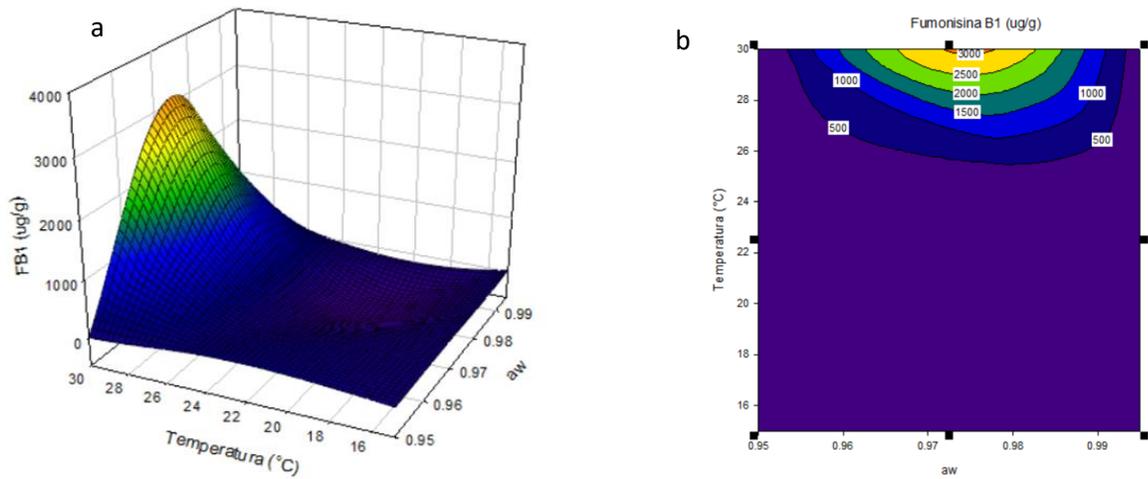


Figura 36 a y b. Efecto de la temperatura y la actividad hídrica (a_w) sobre la producción de FB1 por *Fusarium proliferatum* en granos de sorgo. Representado en una gráfica tridimensional (a) y un mapa de contorno bidimensional donde los números indican la concentración de toxina producida en $\mu\text{g/g}$ (b).

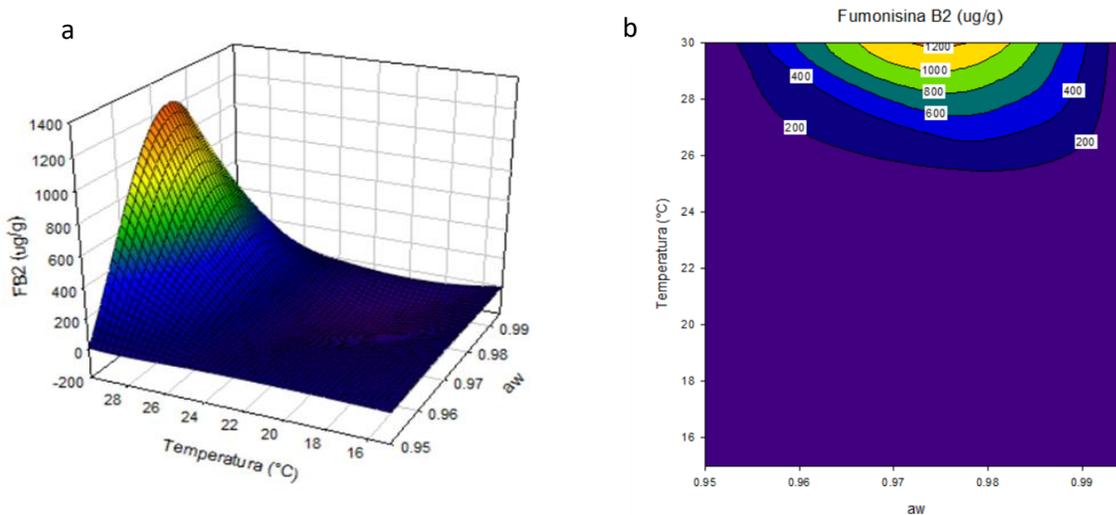


Figura 37 a y b. Efecto de la temperatura y la actividad hídrica (aw) sobre la producción de FB2 por *Fusarium proliferatum* en granos de sorgo. Representado en una gráfica tridimensional (a) y un mapa de contorno bidimensional donde los números indican la concentración de toxina producida en µg/g (b).

Tabla 8. Análisis de varianza sobre el efecto de la temperatura (T°C), la actividad hídrica (aw) y sus interacciones sobre la producción de FB1 y FB2 por *Fusarium proliferatum*.

Toxina	Fuente de variación	g.l.	M.S.	F	P
FB1	aw	2	9000730	4	0,025
	T	2	7534325	3	0,045
	T x aw	4	7176036	3	0,021
FB2	aw	2	1549302	4	0,023
	T	2	1128097	3	0,062
	T x aw	4	1126416	3	0,028

g.l.: grados de libertad, M.S.: media cuadrática, F: Snedecor-F., P = p-valor a 0.001.

6.5. Discusión

En este trabajo se estudió por primera vez el impacto de la actividad hídrica y la temperatura sobre el crecimiento y la producción de micotoxinas por las principales especies de *Fusarium*, *F. graminearum* s.s. y *F. proliferatum*, asociadas a granos de sorgo en Uruguay. Las especies analizadas pudieron crecer en todas las condiciones ambientales evaluadas, siendo estas afectadas significativamente por ambas variables (a_w y T). La temperatura fue el factor determinante para el crecimiento de ambas especies, siendo la temperatura óptima entre 25 – 30 °C.

Fusarium graminearum s.s. mostró un rango de crecimiento mayor a a_w y T bajas, respecto a *F. proliferatum*. La capacidad de *F. graminearum* s.s. de tolerar un amplio rango de a_w y T, le podría dar una ventaja frente a otras especies de *Fusarium* presentes en el campo, explicando en parte la alta incidencia de esta especie en los cultivos de sorgo en Uruguay. En otro estudio, donde analizaron el crecimiento de *F. graminearum* s.s. en granos de maíz, obtuvieron una temperatura óptima para el crecimiento de 25 °C y una actividad hídrica de 0,995 (Belizán et al., 2019), similar a lo reportado en el presente trabajo. Sin embargo, los autores encontraron que la a_w fue el factor determinante para el crecimiento de las cepas de *F. graminearum*, mientras que en nuestro trabajo fue la temperatura, lo que podría estar relacionado con una adaptación de las cepas a estos sustratos diferentes. En otros trabajos se ha observado que la fuente de nutrientes puede influir en los mínimos requeridos para el crecimiento, y que cepas de *F. graminearum* s.s. crecidas sobre diferentes sustratos naturales presentan diferencias en los rangos óptimos de crecimiento (Belizán et al., 2019; Ramirez, Chulze, Magan, 2006).

Por otro lado, el crecimiento óptimo de *F. proliferatum* fue a 30 °C y a_w de 0,970 - 0,995 en granos de sorgo. Estos resultados difieren de lo reportado previamente por otros autores, donde el crecimiento óptimo en trigo y agar extracto de maíz fue de 25 °C y a_w 0,995 (Cendoya et al., 2018; Marín et al., 2004). Estas diferencias en el óptimo de crecimiento, pero no así en los requerimientos de a_w y T que se encuentran dentro de los rangos establecidos para esta especie, pueden deberse a efectos del sustrato sobre el crecimiento y/o a características intrínsecas de las cepas utilizadas en cada estudio. También se ha visto que los sustratos artificiales pueden no reflejar lo que ocurre en sustratos naturales (Marín et al., 1999; Magan y Lacey, 1984).

Es importante conocer los rangos de T y aw óptimos y subóptimos para el crecimiento de cada especie patógena y toxicogénica, ya que estas pueden estar sobre el sustrato durante largos periodos de tiempo e infectar la planta cuando las condiciones ambientales son las adecuadas. En el campo, la temperatura y humedad fluctúan en el tiempo, pudiendo favorecer el desarrollo de una u otra especie.

Teniendo en cuenta la producción de toxinas la aw fue en general el factor más influyente. En términos generales los requerimientos para la producción de toxinas no coincidieron con los rangos óptimos para el crecimiento, siendo más restrictivos en los primeros. Para *F. graminearum* s.s. la máxima producción de DON fue a 24 °C y 0,980 - 0,995; de 15-AcDON fue a 25 °C y 0,995; de 3-AcDON fue a 25 °C y 0,980; de ZEA a 26 °C y 0,980 - 0,995 y de NIV a 25 °C y 0,980. Para todas las toxinas la menor producción se obtuvo a 0,950. Nuestros resultados difieren de lo reportado en otros trabajos. En un estudio sobre *F. graminearum* s.s. en maíz la mayor producción de tricotecenos la obtuvieron a 30 °C y 0,995 aw (Belizán et al., 2019), mientras que en otro estudio realizado en trigo se obtuvo una máxima producción de DON entre 25 - 30 °C y 0,950 - 0,995; 3-AcDON fue a 30 °C y 0,995; 15-AcDON a 10 °C y 0,950 (Ramírez Albuquerque, Patriarca, Fernández Pinto, 2022). Sin embargo, no hay reportes para la producción de micotoxinas en diferentes aw y temperaturas para *F. graminearum* s.s. en sorgo, por lo que podríamos asumir que estas diferencias encontradas respecto a los otros estudios pueden deberse a efectos del sustrato y/o las condiciones ambientales que ocurren durante el desarrollo del cultivo de sorgo en nuestro país. Por otro lado, el óptimo de producción de ZEA obtenido en este trabajo fue levemente superior a lo reportado en otros estudios, donde plantean que las condiciones favorables para la producción son temperaturas entre 20 - 25 °C y una humedad superior al 20%, pero puede producirse bajo condiciones de estrés a temperaturas inferiores de 8 a 15 °C y no puede formarse a temperaturas mayores de 37 °C (Ropejko y Twaruzek, 2021; Jiménez, Máñez y Hernández, 1996).

De acuerdo con estos resultados, sería interesante evaluar la producción de tricotecenos y ZEA de distintas cepas *F. graminearum* s.s. creciendo sobre diversos sustratos como maíz y trigo, para determinar si es un efecto del sustrato o una característica de las poblaciones de *F. graminearum* s.s. de Uruguay.

En cuanto a la producción de FBs por *F. proliferatum*, se obtuvo que el rango de temperatura y aw necesario fue más estrecho que el requerido para el crecimiento del hongo. Esto

concuenda con los resultados obtenidos por Marín et al. (1999), quienes encontraron que el rango de temperaturas sobre el cual FB1 puede ser producida es más estrecho que el necesario para germinar y crecer. En nuestro trabajo, el óptimo de temperatura y aw para la producción de FB1 y FB2 fue de 30 °C y 0,980, para ambas toxinas. La menor producción de FB1 se obtuvo a 15 °C para todas las aw, mientras que la menor producción de FB2 se obtuvo a 15 °C y 0,950. Estos resultados difieren de lo reportado en otros estudios. Cendoya et al. (2018), analizaron el efecto de la temperatura y aw sobre la producción de FBs en cepas de *F. proliferatum* en granos de trigo y encontraron diferencias en cuanto a los óptimos de producción de FBs según distintas cepas, siendo para una de ellas a 25 °C y 0,995 aw y para las otras dos cepas a 15 °C y 0,995 aw. En otro trabajo encontraron que las cepas de *F. proliferatum* estaban mejor adaptadas a temperaturas bajas y obtuvieron un óptimo de producción de FB1 a 15 °C y 0,980 (Marín et al., 2004). Estas diferencias podrían estar indicando una adaptación de las cepas de *F. proliferatum*, aisladas en nuestro trabajo, a las condiciones de temperatura que ocurren durante el verano en el cultivo de sorgo en Uruguay.

En términos generales, el mayor crecimiento y producción de toxinas de ambas especies de *Fusarium* se obtuvo a aw altas y temperaturas entre 25-30 °C para *F. graminearum* s.s. y 30 °C para *F. proliferatum*, lo que refleja las condiciones climáticas de la región donde se obtuvieron los aislamientos. En Uruguay la temperatura promedio durante el verano es de 24,4 °C con una máxima de 27,0 °C y una mínima 22,0 °C, mientras que la media de las precipitaciones es de 351.8 mm (INUMET, 2022/23). Los altos niveles de toxinas producidos en estos rangos de temperatura y disponibilidad de agua muestran el riesgo de contaminación al que está expuesto un cultivo de verano como el sorgo y explican en parte los niveles de micotoxinas encontrados en las muestras analizadas.

