



Hongos toxicogénicos y micotoxinas en maíz, estudio de su interacción

Msc. Agustina del Palacio Flangini
Tesis Doctoral
2024

Tutor: Dra. Dinorah Pan

Co-tutor: Dra. Silvina Stewart

Universidad de la República

Laboratorio de Micología – Facultad de Ciencias - Facultad de Ingeniería

Apoyo económico: Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII)



Índice.

-	Introducción general	pág. 8
-	Maíz (<i>Zea Mays</i>)	pág. 8
-	Hongos asociados a cultivos de maíz	pág. 10
-	Micotoxinas	pág. 17
-	Bibliografía	pág. 24
-	Capítulo 1: <i>Especies fúngicas toxicogénicas y micotoxinas asociadas a granos de maíz.</i>	pág. 32
-	Introducción	pág. 32
-	Objetivo	pág. 33
-	Materiales y métodos	pág. 33
-	Resultados	pág. 37
-	Discusión	pág. 40
-	Bibliografía	pág. 42
-	Capítulo 2: <i>Caracterización de las especies fúngicas toxicogénicas asociadas al maíz</i>	pág. 46
-	Introducción	pág. 46
-	Objetivo	pág. 48
-	Materiales y métodos	pág. 49
-	Resultados	pág. 54
-	Discusión	pág. 61
-	Bibliografía	pág. 64
-	Capítulo 3: <i>Análisis in vitro del perfil de sensibilidad de las principales especies de Fusarium a antifúngicos de uso convencional</i>	pág. 71
-	Introducción	pág. 71
-	Objetivo	pág. 72
-	Materiales y métodos	pág. 72
-	Resultados	pág. 72
-	Discusión	pág. 78
-	Bibliografía	pág. 80
-	Capítulo 4: <i>Impacto de la co-existencia de especies fúngicas en el crecimiento y producción de micotoxinas en granos de maíz</i>	pág. 83
-	Introducción	pág. 83
-	Objetivo	pág. 89

- Materiales y métodos	pág. 89
- Resultados	pág. 97
- Discusión	pág.107
- Bibliografía	pág.111
- Discusión general	pág.116
- Conclusiones	pág.119
- Perspectivas	pág.119
- Anexo: <i>Major Fusarium species and mycotoxins associated with freshly harvested maize grain in Uruguay.</i>	
A. del Palacio, B. Corallo, M. Simoens, J. Cea, I. de Aurrecoechea, I. Martinez, A. Sanchez, S. Stewart, D. Pan. Mycotoxin Research, 2023. https://doi.org/10.1007/s12550-023-00498-y	

Índice de figuras.

- Figura 1. a - c, cultivos de maíz desde el inicio de la floración en el campo hasta la cosecha. d. Diferentes variedades de mazorcas de maíz	pág. 8
- Figura 2. Producción global de cultivos entre los años 2000 y 2020. Tomado de: “FAO. 2021. Production: Crops and livestock products”	pág. 9
- Figura 3. Producción comercial de maíz en Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay (en millones de toneladas). Tomado de: Methol M. 2021. Maíz y sorgo. Anuario de Methol, 2021	pág. 10
- Figura 4. Características macro y micromorfológicas de <i>Fusarium</i> spp. a. colonia en PDA; b. reverso con pigmentos en PDA; c-d. células conidiógenas; e-f. macroconidios; g-h. microconidios. Tomado de: Leslie y Summerell 2006, The <i>Fusarium</i> Laboratory Manual	pág. 12
- Figura 5. Pudrición de la mazorca (<i>Gibberella</i> / <i>Fusarium</i> ear rot) Tomado de: CIMMYT	pág. 12
- Figura 6. Rutas de entrada de <i>Fusarium</i> spp. a la planta de maíz. 1. Infección sistémica de plántulas. 2. Infección a través del estigma (estigma (E), canal estilar (CE) carpelo (C.))3. Infección a través de heridas. Tomado de: de la Torre et al., 2014.	pág. 13
- Figura 7. Características macro y micromorfológicas de <i>Aspergillus</i> spp. a. colonia en MEA; b-c. conidióforos (b. radiado, c. columnar)	pág. 15

- Figura 8. Ciclo de infección de <i>Aspergillus flavus</i> en maíz. Adaptado de: Wicklow y Donahue 1984	pág. 16
- Figura 9. Estructura química de los tricotecenos de tipo A y B. Tomado de: Edite Bezerra da Rocha et al., 2014	pág. 20
- Figura 10. Estructura química de la zearalenona. Tomado de: Edite Bezerra da Rocha et al., 2014	pág. 22
- Figura 11. Estructura química de las fumonisinas	pág. 22
- Figura 12. Estructura química de las aflatoxinas	pág. 23
- Figura 13. Estructura química del ácido ciclopiazónico	pág. 23
- Figura 1-1. Distribución de especies pertenecientes al género <i>Fusarium</i> en muestras de maíz durante las dos zafras de estudio	pág. 37
- Figura 1-2. Distribución de las muestras de maíz (%) según los niveles de contaminación con FB1 y FB2 ($\mu\text{g/kg}$)	pág. 39
- Figura 2-1. Curva de absorción de humedad para 5 g de granos de maíz, tomada de Samsudin 2015.	pág. 53
- Figura 2-2. Porcentaje de aislamientos toxicogénicos identificados como <i>F. verticillioides</i> (FB1 y FB2), <i>F. graminearum</i> s.s. (DON, NIV y ZEA) y <i>A. flavus</i> (AFB1, AFB2 y ACP) en ambos años de estudio.	pág. 55
- Figura 2-3. Efecto de la temperatura y actividad hídrica sobre la velocidad de crecimiento (mm/día) para las especies de <i>F. verticillioides</i> , <i>F. graminearum</i> s. s. y <i>A. flavus</i>	pág. 57
- Figura 2-4. Efecto de diferentes actividades hídricas y temperaturas sobre la velocidad de crecimiento y la producción de FB1 y FB2 por <i>F. verticillioides</i> .	pág. 58
- Figura 2-5. Efecto de diferentes actividades hídricas y temperaturas sobre la velocidad de crecimiento y la producción de DON, ZEA, 15-AcDON y 3-AcDON por <i>F. graminearum</i> s. s..	pág. 60
- Figura 2-6. Efecto de diferentes actividades hídricas y temperaturas sobre la velocidad de crecimiento y la producción de AFB1 por <i>A. flavus</i> .	pág. 60
- Figura 3-1. Rangos de EC50 de los fungicidas analizados para las cepas de <i>F. verticillioides</i> estudiadas	pág. 75
- Figura 3-2. Rangos de EC50 de los fungicidas analizados para las cepas de <i>F. graminearum</i> s. s. estudiadas	pág. 77

- Figura 3-3. Concentraciones de EC50 de cada fungicida para los aislamientos de *F. verticillioides* y *F. graminearum* s. s. estudiados. Las letras minúsculas indican diferencias entre los fungicidas dentro de cada especie (Fisher LSD $p < 0.05$). pág. 78

- Figura 4-1. A. Cluster de genes implicados en la biosíntesis de fumonisinas en *F. verticillioides*. Las flechas amarillas indican los genes reguladores, las flechas negras indican genes que no son necesarios para la biosíntesis de fumonisinas, el círculo rojo indica el gen utilizado en este trabajo. B. Ruta biosintética de las fumonisinas con los genes implicados en cada reacción y las estructuras químicas de los productos intermediarios. Tomado de; Kolawole et al. 2021. pág. 85

- Figura 4-2. A. Genes involucrados en la producción de tricoteceno por especies de *Fusarium*. Las flechas amarillas representan los genes reguladores, el círculo rojo indica los genes utilizados en este trabajo. B. Vías de biosíntesis de tricotecenos, con los genes implicados en cada reacción y las estructuras químicas de los productos intermediarios. T representa la vía biosintética de la toxina T-2; N representa la vía biosintética del nivalenol; y D representa la vía biosintética del deoxinivalenol. Tomado de: Kolawole et al. 2021. pág. 86

- Figura 4-3. A. Cluster de genes para la síntesis de Zearalenona (ZEA) de *F. graminearum*. Las flechas en amarillo indican genes reguladores, flechas negras indican genes involucrados en la biosíntesis de ZEA, el círculo rojo indica los genes utilizados en este trabajo. B. Ruta biosintética para la síntesis de zearalenona, con los genes implicados en cada reacción y las estructuras químicas de los productos intermediarios; Tomado de Kolawole et al. 2021. pág. 87

- Figura 4-4. A. Cluster de genes responsables de la síntesis de aflatoxinas en *Aspergillus spp.* Las flechas amarillas indican genes reguladores, el círculo rojo indica los genes utilizados en este trabajo. B. Ruta biosintética para la síntesis de aflatoxinas, con los genes implicados en cada reacción y las estructuras químicas de los productos intermediarios. Tomado de; Kolawole et al. 2021. pág. 88

- Figura 4-5. Estufa de ambiente controlado para la incubación de los recipientes de los distintos ensayos pág. 92

- Figura 4-6. Evaluación de los niveles de biomasa al día 5 y día 14 de incubación de *F. verticillioidea* (Fv) en presencia de *F. graminearum* s. s. (Fg) y *A. flavus* no toxicogénico (AfNT) y toxicogénico (AfT). Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) respecto al control. pág. 97
- Figura 4-7. Evaluación de los niveles de biomasa al día 5 y día 14 de incubación de *F. graminearum* s. s. (Fg) en presencia de *F. verticillioidea* (Fv) y *A. flavus* no toxicogénico (AfNT) y toxicogénico (AfT). Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) respecto al control. pág. 98
- Figura 4-8. Evaluación de los niveles de biomasa al día 5 y día 14 de incubación de *A. flavus* toxicogénico (AfT) en presencia de *F. verticillioidea* (Fv), *F. graminearum* s. s. (Fg) y *A. flavus* no toxicogénico (AfNT). Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) respecto al control. pág. 99
- Figura 4-9. Evaluación de los niveles de biomasa al día 5 y día 14 de incubación de *A. flavus* no toxicogénico (AfNT) en presencia de *F. graminearum* s. s. (Fg), *F. verticillioidea* (Fv) y *A. flavus* toxicogénico (AfT). Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) respecto al control. pág.100
- Figura 4-10. Niveles de expresión de los diferentes genes involucrados en la síntesis de toxinas para cada una de las especies estudiadas (*fum1*, *tri5*, *tri6*, *psk4*, *psk13*, *afR*, *afS*) a los 5 y 14 días de incubación en las muestras control pág.101
- Figura 4-11. Niveles de expresión del gen FUM1 por *F. verticillioidea* a los 5 y 14 días de incubación en presencia de *F. graminearum* s. s. (Fg) y *A. flavus* toxicogénico (AfT) y no toxicogénico (AfNT). Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) respecto al control. pág.102
- Figura 4-12. Niveles de expresión de los genes *tri5*, *tri6*, *psk13* y *psk4* por *F. graminearum* s. s. (Fg) a los 5 y 14 días de incubación en presencia de *F. verticillioidea* (Fv) y *A. flavus* toxicogénico (AfT) y no toxicogénico (AfNT). Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) respecto al control. pág.103
- Figura 4-13. Niveles de expresión de los genes *afR* y *afS* por *A. flavus* (AfT) a los 5 y 14 días de incubación en presencia de *F. graminearum* s. s. (Fg), *F. verticillioidea* (Fv) y *A. flavus* no toxicogénico (AfNT). Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) respecto al control. pág.104

- Figura 4-14. Niveles de FB1 y FB2 ($\mu\text{g/kg}$) producidas por la cepa A68 de *F. verticillioides* y en presencia de *F. graminearum* s. s. (Fg) y cepas toxicogénicas y no toxicogénicas de *A. flavus* (AfT y AfNT, respectivamente). Las letras sobre las cajas indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control (A68), (Fisher LSD $p < 0.05$). pág.105
- Figura 4-15. Niveles de FB1 ($\mu\text{g/kg}$) producidas por la cepa A52 de *F. verticillioides* y en presencia de *F. graminearum* s. s. (Fg) y cepas toxicogénicas y no toxicogénicas de *A. flavus* (AfT y AfNT, respectivamente). Las letras sobre las cajas indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control (A52), (Fisher LSD $p < 0.05$). pág.105
- Figura 4-16. Niveles de DON y ZEA ($\mu\text{g/Kg}$) producidas por la cepa A368 de *F. graminearum* s. s. en presencia de *F. verticillioides* (A68 y A52) y cepas toxicogénicas y no toxicogénicas de *A. flavus* (A36 y A631, respectivamente). Las letras sobre las cajas indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control (A368), (Fisher LSD $p < 0.05$). pág. 106
- Figura 4-17. Niveles de AFB1 y AFB2 ($\mu\text{g/Kg}$) producidas por *A. flavus* en presencia de *F. graminearum* s. s. (Fg), *F. verticillioides* (Fv) y la cepa no toxicogénica de *A. flavus* (AfNT). Las letras sobre las cajas indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control, (Fisher LSD $p < 0.05$). pág. 107

Índice de tablas.

- Tabla 1. Niveles máximos de micotoxinas permitidos en productos destinados a consumo humano según Reglamento Bromatológico Nacional (RBN), 2012. pág. 19
- Tabla 1-1. Niveles de micotoxinas de Fusarium presentes en muestras de maíz de la cosecha 2018 (n=61) y 2019 (n=58) pág. 39
- Tabla 2-1. Secuencias de cebadores utilizados para la caracterización genotípica mediante PCR múltiple (Tri3, Tri12) y PCR (Tri13) pág. 52
- Tabla 2-2. Volúmenes de glicerol:agua adicionados a granos de maíz para cada actividad hídrica (aw) pág. 53
- Tabla 2-3. Distribución (%) de genotipos de los aislamientos de FGSC para los genes Tri 3, Tri 12 y Tri 13 pág. 56
- Tabla 3-1. Valores de EC50 de las cepas de *F. verticillioides* frente a los diferentes fungicidas estudiados pág. 74

- Tabla 3-2. Valores de EC50 de las cepas de *F. graminearum* s. s. frente a los diferentes fungicidas estudiados pág. 76
- Tabla 4-1. Cepas seleccionadas para estudio del efecto de la co-existencia de especies en el crecimiento y producción de toxinas pág. 90
- Tabla 4-2. Cepas de especies co-inoculadas en cada ensayo experimental. pág. 90
- Tabla 4-3. Secuencias de los distintos cebadores utilizados para la cuantificación de la biomasa de cada especie fúngica pág. 93
- Tabla 4-4. Secuencias de los distintos cebadores utilizados para los análisis por RT-qPCR pág. 95

Glosario de siglas.

3-AcDON - 3 acetil DON

15-AcDON - 15 acetil DON

ACP - ácido ciclopiazónico

ADNc - ADN copia

AFB1 - aflatoxina B1

AFB2 - aflatoxina B2

AFG1 - aflatoxina G1

AFG2 - aflatoxina G2

AfNT- *Aspergillus flavus* no toxicogénico

AfT- *Aspergillus flavus* toxicogénico

aw - actividad hídrica

Ct - ciclo umbral

DON - deoxynivalenol

EC50 - concentracion efectiva que inhibe el crecimiento al 50%

EF-1 - gen *factor de elongación* - 1 α

FBs - fumonisinas

FB1 - fumonisina B1

FB2 - fumonisina B2

FB3 - fumonisina B3

FGSC - complejo *Fusarium graminearum*

IARC - Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer

LC-MS/MS - cromatografía líquida unida a espectrómetro de masa

NIV - nivalenol

OA - ocratoxina A

RBN - reglamento bromatológico nacional

PCR - reacción en cadena de la polimerasa

RT-PCR - reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

RT-qPCR - técnica cuantitativa de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

ZEA - zeralenona

Introducción general

1. Maíz (*Zea Mays*)

El maíz pertenece a la familia de las gramíneas, también conocida como poáceas. El género *Zea* está compuesto por cinco especies nativas de México y América Central que incluyen el maíz y sus parientes silvestres: *Z. Mays*, *Z. diploperennis*, *Z. perennis*, *Z. luxurians* y *Z. nicaraguensis*. Los parientes silvestres del maíz pueden llamarse teosinto o teosinte. La especie *Zea mays* comprende cuatro sub especies diploides y anuales: *Zea mays* L. ssp. *mays*, que corresponde al maíz propiamente dicho; *Zea mays* L. ssp. *parviglumis* y *Zea mays* L. ssp. *mexicana*, ambas nativas de México; y *Zea mays* L. ssp. *huehuetenangensis*, teosinto endémico de Guatemala (Doebley e Iltis, 1980; Doebley, 1990). Su versatilidad ofrece múltiples propósitos para su uso, desde ración para ganado hasta alimento clave en la alimentación humana. Presentando gran potencial para uso medicinal debido a la presencia de carotenoides llamados luteína y zeaxantina, que son beneficiosos para la salud humana y actúan en la prevención de enfermedades (Meléndez-Martínez et al., 2004).



Figura 1. a - c, cultivos de maíz desde el inicio de la floración en el campo hasta la cosecha. d. Diferentes variedades de mazorcas de maíz.

Su producción a nivel mundial ocupa el segundo lugar, luego de la caña de azúcar (Figura 2), siendo también el segundo cultivo, luego del trigo, en exportación a nivel mundial (173.645 millones de toneladas/año en 2018) (FAO, 2021). Se estima que el consumo per cápita de maíz en el mundo es de aproximadamente 160 g por día, principalmente en forma de tortillas (ASERCA, 2012). A pesar de ser un cultivo presente en distintas partes del mundo, su producción se da mayoritariamente en el

continente americano.

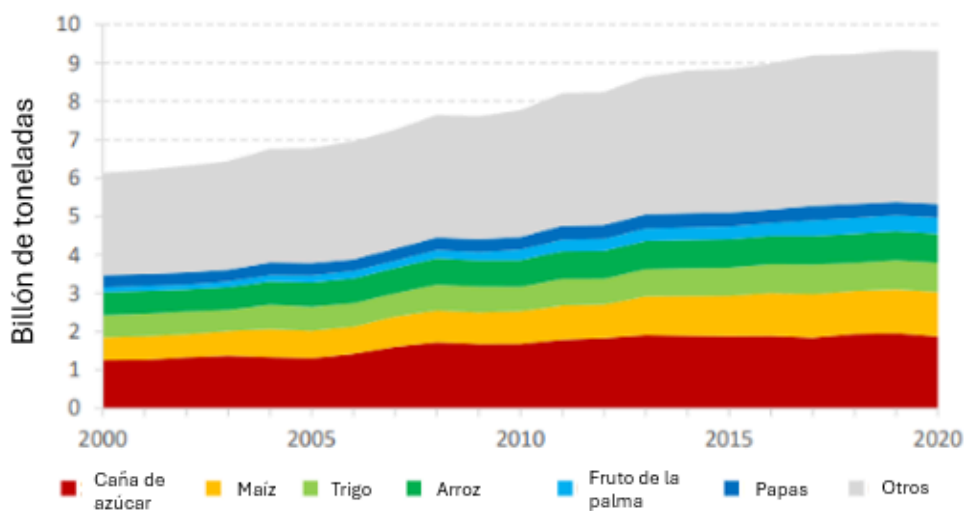


Figura 2. Producción global de cultivos entre los años 2000 y 2020. Tomado de: "FAO. 2021. Production: Crops and livestock products"

A nivel del cono sur (Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay), la producción de maíz ha aumentado significativamente en los últimos 10 años, alcanzando en la zafra 2019/20 un récord histórico de 166 millones de toneladas, que representó el 13% de la producción mundial de maíz (Figura 3) (Methol, 2021). En Uruguay, la superficie sembrada de maíz en la zafra 2020/21 aumentó 22% respecto a la zafra anterior, alcanzando 143.000 hectáreas. Este nivel de siembra es el más alto de los últimos 40 años y no se observaba en el país desde la década del 70 (Methol, 2021). Los departamentos localizados en la región Litoral Oeste de nuestro país son los que presentan mayor superficie sembrada con este cultivo, destacandose, Soriano, Colonia, Durazno, Flores, Florida, Paysandú, Rio Negro y San José. La casi totalidad de la demanda de este grano tiene como destino la alimentación animal, solamente un 8% se destina a la producción de etanol (Methol, 2021).

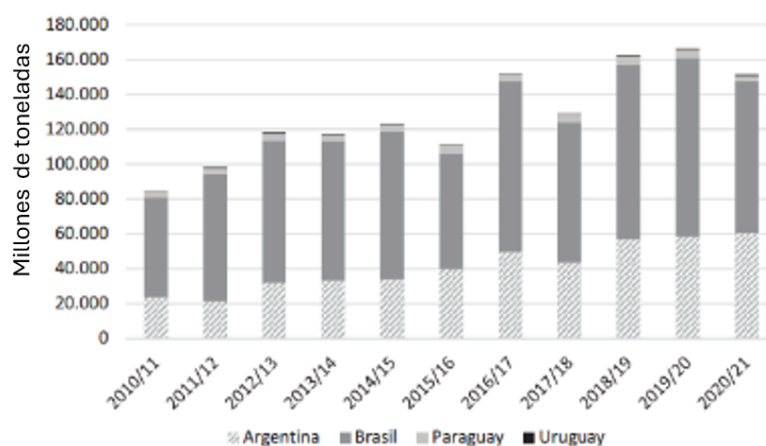


Figura 3. Producción comercial de maíz en Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay (en millones de toneladas). Tomado de: Methol M. 2021. Maíz y sorgo. Anuario de Methol, 2021

2. Hongos asociados a cultivos de maíz

Los granos de cereales desde su formación en la planta, hasta su utilización o consumo final, están expuestos a la colonización por una gran variedad de microorganismos, de los cuales los hongos filamentosos son los más importantes. Los hongos desempeñan un papel ecológico muy importante en los diversos ecosistemas. Debido a su abundancia y diversidad utilizan prácticamente cualquier material como sustrato, participan en el reciclaje de nutrientes y funcionan como descomponedores de la materia orgánica, en especial de la vegetal. La colonización fúngica de los granos provoca su deterioro, puede implicar pérdida de viabilidad del grano, pérdida de peso seco, aumento de ácidos grasos, calentamiento del grano y disminución de la germinación (Magan et al., 2004). El maíz está expuesto a la colonización por una gran variedad de hongos tanto en el campo como durante su almacenamiento y es considerado uno de los cultivos más susceptibles a la contaminación con micotoxinas a nivel mundial (Barug et al., 2004). Particularmente es un buen sustrato para el desarrollo de las principales especies de hongos toxicogénicos como son *Aspergillus flavus*, *Fusarium verticillioides* y *Fusarium graminearum*.

Fusarium es un hongo filamentoso que se encuentra dentro del grupo de los ascomycetes, orden *Hypocreales*. Generalmente se presenta en su fase asexual, si bien algunas especies tienen descripta su fase sexual (por ej. *Gibberella*) que forma ascos con ascosporas contenidas en peritecios. El género *Fusarium* fue descrito por primera vez en la terminología científica moderna por Link (1809), sin embargo, los primeros datos fueron aportados por un monje franciscano en México en el siglo XVI. Estos datos se basaban en las descripciones realizadas por los aztecas, que habían observado la podredumbre del maíz producida por el ahora conocido *F. verticillioides*. Desde su primera descripción se han realizado numerosas clasificaciones, por ello la taxonomía de este género

permanece en continua revisión. Estas clasificaciones se han centrado en el estudio de la morfología y la ausencia o presencia de los tres tipos de esporas asexuales que las especies de este género pueden producir: macroconidios, microconidios y clamidosporas (esporas de resistencia). Su identificación se basa fundamentalmente en la forma y tamaño de los macroconidios, forma y modo de formación de los microconidios (cadenas o cabezuelas), tipo de células conidiógenas (monofialides o polifialides) y en la presencia o ausencia de clamidosporas (Nelson et al., 1983; Leslie y Summerell, 2006). Otras características importantes para su identificación es el aspecto macroscópico de la colonia, la producción de pigmentos, la velocidad de crecimiento en medio papa dextrosa agar y la producción de peritecios (Burgess et al., 1994; Leslie y Summerell, 2006). (Figura 4)

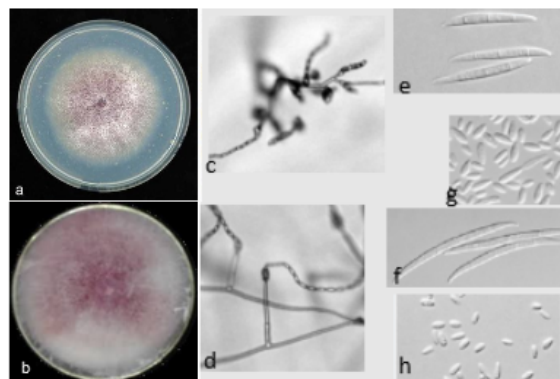


Figura 4. Características macro y micromorfológicas de *Fusarium* spp. a. colonia en PDA; b. reverso con pigmentos en PDA; c-d. células conidiógenas; e-f. macroconidios; g-h. microconidios. Tomado de: Leslie y Summerell 2006, The *Fusarium* Laboratory Manual

En la actualidad, se han descrito alrededor de 150 especies morfológicas y/o filogenéticamente diferentes bien caracterizadas y aceptadas por los taxónomos, a pesar de que no existe ningún manual disponible para abordar el tema de una manera clara y rápida (Seifert y Lévesque, 2004). Mientras que el análisis filogenético de dos o más genes es requerido para el completo desarrollo de un análisis de concordancia genealógica, la identificación precisa de cada una de las especies de *Fusarium* sólo necesita basarse en ensayos específicos sobre una región determinada del DNA. El gen *factor de elongación - 1 α* (EF-1) tiene una gran utilidad a nivel filogenético porque es informativo ya que permite la discriminación a nivel de especie en el género *Fusarium*. Además, no se han detectado copias no-ortólogas de este gen y se han diseñado cebadores universales que funcionan para todas las especies del género *Fusarium*, además de otros géneros fúngicos (Seifert y Lévesque, 2004).

Numerosas especies del género *Fusarium* están consideradas como importantes fitopatógenos, capaces de colonizar plantas generalmente en el campo (Logrieco et al., 2003). Están frecuentemente asociados al desarrollo de distintas enfermedades tales como la pudrición de raíz, tallo y granos. Es

uno de los géneros de hongos fitopatógenos con mayor significancia económica vinculada a la pérdida de cereales alrededor del mundo, incluido el maíz (Dean et al., 2012). Entre las especies de *Fusarium*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* y *Fusarium subglutinans* son las responsables de la pudrición de la mazorca (*Gibberella* / *Fusarium* ear rot), la enfermedad de mayor importancia productiva del cultivo de maíz (Figura 5) (Logrieco et al., 2002, Oldenburg et al., 2017).



Figura 5. Pudrición de la mazorca (*Gibberella* / *Fusarium* ear rot) Tomado de: CIMMYT

Las especies del género *Fusarium* se distribuyen de forma cosmopolita, y están frecuentemente presentes en los diferentes órganos del maíz (Mendoza et al., 2003). Algunas especies de *Fusarium* se consideran hemibiotrofos capaces de cambiar a necrotrofos dependiendo del huésped y las condiciones ambientales (Summerell, 2019; Rampersad, 2020). De manera general, el ciclo infectivo de *Fusarium* parte de un inóculo primario que se encuentra en materiales vegetales infectados en forma de peritecios, clamidosporas, macro y microconidios, según la especie que esté presente en el material vegetal (Goswami y Kistler, 2004). Generalmente, estos materiales infectados proceden de los residuos de la cosecha que pueden encontrarse en el suelo en el mismo campo o en campos cercanos (Xu, 2003). Cuando las condiciones ambientales son favorables, las ascosporas y conidios se desarrollan e infectan los tejidos de la planta. Las principales rutas de entrada e infección son; 1) la infección sistémica de las plantas, como endófito de semilla o a través de la raíz; 2) Infección de la mazorca por el estigma; 3) Infección del tallo o mazorca facilitada por daño mecánico o por insectos (por ejemplo lagarta de la mazorca, cogollo del maíz, etc) (Figura 6) (de la Torre et al., 2014).

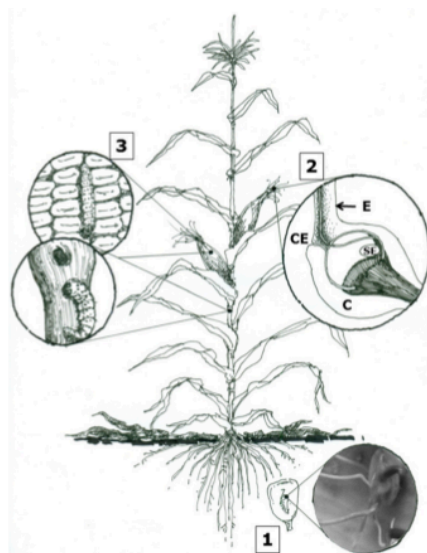


Figura 6. Rutas de entrada de *Fusarium* spp. a la planta de maíz. 1. Infección sistémica de plántulas. 2. Infección a través del estigma (estigma (E), canal estilar (CE) carpelo (C).) 3. Infección a través de heridas. Tomado de: de la Torre et al., 2014.

El complejo *Fusarium fujikuroi* (FFSC) es uno de los más grandes y más estudiados complejos de especies del género *Fusarium* (Sandoval-Denis et al., 2018a; b; Al-Hatmi et al., 2019), al momento se describen más de 60 especies que lo componen (Yilmaz et al., 2021). Algunas de estas especies son capaces de causar infecciones en plantas, producir micotoxinas (beauvericina, fumonisinas, moniliformina, etc) y causar infecciones oportunistas en humanos (Nirenberg y O'Donnell 1998; Munkvold, 2017; Al-Hatmi et al., 2019). Dentro de las especies pertenecientes al FFSC se encuentran *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans*, estas especies son capaces de contaminar el maíz principalmente en regiones tropicales y subtropicales. La especie más comúnmente asociada como patógeno del maíz es *F. verticillioides* (Zainuddin et al., 2011; Covarelli et al., 2012; Madania et al., 2013). Este es un hongo hemibiotrofo cuyo desarrollo se ve favorecido por altas temperaturas, el estrés hídrico, el genotipo del cultivo y el daño producido por insectos. La enfermedad causada por este patógeno, *Fusarium* ear rot, se ve favorecida por la siembra repetida de maíz y otros cultivos de cereales en la misma superficie o en superficies cercanas al aumentar el inóculo fúngico en el rastrojo y la población de insectos que atacan la planta de maíz (Fandohan et al., 2003).

El complejo *Fusarium graminearum* (FGSC) abarca, hasta el momento, 16 especies: *F. austroamericanum*, *F. bothii*, *F. meridionale*, *F. mesoamericanum*, *F. luisianense*, *F. acaciae-mearnsii*, *F. basilicum*, *F. cortaderiae*, *F. gerlachii*, *F. nepalense*, *F. graminearum sensu stricto*, *F. asiaticum*, *F. aethiopicum*, *F. vorosii*, *F. ussurianum* y *F. graminearum* de la Costa del Golfo (Sarver et al., 2011; Aoki et al., 2012; Aoki y O'Donnell 2014). Estas especies son particularmente conocidas por causar la fusariosis de la espiga en cereales de granos pequeños como son trigo, cebada, avena y centeno. Esta enfermedad puede llevar a pérdidas del cultivo que en algunos casos superan el 50% (Parry et al.,

1995). Durante la invasión de los tejidos vegetales, muchas especies pueden sintetizar micotoxinas, algunas de estas se han descrito como factores de virulencia del hongo, como por ejemplo la producción de deoxinivalenol por *F. graminearum* en trigo (Proctor et al., 2002). Dentro de las especies que componen el complejo, *Fusarium graminearum sensu stricto* (*F. graminearum* s. s.) parecería ser la única especie cosmopolita (Logrieco et al., 2003; O'Donnell et al., 2004; Starkey et al., 2007). El ciclo de vida de *F. graminearum* s. s. está influido por factores ambientales, especialmente temperaturas templadas y humedad relativa alta durante la etapa de floración favorecen la infección de las espigas maduras del cereal (Munkvold, 2003; Sanchis y Magan, 2004). *Fusarium graminearum* s. s. es una de las principales especies responsable de causar pudrición de la mazorca (*Gibberella* ear rot) y el tallo (*Gibberella* stalk rot) en maíz (Munkvold, 2003; Lana et al., 2020), también es la principal responsable de la fusariosis de la espiga en los cultivos de granos pequeños, principalmente en el trigo (Castañares et al., 2016). Estas enfermedades disminuyen el rendimiento de los cultivos y la calidad de los mismos a nivel mundial (Kazan et al., 2012; McMullen et al., 2012).

Los hongos del género *Aspergillus* pertenecen a los Ascomycota; sin embargo, en algunos de ellos se desconocen sus formas sexuales. En 1729, Pier Antonio Micheli, describió el género en el libro “Nova Plantarum Genera”. Le dio este nombre debido a que la estructura característica del género se asemejaba a un aspergillum, un instrumento usado por la iglesia Católica para rociar el agua bendita. Recién a mediados del siglo XX comenzó a ser reconocido como un agente activo en la síntesis de compuestos químicos, transformaciones biosintéticas y producción enzimática. *Aspergillus* es un género caracterizado morfológicamente, en términos generales, por la formación de conidióforos con estípites largos, de paredes gruesas y ápices usualmente ensanchados formando una vesícula aproximadamente esférica, aunque en algunas especies son más elongadas. Las vesículas del conidióforo presentan fiálides (uniseriados) o métulas y fiálides (biseriados) en toda su superficie o en parte de ella. Los estípites se originan a partir de una célula especializada denominada célula pie que está unida al conidióforo formando una “T” o una “L” en su base. Los conidios se originan en cadenas formando columnas compactas (columnar) o divergentes (radiada), son unicelulares, de pared lisa u ornamentada, hialinos o pigmentados (Figura 7) (Alexopoulos et al., 1996; Pitt y Hocking, 1997).

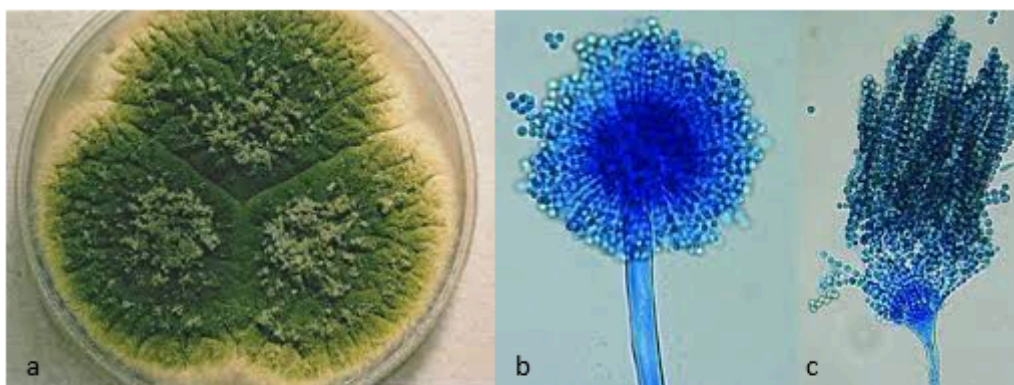


Figura 7. Características macro y micromorfológicas de *Aspergillus* spp. a. colonia en MEA;

b-c. conidióforos(b. radiado, c. columnar)

Algunas especies pueden producir esclerocios, una masa de hifas compacta, usualmente globosa, que no contienen conidios. Éstos varían en forma, tamaño y color. Funcionan como estructuras de supervivencia que el hongo utiliza para permanecer en el suelo en espera de condiciones favorables para su desarrollo (Wicklow, 1990). Aquellas especies que presentan estadio sexual (teleomorfo) forman una estructura denominada cleistotecio, que son cuerpos fructíferos que no tienen apertura natural y que contienen ascos con ascosporas (esporas sexuales). En algunas de estas especies también se puede evidenciar la presencia de células de paredes gruesas denominadas células de Hülle (Figura 7).

La diversificación de las especies de la sección hace muy dificultosa su identificación con los métodos morfológicos y fisiológicos convencionales, debido a que comparten las características que las definen. Es por este motivo que en la actualidad, se trata de efectuar estudios polifásicos que incluyan metodologías morfológicas, fisiológicas, químicas y genéticas. Particularmente, en relación al género *Aspergillus*, la secuenciación de los genes que codifican para β -tubulina y calmodulina presentan numerosas ventajas para la identificación a nivel de especie (Balajee, 2008). Sin embargo, estudios filogenéticos demuestran que el estudio de la calmodulina es el que permite mayor resolución en la identificación a nivel de especie (Alshehri y Palanisamy, 2020). En base a la secuenciación parcial del gen de la calmodulina, se identifican 339 especies pertenecientes al género *Aspergillus* agrupadas en 19 secciones (Samson et al., 2014). La dispersión de las especies de *Aspergillus* se da a través de los conidios, que son propágulos asexuales que pueden propagarse a través del aire, el suelo y por medio de insectos que las diseminan. Los conidios de *Aspergillus* pueden colonizar los granos presentes en la planta, particularmente cuando se presentan condiciones ambientales tales como altas temperaturas y altos niveles de humedad.

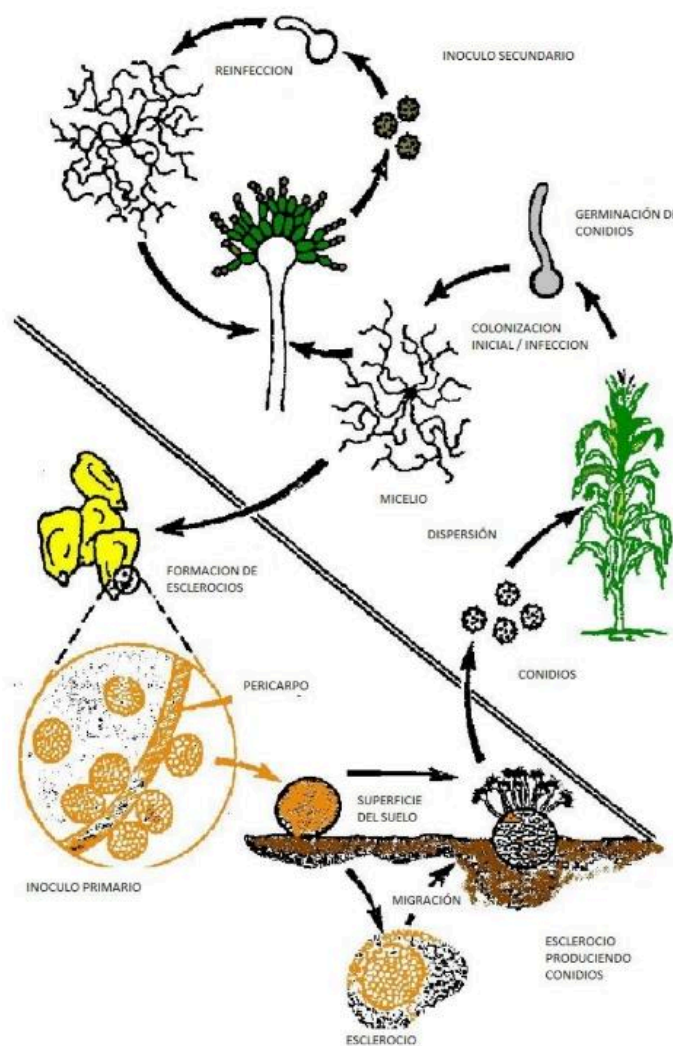


Figura 8. Ciclo de infección de *Aspergillus flavus* en maíz. Adaptado de: Wicklow y Donahue 1984

Las especies de *Aspergillus* se encuentran entre las especies fúngicas más estudiadas debido a que han sido aisladas de una gran variedad de alimentos en los cuales se las ha implicado con el deterioro de los mismos y/o con la producción de aflatoxinas y ocratoxinas, reflejando de esta manera su importancia económica. Especies de este género son causantes de la contaminación de productos agrícolas tanto antes como después de la cosecha. Las especies del género *Aspergillus* son mayoritariamente ubicuas, aislándose de diferentes sustratos y con mayor frecuencia en climas templados y subtropicales entre las latitudes 26° a 35° al Norte y Sur del Ecuador (Klich, 2002). El género *Aspergillus*, subgénero *Circumdati*, sección *Flavi* contiene algunas de las especies más importantes del género debido a su significancia biotecnológica, en alimentos y en la salud tanto humana como animal (Varga et al., 2011). La sección *Flavi* está compuesta por 7 clados principales con más de 20 especies entre las que se encuentran; *A. avenaceus*, *A. clavatoflavus*, *A. flavus*, *A.*

leporis, *A. nomius*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *A. sojae*, *A. subolivaceus*, *A. tamarii*, *A. caelatus*, *A. pseudotamarii*, *A. bombycis*, *A. alliaceus*, *A. pseudocaelatus*, *A. toxicarius*, *A. parvisclerotigenus*, *A. pseudonomius* y *A. minisclerotigenes*.

Aspergillus flavus es un hongo cosmopolita, patógeno de humanos, animales y plantas. Se lo conoce como un hongo saprófito presente en suelos a nivel mundial causante de múltiples enfermedades de gran relevancia en granos como maíz (pudrición de mazorca), maní, algodón, antes y después de la cosecha (Yu et al., 2005; Klich, 2007; Michailides y Thomidis, 2007). Es una de las principales especies a nivel mundial responsable de la contaminación de los granos de maíz con micotoxinas. Coloniza este cultivo principalmente bajo condiciones de estrés hídrico y altas temperaturas, principalmente durante el estado de floración dado que es cuando el cultivo se encuentra más vulnerable al ingreso de este patógeno, principalmente después de la polinización y hasta la senescencia de los estigmas. *Aspergillus flavus*, es frecuentemente encontrado en áreas tropicales, sin embargo, debido al cambio climático, esta especie se la considera como emergente en varias regiones de Europa (Battilani et al., 2016).

3. Micotoxinas

Además de los diversos efectos que puede tener la contaminación fúngica tanto en el rendimiento y viabilidad del cultivo, otro aspecto de gran importancia es la capacidad de contaminación con micotoxinas. Las micotoxinas son metabolitos secundarios de bajo peso molecular producidos, principalmente, al final de la fase exponencial o al inicio de la fase estacionaria de crecimiento del hongo (Bullerman y Draughon, 1994). Anualmente, entre el 25 al 50% de los cultivos del mundo están contaminados con micotoxinas (Ricciardi et al., 2013). Esto determina el riesgo que genera esta contaminación para la salud humana y animal, al producir mediante su ingesta intoxicaciones agudas o crónicas, con efectos carcinogénicos, teratogénicos, embriotóxicos, hepatotóxicos, nefrotóxicos, estrogénicos, inmunotóxicos o incluso la muerte (Sweeney y Dobson, 1998). Esto también se vincula a perjuicios económicos al afectarse el volumen y calidad industrial de los granos (Marin et al., 2013; Ramos et al., 1997). El impacto económico de las micotoxinas en EE.UU. y Canadá fue estimado en USD 5 mil billones/año, ello sin incluir impactos en la salud y pérdidas en el rendimiento de los cultivos. A su vez, en EE.UU. las pérdidas estimadas en maíz atribuibles a micotoxinas de *Fusarium* y a aflatoxinas de *Aspergillus* son de USD 2900 y 225 millones/año, respectivamente (Schmale III y Munkvold, 2017).

La mayoría de las micotoxinas conocidas son producidas por los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (Bennett y Klich, 2003). Por su incidencia y distribución mundial, las principales micotoxinas que contaminan los granos son deoxinivalenol (DON), toxina T-2, zearalenona (ZEA),

fumonisin B1 (FB1), aflatoxina B1 (AFB1) y ocratoxina A (OA) (Gimeno y Martins, 2011). La presencia de micotoxinas en los granos está estrechamente relacionada al crecimiento fúngico, por lo que si no hay desarrollo de hongos no habrá micotoxinas. Sin embargo, la existencia de hongos no implica la producción de micotoxinas, ya sea porque no se dieron las condiciones adecuadas (principalmente disponibilidad de agua y temperatura) o por la ausencia de cepas toxigénicas. En general la síntesis de micotoxinas se asocia a condiciones de estrés, generadas por cambios en la temperatura, humedad, aireación o presencia de agentes agresores (Santin, 2008). Si bien estos metabolitos se caracterizan por ser termoestables, el uso de tratamientos físicos de descontaminación, como la selección de granos de cereales, los descascarillados y la posterior separación mecánica de la cáscara y el polvo del resto del cereal, reducen significativamente el contenido de micotoxinas en las cosechas.

La presencia de micotoxinas en alimentos y raciones ha llevado a que muchos países establezcan niveles máximos de inclusión para proteger la salud humana y animal (FAO, 2004). En nuestro país existen niveles máximos permitidos para algunas micotoxinas, principalmente en alimentos para consumo humano (Tabla 1) (RBN, 2012). En relación a micotoxinas en alimentos destinados a alimentación animal, existen reglamentaciones únicamente para DON a nivel nacional, que establece un límite máximo de en alimentos para: bovinos de carne, ovinos y aves de 5.000 µg/kg; bovinos de leche de 2.000 µg/kg, cerdos y equinos de 1.000 µg/kg y para otros animales de 2.000 µg/kg. Para materias primas (granos y sus subproductos) destinados a la elaboración de alimentos para animales se establece un límite máximo de DON de 10.000 µg/kg (MGAP, 2001).

Tabla 1. Niveles máximos de micotoxinas permitidos en productos destinados a consumo humano según Reglamento Bromatológico Nacional (RBN), 2012.

Producto	Micotoxinas	Límite (mcg/kg o l)
Productos y derivados lácteos (excepto leche en polvo)	Aflatoxinas M1	0.5
Alimentos industrializados para niños de corta edad	Aflatoxinas (B1+B2+G1+G2)	< 3
Otros Alimentos y condimentos diferentes a los citados por el art. 1.2.18	Aflatoxinas (B1+B2+G1+G2)	20 (mientras que B1 no supere 5)
Arroz, cebada, porotos, café, maíz	Ocratoxina A	50
Maíz, cebada en grano	Zearalenona	200
Jugos de frutas	Patulina	50
Harina de trigo, sub-productos del trigo y alimentos elaborados en base a trigo	Deoxinivalenol (DON)	< o = 1.000

Entre las principales micotoxinas producidas por *Fusarium* se encuentran los tricotecenos, la zearalenona (ZEA) y las fumonisinas (FBs) (Ji et al., 2019).

Los tricotecenos son producidos por varias especies de los géneros *Fusarium*, *Cephalosporium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys* y *Trichoderma*. Dentro del género *Fusarium* las principales especies productoras de tricotecenos son *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae* y *F. sporotrichioides*.

Son una gran familia de micotoxinas sesquiterpenoides que comparten una estructura central de anillo tricíclico de 12,13-epoxitricotec-9-eno (tricoteceno), pero difieren en los sustituyentes en varias posiciones (Figura 9). Según el patrón de sustitución, los tricotecenos se pueden subcategorizar en cuatro grupos principales, a saber, tipo A (simple enlace en C-8), B (grupo cetona en C-8), C (epóxido en C-7,8) y D (anillo macrocíclico entre C-4 y C-15). Entre ellos, los tricotecenos de mayor preocupación incluyen el deoxinivalenol (DON, tipo B), el nivalenol (NIV, tipo B), el diacetoxiscirpenol (DAS, tipo A), la toxina T-2 (tipo A) y sus derivados, debido a su alta prevalencia como contaminantes de alimentos. Ocurren globalmente como contaminantes naturales de granos y se forman principalmente en condiciones de alta humedad, generalmente en el campo.

La toxicidad de los tricotecenos varía en función de su estructura química, el doble enlace entre los carbonos 9 y 10 y el grupo epóxido entre los carbonos 12 y 13 han sido identificados como elementos estructurales esenciales de su toxicidad (Figura 9). Un grupo hidroxilo en el carbono 3 aumenta la toxicidad y disminuye gradualmente cuando se sustituye por hidrógeno o un grupo acetoxi en esa posición (Wu et al., 2013). Dentro del grupo B, si bien NIV es más tóxico que DON para humanos y animales domésticos (Schothorst y van Egmond, 2004), DON es más fitotóxico que NIV (Desjardins, 2006).

Deoxynivalenol es el tricoteceno que frecuentemente contamina la mayoría de los granos de cereales, como por ejemplo trigo, maíz o avena. Puede producir irritación de la mucosa intestinal, vómitos, diarrea, rechazo al alimento, aborto y anemia (McCormick et al., 2011). También se ha demostrado, en estudios realizados a animales de experimentación, que tiene una potente actividad inmunosupresora. Los niños se consideran el grupo más vulnerable de la población a la exposición al DON, por su efecto en el retraso en el crecimiento (ELIKA, 2023). En los alimentos contaminados, el DON puede aparecer además junto a sus acetilados 3-AcDON y 15-AcDON, que causan los mismos efectos tóxicos que el DON.

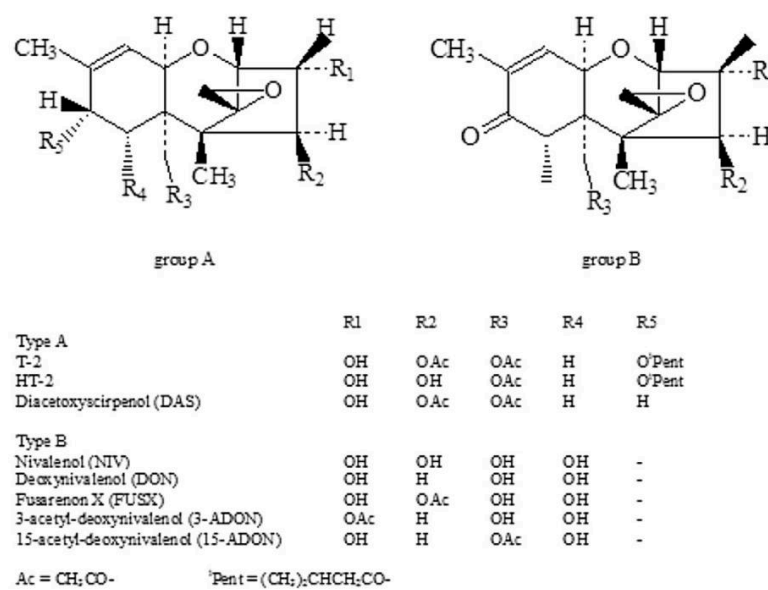


Figura 9. Estructura química de los tricotecenos de tipo A y B. Tomado de: Edite Bezerra da Rocha et al., 2014

La zearalenona (ZEA) es producida por diversas especies de hongos del género *Fusarium*, entre las que se destacan: *F. culmorum*, *F. graminearum* y *F. crookwellense* (Bennett y Klinch, 2003). La ZEA se forma principalmente en la última fase del llenado de grano de los cereales, mayoritariamente maíz y trigo, pero también afecta a la cebada, avena, arroz y sorgo. Debido a similitudes en la estructura química de la ZEA con los estrógenos, esta micotoxina es capaz de actuar como agonista a nivel de los receptores de estrógenos con prácticamente la misma potencia que el 17 β -estradiol (Figura 10), pudiendo causar problemas asociados a la sobre simulación hormonal en determinadas especies animales, principalmente en cerdos, en los que provoca disminución de la fertilidad, abortos por reabsorción fetal, reducción del tamaño de la camada y disminución de la respuesta inmune (Creppy, 2002). En humanos, debido a la actividad estrogénica de ZEA y de sus metabolitos, niveles plasmáticos altos pueden relacionarse con alteraciones endometriales y desarrollo de carcinomas mamarios en las mujeres (Creppy, 2002). Por otra parte, se metaboliza y se excreta rápidamente, por

lo que su bioacumulación en órganos y tejidos es muy baja (ELIKA, 2021). En base a la evidencia de carcinogenicidad, mutagenicidad y genotoxicidad en especies animales de laboratorio sometidas a experimentación, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) la clasifica en el grupo 3, no pudiendo ser clasificada respecto a su carcinogenicidad en humanos (IARC, 2012).

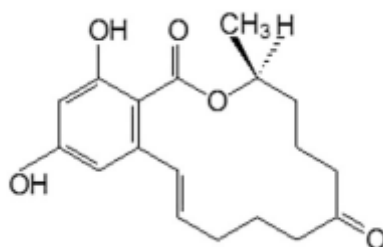


Figura 10. Estructura química de la zearalenona. Tomado de: Edite Bezerra da Rocha et al., 2014

Otras micotoxinas de gran relevancia son las fumonisinas, las cuales son producidas por especies del complejo *Fusarium fujikuroi*, principalmente *F. verticillioides* y *F. proliferatum* (Logrieco et al., 2002). Químicamente son aminopolioles de cadena larga, con dos cadenas laterales de ácido tricarboxílico (Figura 11). Los análogos del grupo B (FB), que comprende FB1, FB2 y FB3, difieren en el número y la posición de los grupos hidroxilo en la cadena principal. Además, se han descrito otras fumonisinas (grupo A, C y P), pero se producen en niveles mucho más bajos y no son significativos (5% del total de fumonisinas presentes) (CAST, 2003). Las fumonisinas son las micotoxinas más abundantes como contaminantes naturales del maíz, siendo FB1 la predominante, habiéndose reportado en todas partes del mundo y la usualmente encontrada en niveles muy elevados (WHO 1993; Dutton 1996; ELIKA, 2021). También es frecuente como contaminante de trigo, arroz, cebada y sorgo. Estudios en animales de experimentación indican que la absorción de FB1 en el tracto gastrointestinal es baja (menos del 4% de la dosis oral), y que se elimina rápidamente por vía biliar, con vidas medias de menos de 4 horas. Más del 90 % de la dosis se excreta con las heces, por lo que las concentraciones plasmáticas, tisulares y urinarias son bajas (ELIKA, 2021). Tras la exposición crónica en animales se observaron tumores hepáticos y renales. La FB1 no es mutagénico en bacterias y no causa síntesis de ADN no programada en células de mamíferos, pero induce al estrés oxidativo a través de un mecanismo indirecto. El modo de acción tóxico de las fumonisinas es la interrupción del metabolismo de los lípidos (Wang et al., 1991). Se han relacionado varios efectos clínicos en humanos (como cáncer de esófago, cáncer de hígado, deterioro del crecimiento), pero hasta ahora ninguno de ellos se ha podido relacionar directamente con la exposición a fumonisinas (Voss y Riley, 2013). La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) clasificó en el año 2002 a las fumonisinas en el grupo 2B, como posible carcinógeno humano. En animales, las fumonisinas pueden provocar encefalomalacia equina y edema pulmonar porcino (Desjardins, 2006).

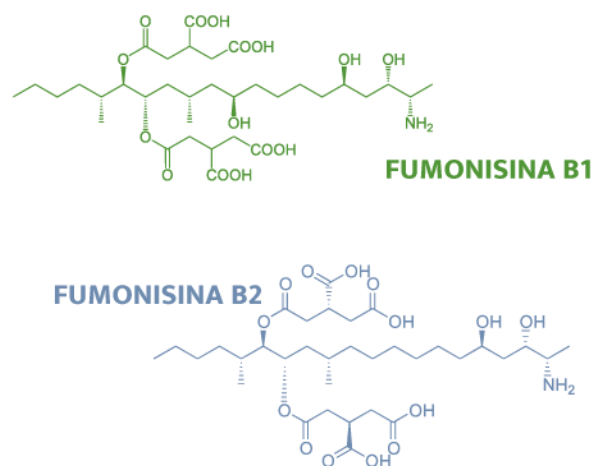


Figura 11. Estructura química de las fumonisinas

El género *Aspergillus* produce diferentes micotoxinas, siendo las especies de la sección *Flavi*, las productoras de las aflatoxinas. Si bien *A. flavus* y *A. parasiticus* son los mayores productores de estas toxinas, otras especies estrechamente relacionadas a *A. flavus* (*A. minisclerotigenes*, *A. korhogoensis*, *A. aflatoxiformans* y *A. texensis*) y *A. parasiticus* (*A. novoparasiticus* y *A. arachidicola*) también son capaces de producirlas (Carvajal-Campos et al., 2017; Frisvad et al., 2019; Singh et al., 2018). Las aflatoxinas son un grupo de compuestos químicos no proteicos, de bajo peso molecular, cuyo esqueleto básico es un anillo de furano unido a un núcleo cumarina (Figura 12). Este grupo está compuesto por cuatro tipos naturales (B1, B2, G1 y G2) y dos derivados monohidroxilados de la aflatoxina B1 y B2, llamadas M1 y M2, respectivamente. Estos derivados se caracterizan por ser excretados en la leche de los animales que han ingerido alimento contaminado con aflatoxinas (Sweeney y Dobson, 1999). Las aflatoxinas son unos de los carcinógenos más potentes producidos en la naturaleza y es frecuentemente encontrado en granos de maíz contaminados con *Aspergillus* (Castegnaro y McGregor, 1998). La AFB1 es la más frecuente y la más tóxica y los daños resultantes de su consumo en granos contaminados van desde daño agudo al hígado, incluyendo necrosis y hemorragia, hasta cáncer hepático (Wild y Hall, 2000; Wang et al., 2001; Ayeni, 2015). En animales también ocasionan disminución de la tasa de crecimiento y baja productividad (leche, huevos, etc.). Son también inmunosupresoras, teratogénicas y mutagénicas. La intoxicación crónica es la más frecuente y se debe al consumo prolongado de alimentos contaminados a bajas concentraciones. Cabe destacar que AFB1 y han sido clasificadas como carcinógenas grado 1 (agente cancerígeno genotóxico, que contribuye al riesgo de sufrir cáncer) por la IARC (IARC, 2012). Se estima que 5 miles de millones de personas a nivel mundial están expuestas al consumo de aflatoxinas a través del consumo de alimentos regularmente (Wu, 2015).

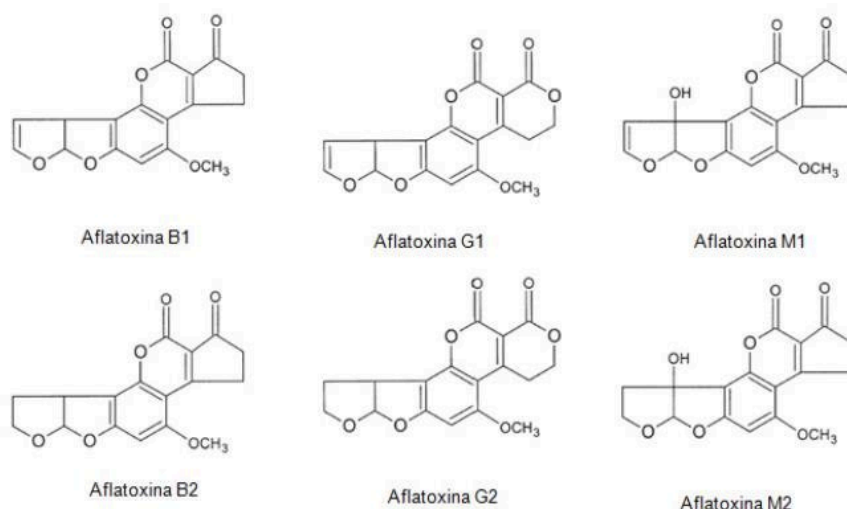


Figura 12. Estructura química de las aflatoxinas

El ácido ciclopiazónico (ACP) es un ácido indol-tetrámico que puede ser producido por especies de *Aspergillus* de la sección *Flavi* (*A. oryzae*, *A. tamarii* y *A. flavus*), así como por otras especies de *Aspergillus* y *Penicillium* (Dorner et al., 2002) (Figura 13). El ACP presenta toxicidad para varios animales como ser cerdos, pollos, ratas, perros y conejos (Norred, 1988). También se cree que es el responsable de los síntomas del “envenenamiento de Kodua” caracterizado por depresión e inmovilidad en humanos y ganado que consumieron mijo contaminado (*Paspalum scrobiculatum*) por *A. flavus* y *A. tamarii* en la India (Rao & Husain, 1985). La ocurrencia natural de ACP ha sido reportada en variedad de sustratos tales como maní, maíz, girasol y varios alimentos destinados al consumo animal (Le Bars, 1990, Ross et al., 1991; Urano, 1992; Balanchadran y Parthasarathy, 1996; González et al., 2013). También se constató la acumulación de esta micotoxina en carne y huevos de pollo y en leche de ovejas (Dorner et al., 1994). Los signos clínicos de intoxicación incluyen anorexia, diarrea, fiebre, deshidratación, pérdida de peso, inmovilidad y muerte. El análisis histológico en animales expuestos a ACP mostró diseminación de focos de necrosis en la mayoría de los tejidos del hígado, riñón, páncreas y miocardio (Dorner et al., 1983).