Las condiciones ambientales durante el desarrollo de los cultivos juegan un rol importante para la infección de los mismos con hongos y micotoxinas. Un estudio sobre el efecto de las variables climáticas en la infección de trigo por *F. graminearum* s.s. ha demostrado que la temperatura y aw durante la floración explican en gran parte la variabilidad observada en cuanto a la intensidad de la enfermedad y los niveles de micotoxinas encontrados (Hooker, Schaafsma, Tamburic-Ilincic, 2007). Dado que en sorgo existe poca información sobre cómo ocurre la infección por las especies de *Fusarium*, sería importante conocer cómo influyen estas variables (T y aw) en la infección por *F. graminearum* s.s. y *F. proliferatum* y la producción de micotoxinas en plantas de sorgo durante la floración y llenado de grano.

Actualmente, el cambio climático es considerado un factor importante que afecta la seguridad e inocuidad de los alimentos a nivel mundial. Está asociado con un aumento en las temperaturas y climas más extremos, así como periodos de lluvias y sequía. Las lluvias durante la floración pueden aumentar en algunos cultivos el riesgo de contaminación por micotoxinas. Además, se prevé un aumento de plagas que pueden facilitar la colonización de los hongos en la planta al generar lesiones y aumentar la dispersión de los mismos (Han et al., 2022; Fumero, Sulyok, Chulze, 2016). Comprender cómo los posibles escenarios del cambio climático podrían afectar la infección fúngica y la producción de micotoxinas por especies de *Fusarium*, así como profundizar el conocimiento sobre la ecofisiología de las especies y la epidemiología de las enfermedades es sumamente importante para desarrollar modelos predictivos de factores de riesgo durante el desarrollo del cultivo y el manejo poscosecha de los granos.

7. CONCLUSIONES

- *Fusarium graminearum* s.s. apareció como la principal especie contaminante en granos de sorgo en los años de muestreo, seguido por especies del complejo *Fusarium fujikuroi* (FFSC). Dentro de estas últimas se identificaron las especies *F. proliferatum*, *F. andiyazi* y *F. thapsinum*, siendo éste el primer reporte para Uruguay. Además, se reportó por primera vez la presencia de las especies *F. fujikuroi* y *F. boothii* en sorgo.
- Se registró contaminación con micotoxinas en las muestras de granos de sorgo provenientes de las zafras 2016 y 2017. Se detectó DON y ZEA en altas concentraciones, e incluso algunas muestras superaron los niveles recomendados para estas toxinas. Por otro lado, las FB1 y FB2 aparecieron en niveles bajos en los años evaluados.
- La mayoría de las cepas de *F. graminearum* s.s. y *F. proliferatum* produjeron al menos una de las toxinas analizadas. También se encontraron cepas que no fueron capaces de producir ninguna de las toxinas en las condiciones del ensayo.
- La mayoría de las cepas de *F. graminearum* s.s. presentaron genotipo 15-AcDON.
- En *F. graminearum* s.s., la expresión de los genes *Tri5*, *Tri6*, *Tri10*, *PKs4* y *PKs13* asociados con las rutas biosintéticas de tricotecenos y ZEA, mostraron una inducción temprana y una mayor expresión génica en presencia de sorgo comparado con el control sin el agregado de sorgo.
- El crecimiento y la producción de toxinas por *F. graminearum* s.s. y *F. proliferatum* dependió de la temperatura y la actividad hídrica del grano. En términos generales, el mayor crecimiento de ambas especies de *Fusarium* se obtuvo a 25 – 30 °C y aw 0,980 – 0,995. A temperaturas y aw bajas, 15 °C y 0,950, las especies presentaron menor crecimiento y menor producción de toxinas.

8. PERSPECTIVAS

- Continuar con el monitoreo de especies patógenas y toxicogénicas en el sorgo y las toxinas presentes en los granos, para poder diseñar modelos predictivos que permitan prevenir la contaminación de los cultivos y productos finales.
- Continuar con el estudio de las especies de *Fusarium* encontradas, para comprender la estructura y diversidad de las poblaciones presentes en Uruguay.
- Estudiar la patogenicidad y virulencia en sorgo de las principales especies encontradas.
- Profundizar en el conocimiento sobre los efectos sinérgicos de las micotoxinas encontradas en sorgo (DON, NIV, ZEA, FB1 y FB2), ya que se observó coocurrencia de estas.
- Profundizar los estudios en las especies de hongos nuevas detectadas en el país y las posibles micotoxinas emergentes.
- Realizar ensayos a campo para evaluar distintas medidas de manejo del cultivo y desarrollar formas de producción que minimicen la infección fúngica y contaminación con micotoxinas.
- Realizar estudios sobre el comportamiento de estas especies en poscosecha y durante la elaboración de subproductos con destinos alimenticios.

Article

Fusarium Species and Mycotoxins Associated with Sorghum Grains in Uruguay

Ana Belén Corallo ¹, Agustina del Palacio ¹, María Oliver ¹, Susana Tiscornia ¹, Macarena Simoens ², Jaqueline Cea ², Inés de Aurrecochea ³, Inés Martínez ⁴ , Alicia Sanchez ⁴, Silvina Stewart ⁵  and Dinorah Pan ^{1,*}

- ¹ Sección Micología, Facultad de Ciencias Facultad de Ingeniería, UdelaR, Julio Herrera y Reissig 565, Montevideo 11300, Uruguay; belencfabiano@gmail.com (A.B.C.); agustinadelpalacio@gmail.com (A.d.P.); moliver24@gmail.com (M.O.); tiscorniasusana@gmail.com (S.T.)
- ² Laboratorio Tecnológico del Uruguay, Departamento de Análisis de Productos Agropecuarios, Avenida Italia 6201, Montevideo 11500, Uruguay; msimoens@latu.org.uy (M.S.); jacqueline.cea6@gmail.com (J.C.)
- ³ Departamento de Granos, Dirección General de Servicios Agrícolas, Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, Avenida Millán 4703, Montevideo 12900, Uruguay; ideaurrecochea@mgap.gub.uy
- ⁴ Latitud, Fundación del Laboratorio Tecnológico del Uruguay, Avenida Italia 6201, Montevideo 11500, Uruguay; imartin@latitud.org.uy (I.M.); asanchez@latitud.org.uy (A.S.)
- ⁵ Programa Cultivos de Secano, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Estación Experimental La Estanzuela, Ruta 50, Km 11, Colonia 70000, Uruguay; sstewart@inia.org.uy
- * Correspondence: dpan@fing.edu.uy

Abstract: Grain mold and stalk rot are among the fungal diseases that cause significant losses in sorghum worldwide and are caused by different *Fusarium* spp. The presence of *Fusarium* species in sorghum grains causes yield losses and mycotoxin contamination, which represents a risk to consumers. In this study, *Fusarium graminearum* species complex (FGSC) had a high incidence, followed by *Fusarium fujikuroi* species complex (FFSC) and *F. incarnatum-equiseti* species complex. Within FFSC, *F. proliferatum*, *F. andiyazi*, *F. fujikuroi*, *F. thapsinum*, *F. verticillioides* and *F. subglutinans* were identified, and this was the first report of *F. fujikuroi* in sorghum. The most frequent toxins found in sorghum samples were deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEN). The presence of fumonisins and nivalenol (NIV) was detected at low levels. This study adds new knowledge about the occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in sorghum grains. Furthermore, this is the first report in Uruguay on fungicide sensitivity for *Fusarium* isolates from sorghum, which constitutes an important starting point for defining management practices to minimize fungal infection and mycotoxin contamination.

Keywords: *Fusarium graminearum*; *Fusarium fujikuroi* species complex; trichothecene; zearalenone; fumonisin; fungicide sensitivity

Key Contribution: *Fusarium graminearum* and *Fusarium fujikuroi* species complexes were isolated from sorghum in Uruguay. *Fusarium fujikuroi* was isolated for the first time from sorghum grains. The most frequent toxins found in sorghum samples were DON and ZEN. Metconazole was the fungicide that showed the best performance against *F. proliferatum* and *F. graminearum*.



Citation: Corallo, A.B.; del Palacio, A.; Oliver, M.; Tiscornia, S.; Simoens, M.; Cea, J.; de Aurrecochea, I.; Martínez, I.; Sanchez, A.; Stewart, S.; et al. *Fusarium* Species and Mycotoxins Associated with Sorghum Grains in Uruguay. *Toxins* **2023**, *15*, 484. <https://doi.org/10.3390/toxins15080484>

Received: 28 June 2023
Revised: 23 July 2023
Accepted: 25 July 2023
Published: 31 July 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench), with a world production of 62×10^6 t in 2021, is one of the most important cereals [1,2].

With the discovery of sorghum's associated health benefits, food-grade sorghum has been produced and is becoming more popular in different regions of the world as a human food [3]. These nutritional qualities, in addition to increasing the profitability of sorghum, have increased the total cultivated area worldwide [4].

In Uruguay, sorghum is one of the three major grain fed summer crops, and it is used for feeding cattle, dairy cattle, poultry, and swine. It's is considered one of the main

protagonists, both for its stability and for its low production cost, which contributes to increasing the profitability of the livestock and dairy production system. Stems and leaves are used for silage, and grains are destined for animal feeding or bioethanol production [5]. For this reason, the sorghum cultivated area has increased by 237% from 2000 to 2021, with 233×10^3 t harvested in the 2020–2021 season [6].

Although sorghum is considered to have habitual resistance to microbial infection, fungal contamination is a major limitation for sorghum production [3]. Among the fungal diseases that causes significant losses in the world are grain mold and stalk rot, which are caused by different *Fusarium* spp. [7]. The presence of *Fusarium* species in sorghum grains causes yield losses and represents a risk to the health of consumers due to the capacity to produce mycotoxins, secondary toxic metabolites.

The *Fusarium fujikuroi* species complex (FFSC) is usually associated with sorghum in different countries [3,8–12]. In addition, some species of this complex can produce fumonisins (FBs), a group of mycotoxins responsible for the contamination of sorghum grains [13]. The presence of FBs in grains and feed has been associated with several diseases such as leukoencephalomalacia equine and porcine pulmonary edema. Further, human consumption has been epidemiologically associated with esophageal cancer and neural tube defects [14]. Other major *Fusarium* spp. associated with sorghum are the members of the *Fusarium graminearum* species complex (FGSC), which produce type B trichothecene mycotoxins such as deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV) and zearalenone (ZEN). DON is associated with feed refusal, vomiting, and suppressed immune functions, and ZEN can cause changes in reproductive organs and fertility loss in animals and humans due to the affinity for estrogen receptors [15,16].

Considering the above and the lack of information that exists in Uruguay, the aims of the present study were (1) to identify the *Fusarium* species associated with sorghum grains in the major sorghum-growing area in Uruguay, (2) to determine the presence of mycotoxins in sorghum samples, (3) to assess the ability of *Fusarium* spp. to produce mycotoxins, and (4) to evaluate the in vitro sensitivity of the main *Fusarium* species towards four fungicides corresponding to triazoles and benzimidazoles, currently used on several crops.

2. Results

2.1. Species Identification

A total of 1567 *Fusarium* spp. from the 2016 harvest and 1098 from the 2017 harvest were isolated in 95 and 72 sorghum grain samples, respectively.

In 2016, mean *Fusarium* spp. incidence in grain samples was 17%, with a maximum of 84%. During 2017, the incidence was lower (15%), although the maximum incidence was 100%. Among the *Fusarium* species isolated and based on morphological characteristics, FGSC had the highest incidence (10%, $n = 1744$), followed by species belonging to FFSC (4%, $n = 609$) and the *F. incarnatum-equiseti* species complex (FIESC) (2%, $n = 282$) (Figure 1).

Within FGSC, *F. graminearum* s.s was the predominant species, with only two isolates identified as *F. boothii*. Meanwhile, within the FFSC, 28% were identified as *F. proliferatum*, 23% as *F. andiyazi*, 21% as *F. fujikuroi*, 18% as *F. thapsinum*, 5% as *F. verticillioides* and 5% as *F. subglutinans* (Figure S1 Supplemental Material). Other identified species were *F. heterosporum* (2%), *F. tricinctum* (1%), *F. armeniacum* (1%), *F. pseudograminearum* (0.5%), *F. chlamydosporum* (0.5%) and *F. oxysporum* (0.2%).