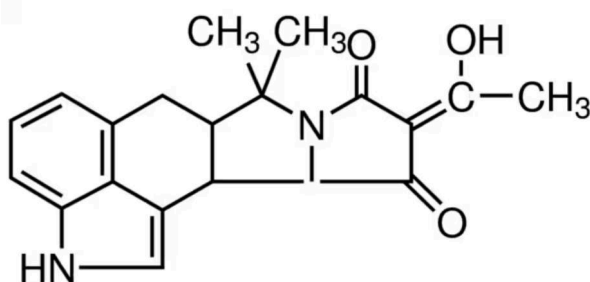


Figura 13. Estructura química del ácido ciclopiazónico.

Considerando el gran crecimiento que ha tenido el cultivo de maíz en nuestro país en los últimos años y sabiendo que las principales especies toxicogénicas asociadas a la contaminación de este cultivo son frecuentemente encontradas como contaminantes de diferentes granos en nuestro país, el objetivo principal de este trabajo es conocer y caracterizar las especies fúngicas toxicológicas asociadas al maíz. Además, de buscar implementar estrategias de manejo del cultivo que permitan disminuir el impacto de estas especies en el cultivo así como también estudiar el efecto de la interacción entre los distintos contaminantes fúngicos.

Este trabajo está estructurado en cuatro capítulos; el primero es sobre la descripción de las especies fúngicas toxicogénicas y micotoxinas asociadas a granos de maíz. El segundo capítulo trata sobre la caracterización de las especies fúngicas toxicogénicas asociadas al maíz. El tercero es el análisis *in vitro* del perfil de sensibilidad de las principales especies de *Fusarium* a antifúngicos de uso convencional. Finalmente, el cuarto capítulo busca estudiar el impacto de la co-existencia de especies fúngicas en el crecimiento y producción de micotoxinas en granos de maíz.

Bibliografía

- Alexopoulos, C., Mims, C., Blackwell, M., 1996. Introductory Mycology; 4th Ed. John Wiley and Sons, New York, USA.
- Alshehri, B., Palanisamy M., 2020. Evaluation of molecular identification of *Aspergillus* species causing fungal keratitis. Saudi Journal of Biological Sciences 27 751–756
- Al-Hatmi, A., Sandoval-Denis, M., Nabet, C., Ahmed, S., Demar, M., Normand, A., de Hoog, G., 2019. *Fusarium* volatile a new potential pathogen from a human respiratory sample. Fungal Systematics and Evolution 4: 171–181.
- Aoki, T., Ward, T., Kistler, H., O'Donnell, K., 2012. Systematics phylogeny and trichothecene Mycotoxin potential of *Fusarium* head blight cereal pathogens. Mycotoxins 62, 91-102.
- Aoki, T., O'Donnell, K., 2014. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. Journal of General Plant Pathology 80, 189-201. 44
- ASERCA, Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria. 2012. Boletín ASERCA Regional Peninsular 2012: La Industrialización del Maíz. 56/12. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Mérida, México. 32 p
- Ayeni, A., 2015. Extension education strategy for minimizing aflatoxin impact on sub-Saharan African agriculture and food systems. World Mycotoxin Journal, 8(2), 253-257.

- Battilani, P., Toscano, P., Van der Fels-Klerx, H., Moretti, A., Camardo Leggieri, M., Brera, C., Rortais, A., Goumperis, T., Robinson, T., 2016. Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Sci. Rep.* 6, 24328.
- Balajee, S., 2008. DNA sequence based methods for species identification in the genus *Aspergillus*. *Aspergillus* species in human keratomycosis. In: Varga J., Samson R.A., editors. *Aspergillus* in the Genomic Era. Wageningen Academic Publishers; The Netherlands: pp. 261–275.
- Barug, D., van Egmond, H., López-García, R., Van Osen-bruggen, W., Visconti, A., 2004. Meeting the mycotoxin menace. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.
- Bennett, J., Klich, M., 2003. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* 16: <https://doi.org/10.1128/cmr.16.3.497-516.2003>
- Burgess, L., Summerell, B., Bullock, S., Gott, K., Backhouse, D., 1994. Laboratory Manual for *Fusarium* Research, 3rd ed. University of Sydney and Botanic Garden, Sydney, Australia
- Bullerman, L., Draughon, F., 1994. *Fusarium moliniforme* and fumonisins symposium introduction. *J. Food Protection*, 57: 513.
- Carvajal-Campos, A., Manizan, L., Tadrist, S., Akaki, K., Koffi-Nevry, R., Moore, G., Fapohunda, O., Bailly, S., Montet, D., Oswald, I., Lorber, S., Brabet, C., Puel, O., 2017. *Aspergillus korhogoensis*, a novel aflatoxin producing species from the cote d'Ivoire. *Toxins* 9, 353.
- [CAST] Council for Agricultural Science and Technology. 2003. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems, Task force report No. 139/January 2003. Ames (IA): Council for Agricultural Science and Technology.
- Castañares, E., Dinolfo, M., Del Ponte, E., Pan, D., Stenglein, S., 2016. Species composition and genetic structure of *Fusarium graminearum* species complex populations affecting the main barley growing regions of South America. *Plant Pathol*, 65: 930-939.
<https://doi.org/10.1111/ppa.12470>
- Castegnaro, M., McGregor, D., 1998. Mycotoxines cancerogenes: evaluation du risque. *Revue de Medecine Veterinaire (France)*, 149(6).
- Covarelli, L., Stifano, S., Beccari, G., Raggi, L., Lattanzio, V., Albertini, E., 2012. Characterization of *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Italy: Fumonisin production, pathogenicity and genetic variability. *Food Microbiology*, 31 (1)
- Creppy, E., 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127: 19-28.

- de la Torre M., Sánchez, D., Galeana, E., Plasencia, J., 2014. Fumonisin, Síntesis y función de la interacción *Fusarium verticillioides*-Maíz. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 17(1):77-91, 2014
- Desjardins, A., 2006. *Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics, and biology. American Phytopathological Society (APS Press).
- Doebley, J., Iltis, H., 1980. Taxonomy of Zea (Gramineae) I. A subgeneric classification with key to taxa. Amer. J. Bot. 67: 982-993.
- Doebley, J., 1990. Molecular systematics of Zea (Graminae). Maydica 35: 143-150
- Dorner, J., Cole, R., Lomax, L., Gosser, H., Diener, U., 1983. Cyclopiazonic acid production by *Aspergillus flavus* and its effects on broiler chickens. Applied and environmental microbiology, 46(3), 698-703.
- Dorner, J., Cole, R., Erlington, D., Suksupath, S., McDowell, G., Bryden, W., 1994. Cyclopiazonic acid residues in milk and eggs. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42(7), 1516-1518.
- Dorner, J., 2002. Recent advances in analytical methodology for cyclopiazonic acid. Mycotoxins and food safety, 107-116.
- Dutton, M., 1996. Fumonisin, mycotoxins of increasing importance: their nature and their effects. Pharmacol Ther; 70: 137–161.
- Dean, R., van Kan, J., Pretorius, Z., Hammond-Kosack, K., Pietro, A., Spanu, P., Rudd, J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G., 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Mol. Plant Pathol. 13, 414–430.
- Edite Bezerra da Rocha, M., Freire, F., Erlan Feitosa Maia, F., Izabel Florindo Guedes, M., D. Rondina., 2014. Mycotoxins and their effects on human and animal health. Food Control, 36:159-165.
- ELIKA, Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria. 2021. Fumonisin. Página visitada 02/2023: <https://seguridadalimentaria.elika.eus/fichas-de-peligros/fumonisin/>
- ELIKA, Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria. Deoxynivalenol. Página visitada 12/2023: <https://seguridadalimentaria.elika.eus/fichas-de-peligros/deoxynivalenol>
- Fandohan, P., Hell, K., Marassas W., Wingfield, M., 2003. Infection of maize by *Fusarium* species and contamination with fumonisin in Africa. African Journal of Biotechnology; 2(12): 570-579
- Food and Agriculture Organization (FAO); 2021. Agricultural production statistics 2000–2021. FAOSTAT Analytical Brief 60

- Food and Agriculture Organization (FAO), 2004. Food and Nutrition Papers 81: Worldwide Regulations for Mycotoxins in Food and Feed in 2003. FAO, Rome.
- Frisvad, C., Hubka, V., Ezekiel, C.N., Hong, B., Novakova, A., Chen, A., Arzanlou, M., Larsen, T., Sklenar, F., Mahakarnchanakul, W., Samson, A., Houbraken, J., 2019. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. Stud. Mycol. 93, 1-63.
- Gimeno, A., Martins, M., 2011. Mycotoxins and Mycotoxicosis in Animals and Humans. 3rd Edition, Special Nutrients Inc., Miami, 128 p.
- Goswami, R., Kistler, H., 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. Mol. Plant Pathol. 5, 515-525. Molecular plant pathology. 5. 515-25.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2012. Pharmaceuticals. Volume 100 A. A review of human carcinogens. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 100(PT A), 1.
- Ji, F., He, D., Olaniran, A., Mokoena, M., Xu, J., Shi, J., 2019. Occurrence, toxicity, production and detection of *Fusarium* mycotoxin: a review. Food Prod Process and Nutr 1, 6
- Kazan, K., Gardiner, D., Manners, J., 2012. On the trail of a cereal killer: recent advances in *Fusarium graminearum* pathogenomics and host resistance. Mol. Plant Pathol. 13:399–413.
- Klich, M., 2002. Identification of Common *Aspergillus* Species. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
- Klich, M., 2007. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. Mol. Plant Pathol. 8:713–22
- Lana, F., Paul, P., Minyo, R., Thomison, P., Madden L., 2020. Stability of Hybrid Maize Reaction to Gibberella Ear Rot and Deoxynivalenol Contamination of Grain. Phytopathology 110:12
- Leslie, J., Summerell, B.; 2006. The *Fusarium* laboratory manual. 1st ed. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, London.
- Logrieco, A., Mulè, G., Moretti, A., Bottalico, A.; 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. European Journal of Plant Pathology, 108: 597-609.
- Logrieco, A., Bottalico, A., Mulé, G., Moretti, A., Perrone, G.; 2003. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. European Journal of Plant Pathology, 109: 645-667.
- Madania, A., Altawil, M., Naffaa, W., Volker, P., Hawat, M., 2013. Morphological and Molecular Characterization of *Fusarium* Isolated From Maize in Syria. J Phytopathol, 161: 452-458.

- Magan, N., Aldred, D.; 2004. The Role Of Spoilage Fungi In Seed Deterioration. Fungal biotechnology in agricultural, food and environmental application.
- Marin, S., Ramos, A., Cano-Sancho, G., Sanchis, V., 2013. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. Food Chem. Toxicol. 60, 218–237.
- McCormick, S., Stanley, A., Stover, N., Alexander, N., 2011. Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. Toxins, 3(7), 802-814.
- McMullen, M., Bergstrom, G., De Wolf, E., Dill-Macky, R., Hershman, D., Shaner, G., Van Sanford, D.; 2012. A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: *Fusarium* Head Blight. Plant Dis. 96:1712–1728.
- Meléndez-Martínez, A., Vicario, I., Heredia, F.; 2004. Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 54(2), 149-155.
- Mendoza, E., López, B., Oyervides, G., Martínez, Z., De León, C., Moreno, M., 2003. Herencia genética y citoplásmica de la resistencia a la pudrición de la mazorca de maíz (*Zea mays* L.) causada por *Fusarium moniliforme* Sheld. Revista Mexicana de Fitopatología 21: 267–271
- Methol, M. 2021. Maíz y sorgo. Anuario OPYPA 2021. último acceso 02/2023: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/anuario-opypa-2021/analisis-sectorial-cadenas-productivas/maiz-sorgo>
- MGAP. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca 2001. Resolución S/N/001 Límites máximos de DON en alimentos para animales. Pagina visitada por ultima vez en 04/2024: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/institucional/normativa/resolucion-sn001-limites-maximos-don-alimentos-para-animales>
- Munkvold, G., 2017. *Fusarium* species and their associated mycotoxins. In: Moretti A, Susca A (eds), Mycotoxigenic fungi: methods and protocols: 51–106. Humana Press, Totowa, NJ, USA.
- Munkvold, G., 2003. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. In: Xu, X., Bailey, J.A., Cooke, B.M. (eds) Epidemiology of Mycotoxin Producing Fungi. Springer, Dordrecht.
- Michailides, T., Thomidis, T., 2007. First report of *Aspergillus flavus* causing fruit rots of peaches in Greece. Plant Pathol. 56:352
- Nirenberg, H., O'Donnell, K., 1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia 90: 434–458.
- Nelson, P., Toussoun, T., Marasas, W., 1983. *Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, USA.
- O'Donnell, K., Ward, T., Geiser, D., Kistler, H., Aoki, T., 2004. Genealogical concordance between mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of

nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. Fungal Genetics and Biology, 41: 600-623.

- Oldenburg, E., Höppner, F., Ellner, F., and Weinert, J., 2017. *Fusarium* diseases of maize associated with mycotoxin contamination of agricultural products intended to be used for food and feed. Mycotoxin Res. 33 (3), 167–182
- Parry, D., Jenkinson, P., McLeod, L., 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals – a review. Plant Pathology 44: 207–238.
- Pitt, J., Hocking, A., 1997. Fungi and food spoilage. CSIRO Division of Food Science and Technology Sydney Academic Press., Australia.
- Proctor, R., Desjardins, A., McCormick, S., Plattner, R., Alexander, N., and Brown D., 2002. Genetic Analysis of the Role of Trichothecene and Fumonisin Mycotoxins in the Virulence of *Fusarium*. European Journal of Plant Pathology 108, 691–698.
- Ramos, A., Sanchis, V., Hukié, M., Jasié, M.,, 1997. Mycotoxins in food. A review. Citado por: Pan, D., 2000. Contaminantes fúngicos y micotoxinas en granos de trigo. Trabajo especial I de la Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias UdelaR, Montevideo, Uruguay.
- Rampersad, S., 2020. Pathogenomics and management of *Fusarium* diseases in plants. Pathogens. 1:340.
- RBN, 2012. Reglamento Bromatológico Nacional 5ª edición. Consultado On-line: <https://montevideo.gub.uy/sites/default/files/biblioteca/bromatologico5a.edicion.pdf>
- Ricciardi, C., Castagna, R., Ferrante, I., Frascella, F., Marasso, S., Ricci, A., Canavese, G., Lore, A., Prella, A., Gullino, M., Spadaro, D., 2013. Development of a microcantilever-based immunosensing method for mycotoxin detection. Biosensors & Bioelectronics, 40, 233–239.
- Sandoval-Denis, M., Guarnaccia, V., Polizzi, G., Crous, P., 2018a. Symptomatic Citrus trees reveal a new pathogenic lineage in *Fusarium* and two new *Neocosmospora* species. Persoonia 40: 1–25.
- Sandoval-Denis, M., Swart, W., Crous, P., 2018b. New *Fusarium* species from the Kruger National Park, South Africa. MycoKeys 34: 63–92.
- Sanchis, V., Magan, N., 2004. Environmental conditions affecting mycotoxins. In: Magan, N., Olsen, M. (Eds.), Mycotoxins in Food. Woodhead Publishing, Cambridge, England, pp. 174-189.
- Santin, E., 2008. crecimiento de los hongos toxicogénicos y producción de micotoxinas. En: El libro Azul de Micotoxinas (Ed. Diaz, D.). Nottingham University Press, Nottingham, UK. pp 239-250.

- Samson, R., Visagie, C., Houbraken, J., Hong, S., Hubka, V., Klaassen, C., Perrone, G., Seifert, K., Susca, A., Tanney, J., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Yaguchi, Y., Frisvad, J., 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol* 78, 141–178
- Sarver, B., Ward, T., Gale, L., Broz, K., Kistler, H., Aoki, T., Nicholson, P., Carter, J., O'Donnell, K., 2011. Novel *Fusarium* head blight pathogens from Nepal and Louisiana revealed by multilocus genealogical concordance. *Fungal Genetics and Biology* 48, 1096-1107.
- Schmale III, D., Munkvold, G., 2009. *Mycotoxins in Crops: A Threat to Human and Domestic Animal Health*. The American Phytopathological Society
- Schothorst, R., van Egmond, H., 2004. Report from SCOOP task 3.2.10 collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states'. Subtask: trichothecenes. *Toxicol Lett.* 153:133–143
- Seifert, K., Lévesque, C., 2004. Phylogeny and Molecular Diagnosis of Mycotoxigenic Fungi. *European Journal of Plant Pathology*. 110. 449-471.
- Singh, P., Orbach, M., Cotty, P., 2018. *Aspergillus texensis*: a novel aflatoxin producer with S morphology from the United States. *Toxins* 10, 22-33.
- Starkey, D., Ward, T., Aoki, T., Gale, L., Kistler, H., Geiser, D., Suga, H., Tóth, B., Varga, J., O'Donnell, K., 2007. Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity. *Fungal Genetics and Biology*, 44: 1191-1204.
- Summerell, B., 2019. Resolving *Fusarium*: Current status of the genus. *Annu. Rev. Phytopathol.* 57:323–339.
- Sweeney, M., Dobson, A., 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int. J. Food Microbiol.* 43: 141-158.
- Sweeney, M., Dobson, A., 1999. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 175: 149-163.
- Varga, J., Frisvad, J., Samson, R., 2011. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Studies in Mycology* 69: 57-80.
- Voss, K., Riley, R., 2013. Fumonisin Toxicity and Mechanism of Action: Overview and Current Perspectives. *Food Safety*; Vol. 1, No. 1, 2013006
- Wang, E., Norred, W., Bacon, C., Riley, R., Merrill, A., 1991. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *J Biol Chem.*; 266: 14486–14490
- Wang, J., Huang, T., Su, J., Liang, F., Wei, Z., Liang, Y., Groopman, J., 2001. Hepatocellular carcinoma and aflatoxin exposure in Zhuqing village, Fusui county, People's Republic of China. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 10(2), 143-146.

- Wicklow, D., Donahue, J., 1984. Sporogenic germination of sclerotia in *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*. Trans. Br. Mycol. Soc. 82: 621-624.
- Wicklow, D., 1990. Adaptation in *Aspergillus flavus*. Trans. Mycol. Soc. Japan 31: 511-523.
- WHO. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, vol. 56. Lyon: IARC; 1993. p. 445–466.
- Wild, C., Hall, A., 2000. Primary prevention of hepatocellular carcinoma in developing countries. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 462(2-3), 381-393.
- Wu, Q, Dohnal V, Kuca K, Yuan Z. Trichothecenes: structure-toxic activity relationships. Curr Drug Metab. 2013 Jul;14(6):641-60
- Wu, F., 2015. Global impacts of aflatoxin in maize: trade and human health. World Mycotoxin Journal, 8(2), 137-142.
- Xu, X., 2003. Effects of environmental conditions on the development of *Fusarium* ear blight. European Journal of Plant Pathology 109: 683–689.
- Yilmaz, N., Sandoval-Denis, M., Lombard, L., Visagie, C., Wingfield, B., Crous, P., 2021. Redefining species limits in the *Fusarium fujikuroi* species complex. Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi, 46(1), 129-162.
- Yu, J., Cleveland, T., Nierman, W., Bennett, J., 2005. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. Rev. Iberoam. Mycol. 22:192–202

Capítulo 1.

Especies fúngicas toxicogénicas y micotoxinas asociadas a granos de maíz.

Introducción

Los hongos son frecuentemente encontrados como contaminantes de los diferentes cultivos, siendo algunos de ellos capaces de producir metabólicos tóxicos (micotoxinas). Es frecuente la detección de altos niveles de micotoxinas en cereales, lo cual configura un riesgo elevado considerando que estos forman parte de la alimentación humana y animal. En particular, los granos de maíz están expuestos a la colonización por una gran variedad de especies toxicogénicas (Widstrom, 1996; Abdullah et al., 1998; Marin et al., 1998; Cardwell et al., 2000; Chulze, 2010), siendo las más frecuentes *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* y *Aspergillus flavus* (Picco et al., 1999; Cardwell et al., 2000; Orsi et al., 2000; Getachew et al., 2017; Shabana et al., 2022). Las especies del género *Fusarium* constituyen un grupo cosmopolita de hongos filamentosos ampliamente distribuidos en el suelo y capaces de colonizar las partes aéreas y subterráneas de las plantas, así como residuos vegetales y otros sustratos orgánicos. En el cultivo de maíz la pudrición de la mazorca (*Gibberella* y *Fusarium* ear rot) es la enfermedad de mayor importancia productiva. Esta enfermedad es causada por especies del género *Fusarium*, principalmente *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. graminearum* (Oldenburg et al., 2017). Por otra lado, *Aspergillus flavus* es encontrado como saprófito en suelos alrededor del mundo y es capaz de causar enfermedades en múltiples cultivos, entre ellos maní, algodón y maíz en el que también causa pudrición de la mazorca. La contaminación por este patógeno puede observarse tanto en el campo, previo a la cosecha como durante el almacenamiento (Yu et al., 2005; Klich, 2007; Michailides y Thomidis, 2007). Si bien el desarrollo de hongos de esta especie siempre estuvo asociada a las condiciones encontradas durante la etapa de almacenamiento con condiciones de temperatura elevadas (>30°C) con mínimos niveles de actividad hídrica (0.75), el cambio climático ha hecho que, en regiones no tropicales como las de nuestro país o la de países europeos, sea cada vez más frecuente encontrarlo como contaminante durante la pre-cosecha, aumentando el riesgo de contaminación con aflatoxinas (Assunção et al., 2018; Pleadin et al., 2023).

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de bajo peso molecular producidos, principalmente, al final de la fase exponencial o al inicio de la fase estacionaria de crecimiento del hongo (Bullerman y Draughon, 1994). La presencia de micotoxinas como contaminantes de cultivos tienen un

importante impacto económico en la industria agropecuaria y son un riesgo para la salud humana y animal (Marasas et al., 1988; Gelderblom et al., 2002; Harrison et al., 1990; Tolleson et al., 1996). En base a las especies fúngicas encontradas como contaminantes se puede predecir las micotoxinas asociadas. La presencia de especies de *Fusarium* determinará la potencial presencia de fumonisinas, ZEA, DON y NIV como toxinas principales, mientras que la presencia de *A. flavus* traerá asociada la potencial presencia de aflatoxinas, condicionado a la capacidad toxigénica de las cepas y a las condiciones ambientales que favorezcan su síntesis. La presencia de micotoxinas en alimentos y raciones ha llevado a que muchos países regulen los niveles máximos de inclusión para proteger la salud humana y animal (FAO 2004). En nuestro país existen niveles máximos permitidos para algunas micotoxinas, principalmente en alimentos para consumo humano (RBN, 2012). A nivel nacional, DON es la única micotoxina para la que hay establecidos límites máximos para el consumo animal (MGAP, 2001).

Objetivo

El objetivo de este trabajo es identificar las principales especies fúngicas toxicogénicas y micotoxinas asociadas a granos de maíz proveniente de distintas regiones de nuestro país y determinar los niveles de micotoxinas presentes en las muestras analizadas.

La hipótesis en relación a este objetivo es.

- El maíz cultivado en Uruguay está expuesto a contaminantes fúngicos tóxicos, prevaleciendo las especies *Fusarium* spp. al momento de la cosecha. La prevalencia y concentración de micotoxinas estará influenciada por las especies encontradas, las condiciones ambientales y prácticas agrícolas.

Materiales y métodos

MUESTREO

Se realizó un relevamiento a nivel nacional de las especies fúngicas toxicogénicas presentes en granos de maíz. Para ello se utilizaron muestras provenientes de distintos puntos de acopios del país durante dos zafas consecutivas, 2018 y 2019. Un total de 152 muestras de granos de maíz fueron seleccionadas, 94 muestras correspondientes al 2018 y 58 al 2019, provenientes de los departamentos de Colonia (n=71), Soriano (n=47), Río Negro (n=21), Paysandú (n= 4), Durazno (n=3), San José (n=2), Rocha (n=2), Florida (n=1) y Flores (n=1). Los acopios de los que se obtuvieron las

muestras fueron seleccionados según un muestreo aleatorio simple semanal de la lista de acopios nacionales registrados en el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) que declaran almacenar maíz. En los sitios de acopio se tomó una muestra de 2 kg según la norma ISO 24333 que fue transportada al laboratorio para posterior análisis.

IDENTIFICACIÓN FÚNGICA

Identificación morfológica.

De cada muestra se tomaron 100 granos y se esterilizaron superficialmente con NaOCl al 0.4% durante 1 minuto, se enjuagaron 2 veces con agua destilada estéril y se secaron con papel de filtro estéril (Samson et al., 1992). Los granos se sembraron en cajas de Petri conteniendo medio papa dextrosa agar (PDA: papa blanca 25%, dextrosa 2% y agar 2%). Se incubaron a 25°C durante 5-7 días bajo periodos de 12 hs de luz blanca, 12hs de luz negra. Las colonias emergentes fueron contadas y transferidas a medios de cultivo específicos y posteriormente se identificaron en base a las características macro y micro morfológicas según claves específicas para cada grupo de hongos (Leslie y Summerell, 2006; Klich, 2002). La identificación morfológica fue confirmada mediante el empleo de métodos moleculares basados en la amplificación y secuenciación de genes específicos y mediante el análisis de fragmentos de restricción para las colonias identificadas morfológicamente como *F. graminearum*. Para esto, se partió de colonias monospóricas de cada aislamiento que fueron procesadas para posterior extracción de ADN.

Los cultivos monospóricos se realizaron a partir de una suspensión de esporas del cultivo en un tubo con agua destilada estéril. Se plaqueo la suspensión en placa de Petri conteniendo agar-agua 2%, se dejó reposar un minuto para que se adhieran los conidios al medio y se descartó el exceso de líquido. Las placas se incubaron a 24±2 °C durante 24 hs en oscuridad en plano inclinado.

Posteriormente, bajo microscopio estereoscópico en estrictas condiciones de esterilidad se seleccionó un conidio germinado, se transfirió a una placa de Petri conteniendo PDA y se incubó a 24±2 °C. El micelio a partir de las esporas germinadas fue guardado en crioviales con agua destilada estéril a temperatura ambiente y en crioviales con glicerol (10%) a -80 °C en la colección del laboratorio de Micología.

Identificación molecular.

Fusarium spp.

Se realizó la extracción de ADN genómico a partir de los cultivos monospóricos mediante el método de bromuro de cetiltrimetilamonio (2% CTAB) (Leslie y Summerell, 2006).

La identificación de *Fusarium graminearum sensu stricto* (*F. graminearum s. s.*), se realizó mediante la metodología descrita por Garmendia et al. (2018). Para ello se utilizó el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación del gen correspondiente al factor de elongación-1 α (TEF-1 α) y posteriormente se realizó la técnica de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) utilizando la enzima *Bsa*HI. La amplificación del gen TEF -1 α se realizó en un volumen final de 25 μ L de reacción conteniendo, 1X Buffer (Nzytech, Portugal), 0.5 μ L de cada (1 mM) cebador, 2 μ L de dNTPs (2,5 mM) (Nzytech, Portugal), 0.5 U de Taq polimerasa (Nzytech, Portugal) y 1 μ L (50 ng) de ADN genómico. Se utilizaron los cebadores EF1 (5'-ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC-3') y EF2 (5'-GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT-3') (O'Donnell et al., 1998), sintetizados por Macrogen Inc. (Seoul, Korea). Todas las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador automático GeneAmp PCR system 9700 (Perkin-Elmer, USA). Las condiciones para la PCR fueron: un paso inicial de desnaturalización de 95° por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización de 94° por 1 minuto, un paso de hibridación a 55°C por 30 segundos y un paso de extensión de 72°C por 1.5 minutos. El último ciclo fue seguido de un paso de extensión a 72°C por 10 minutos. Para el análisis de restricción se tomó un volumen de 10 μ L de los productos de amplificados y se les adiciono 1 μ L de enzima *Bsa*HI y se incubó en baño seco a 65°C durante 1 hr. Posteriormente, se realizó el análisis electroforético de los productos de restricción en gel de agarosa al 1.5% conteniendo colorante GreenSafe Premium (Nzytech, Portugal) (3 mL/100 mL) y las bandas resultantes fueron visualizadas bajo luz UV. Los tamaños de los fragmentos fueron estimados en comparación con un marcador de peso molecular (GeneRuler™ 1Kb Plus DNA ladder, Fermentas International Inc., Canadá). Se identificaron los aislamientos de *Fusarium graminearum s. s.* por la presencia de dos fragmentos de 367 y 291 pb cada uno.

Los aislamientos de *F. verticillioides* se identificaron mediante PCR utilizando primers específicos para esta especie, VER-1 y VER -2 (5'-CTTCCTGCGATGTTTCTCC-3' y 5' -AATTGGCCATTGGTATTATATATCTA-3', respectivamente) (Mulè et al., 2004). Para la reacción de amplificación se utilizaron 25 ng de ADN fúngico, 1X de Buffer, 0.75 μ L de MgCl (50 mM), 1 μ L de cada cebador (10mM), 2.5 μ L de dNTP (2,5 mM) (Nzytech, Portugal) y 0.25 μ L de Taq polimerasa (Nzytech, Portugal). El ADN fue inicialmente desnaturalizado a 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificación donde cada uno consistía de un primer paso de desnaturalización de 50 segundos a 95°C, un paso de hibridación de 50 segundos a 56°C y de extensión de 1 minuto a 72°C. El último ciclo fue seguido de un paso final de extensión a 72 °C por 10 minutos. Posteriormente los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% para confirmar la identidad de los aislamientos. Los aislamientos de *Fusarium verticillioides* fueron identificados por la presencia de un fragmento de 578 pb.

Para el resto de los aislados pertenecientes al género *Fusarium* se realizó la amplificación del TEF-1 α para su posterior secuenciación e identificación (Geiser et al., 2004).

Aspergillus spp.

Para la identificación de aislamientos pertenecientes al género *Aspergillus*, se realizó la extracción de ADN a partir de cultivos monospóricos, según la metodología de Specht et al. (1982). Se amplificó el gen de la calmodulina en un ciclo de PCR con los siguientes pares de cebadores; CMD5 5'-CCGAGTACAAGGAGGCCTTC- 3' y CF4 5'- TTTYTGATCATRAGYTGGAC -3'. Para la reacción de amplificación se utilizaron 25 ng de ADN fúngico, 5 μ L de Buffer 10x (Nzytech, Portugal), 5 μ L de MgCl (25 mM), 2 μ L de cada cebador (10mM), 5 μ L de dNTP (2,5 mM) (Nzytech, Portugal) y 0,5 μ L de Taq polimerasa (Nzytech, Portugal) en un volumen final de 50 μ L. El ADN fue inicialmente desnaturalizado a 94 °C por 5 minutos, seguido de 34 ciclos de amplificación donde cada uno consistía de un primer paso de desnaturalización de 50 segundos a 94 °C, un paso de hibridación de 50 segundos a 58°C y de extensión de 1 minuto a 72 °C. El último ciclo fue seguido de un paso final de extensión a 72 °C por 7 minutos.

Los productos de amplificación obtenidos para todas las especies estudiadas, se visualizaron bajo luz UV luego de una electroforesis en gel de agarosa (1,5%), conteniendo el colorante GoodView TM. El tamaño de los amplicones se estimó por comparación con un marcador de peso molecular (GeneRulerTM 1Kb Plus DNA ladder, Fermentas International Inc., Canadá). Los productos de PCR obtenidos fueron luego enviados a secuenciar a MACROGEN Inc. (Seúl, Korea). Las secuencias consenso fueron obtenidas mediante el programa Seqman (Lasergene, Madison, WI) y comparadas con las secuencias almacenadas en la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) mediante la herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) y en el Instituto Westerdijk de Biodiversidad Fúngica (CBS-KNAW) (<http://www.cbs.knaw.nl>).

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MICOTOXINAS EN MUESTRAS DE MAÍZ

Se realizó la detección y cuantificación de las micotoxinas DON, ZEA, NIV, FB1 y FB2 y aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2), mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El análisis de las muestras se realizó en el Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) en base a las metodologías descritas en la AOAC (970.45; 995.15; 991.31; 994.08; 986.17 cap.49). Los límites de la cuantificación informables (LOQs) fueron: 80 μ g/kg (FBs); 30 μ g/kg (ZEA); 88 μ g/kg (DON) y 50 μ g/kg (NIV). Se analizaron un total de 119 muestras de maíz, 61 correspondientes al 2018 y 58 del 2019.

Resultados

ESPECIES ASOCIADAS AL MAÍZ

En base a las muestras analizadas durante las zafras 2018 y 2019, (2018 n=94, 2019 n=58), las especies de *Fusarium* fueron las principales contaminantes asociadas a granos de maíz (45%), con una incidencia, definida como colonias emergentes por grano, sobre un total de 100 granos analizados, que varió desde 7 a 100%. En segundo lugar se encontraron los hongos pertenecientes al género *Aspergillus* (15%), cuya incidencia en las muestras estuvo comprendida entre 0 y 95%.

En relación a los hongos pertenecientes al género *Fusarium*, en total, se lograron aislar 507 *Fusarium* de las muestras. En base a la identificación morfológica, 337 (66%) aislamientos pertenecían a la especie *F. verticillioides*, 97 (19%) al complejo *Fusarium graminearum* (FGSC), 45 (9%) a *F. subglutinans* y 28 (6%) a *F. proliferatum*. *Fusarium verticillioides* fue la especie mayormente aislada, con una incidencia promedio en las muestras de 44% y 30% en 2018 y 2019, respectivamente. En segundo lugar se encontró la presencia de especies pertenecientes al complejo FGSC con 3% de promedio de incidencia en ambos años de estudio. La presencia de aislamientos pertenecientes a las especies *F. proliferatum* y *F. subglutinans* fue a bajos niveles de incidencia en ambos años, promediando 1,5 y 0,2% en 2018 y 2019, respectivamente para *F. proliferatum* y 1,2 y 0,3% en 2018 y 2019, respectivamente para *F. subglutinans* (Figura 1-1).

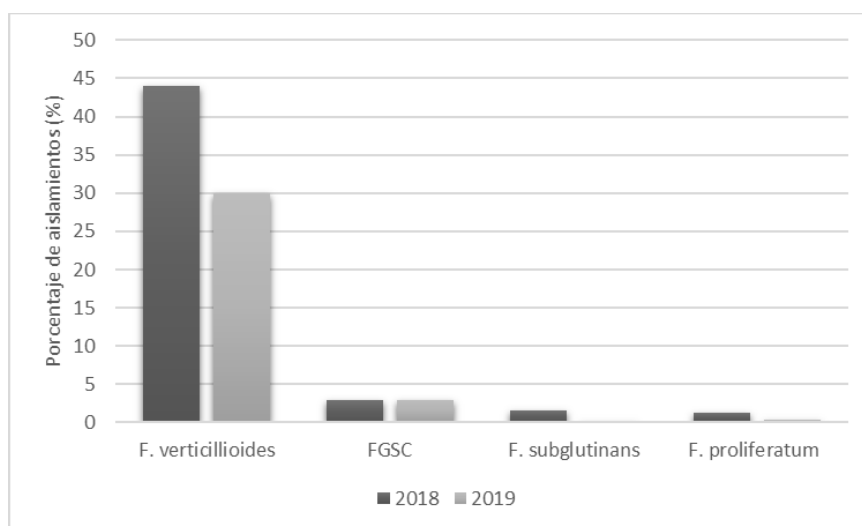


Figura 1-1. Distribución de especies pertenecientes al género *Fusarium* en muestras de maíz durante las dos zafras de estudio

Del total de aislamientos obtenidos del género *Fusarium*, se seleccionaron un total de 236 aislamientos para la identificación mediante el empleo de técnicas moleculares. Los aislamientos se seleccionaron al azar dentro de los obtenidos para cada complejo de especies de acuerdo a las

características morfológicas. De esta manera se lograron identificar 115 (49%) aislamientos como *F. verticillioides*, 89 (38%) como *F. graminearum* s. s., 14 (6%) aislamientos como *F. subglutinans*, 10 (4%) como *F. proliferatum*, 6 (2%) aislamientos como *F. meridionale*, y finalmente un aislamiento como *F. pseudograminearum* y 1 como *F. armeniacum*.

En relación al género *Aspergillus*, se obtuvieron un total de 177 aislamientos a partir de las muestras analizadas en ambos años, de los cuales, en base a las características macro y micro morfológicas, el 68% (n=121) perteneció a la sección *Flavi*, mientras que el 32% (n=56) a la sección *Nigri*. Dentro de este género, los hongos pertenecientes a la sección *Flavi* fueron los más frecuentes en las muestras analizadas en ambos años, con una incidencia promedio de 9% y 3,4%, respectivamente, en función del total de aislamientos para cada año de estudio. La incidencia promedio de la sección *Nigri* fue de 2 y 0,3% para 2018 y 2019, respectivamente. Para el estudio de los hongos pertenecientes a la sección *Flavi*, se seleccionaron 46 aislamientos (38%) para su identificación por métodos moleculares, todos ellos pertenecen a la especie *A. flavus*.

MICOTOXINAS EN MUESTRAS DE MAÍZ

Se realizó la determinación de micotoxinas a un total de 119 muestras, 61 muestras correspondientes a 2018 y a 58 muestras del 2019. En cuanto a la presencia de micotoxinas de *Fusarium*, se pudo determinar la presencia de DON, ZEA, NIV, FB1 y FB2. La micotoxina mayormente encontrada como contaminante de las muestras fue la FB1, alcanzando niveles de contaminación del 96.7% de las muestras analizadas en 2018 y 86.2 % de las muestras del 2019. Asimismo, fue la toxina que presentó mayores niveles de concentración en ambos años de estudio, promediando niveles de 4.071 µg/kg, con máximos de 59.004 µg/kg en 2018 y 1.252 µg/kg con valores máximos de 9.881 µg/kg en 2019 (Tabla 1-1). Para FB2 la concentración promedio fue de 1.529 µg/kg, con máximos de 14.908 µg/kg en 2018, mientras que en 2019 el valor promedio en las muestras fue de 427 µg/kg con 4.138 µg/kg de valor máximo (Tabla 1-1). La mayoría de las muestras analizadas presentaron niveles de contaminación con fumonisinas menores a 2.000 µg/kg, con un 31% de muestras analizadas que superan concentraciones de 2.000 µg/kg, siendo estas últimas más frecuentes en 2018 donde se correspondieron con el 48% de las muestras positivas, mientras que del total de muestras positivas de 2019, el 17% superó esa concentración (Figura 1-2).

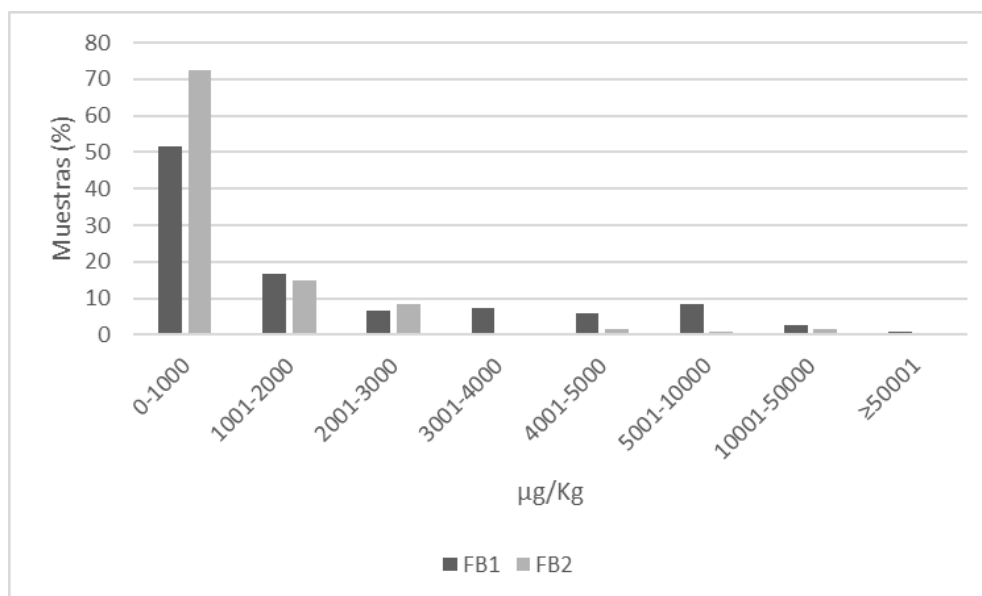


Figura 1-2. Distribución de las muestras de maíz (%) según los niveles de contaminación con FB1 y FB2 (µg/kg)

Por otro lado, NIV fue la toxina con menor número de muestras positivas, encontrándose un total de cuatro entre ambos años de estudio, con niveles de 66 µg/kg y 151 µg/kg en 2018 y 2019, respectivamente (Tabla 1-1). La concentración promedio de DON y ZEA en las muestras analizadas variaron de forma significativa entre ambos años de estudio. Para DON los valores de contaminación promediaron 278 µg/kg en 2018 y 118 µg/kg en 2019 (Tabla 1-1). Para ZEA, el valor promedio de las muestras de 2018 fue de 302 µg/kg en comparación con las correspondientes a 2019 cuyos valores promedio fueron de 18 µg/kg (Tabla 1-1).

Tabla 1-1. Niveles de micotoxinas promedio presentes en muestras de maíz de la cosecha 2018 (n=61) y 2019 (n=58)

Toxinas	Contaminación total (µg/Kg) ± SD		Porcentaje de muestras contaminadas (%)		Contaminación promedio en las muestras positivas (µg/Kg)			
					Muestras positivas (µg/Kg) ± SD	Rango de positivas	Muestras positivas (µg/Kg) ± SD	Rango de positivas
	2018	2019	2018	2019	2018		2019	
FB1	4071±9893	1252±2002	96.7	86.2	4860±10023	80 - 59004	1453±2089	80 - 9881
FB2	1529±2774	427±756	90.2	60.4	1695±2874	80 - 14908	708±868	80 - 4138
DON	278±456	118±233	52.5	46.5	530±513	59 - 2471	253±289	59 - 922
ZEA	302±732	18±45	64.0	17.2	472±874	30 - 2522	103±58	30 - 200
NIV	3±15	3±20	5.0	1.7	66±16	50 - 84	151	-
AFB1	7±12	-	37.0	-	18,5±14	1.1 - 31.1	-	-
AFG1	0.4±2	-	7.0	-	5±6	1.2 - 12	-	-

A 43 muestras de maíz de la cosecha 2018 se les realizó además la determinación de micotoxinas de *Aspergillus*; AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2. La concentración promedio de AFB1 en las muestras positivas (37%) fue de 18,5 µg/kg, variando entre 1,1 y 31,1 µg/kg, y para AFG1 la concentración promedio en las muestras positivas (7%) fue de 5 µg/kg, variando entre 1,2 y 12 µg/kg. No se detectó la presencia

de AFB2 y AFG2. Si consideramos los niveles de aflatoxinas totales (B1+B2+G1+G2), el valor promedio en las muestras positivas fue de 19,6 µg/kg variando entre 1,1 y 32,3 µg/kg.

Discusión

En relación a las especies fúngicas asociadas a granos de maíz, *F. verticillioides* fue la especie predominante, seguido de *F. graminearum* s. s., otro importante contaminante asociado a este cultivo. Trabajos realizados en el sur de Brasil y Argentina, donde las condiciones climáticas y las características del suelo son similares a las de nuestro país, también demostraron la presencia de *F. verticillioides* como la especie prevalente de *Fusarium* asociada a granos de maíz (van der Westhuizen et al., 2003; Stumpf et al., 2013; Castañares et al., 2019). Por otro lado, se determinó la presencia de otras dos especies pertenecientes al complejo FFSC *F. subglutinans* y *F. proliferatum*. Ambas especies habitualmente coexisten con *F. verticillioides* a nivel mundial en las cosechas de maíz, dificultando el desarrollo de variedades híbridas resistentes (Fallahi et al., 2019). Hasta el momento, pocos trabajos relacionados al estudio del complejo FFSC asociado a granos de maíz han sido llevados a cabo en nuestro país, por lo que es importante avanzar en estudios en relación a este complejo para, a futuro, poder desarrollar estrategias adecuadas para el control de la pudrición de la mazorca del maíz y la presencia de micotoxinas en maíz.

En relación al complejo FGSC, varios autores plantean una adaptación de *F. meridionale* al agroecosistema del maíz, ya que es la especie perteneciente al complejo FGSC que prevalece en maíz en Brasil y Argentina (Alvarez et al., 2009; Del Ponte et al., 2015; Kuhnem et al., 2016; Sampietro et al., 2011). Sin embargo, en este trabajo encontramos que en Uruguay la principal especie perteneciente al complejo FGSC en maíz es *F. graminearum* s. s.. Es posible que la presencia de grandes extensiones con cultivos como trigo y cebada, que usualmente están colonizados por *F. graminearum* s. s. (Garmendia et al., 2018b; Pan et al., 2015; Umpierrez et al., 2013), sean un factor de importancia en la distribución de especies. Estos cultivos coexisten en rotación con maíz, en las mismas áreas cultivadas en nuestro país. La diferencia en los niveles de contaminación por las distintas especies de *Fusarium* podría obedecer principalmente a la gran adaptación de *F. verticillioides* a la colonización del maíz, persistiendo como endófito en raíces y hojas (Blacutt et al. 2018) y al hecho de que esta especie se ve favorecida por las altas temperaturas y actividades hídricas medias, características climáticas frecuentes en los veranos de nuestro país.

Si bien existe una fuerte asociación de la contaminación de los cultivos con *Aspergillus* durante la postcosecha debido a un almacenamiento inadecuado y a condiciones de temperatura y humedad

elevadas asociadas al almacenamiento, la contaminación con estos hongos puede ocurrir previo a la cosecha y en consecuencia, asociar contaminación con aflatoxinas. Además de la presencia del inóculo, deben darse condiciones ambientales favorables para el desarrollo y producción de toxinas. *Aspergillus flavus* presenta un crecimiento óptimo entre 30 –35°C (Abdel-Hadi et al., 2012), y actividades hídricas de 0.99 - 0.98. A pesar de que el maíz es un cultivo de verano, las temperaturas durante el verano en nuestro país no alcanzan a ser muy elevadas, generalmente varían entre 15 - 29°C, siendo el promedio de temperaturas para los meses de verano en ambos años de estudio cercano a los 23°C. Por otro lado, los niveles de precipitación acumulados en el periodo de diciembre a marzo, en la región cerealera fueron aproximadamente de 130 mm en ambos años, sin embargo, el porcentaje de agua disponible en el suelo de esta región fue muy bajo en 2018 con niveles entre 0 y 11% en comparación con 2019 donde este fue de 60 -70% (Basado en registros de INIA -GRAS). Es así que la baja prevalencia de esta especie en los cultivos puede ser explicada en parte debido a las condiciones ambientales con baja disponibilidad de agua y bajas temperaturas. Sin embargo, la detección de esta especie desde etapas tempranas en los granos, son un riesgo potencial para el deterioro del grano y la contaminación con aflatoxinas en un almacenamiento posterior, ya que si éste se realiza en condiciones de elevada humedad y temperatura, se favorece su desarrollo.

Como se mencionó, *F. verticillioidea* fue la principal especie aislada de maíz, especie que se caracteriza por ser una de las principales productoras de fumonisinas, junto con *F. proliferatum* y *F. sambucinum*. La alta prevalencia de esta especie indica que el maíz puede estar expuesto a la contaminación por fumonisinas, lo que configura un riesgo para la salud tanto humana como animal. Tal es así, que las fumonisinas fueron las toxinas con mayor distribución en el total de muestras analizadas, evidenciándose un 98% de muestras positivas en 2018 y 86% en 2019, siendo la FB1 además la que presentó niveles mayores en el total de muestras analizadas en ambos años (4.860 µg/kg en 2018 y 1.453 µg/kg en 2019). Considerándose que en Uruguay el principal destino del maíz es la alimentación del ganado bovino y porcino, 24% (n=15) de las muestras de 2018 y 10% (n=6) de las de 2019 superaron los niveles recomendados por el CODEX (2019) para alimentos y raciones (4.000 µg/kg FB1+FB2), mientras que una única muestra excede los niveles recomendados por la Comunidad Europea para granos de maíz y subproductos para alimentación animal (60000 µg/kg FB1+FB2).

A pesar de haberse encontrado una incidencia similar de *F. verticillioidea* en ambos años de estudio (44% y 30% en 2018 y 2019, respectivamente), la detección de mayores niveles de fumonisinas en 2018 en comparación al 2019 podría estar vinculada a la presencia no solo de esta especie, sino también otras especies capaces de producir esta toxina como *F. proliferatum* y *F. subglutinans*.

Asimismo, otro factor incidente podría ser la baja disponibilidad de agua en el suelo en 2018 en comparación con 2019 considerando que bajos niveles de actividad hídrica (0.93 - 0.95 aw) y temperaturas no tan elevadas (25 - 30°C) han demostrado ser las condiciones óptimas para la síntesis de FB1 (Marín et al., 2004, Fumero et al., 2016).

Los niveles de DON y ZEA encontrados en el presente estudio fueron similares en comparación con los reportes de maíz de la región (Castañares et al., 2019; Mendes de Souza et al. 2013). Sólo 6% (n=7) de las muestras superan los niveles recomendados para DON en la reglamentación de Uruguay para porcinos y equinos (1.000 µg/kg). Ninguna muestra supera los niveles máximos recomendados para materias primas destinadas a la producción de alimentos para animales (10.000 µg/kg) (resolución MGAP S/N/001, 2001; FDA, 2010). Considerando los niveles de ZEA, el 11% (n=13) de las muestras excedieron los niveles recomendados en Uruguay de 250 µg/kg, pudiendo esto explicarse por la baja incidencia de FGSC (3%) en ambos años estudiados.

En suma, este estudio permite evidenciar que las especies de *Fusarium* son las principales contaminantes del maíz. Siendo *F. verticillioides* la especie toxicogénica prevalente y en consecuencia las fumonisinas las principales toxinas asociadas a este cultivo. Considerando los elevados niveles de contaminación con estas toxinas es necesario su monitoreo continuo para evitar impactos en la salud humana y animal asociados al consumo de este cultivo. Asimismo, importante ahondar en el desarrollo de estrategias que permitan minimizar la colonización del maíz por especies toxicogénicas evitando así su contaminación con micotoxinas.

Bibliografía

- Abdullah, N., Nawawi, A., Othman, I., 1998. Survey of fungal counts and natural occurrence of aflatoxins in Malaysian starch-based foods. *Mycopathologia*, 143(1):53-8.
- Assunção, R., Martins, C., Viegas, S., Viegas, C., Jakobsen, L., Pires, S., Alvito, P., 2018. Climate change and the health impact of aflatoxins exposure in Portugal – an overview. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 1–12.
- Bullerman, L., Draughon, F., 1994. *Fusarium moniliforme* and fumonisins symposium introduction. *J. Food Protection*, 57: 513.
- Castañares, E., Martínez, M., Cristos, D., Rojas, D., Lara, B., Stenglein, S., Dinolfo, M., 2019. *Fusarium* species and mycotoxin contamination in maize in Buenos Aires province, Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, (4) 1265-1275
- Chulze, S., 2010. Strategies to reduce mycotoxin levels in maize during storage: a review. *Food Add. Contam.* 27 (5), 651e657.

- Cardwell, K., King, J., Maziya-Dixon, B., Bosque-Perez, N., 2000. Interactions between *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus flavus*, and insect infestation in four maize genotypes in Lowland Africa. *Phytopathology* 90, 276–284
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) Rome 2004. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO FOOD AND NUTRITION PAPER 81
- Garmendia, G., Umpierrez-Failache, M., Ward, T., Vero, S., 2018. 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 microbiology*, 70, 28-32.
- Geiser, D. , del Mar Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T., Zhang, N.,Kuldau, G., O'donnell, K., 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European journal of plant pathology*, 110, 473-479.
- Gelderblom, W., Marasas, W., Lebepe-Mazur, S., Swanevelder, S., Vessey, C., De la M Hall, P., 2002. Interaction of fumonisin B1 and aflatoxin B1 in a short-term carcinogenesis model in rat liver. *Toxicology*, 171(2-3), 161-173.
- Getachew, A., Chala, A., Hofgaard, I., Brurberg, M., Sulyok, M., Tronsmo, A., 2017. Multimycotoxin and fungal analysis of maize grains from south and southwestern Ethiopia. *Food Additives & Contaminants: Part B* 11(1):64-74
- Harrison, L., Colvin, B., Greene, J., Newman, L., Cole Jr, J., 1990. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2(3), 217-221.
- Klich, M., 2002. Identification of Common *Aspergillus* Species. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
- Klich, M., 2007. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Mol. Plant Pathol.* 8:713–22
- Leslie, J., Summerell, B.; 2006. The *Fusarium* laboratory manual. 1st ed. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, London.
- Marasas, W., Kellerman, T., Gelderblom, W., Thiel, G., Van der Lugt, J., Coetzer, J., 1988. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*.
- Marin, S., Sanchis, V., Ramos, A. J., Vinas, I., Magan, N., 1998. Environmental factors, in vitro interactions, and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize grain. *Mycological Research*, 102(7), 831-837.

- MGAP. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca 2001. Resolución S/N/001 Límites máximos de DON en alimentos para animales. Pagina visitada por ultima vez en 04/2024: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/institucional/normativa/resolucion-sn001-limites-maximos-don-alimentos-para-animales>
- Michailides T, Thomidis T. 2007. First report of *Aspergillus flavus* causing fruit rots of peaches in Greece. Plant Pathol. 56:352
- Mulè, G., Susca, A., Stea, G., Moretti, A., 2004. A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. European Journal of Plant Pathology, 110, 495-502.
- Oldenburg, E., Höppner, F., Ellner, F., Weinert, J., 2017. *Fusarium* diseases of maize associated with mycotoxin contamination of agricultural products intended to be used for food and feed. Mycotoxin research, 33(3), 167-182.
- Orsi, R., Corrêa, B., Possi, C., Schammas, E., Nogueira, J., Dias, S., Malozzi, M., 2000. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. J Stored Products Res. 36:75–87.
- Picco, M., Nesci, A., Barros, G., Cavaglieri, L., Etcheverry, M., 1999. Aflatoxin B1 and fumonisin B1 in mixed cultures of *Aspergillus flavus* and *Fusarium proliferatum* on maize. Nat. Toxins 7, 331–336.
- Pleadin, J.; Kos, J.; Radić, B.; Vulić, A.; Kudumija, N.; Radović, R.; Janić Hajnal, E.; Mandić, A.; Anić, M. 2023. Aflatoxins in Maize from Serbia and Croatia: Implications of Climate Change. Foods, 12, 548.
- RBN, 2012. Reglamento Bromatológico Nacional 5ª edición. Consultado On-line: <https://montevideo.gub.uy/sites/default/files/biblioteca/bromatologico5a.edicion.pdf>
- Samson, R., Hocking, A., Pitt, J., King, A., 1992. Modern Methods in Food Mycology. Elsevier, Amsterdam.
- Shabana, Y., Ghoneem, K., Rashad, Y., Arafat, N., Fitt, B., Richard, B., Qi, A., 2022. Distribution and Biodiversity of Seed-Borne Pathogenic and Toxigenic Fungi of Maize in Egypt and Their Correlations with Weather Variables. Plants, 11, 2347.
- Specht, C., DiRusso, C., Novotny, C., Ullrich, R., 1982. A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi. Analytical biochemistry, 119(1), 158-163.
- Stumpf, R., Dos Santos, J., Gomes, L., Silva, C., Tessmann, D., Ferreira, F., Machinski, M., Del Ponte, E., 2013. *Fusarium* species and fumonisins associated with maize kernels produced in

Rio Grande do Sul State for the 2008/09 and 2009/10 growing seasons. Braz J Microbiol. May 31;44(1):89-95.

- Tolleson, W., Melchior, W., Morris, S., McGarrity, J., Domon, O., Muskhelishvili, L., James, J., Howard, P., 1996. Apoptotic and anti-proliferative effects of fumonisin B1 in human keratinocytes, fibroblasts, esophageal epithelial cells and hepatoma cells. Carcinogenesis, 17(2), 239-249.
- Van Der Westhuizen, L., Shephard, G., Scussel, V., Costa, L., Vismer, H., Rheeder, J., Marasas, W., 2003. Fumonisin contamination and *Fusarium* incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(18), 5574-5578.
- Yu, J., Cleveland, T., Nierman, W., Bennett, J., 2005. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. Rev. Iberoam. Mycol. 22:192–202
- Widstrom, N., 1996. The aflatoxin problem with corn grain. Adv. Agron.

Capítulo 2.

Caracterización de las especies fúngicas toxicogénicas asociadas al maíz

Introducción

La presencia de micotoxinas en los granos está estrechamente relacionada al crecimiento fúngico, por lo que si no hay desarrollo de hongos no habrá micotoxinas. Sin embargo, la existencia de hongos en un cultivo, no implica la producción de micotoxinas, ya sea porque no se dieron las condiciones adecuadas (principalmente disponibilidad de agua y temperatura) o por la ausencia de cepas toxigénicas (Santin, 2008). La producción de toxinas por parte de las cepas fúngicas es variable, habiéndose definido, para algunas especies, diferentes quimiotipos en base a su perfil toxigénico (Ward et al., 2002; Giorni et al., 2007), por lo que la identificación de las especies contaminantes de los diferentes sustratos permite predecir las potenciales toxinas contaminantes (Mulè et al., 1997; Tan y Niessen, 2003; Kristensen et al., 2005). Especies o cepas muy relacionadas filogenéticamente pueden tener perfiles de producción diferentes, como ocurre en *F. verticillioides*, donde se han descrito 2 linajes que difieren en la capacidad de producir o no fumonisinas (Mirete et al., 2004). Los aislamientos que forman parte del complejo *F. graminearum* se sabe que presentan cuatro perfiles específicos en relación a la producción de tricotecenos, denominados quimiotipos. Estos son: deoxinivalenol (DON), para cepas productoras de DON únicamente, DON/3-AcDON para cepas que productoras de DON y su acetilado 3- AcDON, DON/15-AcDON para las cepas que productoras de DON y el acetilado 15- AcDON, y nivalenol (NIV) para las cepas que únicamente producen NIV (Zhang et al., 2007; Alvarez et al., 2009; Scoz et al., 2009). Por otro lado se han observado cepas capaces de producir tanto DON como NIV y se les adjudica el quimiotipo DON/NIV, como también DON/3-15 AcDON a las que son capaces de producir los dos acetilados simultáneamente (Castañares et al., 2014). Asimismo, se ha observado la asociación de ciertos quimiotipos a la agresividad de los aislamientos y a la capacidad de síntesis de micotoxinas, estableciéndose que cepas productoras de DON/3-AcDON exhiben mayor agresividad que las productoras de DON/15-AcDON como también mayor producción de micotoxinas (Ward et al., 2008; Zhang et al., 2012). Los distintos quimiotipos se han encontrado asociados a regiones geográficas diferentes, habiéndose registrado el quimiotipo NIV predominantemente en Asia, Europa y África, mientras que en América del Norte y del Sur se ha encontrado que predomina el quimiotipo DON (Zhang et al., 2007; Ward et al., 2008; Scoz et al., 2009; Lee et al., 2010; Nielsen et al., 2011; Prodi et al., 2011; Sampietro et al., 2011; Aoki et al., 2012; Pan et al., 2013). La presencia de los quimiotipos de DON con distintos acetilados también se ha

observado en regiones geográficas particulares, predominando 3-AcDON en Asia y 15-AcDON en Sudamérica (Alvarez et al., 2009). Se han diseñado ensayos de PCR específicos dirigidos a genes que participan en la síntesis de tricotecenos para la determinación de genotipos que permitan predecir los quimiotipos (Desjardins, 2008). Sin embargo, estudios demuestran que no siempre existe una relación certera entre estos, por lo que la determinación de los quimiotipos sigue siendo de gran utilidad a la hora de predecir las potenciales micotoxinas contaminantes en los sustratos (Crippin et al., 2019).