2.2. Trichothecene Genotype Determination

The multiplex PCR assays indicated that most *F. graminearum* s.s isolates were of the 15AcDON genotype (98%), with only two isolates indicating NIV genotypes. No 3-AcDON genotypes were determined in the growing seasons studied.

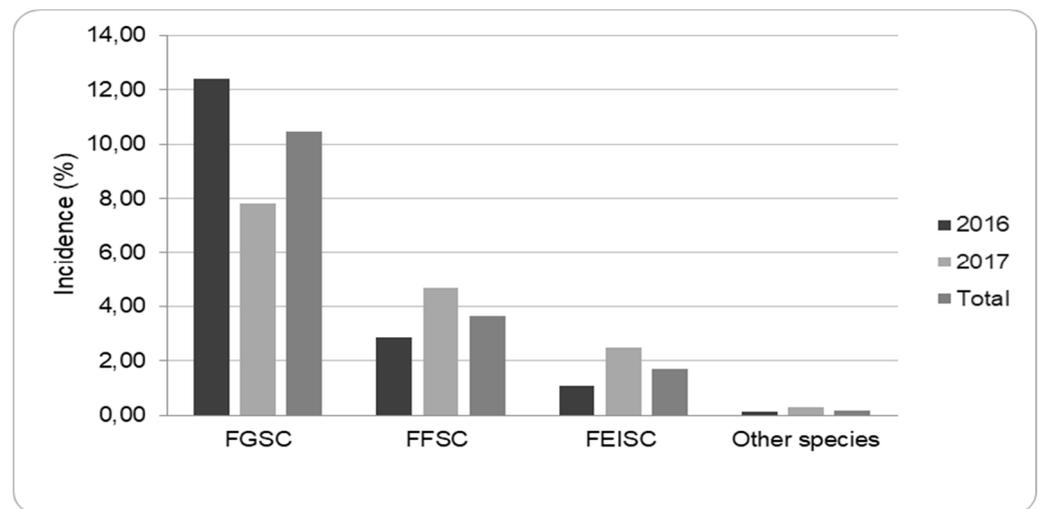


Figure 1. Incidence (%) of the different *Fusarium* species infecting the sorghum samples during 2016 and 2017 as assessed by visual observations. Incidence was calculated as the percentage of grain infected out of the total analyzed grains per sorghum sample. *Fusarium graminearum* species complex (FGSC); *Fusarium fujikuroi* species complex (FFSC); *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex (FIESC).

2.3. *Fusarium* Mycotoxin Production

The mycotoxin production ability of *F. graminearum* s.s and *F. proliferatum* isolates was analyzed, as they were the most frequent species. Of the *F. graminearum* s.s studied, ZEN was produced by 92% ($n = 86$) of the isolates, DON by 88% ($n = 83$) and NIV by 6% ($n = 6$). Production of FB1 and FB2 was detected in 75% ($n = 41$) and 64% ($n = 35$) of the *F. proliferatum* isolates, respectively. Thirteen *F. proliferatum* isolates (24%) did not produce fumonisins.

2.4. Determination of Mycotoxins in Sorghum

One hundred twelve sorghum samples harvested during 2016 and 2017 were analyzed for the presence of mycotoxins (Table 1). The percentage of DON-positive samples was high during the two years (88% and 93%), while mean DON content was low, varying from 1315 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to 565 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. Regarding ZEN, positive samples (97 and 90%) and the mean content (1453 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 752 $\mu\text{g}/\text{kg}$) were high in both years of study. Also, the annual maximum levels ranged from 6560 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to 9280 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Low levels of FB1 and FB2 were also detected in the sorghum samples. Similarly, low levels of NIV were only detected in three samples from 2017.

Table 1. Contamination by toxins in sorghum samples harvested during 2016 and 2017 in Uruguay.

	Total Mean ($\mu\text{g}/\text{kg}$) \pm SD		Positive Samples (%)		Contamination in Positive Samples ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
	2016	2017	2016	2017	Mean \pm SD	Range	Mean \pm SD	Range
					2016		2017	
DON	1315 \pm 1597	565 \pm 567	88	93	1507 \pm 1623	59–6071	619 \pm 564	59–2133
NIV	nd *	4 \pm 19	0	5	--	--	79 \pm 36	50–120
ZEN	1453 \pm 2194	752 \pm 1297	97	90	1567 \pm 2239	30–9280	841 \pm 1344	30–6560
FB1	67 \pm 244	58 \pm 148	16	23	411 \pm 493	80–1693	255 \pm 217	80–753
FB2	5 \pm 36	13 \pm 98	2	2	--	80–270	--	80–742

nd *: not detected.

2.5. Fungicide Sensitivity Assay

EC50 values of metconazole, tebuconazole, epoxiconazole and carbendazim were calculated for 20 isolates of *F. proliferatum* and *F. graminearum* s.s. Both *Fusarium* species showed different behaviors to the tested fungicides (Figures 2 and 3). The two *Fusarium* species investigated showed the highest sensitivity levels for metconazole, with EC50 values below 0.50 mg/L and significantly different from those of the other fungicides tested ($p < 0.05$). Only one isolate of *F. proliferatum* was shown to be less sensitive to metconazole, with EC50 values of 2.18 mg/L. Besides metconazole, EC50 values lower than 0.75 mg/L were recorded for carbendazim and tebuconazole for all isolates of *F. proliferatum*, with mean EC50 values of 0.53 mg/L and 0.33 mg/L, respectively. In the case of epoxiconazole, isolates S400 and S677 were observed to be the least sensitive, with EC50 values of 0.99 and 1.04 mg/L, respectively.

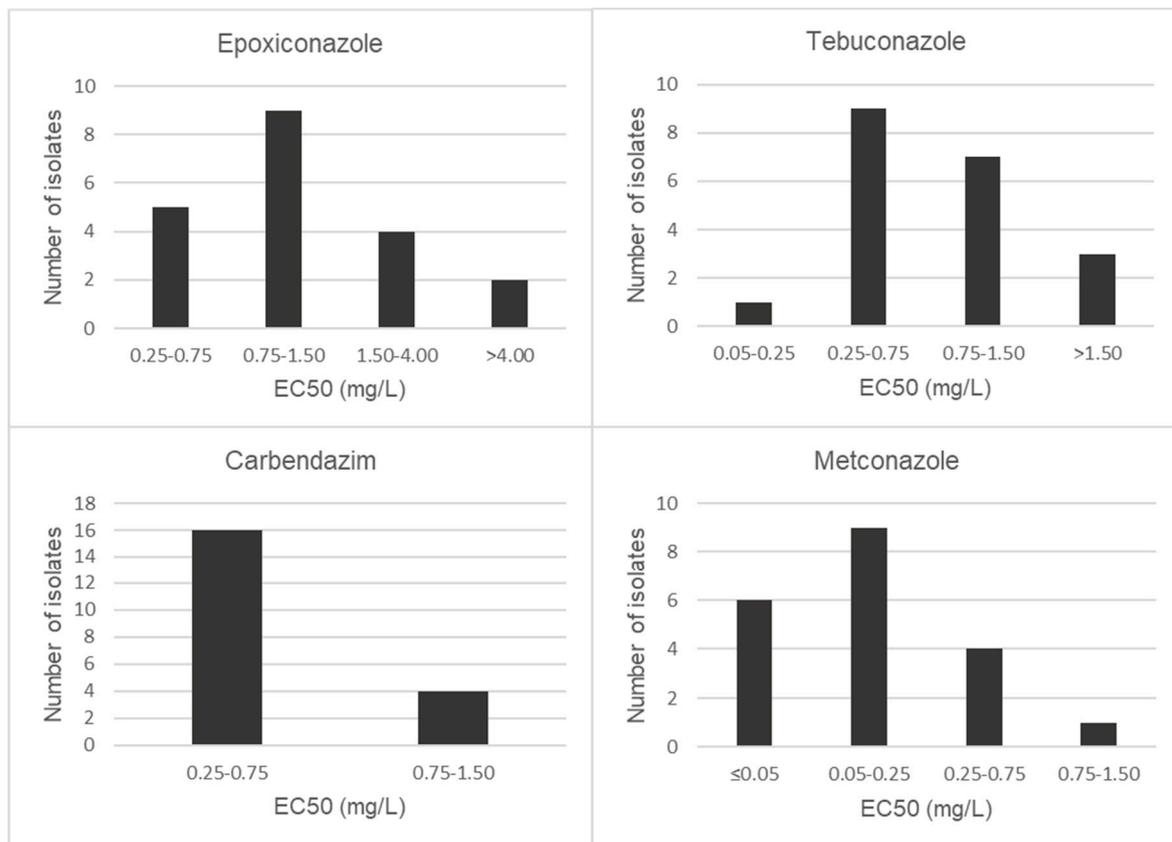


Figure 2. Distribution of EC50 (mg/L) values of *Fusarium proliferatum* isolates for epoxiconazole, tebuconazole, carbendazim and metconazole.

Generally, isolates of *F. graminearum* were shown to be less sensitive to the fungicides evaluated. The EC50 values for triazole fungicide class ranged from 0.31 mg/L to 15.29 mg/L with a mean of 1.97 mg/L for epoxiconazole, 0.05 mg/L to 0.97 mg/L with a mean of 0.17 mg/L for metconazole and 0.14 mg/L to 3.54 mg/L with a mean of 1.06 mg/L for tebuconazole (Figure 3). Additionally, carbendazim EC50 values ranged between 0.34 mg/L and 1.37 mg/L with a mean of 0.62 mg/L (Figure 3). In the case of epoxiconazole, isolate S501 was observed to have high EC50 values of 15.29 mg/L. Also, isolates S58, S68 and S501 showed low levels of sensitivity for tebuconazole, with values of 2.76, 2.88 and 3.54 mg/L, respectively.

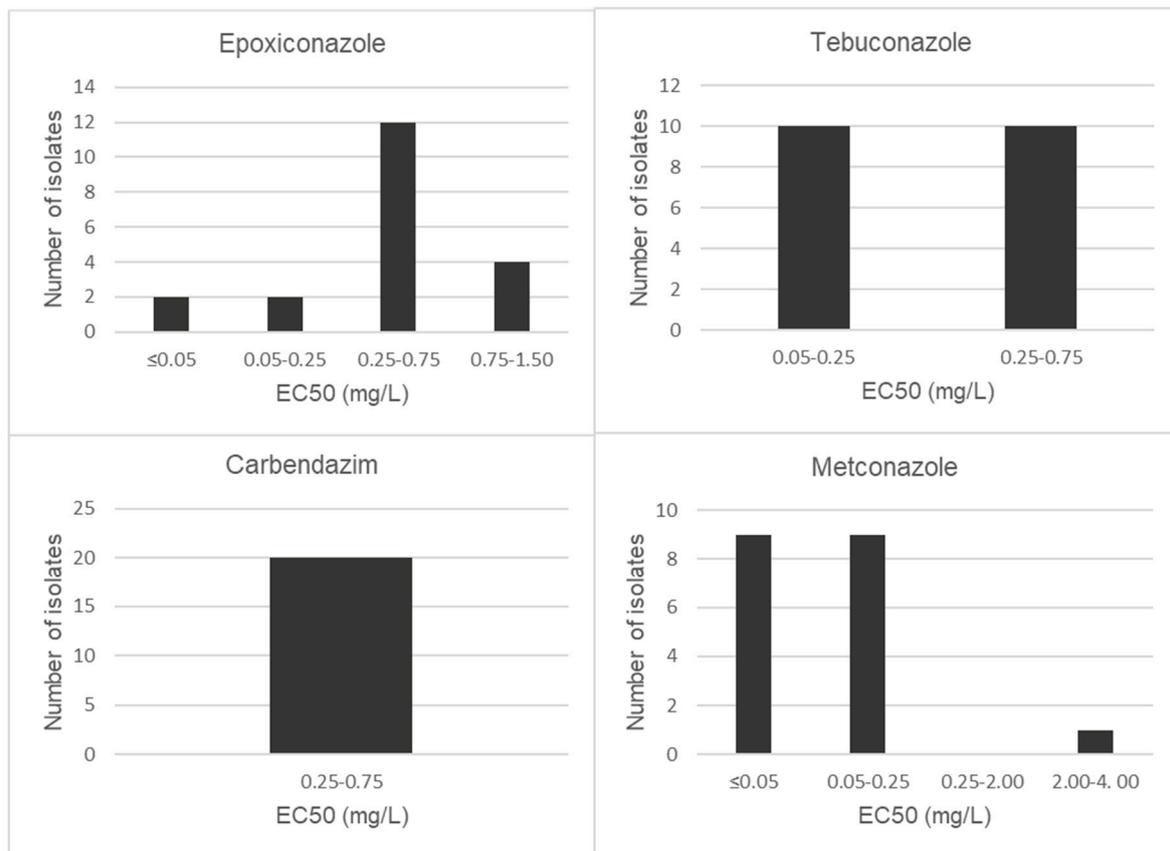


Figure 3. Distribution of EC50 (mg/L) values of *Fusarium graminearum s.s.* isolates for epoxiconazole, tebuconazole, carbendazim and metconazole.