La contaminación fúngica y la síntesis de micotoxinas, tanto en el campo como durante el almacenamiento, es en gran parte dependiente de factores ecofisiológicos. En particular en este estudio pudimos evidenciar que las principales especies toxigénicas asociadas al maíz están comprendidas en los géneros de *Fusarium* y *Aspergillus*, como se mencionó en el capítulo 1. Los principales determinantes para el desarrollo y síntesis de toxinas de los hongos asociados a estos géneros son la actividad de agua (aw) y la temperatura (Doohan et al., 2003, Lahouar et al., 2016). La actividad hídrica se define como la relación entre el agua contenida en el grano y la presión de vapor del agua libre. El agua libre determina la germinación de las esporas, la tasa de crecimiento y afecta a la regulación de la biosíntesis de las toxinas (Marín et al., 2004; Ramírez et al., 2004, 2006). La temperatura también afecta el crecimiento fúngico y a la producción de toxinas. Cada especie fúngica tiene una temperatura mínima, máxima y óptima para su crecimiento (Lacey, 1991) y para la síntesis de las toxinas. Asimismo, existe una variabilidad en los requerimientos de agua para el crecimiento fúngico y la producción de toxinas a diferentes temperaturas. Por lo que cada factor por separado y su interacción tiene influencia sobre las especies fúngicas que colonizan los sustratos, pudiéndose establecer especies más tolerantes a diferentes condiciones ambientales (Magan y Aldred, 2007). En relación al crecimiento de *F. verticillioides*, está descrito que esta especie requiere de aw superiores a 0.90 (óptimo 0.98) y temperaturas entre 4 – 37°C, con un óptimo a 35°C para su crecimiento (Marin et al., 1999). Sin embargo, niveles bajos de actividad hídrica (0.93 - 0.95 aw) y temperaturas no tan elevadas (25 - 30°C) han demostrado ser las condiciones óptimas para la síntesis de fumonisina B1 (Marín et al., 2004, Fumero et al., 2016). Las condiciones óptimas de temperatura para el crecimiento de *F. graminearum* son de 25°C, con un rango comprendido entre 20 y 30°C y niveles de aw de 0.99 (Marín, 2010). Mientras que para la síntesis de DON, las condiciones óptimas descritas para esta especie son de temperaturas comprendidas entre 29–30°C y niveles de aw de 0.99 (Sanchis y Magan, 2004). Finalmente, para el crecimiento de *A. flavus*, en general, altas temperaturas (30-35°C) y bajas actividades hídricas (0.95), hacen de *A. flavus* se desarrolle como especie dominante contaminando el maíz en campo, pudiendo continuar su actividad durante la post-cosecha (Sanchis y Magan, 2004; Giorni et al., 2009; Abdel-Hadi et al., 2012). También se ha

visto que la expresión de genes responsables de la producción de aflatoxinas responde a variaciones en la actividad hídrica, temperatura y sustrato (Giorni, 2008). Ensayos realizados *in vitro* sugieren que la producción máxima de aflatoxina ocurre en rangos de actividad hídrica comprendidos entre 0.95 y 0.99 y a una temperatura óptima de 33°C (Sanchis y Magan, 2004; Giorni et al., 2011; Abdel-Hadi et al., 2012; Battilani et al., 2013).

La presencia de hongos toxicogénicos de *Fusarium* y *Aspergillus* como agentes frecuentes de contaminación en cultivos de maíz de nuestro país, y la producción de micotoxinas asociadas a ellos, enfatiza la necesidad de desarrollar estrategias de control tanto del crecimiento y desarrollo del patógeno como de los factores que favorecen la síntesis de micotoxinas. Para desarrollar estrategias efectivas para lograr los objetivos antes mencionados, es necesario recabar información sobre las poblaciones actuales, su variabilidad, y los factores climáticos que favorecen su desarrollo, así como sobre la capacidad toxicogénica y el perfil genético asociado a la síntesis de toxinas de estos patógenos.

Objetivos

- Determinar los perfiles toxicogénicos de las principales especies fúngicas aisladas y conocer las condiciones de temperatura y actividad hídrica que favorecen su crecimiento y la producción de micotoxinas.
- Desarrollar modelos *in vitro* que permitan predecir, en función de la temperatura y la actividad hídrica, patrones de crecimiento y síntesis de micotoxinas de las especies estudiadas

Las hipótesis planteadas en relación a este objetivo son:

- Las especies *Fusarium verticillioides*, *Fusarium graminearum* s. s. y *Aspergillus flavus* aisladas de maíz tienen diferentes capacidades para sintetizar micotoxinas y estas varían en función de las condiciones de actividad hídrica y temperatura. *Fusarium verticillioides* y *Aspergillus flavus* tienen una mayor capacidad de síntesis de micotoxinas en condiciones de actividad hídrica moderada, y temperaturas elevadas, mientras que *Fusarium graminearum* s. s. tiene un rango más amplio de actividad hídrica óptima y temperaturas intermedias.

Materiales y Métodos

CARACTERIZACIÓN TOXICOGÉNICA

Del total de aislamientos identificados se seleccionaron un total de 232 cepas al azar de cada una de las especies predominantes, resultando en el estudio de 84 cepas de *F. verticillioides*, 74 de *F. graminearum* s. s., 4 de *F. meridionale* y 70 de *A. flavus*. A las cepas seleccionadas se les analizó la capacidad de producción de toxinas *in vitro*. Se realizó el análisis para la producción de ZEA, DON y NIV para *F. graminearum* s. s. y *F. meridionale*; producción de FB1 y FB2 para *F. verticillioides* y producción de aflatoxinas AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 y Ácido ciclopiazónico (ACP) por *A. flavus*.

La producción de toxinas fue analizada mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de fase reversa compuesto por una bomba Shimadzu LC-10ADvp, para la detección de fumonisinas y aflatoxinas se utilizó el detector de fluorescencia RF-10Axl, mientras que para DON, ZEA, NIV y ACP se realizó mediante detector de arreglo de fotodiodos (SPD). Todas las evaluaciones se realizaron utilizando una columna C18 de fase reversa (150 x 4.6 mm i.d., 5 µm tamaño de partícula; Nucleodur®, Macherey-Nagel, Düren, Germany) conectada a una precolumna Security Guard (8 x 4 mm i.d., 5 µm tamaño de partícula; Nucleodur®, Macherey-Nagel, Düren, Germany). Los estándares utilizados para todas las toxinas analizadas fueron los de Trilogy Analytical Laboratory Inc., Washington, MO.

Toxinas de *Fusarium*

Para evaluar la capacidad de producir FB1 y FB2, 20 g de granos de arroz con 10 mL de agua estéril fueron autoclavados por 30 minutos en dos oportunidades en días contiguos. Para DON, NIV y ZEA, se utilizaron 25 g de arroz con 10 mL de agua estéril. Las bolsas con arroz autoclavado fueron inoculadas con 3 discos de micelio tomados a partir de cultivos puros de cada cepa. Las bolsas inoculadas se incubaron en la oscuridad a 25°C durante 28 días, luego se secaron los granos en horno a 60°C, posteriormente se molieron y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

La extracción de FB1 Y FB2 se realizó en base al método AOAC: 995.15, las toxinas se extrajeron a partir de 5 g de arroz molido con metanol:agua (3:1 v/v), el extracto filtrado fue purificado utilizando una columna de intercambio de aniones (Strata® SAX, 55 µm, 70Å, Phenomenex), las fumonisinas fueron eluidas con una solución de ácido acético:metanol (1:99 v/v), se llevaron a sequedad y posteriormente el residuo se disolvió con 1 mL de metanol. A cada muestra analizada se le adiciono O-ftaldialdehído (Sigma-Aldrich, Milan, Italy) para que se de la formación de los derivado fluorescentes de las fumonisinas. Se utilizó el detector de fluorescencia con ondas de emisión y excitación de 335 nm y 440 nm, respectivamente. La fase móvil utilizada estaba compuesta por metanol: NaH₂PO₄ 0.1M (77:23 v/v) pH 3.5, el flujo utilizado fue de 1 mL/min y se inyectaron 20 µL

de muestra. La presencia de fumonisinas fue determinada mediante la comparación con estándares externos.

El análisis de la producción de ZEA se realizó en base a la metodología AOAC 985.18. Cinco gramos de arroz molido se utilizaron para la extracción de la toxina utilizando metanol:agua (80:20 v/v), el extracto filtrado se purificó utilizando una columna MycoSep®226 (Romer Labs Inc., MO, USA). La elución fue primero evaporada y luego resuspendida en metanol:agua (70:30 v/v), la misma solución fue utilizada como fase móvil, el flujo utilizado fue de 1 mL/min, y el volumen de inyección fue 50 µL. La presencia de ZEA se determinó en base a la comparación con estándares externos.

Deoxinivalenol y NIV fueron detectados mediante la metodología descrita por Reynoso et al., 2011. Las toxinas se extrajeron a partir de 7.5 g de arroz molido con acetonitrilo:metanol (14:1 v/v) y luego se filtró el extracto por una columna de aluminio-C-activado (20:1, w/w) fabricada en el laboratorio. La elución obtenida se evaporó a sequedad y posteriormente se resuspendió con metanol:agua (5:95 v/v). Se utilizó un detector UV con una longitud de onda de 220 nm. La fase móvil estaba compuesta de metanol:agua (12:88 v/v), la velocidad del flujo fue de 1.5 mL/min y el volumen de inyección fue de 50 µL. La presencia de DON y NIV se determinó en base a la comparación con estándares externos.

Toxinas de *Aspergillus*

El análisis de la producción de aflatoxinas se realizó según la metodología descrita por Bragulat et al. (2001). Para ello las cepas se incubaron en placas de Petri conteniendo medio Agar Extracto de Levadura Sacarosa (YES) (Extracto de levadura 2%, Sacarosa 15 %, Agar 2%) a 25°C durante 14 días en oscuridad. Luego, tres discos de agar fueron cortados de cada placa y se les adiciono 1 mL de metanol. Luego de 1 hora en metanol, la solución fue filtrada a través de un filtro Millipore (Ø 0.22 mm) y una alícuota (200 µL) fue derivatizada con 700 µL de ácido trifluoroacético: ácido acético: agua Mili Q (20:10:70, v/v). La solución derivatizada fue analizada por detector de fluorescencia con longitud de onda de emisión y excitación de 360 nm y 440 nm, respectivamente. La fase móvil utilizada fue agua Mili Q: metanol: acetonitrilo (4:1:1, v/v/v) a un flujo de 1.5 mL/ min. El volumen de inyección fue de 20 µL. La presencia de aflatoxina G1, G2, B1 y B2 se determinó en base a la comparación con estándares externos.

Se determinó la producción de ACP en base a la metodología descrita por Mamo et al., 2018. Para esto se inocularon las cepas en placas conteniendo medio YES y se incubaron en oscuridad durante 7 días a 28°C. Para la extracción de ACP se colocaron 3 discos de micelio en 1 ml de una mezcla conteniendo metanol: agua (70:30, v:v), el metanol fue modificado con una solución al 1% de

bicarbonato de sodio. Luego de 1 hora en la solución, las muestras se filtraron a través de un filtro Millipore ($\varnothing$ 0.22 μ m) y se inyectaron 20 μ L al equipo. Las muestras se analizaron utilizando un detector UV (285 nm). La fase móvil utilizada fue acetonitrilo: 50 mM acetato de amonio (3:1, v/v), pH 5, con un flujo de 1.0 ml/min. La presencia de ACP se determinó en base a la comparación con estándares externos.

DETERMINACIÓN DE GENOTIPOS VINCULADOS A LA SÍNTESIS DE TRICOTECENOS

A las cepas pertenecientes al complejo FGSC, *F. graminearum* s. s. y *F. meridionale*, se les realizó además, la determinación de los genotipos asociados a tricotecenos mediante técnicas de PCR. Se realizaron dos PCR múltiples para la amplificación de la región de los genes *Tri3* y *Tri12*, genes involucrados en la biosíntesis de tricotecenos. La amplificación de estos genes permite diferenciar los genotipos NIV, 15-AcDON, y 3-AcDON (Ward et al., 2002). Además, se realizó otra PCR para la amplificación de una porción del gen *Tri13* para identificar cepas con genotipo DON (Chandler et al., 2003) (Tabla 2-1). La multiplex realizada para la amplificación del gen *Tri3* incluye un cebador común a todos los genotipos (3CON) y tres cebadores específicos para cada uno de los tres genotipos: 3NA, 3D15A, y 3D3A. Esta reacción produce amplicones de aproximadamente 840-, 610-, y 243-pb para cepas con genotipo NIV, 15-AcDON, y 3-AcDON, respectivamente. La reacción multiplex para el gen *Tri12*, de forma similar, incluye un cebador común a todos los genotipos, 12CON, y tres específicos a cada genotipo: 12NF, 12-15F, y 12-3F. Esta PCR amplifica fragmentos de aproximadamente 840-, 670-, y 410- pb para aislamientos con genotipo NIV, 15-AcDON, y 3-AcDON, respectivamente. Para la amplificación del gen *Tri13* se realizó utilizando los cebadores Tri13F y Tri13DONR, los productos de PCR de aproximadamente 282-bp indica aislamientos con genotipo DON. La PCR múltiple se realizó en un volumen final de 25 μ L que contiene 50 ng de DNAg, 1X PCR buffer (Nzytech), 2 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 0.5U ADN Taq polimerasa (Nzytech) y 0.2 mM de cada cebador. La reacción para la amplificación de los genes *Tri3* y *Tri12* consiste en un paso inicial de desnaturalización de 2 min a 94°C, seguido de 25 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 52°C, y 1 min a 72°C.

Las reacciones para la amplificación del gen *Tri13* se realizó a partir de 50 ng de ADN fúngico en un volumen total de 25 μ L que contiene 1.5X PCR buffer (Nzytech), 2 mM $MgCl_2$, 0.2 mM de cada dNTPs, 0.75 U de ADN Taq polymerase (Nzytech), y 0.4 mM de cada cebador. La amplificación de PCR del gen *Tri13* consiste en una primer paso de desnaturalización de 2 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 65°C, y 30 s a 72°C. Todos los productos de amplificación se revelaron en gel de agarosa al 1.5% (g/v), se corrieron en presencia de un marcador de peso molecular de ADN de 100-bp (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA).

Tabla 2-1. Secuencias de cebadores utilizados para la caracterización genotípica mediante PCR múltiple (*Tri3*, *Tri12*) y PCR (*Tri13*)

GEN	CEBADOR	SECUENCIA
<i>Tri 3</i>	3CON	TGGCAAAGACTGGTTCAC
	3NA	GTGCACAGAATATACGAGC
	3D15A	ACTGACCCAAGCTGCCATC
	3D3A	CGCATTGGCTAACACATG
<i>Tri 12</i>	12CON	CATGAGCATGGTGATGTC
	12NF	TCTCCTCGTTGTATCTGG
	12-15F	TACAGCGGTCGCAACTTC
	12-3F	CTTTGGCAAGCCCGTGCA
<i>Tri 13</i>	Tri13F	CATCATGAGACTTGTKCRAGTTTGGG
	Tri13DONR	GCTAGATCGATTGTTGCATTGAG

CARACTERIZACIÓN ECOFISIOLÓGICA

Del total de aislamientos identificados como *F. verticillioides*, *F. graminearum* s. s. y *A. flavus*, se seleccionaron 3 cepas toxigénicas de cada especie para determinar el efecto de la actividad hídrica (aw) y la temperatura sobre el crecimiento y la producción de micotoxinas. Con base en la literatura, se seleccionaron tres actividades hídricas y tres temperaturas dentro de los rangos óptimos de crecimiento y de producción de toxinas de las tres especies estudiadas. Los niveles de actividad hídrica seleccionados fueron 0.950, 0.980 y 0.995, y las temperaturas fueron 15°C, 25°C y 30°C. Las cepas seleccionadas se hicieron crecer sobre granos de maíz previamente esterilizados por radiación gamma (12 kGy) ajustados a las diferentes actividades hídricas. Para esto, se les adicionó a los granos diferentes volúmenes de agua estéril calculados tomando como base la curva de absorción de humedad diseñada por Samsudin (2015), para maíz (Figura 2-1).

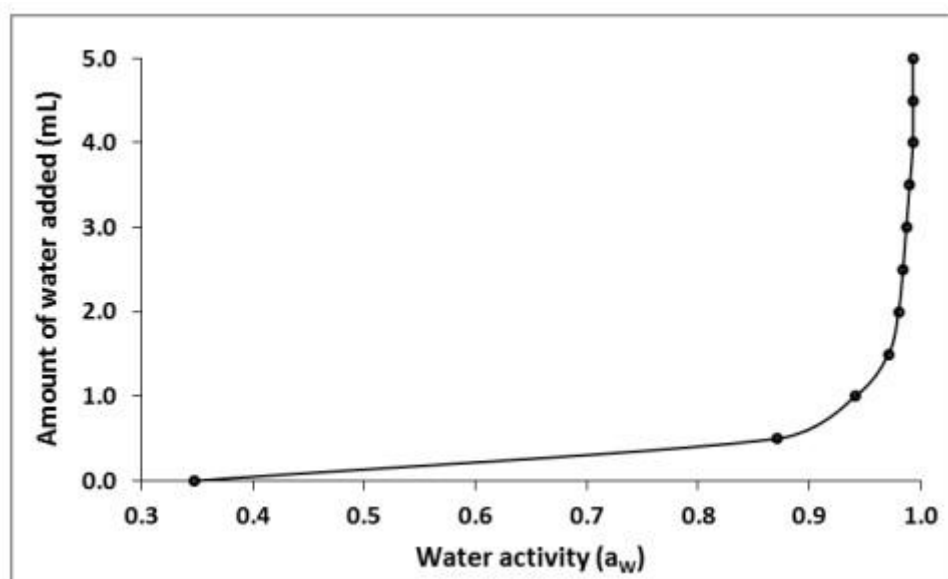


Figura 2-1. Curva de absorción de humedad para 5 g de granos de maíz, tomada de Samsudin 2015.

Los granos hidratados se equilibraron a 4°C durante 72 hs y se midieron los niveles de actividad hídrica utilizando un medidor automático Aqualab Series 3. Para lograr los niveles de actividad hídrica deseados se adicionaron distintos volúmenes de agua esteril a placas de petri conteniendo 20 g de maíz esteril (Figura 2-1) y se incubaron en recipientes herméticos en presencia de una mezcla de glicerol:agua ajustada a cada actividad hídrica para generar una atmósfera controlada (Tabla 2-2).

Tabla 2-2. Volúmenes de glicerol:agua adicionados a granos de maíz para cada actividad hídrica (a_w)

a_w	0.995	0.980	0.950
glicerol:agua	2.2 ml/97.8 ml	7.3 ml/ 92.7ml	18.3 ml/ 81.7ml
maíz (20 g)	7.5 ml	5.0 ml	3.0 ml

Una vez alcanzados los niveles de actividad hídrica objetivo en las placas conteniendo los granos de maíz, en el centro de cada placa se colocó un disco de micelio de medio Papa Dextrosa Agar (PDA) de 0.8 mm de diámetro obtenido del margen de una colonia de 5-7 días de cada cepa a estudiar. Los granos de maíz fueron incubados a cada actividad hídrica (0.95, 0.98 y 0.995) y en las distintas temperaturas seleccionadas (15°C, 25°C y 30°C) durante 28 días. Se realizaron tres réplicas por cada tratamiento.

Se midió diariamente el diámetro de las colonias en dos direcciones perpendiculares hasta que la colonia alcanzó el margen de la placa (8.5 cm). Los diámetros de las colonias se analizaron en relación al tiempo (días) y se realizó una regresión lineal para obtener la velocidad de crecimiento de las cepas (mm/día). Cumplidos los 28 días de incubación, las placas fueron retiradas de la incubación y se procedió al análisis de las micotoxinas correspondientes para cada especie mediante HPLC, siguiendo las mismas metodologías utilizadas para el análisis de toxinas en muestras de maíz (AOAC).

Para el análisis de los datos obtenidos en el estudio ecofisiológico se utilizaron los programas SigmaPlot V.15, e Infostat (Di Rienzo et al. 2020). La significancia estadística de las variables analizadas (aw y temperatura) se analizó mediante un análisis de ANOVA de dos variables con significancia estadística si p -valor $<0,0001$. Se construyeron modelos gráficos de superficie en 3 dimensiones que permiten predecir, en función de la temperatura y la actividad hídrica, patrones de crecimiento y síntesis de micotoxinas de las especies estudiadas. Para analizar si existe una predominancia en la incidencia de los factores estudiados (T y aw), se realizó un análisis de varianza de dos vías con la prueba de igual varianza de Tukey.

Resultados

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD TOXIGÉNICA

Fusarium verticillioides

Al 73% de los aislamientos (n=84) identificados molecularmente como *F. verticillioides* se les estudió la capacidad de producir fumonisinas, 48 cepas pertenecieron al 2018 y 36 al 2019. La FB1 fue producida por el 69% (n=33) de las cepas pertenecientes al 2018 y en el 75% (n=27) de las cepas de 2019, la proporción de cepas productoras de FB2 fue de 31% y 33% para cada uno de los dos años estudiados, respectivamente (n=15 de 2018, n=12 de 2019) (Figura 2-2).

Complejo *Fusarium graminearum*

La producción de DON, NIV y ZEA fue estudiada en el 86% (n=74) de las cepas identificadas como *F. graminearum* s. s. y en el 86% (n=4) de las cepas identificadas como *F. meridionale*. La proporción de cepas de *F. graminearum* s. s. capaces de producir micotoxinas superó el 50% en ambos años estudiados, alcanzando niveles de 70.6% (n=24) y 72.5% (n=29) de cepas productoras de ZEA en 2018 y 2019, respectivamente; 85.3% (n=29) y 85% (n=34) de cepas productoras de DON en cada año de estudio. Por otro lado, las cepas productoras de NIV fueron menos frecuentes, con una proporción de 23.5 % (n=8) y 7.5% (n=3) de cepas productoras en 2018 y 2019, respectivamente (Figura 2-2). Por otro lado, los aislamientos identificados como *F. meridionale*, presentaron un perfil toxicogénico

diferente en comparación con las cepas *F. graminearum* s. s., con 50% (n=2) de cepas productoras de NIV en 2018 y ninguna cepa productora de ZEA o DON.

Aspergillus flavus

Del total de cepas de *A. flavus* obtenidas en ambos años de estudio (n=121), se estudió la capacidad de producir micotoxinas al 58% (n=70) de las cepas seleccionadas de forma representativa del total de muestras analizadas donde se obtuvieron cepas de esta especie. Se determinó el potencial de producir tanto aflatoxinas como ACP en el 52% (n=43) de cepas de 2018 y en el 69% (n=27) de las obtenidas en 2019. Las cepas no toxigénicas predominaron en ambos años, correspondiendo al 67% (n=29) en 2018 y 59% (n=16) en 2019. Dentro de las cepas toxigénicas, la principal micotoxina sintetizada fue el ACP en ambos años de estudio, con 28% (n=12) y 41% (n=11) de cepas productoras en 2018 y 2019, respectivamente. Dentro de las aflatoxinas, en 2018 se observaron igual porcentaje de cepas productoras de aflatoxinas B1 y B2 (16%; n=7), mientras que en 2019 predominaron las cepas productoras de AFB1 (26%; n=7), seguida de las productoras de aflatoxina B2 (18.5%; n= 5). No se encontraron cepas capaces de producir aflatoxinas del tipo G en ninguno de los años de estudio.

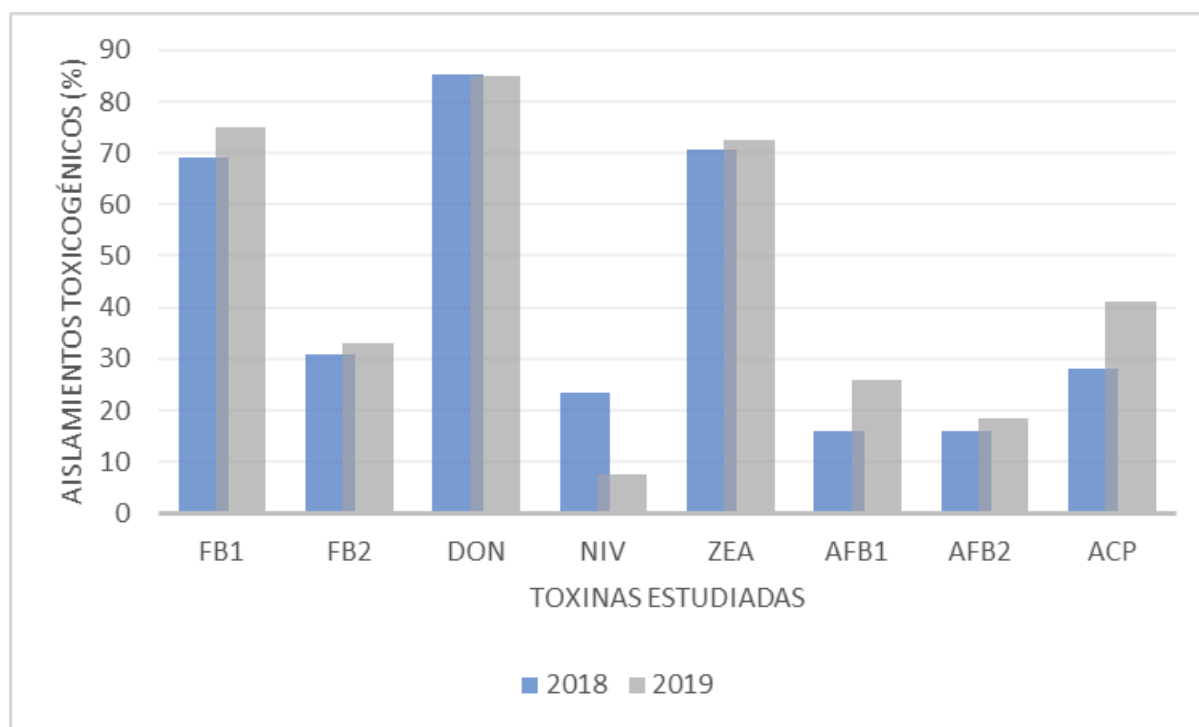


Figura 2-2. Porcentaje de aislamientos toxicogénicos identificados como *F. verticillioides* (FB1 y FB2), *F. graminearum* s. s. (DON, NIV y ZEA) y *A. flavus* (AFB1, AFB2 y ACP) en ambos años de estudio.

DETERMINACIÓN DE GENOTIPOS VINCULADOS A LA SÍNTESIS DE TRICOTECENOS

Del total de aislamientos identificados como *F. graminearum* s. s. se les determinó el genotipo vinculado a la síntesis de tricotecenos a un total de 79 cepas, de las cuales 85% (n=29) corresponden a los aislamientos obtenidos en el 2018 y 96% (n=50) de los aislamientos del 2019. Además, se determinaron los genotipos para el total de aislamientos identificados como *F. meridionale*. El total de cepas identificadas como *F. graminearum* s. s. pertenecen al genotipo DON / 15 Ac-DON. Mientras que el total de cepas de *F. meridionale* (n=6) presentaron genotipo NIV/DON (Tabla 2-3).

Tabla 2-3. Distribución (%) de genotipos de los aislamientos de FGSC para los genes *Tri 3*, *Tri 12* y *Tri 13*

	<i>Tri 3</i>			<i>Tri 12</i>			<i>Tri 13</i>
	3 ADON	15 ADON	NIV	3 ADON	15 ADON	NIV	DON
<i>F. graminearum</i>	-	100%	-	-	100%	-	100%
<i>F. meridionale</i>	-	-	100%	-	-	100%	100%
<i>F. pseudograminearum</i>	-	100%	-	-	100%	-	100%
<i>F. armeniacum</i>	-	100%	-	-	100%	-	100%

CARACTERIZACIÓN ECOFISIOLÓGICA

Se analizaron los resultados obtenidos en base al promedio de las tres cepas estudiadas, se pudo determinar que para todas las especies estudiadas, el crecimiento fue afectado por ambas variables (aw y temperatura), observándose variaciones estadísticamente significativas entre todas las condiciones estudiadas ($p<0,05$) (Figura 2-3). Las especies de *Fusarium* presentaron una menor velocidad de crecimiento a una temperatura de 15°C, mientras que *A. flavus* no presentó crecimiento a la temperatura mencionada. También se pudo determinar que *A. flavus* presenta una velocidad de crecimiento mayor en comparación con ambas especies de *Fusarium*. Asimismo, se obtuvieron para cada especie los niveles óptimos y sub-óptimos de crecimiento y producción de micotoxinas.

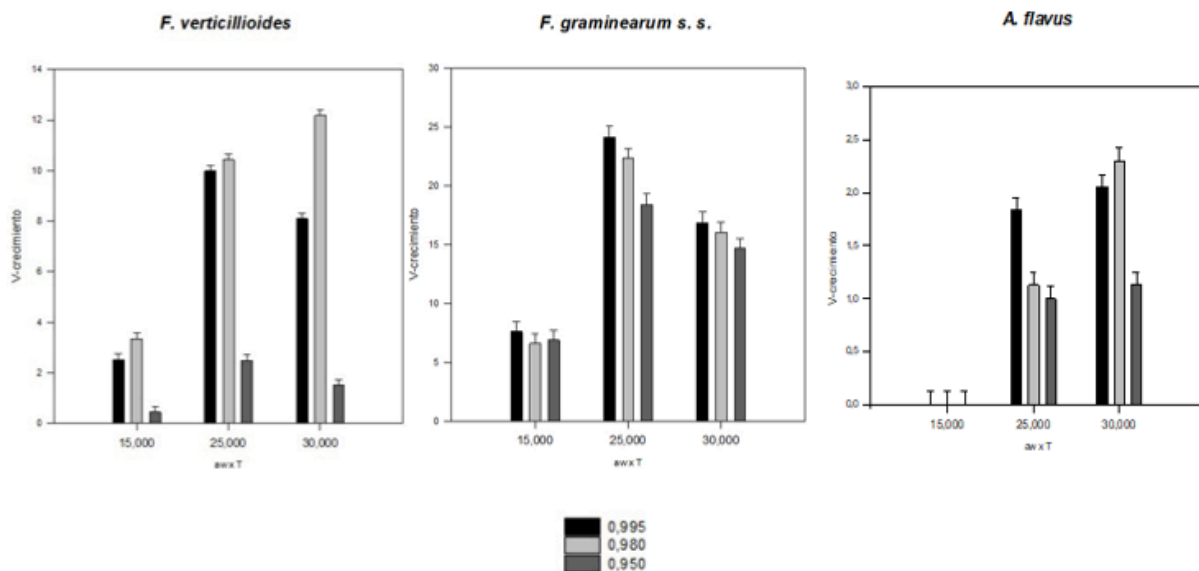


Figura 2-3. Efecto de la temperatura y actividad hídrica sobre la velocidad de crecimiento (mm/día) para las especies de *F. verticillioides*, *F. graminearum s. s.* y *A. flavus*

Fusarium verticillioides

Para *F. verticillioides* se pudo determinar que tanto la temperatura como la actividad hídrica influyen estadísticamente en el crecimiento ($p < 0,001$), siendo discretamente más influyentes las variaciones en la aw (ANOVA - test F aw: 809,710; T: 539,359). En *F. verticillioides* se observó una velocidad de crecimiento máxima a 0.97-0.98 y 29-30°C y una producción máxima de FB1 y FB2 a 0.995 y 23°C durante el crecimiento en granos de maíz (Figura 2-4). Se observó que tanto la actividad hídrica como la temperatura son factores influyentes estadísticamente en la producción de FB2, siendo discretamente más significativas las variaciones de temperatura (ANOVA - test F aw 10,989; T: 16,200). Sin embargo, ninguno de los factores estudiados tiene significancia estadística en la producción de FB1.

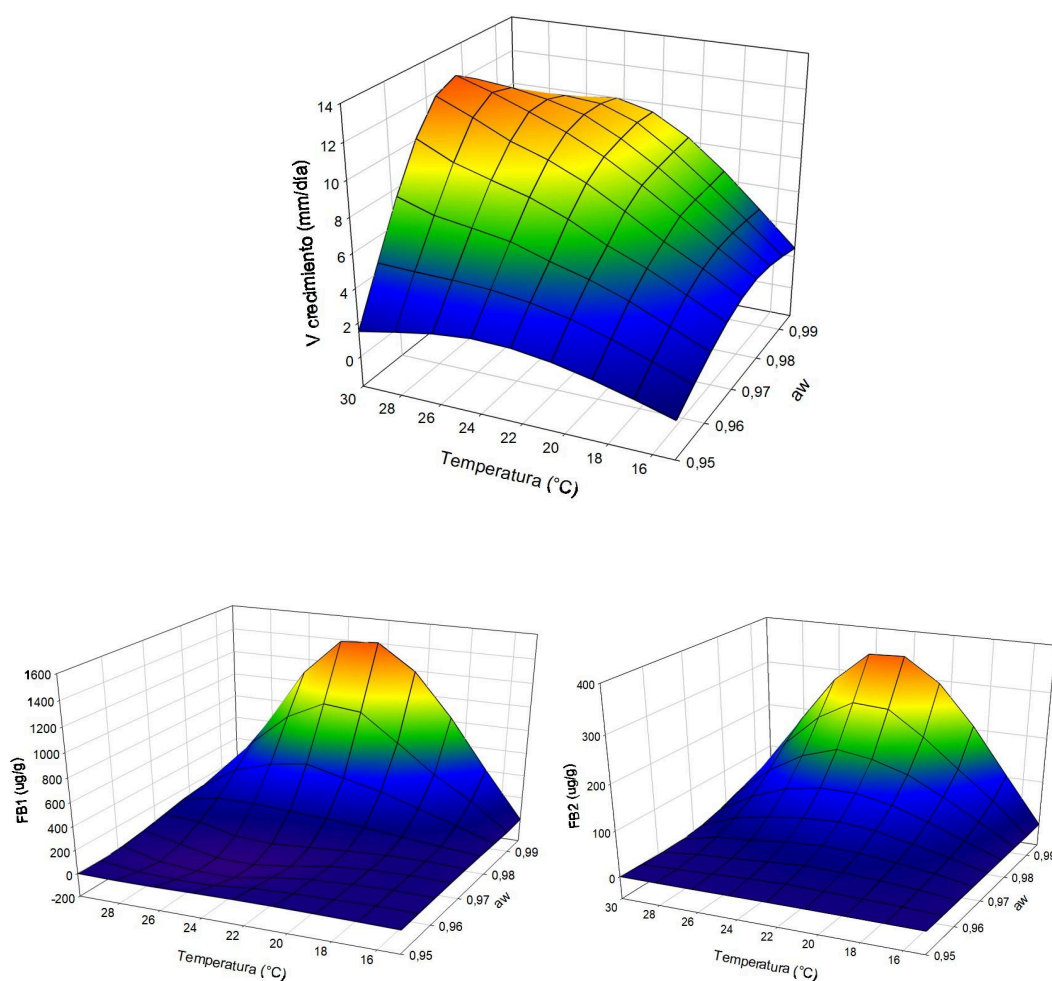


Figura 2-4. Mapa de calor sobre el efecto de diferentes actividades hídricas y temperaturas sobre la velocidad de crecimiento y la producción de FB1 y FB2 por *F. verticillioides*.

Fusarium graminearum s. s.

Para *F. graminearum* se pudo determinar que únicamente la temperatura influye estadísticamente en el crecimiento ($p < 0,001$), siendo el efecto de las variaciones de aw no significativas a las temperaturas analizadas. Las condiciones óptimas de crecimiento se observaron a una temperatura de 24°C y aw de 0.995 (Figura 2-5). En cuanto a la síntesis de toxinas, se vio que únicamente para la síntesis de la ZEA la temperatura es el factor con significancia estadística en su producción ($p < 0,001$). Para la síntesis de DON, como para el acetilado 3-AcDON se observó un comportamiento bimodal, con condiciones óptimas de producción de ambas toxinas a 25°C y aw de 0.95 y un segundo pico en la síntesis de DON a 30°C de temperatura y 0.998 de aw, mientras que para 3-AcDON el segundo pico se observó a 30°C con aw de 0.98. Para 15-AcDON los máximos de producción se observan a 25°C de

temperatura y aw de 0.95. Para la ZEA las condiciones óptimas de síntesis se observaron a una temperatura de 25°C y 0.98 de aw (Figura 2-5).

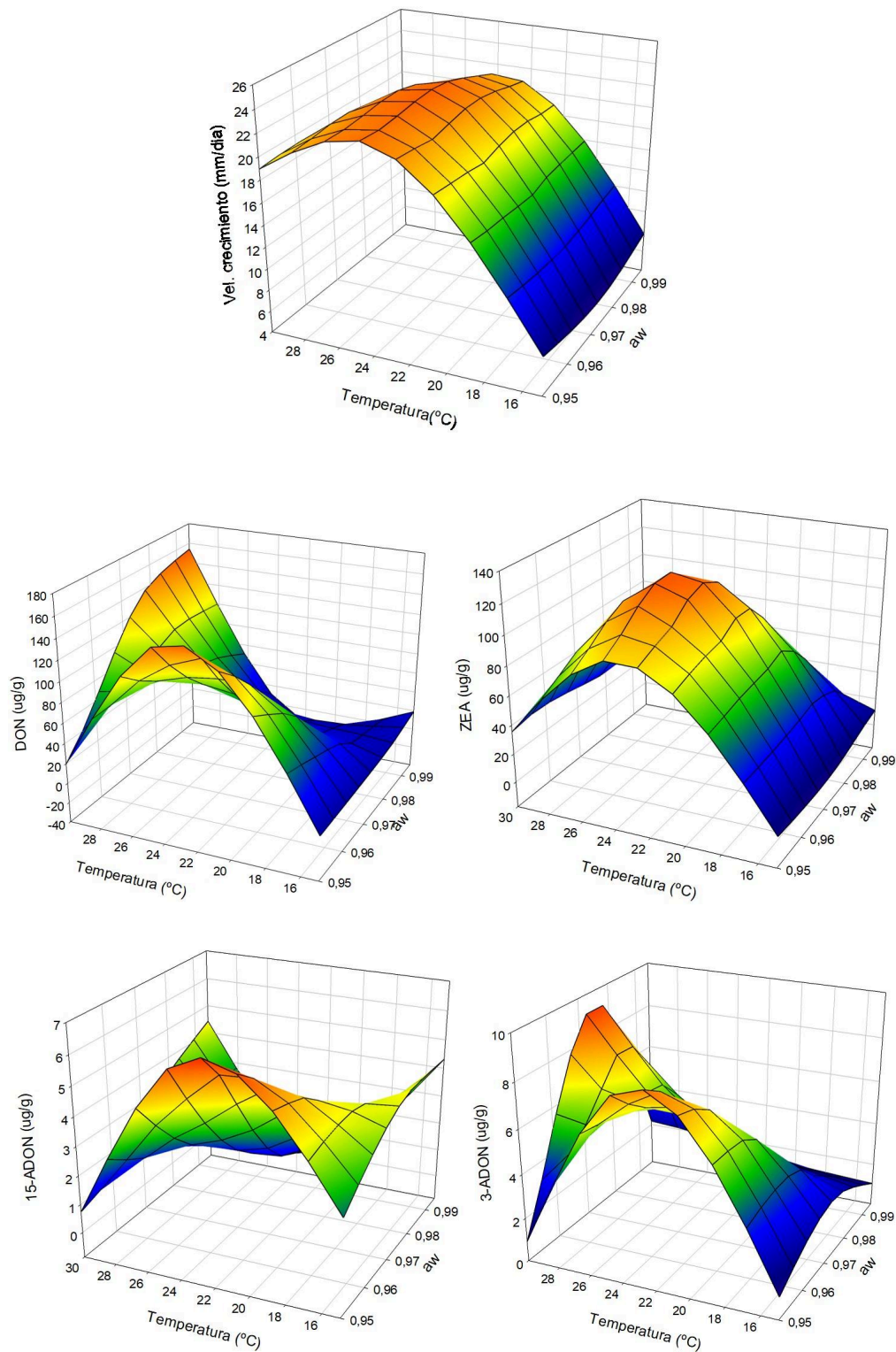


Figura 2-5. Mapa de calor sobre el efecto de diferentes actividades hídricas y temperaturas sobre la velocidad de crecimiento y la producción de DON, ZEA, 15-AcDON Y 3-AcDON por *F. graminearum* s. s..

Aspergillus flavus

En el estudio de *A. flavus* se pudo establecer que únicamente las variaciones en los niveles de temperatura tiene influencia estadística cuando se lo compara con la a_w , tanto en el crecimiento ($p < 0,001$) como en la síntesis de AFB1 ($p < 0,001$). Observándose condiciones óptimas de crecimiento a 30°C y niveles de a_w de 0.98 (Figura 2-6). En cuanto a la síntesis de aflatoxina B1, las condiciones óptimas para su síntesis se observaron a temperaturas de 25°C y niveles bajos de actividad hídrica (0.95) (Figura 2-6).

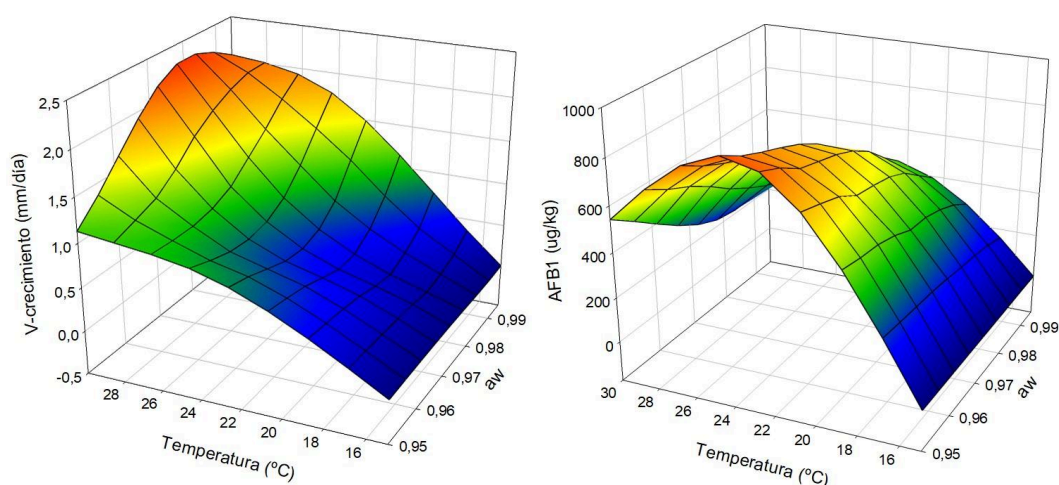


Figura 2-6. Mapa de calor sobre el efecto de diferentes actividades hídricas y temperaturas sobre la velocidad de crecimiento y la producción de AFB1 por *A. flavus*.

Discusión

En este trabajo se evidencio que la mayoría (70%) de las cepas de *F. verticillioides* asociadas a granos de maíz en nuestro país son productoras de fumonisinas, principalmente FB1. En base a análisis filogenéticos se plantea que existen al menos dos linajes de esta especie, en el que uno corresponderia a una población importante productora de fumonisinas con una amplia distribución geográfica, amplias preferencias de huésped (principalmente cereales), que muestra variabilidad y mayor incidencia de reproducción sexual, y una segunda población menor, no productora de fumonisinas, con preferencia de huésped restringida (banana), con baja variabilidad y estrategia reproductiva asexual (Mirete et al. 2004). Considerando la alta incidencia de cepas toxicogénicas de esta especie, vinculada a la alta prevalencia de esta especie en maíz, y la presencia de elevadas concentraciones de fumonisinas en granos de maíz encontradas en este trabajo, se puede inferir que las cepas encontradas corresponden al linaje asociado a reproducción sexual. Asimismo, esto

configura un riesgo para la salud humana y animal vinculado a los altos niveles de contaminación con toxinas encontrados. Si bien es importante tener en cuenta que la producción de fumonisinas es muy variable entre las distintas cepas y que las condiciones ambientales son determinantes en su producción, los test de toxicidad indican que las fumonisinas son capaces de causar efectos adversos en una gran variedad de especies animales, pudiendo generar síntomas a partir de niveles de 5000 - 10000 ug/kg de FB1 en alimentos, si bien los cambios fisiológicos ocurrirían a concentraciones mayores (Munkvold y Desjardins, 1997).

En relación al perfil de micotoxinas producidas por *F. graminearum* s. s., DON, fue la principal toxina producida, seguida de ZEA. Otros trabajos realizados en América del Sur en relación a esta especie contaminando diferentes cultivos, también demostraron que DON era la principal toxina producida (Del Ponte et al., 2022). Por otra parte, es de destacar la alta proporción de cepas productoras de ZEA, y a pesar de que hay pocos estudios en relación al potencial de cepas de *F. graminearum* s. s. de producir esta toxina, es frecuente la contaminación con esta toxina en diferentes cultivos como el maíz (Salay y Mercadante, 2002; Maragos, 2010). Asimismo, la alta proporción de cepas con el potencial de producir ZEA podrían representar un riesgo para la salud tanto humana como animal. Por otro lado, si bien no se encontraron niveles significativos de NIV en las muestras y el porcentaje de cepas de *F. graminearum* s. s productoras de NIV *in vitro* fue bajo en ambos años de estudio, monitorizar la presencia de especies capaces de producirla es de gran interés considerando que es sabido que el NIV es más tóxico que DON en la mayoría de órganos y sistemas animales (Desjardins, 2006, Luongo et al., 2008, Cheat et al., 2015), por lo que la presencia de cepas capaces de producirlo implica un riesgo potencial para los consumidores finales y la necesidad de desarrollar estrategias para su control. Por otro lado, todas las cepas de *F. graminearum* s. s. analizadas en este trabajo presentaron genotipo DON - 15-AcDON pero ninguna presentó genotipo NIV ni 3 AcDON. Esta discordancia entre los quimiotipos y los genotipos también ha sido previamente reportada por otros autores (Beccari et al., 2017), lo que demuestra la necesidad del estudio de los quimiotipos para poder predecir el verdadero riesgo potencial en relación a la presencia de micotoxinas en los distintos sustratos. Por otro lado, los genotipos encontrados en este trabajo concuerda con trabajos previos realizados en aislamientos provenientes de distintos cultivos de nuestro país (Umpierrez et al., 2013; Pan et al., 2013, 2016; Garmendia et al., 2018), donde también se observó la prevalencia del genotipo DON-15-AcDON en cepas de *F. graminearum* s. s., lo que demuestra la estabilidad de este genotipo, a pesar del paso del tiempo y la variedad de cultivos. Así mismo, en los últimos años, trabajos realizados en Europa, han reportado la prevalencia del genotipo 15-AcDON en trigo y maíz, con una distribución global en cereales de hasta 83% (Pasquali et al., 2016).

Las cepas de *Fusarium meridionale* estudiadas fueron no toxigénicas o productoras de NIV. Aunque en baja frecuencia, la presencia de cepas de *F. meridionale* potencialmente productoras de NIV indican un riesgo potencial de contaminación de granos de maíz con esta toxinas, sumado a la presencia de cepas de *F. graminearum* s. s. que son capaces o potencialmente capaces de producirla. La presencia de hongos de esta especie, en baja frecuencia, podría explicar la contaminación, a niveles bajos, con NIV en las muestras de maíz analizadas. Considerando que, si bien ninguna cepa de *F. graminearum* s. s. presentó el quimiotipo NIV, algunas fueron capaces de sintetizar esta toxina en el estudio de capacidad toxicogénica *in vitro*.

En relación a los resultados obtenidos del estudio de cepas de *A. flavus*, el alto porcentaje de cepas no toxigénicas ya había sido reportado en trabajos previos en nuestro país (del Palacio y Pan, 2020) en cepas asociadas a trigo y sorgo, así como también el alto porcentaje de cepas productoras de ACP. En este trabajo, si bien se detectó la presencia de aflatoxinas en un 37% de las muestras analizadas, la baja presencia de cepas toxigénicas se correlacionó con los bajos niveles de contaminación encontrados en las muestras de maíz analizadas, no superando concentraciones de 31,1 µg/Kg para AFB1. Así mismo, si bien se detectaron cepas capaces de sintetizar AFB2 en el estudio *in vitro*, no se detectó la presencia de esta toxina en las muestras de maíz, en cambio se detectó presencia de AFG1 en una de las muestras de maíz analizadas sin haberse identificado cepas capaces de sintetizarla *in vitro*. A nivel mundial, varios trabajos realizados en distintas partes del mundo también han reportado altos porcentajes de cepas no toxigénicas de *A. flavus* en trigo, sorgo, maíz, arroz y soja (Razzaghi-Abyaneh et al., 2006; Mauro et al. 2013; Tran-Dinh et al., 2014; Katsurayama et al. 2018). Se ha establecido que la alta prevalencia de cepas no toxicogénicas en los cultivos podría estar determinada por una mayor capacidad de las cepas no toxicogénicas de esporulación, favoreciendo así la colonización y dispersión de estas cepas en los distintos cultivos. A su vez, la síntesis de micotoxinas implica mayores requerimientos nutricionales que irían en detrimento de la capacidad reproductiva de estas cepas manifestándose con niveles reducidos de esporulación en cepas toxicogénicas (Mehl y Cotty, 2010). Esto podría explicar la alta prevalencia de las no toxicogénicas respecto a las cepas productoras de micotoxinas, así como también puede ser un aspecto importante del porqué del éxito de las cepas no toxicogénicas en el control biológico de la contaminación por cepas toxicogénicas.

Además de las aflatoxinas, *A. flavus* es capaz de producir ACP, un ácido indol-tetratómico tóxico para una gran variedad de animales y humanos (Chang et al. 2009). En este trabajo la mayoría de cepas toxigénicas fueron productoras de ACP. Como se menciona previamente, resultados similares han sido observados en nuestro país en cepas de trigo y sorgo, donde el porcentaje de cepas productoras de ACP y de aflatoxinas fue prácticamente el mismo (del Palacio y Pan, 2020), además de otros

trabajos en los que también se ha reportado una alta presencia de cepas de *A. flavus* productoras de ACP aisladas de maíz (Resnik et al., 1996; Razzaghi-Abyaneh et al., 2006), así como también en otros sustratos (Vaamonde et al., 2003; dos Santos-Ciscon et al., 2019). Debido a la alta prevalencia de cepas productoras de ACP en nuestro país, asociadas a diferentes cultivos, sería de interés evaluar las condiciones que favorecen su producción, los posibles efectos de la co-ocurrencia con aflatoxinas como así también evaluar si es necesario considerar a esta micotoxina en los productos alimentarios como medida sanitaria para su consumo. Si bien es sabido que la presencia de cepas toxicogénicas no asegura la síntesis de toxinas en el sustrato, la presencia de cepas potencialmente productoras como contaminantes naturales de los granos debe ser considerado un factor de riesgo y plantea la necesidad de realizar un monitoreo continuo acerca de la presencia de aflatoxinas y ACP de manera de establecer el riesgo de contaminación existente. Si bien en nuestro país existen regulaciones que establecen límites de aflatoxinas en granos de maíz y derivados, no es así para el ACP.

Se determinó además las características ecofisiológicas de poblaciones fúngicas locales y de especies aún no estudiadas en el país. Se evidenció que tanto la temperatura como la actividad hídrica son factores determinantes tanto en el crecimiento como en la síntesis de toxinas de estas especies, siendo en general la temperatura el principal factor. Asimismo, se determinó que las condiciones menos favorables para el crecimiento son a bajos niveles de aw y temperatura. Tanto *F. verticillioides* como *A. flavus* presentan mayor crecimiento a temperaturas y aw elevadas, mientras que *F. graminearum* s. s. crece mejor a temperaturas menores (25°C). Las condiciones climáticas de nuestro país, durante los meses de verano muestran en los últimos años una tendencia al aumento en las precipitaciones (Barreiro et al. 2021) y temperaturas entre 25- 30°C (INUMET, 2022) con variaciones durante la noche. Considerando que la temperatura es el principal determinante tanto en el crecimiento como en la síntesis de toxinas y que el maíz pertenece a los cultivos de verano, es de esperar la presencia de estas especies como contaminantes del cultivo, así como también la prevalencia de *F. verticillioides* respecto a *F. graminearum* s. s.. Asimismo, se lograron desarrollar modelos que permiten interpretar la interacción entre el comportamiento de especies fúngicas nativas y factores ambientales como la actividad hídrica y temperatura. Disponer de estos modelos permite conocer las condiciones óptimas y marginales para el crecimiento y producción de micotoxinas para las especies fúngicas toxicogénicas estudiadas en este trabajo, lo cual es muy útil para determinar los factores de riesgo durante la cosecha y el manejo poscosecha de los granos. En general, los resultados asociados a las condiciones de temperatura y aw que favorecen el crecimiento de las especies estudiadas, son coincidentes con los resultados presentes en la bibliografía. Sin embargo, si bien algunos autores plantean que bajos niveles de actividad hídrica (0.93 - 0.95 aw) y temperaturas no tan elevadas (25 - 30°C) han demostrado ser las condiciones óptimas para la síntesis

de FB1 (Marín et al., 2004, Fumero et al., 2016), estos resultados contrastan con los obtenidos en este trabajo en el que los requerimientos de aw para la síntesis de FB1 como de FB2 serían más elevados (0.99). Asimismo, para la síntesis de aflatoxinas se ha reportado que la producción máxima de aflatoxina ocurre en rangos de actividad hídrica comprendidos entre 0.95 y 0.99 y a una temperatura óptima de 33°C (Sanchis y Magan, 2004; Giorni et al., 2011; Abdel-Hadi et al., 2012; Battilani et al., 2013), en nuestro trabajo la síntesis máxima de esta toxina se evidenció a temperaturas un poco más bajas, cercanas a los 25°C. Si bien existen múltiples estudios de las características ecofisiológicas de las especies aquí estudiadas realizados en diversas partes del mundo, conocer las características ecofisiológicas de las especies de nuestro país nos permite evidenciar probables adaptaciones a las condiciones climáticas que aquí ocurren. Esto nos ayuda en el desarrollo de estrategias de manejo para minimizar la contaminación con patógenos y sus micotoxinas en nuestros cultivos.

Bibliografía

- Abdel-Hadi, A., Schmidt-Heydt, M., Parra, R., Geisen, R., Magan, N., 2012. A systems approach to model the relationship between aflatoxin gene cluster expression, environmental factors, growth and toxin production by *Aspergillus flavus*. J. R. Soc. Inter. 9 757–767.
- Alvarez, C., Azcarate, M., Pinto, V., 2009. Toxigenic potential of *Fusarium graminearum sensu stricto* isolates from wheat in Argentina. International Journal of Food Microbiology, 135(2), 131-135.
- Aoki, T., Ward, T., Kistler, H., O'Donnell, K., 2012. Systematics, phylogeny and trichothecene mycotoxin potential of *Fusarium* head blight cereal pathogens. Mycotoxins. 62:91–102
- Barreiro, M., Arizmendi, F., Díaz, N., Trinchin R., 2021. Análisis del clima y escenarios de cambio y variabilidad climática en Uruguay. CONVENIO PNUD-UDELAR Proyecto URU/18/002 “Integración del enfoque de adaptación en ciudades, infraestructura y ordenamiento territorial en Uruguay”
- Battilani, P., Camardo Leggieri, M., Rossi, V., Giorni, P., 2013. AFLA-maize, a mechanistic model for *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin B1 contamination in maize. Comput. Electron Agric. 94, 38-46
- Beccari, G., Prodi, A., Tini, F., Bonciarelli, U., Onofri, A., Oueslati, S., Limayma, M., Covarelli, L., 2017. Changes in the *Fusarium* head blight complex of malting barley in a three-year field

experiment in Italy. *Toxins*, 9(4), 120.

- Castañares, E., Albuquerque, D., Dinolfo, M., Pinto, V., Patriarca, A., Stenglein, S., 2014. Trichothecene genotypes and production profiles of *Fusarium graminearum* isolates obtained from barley cultivated in Argentina. *International journal of food microbiology*, 179, 57-63.
- Chandler, E., Simpson, D., Thomsett, M., Nicholson, P., 2003. Development of PCR assays to Tri7 and Tri13 trichothecene biosynthetic genes, and characterisation of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62(6), 355-367.
- Chang, P., Ehrlich, K., Fujii, I., 2009. Cyclopiazonic acid biosynthesis of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Toxins*, 1(2), 74-99.
- Cheat, S., Gerez, J. R., Cognié, J., Alassane-Kpembi, I., Bracarense, A., Raymond-Letron, I., Oswal, I., Kolf-Clauw, M., 2015. Nivalenol has a greater impact than deoxynivalenol on pig jejunum mucosa in vitro on explants and in vivo on intestinal loops. *Toxins*, 7(6), 1945-1961.
- Crippin, T., Renaud, J., Sumarah, M., Miller, J., 2019. Comparing genotype and chemotype of *Fusarium graminearum* from cereals in Ontario, Canada. *PLOS ONE* 14(5): e0216735
- del Palacio, A., Pan, D., 2020. Occurrence and toxigenic potential of *Aspergillus* section *Flavi* on wheat and sorghum silages in Uruguay. *Mycology*, 11(2), 147-157.
- Del Ponte, E., Moreira, G., Ward, T., O'Donnell, K., Nicolli, C., Machado, F., Duffeck, M., Alves, K., Tessmann, D., Waalwijk, C., van der Lee, T., Zhang, H., Chulze, S., Stenglein, S., Pan, D., Vero, S., Vaillancourt, L., Schmale III, D., Esker, P., Moretti, A., Logrieco, A., Kistler, C., Bergstrom, G., Viljoen, A., Rose, L., van Coller, G., 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.
- Desjardins, A., 2006. *Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics, and biology. American Phytopathological Society (APS Press).
- Desjardins, A., 2008. Natural product chemistry meets genetics: when is a genotype a chemotype?. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(17), 7587-7592.
- dos Santos-Ciscon, B., van Diepeningen, A., da Cruz Machado, J., Dias, I., Waalwijk, C., 2019. *Aspergillus* species from Brazilian dry beans and their toxigenic potential. *International Journal of Food Microbiology*, 292, 91-100.
- Instituto Uruguayo de Meteorología (INUMET), 2022. Sequía meteorológica en Uruguay 2020-2023.

https://www.inumet.gub.uy/sites/default/files/2023-02/Sequ%C3%ADa_2020%20al%202023

- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C., 2020. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Doohan, F., Brennan, J., Cooke, B., 2003. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. Epidemiology of Mycotoxin Producing Fungi: Under the Aegis of COST Action 835 'Agriculturally Important Toxigenic Fungi 1998–2003', EU project (QLK 1-CT-1998–01380), 755-768.
- Fumero, M., Sulyok, M., Chulze, S., 2016. Ecophysiology of *Fusarium temperatum* isolated from maize in Argentina. Food Additives & Contaminants: Part A, 33(1), 147-156.
- Garmendia, G., Pattarino, L., Negrín, C., Martínez-Silveira, A., Pereyra, S., Ward, T., Vero, S., 2018. Species composition, toxigenic potential and aggressiveness of *Fusarium* isolates causing head blight of barley in Uruguay. Food Microbiology, 76, 426-433.
- Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., Bertuzzi, T., Battilani, P., 2007. Studies on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in northern Italy. Int J Food Microbiol 113, 330–338
- Giorni, P., 2008. Effect of aw and CO2 level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post-harvest. International Journal of Food Microbiology, 122(1–2), 109–113
- Giorni, P., Magan, N., Battilani, P., 2009. Environmental factors modify carbon nutritional patterns and niche overlap between *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* strains from maize. Int. J. Food Microbiol. 130, 213-218.
- Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., Battilani, P., 2011. Growth and aflatoxin production of an Italian strain of *Aspergillus flavus*: influence of ecological factors and nutritional substrates. World Mycotoxin J. 4, 425-432.
- Katsurayama, A., Martins, L., Iamanaka, B., Fungaro, M., Silva, J., Frisvad, J., Pitt, J., Taniwaki, M., 2018. Occurrence of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in Brazilian rice: From field to market. International journal of food microbiology, 266, 213-221.
- Kristensen, R., Mona, T., Kosiak, B., Holst-Jensen, A., 2005. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. Mycological research, 109(2), 173-186.
- Lacey, J., Ramakrishna, N., Hamer, A., Magan, N., Marfleet, I., 1991. Grain fungi. Handbook of applied mycology, 3, 121-177.
- Lahouar, A., Marin, S., Crespo-Sempere, A., Saïd, S., Sanchis, V., 2016. Effects of temperature, water activity and incubation time on fungal growth and aflatoxin B1 production by

toxigenic *Aspergillus flavus* isolates on sorghum seeds. *Revista Argentina de microbiología*, 48(1), 78-85.