3. Discussion

In Uruguay, little is known about the presence of fungi and mycotoxins in sorghum. Most of the studies that have been carried out have focused on describing the occurrence and incidence of *Fusarium* species in wheat and barley [17–19]. Only one study was found for this crop, and it was limited to silages [20]. Considering this, this work represents the first extended study about the occurrence of *Fusarium* species in sorghum grain in Uruguay. *Fusarium graminearum s.s.* appeared as the predominant species, followed by *F. proliferatum*, *F. andiyazi*, *F. fujikuroi* and *F. thapsinum*. Although all of these species have previously been present in sorghum in other parts of the world, our data indicate that *F. graminearum s.s.* is the main contaminant of sorghum, which differs from that reported in other studies where FFSC resulted in the most frequent contaminants [8–11,21,22]. This can be partially explained by the crop rotation system in Uruguay, where sorghum is generally planted after wheat or barley, so the prevalence of *F. graminearum s.s.* could be due to inoculum carryover from the previous crop. The presence of *F. graminearum* in sorghum grains has a great toxicological risk since this species can produce DON, 15-ADON, 3-ADON, NIV and ZEN. Also, infection of sorghum by species within FGSC can cause reduced germination and nutritional quality of the grains [23].

Within FFSC, *F. proliferatum*, *F. andiyazi* and *F. thapsinum* were the most frequent species, with all these species being reported for the first time in Uruguay. These species have been isolated from sorghum in Argentina, Australia, Brazil, Ethiopia, Nigeria, South Africa, Tunisia, and the USA and are well documented as pathogens of sorghum that cause grain mold and stalk rot [10,11,21,22,24–26]. However, frequencies of FFSC in this study were in contrast with species recovered from sorghum in other areas, including Argentina and Brazil, where *F. thapsinum* and *F. verticillioides* are the most frequent [8,11,12].

Fusarium fujikuroi was also recovered with high frequency within FFSC and, to our knowledge, this is the first report in sorghum. It has been isolated from rice, where it causes Bakanae disease, and from other crops such as soybeans, corn, barley, wheat, and peanuts.

These differences in the recovery and composition of FFSC may be associated with differences in agroclimatic and crop rotation systems associated with our country [26]. Moreover, little is known concerning the growth conditions, host range and pathogenicity of the *Fusarium* species associated with sorghum in Uruguay. This knowledge is essential for developing appropriate management strategies.

Fusarium graminearum s.s. with the DON/15ADON genotype was the predominant species and represents the first data of *F. graminearum* s.s. strains isolated from sorghum in Uruguay. Our results agree with previous reports from different crops in Uruguay and other regions of South America, where the DON-15ADON genotype prevails for *F. graminearum* s.s., showing the stability of genotype composition across crops and years [17,27,28].

Mycotoxins in sorghum samples showed contamination with FB1 and FB2, but in low levels, and none of the samples exceeded the limit established by the FDA for animal feed and the current regulations for other grains [29]. Incidence and DON levels found in the present study were high when compared to other reports from sorghum [30,31]. However, only 27% ($n = 30$) of samples had DON levels that exceeded the recommended levels in Uruguay for swine and equines (1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$); 10% ($n = 11$), the levels for cattle consumption (2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$); and 3% ($n = 3$), the levels for ruminants, sheep and poultry (5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) [32]. No sample exceeded the Uruguayan levels for raw materials destined for the production of animal feed or the FDA levels for grains destined for ruminants and chickens (10,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) [29,32]. Zearalenone was the most dominant mycotoxin and occurred at high levels and incidence rates, with 64% ($n = 72$) of the samples exceeding the recommended levels in Uruguay of 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [32]. Although there are very few published works on ZEN contamination in sorghum worldwide, our results are similar to previous reports which positioned ZEN as the most frequent mycotoxin in sorghum [33–35]. High concentrations of DON and ZEN in our country could be explained by the fact that *F. graminearum* s.s. was the main contaminant species for sorghum. In this sense, we found a positive correlation between the incidence of *F. graminearum* and DON ($r = 0.521$, $p < 0.001$) and ZEN ($r = 0.406$, $p < 0.001$). In addition, climatic conditions, agricultural practices and the sorghum varieties used in Uruguay could also explain the levels of mycotoxins found.

In Uruguay, chemical protection for the control of *Fusarium* grain mold in sorghum is still not widely used, and little is known about the activity of fungicides used on crops, especially against FFSC. Therefore, this study provided information on fungicide sensitivity to two of the main toxigenic *Fusarium* species associated with sorghum crops. Metconazole was the fungicide that showed the best performance against *F. proliferatum* and *F. graminearum*, while epoxiconazole showed a lower effect compared to the other fungicides. In this sense, few studies have investigated the sensitivity of *Fusarium* spp. to epoxiconazole and particularly have been carried out with *F. graminearum* isolated from wheat. The sensitivity of *F. proliferatum* was similar to that reported by other authors in other geographical regions [36–38]. A single isolate of *F. proliferatum* exhibited EC50 values of 2.18 mg/L for metconazole, suggesting reduced sensitivity compared with the other isolates collected. However, except for this isolate, the sensitivity to metconazole was higher than those detected for the other fungicides. Regarding *F. graminearum* s.s. sensitivity, metconazole was the most effective fungicide in inhibiting the growth of *F. graminearum* s.s. isolates with EC50 values lower than 0.97 mg/L. However, the mean EC50 values found for epoxiconazole (1.97 mg/L) and tebuconazole (1.06 mg/L) were higher than those reported by other authors. For epoxiconazole, reported sensitivities in wheat from China ranged from 0.019 to 0.93 mg/L for isolates of *F. graminearum* [39]. In our case, 55% of the isolates had EC50 values higher than 0.93 mg/L, which was the highest value reported for Chinese isolates; moreover, we found one isolate that had an EC50 value of 15.29 mg/L. In the case of sensitivity to tebuconazole, our study showed a mean EC50 value (1.06 mg/L) higher than 0.891 mg/L and 0.29 mg/L, which were the mean values reported in other studies

for isolates of *F. graminearum* s.s. from barley and wheat in Uruguay, respectively [17,19]. Sensitivity surely increases as years go by in relation to numerous exposures, especially to control *Fusarium* head blight. Moreover, our results agree with those obtained from wheat isolates in Brazil, China, Croatia and the United States [40–43]. Additionally, our findings were similar to previous reports that the EC50 values of isolates for metconazole were lower than the EC50 values of the same isolates for tebuconazole and the other fungicides [44]. To our knowledge, this is the first fungicide sensitivity analysis of different classes of fungicides for *F. proliferatum* and *F. graminearum* isolates from sorghum and constitutes an important starting point for defining management practices to control *Fusarium* grain mold in this crop. Further studies are needed to investigate the effectiveness of fungicide applications in vivo and the genetic basis for the reduced sensitivity of *Fusarium* species to epoxiconazole and tebuconazole.

4. Conclusions

Sorghum in Uruguay is exposed to colonization by a wide variety of toxigenic *Fusarium* species that could cause grain contamination with different mycotoxins, mainly from ZEN. These findings indicate the need to establish monitoring programs for mycotoxin levels in sorghum to ensure animal health and implement strategies to minimize fungal infection in the field. In addition to this, metconazole was found to be the most effective fungicide for control of the main *Fusarium* species analyzed.

5. Materials and Methods

5.1. Sorghum Samples

A total of 167 sorghum samples were collected during two harvest seasons from fields in the main sorghum cultivation area of Uruguay (Figure 4). Ninety-five sorghum samples from the 2016 harvest season and 72 samples from the 2017 harvest season were analyzed. Samples were collected according to the ISO 24333: cereals and cereal products - sampling. Each 2 kg grain sample was divided into two subsamples (1 kg each), one for mycological analysis and the other for mycotoxin analysis.

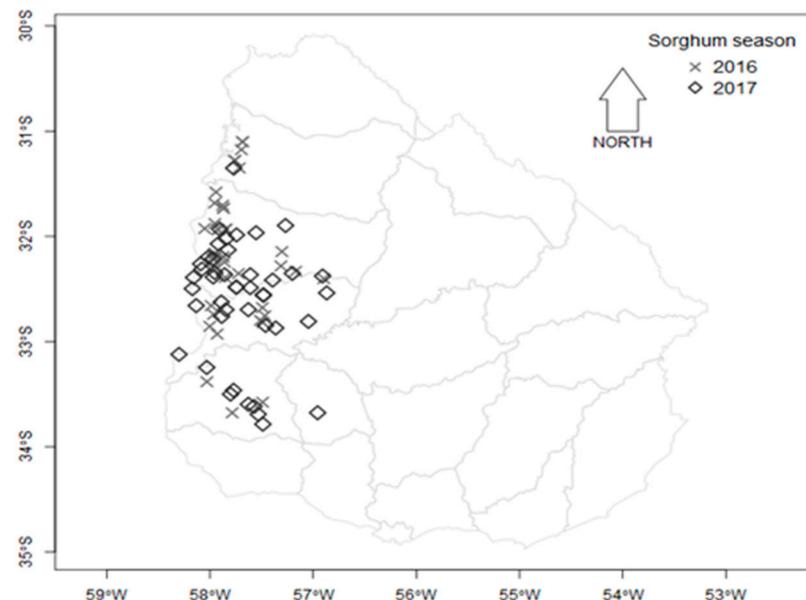


Figure 4. Map depicting the location of departments in Uruguay where sorghum samples were harvested in two sorghum growing seasons, 2016 and 2017.

5.2. *Fusarium* Isolation

From each sample, 100 grains were taken and surface disinfected by placing them in 0.4% hypochlorite for 2 min, rinsing with sterile distilled water and drying on sterile filter

paper. Then, they were placed in Petri dishes, 10 grains per plate, with potato dextrose agar (PDA) culture medium (Oxoid) and incubated at 25 ± 2 °C for 5 days. Monosporic cultures were obtained from colonies identified morphologically as *Fusarium* spp. according to Leslie and Summerell [45]. A subset of representative isolates from different morphologically identified *Fusarium* species was selected for molecular identification, 223 isolates from the 2016 harvest and 221 isolates from the 2017 harvest. The isolates were stored at -80 °C in the fungal collection of the Sección Micología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

5.3. Molecular Identification

Genomic DNA was extracted using the cetyltrimethylammonium bromide (2% CTAB) method [45].

Transcription elongation factor gene (*TEF 1- α*) RFLP analysis was performed to identify *Fusarium graminearum sensu stricto* (*F. graminearum s.s.*) from the remaining species within FGSC with a protocol previously described [46]. A fragment of the *TEF 1- α* gene was amplified by PCR with primers EF-1 and EF-2 [47]. The PCR cycling parameters used for the amplification were as follows: an initial denaturation cycle at 95 °C for 3 min; 35 cycles of denaturation (1 min at 95 °C), hybridization (1 min at 55 °C) and extension (1:30 min at 72 °C); a final extension cycle of 10 min at 72 °C and 5 min at 4 °C. *TEF 1- α* amplicons were digested for 45 min at 37 °C with restriction enzyme *Bsa*HI. RFLP patterns were visualized in a 1.5% agarose gel containing GreenSafe Premium (NZYTech, Lisboa, Portugal). Fragment sizes were estimated by comparison with a DNA standard marker GeneRuler 1 Kb DNA ladder (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

For the other *Fusarium* species, the *TEF 1- α* gene was amplified in the same way as previously described, and PCR products were purified and sequenced by MacroGen Inc., Republic of Korea. Consensus sequences were obtained using the SeqMan software (Lasergene, Madison, WI, USA) and compared to GenBank database sequences using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) and to the *Fusarium* MLST website (<https://fusarium.mycobank.org>) of CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. The generated sequences were deposited in the GenBank database (Supplementary Table S1).

The sequences of FFSC were aligned with reference strain sequences from FFSC using the MUSCLE algorithm [48] with Mega version 11 [49]. A phylogenetic tree was inferred by using the maximum likelihood method, using Kimura's 2-parameter model (G + I) and the Tree-Bisection-Regrafting (TBR) algorithm [50]. *Fusarium oxysporum* strain CBS 132475 and *Fusarium inflexum* NRRL 20433 were used as an outgroup. The analyses were conducted with 1000 bootstrap replicates.

5.4. Trichothecene Genotype Determination

Three different PCR assays were used to determine the trichothecene genotypes of 93 isolates of *F. graminearum s.s.* First, two multiplex assays targeted a portion of trichothecene biosynthesis genes *Tri3* and *Tri12* to determine NIV, 15-ADON and 3-ADON genotypes, while the third assay targeted portions of the *Tri13* gene to determine DON genotypes [51,52]. PCR for *Tri3* and *Tri12* consisted of an initial denaturation of 2 min at 94 °C, followed by 25 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 52 °C and 1 min at 72 °C. PCR amplification of *Tri13* consisted of an initial denaturation of 2 min at 94 °C, followed by 35 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 65 °C and 30 s at 72 °C. The specific bands for each amplification were resolved on 1.5% agarose gels containing GreenSafe Premium (NZYTech) and scored by size in comparison to a 100 bp DNA size ladder (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

5.5. *Fusarium* Mycotoxin Production

The ability of 93 isolates of *F. graminearum s.s.* and 55 isolates of *F. proliferatum* to produce mycotoxin was analyzed, as they were the most frequent species. For mycotoxin production assays, 25 g of rice grains was used for DON, NIV and ZEN or 20 g of rice

was used for FB1 and FB2; rice grains were placed in bags with 10 mL of distilled water, and then autoclaved twice at 121 °C for 30 min. Autoclaved rice bags were inoculated with 3 mycelium plugs taken from pure cultures of each selected isolate and incubated for 28 days at 25 °C in the dark. After this time, the contents of the bags were dried at 50 °C, finely ground with a laboratory blender and stored at −20 °C until toxin analysis. DON and NIV were detected using a method described by Reynoso et al., and ZEN and FBs were detected based on AOAC 985.18 and AOAC: 995.15 methods, respectively [53,54]. All toxins were analyzed using a high-performance liquid chromatography (HPLC) instrument connected to a reversed-phase C18 column (150 mm × 4.6 mm i.d., 5 µm particle size; Nucleodur, Macherey-Nagel, Düren, Germany) connected to a Security Guard pre-column (8 mm × 4 mm i.d., 5 µm particle size; Nucleodur, Macherey-Nagel, Düren, Germany). The HPLC system consisted of a Shimadzu LC-10ADvp pump. For DON and NIV, the HPLC system was coupled with a Shimadzu SPD photodiode array detector, while for ZEN and FBs, an RF-10Ax1 fluorescence detector was used. Toxin production was determined by comparison with external standards supplied by Trilogy Analytical Laboratory Inc., Washington, MO, USA.

5.6. Determination of Mycotoxins in Sorghum

Fifty-five representative samples of sorghum grain from the 2016 harvest and 57 samples from the 2017 harvest were selected for mycotoxin determination according to AOAC methods [54]. All toxins were determined using an HPLC instrument connected to a reversed-phase Gemini C18 (4.60 mm × 150 mm, 5 µm) analytical column (Phenomenex, Torrance, CA, USA). The HPLC system consisted of a Waters 1525 pump, Waters 717 Injector and Waters TCM oven. For FBs and ZEN, the HPLC system was coupled with a Waters 2475 Fluorescence detector, while for DON and NIV, a Waters 2996 photodiode array detector was used. For FB analysis, the excitation and emission wavelengths were set at 335 and 440 nm, respectively. The mobile phase used was methanol–NaH₂PO₄ 0.1 M (77:23 v/v) pH = 3.3, at a flow rate of 1.0 mL/min and at 25 °C. For ZEN analysis, the excitation and emission wavelengths were set at 270 and 465 nm, respectively. The mobile phase was methanol–orthophosphoric acid 0.01 M (58:42 v/v), the flow rate was 1.0 mL/min at 25 °C. For DON and NIV analysis, the mobile phase was water–methanol (86:14 v/v), at a flow of 1.0 mL/min and at 30 °C. Standards of DON, NIV, FB1, FB2 and ZEN from Trilogy (Washington, MO, USA) were used. The accuracy of the method was evaluated through studies of accuracy and precision by using sorghum grains fortified with each toxin (DON, NIV, ZEN, FB1 or FB2 as appropriate). For the accuracy of the method, replicates of certified samples were performed, and the relative standard deviation was calculated between them. The percentage of recovery of the method was 93% for DON, 87% for NIV, 76% for FB1, 77% for FB2 and 77% for ZEN.

5.7. Fungicide Sensitivity Assay

The sensitivity of *F. proliferatum* and *F. graminearum* s.s. isolates were evaluated against two different chemical classes of fungicides, triazoles and benzimidazoles. Fungicides belonging to triazoles were metconazole, tebuconazole and epoxiconazole, while carben-dazim belongs to the benzimidazole class. The assay was performed on a total of 20 isolates per species, 10 isolates from each crop season (2016 and 2017). Fungicides were diluted in dimethylsulfoxide (DMSO) and incorporated into PDA to achieve concentrations of 0.05, 0.25, 0.50, 0.75, 1.5, 3, 6 and 10 mg/L. Then, each PDA plate was inoculated with a mycelial plug in the center. *Fusarium proliferatum* isolate plates were incubated for 7 days at 25 °C in darkness, and *F. graminearum* s.s. strains were incubated for 5 days under the same conditions. Three replicates of each fungicide concentration per isolate were performed.

Evaluation was performed based on the radial growth on PDA containing different concentrations of each fungicide, compared to control plates (PDA + DMSO) [55,56]. The effective concentration of fungicides leading to a 50% inhibition (EC₅₀) of mycelial growth of each strain was determined. The EC₅₀ was calculated based on Probit analysis [57].

Analysis of variance (ANOVA) of the EC₅₀ values was conducted to determine differences in sensitivity for each fungicide. Means were compared using Fisher's least significant difference (LSD) ($\alpha = 0.05$). Statistical analysis was performed using SigmaStat Version 3.5.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/toxins15080484/s1>, Figure S1: Maximum likelihood tree inferred from the transcription elongation factor gene (*TEF 1- α*) sequences of species belonging to the *Fusarium fujikuroi* species complex (FFSC). Table S1: GenBank accession numbers of the FFSC used in phylogenetic analysis.

Author Contributions: Conceptualization, A.B.C., S.S. and D.P.; Methodology, A.B.C., J.C. and D.P.; Formal Analysis, A.B.C. and D.P.; Investigation, A.B.C., A.d.P., M.O., S.T., M.S., I.d.A., I.M., A.S., S.S. and D.P.; Resources, S.S. and D.P.; Data Curation, A.B.C. and D.P.; Writing – Original Draft Preparation, A.B.C.; Writing – Review & Editing, M.S., I.d.A., A.S., S.S. and D.P.; Visualization, S.S. and D.P.; Supervision, S.S. and D.P.; Project Administration, S.S. and D.P.; Funding Acquisition, S.S. and D.P. Conceptualization, A.B.C., S.S. and D.P.; Methodology, A.B.C., J.C. and D.P.; Formal Analysis, A.B.C. and D.P.; Investigation, A.B.C., A.d.P., M.O., S.T., M.S., I.d.A., I.M., A.S., S.S. and D.P.; Resources, S.S. and D.P.; Data Curation, A.B.C. and D.P.; Writing – Original Draft Preparation, A.B.C.; Writing – Review & Editing, M.S., I.d.A., A.S., S.S. and D.P.; Visualization, S.S. and D.P.; Supervision, S.S. and D.P.; Project Administration, S.S. and D.P.; Funding Acquisition, S.S. and D.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was financed by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) (grant number: FSA-I-2017-1-139531).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data will be made available on request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interests.

References

1. FAOSTAT. FAOSTAT Statistical Database. 2015. Available online: <http://faostat3.fao.org/home/E> (accessed on 6 May 2022).
2. United States Department of Agriculture (USDA). World Agricultural Production. 2022. Available online: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf> (accessed on 6 May 2022).
3. Astoreca, A.; Emateguy, G.; Alconada, T. Fungal contamination and mycotoxins associated with sorghum crop: Its relevance today. *Eur. J. Plant Pathol.* **2019**, *155*, 381–392. [[CrossRef](#)]
4. United States Department of Agriculture (USDA). Office of the Chief Economist. In *Agricultural Projections to 2024*; World Agricultural Outlook Board: Washington, DC, USA, 2015.
5. DIEA. Anuario estadístico agropecuario, Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. *Montevideo. DIEA*. 2013. Available online: https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Documentos%20compartmentados/Anuario2013/Diea_Anuario_2013.pdf (accessed on 10 August 2022).
6. Mehtol, M. Maiz y sorgo: Situación y perspectivas, 2021. In *Anuario de OPYPA de 2021*; Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca: Montevideo, Uruguay, 2021; p. 193.
7. Ackerman, A.; Wennndt, A.; Boyles, R. The sorghum grain mold disease complex: Pathogens, host responses, and the bioactive metabolites at play. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, 660171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Alves dos Reis, T.; Zorzete, P.; Rodrigues Pozzi, C.; Nascimento da Silva, V.; Ortega, E.; Correa, B. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian sorghum from sowing to harvest. *J. Sci. Food Agric.* **2010**, *90*, 1445–1451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Divakara, S.; Santosh, P.; Aiyaz, M.; Ramana, M.; Hariprasad, P.; Nayaka, S.; Niranjana, S. Molecular identification and characterization of *Fusarium* spp. associated with sorghum seeds. *J. Sci. Food Agric.* **2014**, *94*, 1132–1139. [[CrossRef](#)]
10. Lahouar, A.; Crespo-Sempere, A.; Marín, S.; Saïd, S.; Sanchis, V. Toxicogenic molds in Tunisian and Egyptian sorghum for human consumption. *J. Stored Prod. Res.* **2015**, *63*, 57–62. [[CrossRef](#)]
11. Mohamed Nor, N.M.I.; Salleh, B.; Leslie, J.F. *Fusarium* Species from Sorghum in Thailand. *Plant Pathol. J.* **2019**, *35*, 301–312. [[CrossRef](#)]
12. Pena, G.A.; Cavaglieri, L.R.; Chulze, S.N. *Fusarium* species and moniliformin occurrence in sorghum grains used as an ingredient for animal feed in Argentina. *J. Sci. Food Agr.* **2019**, *99*, 47–54. [[CrossRef](#)]
13. Leslie, J.F.; Zeller, K.A.; Lamprecht, S.C.; Rheeder, J.P.; Marasas, W.F. Toxicity, pathogenicity, and genetic differentiation of five species of *Fusarium* from sorghum and millet. *Phytopathology* **2005**, *95*, 275–283. [[CrossRef](#)]