- Lee, S., Lee, J., Nam, Y., Lee, S., Ryu, J., Lee, T., 2010. Population structure of *Fusarium graminearum* from maize and rice in 2009 in Korea. *The Plant Pathology Journal*, 26(4), 321-327.
- Luongo, D., De Luna, R., Russo, R., Severino, L., 2008. Effects of four *Fusarium* toxins (fumonisin B1, α -zearalenol, nivalenol and deoxynivalenol) on porcine whole-blood cellular proliferation. *Toxicon*, 52(1), 156-162.
- Magan, N., Aldred, D., 2007. Why do fungi produce mycotoxins?. In *Food Mycology* (pp. 135-148). CRC Press.
- Maragos, C., 2010. Zearalenone occurrence and human exposure. *World Mycotoxin Journal*, 3(4), 369-383.
- Marin, S., Magan, N., Serra, J., Ramos, A., Canela, R., Sanchis, V., 1999. Fumonisin B1 production and growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* on maize, wheat, and barley grain, *Journal of Food Protection*, 64, 921-4.
- Marín, S., Magan, N., Ramos, A., Sanchis, V., 2004. Fumonisin-producing strains of *Fusarium*: a review of their ecophysiology. *Journal of food protection*, 67(8), 1792-1805.
- Marín, P., 2010. Análisis de factores ecofisiológicos que influyen en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de toxinas en especies de "*Fusarium*". Tesis de la Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología III, <https://hdl.handle.net/20.500.14352/47420>
- Mauro, A., Battilani, P., Callicott, K., Giorni, P., Pietri, A., Cotty, P., 2013. Structure of an *Aspergillus flavus* population from maize kernels in northern Italy. *International journal of food microbiology*, 162(1), 1-7.
- Mehl, H., Cotty, P., 2010. Variation in competitive ability among isolates of *Aspergillus flavus* from different vegetative compatibility groups during maize infection. *Phytopathology*, 100(2), 150-159.
- Mulè, G., Logrieco, A., Stea, G., Bottalico, A., 1997. Clustering of trichothecene-producing *Fusarium* strains determined from 28S ribosomal DNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(5), 1843-1846.
- Munkvold, G., Desjardins, A., 1997. Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence?. *Plant disease*, 81(6), 556-565.
- Mirete, S., Vázquez, C., Mulè, G., Jurado, M., González-Jaén, M., 2004. Differentiation of *Fusarium verticillioides* from banana fruits by IGS and EF-1 α sequence analyses. In: Mulè, G.,

Bailey, J.A., Cooke, B.M., Logrieco, A. (eds) Molecular Diversity and PCR-detection of Toxigenic *Fusarium* Species and Ochratoxigenic Fungi. Springer, Dordrecht.

- Nielsen, L., Jensen, J., Nielsen, G., Jensen, J., Spliid, N., Thomsen, I., Justesen, A., Collinge, D., Jørgensen, L., 2011. *Fusarium* head blight of cereals in Denmark: species complex and related mycotoxins. *Phytopathology*. 101:960–969.
- 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.
- Pan, D., Mionetto, A., Calero, N., Reynoso, M., Torres, A., Bettucci, L., 2016. Population genetic analysis and trichothecene profiling of *Fusarium graminearum* from wheat in Uruguay.
- Pasquali, M., Beyer, M., Logrieco, A., Audenaert, K., Balmas, V., Basler, R., Anne-Laure, B., Chrpová, J., Czembor, E., Gagkaeva, T., González-Jaén, M., Hofgaard, I., Köycü, N., Hoffmann, L., Lević, J., Marin, P., Miedaner, T., Migheli, Q., Moretti, A., Müller, M., Munaut, F., Parikka, P., Pallez-Barthel, M., Piec, J., Scauflaire, J., Scherm, B., Stanković S., Thrane, U., Uhlig, S., Vanheule, A., Yli-Mattila, T., Vogelgsang, S., 2016. A European database of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* trichothecene genotypes. *Frontiers in microbiology*, 7, 406.
- Prodi, A., Purahong, W., Tonti, S., Salomoni, D., Nipoti, P., Covarelli, L., Pisi, A., 2011. Difference in chemotype composition of *Fusarium graminearum* populations isolated from durum wheat in adjacent areas separated by the Apennines in Northern-Central Italy. *Plant Pathol J.* 27:354–359
- Ramirez, M., Chulze, S., Magan, N., 2004. Impact of environmental factors and fungicides on growth and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentinian wheat. *Crop Protection*, 23(2), 117-125.
- Ramirez, M., 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. *International journal of food microbiology*, 106(3), 291-296.
- Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Allameh, A., Kazeroon-Shiri, A., Ranjbar-Bahadori, S., Mirzahoseini, H., Rezaee, M., 2006. A survey on distribution of *Aspergillus* section *Flavi* in corn field soils in Iran: population patterns based on aflatoxins, cyclopiazonic acid and sclerotia production. *Mycopathologia*, 161, 183-192.

- Resnik, S., González, H., Pacin, A., Viora, M., Caballero, G., Gros, E., 1996. Cyclopiazonic acid and aflatoxins production by *Aspergillus flavus* isolated from Argentinian corn. *Mycotoxin Research*, 12, 61-66.
- Salay, E., Mercadante, A., 2002. Mycotoxins in Brazilian corn for animal feed: occurrence and incentives for the private sector to control the level of contamination. *Food Control*, 13(2), 87-92.
- Sampietro, D., Díaz, C., Gonzalez, V., Vattuone, M., Ploper, L., Catalan, C., Ward, T., 2011. Species diversity and toxigenic potential of *Fusarium graminearum* complex isolates from maize fields in northwest Argentina. *Int J Food Microbiol.*145:359–364
- Samsudin, N., 2015. Potential biocontrol of fumonisin B1 production by *Fusarium verticillioides* under different ecophysiological conditions in maize. Applied Mycology Group Cranfield Soil and Agrifood Institute School of Energy, Environment and Agrifood. PHD THESIS CRANFIELD UNIVERSITY
- Sanchis, V., Magan, N., 2004. Environmental conditions affecting mycotoxins. In: Magan, N., Olsen, M. (Eds.), *Mycotoxins in Food*. Woodhead Publishing, Cambridge, England, pp. 174-189.
- Santin, E., 2008. crecimiento de los hongos toxicogénicos y producción de micotoxinas. En: El libro Azul de Micotoxinas (Ed. Diaz, D.). Nottingham University Press, Nottingham, UK. pp 239-250.
- Scoz, L., Astolfi, P., Reartes, D., Schmale III, D., Moraes, M., Del Ponte, E., 2009. Trichothecene mycotoxin genotypes of *Fusarium graminearum* sensu stricto and *Fusarium meridionale* in wheat from southern Brazil. *Plant Pathology*, 58(2), 344-351.
- Tan, M., Niessen, L., 2003. Analysis of rDNA ITS sequences to determine genetic relationships among, and provide a basis for simplified diagnosis of, *Fusarium* species causing crown rot and head blight of cereals. *Mycological Research* 107, 811–821.
- Tran-Dinh, N., Pitt, J., Markwell, P., 2014. Selection of non-toxigenic strains of *Aspergillus flavus* for biocontrol of aflatoxins in maize in Thailand. *Biocontrol science and Technology*, 24(6), 652-661.
- Umpiérrez-Failache, M., Garmendia, G., Pereyra, S., Rodríguez-Haralambides, A., Ward, T., Vero, S., 2013. Regional differences in species composition and toxigenic potential among *Fusarium* head blight isolates from Uruguay indicate a risk of nivalenol contamination in new wheat production areas. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), 135-140.
- Vaamonde, G., Patriarca, A., Pinto, V., Comerio, R., Degrossi, C., 2003. Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *Flavi* from different substrates in

Argentina. International journal of food microbiology, 88(1), 79-84.

- Ward, T., Bielawski, J., Kistler, H., Sullivan, E., O'Donnell, K., 2002. Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99(14), 9278-9283.
- Ward, T., Clear, R., Rooney, A., O'Donnell, D., Gaba, D., Patrick, S., Starkey, D., Gilbert, J., Geiser, D., Nowicki, T., 2008. An adaptive evolutionary shift in *Fusarium* head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America. Fungal and Genetics Biology 45, 473-484.
- Zhang, J., Li, H., Dang, F., Qu, B., Xu, Y., Zhao, C., Liao, Y., 2007. Determination of the trichothecene mycotoxin chemotypes and associated geographical distribution and phylogenetic species of the *Fusarium graminearum* clade from China. Mycological research, 111(8), 967-975.
- Zhang H, Van der Lee T, Waalwijk C, Chen W, Xu Jin, Xu Jinsheng, Zhang Y, Feng J. 2012. Population analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat in China show a shift to more aggressive isolates. PLoS One, 7(2), 31722.

Capítulo 3.

Análisis *in vitro* del perfil de sensibilidad de las principales especies de *Fusarium* a antifúngicos de uso convencional

Introducción

Los cereales representan uno de los cultivos más importantes ya que constituyen la base de la alimentación humana, siendo el maíz el principal cereal cultivado a nivel mundial desde los últimos 20 años (FAOSTAT, 2023). Sin embargo, bajo condiciones climáticas adecuadas, la contaminación de este cultivo con especies de hongos toxicogénicos causa importantes pérdidas económicas y productivas. Entre las principales especies de hongos toxicogénicos se encuentran *Fusarium* y *Aspergillus*, que puede contaminar al cultivo desde la maduración del grano, y producir múltiples micotoxinas que se pueden acumular en los productos finales (Logrieco et al. 2002; Logrieco et al. 2007). En el presente trabajo se demostró que las principales especies toxicogénicas contaminantes del maíz en nuestro país pertenecen a *F. verticillioides*, *F. graminearum* s.s. y *A. flavus*. Identificándose a las fumonisinas como las principales contaminantes en las muestras analizadas, seguidas de DON y ZEA.

Dado que la contaminación del maíz con hongos toxicogénicos es cada vez más frecuente a nivel mundial, existe una necesidad urgente de poder controlar estos patógenos (Folcher et al. 2009; EFSA 2014). Se han desarrollado múltiples estrategias en este sentido como ser, desarrollo de cultivares híbridos, modificación en prácticas de manejo a campo y el uso de controladores biológicos (Folcher et al. 2009; Mesterhazy et al. 2012, Abdallah et al. 2018). Sin embargo el uso de controladores químicos es aún considerado una herramienta clave en limitar las enfermedades causadas por hongos en los principales cultivos destinados a alimentación. Actualmente es poca la información en relación a la eficacia de los fungicidas para el control fúngico en maíz (Blandino et al. 2004). Al momento no hay tratamientos químicos que permitan el control de enfermedades del maíz causadas por especies de *Fusarium*. Asimismo, los fungicidas no serían suficientes para el control de especies de este género y su eficacia estaría fuertemente influenciada por la presión de la enfermedad (Blandino et al., 2012; Scarpino et al., 2015). También hay que considerar que su uso puede resultar en un aumento significativo de la contaminación del cultivo con micotoxinas (Simpson et al., 2001). El carbendazim es un fungicida de amplio espectro, perteneciente al grupo de los benzimidazoles, capaz de proporcionar un control eficaz de las enfermedades fúngicas en una variedad de cultivos. Su mecanismo de acción consiste en inhibir la mitosis mediante su unión a la β -tubulina generando alteraciones a nivel del ensamblado de los microtúbulos, esencial para la

formación del huso cromático en la división celular, por lo que las células detienen su multiplicación llevando a la detención del crecimiento y muerte (Zhou et al., 2016). Los fungicidas azoles son utilizados para el control de un amplio espectro de patógenos fúngicos de plantas y varios estudios indican que son los más efectivos para el control de especies de *Fusarium* (Pirgozliev et al., 2002; Amarasinghe et al., 2013). Su mecanismo de acción radica en actuar inhibiendo la síntesis de ergosterol mediante la inhibición de la enzima citocromo P450 esterol 14 α - desmetilasa (CYP51), llevando a la pérdida de la integridad de la membrana (Buchenauer, 1987). Sin embargo, la utilización a largo plazo y el uso excesivo de estos compuestos químicos en los diferentes cultivos ha causado la emergencia de patógenos resistentes. Teniendo todo esto en consideración, es de gran importancia el estudio de diferentes fungicidas tanto en ensayos iniciales *in vitro* para luego desarrollar ensayos a campo para valorar los efectos potenciales de su aplicación en el cultivo.

Objetivo

- Evaluar la sensibilidad de las principales especies toxicogénicas de *Fusarium* a fungicidas de uso común

La hipótesis en relación a este objetivo:

- Las especies *Fusarium verticillioides* y *Fusarium graminearum* aisladas de maíz muestran diferentes niveles de sensibilidad a los fungicidas, con variaciones en la eficacia que puede estar asociada al tipo de fungicida utilizado, factores genéticos o a la historia de exposición a fungicidas de estas especies

Materiales y métodos

Se determinó la sensibilidad a fungicidas de las dos especies prevalentes de *Fusarium*, *F. verticillioides* y *F. graminearum* s. s., en base a la metodología descrita por Becher et al. (2010). Se utilizaron dos grupos de fungicidas, los triazoles y los benzimidazoles. Los fungicidas seleccionados pertenecientes al grupo de los triazoles fueron metconazol, tebuconazol y epoxiconazol, mientras que el carbendazim fue el representante utilizado perteneciente al grupo de los benzimidazoles. El ensayo fue realizado sobre un total de 40 cepas, 20 de *F. graminearum* s. s. y 20 de *F. verticillioides*, 10 cepas de cada zafra estudiada (2018 y 2019), todas ellas seleccionadas al azar. Los fungicidas fueron diluidos en dimetilsulfóxido (DMSO) e incorporados al medio Papa Dextrosa Agar (PDA) para lograr concentraciones de 0.25, 0.50, 0.75, 1.5, 3, 6 y 10 mg/L. Se realizaron tres réplicas de cada concentración de fungicida por cepa. Un disco de micelio de 8 mm de diámetro de cada aislamiento tomado de una colonia de 5 días fue colocado en el centro de placas conteniendo PDA con los distintos fungicidas a las concentraciones mencionadas.

Las cepas de *F. verticillioides* se incubaron durante 7 días a 25 °C en oscuridad, mientras que las cepas de *F. graminearum* s. s. se incubaron durante 5 días en las mismas condiciones.

Los diámetros de las colonias fueron medidos diariamente en dos direcciones perpendiculares. La evaluación se realizó en base al crecimiento radial en las placas conteniendo PDA con diferentes concentraciones de fungicidas, en comparación a placas control que contenían PDA+DMSO (Becher et al., 2010; Tateishi et al., 2010). Se determinó la concentración efectiva de cada fungicida que logró la inhibición del 50% (EC50) del crecimiento micelial de cada cepa. La dosis EC50 se calculó en base al análisis por regresión lineal de los valores de inhibición del crecimiento relativo frente a las concentraciones de fungicida transformadas por logaritmo en base 10 según el modelo Probit (Finney 1952). Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de los valores de EC50 obtenidos para determinar diferencias en sensibilidad entre las diferentes especies (*F. verticillioides* y *F. graminearum* s. s.), entre los distintos fungicidas y entre las especies para un mismo fungicida. Las medias se compararon utilizando el test de Fisher (LSD) ($\alpha = 0.05$). Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa Infostat (Di Rienzo et al., 2011).

Resultados

Teniendo en consideración el total de cepas de *F. verticillioides* analizadas (n=20), los valores de EC50 de epoxiconazol estuvieron comprendidos entre 0,002 y 0,107 mg/L con una media de 0,050 mg/L (Figura 3-1). En lo que respecta al carbendazim, el rango de sensibilidad estuvo comprendido entre 0,181 y 0,651 mg/L con un valor de media de 0,410 mg/L (Figura 3-1). Los niveles de EC50 para el tebuconazol estuvieron comprendidos en un rango de 0,040 mg/L a 0,499 mg/L con una media de 0,107 mg/L (Figura 3-1). Finalmente, los valores de EC50 del metconazol estuvieron comprendidos entre 0,009 mg/L y 0,186 mg/L con una media de 0,340 mg/L (Figura 3-1). En la tabla 3-1 se observan los valores de EC50 para cada cepa estudiada de *F. verticillioides*, puede apreciarse que la cepa A61 fue la que presentó los menores niveles de sensibilidad frente a tebuconazol y metconazol del total de las cepas analizadas, con valores de EC50 de 0,499 y 0,186 mg/L, respectivamente.

Tabla 3-1. Valores de EC50 de las cepas de *F. verticillioides* frente a los diferentes fungicidas estudiados

	<i>F. verticillioides</i>	Origen	epoxiconazol (mg/L)	carbendazim (mg/L)	tebuconazol (mg/L)	metconazol (mg/L)
2018	A1	Florida	0,050	0,367	0,080	0,037
	A46	Rio Negro	0,003	0,387	0,046	0,009
	A52	Rio Negro	0,060	0,433	0,077	0,018
	A54	Paysandú	0,075	0,245	0,095	0,021
	A58	Colonia	0,066	0,382	0,116	0,045
	A61	Durazno	0,091	0,537	0,499	0,186
	A66	Colonia	0,044	0,365	0,065	0,028
	A67	Durazno	0,057	0,417	0,069	0,026
	A68	Colonia	0,047	0,651	0,066	0,032
	A119	Rocha	0,088	0,181	0,111	0,024
2019	A531	Rio Negro	0,061	0,549	0,116	0,023
	A536	Soriano	0,056	0,271	0,120	0,034
	A550	Soriano	0,002	0,504	0,072	0,018
	A562	Colonia	0,037	0,358	0,074	0,019
	A571	Colonia	0,036	0,389	0,057	0,013
	A591	Soriano	0,097	0,508	0,094	0,030
	A595	Soriano	0,005	0,596	0,127	0,049
	A600	Colonia	0,107	0,409	0,112	0,035
	A624	Colonia	0,018	0,215	0,040	0,009
	A760	San José	0,003	0,445	0,113	0,027

En lo que respecta a las cepas de *F. verticillioides*, no se observaron diferencias entre los valores de EC50 exhibidos para el metconazol y el epoxiconazol, sin embargo, el tebuconazol demostró ser el menos efectivo, mostrando diferencias significativas ($p=0.0029$ y $p=0.0155$) cuando se lo comparó con metconazol y epoxiconazol. Asimismo, los aislamientos mostraron ser menos sensibles a la presencia de carbendazim ($p < 0.0001$).

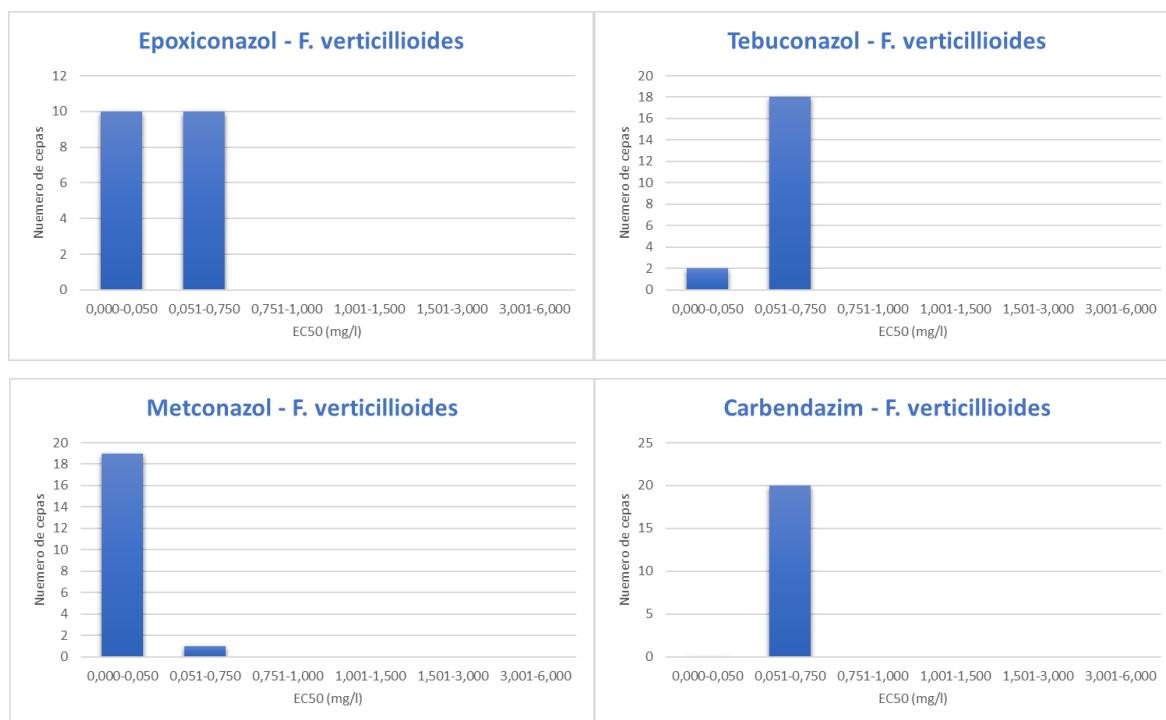


Figura 3-1. Rangos de EC50 de los fungicidas analizados para las cepas de *F. verticillioides* estudiadas

De las cepas de *F. graminearum* s.s estudiadas (n=20), los valores de EC50 correspondientes al grupo de los triazoles, se vio una variación entre 0,217 mg/L y 4,544 mg/L con una media de 1,565 mg/L para el epoxiconazol, 0,001 mg/L a 0,710 mg/L con una media de 0,156 mg/L para el metconazol y 0,040 mg/L a 1,788 mg/L con una media de 0,974 mg/L para el tebuconazol (Tabla 3-2). Por otro lado, los valores de EC50 para el carbendazim estuvieron comprendidos entre 0,130 mg/L y 1,145 mg/L con una media de 0,649 mg/L (Tabla 3-2).

Tabla 3-2. Valores de EC50 de las cepas de *F. graminearum* s. s. frente a los diferentes fungicidas estudiados

	<i>F. graminearum</i> s. s.	Origen	epoxiconazol (mg/L)	metconazol (mg/L)	tebuconazol (mg/L)	carbendazim (mg/L)
2018	A211	Colonia	0,217	0,001	0,040	0,440
	A364	Colonia	0,930	0,166	0,995	0,130
	A367	Colonia	0,558	0,026	0,858	0,649
	A368	Colonia	0,958	0,132	0,748	0,175
	A451	Soriano	0,521	0,074	0,392	0,760
	A461	Colonia	1,439	0,045	0,247	0,690
	A480	Colonia	0,605	0,023	0,140	0,473
	A484	Colonia	1,738	0,088	1,052	0,423
	A489	Soriano	0,499	0,077	0,431	0,750
	A511	Colonia	1,596	0,343	1,578	0,897
2019	A539	Soriano	3,939	0,126	0,471	0,712
	A560	Soriano	4,544	0,403	4,658	1,087
	A545	Soriano	2,155	0,710	1,656	1,145
	A638	Colonia	1,050	0,110	0,433	0,478
	A647	Soriano	0,703	0,032	0,456	0,613
	A650	Soriano	2,934	0,177	1,120	1,166
	A673	Colonia	1,134	0,098	0,642	0,496
	A676	Colonia	3,085	0,179	1,350	0,708
	A752	Soriano	1,830	0,265	1,788	0,839
	A754	Soriano	0,860	0,042	0,416	0,346

En relación con el epoxiconazol, las cepas A539 y A560 fueron las que mostraron menor sensibilidad, con valores de EC50 de 3,939 y 4,544 mg/L, respectivamente (Tabla 3-2). Además, las cepas A545 y A560 mostraron los menores niveles de sensibilidad al metconazol con valores de 0,710 y 0,403 mg/L, respectivamente (Tabla 3-2).

Por otro lado, las cepas de *F. graminearum* s. s. mostraron ser más sensibles al metconazol cuando se lo comparó con el resto de los fungicidas analizados ($p < 0.005$) y el epoxiconazol fue el fungicida menos eficiente en el control de crecimiento de las cepas de *F. graminearum* s. s. ($p=0.0202$, $p<0.0001$, $p=0.0045$ para tebuconazol, metconazol y carbendazim, respectivamente) (Figura 3-2).

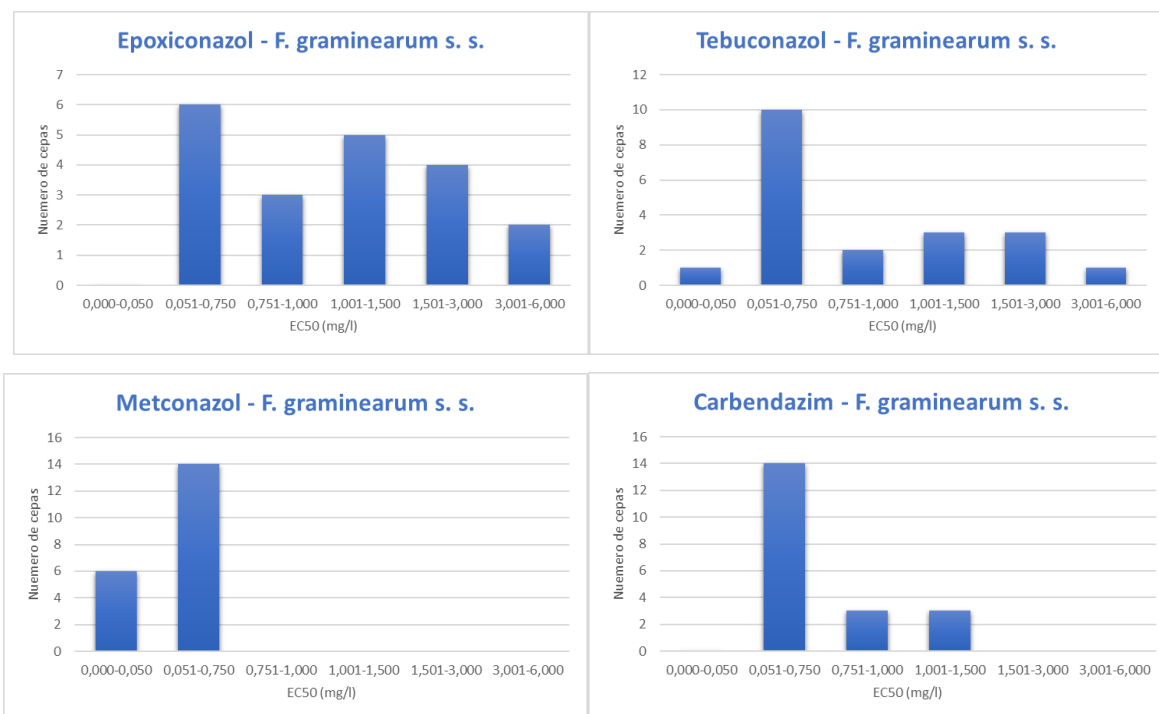


Figura 3-2. Rangos de EC50 de los fungicidas analizados para las cepas de *F. graminearum* s. s. estudiadas

En general, las cepas de *F. verticillioides* demostraron ser más sensibles cuando se las compara con las de *F. graminearum* s. s. para todos los fungicidas analizados ($p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $p = 0.0032$, $p = 0.0017$ para epoxiconazol, tebuconazol, metconazol y carbendazim, respectivamente) (Figura 3-3).

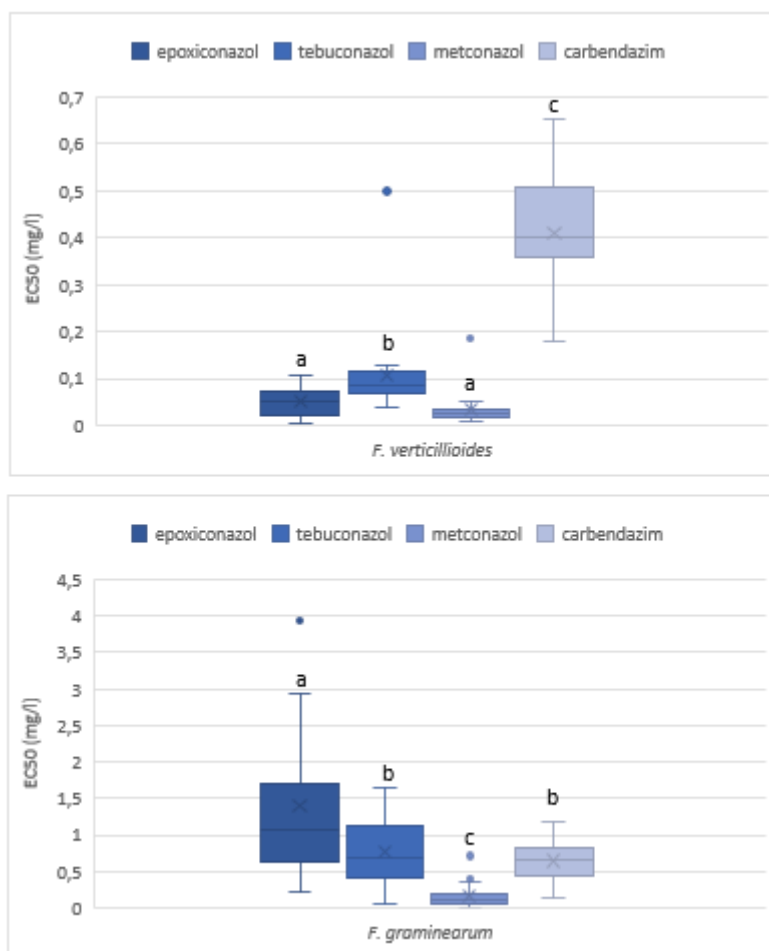


Figura 3-3. Concentraciones de EC50 de cada fungicida para los aislamientos de *F. verticillioides* y *F. graminearum* s. s. estudiados. Las letras minúsculas indican diferencias entre los fungicidas dentro de cada especie (Fisher LSD $p < 0.05$).

Para todos los fungicidas analizados, las cepas menos sensibles pertenecieron a *F. graminearum* s. s.. Los valores de EC50 para los aislamientos de *F. graminearum* s. s. con menor sensibilidad fueron de 4,544 mg/l para epoxiconazol, 0,710 mg/L para metconazol, 4,658 mg/L para tebuconazol y 1,166 mg/l para carbendazim.

Discusión

El uso de fungicidas químicos para el control de los hongos del género *Fusarium*, que causan la pudrición de la mazorca, no es una práctica habitual en el cultivo de maíz y pocos estudios han demostrado la eficacia de los fungicidas en el control de estas especies, especialmente las comprendidas en el complejo *Fusarium fujikuroi* (Masiello et al., 2019; Tava et al., 2021). Este estudio aporta nueva información sobre la sensibilidad de las principales especies toxicogénicas de *Fusarium* involucradas en la pudrición de la mazorca frente a diferentes fungicidas comúnmente utilizados en otros cultivos. La sensibilidad de cepas uruguayas de *F. verticillioides* frente a los fungicidas testeados fue similar a la reportada por otros autores años anteriores en diferentes

regiones geográficas (Ivić et al., 2011; Marin et al., 2013). Recientemente, Masiello et al., (2019) reportó una inhibición de crecimiento promedio del 95% a concentraciones de 0.9 mg/L de metconazol, en concordancia con los resultados aquí obtenidos. En ese mismo trabajo se informó inhibición del crecimiento en el 97% de las cepas de *F. verticillioides* a concentraciones de tebuconazol de 3,2 mg/L, mostrando las especies de nuestro país mayor sensibilidad a este fungicida con una inhibición del 100% a concentraciones de 0,75 mg/L. No hay trabajos en los que se informe la sensibilidad de *F. verticillioides* frente a epoxiconazol y carbendazim. Sin embargo, en este trabajo se evidenció que estos no fueron los de mayor eficacia en el control del crecimiento de hongos de esta especie. De forma similar, el metconazol fue el fungicida más eficiente en la inhibición del crecimiento de cepas uruguayas de *F. graminearum* s.s., seguido de carbendazim, a pesar de que algunos estudios informan sobre la presencia de aislamientos resistentes a benzimidazol en otros cultivos (Brent y Hollomon 2007; Chen et al. 2007; Liu et al., 2010). En relación con otros trabajos realizados en la región, los valores máximos de EC50 aquí obtenidos para metconazol (0,710 mg/L) fueron sensiblemente mayores a los reportados por Garmendia et al., (2018) y Spolti et al., (2012), quienes encontraron niveles máximos de 0,362 mg/L, en cepas uruguayas de *F. graminearum* s.s. aisladas de cebada y niveles de 0,320 mg/L, en aislamientos de trigo en Brasil, respectivamente. Demostrando que nuestros aislamientos fueron más resistentes a este fungicida.

Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas en la sensibilidad de las dos principales especies toxicogénicas de *Fusarium* asociadas al maíz frente a cuatro fungicidas de uso habitual, y se observó que *F. verticillioides* fue más sensible a la presencia de fungicidas que *F. graminearum* s.s. Esta diferencia en la sensibilidad podría deberse a la exposición a largo plazo de aislamientos de *F. graminearum* s.s. a las diferentes clases de fungicidas, además, se sabe que *F. graminearum* s.s. es el patógeno más frecuente en trigo y cebada en Uruguay, causando la fusariosis de la espiga de trigo (Umpierrez et al., 2013; Garmendia et al., 2018). Estos cultivos, especialmente el trigo, son usualmente tratados con fungicidas para el control de esta enfermedad. Por otro lado, en este trabajo se demostró que *F. verticillioides* es un contaminante asociado principalmente al maíz, y en Uruguay, no es frecuente el uso de fungicidas en este cultivo, ya que su principal destino es la alimentación del ganado y se consume principalmente en el propio establecimiento. Este ensayo *in vitro* utilizando fungicidas disponibles en el mercado, nos brinda información para seleccionar el químico más eficiente en el control del crecimiento de las principales especies fúngicas toxicogénicas asociadas al maíz. Estos resultados deberían corroborarse a campo y comprobar así la eficacia observada en los ensayos *in vitro*.

Bibliografía

- Abdallah, M., Ameye, M., De Saeger, S., Audenaert, K., Haesaert, G., 2018. Biological control of mycotoxigenic fungi and their toxins: An update for the pre-harvest approach. In *Fungi and Mycotoxins—Their Occurrence, Impact on Health and the Economy as Well as Pre- and Postharvest Management Strategies*; Berka Njobeh, P., Ed.; IntechOpen: London, UK.
- Amarasinghe, C., Tamburic-Ilincic, L., Gilbert, J., Brûlé-Babel, A., Dilantha Fernando, W., 2013. Evaluation of different fungicides for control of *Fusarium* head blight in wheat inoculated with 3ADON and 15ADON chemotypes of *Fusarium graminearum* in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 35(2), 200-208.
- Becher, R., Hettwer, U., Karlovsky, P., Deising, H., Wirsal, S. 2010. Adaptation of *Fusarium graminearum* to tebuconazole yielded descendants diverging for levels of fitness, fungicide resistance, virulence, and mycotoxin production. *Phytopathology* 100:444-453.
- Blandino, M., Haidukowski, M., Pascale, M., Plizzari, L., Scudellari, D., Reyneri, A., 2012. Integrated strategies for the control of *Fusarium* head blight and deoxynivalenol contamination in winter wheat. *Field Crops Res.* 133, 139–149.
- Blandino, M., Reyneri, A., Vanara, F., Ferrero, C., 2004. Control of mycotoxins in corn from harvesting to processing operation. In *Proceedings of the International Quality Grains Conference*, Indianapolis, Indiana, IN, USA, 19–22
- Brent, K., Hollomon, D., 2007. Fungicide resistance: the assessment of risk. In *Global Crop Protection Federation. (FRAC Monograph No. 2.)*; The Fungicide Resistance Action Committee Brussels: Brussels, Belgium
- Buchenauer, H. 1987. Mechanism of action of triazole fungicides and related compounds. Pages 205-232 in: *Modern Selective Fungicides*. H. Lyr, ed. Gustav-Fischer-Verlag, Jena, Germany.
- Chen, C., Wang, J., Luo, Q., Yuan, S., Zhou, M., 2007. Characterization and fitness of carbendazim-resistant strains of *Fusarium graminearum* (wheat scab). *Pest Manag Sci* 63:1201–1207
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C., 2020. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2014. Evaluation of the increase of risk for public health related to a possible temporary derogation from the maximum level of

deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins for maize and maize products. EFSA J., 12, 3699.

- Folcher, L., Jarry, M., Weissenberger, A., G rault, F., Eychenne, N., Delos, M., Regnault-Roger, C., 2009. Comparative activity of agrochemical treatments on mycotoxin level with regard to corn borers and *Fusarium* mycoflora in maize (*Zea mays* L.) fields. Crop Prot., 28, 302–308.
- Garmendia, G., Pattarino, L., Negrin, C., Martinez-Silveira, A., Pereyra, S., Ward, T., Vero, S., 2018. Species composition, toxigenic potential and aggressiveness of *Fusarium* isolates causing Head blight of barley in Uruguay. Food Microbiol 76:426–433
- Ivi , D., Sever, Z., Kumanovska, B., 2011. In vitro sensitivity of *Fusarium graminearum*, *F. avenaceum* and *F. verticillioides* to carbendazim, tebuconazole, flutriafol, metconazole and prochloraz. Pestic Phytomed (belgrade) 26:35–42
- Liu, S., Chen, Y., Yu, J., Chen, C., Wang, J., Zhou, M., 2010. Transfer of the beta-tubulin gene of *Botrytis cinerea* with resistance to carbendazim into *Fusarium graminearum*. Pest Manag Sci 66:482–489
- Logrieco, A., Mul , G., Moretti, A., Bottalico, A., 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. In Mycotoxins in Plant Disease; Logrieco, A., Bailey, J., Corazza, L., Cooke, B., Eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands; pp. 597–609. ISBN 0-4020-0871-6.
- FAOSTAT. Acceso online: www.fao.org/faostat/en (visitado el 9 marzo de 2023).
- Logrieco, A., Moretti, A., Perrone, G., Mul , G., 2007. Biodiversity of complexes of mycotoxigenic fungal species associated with *Fusarium* ear rot of maize and *Aspergillus* rot of grape. Int. J. Food Microbiol., 119, 11–16.
- Marín, P., De Ory, A., Cruz, A., Magan, N., González-Jaén, M., 2013. 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 165:251–258
- Masiello, M., Somma, S., Ghionna, V., Logrieco, A., Moretti, A., 2019. In Vitro and in Field Response of Different Fungicides against *Aspergillus flavus* and *Fusarium* Species Causing Ear Rot Disease of Maize. Toxins, 11, 11.
- Mesterh zy,  ., Lemmens, M., Reid, L., 2012. Breeding for resistance to ear rots caused by *Fusarium* spp. in maize—a review. Plant breeding, 131(1), 1-19.

- Pirgozliev, S., Edwards, S., Hare, M., Jenkinson, P., 2002. Effect of dose rate of azoxystrobin and metconazole on the development of *Fusarium* head blight and the accumulation of deoxynivalenol (DON) in wheat grain. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 469-478.
- Scarpino, V., Reyneri, A., Sulyok, M., Krska, R., Blandino, M., 2015. Effect of fungicide application to control *Fusarium* head blight and 20 *Fusarium* and *Alternaria* mycotoxins in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *World Mycotoxin J.* 1–12.
- Simpson, D., Weston, G., Turner, J., Jennings, P., Nicholson, P., 2001. Differential control of head blight pathogens of wheat by fungicides and consequences for mycotoxin contamination of grain. *Eur. J. Plant Pathol.* 107, 421–431.
- Spolti, P., Del Ponte, E., Dong, Y., Cummings, J., Bergstrom, G., 2014. Triazole sensitivity in a contemporary population of *Fusarium graminearum* from New York wheat and competitiveness of a tebuconazole-resistant isolate. *Plant Dis* 98:607–613
- 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.
- Tava, V., Prigitano, A., Cortesi, P., Esposto, M., Pasquali, M., 2021. *Fusarium musae* from diseased bananas and human patients: susceptibility to fungicides used in clinical and agricultural settings. *J. Fungi (basel)* 7:784
- Umpiérrez-Failache, M., Garmendia, G., Pereyra, S., Rodríguez-Haralambides, A., Ward, T., Vero, S., 2013. Regional differences in species composition and toxigenic potential among *Fusarium* head blight isolates from Uruguay indicate a risk of nivalenol contamination in new wheat production areas. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), 135-140.
- Zhou, Y., Xu, J., Zhu, Y., Duan, Y., Mingguo, Z., 2016. Mechanism of Action of the Benzimidazole Fungicide on *Fusarium graminearum*: Interfering with Polymerization of Monomeric Tubulin But Not Polymerized Microtubule. *Phytopathology*.

Capítulo 4.

Impacto de la co-existencia de especies fúngicas en el crecimiento y producción de micotoxinas en granos de maíz

Introducción

El maíz es un sustrato en el que es frecuente encontrar co-ocurrencia de especies toxicogénicas, como se demostró en este trabajo, donde se evidencio la presencia tanto de *F. verticillioides*, *F. graminearum* s. s. y *A. flavus* de forma concomitante como contaminantes del cultivo. Es por esta razón que estudios sobre el posible efecto de la interacción entre las diferentes especies en relación al crecimiento y síntesis de toxinas son de gran interés. En este sentido se han postulado varias teorías, entre ellas, hay autores que plantean que como consecuencia del calentamiento global, una mayor presencia de *A. flavus* y *F. verticillioides* puede ocurrir en detrimento de la persistencia de *F. graminearum* (Juroszek y Von Tiedemann, 2013). En vistas a las consecuencias en salud humana y animal este cambio es definitivamente no deseado (Miraglia et al., 2009), considerando que las toxinas (aflatoxinas y fumonisinas) producidas por hongos de estas especies son consideradas incluso más tóxicas que otras, por ejemplo zearalenona (ZEA) y deoxynivalenol (DON). Por estas razones, es importante prevenir y conocer de antemano el efecto de la interacción entre estas especies. Se han realizado diferentes estudios sobre las principales especies que colonizan los granos de maíz (*Fusarium*, *Aspergillus*) y sus interacciones (Marín et al., 1998; Velluti et al., 2000). Existen estudios que demostraron cierta inhibición del crecimiento entre especies de *Fusarium* (Marín et al., 1998; Velluti et al., 2000), y se ha llegado a postular que granos colonizados por *Fusarium* serían resistentes a la infección por *A. flavus* (Wicklow, 1988). Otros autores plantean que los nichos ecológicos que ocupan *F. verticillioides* y *A. flavus* en el maíz son diferentes debido a que utilizan diferentes fuentes de carbono, existiendo una dominancia de *F. verticillioides* frente a *A. flavus* únicamente bajo condiciones extremas (Giorni et al., 2009). En relación al efecto de la interacción en la síntesis de toxinas, se han observado variaciones en sus concentraciones cuando otras especies toxigénicas están presentes (Velluti et al., 2000). Dado que el efecto de la interacción de especies no ha sido completamente definido, es de gran importancia continuar estudiando sus consecuencias ya que conocer cómo interactúan las distintas especies toxicogénicas nos permitiría predecir el riesgo de contaminación del sustrato por estas especies y sus micotoxinas. A su vez es necesario valorar las potenciales consecuencias de la co-existencia de las toxinas que estas especies producen, ya que la presencia de diferentes micotoxinas en un mismo sustrato puede implicar interacciones que resulten en efectos aditivos, sinérgicos y/o antagónicos entre ellas (Bracarense et al., 2012).

En relación a las técnicas disponibles para estudios de este tipo, en los últimos años el uso de las técnicas de PCR en tiempo real han permitido una estimación adecuada de la biomasa de diferentes especies fúngicas, facilitando así su identificación y cuantificación en los distintos sustratos. Para la identificación de las diferentes especies de *Fusarium* se ha implementado el uso de cebadores específicos diseñados para la amplificación de un fragmento del gen *EF1α*, ya que este gen permite diferenciar entre la mayoría de las especies del género (Kristensen et al., 2005). Para *A. flavus* la determinación de biomasa que permite la diferenciación entre cepas toxicogénicas y no toxicogénicas se basa en la amplificación de la región de segmentos espaciadores intergénicos (IGS) ya que la presencia de inserciones/deleciones en esta región permite su diferenciación (Mylroie et al. 2016).

Asimismo, la producción de toxinas se puede estimar en base a la expresión de genes involucrados en su síntesis mediante la técnica cuantitativa de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-qPCR). Las fumonisinas son micotoxinas derivadas de policétidos, producidas por varias especies de *Fusarium*, y su ruta biosintética está controlada por el grupo *fum*, un grupo de genes que exhiben un patrón de expresión común durante la biosíntesis de fumonisinas (Stępień et al., 2011). El gen *fum1* es el primer gen de la ruta biosintética para la síntesis de fumonisinas, este gen codifica una policétido sintasa, siendo su síntesis temprana un paso clave en el ensamblaje de la fumonisina (Scala et al., 2017) (Figura 4-1). Hacia abajo del gen *fum1* se ubican otros genes que codifican enzimas participantes en la síntesis de estas toxinas (Figura 1). Se ha demostrado que existen cepas de *F. verticillioides* incapaces de sintetizar fumonisinas porque tienen una mutación en el gen *fum1* o, bien, carecen del locus *fum* (Proctor et al. 1999; Glenn, et al. 2008). Asimismo se ha observado que mutaciones en otros genes del locus que hace que las cepas no sean capaces de sintetizar FB1 pero si FB2 (Proctor et al., 2006).

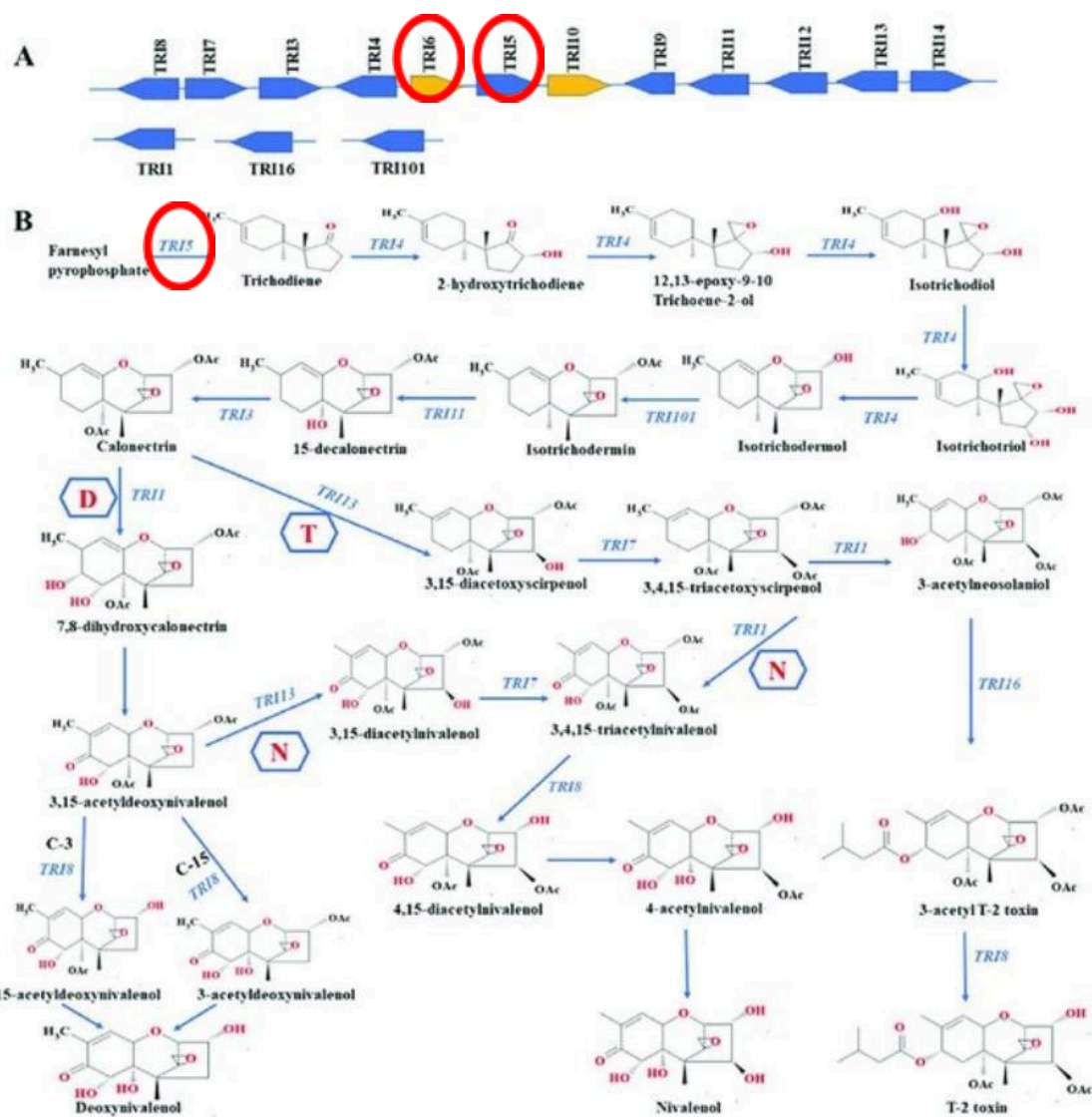


Figura 4-2. A. Genes involucrados en la producción de tricoteceno por especies de *Fusarium*. Las flechas amarillas representan los genes reguladores, el círculo rojo indica los genes utilizados en este trabajo. B. Vías de biosíntesis de tricotecenos, con los genes implicados en cada reacción y las estructuras químicas de los productos intermedios. T representa la vía biosintética de la toxina T-2; N representa la vía biosintética del nivalenol; y D representa la vía biosintética del deoxynivalenol. Tomado de: Kolawole et al. 2021.

La zearalenona (ZEA) es un policétido y se produce por la ruta del acetato-polimalonato (Dewick 2001), en la que participan las policétido sintasas fúngicas (PKS), grandes enzimas multidominio con función iterativa del tipo I (Hopwood, 1997; Kennedy et al., 1999). Hasta el momento se ha demostrado que solo cuatro genes participan en la biosíntesis de ZEA en *F. graminearum*: *pk4*, *pk13*, *zeb1* y *zeb2* (Lysøe et al., 2006; Gaffoor y Trail 2006; Huffman et al., 2010; Mahato et al. 2021), (Figura 3). Pks4 cataliza la síntesis de la estructura principal de la ZEA mediante la unión de acetil coenzima A (Co-A) y moléculas de malonil-CoA (Kim et al., 2005). La unidad inicial resultante es

un hexacétido que posteriormente sufre transilación. El gen *pks13* cataliza la extensión de esta estructura mediante la adición de tres moléculas adicionales de malonil-CoA. Posteriormente se da un proceso de aromatización espontánea no enzimática resultado en la formación de zearalenol. El paso final de la conversión de zearalenol a zearalenona está catalizada por Zeb1 (Gaffoor y Trail, 2006) (Figura 4-3). Finalmente, Zeb2 es responsable de la regulación de los genes *pks4*, *pks13* y *zeb1* (Gaffoor y Trail, 2006; Kim et al., 2005).

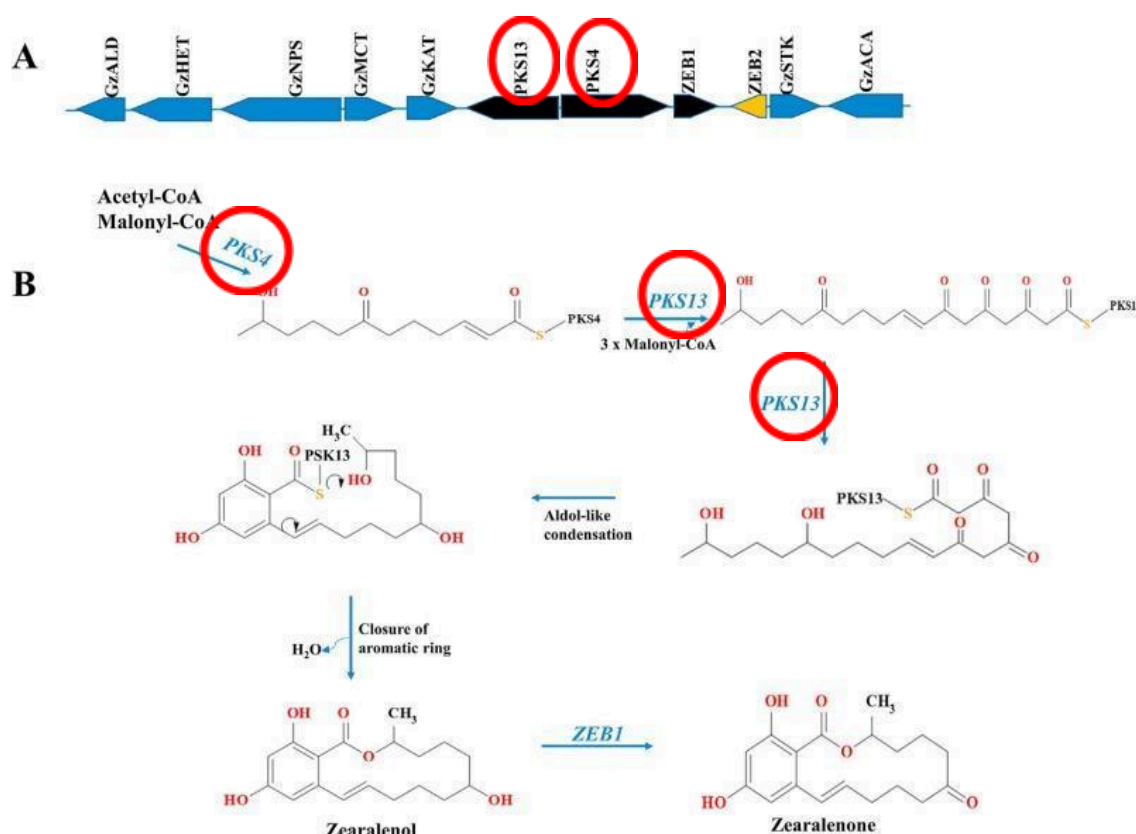


Figura 4-3. A. Cluster de genes para la síntesis de Zearalenona (ZEA) de *F. graminearum*. Las flechas en amarillo indican genes reguladores, flechas negras indican genes involucrados en la biosíntesis e ZEA, el círculo rojo indica los genes utilizados en este trabajo. B. Ruta biosintética para la síntesis de zearalenona, con los genes implicados en cada reacción y las estructuras químicas de los productos intermedios; Tomado de Kolawole et al. 2021.

Las aflatoxinas son compuestos bisfuranocumarínicos y el cluster de genes que participa en la síntesis de aflatoxinas ha sido bien estudiado y caracterizado. Se ha clasificado a los genes que participan en la ruta biosintética de estas toxinas en tres grupos; genes tempranos (*aflA*, *aflB*, *aflC*, *hypC*, *aflD*, *aflR*, *aflS*); genes medios (*aflG*, *aflH*, *aflI*, *aflK*, *aflL*, *aflM*, *aflN*, *aflV*, *aflW*), y genes tardíos (*aflO*, *aflP*, *aflQ*, *aflX*, *aflY*, *aflE*, *aflB*, *aflC* y *aflE*) (Zeng et al., 2020; Yu et al., 2004). La regulación de este cluster

de genes está a cargo de los genes *aflR* y *aflS*, siendo éstos claves en la expresión de estas toxinas (Abdel-Hadi, et al., 2011). La transcripción de genes biosintéticos de aflatoxinas puede activarse cuando la proteína expresada por el gen *aflR* se une a la secuencia palindrómica 5'-TCG(N5)CGA-3' en la región promotora de los genes estructurales, activando su transcripción (Fernandes, et al., 1998; Ehrlich, et al., 1999a; 1999b). El gen *aflS*, que reside junto al *aflR*, también está implicado en la regulación de la biosíntesis de aflatoxinas, implicado en la regulación de genes de expresión temprana actuando como cofactor del gen *aflR* (Meyers et al., 1998; Du et al., 2007). (Figura 4-4).

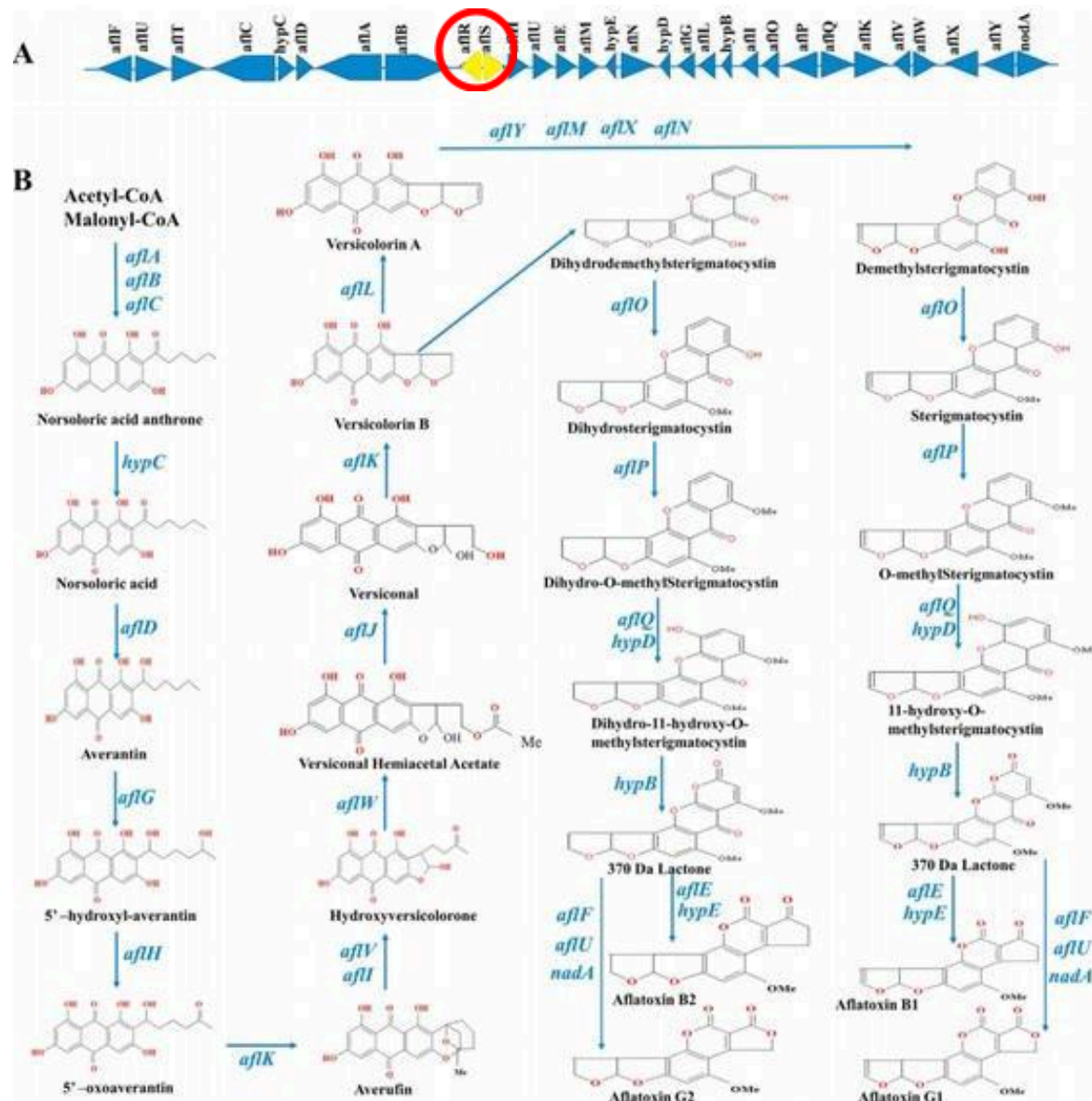


Figura 4-4. A. Cluster de genes responsables de la síntesis de aflatoxinas en *Aspergillus* spp. Las flechas amarillas indican genes reguladores, el círculo rojo indica los genes utilizados en este trabajo. B. Ruta biosintética para la síntesis de aflatoxinas, con los genes implicados en cada reacción y las estructuras químicas de los productos intermedios. Tomado de; Kolawole et al. 2021.