14. Marasas, W.F.O.; Rheeder, J.P.; Lamprecht, S.C.; Zeller, K.A.; Leslie, J.F. *Fusarium andiyazi* sp. nov., a new species from sorghum. *Mycologia* **2001**, *93*, 1203–1210. [CrossRef]
15. McCormick, S.P.; Stanley, A.M.; Stover, N.A.; Alexander, N.J. Trichothecenes: From simple to complex mycotoxins. *Toxins* **2011**, *3*, 802–814. [CrossRef]
16. Zinedine, A.; Soriano, J.M.; Molto, J.C.; Manes, J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food Chem. Toxicol.* **2007**, *45*, 1–18. [CrossRef]
17. Garmendia, G.; Pattarino, L.; Negrin, C.; Martinez-Silveira, A.; Pereyra, S.; Ward, T.; Vero, S. Species composition, toxigenic potential and aggressiveness of *Fusarium* isolates causing Head blight of barley in Uruguay. *Food Microbiol.* **2018**, *76*, 426–433. [CrossRef]
18. Pan, D.; Mionetto, A.; Calero, N.; Reynoso, M.M.; Torres, A.; Bettucci, L. Population genetic analysis and trichothecene profiling of *Fusarium graminearum* from wheat in Uruguay. *Genet. Mol. Res.* **2016**, *15*, 1–11. [CrossRef]
19. Umpiérrez-Failache, M.; Garmendia, G.; Pereyra, S.; Rodríguez-Haralambides, A.; Ward, T.J.; Vero, S. 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. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *166*, 135–140. [CrossRef]
20. del Palacio, A.; Mionetto, A.; Bettucci, L.; Pan, D. Evolution of fungal populations and mycotoxins in sorghum silage. *Food Addit. Contam. A* **2016**, *33*, 1864–1872. [CrossRef]
21. Kelly, L.; Tan, Y.; Ryley, M.; Aitken, E. *Fusarium* species associated with stalk rot and head blight of grain sorghum in Queensland and New South Wales. *Plant Pathol.* **2017**, *66*, 1413–1423. [CrossRef]
22. Sharma, R.; Thakur, R.P.; Senthilvel, S.; Nayak, S.; Reddy, S.V.; Rao, V.P.; Varshney, R.K. Identification and characterization of toxigenic *Fusaria* associated with sorghum grain mold complex in India. *Mycopathologia* **2011**, *171*, 223–230. [CrossRef]
23. Balota, M. Sorghum diseases, head mold. Virginia Polytechnic Institute and State University, Extension Program, Virginia State, Petersburg, VA, USA. 2012.
24. Funnell-Harris, L.D.; Pedersen, J.F. Presence of *Fusarium* spp. in air and soil associated with sorghum fields. *Plant Dis.* **2011**, *95*, 648–656. [CrossRef]
25. Leslie, J.F.; Marasas, W.F.O.; Diourté, M. Naturally occurring mycotoxins in sorghum and millet from Mali (abstract). In Proceedings of the INTSORMIL Principal Investigators Conference, Addis Ababa, Ethiopia, 18–20 November 2002.
26. Petrovic, T.; Walsh, J.L.; Burgess, L.W.; Summerell, B.A. *Fusarium* species associated with stalk rot of grain sorghum in the northern grain belt of eastern Australia. *Aust. Plant Pathol.* **2009**, *38*, 373–379. [CrossRef]
27. Pan, D.; Calero, N.; Mionetto, A.; Bettucci, L. Trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* from wheat in Uruguay. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *162*, 120–123. [CrossRef]
28. Del Ponte, E.M.; Moreira, G.M.; Ward, T.J.; O'Donnell, K.; Nicolli, C.P.; Machado, F.J.; Duffeck, M.R.; Alves, K.S.; Tessmann, D.J.; Waalwijk, C.; et al. *Fusarium graminearum* Species Complex: A Bibliographic Analysis and Web-Accessible Database for Global Mapping of Species and Trichothecene Toxin Chemotypes. *Phytopathology* **2022**, *112*, 741–751. [CrossRef] [PubMed]
29. FDA. Mycotoxins. 2010. Available online: <https://www.fda.gov/food/natural-toxins-food/mycotoxins> (accessed on 4 May 2022).
30. Chilaka, C.; De Boevre, M.; Atanda, O.; De Saeger, S. The status of *Fusarium* mycotoxins in Sub-Saharan Africa: A review of emerging trends and post-harvest mitigation strategies towards food control. *Toxins* **2017**, *9*, 19. [CrossRef] [PubMed]
31. Hanvi, D.; Lawson-Evi, P.; De Boever, M.; Goto, C.E.; De Saeger, S.; Eklu-Gadegbeku, K. Natural occurrence of mycotoxins in maize and sorghum in Togo. *Mycotoxin Res.* **2019**, *35*, 321–327. [CrossRef] [PubMed]
32. Resolución S/N/001. 2001. Límites Máximos de DON en Alimentos Para Animales. 2001. Available online: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/institucional/normativa/resolucion-sn001-limites-maximos-don-alimentos-para-animales> (accessed on 6 May 2022).
33. Aoyama, K.; Ishikuro, E.; Nishiwaki, M.; Ichinoe, M. Zearalenone contamination and the causative fungi in sorghum. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* **2009**, *50*, 47–51. [CrossRef]
34. Ayalew, A.; Fehrmann, H.; Lepschy, J.; Beck, R.; Abate, D. Natural occurrence of mycotoxins in staple cereals from Ethiopia. *Mycopathologia* **2006**, *162*, 57–63. [CrossRef]
35. Chala, A.; Taye, W.; Ayalew, A.; Krska, R.; Sulyok, M.; Logrieco, A. Multi mycotoxin analysis of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) and finger millet (*Eleusine coracana* L. Gaertn) from Ethiopia. *Food Control* **2014**, *45*, 29–35. [CrossRef]
36. Cendoya, M.; Nichea, J.; Monge, M.; Zchetti, V.; Stella, M.; Ramirez, M. Effect of fungicides commonly used for *Fusarium* head blight management on growth and fumonisin production by *Fusarium proliferatum*. *Rev. Argent. Microbiol.* **2021**, *53*, 64–74. [CrossRef]
37. Marín, P.; De Ory, A.; Cruz, A.; Magan, N.; González-Jaén, M.T. Potential effects of environmental conditions on the efficiency of the antifungal tebuconazole controlling *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* growth rate and fumonisin biosynthesis. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *165*, 251–258. [CrossRef]
38. Xu, S.; Wang, J.; Wang, H.; Bao, Y.; Li, Y.; Govindaraju, M.; Yao, W.; Chen, B.; Zhang, M. Molecular characterization of carbendazim resistance of *Fusarium* species complex that causes sugarcane pokkah boeng disease. *BMC Genomics* **2019**, *20*, 115. [CrossRef]
39. Liu, S.; Fu, L.; Chen, J.; Chen, J.; Wang, S.; Liu, J.; Jiang, J.; Che, Z.; Tian, Y.; Chen, G. Baseline sensitivity and control efficacy of epoxiconazole against *Fusarium graminearum* in Henan Province, China. *Eur J Plant Pathol.* **2020**, *157*, 825–833. [CrossRef]
40. Ivić, D.; Sever, Z.; Kumanovska, B. In vitro sensitivity of *Fusarium graminearum*, *F. avenaceum* and *F. verticillioides* to carbendazim, tebuconazole, flutriafol, metconazole and prochloraz. *Pestic i Phytomed (Belgrade)* **2011**, *26*, 35–42. [CrossRef]

41. Machado, F.J.; Santana, F.M.; Lau, D.; Del Ponte, E.M. Quantitative Review of the effects of triazole and benzimidazole fungicides on *Fusarium* head blight and wheat yield in Brazil. *Plant Dis.* **2017**, *101*, 1633–1641. [[CrossRef](#)]
42. Spolti, P.; Del Ponte, E.M.; Dong, Y.; Cummings, J.A.; Bergstrom, G.C. Triazole sensitivity in a contemporary population of *Fusarium graminearum* from New York wheat and competitiveness of a tebuconazole-resistant isolate. *Plant Dis.* **2014**, *98*, 607–613. [[CrossRef](#)]
43. Yin, Y.; Liu, X.; Li, B.; Ma, Z. Characterization of sterol demethylation inhibitor-resistant isolates of *Fusarium asiaticum* and *F. graminearum* collected from wheat in China. *Phytopathology* **2009**, *99*, 487–497. [[CrossRef](#)]
44. Anderson, N.; Freije, A.; Bergstrom, G.; Bradley, C.; Cowger, C.; Faske, T.; Hollier, C.; Kleczewski, N.; Padgett, G.; Paul, P.; et al. Sensitivity of *Fusarium graminearum* to Metconazole and Tebuconazole Fungicides Before and After Widespread Use in Wheat in the United States. *Plant Health Prog.* **2020**, *21*, 85–90. [[CrossRef](#)]
45. Leslie, J.F.; Summerell, B.A. *The Fusarium Laboratory Manual*; Blackwell Professional: Ames, IA, USA, 2006.
46. Garmendia, G.; Umpierrez-Failache, M.; Ward, T.; Vero, S. Development of a PCR-RFLP method based on the transcription elongation factor 1- α gene to differentiate *Fusarium graminearum* from other species within the *Fusarium graminearum* species complex. *Food Microbiol.* **2018**, *70*, 28–32. [[CrossRef](#)]
47. O'Donnell, K.; Cigelnik, E.; Nirenberg, H.I. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* **1998**, *90*, 465–493. [[CrossRef](#)]
48. Edgar, R.C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 1792–1797. [[CrossRef](#)]
49. Tamura, K.; Stecher, G.; Kumar, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* **2021**, *38*, 3022–3027. [[CrossRef](#)]
50. Nei, M.; Kumar, S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*; Oxford University Press: New York, NY, USA, 2000.
51. Ward, T.J.; Bielawski, J.P.; Kistler, H.C.; Sullivan, E.; O'Donnell, K. Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 9278–9283. [[CrossRef](#)]
52. Chandler, E.; Simpson, D.; Thomsett, M.; Nicholson, P. Development of PCR Assays to Tri7 and Tri13 Trichothecene Biosynthetic Gene. *Revista Argentina de Microbiología*, and Characterization of Chemotypes of *Fusarium*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2003**, *62*, 355–367. [[CrossRef](#)]
53. Reynoso, M.M.; Ramirez, M.L.; Torres, A.M.; Chulze, S.N. Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* strains isolated from wheat in Argentina. *Int J Food Microbiol.* **2011**, *145*, 444–448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. AOAC. *International Official Methods of Analysis of AOAC International*, 20th ed.; AOAC: Gaithersburg, MD, USA, 2016.
55. Becher, R.; Hettwer, U.; Karlovsky, P.; Deising, H.B.; Wirsal, S. Adaptation of *Fusarium graminearum* to tebuconazole yielded descendants diverging for levels of fitness, fungicide resistance, virulence, and mycotoxin production. *Phytopathology* **2010**, *100*, 444–453. [[CrossRef](#)]
56. Tateishi, H.; Miyake, T.; Mori, M.; Kimura, R.; Sakuma, Y.; Saishoji, T. Sensitivity of Japanese *Fusarium graminearum* species complex isolates to metconazole. *J. Pestic. Sci.* **2010**, *35*, 419–430. [[CrossRef](#)]
57. Finney, D.J. Probit Analysis (2nd Ed). *J. Inst. Actuar.* **1952**, *78*, 388–390.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

9. BIBLIOGRAFÍA

Abbas H. K., Accinelli C., Shier W. T. 2017. Biological control of aflatoxin contamination in U.S. crops and the use of bioplastic formulations of *Aspergillus flavus* biocontrol strains to optimize application strategies. J. Agric. Food Chem. 65, 7081–7087.

Abd-Elsalam K. A., Rai M. 2020. An introduction to nanomycotoxicology. Nanomycotoxicology, 1–7. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817998-7.00001-x>

Alves dos Reis T., Zorzete P., Rodrigues Pozzi C., Nascimento da Silva V., Ortega E., Correa B. 2010. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian sorghum from sowing to harvest. J Sci Food Agric 90, 1445–1451. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3962>

Amarasinghe C. C., Fernando W. G. 2016. Comparative analysis of deoxynivalenol biosynthesis related gene expression among different chemotypes of *Fusarium graminearum* in spring wheat. Frontiers in Microbiology, 7, 1229. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01229>

Astoreca A. L., Emateguy L. G. y Alconada, T. M. 2019. Fungal contamination and mycotoxins associated with sorghum crop: its relevance today. Eur J Plant Pathol 155, 381–392. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01797-w>

AOAC. 2016. International Official Methods of Analysis of AOAC International, 20th ed.; AOAC: Gaithersburg, MD, USA.

Aoyama K., Ishikuro E., Nishiwaki M., Ichinoe M. 2009. Zearalenone contamination and the causative fungi in sorghum. Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 50, 47–51. <https://doi.org/10.3358/shokueishi.50.47>

Awuchi C. G., Ondari E. N., Ogbonna C. U., Upadhyay A. K., Baran K., Okpala C. O. R., Korzeniowska M., Guiné R.P.F. 2021. Mycotoxins affecting animals, foods, humans, and plants: types, occurrence, toxicities, action mechanisms, prevention, and detoxification strategies—A revisit. Foods, 10: 1279. <https://doi.org/10.3390/foods10061279>

Ayalew A., Fehrmann H., Lepschy J., Beck R., Abate, D. 2006. Natural occurrence of mycotoxins in staple cereals from Ethiopia. *Mycopathologia*, 162, 57–63. <https://doi.org/10.1007/s11046-006-0027-8>

Badigannavar A., Teme N., Costa de Oliveira A., Li G., Vaksman M., Ebeling Viana V., Ganapathi T. R., Sarsu F. 2018. Physiological, genetic and molecular basis of drought resilience in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Ind J Plant Physiol*. 23, 670–688. <https://doi.org/10.1007/s40502-018-0416-2>

Balota M. 2012. Sorghum diseases, head mold. Virginia Polytechnic Institute and State University, Extension Program, Virginia State, Petersburg, VA, USA.

Becher R., Hettwer U., Karlovsky P., Deising H. B., Wirsal S. G. 2010. Adaptation of *Fusarium graminearum* to tebuconazole yielded descendants diverging for levels of fitness, fungicide resistance, virulence, and mycotoxin production. *Phytopathology*, 100, 444-53.

Belizán, M. M. E., Gomez A. de los A., Terán Baptista Z. P., Jimenez C. M., Sánchez Matías M. del H., Catalán C. A. N., Sampietro D. A. 2019. Influence of water activity and temperature on growth and production of trichothecenes by *Fusarium graminearum* sensu stricto and related species in maize grains. *International Journal of Food Microbiology*, 305, 108242. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108242>.

Bennett J. W. 1987. Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and mycopathologia. *Mycopathologia*, 100(1), 3–5. <https://doi.org/10.1007/bf00769561>

Brown D. W., Villani A., Susca A., Moretti A., Hao G., Kim H. S., Proctor R. H., McCormick S. P. 2020. Gain and loss of a transcription factor that regulates late trichothecene biosynthetic pathway genes in *Fusarium*. *Fungal Genet Biol.*, 136,103317. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.103317>.

Cendoya E., Monge M. P., Chiacchiera S. M., Farnochi M. C., Ramirez M. L. 2018. Influence of water activity and temperature on growth and fumonisin production by *Fusarium proliferatum* strains on irradiated wheat grains. *International Journal of Food Microbiology*, 266,158-166. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.001>

Chala A. 2019. Genetic diversity among *Fusarium* species associated with sorghum stalk rot in Southern Ethiopia. *African Journal of Biotechnology*, 18 (14), 289-295. <https://doi.org/10.5897/AJB2018.16725>

Chala A., Taye W., Ayalew A., Krska R., Sulyok M., Logrieco A. 2014. Multi mycotoxin analysis of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) and finger millet (*Eleusine coracana* L. Garten) from Ethiopia. *Food Control*, 45, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.04.018>

Chandler E. A., Simpson D. R., Thomsett M. A., Nicholson P. 2003. Development of PCR Assays to Tri7 and Tri13 Trichothecene Biosynthetic Genes, and Characterization of Chemotypes of *Fusarium*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62 (6), 355- 367

Chen Y., Kistler H. C., Ma Z. 2019. *Fusarium graminearum* trichothecene mycotoxins: biosynthesis, regulation, and management. *Annu Rev Phytopathol.*, 25 (57),15-39. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100318>.

Chilaka C., De Boevre M., Atanda O., De Saeger S. 2017. The status of *Fusarium* mycotoxins in Sub-Saharan Africa: A review of emerging trends and post-harvest mitigation strategies towards food control. *Toxins*, 9, 19. <https://doi.org/10.3390/toxins9010019>

Cimbalo A., Alonso-Garrido M., Font G., Manyes L. 2020. Toxicity of mycotoxins in vivo on vertebrate organisms: A review. *Food and Chemical Toxicology*, 111161. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111161>

Coetzee L. A. 2015. Modelling the colonisation of sorghum grain by the *Fusarium graminearum* species complex and concomitant mycotoxin production. *Magister Scientiae Agriculturae*, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, Department of Plant Sciences, Bloemfontein, South Africa.

Daou R., Joubrane K., Maroun R. G., Khabbaz L. R., Ismail A., El Khoury A. 2021. Mycotoxins: Factors influencing production and control strategies. *AIMS Agriculture and Food*, 6 (1): 416-447. <https://doi.org/10.3934/agrfood.2021025>

de Morais Cardoso L., Silva Pinheiro S., Duarte Martino H. S y Pinheiro-Sant'Ana H. M. 2017. Sorghum (*Sorghum bicolor* L.): Nutrients, bioactive compounds, and potential impact on human

health, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57 (2), 372-390.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2014.887057>

del Palacio A., Mionetto A., Bettucci L., Pan D. 2016. Evolution of fungal populations and mycotoxins in sorghum silage. *Food Addit. Contam. A*, 33, 1864–1872.
<https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1244732>

del Palacio A., Corallo B., Simoens M., Cea J., de Aurrecoechea I., Martinez I., Sanchez A., Stewart S., Pan D. 2023. Major *Fusarium* species and mycotoxins associated with freshly harvested maize grain in Uruguay. *Mycotoxin Research*, 39, 379–391.
<https://doi.org/10.1007/s12550-023-00498-y>

Del Ponte E. M., Moreira G. M., Ward T. J., O'Donnell K., Nicolli C. P., Machado F. J., Duffeck M. R., Alves K. S., Tessmann D. J., Waalwijk C., van der Lee T., Zhang H., Chulze S. N., Stenglein S. A., Pan D., Vero S., Vaillancourt L. J., Schmale D. G. 3rd, Esker P. D., Moretti A., Logrieco A. F., Kistler H. C., Bergstrom G. C., Viljoen A., Rose L. J., van Coller G. J., Lee T. 2022. *Fusarium graminearum* Species Complex: A Bibliographic Analysis and Web-Accessible Database for Global Mapping of Species and Trichothecene Toxin Chemotypes. *Phytopathology.*, 112 (4): 741-751. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-21-0277-RVW>.

Desjardins A. E., Munkvold G. P., Plattner R. D., Proctor R. H. 2002. Fum1-a gene required for fumonisin biosynthesis but not for maize ear rot and ear infection by *Gibberella moniliformis* in field tests. *Mol. Plant Microbe Interact* 15, 1157–1164.
<https://doi.org/10.1094/mpmi.2002.15.11.1157>

Desjardins A. E. 2003. *Gibberella* from a (venaceae) to z (eae). *Annual Review of Phytopathology*, 41(1), 177–198. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.011703.115501>

Desjardins A. 2006. *Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics, and biology. APS Press, St. Paul, M. N.

Desjardins A. E., Proctor R. H. 2011. Genetic diversity and trichothecene chemotypes of the *Fusarium graminearum* clade isolated from maize in Nepal and identification of a putative new lineage. *Fungal Biol.*, 115(1): 38-48. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.10.002>.

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. *J Sci Food Agric.*, 94(6), 1132-9. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6380>.

Edgar R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.*, 32(5), 1792-7. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>

Farhadi A., Fakhri Y., Kachuei R., Vasseghian Y., Huseyn E., Khaneghah A. M. 2021. Prevalence and concentration of fumonisins in cereal-based foods: a global systematic review and meta-analysis study. *Environmental Science and Pollution Research* 28, 20998–21008. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12671-w>.

FDA. Mycotoxins. 2010. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/natural-toxins-food/mycotoxins> (acceso el 04/05/2022)

Ferrara M., Haidukowski M., Logrieco A. F., Leslie J. F., Mulè G. 2019. A CRISPR-Cas9 System for Genome Editing of *Fusarium proliferatum*. *Sci Rep* 9, 19836. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56270-9>

Finney D.J. 1952. Probit Analysis (2nd Ed). *Journal of the Institute of Actuaries*, 78:388-390.

Fumero M. V., Sulyok M., Chulze S. 2016. Ecophysiology of *Fusarium temperatum* isolated from maize in Argentina. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 33(1), 147-56. <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1107917>.

Funnell-Harris L. D., Pedersen J. F. 2011. Presence of *Fusarium* spp. in air and soil associated with sorghum fields. *Plant Dis.*, 95, 648–656. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-10-0671>

Gab-Allah, M.A., Choi, K., Kim, B. 2023. Type B Trichothecenes in cereal grains and their products: recent advances on occurrence, toxicology, analysis and post-harvest decontamination strategies. *Toxins* 15, 85. <https://doi.org/10.3390/toxins15020085>

Gardiner S. A., Boddu J., Berthiller F., Hametner C., Stupar R. M., Adam G., Muehlbauer G. J. 2010. Transcriptome analysis of the barley-deoxynivalenol interaction: Evidence for a role of glutathione in deoxynivalenol detoxification. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 23, 962–976. <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-7-0962>

Garmendia G., Umpierrez-Failache M., Ward T., Vero S. 2018a. Development of a PCR-RFLP method based on the transcription elongation factor 1- α gene to differentiate *Fusarium graminearum* from other species within the *Fusarium graminearum* species complex. *Food Microbiol.*, 70, 286–32.

Garmendia G., Pattarino L., Negrin C., Martinez-Silveira A., Pereyra S., Ward T., Vero S. 2018b. Species composition, toxigenic potential and aggressiveness of *Fusarium* isolates causing Head blight of barley in Uruguay. *Food Microbiol.*, 76, 426–433. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.07.005>

Han, X., Huangfu, B., Xu, T., Xu, W., Asakiya, C., Huang, K., He, X. 2022. Research progress of safety of zearalenone: a review. *Toxins*, 14, 386. <https://doi.org/10.3390/toxins14060386>

Hanvi D., Lawson-Evi P., De Boever M., Goto C. E., De Saeger S., Ekl-Gadegbeku K. 2019. Natural occurrence of mycotoxins in maize and sorghum in Togo. *Mycotoxin Res.*, 35, 321–327. <https://doi.org/10.1007/s12550-019-00351-1>

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/protocolo-requisitos-fitosanitarios-para-exportacion-sorgo-uruguay-china>

<https://fusarium.mycobank.org/page/Pairwise%20alignment>

<https://www.fao.org/land-water/databases-and-software/crop-information/sorghum/en/>

<https://www.fao.org/3/t0818e/T0818E01.htm#Sorghum>

Hooker D.C., Schaafsma A. W., Tamburic-Ilincic L. 2007. Using weather variables pre- and post-heading to predict deoxynivalenol content in winter wheat. *Plant Disease* 86: 611-619

IARC. 1993. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 56, 599. Tomado de: <https://monographs.iarc.fr/iarc-monographs-on-the-evaluation-of-carcinogenic-risks-to-humans-65/>

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2002. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 82, 338. <https://doi.org/10.1002/food.19940380335>

INUMET, Informe de verano. 2022/23. Boletín Trimestral N°1. Tomado de: <https://www.inumet.gub.uy/sites/default/files/2023-03/informe%20estacional%20VERANO%20V2.pdf>

Jiménez M., Máñez M., Hernández E. 1996. Influence of water activity and temperature on the production of zearalenone in corn by three *Fusarium* species. *Int J Food Microbiol.*, 29 (2-3), 417-21. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00073-9](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00073-9)

Karlsson I., Persson P., Friberg H. 2021. *Fusarium* Head Blight from a microbiome perspective. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628373>

Kaufman R. C., Herald T. J., Bean S. R., Wilson J. D., Tuinstra, M. R. 2012. Variability in tannin content, chemistry and activity in a diverse group of tannin containing sorghum cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(5), 1233–1241. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5890>

Keller M. D., Bergstrom G. C., Shields E. J. 2014. The aerobiology of *Fusarium graminearum*. *Aerobiologia* 30, 123–136. <https://doi.org/10.1007/s10453-013-9321-3>

Kelly L., Tan Y., Ryley M., Aitken E. 2017. *Fusarium* species associated with stalk rot and head blight of grain sorghum in Queensland and New South Wales. *Plant Pathol.*, 66, 1413–1423. <https://doi.org/10.1111/ppa.12697>.

Khalid W., Ali A., Sajid Arshad M., Afzal F., Akram R., Siddeeg A., Kousar S., Abdul Rahim M., Aziz A., Maqbool Z., Saeed A. 2022. Nutrients and bioactive compounds of *Sorghum bicolor* L. used to prepare functional foods: a review on the efficacy against different chronic disorders, *International Journal of Food Properties*, 25 (1), 1045-1062. <https://doi.org/10.1080/10942912.2022.2071293>

Kim, J. E., Son H., Lee, Y. W. 2018. Biosynthetic mechanism and regulation of zearalenone in *Fusarium graminearum*. *JSM Mycotoxins*, 68, 1-6. <https://doi.org/10.2520/myco.68-1-2>.