Es de gran interés conocer el efecto de la interacción entre las diferentes especies toxicogénicas contaminantes del maíz, para evaluar el riesgo potencial de contaminación, sabiendo que la incidencia de cada una de las toxinas producidas por estas especies podría estar influenciada por la presencia de las otras especies en el cultivo y por la existencia de condiciones ambientales favorables para el desarrollo fúngico y para la síntesis de cada una de las toxinas. Por otra parte, es importante evaluar las variaciones en el crecimiento y la síntesis de toxinas de las cepas, mediante métodos de diagnóstico moleculares rápidos y específicos para poder implementar esta herramienta en futuros estudios.

Objetivo

Determinar el efecto de la interacción entre especies fúngicas toxicogénicas aisladas de maíz a través del estudio de la expresión de genes que permiten determinar el crecimiento (estimación de biomasa) y la biosíntesis de toxinas.

Hipótesis en relación con este objetivo:

- La co-inoculación de *F. verticillioides*, *F. graminearum* y *A. flavus* en maíz afecta el crecimiento y la capacidad de síntesis de toxinas pudiendo inducir cambios significativos en la expresión génica que modulan tanto el crecimiento de los hongos como la producción de micotoxinas.
- Algunas especies pueden experimentar un crecimiento reducido o potenciado debido a las interacciones competitivas o sinérgicas entre ellas
- La síntesis de toxinas tiende a aumentar en presencia de otras especies

Materiales y métodos

Se seleccionaron cepas aisladas de granos de maíz pertenecientes a *F. verticillioides*, *F. graminearum* s. s. y *A. flavus*. Las cepas seleccionadas fueron previamente identificadas mediante métodos moleculares y se les determinó su capacidad toxigénica y se determinaron parámetros de temperatura y actividad hídrica óptimos para su crecimiento y producción de toxinas. Se seleccionaron un total de 5 cepas, 4 cepas toxigénicas que fueron seleccionadas con base en su capacidad de producir micotoxinas *in vitro* a concentraciones elevadas y además, se seleccionó una cepa no toxicogénica de *A. flavus* (Tabla 4-1).

Tabla 4-1. Cepas seleccionadas para estudio del efecto de la co-existencia de especies en el crecimiento y producción de toxinas

CEPA (código colección)	ESPECIE	TOXINAS
A68	<i>F. verticillioides</i>	FB1 y FB2
A52	<i>F. verticillioides</i>	FB1 y FB2
A368	<i>F. graminearum s. s.</i>	DON y ZEA
A36	<i>A. flavus</i>	AFB1 y AFB2
A631	<i>A. flavus</i>	No toxicogénica

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizaron un total de 6 ensayos en los que se inocularon combinaciones de las distintas especies como se detalla en la tabla 4-2.

Tabla 4-2. Cepas de especies co-inoculadas en cada ensayo experimental.

Especies para cada ensayo realizado	Códigos colección cepas co-inoculadas en cada ensayo	
<i>F. graminearum s. s.</i> + <i>F. verticillioides</i>	A368+A68	A368+A52
<i>F. graminearum s. s.</i> + <i>A. flavus</i> toxicogénico	A368+A36	
<i>F. graminearum s. s.</i> + <i>A. flavus</i> no toxigénico	A368+A631	
<i>F. verticillioides</i> + <i>A. flavus</i> toxicogénico	A68+A36	A52+A36
<i>F. verticillioides</i> + <i>A. flavus</i> no toxicogenico	A68+A631	A52+A631
<i>A. flavus</i> toxicogénico + <i>A. flavus</i> no toxigénico	A36+A631	

Los ensayos fueron incubados a 25°C y a una actividad hídrica (aw) de 0.95 durante un total de 14 días. De cada ensayo se realizaron 4 réplicas y se realizó una medición al día 5 y al día 14 de

incubación de los parámetros de crecimiento y expresión de toxinas. Además se cuantificó la concentración de micotoxinas en las muestras al finalizar incubación.

Inicialmente, las cepas seleccionadas se hicieron crecer en medios de cultivos específicos para favorecer la formación de esporas, las cepas de *Fusarium* se crecieron en medio soja-PDA (400 ml de caldo de soja (60 g de soja en 1 L de agua), 1,2% agar, 2,4% medio comercial PDA) y las de *Aspergillus* en medio PDA durante 7-10 días. De cada una de las cepas se preparó una suspensión de esporas en agua destilada esteril, con una concentración final de 10^6 esporas/mL. Se utilizaron granos de maíz previamente esterilizados por radiación gamma (12 kGy) como sustrato para los distintos ensayos. Se utilizó un tratador de semilla de aire comprimido, Wintersteiger Hege 11, para adicionar agua estéril a los granos y de esta forma alcanzar el nivel deseado de a_w (0.95). El volumen de agua a adicionar se determinó en base al contenido de humedad inicial en los granos (MC) mediante la siguiente ecuación:

$$W_f = W_o + ((1/(100 - M_f))(M_f - M_o)(W_o))$$

Donde W_f y W_o son el peso de la muestra final e inicial (kg), respectivamente y M_f y M_o es el contenido de humedad final e inicial, respectivamente. Para la correlación entre la a_w y el MC se utilizó la ecuación GAB (Guggenheim-Andersen-de Boer)(Van den Berg, 1985), que permite calcular el contenido de humedad de equilibrio (M):

$$M = \frac{m_o C K a_w}{[(1 - K a_w) (1 - K a_w + C K a_w)]}$$

Donde los parámetros m_o (contenido de humedad en la monocapa (kg/100 kg materia seca)), C y K que son constantes del modelo se obtuvieron del trabajo realizado por Samapundo et al., 2007 en los que se analizaron curvas de absorción hídrica a distintas temperaturas para granos de maíz. Siendo los valores obtenidos: m_o 7.444; C 34.557 y K 0.764 para el modelo GAB a 25°C de temperatura. Una vez hidratados los granos, se corroboraron los niveles de a_w y se almacenaron durante 48 horas en heladera para estabilizar. Se alcanzó un contenido de humedad en los granos de 20.5% lo que equivale a una a_w de 0.95. En recipientes estériles, se colocaron 200 g de granos del maíz previamente hidratado y se inocularon con 20 mL de suspensión de esporas de cada cepa. Como control se inocularon 40 mL de cada cepa por separado para poder evaluar el crecimiento de cada aislamiento. Se realizó un control negativo inoculado con agua esteril. Los granos inoculados se

incubaron en una estufa con ambiente controlado, a 25°C de temperatura como se muestra en la Figura 4-5.



Figura 4-5. Estufa de ambiente controlado para la incubación de los recipientes de los distintos ensayos

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA ANÁLISIS

Se realizaron determinaciones del nivel de biomasa fúngica y de la expresión de genes asociados a rutas biosintéticas para la síntesis de toxinas en dos oportunidades, al día 5 y al día 14 de incubación. Para esto, de cada recipiente se tomó una submuestra de 50 g de maíz que fue colocada inmediatamente en nitrógeno líquido para preservación del ARN. Para su análisis las submuestras se molieron utilizando un molinillo en el que cada muestra fue procesada de forma individual y fueron posteriormente almacenadas a -80°C para su conservación hasta su utilización.

EVALUACIÓN DE BIOMASA

Se determinaron los niveles de biomasa de cada aislamiento a los 5 y a los 14 días de incubación, se realizó la evaluación por duplicado de las cuatro réplicas de cada tratamiento y los controles de cada aislamiento. A partir de las sub-muestras almacenadas a -80°C se tomaron entre 30-90 mg de muestra y se colocaron en tubos eppendorf estériles para la posterior extracción de ADN y determinación de biomasa. Para la extracción de ADN se utilizó el kit comercial MagMAX™ Plant DNA Isolation , Thermo Scientific™ y se siguieron las instrucciones del fabricante, la extracción se

realizó utilizando un equipo KingFisher flex, Thermo Scientific™ de 96 pocillos. Una vez obtenido el ADN de cada tratamiento, se utilizaron distintos cebadores específicos para cada especie (Tabla 4-3) para estimar por qPCR la cantidad de biomasa de cada aislamiento presente en las muestras.

Tabla 4-3. Secuencias de los distintos cebadores utilizados para la cuantificación de la biomasa de cada especie fúngica

Especie	Cebador	Secuencia 5'-3'	Bibliografía
<i>F. graminearum</i> s. s.	FgramB411 rev	CCTATTGACAGGTGGTTAGTGACTGG	Nicolaisen et al. 2009
	FgramB379 fwd	CCATTCCCTGGGCGCT	
<i>F. verticillioides</i>	Fver356 fwd	CGTTTCTGCCCTCTCCCA	
	Fver412 rev	TGCTTGACACGTGACGATGA	
<i>A. flavus</i> toxicogénicos	3357-F2	GGAGCGGGATCTCAGACC	Mylroie et al. 2016
	3357-R8	GTAGGAGGTAGGGTGATCAGAGC	
<i>A. flavus</i> no toxicogénico	21882-F2 b	GGAGCGGGATCTCAGAGAC	
	3357-R8	GTAGGAGGTAGGGTGATCAGAGC	

Tanto la composición de la reacción de amplificación como el ciclado utilizado fueron los mismos para los aislamientos de *Fusarium* como los de *Aspergillus*. Para la realización de las PCR se preparó una reacción de volumen final 10 µL conteniendo, 5 µL 2× SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.3 µL de cada cebador [10 uM] y 2 µL de ADN. El protocolo de amplificación utilizado consistió en 3 min a 95°C; seguido de 39 ciclos compuestos por una primera etapa de denaturalización a 95°C 15 seg y una etapa de hibridación/extensión a 62°C por 60 seg y un paso final de 95°C por 10 seg. La curva de disociación se realizó en ciclos de 5 seg comenzando a 60°C con incrementos de 0.5°C hasta alcanzar los 95°C. Para la estimación de los niveles de biomasa de cada cepa en cada tratamiento, en cada ciclo de PCR se realizaron las curvas de calibración correspondientes a cada aislamiento que se utilizaron como referencia de crecimiento en la evaluación posterior. Para las curvas de calibración se hicieron crecer los aislamientos en medio líquido YEPD y se realizó la extracción de ADN mediante la metodología de CTAB descrita por Leslie y Summerell 2006. Una vez obtenido el ADN se midió la concentración de ADN utilizando un equipo

Nanodrop, y se realizaron 4 diluciones consecutivas 1:10 para la construcción de la curva de calibración. Para análisis de los resultados obtenidos se utilizó el programa BioRad CFX Maestro.

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS A SÍNTESIS DE TOXINAS

Para evaluar la expresión de micotoxinas, se determinaron los niveles de expresión de genes claves vinculados a la síntesis de las principales toxinas asociadas a cada especie a los 5 y a los 14 días de incubación. Se realizó la evaluación por duplicado de las cuatro réplicas de cada tratamiento y los controles de cada aislamiento. A partir de las sub-muestras almacenadas a -80°C se tomaron entre 30-90 mg de muestra y se colocaron en tubos eppendorf estériles para la posterior extracción de ARN, durante todo el procedimiento se mantuvieron las muestras en frío utilizando nitrógeno líquido. Se utilizaron kits comerciales para la extracción de ARN MagMAX™ Plant RNA Isolation, Thermo Scientific™ siguiendo las instrucciones del fabricante y la extracción se realizó utilizando un equipo KingFisher flex, Thermo Scientific™ de 96 pocillos. Una vez obtenido el ARN de cada tratamiento, se realizó la transcripción reversa para obtener el ADN copia (ADNc) para la determinación de los niveles de expresión de genes. La síntesis del ADNc se realizó utilizando el kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System para RT-PCR de Thermo Fisher siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción para la retrotranscripción de ADN consistió en la preparación de una pre-mix para la unión del cebador al fragmento de ARN que contenía; 10 µL de agua DEPC (desionizada, tratada con dietilpirocarbonato y filtrada por membrana de 0,22 µm), 1 µL de cada cebador [2 µM], 1 µL de dNTPs [10 mM de cada dNTP] y 1 µL de ARN. Esta pre-mix fue colocada a 65°C por 5 min y posteriormente incubada en hielo por 1 min. Luego se combinó la reacción anterior con un volumen final de 7 µL de una mix que contenía 4 µL de buffer, 1 µL de DTT, 1µL de inhibidor de la ribonucleasa y 1µL de transcriptasa reversa [200 U/ µL]. La combinación de reacciones se incubó a 50°C por 10 min y posteriormente 10 min a 80°C para inactivar la reacción. Una vez obtenido el ADNc de cada ensayo se procedió al análisis de la expresión de genes vinculados a la síntesis de toxinas. Para los aislamientos de *F. verticillioides* se estudiaron genes vinculados a la expresión de fumonisinas (*fum 1*), para los aislamientos de *F. graminearum* s. s. se analizaron genes vinculados a la expresión de DON (*tri5* y *tri6*), y ZEA (*pks4* y *pks13*) y finalmente, para los aislamientos toxigénicos de *A. flavus* se analizaron los genes vinculados a la expresión de aflatoxinas (*aflR* y *aflS*). Los cebadores utilizados para cada gen se resumen en la tabla 4-4.

Tabla 4-4. Secuencias de los distintos cebadores utilizados para los análisis por RT-qPCR

Especie	Toxina	Gen	Cebador	Secuencia 5'-3'	Gen constitutivo	Secuencia 5'-3'	Bibliografía
<i>F. graminearum</i> <i>S. S.</i>	DON	<i>Tri 5</i>	Tri5F	AAGAACTTTGTC ACCTGTCA	EF1-PS.1	GGCTTTCAC CGACTACCC TCCTCT	Diao et. al., 2018
			Tri5R	CCTGATCCTTGAC CTTTTCA			
		<i>Tri 6</i>	Tri6F	CGACTTGCAACT AGGGAAT			
			Tri6R	GACATTGACAAC TTCCCCA			
	ZEA	<i>PKS 4</i>	PKS4-PS.1	GTGGGCTTCGCT AGACCGTGAGTT	EF1-PS.2	ACTTCTCGA CGGCCTTGA TGACAC	Lysøe et al., 2006
			PKS4-PS.2	ATGCCCTGATGAA GAGTTTGAT			
		<i>PKS 13</i>	PKS13-PS. 1	CCCCAACTCGA CGTCAAATCTAT			
			PKS13-PS. 2	TTCTTCCCGCCGA CTTCAAAACA			
<i>F. verticillioides</i>	FBs	<i>FUM1</i>	PQF1-F	GAGCCGAGTCAG CAAGGATT	βtub_F	ACATTCGTC GGAAACTCC AC	Scala et al., 2017
			PQF1-R	AGGGTTCGTGAG CCAAGGA	βtub_R	CAGCATCCT GGTACTGCT GA	
<i>A. flavus</i>	AFs	<i>afIR</i>	AfIRTaql	TCGTCCTTATCGT TCTCAAGG	F-TUBjd	TCTTCATGGT TGGCTTCGCT	Peromingo et al., 2017
			AfIRTaqr	ACTGTTGCTACAG CTGCCACT			
		<i>afIS</i>	AfISqPCR1	TGGTGCGACCAT ATTTACA	R-TUBjd	CTTGGGGT CGAACATC TGCT	
			AfISqPCR2	GGTTGGGTCACG AACTGTTT			

La reacción de amplificación a partir de ADNc, se realizó siguiendo las recomendaciones adjuntas al Kit de SYBR green Bio Rad. Para todas las cepas, se preparó una reacción de volumen final 10 μ L conteniendo, 5 μ L 2 $\times$ SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.3 μ L de cada cebador [10 μ M] y 2 μ L de ADNc. El protocolo de amplificación de PCR utilizado tanto para el análisis de *fum 1*, como para la determinación de *afIS* y *afIR* consistió en 3 min a 95°C (1 ciclo) seguido de 39 ciclos de 10 seg a 95°C y 30 seg a 60°C. La curva de disociación se realizó en ciclos de 5 seg comenzando a 60°C con incrementos de 0.5°C hasta alcanzar los 95°C. La determinación de *tri 5* y *tri 6* se realizó con un protocolo de PCR que consistió en 3 min a 95°C (1 ciclo) seguido de 39 ciclos de 10 seg a 95°C y 30

seg a 55°C. La curva de disociación se realizó en ciclos de 5 seg comenzando a 60°C con incrementos de 0.5°C hasta alcanzar los 95°C.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el programa BioRad CFX Maestro, las determinaciones de los ciclos umbral (Ct, por sus siglas en inglés; threshold cycle (primer ciclo en el que los productos de PCR son detectados)) fueron realizadas automáticamente por el instrumento utilizando parámetros predeterminados. La estimación de biomasa se realizó mediante la comparación de la expresión de los genes mencionados en la Tabla 4-3 en cada uno de los ensayos planteados, versus la expresión de los mismos genes en las muestras control, se construyeron gráficas en las que se muestran los intervalos de confianza del 95% y se analizó la significancia de los resultados para un p -valor < 0.05 .

La comparación de los niveles de expresión entre los controles a los distintos tiempos de incubación se realizó utilizando el programa sigma stat mediante comparación de grupos por test de Student's, se consideró significativos valores de $p < 0,05$. Para estimar los niveles de expresión de los diferentes genes asociados a la síntesis de toxinas se realizó una comparación en la misma muestra entre los niveles de expresión del gen de interés (*fum1*, *tri5* y *tri6*, *pks4*, *pks13*, *aflS* y *aflR*) y los genes constitutivos para cada especie en particular (Tabla 4-4). La cuantificación es relativa al gen de constitutivo, y se calcula restando el ciclo umbral (Ct) del gen constitutivo a partir del Ct del gen de interés (ΔCt). La diferencia resultante en el número de ciclos se divide luego por el valor objetivo normalizado del calibrador y el valor obtenido ($\Delta\Delta Ct$) es el exponente de base 2 (debido a la función de duplicación de la PCR) para generar los niveles de expresión relativa. En base a los resultados, se construyeron gráficas en las que se muestran los intervalos de confianza del 95% y se analizó la significancia de los resultados para un p -valor < 0.05 .

DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE MICOTOXINAS EN LAS MUESTRAS

Luego de 14 días de incubación, las muestras fueron enviadas para la determinación de micotoxinas al laboratorio de diagnóstico veterinario de la Universidad de Iowa (ISU-VDL). La extracción de toxinas se realizó mediante solventes en base a una metodología validada por la Sección de Servicio de Análisis de la Universidad de Iowa (ISU-VDL). Las muestras fueron analizadas mediante la técnica de cromatografía líquida unida a espectrómetro de masa (LC-MS/MS). Los límites de detección para las toxinas analizadas fueron de 10 µg/kg para aflatoxinas; 100 µg/kg para DON y FB, y 200 µg/kg para ZEA.

Resultados

BIOMASA

Fusarium verticillioides

Del estudio de la interacción de las cepas de *F. verticillioides* en presencia de *A. flavus* y *F. graminearum* s. s., se desprende que hay una disminución significativa en los niveles de biomasa en presencia de cepas de *A. flavus*, tanto toxigénicas como no toxigénicas, evidenciándose esta disminución a ambos días de incubación (Figura 4-6). En relación a la presencia de *F. graminearum* s. s., no se observan diferencias estadísticas en la biomasa de *F. verticillioides* respecto al control (Figura 4-6).

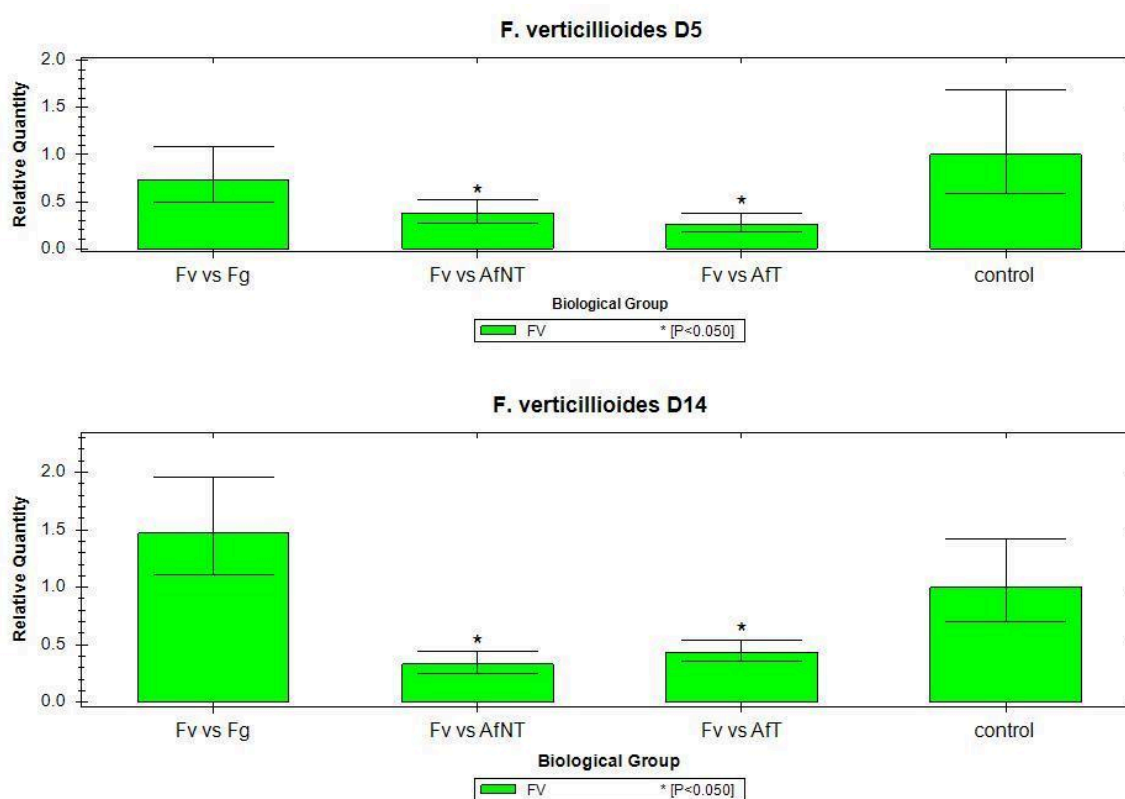


Figura 4-6. Evaluación de los niveles de biomasa al día 5 y día 14 de incubación de *F. verticillioides* (Fv) en presencia de *F. graminearum* s. s. (Fg) y *A. flavus* no toxicogénico (AfNT) y toxicogénico (AfT). Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto al control.

Fusarium graminearum s. s

La cepa de *F. graminearum* s. s. demostró una disminución significativa de su biomasa frente a la presencia de todas las especies estudiadas a los 14 días de incubación, mientras que frente a *F. verticillioides*, la disminución de biomasa se observó desde los 5 días de incubación (Figura 4-7).

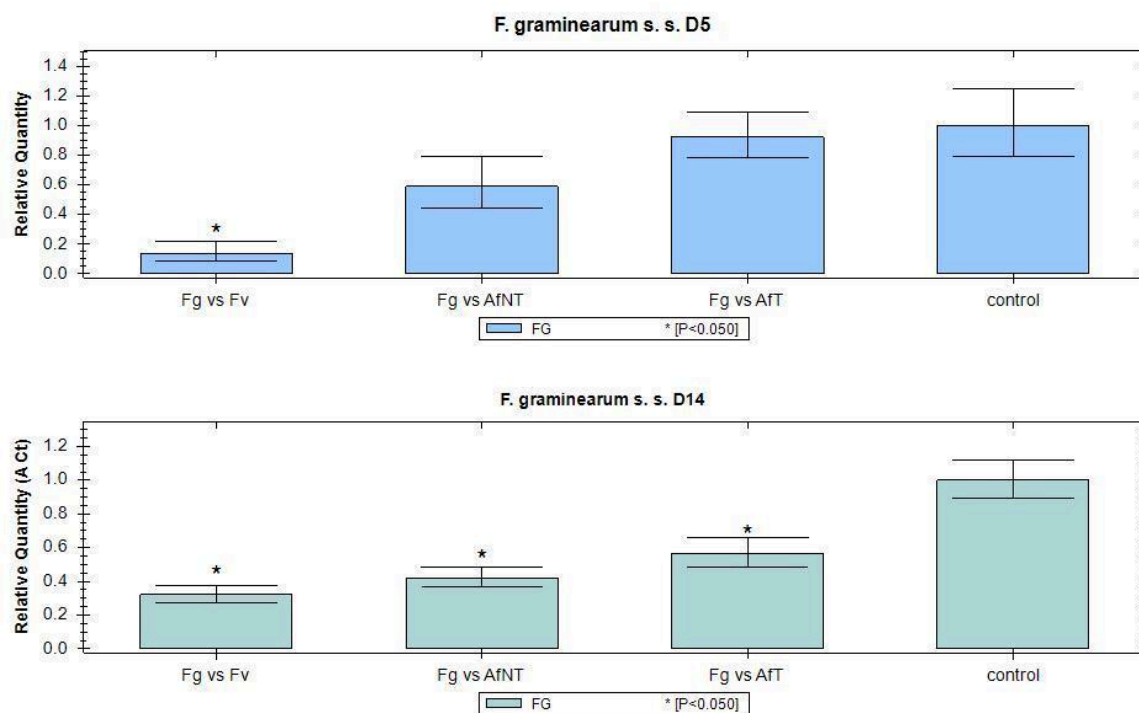


Figura 4-7. Evaluación de los niveles de biomasa al día 5 y día 14 de incubación de *F. graminearum s. s.* (Fg) en presencia de *F. verticillioides* (Fv) y *A. flavus* no toxicogénico (AfNT) y toxicogénico (AfT). Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto al control.

Aspergillus flavus toxicogénicos

La cepa de *A. flavus* toxicogénica evidenció una reducción de biomasa estadísticamente significativa respecto al control a los 5 días de incubación en presencia de todas las especies analizadas, mientras que a los 14 días esta reducción significativa se mantuvo únicamente frente a las especies de *Fusarium* (Figura 4-8).

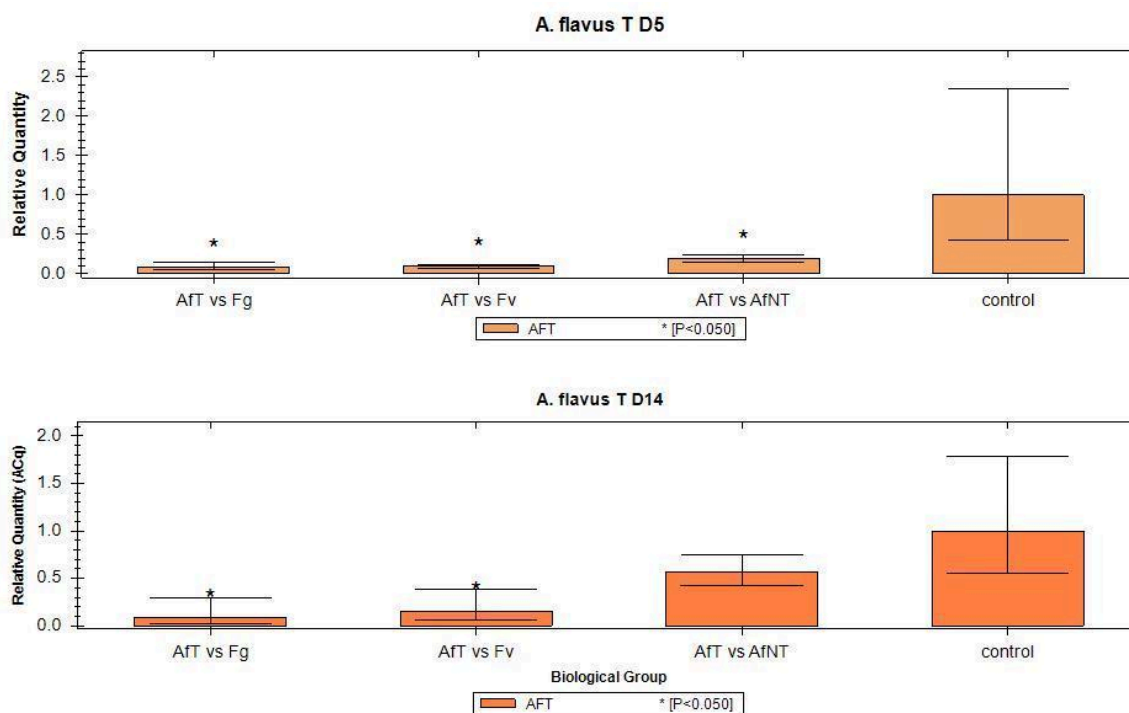


Figura 4-8. Evaluación de los niveles de biomasa al día 5 y día 14 de incubación de *A. flavus* toxicogénico (Aft) en presencia de *F. verticillioides* (Fv), *F. graminearum* s. s. (Fg) y *A. flavus* no toxicogénico (AfNT). Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) respecto al control.

Aspergillus flavus no toxicogénico

Para el caso de la cepa de *A. flavus* no toxigénica estudiada, a los 5 y 14 días de incubación se observó una disminución de su biomasa en presencia de todas las especies analizadas respecto al control (Figura 4-9).

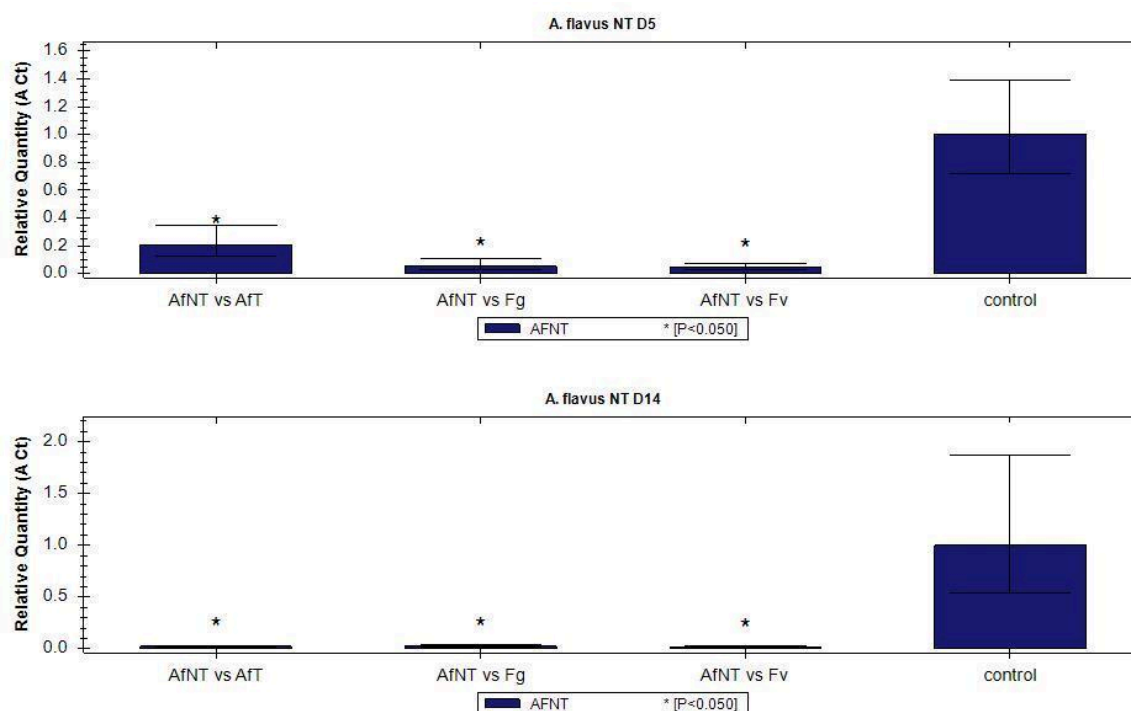


Figura 4-9. Evaluación de los niveles de biomasa al día 5 y día 14 de incubación de *A. flavus* no toxicogénico (AfNT) en presencia de *F. graminearum* s. s. (Fg), *F. verticillioides* (Fv) y *A. flavus* toxicogénico (AfNT). Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto al control.

EXPRESIÓN DE GENES VINCULADOS A LA SÍNTESIS DE TOXINAS

Inicialmente se buscó evaluar cómo varían los niveles de expresión de genes asociados a la síntesis de toxinas en las cepas analizadas en función del tiempo en los ensayos control. Esto permitió evidenciar diferencias en el comportamiento de las diferentes especies, en ausencia de competidores. Si bien la comparación entre los distintos tiempos de expresión no fue significativa para la mayoría de los genes estudiados, se observó que *F. verticillioides* aumenta los niveles de expresión del gen *fum1* a mayores periodos de tiempo ($p=0,555$), al igual que *A. flavus* (*aflR* $p=0,352$; *aflS* $p=0,337$). Sin embargo, *F. graminearum* s. s. exhibe un aumento significativo en la expresión de uno de los genes asociado a la ruta biosintética de los tricotecenos a los 14 días de incubación (*tri5* $p < 0,001$), mientras que la expresión del gen *tri 6* no varía de forma significativa (*tri6* $p=0,233$). Por otro lado, se observa una disminución, aunque no significativa, en ambos genes de la ruta biosintética de la ZEA (*psk4* $p=0,327$; *psk13* $p=0,173$) a mayor tiempo de incubación. A su vez, de la comparación entre las diferentes especies se puede evidenciar que predominan los niveles de expresión de *fum1* respecto al resto de los genes analizados (Figura 4-10).

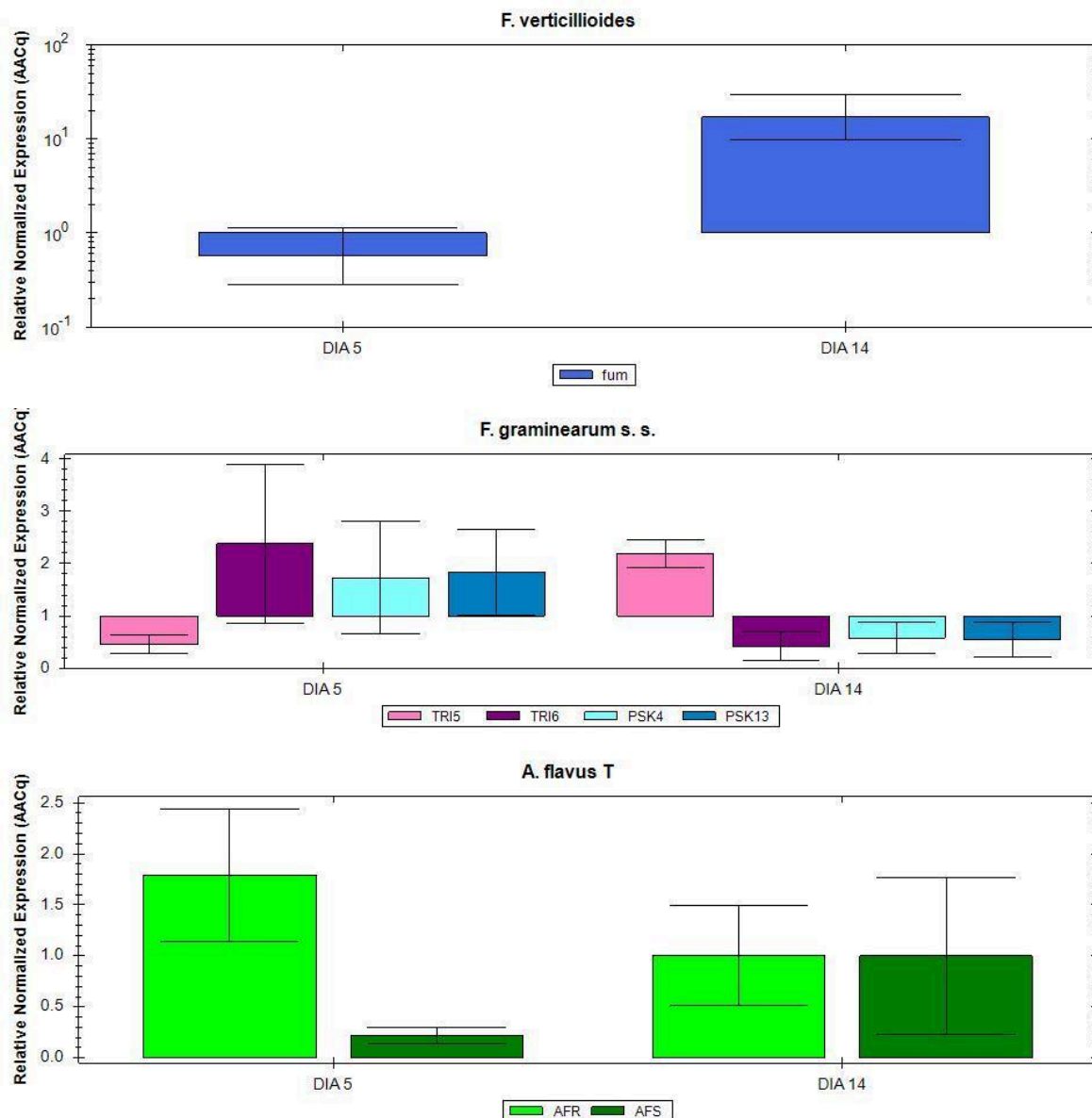


Figura 4-10. Niveles de expresión de los diferentes genes involucrados en la síntesis de toxinas para cada una de las especies estudiadas (*fum1*, *tri5*, *tri6*, *psk4*, *psk13*, *afr*, *afs*) a los 5 y 14 días de incubación en las muestras control.

Fusarium verticillioides

Se estudiaron los niveles de expresión del gen *fum1* como responsable de la síntesis de fumonisinas en cepas de *F. verticillioides*, en presencia de otras especies fúngicas. Sin embargo, no se observaron variaciones en sus niveles de expresión, por lo que la expresión de este gen no estaría condicionado por la presencia de otras especies (Figura 4-11).

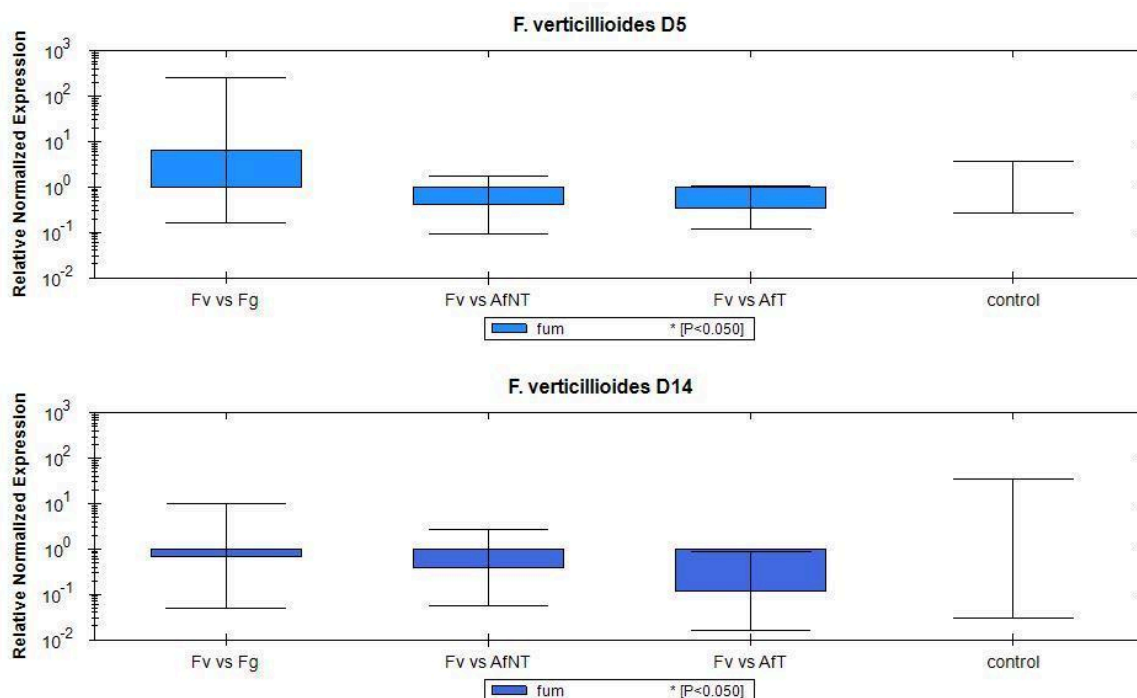


Figura 4-11. Niveles de expresión del gen FUM1 por *F. verticillioides* a los 5 y 14 días de incubación en presencia de *F. graminearum* s. s. (Fg) y *A. flavus* toxicogénico (AfT) y no toxicogénico (AfNT). Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) respecto al control.

Fusarium graminearum s. s.

Para determinar si existen variaciones en la síntesis de tricotecenos por *F. graminearum* s. s. en presencia de otras especies toxicogénicas, se estudió la expresión de los genes *tri 5* y *tri 6* vinculados a la síntesis de DON y los genes *psk4* y *psk13* asociados a la síntesis de ZEA. Si bien en presencia de *F. verticillioides* al día 5 se observó un aumento significativo en la expresión de *tri5*, esto no se mantuvo al día 14, sin evidenciarse variaciones significativas en la expresión de ninguno de los genes vinculados a la biosíntesis de DON en presencia de *F. verticillioides*. Sin embargo, la expresión de genes vinculados a la síntesis de ZEA sí mostró diferencias significativas respecto al control en presencia de *F. verticillioides*, observándose una disminución de la expresión de *psk4* y *psk13* tanto a los 5 como a los 14 días de incubación frente a *F. verticillioides* (Figura 4-12). Los genes *tri* no mostraron variaciones significativas en su expresión en presencia de cepas de *A. flavus* no toxicogénicas. Sin embargo, el gen *tri5* mostró diferencias significativas a los 5 días de incubación en presencia de *A. flavus* toxigénico, pero esto no se mantuvo a los 14 días de incubación. Nuevamente se observaron variaciones en la expresión de genes vinculados a la síntesis de ZEA, en este caso se vio un aumento significativo de la expresión al día 14 de incubación en presencia de cepas de *A. flavus* (Figura 4-12).

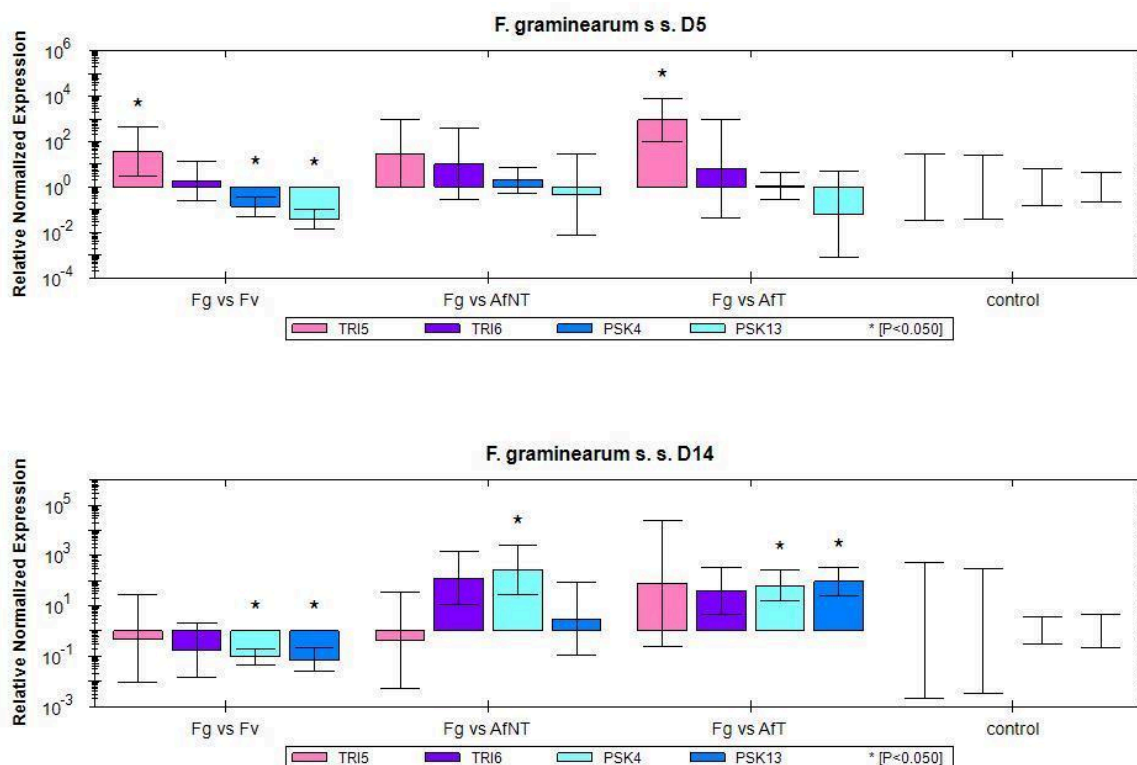
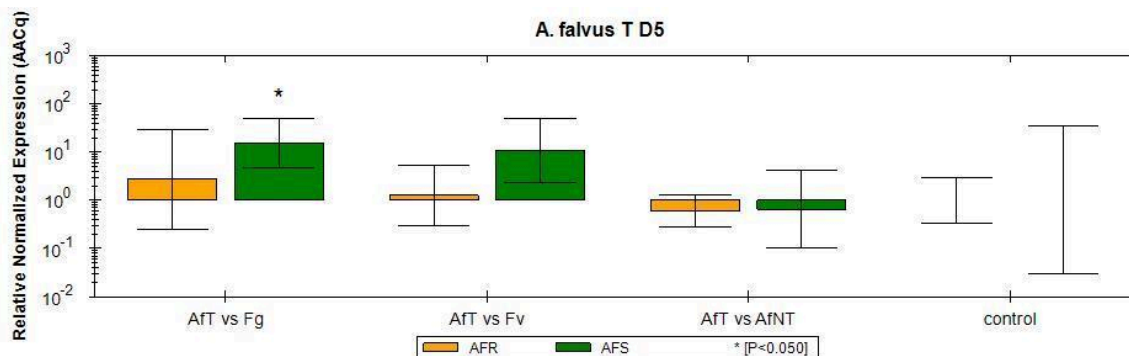


Figura 4-12. Niveles de expresión de los genes *tri5*, *tri6*, *pks13* y *pks4* por *F. graminearum* s. s. (Fg) a los 5 y 14 días de incubación en presencia de *F. verticillioides* (Fv) y *A. flavus* toxicogénico (AfT) y no toxicogénico (AfNT). Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto al control.

Aspergillus flavus

Las variaciones en la expresión de aflatoxinas en los distintos ensayos realizados se evaluaron en función de los niveles de expresión de los genes *aflR* y *aflS*. En presencia de *F. graminearum* s. s. se observó un aumento significativo en la expresión de ambos genes en la cepa de *A. flavus* toxicogénica respecto al control. Por otro lado, en presencia de *F. verticillioides* y *A. flavus* no toxicogénico, se vio un aumento significativo en la expresión únicamente del gen *aflR* al día 14 de incubación respecto al control (Figura 4-13).



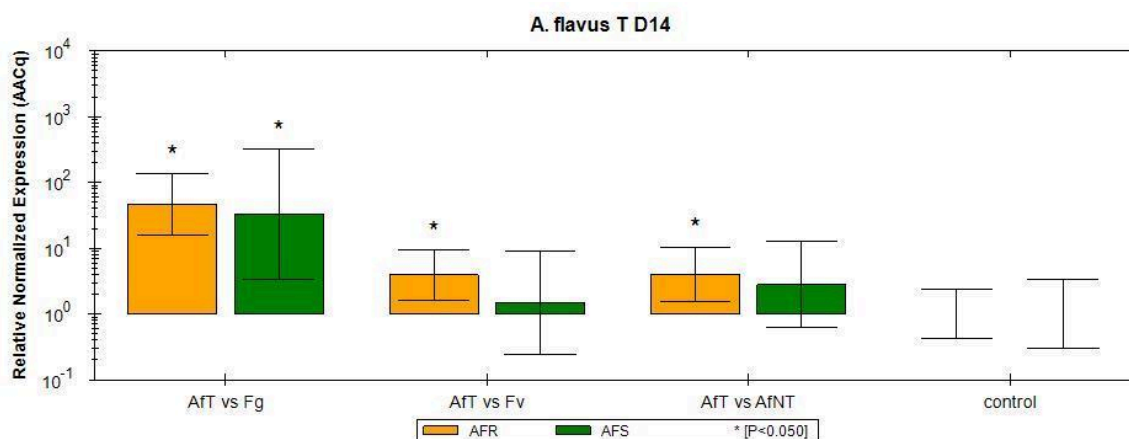


Figura 4-13. Niveles de expresión de los genes *afIR* y *afIS* por *A. flavus* (AfT) a los 5 y 14 días de incubación en presencia de *F. graminearum* s. s. (Fg), *F. verticillioides* (Fv) y *A. flavus* no toxicogénico (AfNT). Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto al control.

MICOTOXINAS

Se analizaron los niveles de fumonisinas presentes en las muestras a los 14 días de incubación en todas las muestras inoculadas con cepas de *F. verticillioides*. Se analizaron las cepas de *F. verticillioides* por separado debido a que presentaron diferentes perfiles toxicogénicos y diferencias significativas en los rangos de producción de toxinas. La cepa A68 produjo tanto FB1 como FB2 mientras que la cepa A52 produjo únicamente FB1. Los niveles de producción de FB1 para la muestra control de la cepa A68 promedió los 37 mil $\mu\text{g}/\text{kg}$, mientras que para la cepa 52 el promedio fue de 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$. En el estudio de la cepa A68, la concentración de FB1 superó la de FB2 en todos los casos. Tanto la presencia de *F. graminearum* s. s. como *A. flavus* generó una disminución significativa de la síntesis de ambas fumonisinas, siendo ésta más significativa en presencia de cepas de *A. flavus*. Se inhibió la producción de fumonisinas al 50% en presencia de *F. graminearum* s. s., 89% en presencia de *A. flavus* no toxicogénicos y 94% frente a *A. flavus* toxicogénico (Figura 4-14).

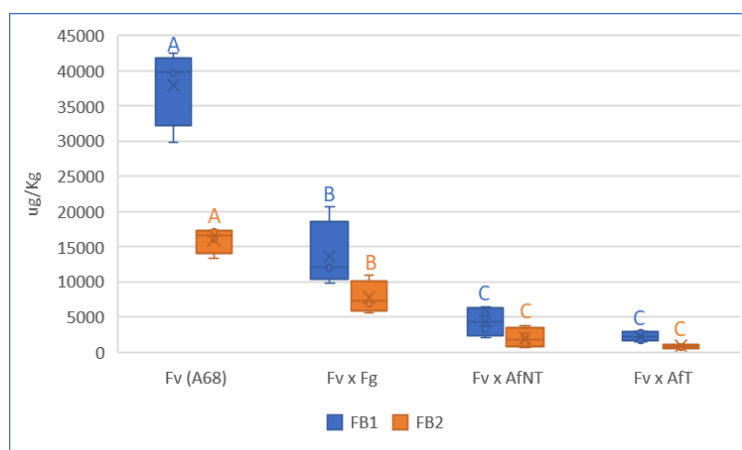


Figura 4-14. Niveles de FB1 y FB2 ($\mu\text{g/kg}$) producidas por la cepa A68 de *F. verticillioides* y en presencia de *F. graminearum* s. s. (Fg) y cepas toxicogénicas y no toxicogénicas de *A. flavus* (AfT y AfNT, respectivamente). Las letras sobre las cajas indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control (A68), (Fisher LSD $p < 0.05$).

En relación a la cepa A52, también se observó un descenso significativo en la síntesis de FB1 en presencia de todas las cepas estudiadas (Figura 4-15).

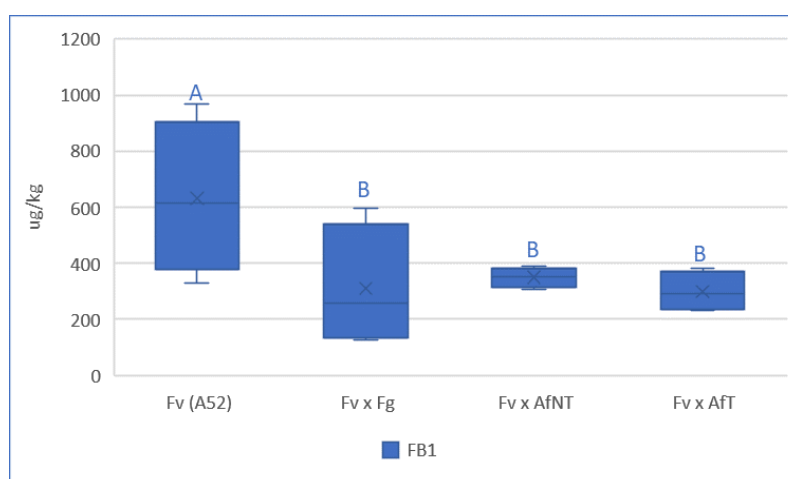


Figura 4-15. Niveles de FB1 ($\mu\text{g/kg}$) producidas por la cepa A52 de *F. verticillioides* y en presencia de *F. graminearum* s. s. (Fg) y cepas toxicogénicas y no toxicogénicas de *A. flavus* (AfT y AfNT, respectivamente). Las letras sobre las cajas indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control (A52), (Fisher LSD $p < 0.05$).

Se analizó la presencia de DON y ZEA en los ensayos en los que estaba presente la cepa de *F. graminearum* s. s.. La toxina mayormente encontrada fue DON, seguida de ZEA. Para el caso de DON no se observaron diferencias en sus niveles de síntesis en presencia de la cepa de *A. flavus* no toxicogénica. Sin embargo, tanto la presencia de *A. flavus* toxicogénica como la presencia de *F. verticillioides*, generaron una disminución significativa en su síntesis, siendo ésta más marcada en presencia de *F. verticillioides*, con una disminución del 75% en la producción de DON para *F. verticillioides* y del 42% para *A. flavus* (Figura 4-16). Por el contrario, la presencia de la cepa de *A. flavus* toxicogénica generó un aumento significativo en la síntesis de ZEA. En presencia de las otras especies estudiadas, no se observó un cambio significativo respecto al control (Figura 4-16).

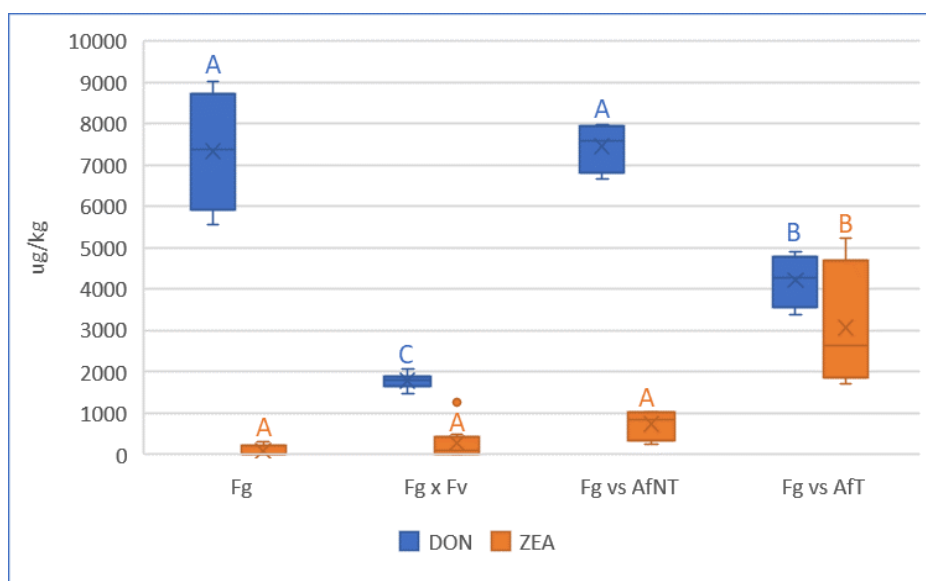


Figura 4-16. Niveles de DON y ZEA (ug/Kg) producidas por la cepa A368 de *F. graminearum* s. s. en presencia de *F. verticillioides* (A68 y A52) y cepas toxicogénicas y no toxicogénicas de *A. flavus* (A36 y A631, respectivamente). Las letras sobre las cajas indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control (A368), (Fisher LSD $p < 0.05$).

Se estudiaron las variaciones en los niveles de aflatoxinas en las muestras correspondientes a los distintos ensayos. Se determinó la presencia de AFB1 y AFB2, no habiéndose detectado en ninguna de las muestras aflatoxinas del tipo G. Se pudo observar que la AFB1 se encontró en niveles mayores respecto a la AFB2 y que en presencia de todas las especies estudiadas los niveles de ambas aflatoxinas disminuyeron de forma significativa respecto al control (Figura 4-17). La presencia de *A. flavus* no toxigénica provocó niveles de inhibición de la síntesis de AFB1 del 90% (Figura 4-17).

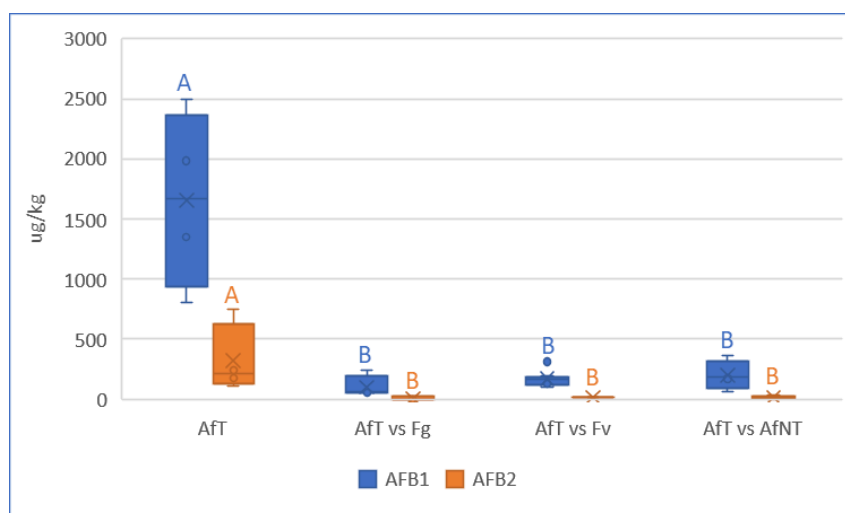


Figura 4-17. Niveles de AFB1 y AFB2 (ug/Kg) producidas por *A. flavus* en presencia de *F. graminearum* s. s. (Fg), *F. verticillioides* (Fv) y la cepa no toxicogénica de *A. flavus* (AfNT). Las letras sobre las cajas indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control, (Fisher LSD $p < 0.05$).

Discusión

La ocurrencia de *F. verticillioides*, *F. graminearum* s. s. y *A. flavus* ha sido informada con frecuencia asociada a granos de maíz (Pearson y Wicklow, 2006; Mukanga et al., 2010; Krnjaja et al., 2019). La presencia de hongos de diferentes especies en un mismo sustrato puede tener diferentes implicancias tanto a nivel del desarrollo como de la síntesis de toxinas, pudiendo generar tanto efecto aditivo como supresor de estas últimas. Por otro lado, también es sabido que las condiciones ambientales juegan un papel clave en la determinación del desarrollo de estas especies cuando éstas coexisten. Pudiendo ser estos, determinantes fundamentales en el establecimiento de la dominancia de una especie frente a otra. Las condiciones seleccionadas que permitieron implementar los diferentes ensayos (aw de 0.95 y 25°C) estuvieron basadas principalmente en las condiciones climáticas asociadas a la zafra del cultivo en nuestro país y en el hecho que permiten el desarrollo de todas las especies seleccionadas haciendo posible evaluar el efecto de la interacción entre las mismas.

En relación al efecto de la interacción en el crecimiento fúngico, a través de la evaluación de los niveles de biomasa para cada una de las especies estudiadas en los distintos ensayos, pudimos observar que, en general, la tendencia es hacia la reducción de biomasa en presencia de otras especies. Únicamente dos interacciones tuvieron un efecto diferente sobre los niveles de biomasa, *F. verticillioides* en presencia de *F. graminearum* s. s., en la que se vio que la presencia de este último no genera un impacto en el crecimiento del primero y *A. flavus* toxicogénico que no se vio afectada por la presencia de la cepa de *A. flavus* no toxicogénica. El hecho de que el crecimiento de *F. verticillioides* no se vea afectado por la presencia de *F. graminearum*, pero que sí exista una reducción de los niveles de biomasa de *F. graminearum* en presencia de *F. verticillioides*, en conjunto con la determinación de este último como la principal especie contaminante del maíz evidenciado en los capítulos anteriores, pone de manifiesto el alto grado de asociación de esta especie y el cultivo de maíz. Es en este sentido que algunos autores plantean que la predominancia de *F. verticillioides* podría ser explicada considerando a la infección por esta especie como disuasivo para la contaminación con otros hongos y pudiendo de cierta forma proteger mazorcas de maíz contra la contaminación por otros patógenos (Wicklow et al., 1988; Velluti, 2002). Así mismo, hay quienes plantean que *F. verticillioides* es de las primeras especies que colonizan las mazorcas de maíz en el

campo, infectando los granos antes que otros hongos confiriéndoles esto una ventaja temporal para la colonización del nicho frente al resto de los competidores (Hesseltine y Bothast 1977; King, 1981). Esto puede no verse completamente reflejado en este estudio en el que el inóculo de las diferentes especies fue concomitante, no necesariamente reflejando una situación que ocurriría naturalmente en campo. Sin embargo, en los resultados obtenidos de la evaluación de ambas especies en campo, se vio un claro predominio de *F. verticillioides* no solo frente a *F. graminearum*, sino también frente a *A. flavus*, en sintonía con lo antes mencionado. Hay quienes sugieren que el crecimiento de *A. flavus* estaría más afectado por la presencia de *F. verticillioides* que de *F. graminearum* en plantas de maíz (Giorni et al., 2019), si bien no se observa este comportamiento en nuestro trabajo *in vitro*, esto también va en línea con la predominancia de *F. verticillioides* frente al resto de las especies como contaminante del maíz. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la presencia de otras especies en el maíz genera un efecto en el crecimiento de todas las especies estudiadas, evidenciando así, su rol como competidores.

Cuando analizamos los resultados correspondientes a los niveles de expresión de genes involucrados en las rutas biosintéticas de las diferentes toxinas en función del tiempo de incubación vemos un marcado aumento en las concentraciones del gen asociado a la síntesis de fumonisinas en comparación con la expresión de genes en las otras especies estudiadas además del aumento en función del tiempo. A su vez, cuando analizamos los distintos co-inóculos, podemos ver que los niveles de expresión del gen *fum1* no se modifica por la presencia de otras especies. Así mismo, si consideramos que los niveles de biomasa se vieron significativamente reducidos en presencia de competidores podemos inferir, bajo estas circunstancias, una sobreexpresión génica por unidad de biomasa respecto al control. Pudiendo todo ésto correlacionarse con el rol ecológico de las micotoxinas como mecanismo de respuesta frente a competidores, considerando que es el principal contaminante del sustrato, en línea con lo anteriormente mencionado en relación a los niveles de biomasa. Sin embargo, el aumento en la expresión del gen *fum1* no se correlaciona con los niveles de FBs encontrados en las muestras, las cuales disminuyeron de forma significativa respecto a los controles. En este sentido, es posible que a pesar de una sobreexpresión del gen *fum1*, implicado en los pasos iniciales de la ruta biosintética de las fumonisinas, existan interacciones corriente abajo en la expresión de genes de esta ruta que llevan a una menor concentración final de estas toxinas, así como también es posible que exista una degradación posterior de la toxina ya sintetizada disminuyendo así su concentración final. Podemos concluir que la síntesis de toxinas se ve afectada por la presencia de diferentes especies disminuyendo su síntesis significativamente, a pesar de generar un aumento de la expresión génica por unidad de biomasa del gen *fum1*. Otros autores

reportan resultados *in vitro* similares a los aquí obtenidos cuando *F. verticillioides* se co-inocula en presencia de especies de *A. flavus* y *F. graminearum* (Marin et al., 1998).

Por otro lado, del análisis de la expresión de genes para la síntesis de toxinas por la cepa estudiada de *F. graminearum* s. s. se pudo concluir que en presencia de las distintas especies estudiadas no se observó variación significativa en la expresión de los genes involucrados en la síntesis de tricotecenos respecto al control a los 14 días de incubación. Sin embargo, en el análisis de toxinas en las muestras se vieron variaciones significativas en las concentraciones de DON, evidenciándose un descenso significativo en su concentración en presencia de *A. flavus* toxigénico y un descenso aún más significativo en presencia de *F. verticillioides*. Si bien hay autores que postulan que la síntesis de DON podría ser considerada una estrategia de defensa frente a competidores, particularmente *F. verticillioides* (Velluti et al. 2000), nuestros resultados no evidencian dicho mecanismo. El hecho de que no se observen variaciones en relación a la expresión de los genes estudiados, pero sí haya una disminución en la concentración final de toxina en la muestra analizada, podría ser consecuencia de interacciones que ocurren a nivel de genes de la ruta biosintética que no fueron estudiados en este trabajo. Así mismo, el hecho de que en presencia de *A. flavus* no toxicogénico no se vieran variaciones en las concentraciones de DON mientras que frente a *A. flavus* toxicogénico se evidenciara un descenso significativo en su concentración hace pensar en un rol restrictivo para la síntesis de DON ejercido por las aflatoxinas. Por otro lado, el comportamiento de la expresión de los genes involucrados en la síntesis de ZEA fue bastante diferente al de los genes de tricotecenos. Si bien se observó un aumento significativo en su expresión tanto en el control como frente *A. flavus* y un descenso significativo frente a *F. verticillioides*, la concentración de ZEA en las muestras en los distintos ensayos no difirieron respecto al control. Únicamente en presencia de *A. flavus* toxigénico las concentraciones de ZEA en las muestras fueron significativamente mayores, coincidente con la sobreexpresión génica previamente mencionada. El aumento significativo en las concentraciones de ZEA frente a la cepa toxicogénica de *A. flavus* podría ser interpretado como un mecanismo de defensa frente a la presencia de aflatoxinas, si bien hace falta más evidencia para poder concluirlo. Sin bien las otras variaciones observadas en la expresión génica no se vieron reflejadas en la concentración de la toxina en las muestras, el descenso significativo de la expresión de genes en presencia de *F. verticillioides* parece indicar un efecto restrictivo de esta especie sobre *F. graminearum*, como se mencionó anteriormente. Al igual que en el trabajo de Velluti et al., 2000, se observó que la presencia de *F. verticillioides* no genera modificaciones en los niveles de síntesis de ZEA.

Finalmente, del estudio de la expresión de genes involucrados en la síntesis de aflatoxinas por *A. flavus* se pudo concluir que si bien en presencia de todas las especies estudiadas se evidenció un aumento significativo en el gen promotor de ruta biosintética de las aflatoxinas, los niveles, tanto de AFB1 como AFB2, encontrados en las muestras fueron significativamente menores respecto al control. Esto podría deberse a la activación de algún mecanismo que pudiera inhibir la traducción de estos mensajeros determinando una disminución en la activación de la ruta biosintética de las aflatoxinas, y en consecuencia, la presencia de estas toxinas en las muestras. Si bien hay autores que postulan que *A. flavus* se vería más afectado por la presencia de *F. verticillioides* que de *F. graminearum* s. s., viéndose esto reflejado no solo en el crecimiento sino también en la síntesis de toxinas (Giorni et al., 2019), en este trabajo este comportamiento no se vio reflejado, generando la presencia de ambas disminución en la síntesis de aflatoxinas en niveles similares. La diferencia en el comportamiento entre el crecimiento fúngico (biomasa) y la síntesis de toxinas ha sido reportado previamente por otros autores (Obradovic et al., 2018; Giorni et al., 2019). En estos trabajos no se observó correlación positiva en el crecimiento entre *A. flavus* y *F. verticillioides*, mientras que sí se observó una correlación significativa positiva entre sus micotoxinas, no siendo así para el caso de nuestro trabajo en el que los niveles de ambas toxinas disminuyen cuando estas especies coexisten.

Con base en los resultados aquí obtenidos podemos concluir que la coexistencia de especies de *F. graminearum* s. s., *F. verticillioides* y *A. flavus* impacta en el crecimiento y expresión génica de las mismas. A su vez, vimos que no existe una correlación directa entre los niveles de expresión de los genes estudiados y las concentraciones de las toxinas en las muestras, concluyendo que ésta no sería una herramienta válida para predecir las concentraciones de micotoxinas en las muestras, al menos con base en los genes aquí seleccionados. También podemos concluir que si bien la presencia de diferentes especies toxigénicas implica la posibilidad de contaminación del sustrato con más de una toxina, en general los niveles de las mismas se reducen cuando las distintas especies coexisten.

Bibliografía

- Abdel-Hadi, A., Caley, D., Carter, D., Magan, N., 2011. Control of aflatoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* using RNA silencing technology by targeting aflD (nor-1) gene. *Toxins*, 3, 647–659.
- Bracarense, A., Luciolli, J., Grenier, B., Pacheco, G., Moll, W., Schatzmayr, G., Oswald, I., 2012. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces

morphological and immunological changes in the intestine of piglets. *British Journal of Nutrition*, 107(12), 1776-1786.

- Butchko, R., Plattner, R., Proctor, R., 2006. Deletion analysis of FUM genes involved in tricarballic ester formation during fumonisin biosynthesis. *J Agric Food Chem.* 54:9398–9404.
- Chen, Y., Kistler, H., Ma, Z., 2019. *Fusarium graminearum* trichothecene mycotoxins: biosynthesis, regulation, and management. *Annu. Rev. Phytopathol.* 57, 15-39.
- Dewick, P., 2001. The acetate pathway: fatty acids and polyketides, p. 35–117. In P. N. Dewick (ed.), *Medicinal natural products. A biosynthetic approach*, 2nd ed. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, England
- Diao, X., Han, Y., Liu, C., 2018. The fungicidal activity of tebuconazole enantiomers against *Fusarium graminearum* and its selective effect on DON production under different conditions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(14), 3637-3643.
- Du, W., O'Brien, G., Payne, G., 2007. Function and regulation of aflJ in the accumulation of aflatoxin early pathway intermediate in *Aspergillus flavus*. *Food additives and contaminants*, 24(10), 1043-1050.
- Ehrlich, K., Cary, J., Montalbano, B., 1999a. Characterization of the promoter for the gene encoding the aflatoxin biosynthetic pathway regulatory protein AFLR. *BBA- Gene Struct. Expr.*, 1444, 412–417.
- Ehrlich, K., Montalbano, B., Cary, J., 1999b. Binding of the C6-zinc cluster protein, AFLR, to the promoters of aflatoxin pathway biosynthesis genes in *Aspergillus parasiticus*. *Gene*, 230, 249–257.
- Ehrlich, K., Yu, J., Cotty, P., 2005. Aflatoxin biosynthesis gene clusters and flanking regions. *Journal of Applied Microbiology*, 99(3), 518-527.
- Fernandes, M., Keller, N., Adams, T., 1998. Sequence-specific binding by *Aspergillus nidulans* AflR, a C6 zinc cluster protein regulating mycotoxin biosynthesis. *Mol. Microbiol.*, 28, 1355–1365.
- Gaffoor, I., Trail, F., 2006. Characterization of two polyketide synthase genes involved in zearalenone biosynthesis in *Gibberella zeae*. *Appl. Environ. Microbiol.*;72:1793–1799.
- Giorni, P., Magan, N., Battilani, P., 2009. Environmental factors modify carbon nutritional patterns and niche overlap between *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* strains from maize. *Int. J. Food Microbiol.* 130, 213e218.
- Giorni, P., Bertuzzi, T., Battilani, P., 2019. Impact of fungi co-occurrence on mycotoxin contamination in maize during the growing season. *Frontiers in microbiology*, 10, 461889.

- Glenn, A., Zitomer, N., Zimeri, A., Williams, L., Riley, R., Proctor, R., 2008. Transformation-mediated complementation of a FUM gene cluster deletion in *Fusarium verticillioides* restores both fumonisin production and pathogenicity on maize seedlings. *Mol Plant Microbe Interact.* Jan;21(1):87-97.
- Huffman J., Gerber R., Du L. Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins. *Biopolymers.* 2010;93:764–776.
- Juroszek, P., von Tiedemann, A., 2013. Climate change and potential future risks through wheat diseases: a review. *European Journal of Plant Pathology*, 136, 21-33.
- King, S., 1981. Time of infection of maize kernels by *Fusarium moniliforme* and *Cephalosporium acremonium*. *Phytopathology* 71: 796–799.
- Krnjaja, V., Mandić, V., Stanković, S., Obradović, A., Vasić, T., Lukić, M., Bijelić, Z., 2019. Influence of plant density on toxigenic fungal and mycotoxin contamination of maize grains. *Crop Protection*, 116, 126-131.
- Leslie, J., Summerell, B., 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell publishing, Iowa, USA.
- Lysøe, E., Klemsdal S., Bone K., Frandsen R., Johansen T., Thrane U., y Henriette G. The PKS4 Gene of *Fusarium graminearum* Is Essential for Zearalenone Production. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, June 2006, p. 3924–3932 Vol. 72, No. 6
- Marín, S., V. Sanchis, F. Rull, A. J. Ramos, and N. Magan. 1998. Colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in the presence of competing fungi and their impact on fumonisin production. *J. Food Prot.* 61:1489–1496.
- Mahato D.K., Devi S., Pandhi S., Sharma B., Maurya K.K., Mishra S., Dhawan K., Selvakumar R., Kamle M., Mishra A.K., et al. Occurrence, impact on agriculture, human health, and management strategies of zearalenone in food and feed: A review. *Toxins.* 2021;13:92.
- Meyers, D., Obrian, G., Du, W., Bhatnagar, D., Payne, G., 1998. Characterization of aflJ, a gene required for conversion of pathway intermediates to aflatoxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3713-3717.
- Miraglia, M., Marvin, H. J. P., Kleter, G. A., Battilani, P., Brera, C., Coni, E., Cubadda, F., Croci, L., De Santis, B., Dekkers, S., Filippi, L., Hutjes, R., Noordam, M., Pisante, M., Piva, G., Prandini, A., Toti, L., van den Born, G., Vespermann, A., 2009. Climate change and food safety: an emerging issue with special focus on Europe. *Food and chemical toxicology*, 47(5), 1009-1021.

- Mukanga, M., Derera, J., Tongoona, P., Laing, M., 2010. A survey of pre-harvest ear rot diseases of maize and associated mycotoxins in south and central Zambia. *International journal of food microbiology*, 141(3), 213-221.
- Mylroie, J., Ozkan, S., Shivaji, R., Windham, G., Alpe, M., Williams, W., 2016. Identification and quantification of a toxigenic and non-toxigenic *Aspergillus flavus* strain in contaminated maize using quantitative real-time PCR. *Toxins*, 8(1), 15.
- Nicolaisen, M., Supronienė, S., Nielsen, L., Lazzaro, I., Spliid, N., Justesen, A., 2009. Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. *Journal of Microbiological Methods*, 76(3), 234-240.
- Obradović, A., Krnjaja, V., Nikolić, M., Delibašić, G., Filipović, M., Stanković, G., Stanković, S., 2018. Impacts of climatic conditions on aflatoxin B 1 and fumonisins contamination of maize kernels and their co-occurrence. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 34(4), 469-480.
- Pearson, T. C., & Wicklow, D. T. (2006). Detection of corn kernels infected by fungi. *Transactions of the ASABE*, 49(4), 1235-1245.
- Peromingo, B., Rodríguez, M., Delgado, J., Andrade, M, Rodríguez, A., Gene expression as a good indicator of aflatoxin contamination in dry-cured ham, *Food Microbiology* (2017)
- Scala V., Visentin I., y Cardinale F., 2017. Evaluating Fumonisin Gene Expression in *Fusarium verticillioides*. *Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, vol. 1542, capítulo 16. Antonio Moretti and Antonia Susca (eds.)
- Skory, C., Chang, P., Cary, J., Linz, J., 1992. Isolation and characterization of a gene from *Aspergillus parasiticus* associated with the conversion of versicolorin A to sterigmatocystin in aflatoxin biosynthesis. *Applied and environmental microbiology*, 58(11), 3527-3537.
- Stępień, L., Koczyk, G., Waśkiewicz, A., 2011. FUM cluster divergence in fumonisins-producing *Fusarium* species. *Fungal Biology* 115(2), 0–123.
- Suzuki, T., Iwahashi, Y., 2012. Comprehensive gene expression analysis of type B trichothecenes. *J. Agric. Food Chem.* 60, 9519-9527.
- Proctor RH, Hohn TM, McCormick SP, Desjardins AE. Tri6 encodes an unusual zinc finger protein involved in regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides*. *Appl Environ Microbiol* 1995;61: 1923–30.
- Proctor RH, Desjardins AE., Plattner R.D., Hohn TM. 1999. A poliketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Fungal Genet. Biol.*, 27, pp. 100-112

- Proctor, R., Plattner, R., Desjardins, A. Busaman, M., Butchko, R., 2006. Fumonisin production in the maize pathogen *Fusarium verticillioides*: genetic basis of naturally occurring chemical variation. J. Agric. Food Chem., 54, pp. 2424-2430
- Hesseltine, C. W., and R. J. Bothast. 1977. Mold development in ears of corn from tasseling to harvest. Mycologia 69:328–340.
- Hopwood, D. A. 1997. Genetic contributions to understanding polyketide synthases. Chem. Rev. 97:2465–2497.
- Kennedy, J., K. Auclair, S. G. Kendrew, C. Park, J. C. Vederas, and C. R. Hutchinson. 1999. Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis. Science 284:1368–1372.
- Kim, Y., Lee, Y., Jin, J., Han, K., Kim, H., Kim, J., Lee, T., Yun, S., Lee, Y., 2005. Two different polyketide synthase genes are required for synthesis of zearalenone in *Gibberella zeae*. Molecular microbiology, 58(4), 1102-1113.
- Kimura, M., Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Ohsato, S., Fujimura, M., 2007. Molecular and Genetic Studies of *Fusarium* Trichothecene Biosynthesis: Pathways, Genes, and Evolution.
- Kolawole, O., Meneely, J., Petchkongkaew, A., Elliott, C., 2021. A review of mycotoxin biosynthetic pathways: Associated genes and their expressions under the influence of climatic factors. Fungal Biol. Rev. 37, 8–26
- Kristensen, R., Mona, T., Kosiak, B., Holst-Jensen, A., 2005. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. Mycological research, 109(2), 173-186.
- Van den Berg, C., 1985. Development of BET-like models for sorption of water on foods, theory and relevance. In Properties of water in foods: in relation to quality and stability (pp. 119-131). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Velluti, A., Marín, S., Bettucci, L., Ramos, A., Sanchis, V., 2000. The effect of fungal competition on colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* and on fumonisin B1 and zearalenone formation. Int J Food Microbiol 59:59±66
- Velluti, A., 2002. Ecofisiología de especies de *Fusarium* productoras de fumonisinas, zearalenona y deoxinivalenol en maíz: aceites esenciales como inhibidores fúngicos. Universitat de Lleida.
- Wicklow, D., Horn, B., Shotwell, O., Hesseltine, C., Caldwell, R., 1988. Fungal interference with *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination of maize grown in a controlled environment. Phytopathology 78:68–74.

- Yu, J., Chang, P., Ehrlich, K., Cary, J., Bhatnagar, D., Cleveland, T., Payne, G., Linz, J., Woloshuk C., Bennett, J., 2004. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied and environmental microbiology*, 70(3), 1253-1262.
- Zeng, H., Cai, J., Hatabayashi, H., Nakagawa, H., Nakajima, H., Yabe, K., 2020. VerA gene is involved in the step to make the xanthone structure of demethylsterigmatocystin in aflatoxin biosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 6389.

Discusión general.

El trabajo realizado tiene como objetivo principal conocer y caracterizar las especies fúngicas toxicológicas asociadas al maíz, y en base a lo encontrado, implementar estrategias de manejo del cultivo que permitan disminuir el impacto de estas especies, así como también estudiar el efecto de la interacción entre los distintos contaminantes fúngicos.

El cultivo de maíz en nuestro país ha tenido un gran desarrollo con aumento de la superficie sembrada en el último periodo de tiempo (Methol, 2021). Este cultivo suele destinarse a alimentación animal en nuestro país, y es un cultivo en el cual el uso de fungicidas no es una práctica habitual a nivel mundial. Sin embargo, la contaminación de este cultivo por especies fúngicas es muy frecuente, principalmente por especies toxicogénicas, siendo considerado uno de los cultivos más susceptibles a la contaminación con micotoxinas a nivel mundial (Barug et al., 2004). Considerando las especies toxicogénicas contaminantes del maíz, las pertenecientes al género *Fusarium* fueron las predominantes y dentro de éste, la especie *F. verticillioides*. Estos resultados concuerdan con los reportados en la región por autores de Argentina y Brasil (van der Westhuizen et al., 2003; Stumpf et al., 2013; Castañares et al., 2019). A su vez, esta especie se caracteriza por ser una de las principales productoras de fumonisinas. En concordancia, las fumonisinas fueron las toxinas con mayor incidencia en el total de muestras analizadas, y la mayoría de las cepas analizadas fueron capaces de producirlas. Otras especies toxigénicas encontradas fueron *F. graminearum* s.s. y *A. flavus*. La prevalencia de *F. graminearum* s. s. en relación a otras especies del complejo FGSC asociadas a este cultivo en nuestro país, podría estar en relación con grandes extensiones de cultivos, fuertemente asociados a la contaminación por este patógeno.

En relación a la síntesis de toxinas, las cepas de *F. graminearum* s. s. fueron en su mayoría productoras de ZEA, seguido de DON y NIV. A su vez, al igual que otros autores (Beccari et al., 2017), se puso de manifiesto la discordancia entre quimiotipos y genotipos reafirmando la importancia de la determinación de quimiotipos en esta especie. En relación a las cepas de *A. flavus*, éstas se presentaron en baja incidencia presumiblemente por condiciones climáticas inadecuadas para su desarrollo y en su mayoría fueron no toxicogénicas, como se reportó previamente en especies de nuestro país (del Palacio y Pan, 2020), disminuyendo el riesgo de contaminación del cultivo con las toxinas de esta especie, como se demostró en la determinación de toxinas en granos de maíz. En relación con la ecofisiología para el crecimiento y síntesis de toxinas de *F. graminearum* s.s., *F. verticillioides* y *A. flavus*, en general la temperatura es el principal determinante ecofisiológico. El crecimiento de las especies de *Fusarium* se ve favorecido a temperaturas de 25°C y aw de 0.98-0.995 mientras que *A. flavus* crece mejor a 30°C y aw de 0.98. En relación a la síntesis de toxinas asociadas

a las especies estudiadas, todas se ven favorecidas a temperaturas en torno a los 24°C, mientras que los niveles óptimos de aw varían según la especie, requiriendo *F. verticillioides* aw más elevadas, mientras que *F. graminearum* s.s. y *A. flavus* se asociaron aw más bajas. Esto, sumado a que en Uruguay, en los meses de verano hay una tendencia hacia las altas temperaturas y variaciones extremas en las precipitaciones, es esperable la prevalencia de *F. verticillioides*.

En relación a la evaluación de la sensibilidad a fungicidas de *F. verticillioides* y *F. graminearum*, s.s. se logró determinar que las cepas más resistentes pertenecieron a *F. graminearum* s.s., probablemente vinculado a mayor exposición al uso de fungicidas en otros cultivos. Para ambas especies el metconazol fue el fungicida con mayor eficiencia en el control del crecimiento. Y este fue el primer trabajo en reportar sensibilidad de *F. verticillioides* frente a epoxiconazol y carbendazim.

La coexistencia de especies de *F. graminearum* s. s., *F. verticillioides* y *A. flavus* demostró que, en general, la presencia de otras especies genera una disminución en los niveles de biomasa y esto pone en evidencia su rol como competidores. A su vez, se puso de manifiesto el alto grado de asociación de la especie *F. verticillioides* al maíz, considerando que su presencia genera disminuciones de biomasa en todos sus competidores, mientras que sus niveles de biomasa no se modifican en presencia de *F. graminearum* que es el segundo contaminante en incidencia. En este sentido también, los niveles de expresión de genes asociados a la síntesis de toxinas por esta especie aumentan a lo largo del tiempo y no se modifican en presencia de competidores. Esto pone de manifiesto un posible rol de esta especie como disuasivo para la contaminación con otros hongos, así como también se plantea que se vea favorecido por una ventaja temporal ya que suele ser de los primeros contaminantes en invadir el cultivo (Wicklow et al., 1988; Velluti, 2002; Hesseltine y Bothast 1977; King, 1981). Por otro lado se vio que la variación en expresión de genes asociados a la síntesis de micotoxinas no siempre se correlaciona con los niveles de toxinas encontrados en las muestras, observándose discretas variaciones en su expresión en presencia de otras especies toxicogénicas. Sin embargo de la determinación de micotoxinas en el sustrato se desprende que, para la mayoría de las toxinas, hay una disminución significativa en su concentración en presencia de otras especies toxicogénicas, con excepción de la ZEA que aumenta su concentración en presencia de *A. flavus* pudiendo interpretarse esta respuesta como un mecanismo de defensa frente a las aflatoxinas, sin bien falta mayor evidencia para afirmarlo.

El conocimiento de los hongos toxicogénicos asociados al maíz, su comportamiento en relación a variables ecofisiológicas y en relación a otras especies y finalmente su sensibilidad a fungicidas, son el paso inicial para el desarrollo de estrategias que permitan su control y por tanto minimizar la contaminación con micotoxinas en este sustrato.

Bibliografía

- Barug, D., van Egmond, H., López-García, R., Van Osen-bruggen, W., Visconti, A., 2004. Meeting the mycotoxin menace. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.
- Beccari, G., Prodi, A., Tini, F., Bonciarelli, U., Onofri, A., Oueslati, S., Limayma, M., Covarelli, L., 2017. Changes in the *Fusarium* head blight complex of malting barley in a three-year field experiment in Italy. *Toxins*, 9(4), 120.
- Castañares, E., Martínez, M., Cristos, D., Rojas, D., Lara, B., Stenglein, S., Dinolfo, M., 2019. *Fusarium* species and mycotoxin contamination in maize in Buenos Aires province, Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, (4) 1265-1275
- del Palacio, A., Pan, D., 2020. Occurrence and toxigenic potential of *Aspergillus* section *Flavi* on wheat and sorghum silages in Uruguay. *Mycology*, 11(2), 147-157.
- Hesseltine, C. W., and R. J. Bothast. 1977. Mold development in ears of corn from tasseling to harvest. *Mycologia* 69:328–340.
- King, S., 1981. Time of infection of maize kernels by *Fusarium moniliforme* and *Cephalosporium acremonium*. *Phytopathology* 71: 796–799.
- Methol, M. 2021. Maíz y sorgo. Anuario OPYPA 2021. último acceso 02/2023: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/anuario-opypa-2021/analisis-sectorial-cadenas-productivas/maiz-sorgo>
- Stumpf, R., Dos Santos, J., Gomes, L., Silva, C., Tessmann, D., Ferreira, F., Machinski, M., Del Ponte, E., 2013. *Fusarium* species and fumonisins associated with maize kernels produced in Rio Grande do Sul State for the 2008/09 and 2009/10 growing seasons. *Braz J Microbiol.* May 31;44(1):89-95.
- Van Der Westhuizen, L., Shephard, G., Scussel, V., Costa, L., Vismer, H., Rheeder, J., Marasas, W., 2003. Fumonisin contamination and *Fusarium* incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18), 5574-5578.
- Velluti, A., 2002. Ecofisiología de especies de *Fusarium* productoras de fumonisinas, zearalenona y deoxinivalenol en maíz: aceites esenciales como inhibidores fúngicos. Universitat de Lleida.
- Wicklow, D., Horn, B., Shotwell, O., Hesseltine, C., Caldwell, R., 1988. Fungal interference with *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination of maize grown in a controlled environment. *Phytopathology* 78:68–74.
-

Conclusiones generales.

- *Fusarium verticillioides* fue la principal especie contaminante del maíz en Uruguay.
- Las fumonisinas fueron las toxinas con mayor incidencia en el total de muestras analizadas, y la mayoría de las cepas analizadas fueron capaces de producirlas.
- Tanto la temperatura como la aw son factores determinantes en el crecimiento y síntesis de toxinas de las especies estudiadas, siendo en general la temperatura el principal factor.
- Las condiciones menos favorables para el crecimiento son bajos niveles de aw y temperatura.
- *Fusarium verticillioides* es más sensible al tratamiento con fungicidas, siendo el metconazol el fungicida con mayor eficiencia en el control del crecimiento de *F. verticillioides* y *F. graminearum s. s.*
- La presencia de otras especies tiene un impacto en el crecimiento de las especies estudiadas, y modifica tanto la expresión génica como la síntesis de toxinas

Perspectivas.

- Dado la alta incidencia de micotoxinas en muestras de maíz el monitoreo continuo de las especies fúngicas y micotoxinas en este cultivo es de gran relevancia a nivel salud y económico
- En ese sentido, es de gran relevancia establecer límites en concentraciones de toxinas a nivel nacional e internacional
- Vigilancia de especies fúngicas emergentes y de micotoxinas asociadas a las mismas
- Implementar ensayos a campo que permitan evaluar estrategias de manejo con base en el conocimiento aquí adquirido para así poder mitigar el daño generado por estas especies y sus micotoxinas
- Realizar seguimiento, en relación a hongos toxicogénicos y micotoxinas, a lo largo de la cadena alimentaria hasta la llegada al consumidor final



Major *Fusarium* species and mycotoxins associated with freshly harvested maize grain in Uruguay

A. del Palacio¹ · B. Corallo¹ · M. Simoens² · Jacqueline Cea² · I. de Aurrecoechea³ · I. Martinez⁴ · A. Sanchez⁴ · S. Stewart⁵ · D. Pan¹ 

Received: 5 December 2022 / Revised: 22 May 2023 / Accepted: 27 June 2023

© The Author(s) under exclusive licence to Society for Mycotoxin (Research Gesellschaft für Mykotoxinforschung e.V.) and Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2023

Abstract

Fusarium species are common fungal pathogens of maize. *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides*, among others, can cause maize ear rot, and they are also mycotoxin producers. The aims of this work were to determine the frequency and diversity of *Fusarium* species in Uruguayan maize kernels, evaluate the toxigenic potential of the isolates, determine toxin contamination levels on freshly harvested grain, and assess the sensitivity of main *Fusarium* species against fungicides. *Fusarium verticillioides* was the most frequent species isolated, followed by *Fusarium graminearum sensu stricto*. Of *F. verticillioides* isolates studied for fumonisin production, 72% produced fumonisin B1 and 32% fumonisin B2. Considering *in vitro* toxin production by *F. graminearum sensu stricto* isolates, deoxynivalenol was the main toxin produced, followed by zearalenone and nivalenol. Fumonisins were the most frequently found toxins on freshly harvested maize samples (98% in 2018 and 86% in 2019), and also, fumonisin B1 was the toxin with highest concentration in both years studied (4860 µg/kg in 2018 and 1453 µg/kg in 2019). Deoxynivalenol and zearalenone were also found as contaminants. Metconazole and epoxiconazole were the most effective fungicides tested on *F. verticillioides* isolates. *Fusarium graminearum sensu stricto* isolates also were more sensitive to metconazole compared to other fungicides; nevertheless, epoxiconazole was less efficient in controlling this species. This is the first study that reports *Fusarium* species and mycotoxin contamination levels associated with maize grain in Uruguay. Its detection is the main step to develop management strategies in order to minimize fungal infection in maize crops.

Keywords Maize · *Fusarium graminearum* · *Fusarium verticillioides* · Mycotoxins · Fungicides

Introduction

Maize, *Zea mays* L., is considered to be one of the most susceptible crops to mycotoxin contamination worldwide. *Fusarium* species are common fungal pathogens of maize, and these fungi are responsible for various diseases including seedling blight, stalk, and ear rot. Within *Fusarium* species, *Fusarium graminearum* and some species of the *Fusarium fujikuroi* complex (FFSC) such as *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum*, and *Fusarium subglutinans* are considered among the predominant species causing maize ear rot (Logrieco et al. 2002).

Fusarium verticillioides is capable of producing fumonisins, dangerous toxins for animals and humans. They have been classified into four main groups: fumonisins A, B, C, and P. Fumonisin B (FB) is divided into 4 analogs (FB1, FB2, FB3, and FB4) and is the most abundant naturally

✉ D. Pan
dpan@fing.edu.uy

¹ Laboratorio de Micología, Facultad de Ciencias-Facultad de Ingeniería, UdelaR, 565, 11200 Montevideo, Julio Herrera Reissig, Uruguay

² Departamento de Análisis de Productos Agropecuarios, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, Montevideo, Uruguay

³ Departamento de Granos, Ministerio de Ganadería, Dirección General de Servicios Agrícolas, Agricultura y Pesca, Montevideo, Uruguay

⁴ Fundación del Laboratorio Tecnológico del Uruguay, Montevideo, Uruguay

⁵ Programa Cultivos de Secano, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Estación Experimental La Estanzuela, Colonia, Uruguay

occurring fumonisin (Picot et al. 2010; Reddy et al. 2010; Sundheim and Tsehaye 2015). Also, FB1 is the most toxic and usually appears in the highest concentrations in grains contaminated with *F. verticillioides* (Alexander et al. 2009; Baldwin et al. 2014). This mycotoxin is classified as possibly carcinogenic to humans and livestock and also causes equine leukoencephalomalacia, rat hepatocarcinoma, and porcine pulmonary edema (Gelderblom et al. 1988; Marasas et al. 1988).

Species in the *Fusarium graminearum* species complex (FGSC) are important pathogens of small-grain cereals and maize in many areas of the world. These fungi often cause crop diseases at different stages of development, and they are also mycotoxin producers. *Fusarium graminearum* species complex can produce different mycotoxins such as zearalenone (ZEN), nivalenol (NIV), and deoxynivalenol (DON). Deoxynivalenol is also divided into two acetylated derivatives, 3-acetyldeoxynivalenol (3-AcDON) and 15-acetyldeoxynivalenol (15-AcDON), where 3-AcDON has shown to be more phytotoxic and isolates that produce it may have higher pathogenic potential than those producing 15-AcDON (Pestka 2010; McCormick et al. 2011). In South America, 15-AcDON-producing isolates are usually predominant, while 3-AcDON and NIV isolates are less frequent (Del Ponte et al. 2022). Zearalenone is a toxin which has an estrogenic effect on humans and animals, causing hyperestrogenism, especially in swine (Sundlof and Strickland 1986).

Fungicides have always been a useful strategy for limiting fungal diseases on important crops. However, long-term and extensive use of chemical compounds in different crops can cause the emergence of fungicide resistance in pathogens. For this reason, monitoring the efficacy of fungicides against *Fusarium* species plays a key role in managing chemical control strategies. Carbendazim, a benzimidazole fungicide, has been widely applied for *Fusarium* control, and in recent years, carbendazim-resistant field populations have been increasing in isolates from small-grain cereals (Duan et al. 2014). On the other hand, sterol biosynthesis inhibitors, which include triazoles, are reported to be the most effective chemicals against *Fusarium* (Pirgozliev et al. 2002; Amarasinghe et al. 2013).

In Uruguay, the area planted with corn has been increasing over the last 3 years, reaching 143,000 hectares in the 2020/2021. At the same time, the productivity of the crop has increased (an accumulated 45% in the last 10 years) due to the professionalization of corn production with the incorporation of technological improvements and the use of late sowing varieties. Maize in Uruguay is mainly used as livestock feed for beef and dairy cattle (Methol 2021). In addition to this, surveys to determine prevalence of different *Fusarium* species and mycotoxins in maize have not been extensively carried out in Uruguay. This is extremely

important, since a comprehensive knowledge of the *Fusarium* species occurring on maize kernels, as well as the mycotoxins present, has important practical implications for the development of appropriate strategies to limit the presence of fungi in maize and ensure animal health.

Considering the information mentioned above, the aims of this study were (i) to determine the frequency and diversity of *Fusarium* species in Uruguayan maize kernels, (ii) to evaluate the toxigenic potential of the isolates, (iii) to determine mycotoxin contamination levels on freshly harvested maize grain, and (iv) to evaluate the sensitivity of different fungicides to the main *Fusarium* species associated to maize.

Materials and methods

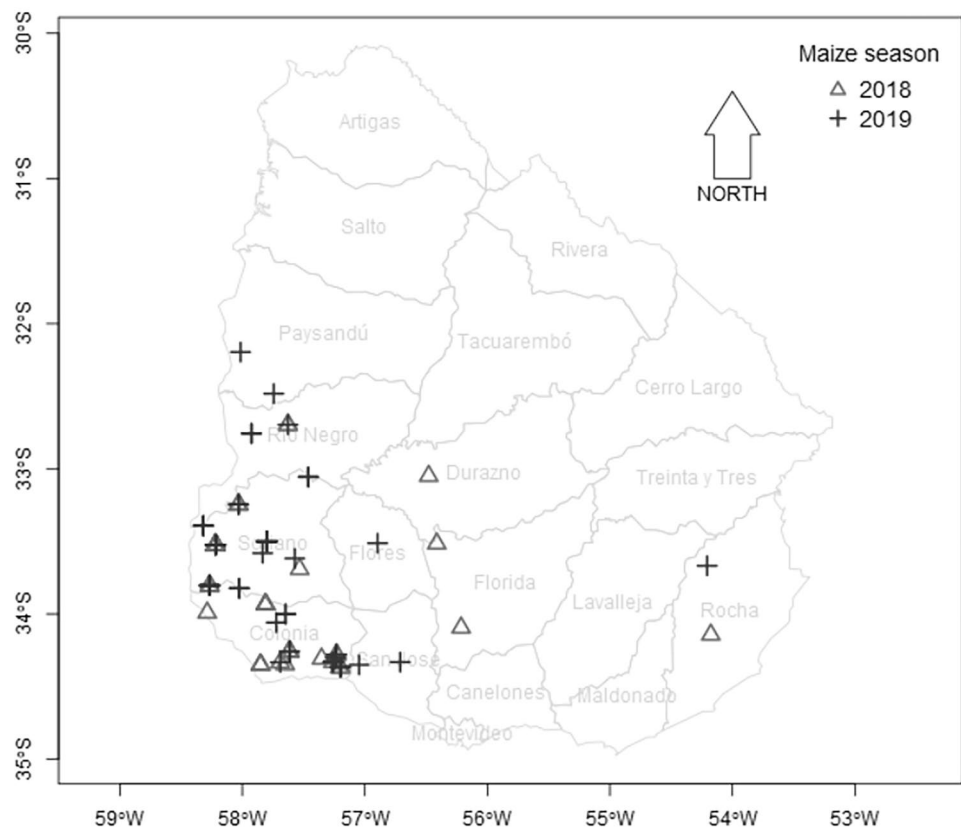
Sampling and fungal isolation

A total of 152 maize kernel samples were collected from fields located in the major maize growing area south-west of Uruguay, at the departments of Paysandú ($n=4$), Río Negro ($n=21$), Soriano ($n=47$), Colonia ($n=71$), Flores ($n=1$), San José ($n=2$), Florida ($n=1$), Durazno ($n=3$), and Rocha ($n=2$) (Fig. 1). Samples from the two crop seasons, 2018 ($n=94$) and 2019 ($n=58$), were analyzed. Kernels were surface sterilized for 1 min in 0.4% sodium hypochlorite solution, rinsed twice in sterile distilled water, and dried on sterilized filter paper. One hundred kernels from each sample were placed in Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA) and incubated at 25 °C under a 12 h white /12 h black fluorescent light photoperiod for 7 days. Fungal colonies presumably belonging to *Fusarium* spp. were purified and transferred to new Petri dishes with PDA, using a single-spore technique, for subsequent identification to species level.

Identification of *Fusarium* spp

Identification to species level was performed based on morphological characteristics following mycological methods according to Leslie and Summerell (2006). Subsequently, in order to confirm morphological identification, molecular methods were performed. For this, genomic DNA (gDNA) was extracted from single-spore culture isolates with a cetyltrimethylammonium bromide (2% CTAB) method (Leslie and Summerell 2006). All PCR reactions were carried out in a GeneAmp PCR system 9700 thermocycler (Perkin-Elmer, USA). *Fusarium graminearum sensu stricto* (*Fusarium graminearum* s. s.) was identified by RFLP of the *TEF-1α* gene method using enzyme BsaHI (Garmendia et al. 2018a). *Fusarium graminearum* s. s. strains were identified by two fragments of 367 bp and 291 bp each. The identification of *F. verticillioides* strains was carried out by PCR detection

Fig. 1 Map depicting the location of departments in Uruguay where maize kernel samples were harvested in two maize growing seasons, 2018 and 2019



assays using sets of species specific primers VER-1 and VER-2 (5'-CTTCCTGCGATGTTTCTCC-3' and 5'-AATTGGCCATTGGTATTATATATCTA-3', respectively) (Mulè et al. 2004). Also, elongation factor-1 α (tef-1 α) gene sequence was used to identify other *Fusarium* isolates obtained (Geiser et al. 2004). DNA sequences were analyzed using the SeqMan software (Lasergene, Madison, WI) and compared with the sequences of closely related species in GenBank database by using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) and in the CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre's *Fusarium* MLST website (<https://fusarium.mycobank.org/databases>). The generated sequences were deposited in the GenBank database under accession numbers OQ948480–OQ948506.

Toxigenic capacity of fungal isolates

A random subsample of all collected isolates of *F. verticillioides* ($n=86$) and FGSC ($n=79$) was selected in order to analyze their in vitro toxigenic profile. Toxins were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) consisting of a Shimadzu LC-10ADvp pump. A RF-10Axl fluorescence detector and a photodiode array detector were used for fumonisins and trichothecenes, respectively (Shimadzu). For all toxin evaluations, a C18 column (150 mm $\times$ 4.6 mm i.d., 5 μ m particle size; Nucleodur®, Macherey–Nagel, Düren, Germany) connected to a pre-column security guard

(8 mm $\times$ 4 mm i.d., 5 μ m particle size; Nucleodur®, Macherey–Nagel, Düren, Germany) was used. Fumonisin B1 and B2, DON, NIV, and ZEN standards were supplied by Trilogy Analytical Laboratory Inc., Washington, MO. For FB1 and B2 evaluation, 20 g of rice kernels with 10 ml of sterile water was autoclaved for 30 min twice on alternate days. For DON, NIV, and ZEA production, 25 g of rice with 10 ml of water was used. Bags of autoclaved rice were inoculated with 3 mycelium plugs taken from pure cultures of each selected isolate. Bags were incubated in the dark at 25 °C for 28 days, and developed cultures were then oven dried at 60 °C, finely ground with a laboratory blender, and stored at –20 °C until use.

Fumonisin extraction was performed according to the AOAC: 995.15 method. Toxins were extracted from 5g of grinded rice with methanol:water (3:1 v/v), filtered extract was applied to an anion-exchange (SAX) column (Strata®SAX, 55 μ m, 70 Å, Phenomenex), and fumonisins were eluted with acetic acid: methanol (1:99 v/v). Eluate was evaporated to dryness, and the residue was dissolved in methanol. O-Phthaldialdehyde (Sigma-Aldrich, Milan, Italy) reagent solution was added to form fluorescent fumonisin derivatives. A fluorescence detector with excitation and emission wavelengths of 335nm and 440 nm, respectively, was used. The mobile phase was methanol: NaH₂PO₄ 0.1M solution (77:23 v/v) pH 3.5, at a flow rate of 1ml/min; the

injection volume was 20 µl. Fumonisin concentration was determined by comparison with external standards.

Zearalenone production was performed based on the methodology described by AOAC 985.18. Five grams of ground rice was used for toxin extraction using methanol: water (80:20 v/v); the filtered extract was cleaned using a MycoSep®226 column (Romer Labs Inc., MO, USA). The eluate was first evaporated and then dissolved in methanol: water (70:30 v/v), the same solution was used as mobile phase, the flow rate was 1ml/min, and the injection volume was 50 µl. ZEN concentration was determined by comparison with external standards.

Deoxynivalenol and NIV were detected using methods described by Reynoso et al. (2011). Toxins were extracted from 7.5 g of ground rice with acetonitrile: methanol (14:1 v/v) and then filtered through an aluminum C-activated (20:1, w/w) laboratory made column. Eluate was evaporated to dryness and resuspended with methanol: water (5:95 v/v). An UV detector (220 nm) was used. The mobile phase was methanol: water (12:88 v/v), at a flow rate of 1.5 ml/min. The injection volume was 50 µl. DON and NIV concentration was determined by comparison with external standards.

Trichothecene genotype determination

For FGSC isolates, trichothecene genotypes were also determined using three different PCR assays. First, two multiplex assays targeted a portion of trichothecene biosynthesis genes *Tri3* and *Tri12* to determine NIV, 15-AcDON, and 3-AcDON genotypes (Ward et al. 2002), while the third assay targeted portions of the *Tri13* gene to determine DON genotypes (Chandler et al. 2003) (Table 1). The *Tri3* multiplex included a primer common to all genotypes (3CON) and three genotype-specific primers: 3NA, 3D15A, and 3D3A. This reaction produces amplicons of approximately 840, 610, and 243 bp for isolates that match NIV, 15-AcDON, and 3-AcDON genotypes, respectively. The *Tri12* multiplex

similarly included a primer common to all genotypes, 12CON, and three genotype-specific primers: 12NF, 12-15F, and 12-3F. This multiplex produced amplicons of approximately 840, 670, and 410 bp for isolates that match NIV, 15ADON, and 3ADON genotypes, respectively. The *Tri13* gene amplification was performed using primers Tri13F and Tri13DONR; the PCR amplifies a fragment of 282 bp for DON-producing isolates. The multiplex PCR was conducted in 25 µl reaction mixtures containing 50 ng of DNAg, 1X PCR buffer (Nzytech), 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.5U DNA Taq polymerase (Nzytech), and 0.2 mM each primer. 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 assays for *Tri13* genes were conducted using 50 ng of fungal DNA in a total volume of 25 µl containing 1.5X PCR buffer (Nzytech), 2 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTPs, 0.75 U of DNA Taq polymerase (Nzytech), and 0.4 mM each primer. 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.

All amplification products were resolved on 1.5% (wt/vol) agarose gels and scored by size in comparison to a 100-bp DNA size ladder (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA).

Natural mycotoxin occurrence in maize grain

Sixty-one representative samples of maize grain from the 2018 harvest and 58 samples from 2019 were selected for mycotoxin determination. One kilogram of each sample was ground in a Romer mill, range of 60–200 mesh (Romer Labs Inc., MO, USA) and stored in the freezer at –80 °C until analysis. Before the analysis, a ground subsample (20 g) was obtained by the quartering sampling method following Codex guidelines. Fumonisin and ZEN determination were performed according to AOAC methods described above (AOAC 2019). All toxins were determined using HPLC connected to a reversed-phase Gemini C18 (4.60 mm × 150 mm, 5 µm, for fumonisins and DON and 4.60 mm × 250 mm, 5 µm, for ZEA and NIV) analytical column (Phenomenex, USA) connected to a pre-column security guard (8 mm × 4 mm i.d., 5 µm particle size; Nucleodur®, Macherey–Nagel, Düren, Germany). The HPLC system consisted of a Waters 1525 pump, Waters 717 Injector, and Waters TCM oven. For fumonisins and ZEN, the HPLC system was coupled to a Waters 2475 Fluorescence detector. The mobile phase and standard solutions used were that described above. Deoxynivalenol and NIV extraction was performed according to the AOAC: 986.17 method. A Waters 2996 photodiode array detector (220 nm) was used. The mobile phase and standard solutions used were that described above. Veracity and precision of the method were evaluated by using maize

Table 1 Primer sequences used for genotype characterization by multiplex PCR (*Tri3*, *Tri12*) and PCR (*Tri13*)

Gene	Primer	Sequence (5'-3')
<i>Tri 3</i>	3CON	TGGCAAAGACTGGTTCAC
<i>Tri 3</i>	3NA	GTGCACAGAATATACGAGC
<i>Tri 3</i>	3D15A	ACTGACCCAAGCTGCCATC
<i>Tri 3</i>	3D3A	CGCATTGGCTAACACATG
<i>Tri 12</i>	12CON	CATGAGCATGGTGATGTC
<i>Tri 12</i>	12NF	TCTCCTCGTTGTATCTGG
<i>Tri 12</i>	12-15F	TACAGCGTTCGCAACTTC
<i>Tri 12</i>	12-3F	CTTTGGCAAGCCCGTGCA
<i>Tri 13</i>	Tri13F	CATCATGAGACTTGTGTGACAGTTGGG
<i>Tri 13</i>	Tri13DONR	GCTAGATCGATTGTTGCATTGAG

kernels spiked with each toxin (DON, NIV, ZEN, FB1, or FB2 as appropriate). Replicates of spiked samples were performed, and the relative standard deviation was calculated among them to stipulate the precision of the method. The veracity of the analytical method was evaluated in terms of recovery. Recoveries were determined by spiked maize samples with known levels of standards. Percent method recovery was 93% for DON, 87% for NIV, 76% for FB1, 77% for FB2, and 77% for ZEA. The limits of report quantification (LOQs) were 80 µg/kg (FBs), 30 µg/kg (ZEN), 88 µg/kg (DON), and 50 µg/kg (NIV).

Fungicide sensitivity assay

Sensitivity of *F. verticillioides* and *F. graminearum* s. s. isolates was evaluated against two different chemical classes of fungicides, triazoles and benzimidazoles. Fungicides belonging to triazoles were metconazole, tebuconazole, and epoxiconazole, while carbendazim belongs to benzimidazole class. The assay was performed on a total of 20 isolates per species, 10 isolates from each crop season (2018 and 2019). Fungicides were diluted in dimethylsulfoxide 0.1% (DMSO) and incorporated into PDA to achieve concentrations of 0.25, 0.50, 0.75, 1.5, 3, 6, and 10 mg/l. Three replicates of each fungicide concentration per isolate were performed. A mycelial plug (8 mm in diameter) of each isolate was taken from a 5-day-old colony and placed on the center of a PDA plate amended with each fungicide at each concentration. *Fusarium verticillioides* isolates plates were incubated for 7 days at 25 °C in darkness; *F. graminearum* s. s. strains were incubated for 5 days under the same conditions. Colony diameters were measured daily in two perpendicular directions. Evaluation was performed based on the radial growth

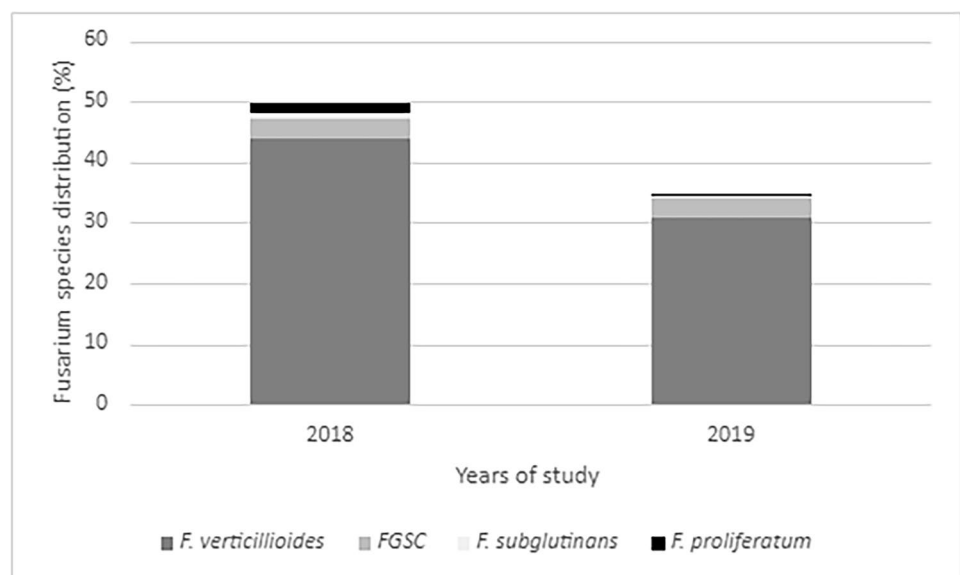
on PDA containing different concentrations of each fungicide, compared to control plates (PDA + DMSO) (Becher et al. 2010; Tateishi et al. 2010). Effective concentration of fungicides leading to a 50% inhibition (EC₅₀) of mycelial growth of each strain was determined. The EC₅₀ was calculated on the basis of linear regression analysis of relative growth inhibition values against the log₁₀-transformed fungicide concentrations based on Probit analysis (Finney 1952). Analysis of variance (ANOVA) of the EC₅₀ values were conducted to determine differences in sensitivity among species (*F. verticillioides* and *F. graminearum* s. s.) for each fungicide and among fungicides within each species. Means were compared using Fisher's least significant difference (LSD) ($\alpha = 0.05$). Statistical analysis was performed using Infostat (Di Rienzo et al. 2011).

Results

Frequency of *Fusarium* in maize kernels

According to the 152 field samples analyzed over both years (2018 $n = 94$, 2019 $n = 58$), *Fusarium* species were the most frequent toxigenic contaminants in maize kernels (45%) with incidence values ranging between 7 and 100%, followed by *Aspergillus* species (15%). Within the *Fusarium* species, *Fusarium verticillioides* was the most frequent species isolated, with an average frequency of 44% and 30% in 2018 and 2019, respectively. The second most frequent *Fusarium* species isolated was the FGSC with 3% average frequency for both years studied. Other *Fusarium* species identified were *F. proliferatum* and *F. subglutinans*, but they were in low frequency over both years (Fig. 2).

Fig. 2 *Fusarium* species distribution according to morphological features in both seasons studied



To correctly assign the *Fusarium* species identification, 236 *Fusarium* isolates from both years were selected as representatives of the *Fusarium* population isolated from maize kernels and were molecularly identified. This allowed to identify 115 isolates as *F. verticillioides*, 89 isolates as *F. graminearum* s.s., 14 isolates as *F. subglutinans*, 10 isolates as *F. proliferatum*, 6 isolates as *F. meridionale*, 1 isolate as *F. pseudograminearum*, and 1 as *F. armeniacum*.

Toxicogenic capacity of fungal isolates

Fumonisin production was assessed for 84 of the isolates identified molecularly as *F. verticillioides*. Fumonisin B1 was produced by 69% ($n=33$) of the isolates from 2018 and 75% ($n=27$) from 2019; the proportion of FB2 producers was 31% and 33% for each year ($n=15$ from 2018, $n=12$ from 2019) (Fig. 3).

Deoxynivalenol, NIV, and ZEN production was studied in 74 of the *F. graminearum* s. s. isolates and in 4 of the *F. meridionale* strains found. The proportion of *F. graminearum* s. s. mycotoxin producer strains was high during both years of study, with 70.5% ($n=24$) and 72.5% ($n=29$) ZEN producer strains in 2018 and 2019, respectively, and 85% of DON producer strains for each year of study. On the other hand, NIV producer strains were less frequent with 23.5% ($n=8$) and 7.5% ($n=3$) in 2018 and 2019, respectively (Fig. 3). Finally, *F. meridionale* strains showed a different mycotoxin profile compared to *F. graminearum* s. s. strains, with 2 out of 4 isolates being NIV producers in 2018, while ZEN and DON producer strains were not found.

Trichothecene genotypes

Trichothecene genotype study was performed on 85% ($n=29$) and 86% ($n=45$) of *F. graminearum* s. s. isolates from 2018 and 2019, respectively. Moreover, genotype profile was assessed for four *F. meridionale* isolates. All isolates identified as *F. graminearum* s. s. belong to genotypes DON-15-AcDON, and all *F. meridionale* isolates have a genotype NIV-DON.

Natural mycotoxins occurrence on freshly harvested maize grain

The presence of *Fusarium* mycotoxins (DON, ZEN, NIV, FB1, and FB2) was assessed on 119 maize samples, 61 belonging to 2018 and 58 from 2019. About 97% and 86% of freshly harvested samples from 2018 and 2019, respectively, were contaminated with FB1, which was the main contaminant found in the study (Table 2). Higher concentrations of fumonisins were found on samples from 2018, FB1 averaged 4071 $\mu\text{g/kg}$ and 1529 $\mu\text{g/kg}$ for FB2 (Table 2). Most samples studied had contamination levels of fumonisins lower than 2000 $\mu\text{g/kg}$, and only 10% or less of the samples showed levels of contamination above 5000 $\mu\text{g/kg}$ (Fig. 4).

The presence of DON was also detected in maize samples, but at lower concentrations during 2018 and 2019 with a mean content of 278 $\mu\text{g/kg}$ and 118 $\mu\text{g/kg}$, respectively (Table 2). Regarding ZEN, the contamination levels were higher during 2018, with 64% positive freshly harvested samples and a mean value of 302 $\mu\text{g/kg}$ (Table 2). On the other hand, NIV was detected in one sample each year and at low levels.

Fig. 3 Percent of *F. verticillioides* isolates that produced FB1 and FB2 and of *F. graminearum* s. s. isolates that produced DON, NIV, and ZEN, in vitro for both years of study

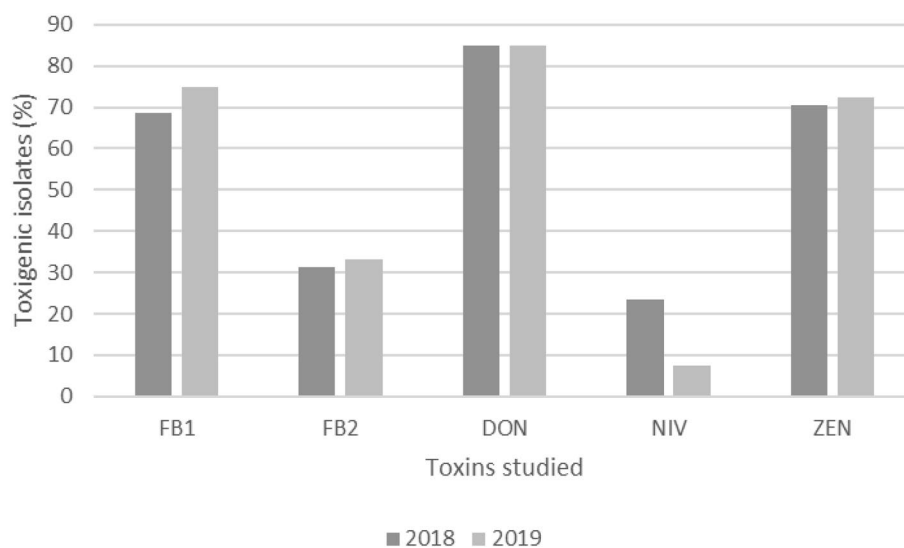


Table 2 Presence of mycotoxins (DON, ZEN, NIV, FB1, and FB2) on harvest maize grain samples from Uruguay during the years 2018 ($n=61$) and 2019 ($n=58$)

Maize	Average contamination ($\mu\text{g/kg}$) $\pm$ SD		Percentage of contaminated samples (%)		Average contamination on contaminated samples ($\mu\text{g/kg}$)			
					Average of contaminated samples ($\mu\text{g/kg}$) $\pm$ SD	Contamination range	Average of contaminated samples ($\mu\text{g/kg}$) $\pm$ SD	Contamination range
	2018	2019	2018	2019				
FB1	4071 $\pm$ 9893	1252 $\pm$ 2002	96.7	86.2	4860 $\pm$ 10023	80–59004	1453 $\pm$ 2089	80–9881
FB2	1529 $\pm$ 2774	427 $\pm$ 756	90.2	60.4	1695 $\pm$ 2874	80–14,908	708 $\pm$ 868	80–4138
DON	278 $\pm$ 456	118 $\pm$ 233	52.5	46.5	530 $\pm$ 513	59–2471	253 $\pm$ 289	59–922
ZEN	302 $\pm$ 732	18 $\pm$ 45	64	17.2	472 $\pm$ 874	30–2522	103 $\pm$ 58	30–200
NIV	3 $\pm$ 15	3 $\pm$ 20	5	1.7	66 $\pm$ 16	50–84	-	-

Sensitivity to fungicides

EC₅₀ values of epoxiconazole for the tested *F. verticillioides* isolates ($n=20$) ranged between 0.002 and 0.107 mg/l with a mean of 0.040 mg/l (Fig. 5). For metconazole, the sensitivity range was between 0.004 and 0.146 mg/l with a mean value of 0.027 mg/l (Fig. 5). EC₅₀ values for tebuconazole ranged from 0.03 to 0.429 mg/l with a mean value of 0.093 mg/l (Fig. 5). Lastly, carbendazim EC₅₀ values ranged between 0.181 and 0.651 mg/l with a mean of 0.410 mg/l (Fig. 5). One of the *F. verticillioides* isolates (A61) was less sensitive for both tebuconazole and metconazole with EC₅₀ values of 0.499 and 0.186 mg/l, respectively (online resource 1).