Kim Y. T., Lee Y. R., Jin J., Han K. H., Kim H., Kim J. C., Lee T., Yun S. H., Lee Y.W. 2005. Two different polyketide synthase genes are required for synthesis of zearalenone in *Gibberella zeae*. *Mol Microbiol.* 58(4), 1102-13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04884.x>. PMID: 16262793.

Kim, H.-K. y Yun, S.-H. 2011. Evaluation of potential reference genes for quantitative RT-PCR analysis in *Fusarium graminearum* under different culture conditions. *Plant Pathol. J.* 27, 301-309

Kimura, M., Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Ohsato, S., Fujimura, M. 2007. Molecular and genetic studies of *Fusarium* trichothecene biosynthesis: pathways, genes, and evolution. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71 (9), 2105–2123. <https://doi.org/10.1271/bbb.70183>

Lacey J., Magan N. 1991. Fungi in cereal grains: their occurrence and water and temperature relationships. En: Chelowski, J. (ed.) *Cereal grain: mycotoxins, fungi and quality in drying and storage*. Elsevier, Amsterdam, 77-118.

Lahouar A., Crespo-Sempere A., Marín S., Saïd S., Sanchis V. 2015. Toxigenic molds in Tunisian and Egyptian sorghum for human consumption. *J. Stored Prod. Res.*, 63, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2015.07.001>

Lahouar A., Marín S., Crespo-Sempere A., Saïd S., Sanchis V. 2017. Influence of temperature, water activity and incubation time on fungal growth and production of ochratoxin A and zearalenone by toxigenic *Aspergillus tubingensis* and *Fusarium incarnatum* isolates in sorghum seeds. *Int J Food Microbiol.* 242, 53–60.

Laraba I., McCormick S. P., Vaughan M. M., Geiser D. M., O'Donnell K. 2021. Phylogenetic diversity, trichothecene potential, and pathogenicity within *Fusarium sambucinum* species complex. PLoS ONE 16(1), e0245037. [https://doi.org/ 10.1371/journal.pone.0245037](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245037)

Lee T., Lee S-H, Shin J Y, Kim H-K, Yun S-H, Kim H-Y, Lee S, Ryu J-G. 2014. Comparison of trichothecene biosynthetic gene expression between *Fusarium graminearum* and *Fusarium asiaticum*. The Plant Pathology Journal; 30 (1), 33-42. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.11.2013.0107>

Leslie J. F, Summerell B. A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Ames, IA, USA: Blackwell Professional.

Liew M. X. X., Nakajima Y., Maeda K., Kitamura N., Kimura M. 2023. Regulatory mechanism of trichothecene biosynthesis in *Fusarium graminearum*. Front. Microbiol. 14:1148771. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1148771>

Lysøe E., Bone K. R., Klemsdal S. S. 2009. Real-Time quantitative expression studies of the zearalenone biosynthetic gene cluster in *Fusarium graminearum*. Phytopathology, 99(2), 176–184. <https://doi.org/10.1094/phyto-99-2-0176>

Magan N., J. Lacey. 1984. Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. Transactions of the British Mycological Society, 82 (1), 83-93. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(84\)80214-4](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(84)80214-4).

Marín S. 1998. Ecofisiología de cepas de *Fusarium* productoras de fumonisinas. Tesis doctoral. Universitat de Lleida, España.

Marín S., Magan N., Ramos A. J., Sanchis V. 2004. *Fumonisin*-producing strains of *Fusarium*: A review of their ecophysiology. Journal of Food Protection, 67(8), 1792-1805. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-67.8.1792>

Marín S., Magan N., Serra J., Ramos A. J., Canela R., Sanchis V. 1999. Fumonisin B1 production and growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* on maize, wheat, and barley grain. J. Food Sci. 64, 921–924. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1999.tb15941.x>

Methol, M., Pizzanelli M. Maíz y sorgo: situación y perspectivas., 2021. En: Anuario de OPYPA de 2022, pag. 237, 238, 248-250

Mohamed Nor N. M. I., Salleh B., Leslie J. F. 2019. *Fusarium* species from sorghum in Thailand. Plant Pathol. J., 35, 301–312. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.03.2019.0049>

Munkvold G. 2014. Crop management practices to minimize the risk of mycotoxins contamination in temperate-zone maize. Mycotoxin Reduct. Grain Chain., 1, 59–77.

O'Donnell K., Whitaker B. K., Laraba I., Proctor R. H., Brown D. W., Broders K., Kim H-S., McCormick S. P., Busman M., Aoki T., Torres-Cruz T. J., Geiser D.M. 2022. DNA Sequence-Based Identification of *Fusarium*: A Work in Progress. Plant Disease, 106, 1597-1609. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-21-2035-SR>

O'Donnell, K., Cigelnik, E., Nirenberg, H.I., 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia 90, 465–493.

Ojiambo P. S., Battilani P., Cary J. W., Blum B. H., Carbone I. 2018. Cultural and genetic approaches to manage aflatoxin contamination: recent insights provide opportunities for improved control. Phytopathology 108, 1024–1037. <https://doi.org/10.1094/phyto-04-18-0134-rvw>

Pan D., Calero N., Mionetto A., Bettucci L. 2013. Trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* from wheat in Uruguay. International Journal of Food Microbiology, 162(1), 120–123. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.002>

Pan D., Mionetto A., Calero N., Reynoso M. M., Torres A., Bettucci L. 2016. Population genetic analysis and trichothecene profiling of *Fusarium graminearum* from wheat in Uruguay. Genet Mol Res 15: 1–11. <https://doi.org/10.4238/gmr.15017270>.

Pelhate J. 1968. Mycopathology. Mycological applied, 36, 117-128.

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*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9140>

Pereyra S. A., Dill-Macky R. 2008. Colonization of the residues of diverse plant species by *Gibberella zeae* and their contribution to *Fusarium* Head Blight inoculum. *Plant Disease*, 92 (5), 800–807. <https://doi.org/10.1094/pdis-92-5-0800>

Petrovic T., Walsh J. L., Burgess L. W., Summerell B. A. 2009. *Fusarium* species associated with stalk rot of grain sorghum in the northern grain belt of eastern Australia. *Aust. Plant Pathol.*, 38, 373–379. <https://doi.org/10.1071/AP09011>

Proctor R., Desjardins A.E., Plattner, R. Alexander, N., Brown, D. 2002. Genetic analysis of the role of trichothecene and fumonisin mycotoxins in the virulence of *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 108. <https://doi.org/10.1023/A:1020637832371>.

Qu L., Wang L., Ji H., Fang Y., Lei P., Zhang X., Jin L., Sun D., Dong H. 2022. Toxic mechanism and biological detoxification of fumonisins. *Toxins (Basel)* 14(3), 182. <https://doi.org/10.3390/toxins14030182>.

Rai, A., Das, M., Tripathi, A. 2019. Occurrence and toxicity of a *Fusarium* mycotoxin, zearalenone. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–20. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1655388>.

Rana A., Sahgal M. y Johri B. N. 2017. *Fusarium oxysporum*: Genomics, Diversity and Plant–Host Interaction. *Developments in Fungal Biology and Applied Mycology*,10, 159-199.

Ramírez Albuquerque D., Patriarca A., Fernández Pinto V. 2022. Water activity influence on the simultaneous production of DON, 3-ADON and 15-ADON by a strain of *Fusarium graminearum* ss of 15-ADON genotype. *Int J Food Microbiol.*, 373: 109721. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109721>.

Ramirez M. L., Chulze S., Magan N. 2006. Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on

irradiated wheat grain. *Int J Food Microbiol.*, 106 (3): 291-6.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.09.004>.

Rauwane M. E, Ogugua U. V., Kalu C. M., Ledwaba L. K., Woldesemayat A. A., Ntushelo K. 2020. Pathogenicity and virulence factors of *Fusarium graminearum* including factors discovered using next generation sequencing technologies and proteomics. *Microorganisms*, 8 (2), 305.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8020305>.

Reddy B. V. S., Kumar A. A., Reddy P. S. 2010. Recent advances in sorghum improvement research at ICRI- SAT, Kasetsart. *Natural Science* 44, 499- 50

Resolución S/N/001. 2001. Límites Máximos de DON en Alimentos Para Animales. Disponible en: [https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/institucional/normativa/resolucion-sn001-limites-maximos-don alimentos-para-animales](https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/institucional/normativa/resolucion-sn001-limites-maximos-don_alimentos-para-animales) (acceso el 06/05/2022).

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

Ropejko, K., Twaruzek, M. 2021. Zearalenone and its metabolites—General overview, occurrence, and toxicity. *Toxins* 13, 35. <https://doi.org/10.3390/toxins13010035>

Sharma R., Thakur R. P., Senthilvel S., Nayak S., Reddy S. V., Rao V. P., Varshney R. K. 2011. Identification and characterization of toxigenic fusaria associated with sorghum grain mold complex in India. *Mycopathologia*, 171(3), 223-30. <https://doi.org/10.1007/s11046-010-9354-x>.

Srinivas, M. Y., Diwakar B. T., Charith Raj A.-P., Das, R. S., Naidu A., Janardhan G. R. 2013. Toxigenic *Fusarium* Species and fumonisinB1 and B2 associated with freshly harvested sorghum and maize grains produced in Karnataka, India. *Annal Food Sci Technol.* 14. 101-106.

Sweeney M., Dobson A. 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology.* 43, 141-158

Tamura K., Stecher G., Kumar S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38, 3022-3027.

Tapia M. S., Alzamora S. M., Chirife J. 2020. Effects of water activity (aw) on microbial stability as a hurdle in food preservation. *Water Activity in Foods*, 323–355. <https://doi.org/10.1002/9781118765982.ch14>

Tateishi H., Miyake T., Mori M., Kimura R., Sakuma Y., Saishoji T. 2010. Sensitivity of Japanese *Fusarium graminearum* species complex isolates to metconazole. *Journal of Pesticide Science* 35, 419–430.

Taylor J.R.N., Emmambux M.N. 2008. 13 - Products containing other speciality grains: sorghum, the millets and pseudocereals. Editor(s): Bruce R. Hamaker. In *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Technology of Functional Cereal Products*, Woodhead Publishing, 281-335. <https://doi.org/10.1533/9781845693886.2.281>.

Tola M., Kebede B. 2016. Occurrence, importance and control of mycotoxins: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1). <https://doi.org/10.1080/23311932.2016.1191103>

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. *Int. J. Food Microbiol.*, 166, 135–140.

United States Department of Agriculture (USDA). World agricultural production, 2022 <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>

Van Rooyen D. 2019. Relationship between sorghum plant and grain characteristics, colonisation by mycotoxigenic *Fusarium* spp. and mycotoxin levels. Faculty of Natural and Agricultural Sciences, Department of Plant Sciences, University of the Free State, Bloemfontein

Velluti A. 2002. Ecofisiología de especies de *Fusarium* productoras de fumonisinas, zearalenona y deoxinivalenol en maíz. Aceites esenciales como inhibidores fúngicos. Tesis de doctorado. Universidad de Lleida, España.

Vismer H. F., Shephard G. S., van der Westhuizen L., Mngqawa P., Bushula-Njah V., John F. Leslie J. F. 2019. Mycotoxins produced by *Fusarium proliferatum* and *F. pseudonygamai* on maize, sorghum and pearl millet grains in vitro. International Journal of Food Microbiology, 296, 31-36. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.02.016>

Voigt, K. 2002. Management of Fusarium Diseases. In: Kempken, F. (eds) Agricultural Applications. The Mycota, vol 11. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-03059-2_12

Wang J., Lin S., Zhu G., Zhao Z., Wang H., Zhou M., Zhao X., Wu, A. 2022. Identification of candidate genes associated with trichothecene biosynthesis in *Fusarium graminearum* species complex combined with transcriptomic and proteomic analysis. Microorganisms, 10, 1479. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081479>

Wangia-Dixon R. N., Nishimwe K. 2021. Molecular toxicology and carcinogenesis of fumonisins: a review. Journal of Environmental Science and Health, Part C, 39 (1), 44-67.

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

Whitfield M. B., Chinn M. S., Veal M. W. 2012. Processing of materials derived from sweet sorghum for biobased products. Industrial Crops and Products, 37 (1), 362-375. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.12.011>.

Zain M. E. 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. Journal of Saudi Chemical Society, 15 (2), 129-144. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.06.006>.