In the case of *F. graminearum s. s* isolates ($n=20$), the EC₅₀ values for triazole fungicide class ranged from 0.217 to 3.951 mg/l with a mean of 1.392 mg/l for epoxiconazole, 0.001 to 0.710 mg/l with a mean of 0.155 mg/l for metconazole, and 0.040 to 1.656 mg/l with a mean of 0.763 mg/l for tebuconazole (Fig. 5). Additionally, carbendazim EC₅₀ values ranged between 0.130 and 1.145 mg/l with a mean of 0.649 mg/l (Fig. 5). In the case

of epoxiconazole, isolates A539 and A545 were observed to be the least sensitive, with EC₅₀ values of 3.939 and 3.951 mg/l, respectively. Also, isolates A545 and A560 showed low levels of sensitivity for metconazole, with values of 0.710 and 0.403 mg/l (online resource 2).

Considering *F. verticillioides*, no differences were shown between epoxiconazole and metconazole, although tebuconazole appears to be less effective showing significant differences on EC₅₀ values ($p < 0.05$) when compared to metconazole and epoxiconazole. Also, isolates were significantly less sensitive to the presence of carbendazim ($p < 0.05$). On the other hand, *F. graminearum s. s* isolates were more sensitive to metconazole ($p < 0.05$) than other fungicides tested and least sensitive to epoxiconazole.

Overall, *F. verticillioides* isolates were more sensitive than *F. graminearum s. s* strains for all fungicides tested ($p < 0.05$).

Less sensitive isolates of *F. graminearum s. s* were observed in the case of all fungicides assessed (Fig. 5). The EC₅₀ for the least sensitive isolates was 3.951 mg/l for epoxiconazole, 1.656 mg/l for tebuconazole, 0.710 mg/l for metconazole, and 1.145 mg/l for carbendazim.

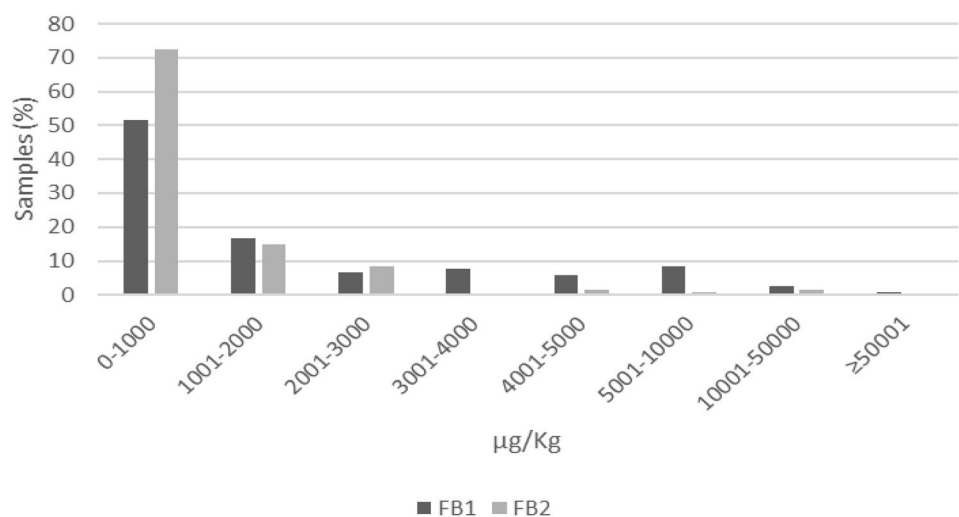
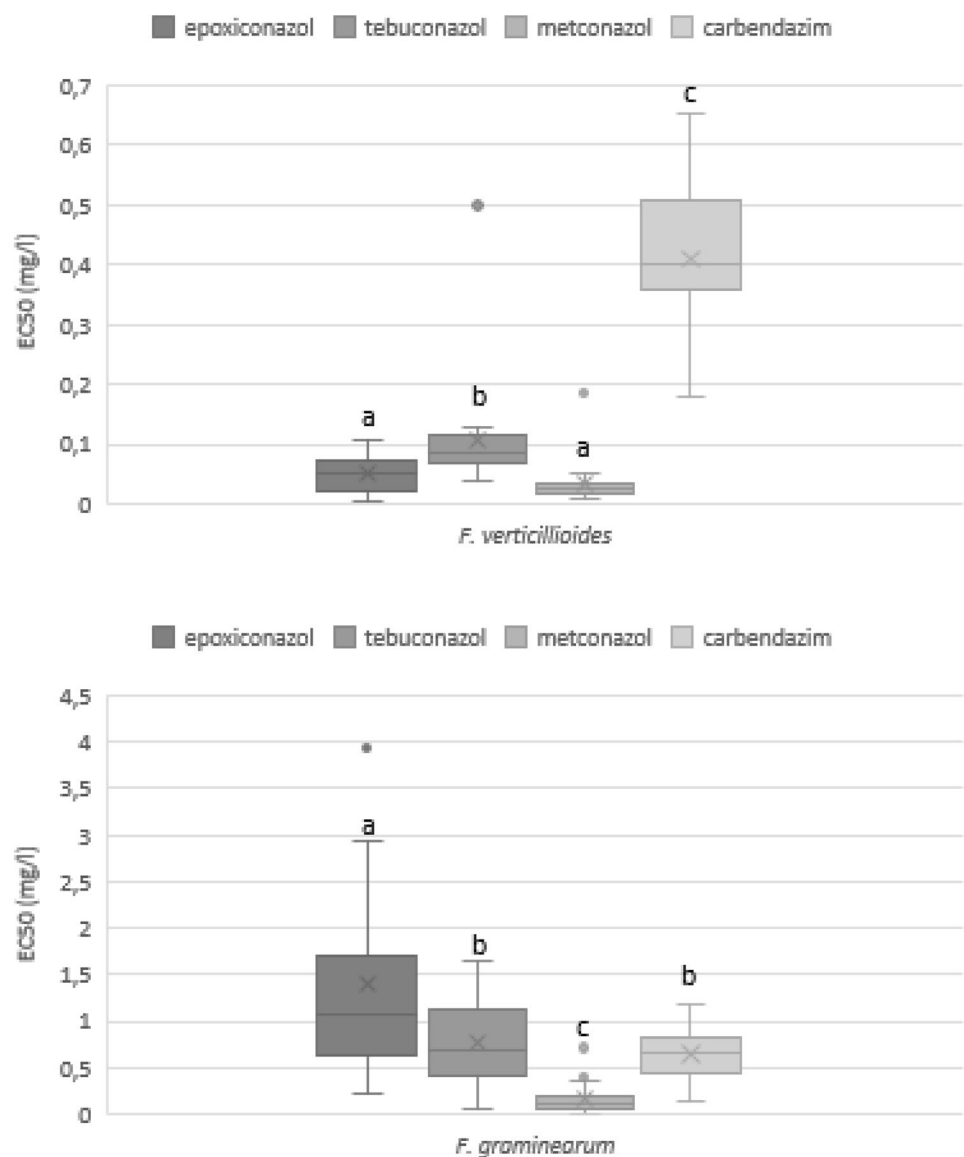
Fig. 4 Sample distribution (%) according to FB1 and FB2 contamination levels ($\mu\text{g/kg}$) considering all samples analyzed

Fig. 5 Fungicide EC₅₀ values for *F. verticillioides* and *F. graminearum* s. s. strains. Letters above boxes indicate statistical differences; lower cases indicate differences in between fungicides within each species (Fisher LSD $p < 0.05$)



Discussion

This work represents the first survey on *Fusarium* species associated with maize kernels in Uruguay. *Fusarium verticillioides* appeared as the predominant species, and to a lesser extent, *F. graminearum* s. s. was also identified as an important contaminant of this crop. Studies carried out in other regions, in particular, in Brazil and Argentina, showed that *F. verticillioides* was the most prevalent *Fusarium* species in freshly harvested maize (Castañares et al. 2019; van der Westhuizen et al. 2003). In our study, *F. verticillioides* was isolated with a frequency of 37% that is similar to that found in maize samples from Brazil (Almeida et al. 2002), Korea (Choi et al. 2018), Iran (Fallahi et al. 2019), Bélgica (Scauflaire et al. 2011), and China (Zhou et al. 2018). However, our frequency is lower

than those observed by other authors. In Brazil, Stumpf et al. (2013) determined that *F. verticillioides* was present in a frequency of 96% and Barroso et al. (2017) between 54.1 and 91.8% on commercial hybrids of maize. Same results were obtained from Argentina (Castañares et al. 2019), Brazil (Lanza et al. 2014), China (Qin et al. 2020), Nigeria (Bankole and Mabekoje 2004) and Spain (Aguín et al. 2014). These differences could be due to several factors, including climatic conditions, maize genotypes, and cultural practices that influence the occurrence and prevalence of *F. verticillioides* and other *Fusarium* species that affect maize (Munkvold 2003).

On the other hand, two more species members of FFSC have been detected with significant frequency: *F. subglutinans* and *F. proliferatum* (O'Donnell et al. 1998). Both species often co-occur with *F. verticillioides* worldwide on

maize, making the development of resistant hybrids more difficult for breeders (Fallahi et al. 2019). Considering that this is the first report of some of the species within the FFSC in crops of Uruguay, more studies about this species complex should be carried on in order to develop adequate strategies to control *Fusarium* ear rot and minimize mycotoxin contamination of maize.

When it comes to FGSC, it is usually suggested that *F. meridionale* is adapted to maize agroecosystems, as it is the most prevalent contaminant of the FGSC in maize in Brazil and Argentina, despite the prevalence of other FGSC species on wheat and rice in those countries (Alvarez et al. 2009; Del Ponte et al. 2015; Kuhnem et al. 2016; Sampietro et al. 2011). However, our data indicate that *F. graminearum* s. s. is the main contaminant of the FGSC in maize in Uruguay, suggesting that extended areas of crops such as wheat and barley, usually contaminated with *F. graminearum* s. s. (Garmendia et al. 2018b; Pan et al. 2016; Umpiérrez-Failache et al. 2013), may be a very important factor in species distribution when these crops coexist in rotation on the same cultivated areas like in our country.

The present study showed that over 70% of *F. verticillioides* isolated from maize in Uruguay are *in vitro* fumonisins producers, being FB1 the principal toxin produced by this species. Considering this, and the fact that *F. verticillioides* was the most prevalent species, the presence of fumonisins in maize grain is a potential threat to human and animal health in our country. In this sense, the presence of *F. proliferatum* and *F. subglutinans* of further concern due to the ability of these species to produce fumonisins increases risks of consumption of contaminated maize due to the coexistence of these toxigenic species in maize.

Regarding *F. graminearum* s. s., *in vitro* mycotoxin production profile, DON, was the most frequently produced toxin, followed by ZEN and NIV. Previous studies in South America about this species contaminating different crops have also found DON as the main toxin produced (Del Ponte et al. 2022). Nevertheless, our study also showed a very high proportion of isolates being ZEN producers (70.5% and 72.5% from 2018 and 2019, respectively). Although there are very few studies on potential ZEN production by *F. graminearum* s. s. isolates, it is well known that the levels of ZEN are frequently present in grains from different crops, including maize (Salay and Mercadante 2002; Maragos 2010). On the other hand, *F. graminearum* s. s. isolates evaluated in this study showed DON-15-AcDON genotype, and none of them had NIV genotype. This result is consistent with the previous reports from different crops in Uruguay (Garmendia et al. 2018b; Pan et al. 2013, 2016; Umpiérrez-Failache et al. 2013), where DON-15-AcDON genotype prevails for *F. graminearum* s. s., showing stability of genotype composition across crops and years in our country. Moreover, in recent years, it has been shown that

in Europe, 15-AcDON genotype is the predominant one in wheat and maize, with an overall distribution in cereals up to 83% (Pasquali et al. 2016).

Previous studies that evaluated the toxigenic potential of *F. meridionale* from Argentina, Brazil, and other parts of the world including Europe, China, and Mexico (Scoz et al. 2009; Astolfi et al. 2012; Sampietro et al. 2011; Desjardins and Proctor 2011; Boutigny et al. 2014) suggested a very strong association of this species to NIV genotype. However, our results showed that all strains of *F. meridionale* studied were characterized as a DON/NIV genotype and were either non-toxin producers or NIV producers by chemical analysis. Some studies reported the presence of DON/NIV genotype in different species of FGSC. Furthermore, isolates of this genotype showed different chemical profiles (Del Ponte et al. 2022; Lee et al. 2012; Sampietro et al. 2013; Reynoso et al. 2011). Moreover, Barros et al. (2012) found that all *F. meridionale* strains isolated from Argentinian soybean grain showed the DON/NIV genotype. However, these DON/NIV isolates of *F. meridionale* produced detectable DON and NIV levels and only DON by chemical analysis. Further studies will be necessary in order to characterize the *F. meridionale* DON/NIV strains.

The fact that *F. verticillioides* was the most prevalent species found on maize samples and that most of the isolates were able to produce FB1 was to be expected that over 85% of the maize samples were naturally contaminated with fumonisins, being FB1 the predominant toxin. Piñeiro et al. (1997) studied the levels of fumonisins in unprocessed corn kernels from Uruguay; their results showed average contamination levels with FB1 of 963 µg/kg, with a range from ND to 3688 µg/kg, with 50% of contaminated samples with FB1, and no contaminated samples with FB2. Although their results are based only on 22 samples, both surveys show that FB1 contamination of maize grains is frequent in Uruguay, and it is frequently found at high levels. Also, our results are similar to those reported for maize in other parts of the world (Garrido et al. 2012; Scussel et al. 2014; Udovicki et al. 2018; Yli-Mattila and Sundheim 2022) and support the idea that this crop is very prone to fumonisin contamination (Ponce-García et al. 2018).

In Uruguay, maize is principally used for feeding cattle, dairy cattle, poultry, and swine. Considering current international regulations, the levels found on 24% ($n = 15$) of the samples from 2018 and 10% ($n = 6$) of the samples from 2019 are higher than those recommended by CAC (2019) for food and feed (4000 µg/kg FB1 + FB2), and only one sample exceeded China recommended levels (GB 13078, 2017) in maize grain and maize by-products for animal feed (60,000 µg/kg FB1 + FB2). Despite the similar incidence of *F. verticillioides* in both years of study (44% and 30% in 2018 and 2019, respectively), the levels of fumonisins were much higher in 2018 compared to 2019. This could be explained by

fumonisin production being very variable among strains and that environmental conditions play an important role in its production (Munkvold and Desjardins 1997).

The levels of DON and ZEN found in the present study were similar when compared to the reports from maize of the region (Castañares et al. 2019; Mendes de Souza et al. 2013). Only the DON levels present in 6% ($n=7$) of samples exceed the recommended levels in Uruguay for swines and equines (1000 µg/kg). No samples exceed the levels for raw materials destined for the production of animal feed (10,000 µg/kg) (MGAP resolución S/N/001 2001; FDA 2010). Considering levels of ZEN, 11% ($n=13$) of the samples exceeded the recommended levels in Uruguay of 250 µg/kg. It could be explained by the low incidence of FGSC (3%) in both years studied.

Chemical applications to control *Fusarium* ear rot are not a widely used practice, and few studies have demonstrated the efficacy of synthetic fungicide to control *Fusarium* ear rot in maize, especially against *Fusarium fujikuroi* species complex (Masiello et al. 2019; Tava et al. 2021). This study provides new information on the sensitivity of the two main toxigenic *Fusarium* species associated with *Fusarium* ear rot of maize to different fungicides commonly used in other crops. Sensitivity of *F. verticillioides* Uruguayan isolates to tebuconazole, metconazole, and carbendazim was similar to those reported by other authors years ago in other geographical regions (Ivić et al. 2011; Marin et al. 2013). No reported data was found on sensitivity of *F. verticillioides* to epoxiconazole.

Metconazole was the most effective fungicide to inhibit growth of *F. graminearum* s. s. isolates in this study, followed by carbendazim, despite some reports mentioning the occurrence of resistant field strains to benzimidazole fungicides in other crops (Brent and Hollomon 2007; Chen et al. 2007; Liu et al. 2010). However, our results showed EC50 values higher than 0.362 mg/l and 0.320 mg/l for metconazole, which were the highest values reported by Garmendia et al. (2018b) for isolates of *F. graminearum* s. s. from barley in Uruguay and Spolti et al. (2014) from wheat in Brazil, respectively.

Results showed significant differences in sensitivity of two important *Fusarium* toxigenic species to four fungicides commonly used, with *F. verticillioides* being more sensitive to fungicides than *F. graminearum* s. s. These differences are probably due to long-term exposure of *F. graminearum* s. s. strains to different classes of fungicides; thus, *F. graminearum* s. s. is known to be the most frequent pathogen on barley and wheat in Uruguay, causing severe *Fusarium* head blight (Umpiérrez-Failache et al. 2013; Garmendia et al. 2018b). These crops, especially wheat, are usually treated with fungicides to control this disease. On the other hand, *F. verticillioides* appears here as the most important contaminant of maize, but generally in Uruguay,

farmers produce maize primarily to feed their animals, so no fungicide is applied.

The *in vitro* assay on fungicides available in the market allowed us to select the most effective chemical against the most occurring pathogenic and toxigenic fungi on maize. Results of fungicide assays should be taken into account to design experiments in the field to confirm *in vitro* tests.

In conclusion, this is the most extensive study that reports *Fusarium* species associated with maize kernels in Uruguay and the presence of *Fusarium* toxins on grain samples. This knowledge is an important step for developing management strategies to minimize *Fusarium* infection and the presence of their toxins in maize. To this purpose, it was determined that the most effective fungicide for the control of the *Fusarium* species analyzed is metconazole. However, it is important to continue studying the sensitivity of Uruguayan *Fusarium* strains to fungicides, considering this an important strategy to control the disease in the field and improve crop sustainability.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s12550-023-00498-y>.

Funding This work was financed by the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), project number FSA-I-2017–1-139531.

Declarations

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

References

- Aguín O, Cao A, Pintos C, Santiago R, Mansilla P, Butrón A (2014) Occurrence of *Fusarium* species in maize kernels grown in north-western Spain. *Plant Pathol* 63:946–951
- Alexander NJ, Proctor RH, McCormick SP (2009) Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. *Toxin Rev* 28:198–215
- Almeida AP, Fonseca H, Fancelli AL, Direito GM, Ortega EM, Corrêa B (2002) Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian corn from sowing to harvest. *J Agric Food Chem* 50:3877–3882
- Alvarez CL, Azcarate MP, Pinto VF (2009) Toxigenic potential of *Fusarium graminearum* sensu stricto isolates from wheat in Argentina. *Int J Food Microbiol* 135:131–135
- Amarasinghe C, Tamburic-Ilincic L, Gilbert J, Brûlé-Babel AL, Fernando WG (2013) Evaluation of different fungicides for control of *Fusarium* head blight in wheat inoculated with 3ADON and 15ADON chemotypes of *Fusarium graminearum* in Canada. *Can J Plant Pathol* 35:200–208
- AOAC International Official Methods of Analysis of AOAC International (2019)
- Astolfi P, Reynoso MM, Ramirez ML, Chulze SN, Alves TCA, Tessmann DJ, Del Ponte EM (2012) Genetic population structure and trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat in southern Brazil. *J Plant Physiol* 61:289–295
- Baldwin TT, Zitomer NC, Mitchell TR, Zimeri AM, Bacon CW, Riley RT, Glenn AE (2014) Maize seedling blight induced by *Fusarium verticillioides*: accumulation of fumonisin B1 in leaves without colonization of the leaves. *J Agric Food Chem* 62:2118–2125

- Bankole S, Mabekoje O (2004) Occurrence of aflatoxins and fumonisins in pre-harvest maize from South-Western Nigeria. *Food Addit Contam* 21:251–255
- Udovicki B, Audenaert K, De Saeger S, Rajkovic A (2018) Overview on the mycotoxins incidence in Serbia in the period 2004–2016. *Toxins (basel)* 10:279
- Barros G, Alaniz Zanon M, Abod A, Oviedo M, Ramirez ML, Reynoso MM, Torres A, Chulze S (2012) Natural deoxynivalenol occurrence and genotype and chemotype determination of a field population of the *Fusarium graminearum* complex associated with soybean in Argentina. *Food Add Cont* 29:293–303
- Barroso V, Rocha L, Reis T, Reis G, Duarte A, Michelotto M, Correa B (2017) *Fusarium verticillioides* and fumonisin contamination in Bt and non-Bt maize cultivated in Brazil. *Mycotoxin Res* 33:121–127
- Becher R, Hettwer U, Karlovsky P, Deising HB, Wirsel SG (2010) Adaptation of *Fusarium graminearum* to tebuconazole yielded descendants diverging for levels of fitness, fungicide resistance, virulence, and mycotoxin production. *Phytopathology* 100:444–453
- Boutigny AL, Ward TJ, Ballois N, Iancu G, Ioos R (2014) Diversity of the *Fusarium graminearum* species complex on French cereals. *Eur J Plant Pathol* 138:133–148
- Brent KJ, Hollomon DW (2007) Fungicide resistance: the assessment of risk. In Global Crop Protection Federation. (FRAC Monograph No. 2.); The Fungicide Resistance Action Committee Brussels: Brussels, Belgium
- Castañares E, Martínez M, Cristos D, Rojas D, Lara B, Stenglein S, Dinolfo M (2019) *Fusarium* species and mycotoxin contamination in maize in Buenos Aires province, Argentina. *Eur J Plant Pathol* 155:1265–1275
- Chandler EA, Simpson DR, Thomsett MA, Nicholson P (2003) Development of PCR assays to Tri7 and Tri13 trichothecene biosynthetic genes, and characterization of chemotypes of *Fusarium*. *Physiol Mol Plant Pathol* 62:355–367
- Chen CJ, Wang JX, Luo QQ, Yuan SK, Zhou MG (2007) Characterization and fitness of carbendazim-resistant strains of *Fusarium graminearum* (wheat scab). *Pest Manag Sci* 63:1201–1207
- Choi J-H, Lee S, Nah J-Y, Kim H-K, Paek J-S, Lee S, Ham H, Kee Hong S, Yunb S-H, Lee T (2018) Species composition of and fumonisin production by the *Fusarium fujikuroi* species complex isolated from Korean cereals. *Int J Food Microbiol* 267:62–69
- Codex Alimentarius Commission (CAC) (2019). General standard for contaminants and toxins in food and feed. CXS 193–1995. 2019. Available from: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B193-1995%252FCXS_193e.pdf
- Del Ponte EM, Moreira GM, Ward TJ et al (2022) *Fusarium graminearum* species complex: a bibliographic analysis and web-accessible database for global mapping of species and trichothecene toxin chemotypes. *Phytopathology* 112:741–751
- Del Ponte EM, Spolti P, Ward TJ, Gomes LB, Nicolli CP, Kuhnem PR, Silva CN, Tessmann DJ (2015) Regional and field-specific factors affect the composition of *Fusarium* head blight pathogens in subtropical no-till wheat agroecosystem of Brazil. *Phytopathology* 105:246–254
- Desjardins AE, Proctor RH (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* 115:38–48
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, Robledo CW (2011) InfoStat (versión 2011). FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, Grupo InfoStat
- Duan Y, Zhang X, Ge C, Wang Y, Cao J, Jia X, Wang J, Zhou M (2014) Development and application of loop-mediated isothermal amplification for detection of the F167Y mutation of carbendazim-resistant isolates in *Fusarium graminearum*. *Sci Rep* 4:Article 7094
- Fallahi M, Saremi H, Javan-Nikkhah M, Somma S, Haidukowski M, Logrieco AF, Moretti A (2019) Isolation, molecular identification and mycotoxin profile of *Fusarium* species isolated from maize kernels in Iran. *Toxins* 11:297
- FDA – US Food and Drug Administration (2010). Guidance for industry and FDA: advisory levels for deoxynivalenol (DON) in finished wheat products for human consumption and grains and grain by-products used for animal feed. Available from: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-and-fda-advisory-levels-deoxynivalenol-don-finished-wheat-products-human>
- Finney DJ (1952) Probit Analysis (2nd Ed). J Inst Act 783: 388–390
- Garrido CE, Hernández Pezzani C, Pacin A (2012) Mycotoxins occurrence in Argentina's maize (*Zea mays* L.) from 1999 to 2010. *Food Control* 25:660–665
- Garmendia G, Pattarino L, Negrin C, Martinez-Silveira A, Pereyra S, Ward TJ, Vero S (2018b) Species composition, toxigenic potential and aggressiveness of *Fusarium* isolates causing Head blight of barley in Uruguay. *Food Microbiol* 76:426–433
- Umpiérrez-Failache M, Garmendia G, Pereyra S, Rodríguez-Haralambides A, Ward T, 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
- Garmendia G, Umpiérrez-Failache M, Ward TJ, 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* 70:286–332
- GB13078-2017 Hygienic Standard for Feeds (2017) https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/report/downloadreportbyfilename?filename=Hygienic%20Standard%20for%20Feeds_Beijing_China%20-%20Peoples%20Republic%20of_10-24-10.1007/s12550-023-00498-y2017.pdf
- Geiser DM, del Mar J-G, Kang S, Makalowska I, Veeraraghavan N, Ward TJ, Zhang N, Kuldau GA, O'donnell K, (2004) FUSARIUM-ID vol 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Euro J Plant Pathol* 110:473–479
- Gelderblom WC, Jaskiewicz K, Marasas WF, Thiel PG, Horak RM, Vleggaar R, Kriek NP (1988) Fumonisin—novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol* 54(7):1806–1811
- Ivić D, Sever Z, Kumanovska B (2011) In vitro sensitivity of *Fusarium graminearum*, *F. avenaceum* and *F. verticillioides* to carbendazim, tebuconazole, flutriafol, metconazole and prochloraz. *Pestic Phyto-med (belgrade)* 26:35–42
- Yli-Mattila T, Sundheim L (2022) Fumonisin in African Countries *Toxins* 14:419
- Kuhnem P, Ward T, Silva C, Spolti P, Ciliato M, Tessmann D, Del Ponte E (2016) Composition and toxigenic potential of the *Fusarium graminearum* species complex from maize ears, stalks and stubble in Brazil. *Plant Pathol* 65:1185–1191
- Lanza F, Zambolim L, Veras da Costa R, Vieira Queiroz V, Cota L, da Silva D, Coelho de Souza A, Fontes Figueiredo J (2014) Prevalence of fumonisin-producing *Fusarium* species in Brazilian corn grains. *Crop Prot* 65:232–237
- Lee J, Kim H, Jeon J-J, Kim H-S, Zeller K, Carter L, Leslie J, Lee Y-W (2012) Population Structure of and Mycotoxin Production by *Fusarium graminearum* from Maize in South Korea. *Appl Environ Microbiol* 78:2161–2167
- Leslie JF, Summerell BA (2006) The *Fusarium* laboratory manual. Ames, IA, USA: Blackwell Professional
- Liu SM, Chen Y, Yu JJ, Chen CJ, Wang JX, Zhou MG (2010) Transfer of the beta-tubulin gene of *Botrytis cinerea* with resistance

- to carbendazim into *Fusarium graminearum*. *Pest Manag Sci* 66:482–489
- Logrieco A, Mule G, Moretti A, Bottalico A (2002) Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *Eur J Plant Pathol* 108:597–609
- Maragos C (2010) Zearalenone occurrence and human exposure. *World Mycotoxin J* 3:369–383
- Marasas WF, Kellerman TS, Gelderblom WC, Coetzer JA, Thiel PG, van der Lugt JJ (1988) Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort J Vet Res* 55(4):197–203
- Marín P, De Ory A, Cruz A, Magan N, González-Jaén MT (2013) 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* 165:251–258
- Masiello M, Somma S, Ghionna V, Logrieco A, Moretti A (2019) *In vitro* and in field response of different fungicides against *Aspergillus flavus* and *Fusarium* species causing ear rot disease of maize. *Toxins* 11:11
- van der Westhuizen L, Shepard G, Scussel V, Costa L, Vismer H, Marasas RJ, W, (2003) Fumonisin contamination and *Fusarium* incidence in corn from Santa Catarina. *Brazil J Agric Food Chem* 51:5574–5578
- McCormick SP, Stanley AM, Stover NA, Alexander N (2011) Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. *Toxins* 3:802–814
- Mendes de Souza M, Sulyok M, Freitas-Silva O, Soares S, Brabet C, Machinski M, Leiko B, Azevedo E, Krska R, Schuhmache R (2013) Cooccurrence of mycotoxins in maize and poultry feeds from Brazil by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Sci World J* 2013:427369
- Methol M (2021) Maíz y sorgo: situación y perspectivas. In *Anuario de OPYPA*, pp193. Available from: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/anuario-opypa-2021/anuario-opypa-2021>
- MGAP, Resolución S/N/001 (2001) Límites máximos de DON en alimentos para animales. <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/institucional/normativa/resolucion-sn001-limitesmaximos-don-alimentos-para-animales>
- Mulè G, Susca A, Stea G, Moretti A (2004) Specific detection of the toxigenic species *Fusarium proliferatum* and *F. oxysporum* from asparagus plants using primers based on calmodulin gene sequences. *FEMS Microbiol Lett* 230:235–240
- Munkvold GP, Desjardins AE (1997) Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence? *Plant Dis* 82:556–565
- Munkvold GP (2003) Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. *Eur J Plant Pathol* 109:705–713
- O'Donnell K, Cigelnick E, Nirenberg HI (1998) Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90:465–493
- Pan D, Calero N, Mionetto A, Bettucci L (2013) Trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* from wheat in Uruguay. *Int J Food Microbiol* 162:120–123
- Pan D, Mionetto A, Calero N, Reynoso MM, Torres A, Bettucci L (2016) Population genetic analysis and trichothecene profiling of *Fusarium graminearum* from wheat in Uruguay. *Genet Mol Res* 15:1–11
- Pasquali M, Beyer M, Logrieco A et al (2016) A European database of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* trichothecene genotypes. *Front Microbiol* 7:406. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00406>
- Piñero S, Silva G, Scott P, Lawrence G, Stack M (1997) Fumonisin levels in Uruguayan corn products. *J. Assoc off Anal Chem Int* 80:825–829
- Ward T, Bielawski JP, Kistler HC, 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
- Pestka JJ (2010) Deoxynivalenol: Mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. *Arch Toxicol* 84:663–679
- Picot A, Barreau C, Pinson-Gadais L, Caron D, Lannou C, Richard-Forget F (2010) Factors of the *Fusarium verticillioides*-maize environment modulating fumonisin production. *Crit Rev Microbiol* 36:221–231
- Pirgozliev SR, Edwards SG, Hare MC, Jenkinson P (2002) Effect of dose rate of azoxystrobin and metconazole on the development of *Fusarium* head blight and the accumulation of deoxynivalenol (DON) in wheat grain. *Eur J Plant Pathol* 108:469–478
- Zhou D, Wang X, Chen G, Sun S, Yang Y, Zhu Z, Duan C (2018) The major *Fusarium* species causing maize ear and kernel rot and their toxigenicity in Chongqing. *China Toxins* 10:90
- Ponce-García N, Serna-Saldivar SO, García-Lara S (2018) Fumonisin and their analogues in contaminated corn and its processed foods - a review. *Food Addit Contam Part A* 35:2183–2203
- QinP XuJ, Jiang Y, Hu L, van der Lee T, Waalwijk C, Zhang W, Xu X (2020) Survey for toxigenic *Fusarium* species on maize kernels in China. *World Mycotoxin J* 13:213–223
- Reddy K, Salleh B, Saad B, Abbas H, Abel C, Shier W (2010) An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. *Toxin Rev* 29:3–26
- Reynoso MM, Ramirez ML, Torres A, Chulze S (2011) Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* strains isolated from wheat in Argentina. *Int J Food Microbiol* 145:444–448
- Salay E, Mercadante A (2002) Mycotoxins in Brazilian corn for animal feed: occurrence and incentives for the private sector to control the level of contamination. *Food Control* 13:87–92
- Sampietro D, Apudí G, BelizánI M, VattuoneI M, Catalán C (2013) Toxigenic potential of *Fusarium graminearum* isolated from maize of northwest Argentina. *Braz J Microbiol* 44:2
- Sampietro DA, Díaz CG, González V, Vattuone MA, Ploper LD, Catalán CA, Ward T (2011) Species diversity and toxigenic potential of *Fusarium graminearum* complex isolates from maize fields in northwest Argentina. *Int J Food Microbiol* 145:359–364
- Scauflaire J, Mahieu O, Louvieaux J, Foucart G, Renard F, Munaut F (2011) Biodiversity of *Fusarium* species in ears and stalks of maize plants in Belgium. *Eur J Plant Pathol* 131:59–66
- Scorz LB, Astolfi P, Reartes DS, Schmale DG, Moraes MG, Del Ponte EM (2009) Trichothecene mycotoxin genotypes of *Fusarium graminearum* sensu stricto and *Fusarium meridionale* in wheat from southern Brazil. *Plant Pathol* 58:344–351
- Scussel V, Savi G, Freitas Costas L, Mendonça J, Manfio D, Bittencourt K, Aguiar K, Stein S (2014) Fumonisin in corn (*Zea mays* L.) from Southern Brazil. *Food Addit Contam: Part B* 7:151–155
- Spolti P, Del Ponte EM, Dong Y, Cummings JA, Bergstrom GC (2014) Triazole sensitivity in a contemporary population of *Fusarium graminearum* from New York wheat and competitiveness of a tebuconazole-resistant isolate. *Plant Dis* 98:607–613
- Stumpf R, dos Santos J, Gomes L, Silva C, Tessmann D, Ferreira F, Machinski Junior M, Del Ponte E (2013) *Fusarium* species and fumonisins associated with maize kernels produced in Rio Grande do Sul State for the 2008/09 and 2009/10 growing seasons. *Braz J Microbiol* 44:89–95
- Sundheim L, Tsehaye H (2015) Fumonisin in Zambia and neighboring countries in a changing climate. *Adv Environ Res* 39:69–84
- Sundlof SF, Strickland C (1986) Zearalenone and zeranone: potential residue problems in livestock. *Vet Hum Toxicol* 28:242–250
- Tateishi H, Miyake T, Mori M, Kimura R, Sakuma Y, Saishoji T (2010) Sensitivity of Japanese *Fusarium graminearum* species complex isolates to metconazole. *J Pestic Sci* 35:419–430

Tava V, Prigitano A, Cortesi P, Esposito MC, Pasquali M (2021) *Fusarium musae* from diseased bananas and human patients: susceptibility to fungicides used in clinical and agricultural settings. J Fungi (basel) 7:784

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

Índice.

-	Introducción general	pág. 8
-	Maíz (<i>Zea Mays</i>)	pág. 8
-	Hongos asociados a cultivos de maíz	pág. 10
-	Micotoxinas	pág. 17
-	Bibliografía	pág. 24
-	Capítulo 1: <i>Especies fúngicas toxicogénicas y micotoxinas asociadas a granos de maíz.</i>	pág. 32
-	Introducción	pág. 32
-	Objetivo	pág. 33
-	Materiales y métodos	pág. 33
-	Resultados	pág. 37
-	Discusión	pág. 40
-	Bibliografía	pág. 42
-	Capítulo 2: <i>Caracterización de las especies fúngicas toxicogénicas asociadas al maíz</i>	pág. 46
-	Introducción	pág. 46
-	Objetivo	pág. 48
-	Materiales y métodos	pág. 49
-	Resultados	pág. 54
-	Discusión	pág. 61
-	Bibliografía	pág. 64
-	Capítulo 3: <i>Análisis in vitro del perfil de sensibilidad de las principales especies de Fusarium a antifúngicos de uso convencional</i>	pág. 71
-	Introducción	pág. 71
-	Objetivo	pág. 72
-	Materiales y métodos	pág. 72
-	Resultados	pág. 72
-	Discusión	pág. 78
-	Bibliografía	pág. 80
-	Capítulo 4: <i>Impacto de la co-existencia de especies fúngicas en el crecimiento y producción de micotoxinas en granos de maíz</i>	pág. 83
-	Introducción	pág. 83
-	Objetivo	pág. 89

- Materiales y métodos	pág. 89
- Resultados	pág. 97
- Discusión	pág.107
- Bibliografía	pág.111
- Discusión general	pág.116
- Conclusiones	pág.119
- Perspectivas	pág.119
- Anexo: <i>Major Fusarium species and mycotoxins associated with freshly harvested maize grain in Uruguay.</i>	
A. del Palacio, B. Corallo, M. Simoens, J. Cea, I. de Aurrecoechea, I. Martinez, A. Sanchez, S. Stewart, D. Pan. Mycotoxin Research, 2023. https://doi.org/10.1007/s12550-023-00498-y	

Índice de figuras.

- Figura 1. a - c, cultivos de maíz desde el inicio de la floración en el campo hasta la cosecha. d. Diferentes variedades de mazorcas de maíz	pág. 8
- Figura 2. Producción global de cultivos entre los años 2000 y 2020. Tomado de: “FAO. 2021. Production: Crops and livestock products”	pág. 9
- Figura 3. Producción comercial de maíz en Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay (en millones de toneladas). Tomado de: Methol M. 2021. Maíz y sorgo. Anuario de Methol, 2021	pág. 10
- Figura 4. Características macro y micromorfológicas de <i>Fusarium</i> spp. a. colonia en PDA; b. reverso con pigmentos en PDA; c-d. células conidiógenas; e-f. macroconidios; g-h. microconidios. Tomado de: Leslie y Summerell 2006, The <i>Fusarium</i> Laboratory Manual	pág. 12
- Figura 5. Pudrición de la mazorca (<i>Gibberella</i> / <i>Fusarium</i> ear rot) Tomado de: CIMMYT	pág. 12
- Figura 6. Rutas de entrada de <i>Fusarium</i> spp. a la planta de maíz. 1. Infección sistémica de plántulas. 2. Infección a través del estigma (estigma (E), canal estilar (CE) carpelo (C.))3. Infección a través de heridas. Tomado de: de la Torre et al., 2014.	pág. 13
- Figura 7. Características macro y micromorfológicas de <i>Aspergillus</i> spp. a. colonia en MEA; b-c. conidióforos (b. radiado, c. columnar)	pág. 15

- Figura 8. Ciclo de infección de <i>Aspergillus flavus</i> en maíz. Adaptado de: Wicklow y Donahue 1984	pág. 16
- Figura 9. Estructura química de los tricotecenos de tipo A y B. Tomado de: Edite Bezerra da Rocha et al., 2014	pág. 20
- Figura 10. Estructura química de la zearalenona. Tomado de: Edite Bezerra da Rocha et al., 2014	pág. 22
- Figura 11. Estructura química de las fumonisinas	pág. 22
- Figura 12. Estructura química de las aflatoxinas	pág. 23
- Figura 13. Estructura química del ácido ciclopiazónico	pág. 23
- Figura 1-1. Distribución de especies pertenecientes al género <i>Fusarium</i> en muestras de maíz durante las dos zafas de estudio	pág. 37
- Figura 1-2. Distribución de las muestras de maíz (%) según los niveles de contaminación con FB1 y FB2 ($\mu\text{g/kg}$)	pág. 39
- Figura 2-1. Curva de absorción de humedad para 5 g de granos de maíz, tomada de Samsudin 2015.	pág. 53
- Figura 2-2. Porcentaje de aislamientos toxicogénicos identificados como <i>F. verticillioides</i> (FB1 y FB2), <i>F. graminearum</i> s.s. (DON, NIV y ZEA) y <i>A. flavus</i> (AFB1, AFB2 y ACP) en ambos años de estudio.	pág. 55
- Figura 2-3. Efecto de la temperatura y actividad hídrica sobre la velocidad de crecimiento (mm/día) para las especies de <i>F. verticillioides</i> , <i>F. graminearum</i> s. s. y <i>A. flavus</i>	pág. 57
- Figura 2-4. Efecto de diferentes actividades hídricas y temperaturas sobre la velocidad de crecimiento y la producción de FB1 y FB2 por <i>F. verticillioides</i> .	pág. 58
- Figura 2-5. Efecto de diferentes actividades hídricas y temperaturas sobre la velocidad de crecimiento y la producción de DON, ZEA, 15-AcDON y 3-AcDON por <i>F. graminearum</i> s. s..	pág. 60
- Figura 2-6. Efecto de diferentes actividades hídricas y temperaturas sobre la velocidad de crecimiento y la producción de AFB1 por <i>A. flavus</i> .	pág. 60
- Figura 3-1. Rangos de EC50 de los fungicidas analizados para las cepas de <i>F. verticillioides</i> estudiadas	pág. 75
- Figura 3-2. Rangos de EC50 de los fungicidas analizados para las cepas de <i>F. graminearum</i> s. s. estudiadas	pág. 77

- Figura 3-3. Concentraciones de EC50 de cada fungicida para los aislamientos de *F. verticillioides* y *F. graminearum* s. s. estudiados. Las letras minúsculas indican diferencias entre los fungicidas dentro de cada especie (Fisher LSD $p < 0.05$). pág. 78

- Figura 4-1. A. Cluster de genes implicados en la biosíntesis de fumonisinas en *F. verticillioides*. Las flechas amarillas indican los genes reguladores, las flechas negras indican genes que no son necesarios para la biosíntesis de fumonisinas, el círculo rojo indica el gen utilizado en este trabajo. B. Ruta biosintética de las fumonisinas con los genes implicados en cada reacción y las estructuras químicas de los productos intermediarios. Tomado de; Kolawole et al. 2021. pág. 85

- Figura 4-2. A. Genes involucrados en la producción de tricoteceno por especies de *Fusarium*. Las flechas amarillas representan los genes reguladores, el círculo rojo indica los genes utilizados en este trabajo. B. Vías de biosíntesis de tricotecenos, con los genes implicados en cada reacción y las estructuras químicas de los productos intermediarios. T representa la vía biosintética de la toxina T-2; N representa la vía biosintética del nivalenol; y D representa la vía biosintética del deoxinivalenol. Tomado de: Kolawole et al. 2021. pág. 86

- Figura 4-3. A. Cluster de genes para la síntesis de Zearalenona (ZEA) de *F. graminearum*. Las flechas en amarillo indican genes reguladores, flechas negras indican genes involucrados en la biosíntesis de ZEA, el círculo rojo indica los genes utilizados en este trabajo. B. Ruta biosintética para la síntesis de zearalenona, con los genes implicados en cada reacción y las estructuras químicas de los productos intermediarios; Tomado de Kolawole et al. 2021. pág. 87

- Figura 4-4. A. Cluster de genes responsables de la síntesis de aflatoxinas en *Aspergillus spp.* Las flechas amarillas indican genes reguladores, el círculo rojo indica los genes utilizados en este trabajo. B. Ruta biosintética para la síntesis de aflatoxinas, con los genes implicados en cada reacción y las estructuras químicas de los productos intermediarios. Tomado de; Kolawole et al. 2021. pág. 88

- Figura 4-5. Estufa de ambiente controlado para la incubación de los recipientes de los distintos ensayos pág. 92

- Figura 4-6. Evaluación de los niveles de biomasa al día 5 y día 14 de incubación de *F. verticilliioides* (Fv) en presencia de *F. graminearum* s. s. (Fg) y *A. flavus* no toxicogénico (AfNT) y toxicogénico (AfT). Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) respecto al control. pág. 97
- Figura 4-7. Evaluación de los niveles de biomasa al día 5 y día 14 de incubación de *F. graminearum* s. s. (Fg) en presencia de *F. verticilliioides* (Fv) y *A. flavus* no toxicogénico (AfNT) y toxicogénico (AfT). Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) respecto al control. pág. 98
- Figura 4-8. Evaluación de los niveles de biomasa al día 5 y día 14 de incubación de *A. flavus* toxicogénico (AfT) en presencia de *F. verticilliioides* (Fv), *F. graminearum* s. s. (Fg) y *A. flavus* no toxicogénico (AfNT). Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) respecto al control. pág. 99
- Figura 4-9. Evaluación de los niveles de biomasa al día 5 y día 14 de incubación de *A. flavus* no toxicogénico (AfNT) en presencia de *F. graminearum* s. s. (Fg), *F. verticilliioides* (Fv) y *A. flavus* toxicogénico (AfT). Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) respecto al control. pág.100
- Figura 4-10. Niveles de expresión de los diferentes genes involucrados en la síntesis de toxinas para cada una de las especies estudiadas (*fum1*, *tri5*, *tri6*, *psk4*, *psk13*, *afR*, *afS*) a los 5 y 14 días de incubación en las muestras control pág.101
- Figura 4-11. Niveles de expresión del gen FUM1 por *F. verticilliioides* a los 5 y 14 días de incubación en presencia de *F. graminearum* s. s. (Fg) y *A. flavus* toxicogénico (AfT) y no toxicogénico (AfNT). Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) respecto al control. pág.102
- Figura 4-12. Niveles de expresión de los genes *tri5*, *tri6*, *psk13* y *psk4* por *F. graminearum* s. s. (Fg) a los 5 y 14 días de incubación en presencia de *F. verticilliioides* (Fv) y *A. flavus* toxicogénico (AfT) y no toxicogénico (AfNT). Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) respecto al control. pág.103
- Figura 4-13. Niveles de expresión de los genes *afR* y *afS* por *A. flavus* (AfT) a los 5 y 14 días de incubación en presencia de *F. graminearum* s. s. (Fg), *F. verticilliioides* (Fv) y *A. flavus* no toxicogénico (AfNT). Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) respecto al control. pág.104

- Figura 4-14. Niveles de FB1 y FB2 ($\mu\text{g/kg}$) producidas por la cepa A68 de *F. verticillioides* y en presencia de *F. graminearum* s. s. (Fg) y cepas toxicogénicas y no toxicogénicas de *A. flavus* (AfT y AfNT, respectivamente). Las letras sobre las cajas indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control (A68), (Fisher LSD $p < 0.05$). pág.105
- Figura 4-15. Niveles de FB1 ($\mu\text{g/kg}$) producidas por la cepa A52 de *F. verticillioides* y en presencia de *F. graminearum* s. s. (Fg) y cepas toxicogénicas y no toxicogénicas de *A. flavus* (AfT y AfNT, respectivamente). Las letras sobre las cajas indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control (A52), (Fisher LSD $p < 0.05$). pág.105
- Figura 4-16. Niveles de DON y ZEA ($\mu\text{g/Kg}$) producidas por la cepa A368 de *F. graminearum* s. s. en presencia de *F. verticillioides* (A68 y A52) y cepas toxicogénicas y no toxicogénicas de *A. flavus* (A36 y A631, respectivamente). Las letras sobre las cajas indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control (A368), (Fisher LSD $p < 0.05$). pág. 106
- Figura 4-17. Niveles de AFB1 y AFB2 ($\mu\text{g/Kg}$) producidas por *A. flavus* en presencia de *F. graminearum* s. s. (Fg), *F. verticillioides* (Fv) y la cepa no toxicogénica de *A. flavus* (AfNT). Las letras sobre las cajas indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control, (Fisher LSD $p < 0.05$). pág. 107

Índice de tablas.

- Tabla 1. Niveles máximos de micotoxinas permitidos en productos destinados a consumo humano según Reglamento Bromatológico Nacional (RBN), 2012. pág. 19
- Tabla 1-1. Niveles de micotoxinas de Fusarium presentes en muestras de maíz de la cosecha 2018 (n=61) y 2019 (n=58) pág. 39
- Tabla 2-1. Secuencias de cebadores utilizados para la caracterización genotípica mediante PCR múltiple (Tri3, Tri12) y PCR (Tri13) pág. 52
- Tabla 2-2. Volúmenes de glicerol:agua adicionados a granos de maíz para cada actividad hídrica (aw) pág. 53
- Tabla 2-3. Distribución (%) de genotipos de los aislamientos de FGSC para los genes Tri 3, Tri 12 y Tri 13 pág. 56
- Tabla 3-1. Valores de EC50 de las cepas de *F. verticillioides* frente a los diferentes fungicidas estudiados pág. 74

- Tabla 3-2. Valores de EC50 de las cepas de *F. graminearum* s. s. frente a los diferentes fungicidas estudiados pág. 76
- Tabla 4-1. Cepas seleccionadas para estudio del efecto de la co-existencia de especies en el crecimiento y producción de toxinas pág. 90
- Tabla 4-2. Cepas de especies co-inoculadas en cada ensayo experimental. pág. 90
- Tabla 4-3. Secuencias de los distintos cebadores utilizados para la cuantificación de la biomasa de cada especie fúngica pág. 93
- Tabla 4-4. Secuencias de los distintos cebadores utilizados para los análisis por RT-qPCR pág. 95

Glosario de siglas.

3-AcDON - 3 acetil DON

15-AcDON - 15 acetil DON

ACP - ácido ciclopiazónico

ADNc - ADN copia

AFB1 - aflatoxina B1

AFB2 - aflatoxina B2

AFG1 - aflatoxina G1

AFG2 - aflatoxina G2

AfNT- *Aspergillus flavus* no toxicogénico

AfT- *Aspergillus flavus* toxicogénico

aw - actividad hídrica

Ct - ciclo umbral

DON - deoxynivalenol

EC50 - concentracion efectiva que inhibe el crecimiento al 50%

EF-1 - gen *factor de elongación* - 1 α

FBs - fumonisinas

FB1 - fumonisina B1

FB2 - fumonisina B2

FB3 - fumonisina B3

FGSC - complejo *Fusarium graminearum*

IARC - Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer

LC-MS/MS - cromatografía líquida unida a espectrómetro de masa

NIV - nivalenol

OA - ocratoxina A

RBN - reglamento bromatológico nacional

PCR - reacción en cadena de la polimerasa

RT-PCR - reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

RT-qPCR - técnica cuantitativa de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

ZEA - zeralenona

Introducción general

1. Maíz (*Zea Mays*)

El maíz pertenece a la familia de las gramíneas, también conocida como poáceas. El género *Zea* está compuesto por cinco especies nativas de México y América Central que incluyen el maíz y sus parientes silvestres: *Z. Mays*, *Z. diploperennis*, *Z. perennis*, *Z. luxurians* y *Z. nicaraguensis*. Los parientes silvestres del maíz pueden llamarse teosinto o teosinte. La especie *Zea mays* comprende cuatro sub especies diploides y anuales: *Zea mays* L. ssp. *mays*, que corresponde al maíz propiamente dicho; *Zea mays* L. ssp. *parviglumis* y *Zea mays* L. ssp. *mexicana*, ambas nativas de México; y *Zea mays* L. ssp. *huehuetenangensis*, teosinto endémico de Guatemala (Doebley e Iltis, 1980; Doebley, 1990). Su versatilidad ofrece múltiples propósitos para su uso, desde ración para ganado hasta alimento clave en la alimentación humana. Presentando gran potencial para uso medicinal debido a la presencia de carotenoides llamados luteína y zeaxantina, que son beneficiosos para la salud humana y actúan en la prevención de enfermedades (Meléndez-Martínez et al., 2004).



Figura 1. a - c, cultivos de maíz desde el inicio de la floración en el campo hasta la cosecha. d. Diferentes variedades de mazorcas de maíz.

Su producción a nivel mundial ocupa el segundo lugar, luego de la caña de azúcar (Figura 2), siendo también el segundo cultivo, luego del trigo, en exportación a nivel mundial (173.645 millones de toneladas/año en 2018) (FAO, 2021). Se estima que el consumo per cápita de maíz en el mundo es de aproximadamente 160 g por día, principalmente en forma de tortillas (ASERCA, 2012). A pesar de ser un cultivo presente en distintas partes del mundo, su producción se da mayoritariamente en el

continente americano.

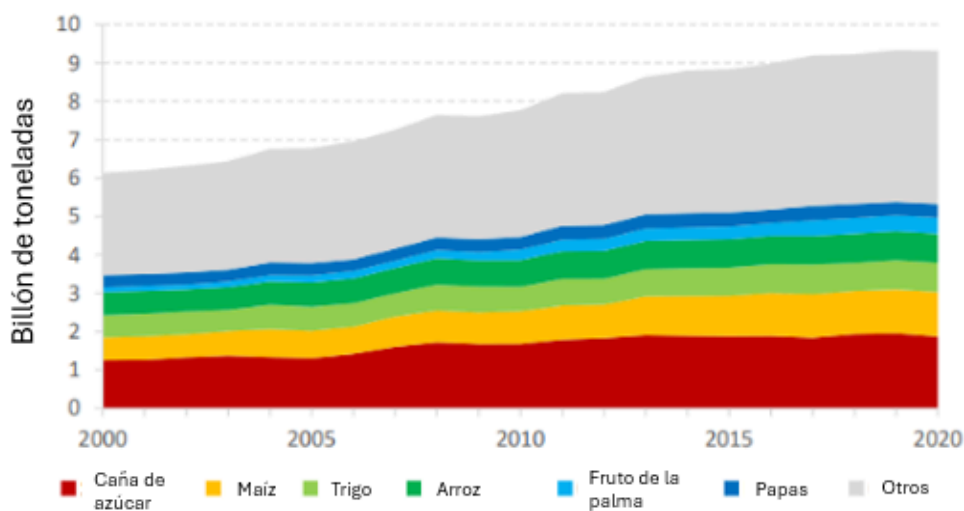


Figura 2. Producción global de cultivos entre los años 2000 y 2020. Tomado de: "FAO. 2021. Production: Crops and livestock products"

A nivel del cono sur (Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay), la producción de maíz ha aumentado significativamente en los últimos 10 años, alcanzando en la zafra 2019/20 un récord histórico de 166 millones de toneladas, que representó el 13% de la producción mundial de maíz (Figura 3) (Methol, 2021). En Uruguay, la superficie sembrada de maíz en la zafra 2020/21 aumentó 22% respecto a la zafra anterior, alcanzando 143.000 hectáreas. Este nivel de siembra es el más alto de los últimos 40 años y no se observaba en el país desde la década del 70 (Methol, 2021). Los departamentos localizados en la región Litoral Oeste de nuestro país son los que presentan mayor superficie sembrada con este cultivo, destacandose, Soriano, Colonia, Durazno, Flores, Florida, Paysandú, Rio Negro y San José. La casi totalidad de la demanda de este grano tiene como destino la alimentación animal, solamente un 8% se destina a la producción de etanol (Methol, 2021).

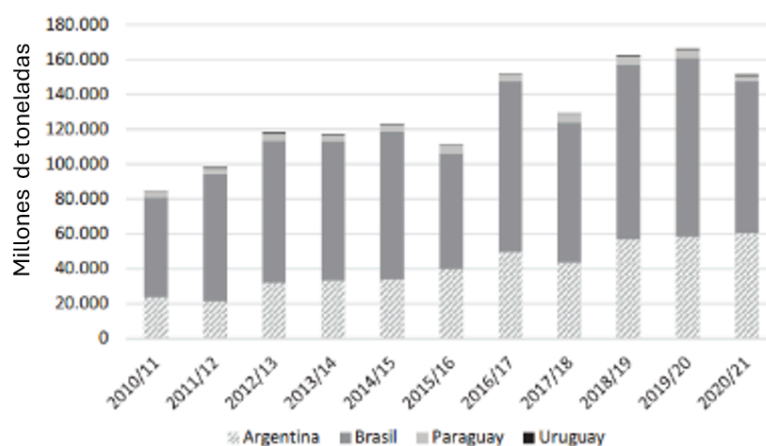


Figura 3. Producción comercial de maíz en Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay (en millones de toneladas). Tomado de: Methol M. 2021. Maíz y sorgo. Anuario de Methol, 2021

2. Hongos asociados a cultivos de maíz

Los granos de cereales desde su formación en la planta, hasta su utilización o consumo final, están expuestos a la colonización por una gran variedad de microorganismos, de los cuales los hongos filamentosos son los más importantes. Los hongos desempeñan un papel ecológico muy importante en los diversos ecosistemas. Debido a su abundancia y diversidad utilizan prácticamente cualquier material como sustrato, participan en el reciclaje de nutrientes y funcionan como descomponedores de la materia orgánica, en especial de la vegetal. La colonización fúngica de los granos provoca su deterioro, puede implicar pérdida de viabilidad del grano, pérdida de peso seco, aumento de ácidos grasos, calentamiento del grano y disminución de la germinación (Magan et al., 2004). El maíz está expuesto a la colonización por una gran variedad de hongos tanto en el campo como durante su almacenamiento y es considerado uno de los cultivos más susceptibles a la contaminación con micotoxinas a nivel mundial (Barug et al., 2004). Particularmente es un buen sustrato para el desarrollo de las principales especies de hongos toxicogénicos como son *Aspergillus flavus*, *Fusarium verticillioides* y *Fusarium graminearum*.

Fusarium es un hongo filamentoso que se encuentra dentro del grupo de los ascomycetes, orden *Hypocreales*. Generalmente se presenta en su fase asexual, si bien algunas especies tienen descripta su fase sexual (por ej. *Gibberella*) que forma ascos con ascosporas contenidas en peritecios. El género *Fusarium* fue descrito por primera vez en la terminología científica moderna por Link (1809), sin embargo, los primeros datos fueron aportados por un monje franciscano en México en el siglo XVI. Estos datos se basaban en las descripciones realizadas por los aztecas, que habían observado la podredumbre del maíz producida por el ahora conocido *F. verticillioides*. Desde su primera descripción se han realizado numerosas clasificaciones, por ello la taxonomía de este género

permanece en continua revisión. Estas clasificaciones se han centrado en el estudio de la morfología y la ausencia o presencia de los tres tipos de esporas asexuales que las especies de este género pueden producir: macroconidios, microconidios y clamidosporas (esporas de resistencia). Su identificación se basa fundamentalmente en la forma y tamaño de los macroconidios, forma y modo de formación de los microconidios (cadenas o cabezuelas), tipo de células conidiógenas (monofialides o polifialides) y en la presencia o ausencia de clamidosporas (Nelson et al., 1983; Leslie y Summerell, 2006). Otras características importantes para su identificación es el aspecto macroscópico de la colonia, la producción de pigmentos, la velocidad de crecimiento en medio papa dextrosa agar y la producción de peritecios (Burgess et al., 1994; Leslie y Summerell, 2006). (Figura 4)

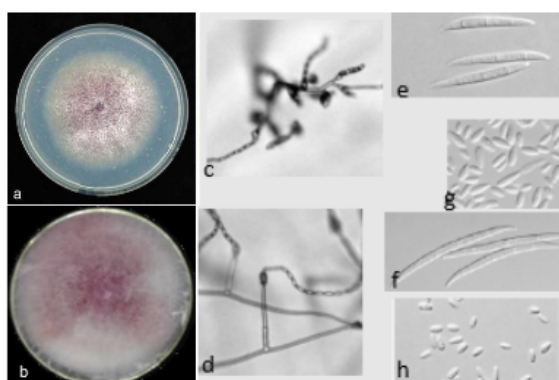


Figura 4. Características macro y micromorfológicas de *Fusarium* spp. a. colonia en PDA; b. reverso con pigmentos en PDA; c-d. células conidiógenas; e-f. macroconidios; g-h. microconidios. Tomado de: Leslie y Summerell 2006, The *Fusarium* Laboratory Manual

En la actualidad, se han descrito alrededor de 150 especies morfológicas y/o filogenéticamente diferentes bien caracterizadas y aceptadas por los taxónomos, a pesar de que no existe ningún manual disponible para abordar el tema de una manera clara y rápida (Seifert y Lévesque, 2004). Mientras que el análisis filogenético de dos o más genes es requerido para el completo desarrollo de un análisis de concordancia genealógica, la identificación precisa de cada una de las especies de *Fusarium* sólo necesita basarse en ensayos específicos sobre una región determinada del DNA. El gen *factor de elongación - 1 α* (EF-1) tiene una gran utilidad a nivel filogenético porque es informativo ya que permite la discriminación a nivel de especie en el género *Fusarium*. Además, no se han detectado copias no-ortólogas de este gen y se han diseñado cebadores universales que funcionan para todas las especies del género *Fusarium*, además de otros géneros fúngicos (Seifert y Lévesque, 2004).

Numerosas especies del género *Fusarium* están consideradas como importantes fitopatógenos, capaces de colonizar plantas generalmente en el campo (Logrieco et al., 2003). Están frecuentemente asociados al desarrollo de distintas enfermedades tales como la pudrición de raíz, tallo y granos. Es

uno de los géneros de hongos fitopatógenos con mayor significancia económica vinculada a la pérdida de cereales alrededor del mundo, incluido el maíz (Dean et al., 2012). Entre las especies de *Fusarium*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* y *Fusarium subglutinans* son las responsables de la pudrición de la mazorca (*Gibberella* / *Fusarium* ear rot), la enfermedad de mayor importancia productiva del cultivo de maíz (Figura 5) (Logrieco et al., 2002, Oldenburg et al., 2017).



Figura 5. Pudrición de la mazorca (*Gibberella* / *Fusarium* ear rot) Tomado de: CIMMYT

Las especies del género *Fusarium* se distribuyen de forma cosmopolita, y están frecuentemente presentes en los diferentes órganos del maíz (Mendoza et al., 2003). Algunas especies de *Fusarium* se consideran hemibiotrofos capaces de cambiar a necrotrofos dependiendo del huésped y las condiciones ambientales (Summerell, 2019; Rampersad, 2020). De manera general, el ciclo infectivo de *Fusarium* parte de un inóculo primario que se encuentra en materiales vegetales infectados en forma de peritecios, clamidosporas, macro y microconidios, según la especie que esté presente en el material vegetal (Goswami y Kistler, 2004). Generalmente, estos materiales infectados proceden de los residuos de la cosecha que pueden encontrarse en el suelo en el mismo campo o en campos cercanos (Xu, 2003). Cuando las condiciones ambientales son favorables, las ascosporas y conidios se desarrollan e infectan los tejidos de la planta. Las principales rutas de entrada e infección son; 1) la infección sistémica de las plantas, como endófito de semilla o a través de la raíz; 2) Infección de la mazorca por el estigma; 3) Infección del tallo o mazorca facilitada por daño mecánico o por insectos (por ejemplo lagarta de la mazorca, cogollo del maíz, etc) (Figura 6) (de la Torre et al., 2014).

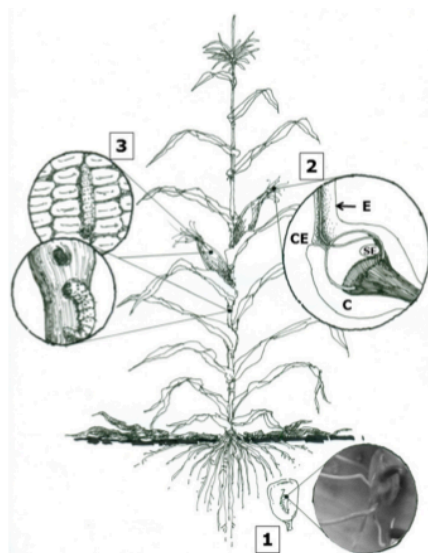


Figura 6. Rutas de entrada de *Fusarium* spp. a la planta de maíz. 1. Infección sistémica de plántulas. 2. Infección a través del estigma (estigma (E), canal estilar (CE) carpelo (C)). 3. Infección a través de heridas. Tomado de: de la Torre et al., 2014.

El complejo *Fusarium fujikuroi* (FFSC) es uno de los más grandes y más estudiados complejos de especies del género *Fusarium* (Sandoval-Denis et al., 2018a; b; Al-Hatmi et al., 2019), al momento se describen más de 60 especies que lo componen (Yilmaz et al., 2021). Algunas de estas especies son capaces de causar infecciones en plantas, producir micotoxinas (beauvericina, fumonisinas, moniliformina, etc) y causar infecciones oportunistas en humanos (Nirenberg y O'Donnell 1998; Munkvold, 2017; Al-Hatmi et al., 2019). Dentro de las especies pertenecientes al FFSC se encuentran *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans*, estas especies son capaces de contaminar el maíz principalmente en regiones tropicales y subtropicales. La especie más comúnmente asociada como patógeno del maíz es *F. verticillioides* (Zainuddin et al., 2011; Covarelli et al., 2012; Madania et al., 2013). Este es un hongo hemibiotrofo cuyo desarrollo se ve favorecido por altas temperaturas, el estrés hídrico, el genotipo del cultivo y el daño producido por insectos. La enfermedad causada por este patógeno, *Fusarium* ear rot, se ve favorecida por la siembra repetida de maíz y otros cultivos de cereales en la misma superficie o en superficies cercanas al aumentar el inóculo fúngico en el rastrojo y la población de insectos que atacan la planta de maíz (Fandohan et al., 2003).

El complejo *Fusarium graminearum* (FGSC) abarca, hasta el momento, 16 especies: *F. austroamericanum*, *F. bothii*, *F. meridionale*, *F. mesoamericanum*, *F. luisianense*, *F. acaciae-mearnsii*, *F. basilicum*, *F. cortaderiae*, *F. gerlachii*, *F. nepalense*, *F. graminearum sensu stricto*, *F. asiaticum*, *F. aethiopicum*, *F. vorosii*, *F. ussurianum* y *F. graminearum* de la Costa del Golfo (Sarver et al., 2011; Aoki et al., 2012; Aoki y O'Donnell 2014). Estas especies son particularmente conocidas por causar la fusariosis de la espiga en cereales de granos pequeños como son trigo, cebada, avena y centeno. Esta enfermedad puede llevar a pérdidas del cultivo que en algunos casos superan el 50% (Parry et al.,

1995). Durante la invasión de los tejidos vegetales, muchas especies pueden sintetizar micotoxinas, algunas de estas se han descrito como factores de virulencia del hongo, como por ejemplo la producción de deoxinivalenol por *F. graminearum* en trigo (Proctor et al., 2002). Dentro de las especies que componen el complejo, *Fusarium graminearum sensu stricto* (*F. graminearum* s. s.) parecería ser la única especie cosmopolita (Logrieco et al., 2003; O'Donnell et al., 2004; Starkey et al., 2007). El ciclo de vida de *F. graminearum* s. s. está influido por factores ambientales, especialmente temperaturas templadas y humedad relativa alta durante la etapa de floración favorecen la infección de las espigas maduras del cereal (Munkvold, 2003; Sanchis y Magan, 2004). *Fusarium graminearum* s. s. es una de las principales especies responsable de causar pudrición de la mazorca (*Gibberella* ear rot) y el tallo (*Gibberella* stalk rot) en maíz (Munkvold, 2003; Lana et al., 2020), también es la principal responsable de la fusariosis de la espiga en los cultivos de granos pequeños, principalmente en el trigo (Castañares et al., 2016). Estas enfermedades disminuyen el rendimiento de los cultivos y la calidad de los mismos a nivel mundial (Kazan et al., 2012; McMullen et al., 2012).

Los hongos del género *Aspergillus* pertenecen a los Ascomycota; sin embargo, en algunos de ellos se desconocen sus formas sexuales. En 1729, Pier Antonio Micheli, describió el género en el libro “Nova Plantarum Genera”. Le dio este nombre debido a que la estructura característica del género se asemejaba a un aspergillum, un instrumento usado por la iglesia Católica para rociar el agua bendita. Recién a mediados del siglo XX comenzó a ser reconocido como un agente activo en la síntesis de compuestos químicos, transformaciones biosintéticas y producción enzimática. *Aspergillus* es un género caracterizado morfológicamente, en términos generales, por la formación de conidióforos con estípites largos, de paredes gruesas y ápices usualmente ensanchados formando una vesícula aproximadamente esférica, aunque en algunas especies son más elongadas. Las vesículas del conidióforo presentan fiálides (uniseriados) o métulas y fiálides (biseriados) en toda su superficie o en parte de ella. Los estípites se originan a partir de una célula especializada denominada célula pie que está unida al conidióforo formando una “T” o una “L” en su base. Los conidios se originan en cadenas formando columnas compactas (columnar) o divergentes (radiada), son unicelulares, de pared lisa u ornamentada, hialinos o pigmentados (Figura 7) (Alexopoulos et al., 1996; Pitt y Hocking, 1997).

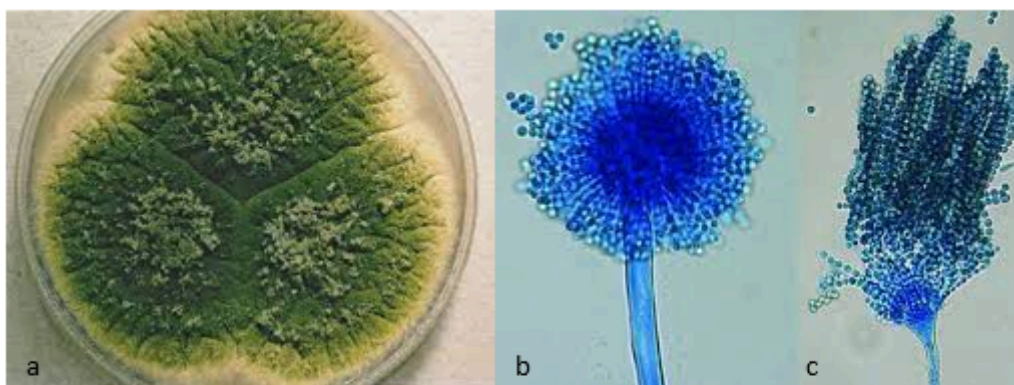


Figura 7. Características macro y micromorfológicas de *Aspergillus* spp. a. colonia en MEA;

b-c. conidióforos(b. radiado, c. columnar)

Algunas especies pueden producir esclerocios, una masa de hifas compacta, usualmente globosa, que no contienen conidios. Éstos varían en forma, tamaño y color. Funcionan como estructuras de supervivencia que el hongo utiliza para permanecer en el suelo en espera de condiciones favorables para su desarrollo (Wicklow, 1990). Aquellas especies que presentan estadio sexual (teleomorfo) forman una estructura denominada cleistotecio, que son cuerpos fructíferos que no tienen apertura natural y que contienen ascos con ascosporas (esporas sexuales). En algunas de estas especies también se puede evidenciar la presencia de células de paredes gruesas denominadas células de Hülle (Figura 7).

La diversificación de las especies de la sección hace muy dificultosa su identificación con los métodos morfológicos y fisiológicos convencionales, debido a que comparten las características que las definen. Es por este motivo que en la actualidad, se trata de efectuar estudios polifásicos que incluyan metodologías morfológicas, fisiológicas, químicas y genéticas. Particularmente, en relación al género *Aspergillus*, la secuenciación de los genes que codifican para β -tubulina y calmodulina presentan numerosas ventajas para la identificación a nivel de especie (Balajee, 2008). Sin embargo, estudios filogenéticos demuestran que el estudio de la calmodulina es el que permite mayor resolución en la identificación a nivel de especie (Alshehri y Palanisamy, 2020). En base a la secuenciación parcial del gen de la calmodulina, se identifican 339 especies pertenecientes al género *Aspergillus* agrupadas en 19 secciones (Samson et al., 2014). La dispersión de las especies de *Aspergillus* se da a través de los conidios, que son propágulos asexuales que pueden propagarse a través del aire, el suelo y por medio de insectos que las diseminan. Los conidios de *Aspergillus* pueden colonizar los granos presentes en la planta, particularmente cuando se presentan condiciones ambientales tales como altas temperaturas y altos niveles de humedad.

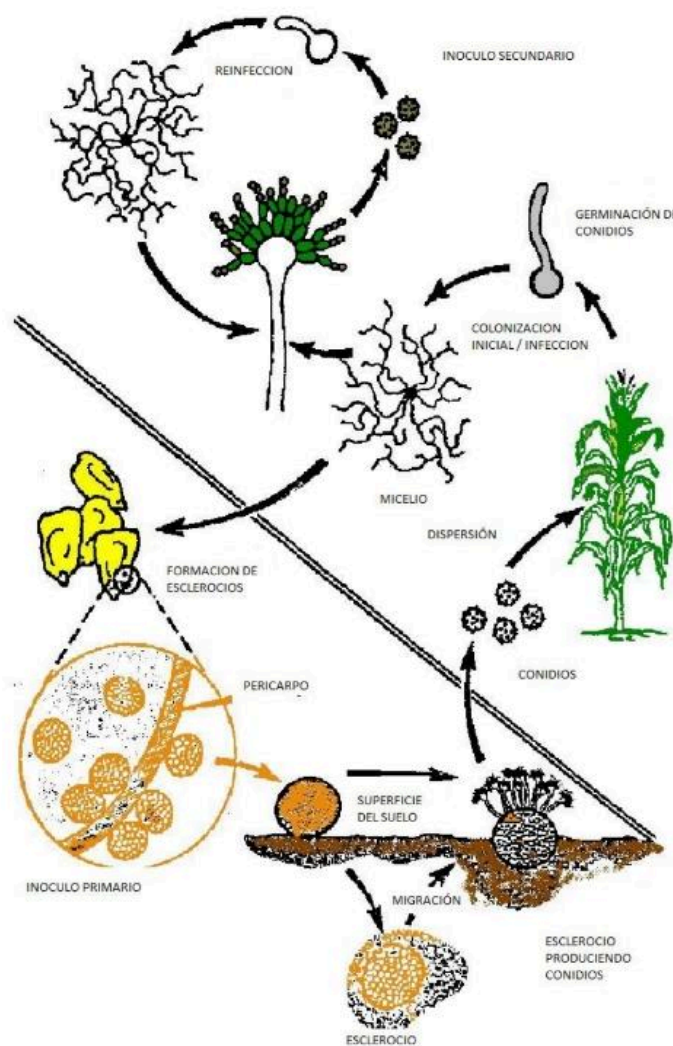


Figura 8. Ciclo de infección de *Aspergillus flavus* en maíz. Adaptado de: Wicklow y Donahue 1984

Las especies de *Aspergillus* se encuentran entre las especies fúngicas más estudiadas debido a que han sido aisladas de una gran variedad de alimentos en los cuales se las ha implicado con el deterioro de los mismos y/o con la producción de aflatoxinas y ocratoxinas, reflejando de esta manera su importancia económica. Especies de este género son causantes de la contaminación de productos agrícolas tanto antes como después de la cosecha. Las especies del género *Aspergillus* son mayoritariamente ubicuas, aislándose de diferentes sustratos y con mayor frecuencia en climas templados y subtropicales entre las latitudes 26° a 35° al Norte y Sur del Ecuador (Klich, 2002). El género *Aspergillus*, subgénero *Circumdati*, sección *Flavi* contiene algunas de las especies más importantes del género debido a su significancia biotecnológica, en alimentos y en la salud tanto humana como animal (Varga et al., 2011). La sección *Flavi* está compuesta por 7 clados principales con más de 20 especies entre las que se encuentran; *A. avenaceus*, *A. clavatoflavus*, *A. flavus*, *A.*

leporis, *A. nomius*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *A. sojae*, *A. subolivaceus*, *A. tamarii*, *A. caelatus*, *A. pseudotamarii*, *A. bombycis*, *A. alliaceus*, *A. pseudocaelatus*, *A. toxicarius*, *A. parvisclerotigenus*, *A. pseudonomius* y *A. minisclerotigenes*.

Aspergillus flavus es un hongo cosmopolita, patógeno de humanos, animales y plantas. Se lo conoce como un hongo saprófito presente en suelos a nivel mundial causante de múltiples enfermedades de gran relevancia en granos como maíz (pudrición de mazorca), maní, algodón, antes y después de la cosecha (Yu et al., 2005; Klich, 2007; Michailides y Thomidis, 2007). Es una de las principales especies a nivel mundial responsable de la contaminación de los granos de maíz con micotoxinas. Coloniza este cultivo principalmente bajo condiciones de estrés hídrico y altas temperaturas, principalmente durante el estado de floración dado que es cuando el cultivo se encuentra más vulnerable al ingreso de este patógeno, principalmente después de la polinización y hasta la senescencia de los estigmas. *Aspergillus flavus*, es frecuentemente encontrado en áreas tropicales, sin embargo, debido al cambio climático, esta especie se la considera como emergente en varias regiones de Europa (Battilani et al., 2016).

3. Micotoxinas

Además de los diversos efectos que puede tener la contaminación fúngica tanto en el rendimiento y viabilidad del cultivo, otro aspecto de gran importancia es la capacidad de contaminación con micotoxinas. Las micotoxinas son metabolitos secundarios de bajo peso molecular producidos, principalmente, al final de la fase exponencial o al inicio de la fase estacionaria de crecimiento del hongo (Bullerman y Draughon, 1994). Anualmente, entre el 25 al 50% de los cultivos del mundo están contaminados con micotoxinas (Ricciardi et al., 2013). Esto determina el riesgo que genera esta contaminación para la salud humana y animal, al producir mediante su ingesta intoxicaciones agudas o crónicas, con efectos carcinogénicos, teratogénicos, embriotóxicos, hepatotóxicos, nefrotóxicos, estrogénicos, inmunotóxicos o incluso la muerte (Sweeney y Dobson, 1998). Esto también se vincula a perjuicios económicos al afectarse el volumen y calidad industrial de los granos (Marin et al., 2013; Ramos et al., 1997). El impacto económico de las micotoxinas en EE.UU. y Canadá fue estimado en USD 5 mil billones/año, ello sin incluir impactos en la salud y pérdidas en el rendimiento de los cultivos. A su vez, en EE.UU. las pérdidas estimadas en maíz atribuibles a micotoxinas de *Fusarium* y a aflatoxinas de *Aspergillus* son de USD 2900 y 225 millones/año, respectivamente (Schmale III y Munkvold, 2017).

La mayoría de las micotoxinas conocidas son producidas por los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (Bennett y Klich, 2003). Por su incidencia y distribución mundial, las principales micotoxinas que contaminan los granos son deoxinivalenol (DON), toxina T-2, zearalenona (ZEA),

fumonisin B1 (FB1), aflatoxina B1 (AFB1) y ocratoxina A (OA) (Gimeno y Martins, 2011). La presencia de micotoxinas en los granos está estrechamente relacionada al crecimiento fúngico, por lo que si no hay desarrollo de hongos no habrá micotoxinas. Sin embargo, la existencia de hongos no implica la producción de micotoxinas, ya sea porque no se dieron las condiciones adecuadas (principalmente disponibilidad de agua y temperatura) o por la ausencia de cepas toxigénicas. En general la síntesis de micotoxinas se asocia a condiciones de estrés, generadas por cambios en la temperatura, humedad, aireación o presencia de agentes agresores (Santin, 2008). Si bien estos metabolitos se caracterizan por ser termoestables, el uso de tratamientos físicos de descontaminación, como la selección de granos de cereales, los descascarillados y la posterior separación mecánica de la cáscara y el polvo del resto del cereal, reducen significativamente el contenido de micotoxinas en las cosechas.

La presencia de micotoxinas en alimentos y raciones ha llevado a que muchos países establezcan niveles máximos de inclusión para proteger la salud humana y animal (FAO, 2004). En nuestro país existen niveles máximos permitidos para algunas micotoxinas, principalmente en alimentos para consumo humano (Tabla 1) (RBN, 2012). En relación a micotoxinas en alimentos destinados a alimentación animal, existen reglamentaciones únicamente para DON a nivel nacional, que establece un límite máximo de en alimentos para: bovinos de carne, ovinos y aves de 5.000 µg/kg; bovinos de leche de 2.000 µg/kg, cerdos y equinos de 1.000 µg/kg y para otros animales de 2.000 µg/kg. Para materias primas (granos y sus subproductos) destinados a la elaboración de alimentos para animales se establece un límite máximo de DON de 10.000 µg/kg (MGAP, 2001).

Tabla 1. Niveles máximos de micotoxinas permitidos en productos destinados a consumo humano según Reglamento Bromatológico Nacional (RBN), 2012.

Producto	Micotoxinas	Límite (mcg/kg o l)
Productos y derivados lácteos (excepto leche en polvo)	Aflatoxinas M1	0.5
Alimentos industrializados para niños de corta edad	Aflatoxinas (B1+B2+G1+G2)	< 3
Otros Alimentos y condimentos diferentes a los citados por el art. 1.2.18	Aflatoxinas (B1+B2+G1+G2)	20 (mientras que B1 no supere 5)
Arroz, cebada, porotos, café, maíz	Ocratoxina A	50
Maíz, cebada en grano	Zearalenona	200
Jugos de frutas	Patulina	50
Harina de trigo, sub-productos del trigo y alimentos elaborados en base a trigo	Deoxinivalenol (DON)	< o = 1.000

Entre las principales micotoxinas producidas por *Fusarium* se encuentran los tricotecenos, la zearalenona (ZEA) y las fumonisinas (FBs) (Ji et al., 2019).

Los tricotecenos son producidos por varias especies de los géneros *Fusarium*, *Cephalosporium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys* y *Trichoderma*. Dentro del género *Fusarium* las principales especies productoras de tricotecenos son *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae* y *F. sporotrichioides*.

Son una gran familia de micotoxinas sesquiterpenoides que comparten una estructura central de anillo tricíclico de 12,13-epoxitricotec-9-eno (tricoteceno), pero difieren en los sustituyentes en varias posiciones (Figura 9). Según el patrón de sustitución, los tricotecenos se pueden subcategorizar en cuatro grupos principales, a saber, tipo A (simple enlace en C-8), B (grupo cetona en C-8), C (epóxido en C-7,8) y D (anillo macrocíclico entre C-4 y C-15). Entre ellos, los tricotecenos de mayor preocupación incluyen el deoxinivalenol (DON, tipo B), el nivalenol (NIV, tipo B), el diacetoxiscirpenol (DAS, tipo A), la toxina T-2 (tipo A) y sus derivados, debido a su alta prevalencia como contaminantes de alimentos. Ocurren globalmente como contaminantes naturales de granos y se forman principalmente en condiciones de alta humedad, generalmente en el campo.

La toxicidad de los tricotecenos varía en función de su estructura química, el doble enlace entre los carbonos 9 y 10 y el grupo epóxido entre los carbonos 12 y 13 han sido identificados como elementos estructurales esenciales de su toxicidad (Figura 9). Un grupo hidroxilo en el carbono 3 aumenta la toxicidad y disminuye gradualmente cuando se sustituye por hidrógeno o un grupo acetoxi en esa posición (Wu et al., 2013). Dentro del grupo B, si bien NIV es más tóxico que DON para humanos y animales domésticos (Schothorst y van Egmond, 2004), DON es más fitotóxico que NIV (Desjardins, 2006).

Deoxynivalenol es el tricoteceno que frecuentemente contamina la mayoría de los granos de cereales, como por ejemplo trigo, maíz o avena. Puede producir irritación de la mucosa intestinal, vómitos, diarrea, rechazo al alimento, aborto y anemia (McCormick et al., 2011). También se ha demostrado, en estudios realizados a animales de experimentación, que tiene una potente actividad inmunosupresora. Los niños se consideran el grupo más vulnerable de la población a la exposición al DON, por su efecto en el retraso en el crecimiento (ELIKA, 2023). En los alimentos contaminados, el DON puede aparecer además junto a sus acetilados 3-AcDON y 15-AcDON, que causan los mismos efectos tóxicos que el DON.

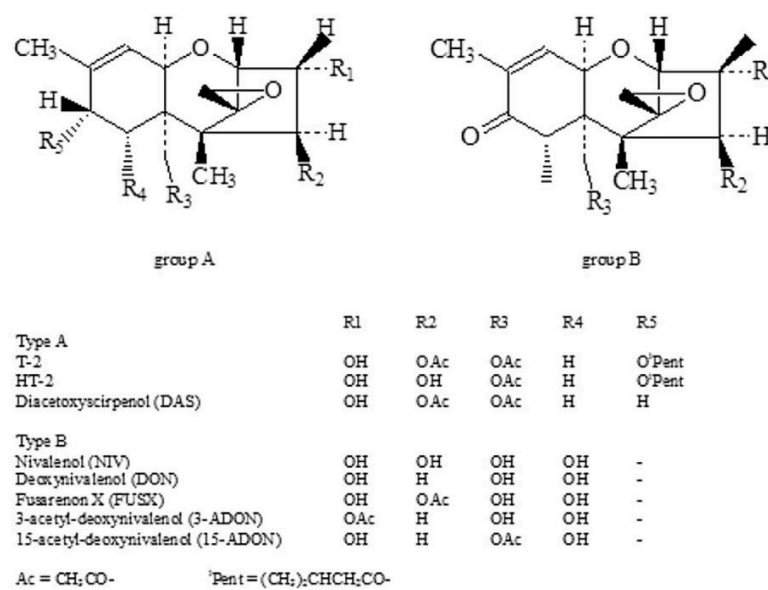


Figura 9. Estructura química de los tricotecenos de tipo A y B. Tomado de: Edite Bezerra da Rocha et al., 2014

La zearalenona (ZEA) es producida por diversas especies de hongos del género *Fusarium*, entre las que se destacan: *F. culmorum*, *F. graminearum* y *F. crookwellense* (Bennett y Klinch, 2003). La ZEA se forma principalmente en la última fase del llenado de grano de los cereales, mayoritariamente maíz y trigo, pero también afecta a la cebada, avena, arroz y sorgo. Debido a similitudes en la estructura química de la ZEA con los estrógenos, esta micotoxina es capaz de actuar como agonista a nivel de los receptores de estrógenos con prácticamente la misma potencia que el 17 β -estradiol (Figura 10), pudiendo causar problemas asociados a la sobre simulación hormonal en determinadas especies animales, principalmente en cerdos, en los que provoca disminución de la fertilidad, abortos por reabsorción fetal, reducción del tamaño de la camada y disminución de la respuesta inmune (Creppy, 2002). En humanos, debido a la actividad estrogénica de ZEA y de sus metabolitos, niveles plasmáticos altos pueden relacionarse con alteraciones endometriales y desarrollo de carcinomas mamarios en las mujeres (Creppy, 2002). Por otra parte, se metaboliza y se excreta rápidamente, por

lo que su bioacumulación en órganos y tejidos es muy baja (ELIKA, 2021). En base a la evidencia de carcinogenicidad, mutagenicidad y genotoxicidad en especies animales de laboratorio sometidas a experimentación, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) la clasifica en el grupo 3, no pudiendo ser clasificada respecto a su carcinogenicidad en humanos (IARC, 2012).

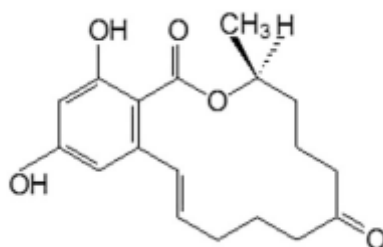


Figura 10. Estructura química de la zearalenona. Tomado de: Edite Bezerra da Rocha et al., 2014

Otras micotoxinas de gran relevancia son las fumonisinas, las cuales son producidas por especies del complejo *Fusarium fujikuroi*, principalmente *F. verticillioides* y *F. proliferatum* (Logrieco et al., 2002). Químicamente son aminopolioles de cadena larga, con dos cadenas laterales de ácido tricarbóxico (Figura 11). Los análogos del grupo B (FB), que comprende FB1, FB2 y FB3, difieren en el número y la posición de los grupos hidroxilo en la cadena principal. Además, se han descrito otras fumonisinas (grupo A, C y P), pero se producen en niveles mucho más bajos y no son significativos (5% del total de fumonisinas presentes) (CAST, 2003). Las fumonisinas son las micotoxinas más abundantes como contaminantes naturales del maíz, siendo FB1 la predominante, habiéndose reportado en todas partes del mundo y la usualmente encontrada en niveles muy elevados (WHO 1993; Dutton 1996; ELIKA, 2021). También es frecuente como contaminante de trigo, arroz, cebada y sorgo. Estudios en animales de experimentación indican que la absorción de FB1 en el tracto gastrointestinal es baja (menos del 4% de la dosis oral), y que se elimina rápidamente por vía biliar, con vidas medias de menos de 4 horas. Más del 90 % de la dosis se excreta con las heces, por lo que las concentraciones plasmáticas, tisulares y urinarias son bajas (ELIKA, 2021). Tras la exposición crónica en animales se observaron tumores hepáticos y renales. La FB1 no es mutagénico en bacterias y no causa síntesis de ADN no programada en células de mamíferos, pero induce al estrés oxidativo a través de un mecanismo indirecto. El modo de acción tóxico de las fumonisinas es la interrupción del metabolismo de los lípidos (Wang et al., 1991). Se han relacionado varios efectos clínicos en humanos (como cáncer de esófago, cáncer de hígado, deterioro del crecimiento), pero hasta ahora ninguno de ellos se ha podido relacionar directamente con la exposición a fumonisinas (Voss y Riley, 2013). La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) clasificó en el año 2002 a las fumonisinas en el grupo 2B, como posible carcinógeno humano. En animales, las fumonisinas pueden provocar encefalomalacia equina y edema pulmonar porcino (Desjardins, 2006).

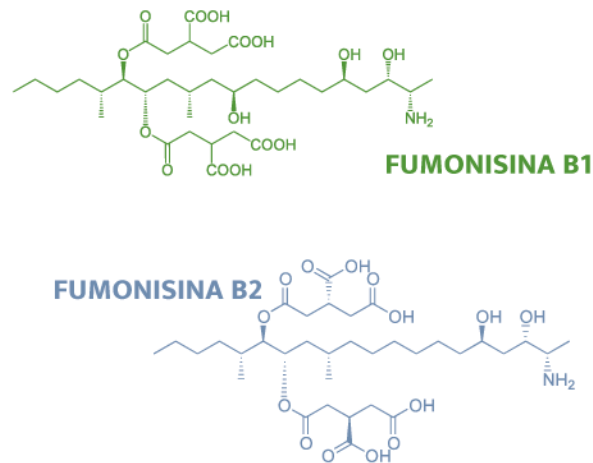


Figura 11. Estructura química de las fumonisinas

El género *Aspergillus* produce diferentes micotoxinas, siendo las especies de la sección *Flavi*, las productoras de las aflatoxinas. Si bien *A. flavus* y *A. parasiticus* son los mayores productores de estas toxinas, otras especies estrechamente relacionadas a *A. flavus* (*A. minisclerotigenes*, *A. korhogoensis*, *A. aflatoxiformans* y *A. texensis*) y *A. parasiticus* (*A. novoparasiticus* y *A. arachidicola*) también son capaces de producirlas (Carvajal-Campos et al., 2017; Frisvad et al., 2019; Singh et al., 2018). Las aflatoxinas son un grupo de compuestos químicos no proteicos, de bajo peso molecular, cuyo esqueleto básico es un anillo de furano unido a un núcleo cumarina (Figura 12). Este grupo está compuesto por cuatro tipos naturales (B1, B2, G1 y G2) y dos derivados monohidroxilados de la aflatoxina B1 y B2, llamadas M1 y M2, respectivamente. Estos derivados se caracterizan por ser excretados en la leche de los animales que han ingerido alimento contaminado con aflatoxinas (Sweeney y Dobson, 1999). Las aflatoxinas son unos de los carcinógenos más potentes producidos en la naturaleza y es frecuentemente encontrado en granos de maíz contaminados con *Aspergillus* (Castegnaro y McGregor, 1998). La AFB1 es la más frecuente y la más tóxica y los daños resultantes de su consumo en granos contaminados van desde daño agudo al hígado, incluyendo necrosis y hemorragia, hasta cáncer hepático (Wild y Hall, 2000; Wang et al., 2001; Ayeni, 2015). En animales también ocasionan disminución de la tasa de crecimiento y baja productividad (leche, huevos, etc.). Son también inmunosupresoras, teratogénicas y mutagénicas. La intoxicación crónica es la más frecuente y se debe al consumo prolongado de alimentos contaminados a bajas concentraciones. Cabe destacar que AFB1 y han sido clasificadas como carcinógenas grado 1 (agente cancerígeno genotóxico, que contribuye al riesgo de sufrir cáncer) por la IARC (IARC, 2012). Se estima que 5 miles de millones de personas a nivel mundial están expuestas al consumo de aflatoxinas a través del consumo de alimentos regularmente (Wu, 2015).

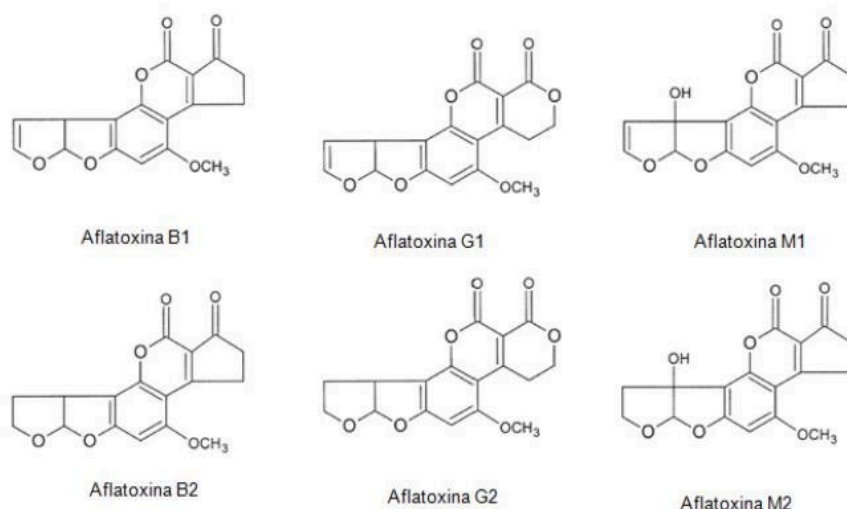


Figura 12. Estructura química de las aflatoxinas

El ácido ciclopiazónico (ACP) es un ácido indol-tetrámico que puede ser producido por especies de *Aspergillus* de la sección *Flavi* (*A. oryzae*, *A. tamarii* y *A. flavus*), así como por otras especies de *Aspergillus* y *Penicillium* (Dorner et al., 2002) (Figura 13). El ACP presenta toxicidad para varios animales como ser cerdos, pollos, ratas, perros y conejos (Norred, 1988). También se cree que es el responsable de los síntomas del “envenenamiento de Kodua” caracterizado por depresión e inmovilidad en humanos y ganado que consumieron mijo contaminado (*Paspalum scrobiculatum*) por *A. flavus* y *A. tamarii* en la India (Rao & Husain, 1985). La ocurrencia natural de ACP ha sido reportada en variedad de sustratos tales como maní, maíz, girasol y varios alimentos destinados al consumo animal (Le Bars, 1990, Ross et al., 1991; Urano, 1992; Balanchadran y Parthasarathy, 1996; González et al., 2013). También se constató la acumulación de esta micotoxina en carne y huevos de pollo y en leche de ovejas (Dorner et al., 1994). Los signos clínicos de intoxicación incluyen anorexia, diarrea, fiebre, deshidratación, pérdida de peso, inmovilidad y muerte. El análisis histológico en animales expuestos a ACP mostró diseminación de focos de necrosis en la mayoría de los tejidos del hígado, riñón, páncreas y miocardio (Dorner et al., 1983).

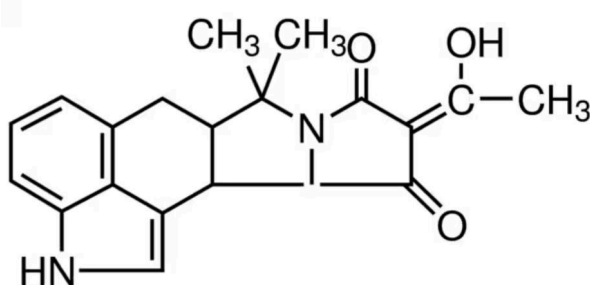


Figura 13. Estructura química del ácido ciclopiazónico.

Considerando el gran crecimiento que ha tenido el cultivo de maíz en nuestro país en los últimos años y sabiendo que las principales especies toxicogénicas asociadas a la contaminación de este cultivo son frecuentemente encontradas como contaminantes de diferentes granos en nuestro país, el objetivo principal de este trabajo es conocer y caracterizar las especies fúngicas toxicológicas asociadas al maíz. Además, de buscar implementar estrategias de manejo del cultivo que permitan disminuir el impacto de estas especies en el cultivo así como también estudiar el efecto de la interacción entre los distintos contaminantes fúngicos.

Este trabajo está estructurado en cuatro capítulos; el primero es sobre la descripción de las especies fúngicas toxicogénicas y micotoxinas asociadas a granos de maíz. El segundo capítulo trata sobre la caracterización de las especies fúngicas toxicogénicas asociadas al maíz. El tercero es el análisis *in vitro* del perfil de sensibilidad de las principales especies de *Fusarium* a antifúngicos de uso convencional. Finalmente, el cuarto capítulo busca estudiar el impacto de la co-existencia de especies fúngicas en el crecimiento y producción de micotoxinas en granos de maíz.

Bibliografía

- Alexopoulos, C., Mims, C., Blackwell, M., 1996. Introductory Mycology; 4th Ed. John Wiley and Sons, New York, USA.
- Alshehri, B., Palanisamy M., 2020. Evaluation of molecular identification of *Aspergillus* species causing fungal keratitis. Saudi Journal of Biological Sciences 27 751–756
- Al-Hatmi, A., Sandoval-Denis, M., Nabet, C., Ahmed, S., Demar, M., Normand, A., de Hoog, G., 2019. *Fusarium* volatile a new potential pathogen from a human respiratory sample. Fungal Systematics and Evolution 4: 171–181.
- Aoki, T., Ward, T., Kistler, H., O'Donnell, K., 2012. Systematics phylogeny and trichothecene Mycotoxin potential of *Fusarium* head blight cereal pathogens. Mycotoxins 62, 91-102.
- Aoki, T., O'Donnell, K., 2014. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. Journal of General Plant Pathology 80, 189-201. 44
- ASERCA, Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria. 2012. Boletín ASERCA Regional Peninsular 2012: La Industrialización del Maíz. 56/12. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Mérida, México. 32 p
- Ayeni, A., 2015. Extension education strategy for minimizing aflatoxin impact on sub-Saharan African agriculture and food systems. World Mycotoxin Journal, 8(2), 253-257.

- Battilani, P., Toscano, P., Van der Fels-Klerx, H., Moretti, A., Camardo Leggieri, M., Brera, C., Rortais, A., Goumperis, T., Robinson, T., 2016. Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Sci. Rep.* 6, 24328.
- Balajee, S., 2008. DNA sequence based methods for species identification in the genus *Aspergillus*. *Aspergillus* species in human keratomycosis. In: Varga J., Samson R.A., editors. *Aspergillus* in the Genomic Era. Wageningen Academic Publishers; The Netherlands: pp. 261–275.
- Barug, D., van Egmond, H., López-García, R., Van Osen-bruggen, W., Visconti, A., 2004. Meeting the mycotoxin menace. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.
- Bennett, J., Klich, M., 2003. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* 16: <https://doi.org/10.1128/cmr.16.3.497-516.2003>
- Burgess, L., Summerell, B., Bullock, S., Gott, K., Backhouse, D., 1994. Laboratory Manual for *Fusarium* Research, 3rd ed. University of Sydney and Botanic Garden, Sydney, Australia
- Bullerman, L., Draughon, F., 1994. *Fusarium moliniforme* and fumonisins symposium introduction. *J. Food Protection*, 57: 513.
- Carvajal-Campos, A., Manizan, L., Tadrist, S., Akaki, K., Koffi-Nevry, R., Moore, G., Fapohunda, O., Bailly, S., Montet, D., Oswald, I., Lorber, S., Brabet, C., Puel, O., 2017. *Aspergillus korhogoensis*, a novel aflatoxin producing species from the cote d'Ivoire. *Toxins* 9, 353.
- [CAST] Council for Agricultural Science and Technology. 2003. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems, Task force report No. 139/January 2003. Ames (IA): Council for Agricultural Science and Technology.
- Castañares, E., Dinolfo, M., Del Ponte, E., Pan, D., Stenglein, S., 2016. Species composition and genetic structure of *Fusarium graminearum* species complex populations affecting the main barley growing regions of South America. *Plant Pathol*, 65: 930-939. <https://doi.org/10.1111/ppa.12470>
- Castegnaro, M., McGregor, D., 1998. Mycotoxines cancerogenes: evaluation du risque. *Revue de Medecine Veterinaire (France)*, 149(6).
- Covarelli, L., Stifano, S., Beccari, G., Raggi, L., Lattanzio, V., Albertini, E., 2012. Characterization of *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Italy: Fumonisin production, pathogenicity and genetic variability. *Food Microbiology*, 31 (1)
- Creppy, E., 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127: 19-28.

- de la Torre M., Sánchez, D., Galeana, E., Plasencia, J., 2014. Fumonisin, Síntesis y función de la interacción *Fusarium verticillioides*-Maíz. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 17(1):77-91, 2014
- Desjardins, A., 2006. *Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics, and biology. American Phytopathological Society (APS Press).
- Doebley, J., Iltis, H., 1980. Taxonomy of Zea (Gramineae) I. A subgeneric classification with key to taxa. Amer. J. Bot. 67: 982-993.
- Doebley, J., 1990. Molecular systematics of Zea (Graminae). Maydica 35: 143-150
- Dorner, J., Cole, R., Lomax, L., Gosser, H., Diener, U., 1983. Cyclopiazonic acid production by *Aspergillus flavus* and its effects on broiler chickens. Applied and environmental microbiology, 46(3), 698-703.
- Dorner, J., Cole, R., Erlington, D., Suksupath, S., McDowell, G., Bryden, W., 1994. Cyclopiazonic acid residues in milk and eggs. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42(7), 1516-1518.
- Dorner, J., 2002. Recent advances in analytical methodology for cyclopiazonic acid. Mycotoxins and food safety, 107-116.
- Dutton, M., 1996. Fumonisin, mycotoxins of increasing importance: their nature and their effects. Pharmacol Ther; 70: 137–161.
- Dean, R., van Kan, J., Pretorius, Z., Hammond-Kosack, K., Pietro, A., Spanu, P., Rudd, J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G., 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Mol. Plant Pathol. 13, 414–430.
- Edite Bezerra da Rocha, M., Freire, F., Erlan Feitosa Maia, F., Izabel Florindo Guedes, M., D. Rondina., 2014. Mycotoxins and their effects on human and animal health. Food Control, 36:159-165.
- ELIKA, Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria. 2021. Fumonisin. Página visitada 02/2023: <https://seguridadalimentaria.elika.eus/fichas-de-peligros/fumonisin/>
- ELIKA, Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria. Deoxynivalenol. Página visitada 12/2023: <https://seguridadalimentaria.elika.eus/fichas-de-peligros/deoxynivalenol>
- Fandohan, P., Hell, K., Marassas W., Wingfield, M., 2003. Infection of maize by *Fusarium* species and contamination with fumonisin in Africa. African Journal of Biotechnology; 2(12): 570-579
- Food and Agriculture Organization (FAO); 2021. Agricultural production statistics 2000–2021. FAOSTAT Analytical Brief 60

- Food and Agriculture Organization (FAO), 2004. Food and Nutrition Papers 81: Worldwide Regulations for Mycotoxins in Food and Feed in 2003. FAO, Rome.
- Frisvad, C., Hubka, V., Ezekiel, C.N., Hong, B., Novakova, A., Chen, A., Arzanlou, M., Larsen, T., Sklenar, F., Mahakarnchanakul, W., Samson, A., Houbraken, J., 2019. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. Stud. Mycol. 93, 1-63.
- Gimeno, A., Martins, M., 2011. Mycotoxins and Mycotoxicosis in Animals and Humans. 3rd Edition, Special Nutrients Inc., Miami, 128 p.
- Goswami, R., Kistler, H., 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. Mol. Plant Pathol. 5, 515-525. Molecular plant pathology. 5. 515-25.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2012. Pharmaceuticals. Volume 100 A. A review of human carcinogens. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 100(PT A), 1.
- Ji, F., He, D., Olaniran, A., Mokoena, M., Xu, J., Shi, J., 2019. Occurrence, toxicity, production and detection of *Fusarium* mycotoxin: a review. Food Prod Process and Nutr 1, 6
- Kazan, K., Gardiner, D., Manners, J., 2012. On the trail of a cereal killer: recent advances in *Fusarium graminearum* pathogenomics and host resistance. Mol. Plant Pathol. 13:399–413.
- Klich, M., 2002. Identification of Common *Aspergillus* Species. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
- Klich, M., 2007. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. Mol. Plant Pathol. 8:713–22
- Lana, F., Paul, P., Minyo, R., Thomison, P., Madden L., 2020. Stability of Hybrid Maize Reaction to Gibberella Ear Rot and Deoxynivalenol Contamination of Grain. Phytopathology 110:12
- Leslie, J., Summerell, B.; 2006. The *Fusarium* laboratory manual. 1st ed. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, London.
- Logrieco, A., Mulè, G., Moretti, A., Bottalico, A.; 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. European Journal of Plant Pathology, 108: 597-609.
- Logrieco, A., Bottalico, A., Mulé, G., Moretti, A., Perrone, G.; 2003. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. European Journal of Plant Pathology, 109: 645-667.
- Madania, A., Altawil, M., Naffaa, W., Volker, P., Hawat, M., 2013. Morphological and Molecular Characterization of *Fusarium* Isolated From Maize in Syria. J Phytopathol, 161: 452-458.

- Magan, N., Aldred, D.; 2004. The Role Of Spoilage Fungi In Seed Deterioration. Fungal biotechnology in agricultural, food and environmental application.
- Marin, S., Ramos, A., Cano-Sancho, G., Sanchis, V., 2013. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. Food Chem. Toxicol. 60, 218–237.
- McCormick, S., Stanley, A., Stover, N., Alexander, N., 2011. Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. Toxins, 3(7), 802-814.
- McMullen, M., Bergstrom, G., De Wolf, E., Dill-Macky, R., Hershman, D., Shaner, G., Van Sanford, D.; 2012. A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: *Fusarium* Head Blight. Plant Dis. 96:1712–1728.
- Meléndez-Martínez, A., Vicario, I., Heredia, F.; 2004. Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 54(2), 149-155.
- Mendoza, E., López, B., Oyervides, G., Martínez, Z., De León, C., Moreno, M., 2003. Herencia genética y citoplásmica de la resistencia a la pudrición de la mazorca de maíz (*Zea mays* L.) causada por *Fusarium moniliforme* Sheld. Revista Mexicana de Fitopatología 21: 267–271
- Methol, M. 2021. Maíz y sorgo. Anuario OPYPA 2021. último acceso 02/2023: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/anuario-opypa-2021/analisis-sectorial-cadenas-productivas/maiz-sorgo>
- MGAP. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca 2001. Resolución S/N/001 Límites máximos de DON en alimentos para animales. Pagina visitada por ultima vez en 04/2024: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/institucional/normativa/resolucion-sn001-limites-maximos-don-alimentos-para-animales>
- Munkvold, G., 2017. *Fusarium* species and their associated mycotoxins. In: Moretti A, Susca A (eds), Mycotoxigenic fungi: methods and protocols: 51–106. Humana Press, Totowa, NJ, USA.
- Munkvold, G., 2003. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. In: Xu, X., Bailey, J.A., Cooke, B.M. (eds) Epidemiology of Mycotoxin Producing Fungi. Springer, Dordrecht.
- Michailides, T., Thomidis, T., 2007. First report of *Aspergillus flavus* causing fruit rots of peaches in Greece. Plant Pathol. 56:352
- Nirenberg, H., O'Donnell, K., 1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia 90: 434–458.
- Nelson, P., Toussoun, T., Marasas, W., 1983. *Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, USA.
- O'Donnell, K., Ward, T., Geiser, D., Kistler, H., Aoki, T., 2004. Genealogical concordance between mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of

nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genetics and Biology*, 41: 600-623.

- Oldenburg, E., Höppner, F., Ellner, F., and Weinert, J., 2017. *Fusarium* diseases of maize associated with mycotoxin contamination of agricultural products intended to be used for food and feed. *Mycotoxin Res.* 33 (3), 167–182
- Parry, D., Jenkinson, P., McLeod, L., 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals – a review. *Plant Pathology* 44: 207–238.
- Pitt, J., Hocking, A., 1997. *Fungi and food spoilage*. CSIRO Division of Food Science and Technology Sydney Academic Press., Australia.
- Proctor, R., Desjardins, A., McCormick, S., Plattner, R., Alexander, N., and Brown D., 2002. Genetic Analysis of the Role of Trichothecene and Fumonisin Mycotoxins in the Virulence of *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 108, 691–698.
- Ramos, A., Sanchis, V., Hukié, M., Jasié, M., 1997. Mycotoxins in food. A review. Citado por: Pan, D., 2000. Contaminantes fúngicos y micotoxinas en granos de trigo. Trabajo especial I de la Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias UdelaR, Montevideo, Uruguay.
- Rampersad, S., 2020. Pathogenomics and management of *Fusarium* diseases in plants. *Pathogens*. 1:340.
- RBN, 2012. Reglamento Bromatológico Nacional 5ª edición. Consultado On-line: <https://montevideo.gub.uy/sites/default/files/biblioteca/bromatologico5a.edicion.pdf>
- Ricciardi, C., Castagna, R., Ferrante, I., Frascella, F., Marasso, S., Ricci, A., Canavese, G., Lore, A., Prella, A., Gullino, M., Spadaro, D., 2013. Development of a microcantilever-based immunosensing method for mycotoxin detection. *Biosensors & Bioelectronics*, 40, 233–239.
- Sandoval-Denis, M., Guarnaccia, V., Polizzi, G., Crous, P., 2018a. Symptomatic Citrus trees reveal a new pathogenic lineage in *Fusarium* and two new *Neocosmospora* species. *Persoonia* 40: 1–25.
- Sandoval-Denis, M., Swart, W., Crous, P., 2018b. New *Fusarium* species from the Kruger National Park, South Africa. *MycoKeys* 34: 63–92.
- Sanchis, V., Magan, N., 2004. Environmental conditions affecting mycotoxins. In: Magan, N., Olsen, M. (Eds.), *Mycotoxins in Food*. Woodhead Publishing, Cambridge, England, pp. 174-189.
- Santin, E., 2008. crecimiento de los hongos toxicogénicos y producción de micotoxinas. En: El libro Azul de Micotoxinas (Ed. Diaz, D.). Nottingham University Press, Nottingham, UK. pp 239-250.

- Samson, R., Visagie, C., Houbraken, J., Hong, S., Hubka, V., Klaassen, C., Perrone, G., Seifert, K., Susca, A., Tanney, J., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Yaguchi, Y., Frisvad, J., 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol* 78, 141–178
- Sarver, B., Ward, T., Gale, L., Broz, K., Kistler, H., Aoki, T., Nicholson, P., Carter, J., O'Donnell, K., 2011. Novel *Fusarium* head blight pathogens from Nepal and Louisiana revealed by multilocus genealogical concordance. *Fungal Genetics and Biology* 48, 1096-1107.
- Schmale III, D., Munkvold, G., 2009. *Mycotoxins in Crops: A Threat to Human and Domestic Animal Health*. The American Phytopathological Society
- Schothorst, R., van Egmond, H., 2004. Report from SCOOP task 3.2.10 collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states'. Subtask: trichothecenes. *Toxicol Lett.* 153:133–143
- Seifert, K., Lévesque, C., 2004. Phylogeny and Molecular Diagnosis of Mycotoxigenic Fungi. *European Journal of Plant Pathology*. 110. 449-471.
- Singh, P., Orbach, M., Cotty, P., 2018. *Aspergillus texensis*: a novel aflatoxin producer with S morphology from the United States. *Toxins* 10, 22-33.
- Starkey, D., Ward, T., Aoki, T., Gale, L., Kistler, H., Geiser, D., Suga, H., Tóth, B., Varga, J., O'Donnell, K., 2007. Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity. *Fungal Genetics and Biology*, 44: 1191-1204.
- Summerell, B., 2019. Resolving *Fusarium*: Current status of the genus. *Annu. Rev. Phytopathol.* 57:323–339.
- Sweeney, M., Dobson, A., 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int. J. Food Microbiol.* 43: 141-158.
- Sweeney, M., Dobson, A., 1999. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 175: 149-163.
- Varga, J., Frisvad, J., Samson, R., 2011. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Studies in Mycology* 69: 57-80.
- Voss, K., Riley, R., 2013. Fumonisin Toxicity and Mechanism of Action: Overview and Current Perspectives. *Food Safety*; Vol. 1, No. 1, 2013006
- Wang, E., Norred, W., Bacon, C., Riley, R., Merrill, A., 1991. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *J Biol Chem.*; 266: 14486–14490
- Wang, J., Huang, T., Su, J., Liang, F., Wei, Z., Liang, Y., Groopman, J., 2001. Hepatocellular carcinoma and aflatoxin exposure in Zhuqing village, Fusui county, People's Republic of China. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 10(2), 143-146.

- Wicklow, D., Donahue, J., 1984. Sporogenic germination of sclerotia in *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*. Trans. Br. Mycol. Soc. 82: 621-624.
- Wicklow, D., 1990. Adaptation in *Aspergillus flavus*. Trans. Mycol. Soc. Japan 31: 511-523.
- WHO. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, vol. 56. Lyon: IARC; 1993. p. 445–466.
- Wild, C., Hall, A., 2000. Primary prevention of hepatocellular carcinoma in developing countries. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 462(2-3), 381-393.
- Wu, Q, Dohnal V, Kuca K, Yuan Z. Trichothecenes: structure-toxic activity relationships. Curr Drug Metab. 2013 Jul;14(6):641-60
- Wu, F., 2015. Global impacts of aflatoxin in maize: trade and human health. World Mycotoxin Journal, 8(2), 137-142.
- Xu, X., 2003. Effects of environmental conditions on the development of *Fusarium* ear blight. European Journal of Plant Pathology 109: 683–689.
- Yilmaz, N., Sandoval-Denis, M., Lombard, L., Visagie, C., Wingfield, B., Crous, P., 2021. Redefining species limits in the *Fusarium fujikuroi* species complex. Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi, 46(1), 129-162.
- Yu, J., Cleveland, T., Nierman, W., Bennett, J., 2005. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. Rev. Iberoam. Mycol. 22:192–202

Capítulo 1.

Especies fúngicas toxicogénicas y micotoxinas asociadas a granos de maíz.

Introducción

Los hongos son frecuentemente encontrados como contaminantes de los diferentes cultivos, siendo algunos de ellos capaces de producir metabólicos tóxicos (micotoxinas). Es frecuente la detección de altos niveles de micotoxinas en cereales, lo cual configura un riesgo elevado considerando que estos forman parte de la alimentación humana y animal. En particular, los granos de maíz están expuestos a la colonización por una gran variedad de especies toxicogénicas (Widstrom, 1996; Abdullah et al., 1998; Marin et al., 1998; Cardwell et al., 2000; Chulze, 2010), siendo las más frecuentes *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* y *Aspergillus flavus* (Picco et al., 1999; Cardwell et al., 2000; Orsi et al., 2000; Getachew et al., 2017; Shabana et al., 2022). Las especies del género *Fusarium* constituyen un grupo cosmopolita de hongos filamentosos ampliamente distribuidos en el suelo y capaces de colonizar las partes aéreas y subterráneas de las plantas, así como residuos vegetales y otros sustratos orgánicos. En el cultivo de maíz la pudrición de la mazorca (*Gibberella* y *Fusarium* ear rot) es la enfermedad de mayor importancia productiva. Esta enfermedad es causada por especies del género *Fusarium*, principalmente *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. graminearum* (Oldenburg et al., 2017). Por otra lado, *Aspergillus flavus* es encontrado como saprófito en suelos alrededor del mundo y es capaz de causar enfermedades en múltiples cultivos, entre ellos maní, algodón y maíz en el que también causa pudrición de la mazorca. La contaminación por este patógeno puede observarse tanto en el campo, previo a la cosecha como durante el almacenamiento (Yu et al., 2005; Klich, 2007; Michailides y Thomidis, 2007). Si bien el desarrollo de hongos de esta especie siempre estuvo asociada a las condiciones encontradas durante la etapa de almacenamiento con condiciones de temperatura elevadas (>30°C) con mínimos niveles de actividad hídrica (0.75), el cambio climático ha hecho que, en regiones no tropicales como las de nuestro país o la de países europeos, sea cada vez más frecuente encontrarlo como contaminante durante la pre-cosecha, aumentando el riesgo de contaminación con aflatoxinas (Assunção et al., 2018; Pleadin et al., 2023).

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de bajo peso molecular producidos, principalmente, al final de la fase exponencial o al inicio de la fase estacionaria de crecimiento del hongo (Bullerman y Draughon, 1994). La presencia de micotoxinas como contaminantes de cultivos tienen un

importante impacto económico en la industria agropecuaria y son un riesgo para la salud humana y animal (Marasas et al., 1988; Gelderblom et al., 2002; Harrison et al., 1990; Tolleson et al., 1996). En base a las especies fúngicas encontradas como contaminantes se puede predecir las micotoxinas asociadas. La presencia de especies de *Fusarium* determinará la potencial presencia de fumonisinas, ZEA, DON y NIV como toxinas principales, mientras que la presencia de *A. flavus* traerá asociada la potencial presencia de aflatoxinas, condicionado a la capacidad toxigénica de las cepas y a las condiciones ambientales que favorezcan su síntesis. La presencia de micotoxinas en alimentos y raciones ha llevado a que muchos países regulen los niveles máximos de inclusión para proteger la salud humana y animal (FAO 2004). En nuestro país existen niveles máximos permitidos para algunas micotoxinas, principalmente en alimentos para consumo humano (RBN, 2012). A nivel nacional, DON es la única micotoxina para la que hay establecidos límites máximos para el consumo animal (MGAP, 2001).

Objetivo

El objetivo de este trabajo es identificar las principales especies fúngicas toxicogénicas y micotoxinas asociadas a granos de maíz proveniente de distintas regiones de nuestro país y determinar los niveles de micotoxinas presentes en las muestras analizadas.

La hipótesis en relación a este objetivo es.

- El maíz cultivado en Uruguay está expuesto a contaminantes fúngicos tóxicos, prevaleciendo las especies *Fusarium* spp. al momento de la cosecha. La prevalencia y concentración de micotoxinas estará influenciada por las especies encontradas, las condiciones ambientales y prácticas agrícolas.

Materiales y métodos

MUESTREO

Se realizó un relevamiento a nivel nacional de las especies fúngicas toxicogénicas presentes en granos de maíz. Para ello se utilizaron muestras provenientes de distintos puntos de acopios del país durante dos zafas consecutivas, 2018 y 2019. Un total de 152 muestras de granos de maíz fueron seleccionadas, 94 muestras correspondientes al 2018 y 58 al 2019, provenientes de los departamentos de Colonia (n=71), Soriano (n=47), Río Negro (n=21), Paysandú (n= 4), Durazno (n=3), San José (n=2), Rocha (n=2), Florida (n=1) y Flores (n=1). Los acopios de los que se obtuvieron las

muestras fueron seleccionados según un muestreo aleatorio simple semanal de la lista de acopios nacionales registrados en el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) que declaran almacenar maíz. En los sitios de acopio se tomó una muestra de 2 kg según la norma ISO 24333 que fue transportada al laboratorio para posterior análisis.

IDENTIFICACIÓN FÚNGICA

Identificación morfológica.

De cada muestra se tomaron 100 granos y se esterilizaron superficialmente con NaOCl al 0.4% durante 1 minuto, se enjuagaron 2 veces con agua destilada estéril y se secaron con papel de filtro estéril (Samson et al., 1992). Los granos se sembraron en cajas de Petri conteniendo medio papa dextrosa agar (PDA: papa blanca 25%, dextrosa 2% y agar 2%). Se incubaron a 25°C durante 5-7 días bajo periodos de 12 hs de luz blanca, 12hs de luz negra. Las colonias emergentes fueron contadas y transferidas a medios de cultivo específicos y posteriormente se identificaron en base a las características macro y micro morfológicas según claves específicas para cada grupo de hongos (Leslie y Summerell, 2006; Klich, 2002). La identificación morfológica fue confirmada mediante el empleo de métodos moleculares basados en la amplificación y secuenciación de genes específicos y mediante el análisis de fragmentos de restricción para las colonias identificadas morfológicamente como *F. graminearum*. Para esto, se partió de colonias monospóricas de cada aislamiento que fueron procesadas para posterior extracción de ADN.

Los cultivos monospóricos se realizaron a partir de una suspensión de esporas del cultivo en un tubo con agua destilada estéril. Se plaqueo la suspensión en placa de Petri conteniendo agar-agua 2%, se dejó reposar un minuto para que se adhieran los conidios al medio y se descartó el exceso de líquido. Las placas se incubaron a 24±2 °C durante 24 hs en oscuridad en plano inclinado.

Posteriormente, bajo microscopio estereoscópico en estrictas condiciones de esterilidad se seleccionó un conidio germinado, se transfirió a una placa de Petri conteniendo PDA y se incubó a 24±2 °C. El micelio a partir de las esporas germinadas fue guardado en crioviales con agua destilada estéril a temperatura ambiente y en crioviales con glicerol (10%) a -80 °C en la colección del laboratorio de Micología.

Identificación molecular.

Fusarium spp.

Se realizó la extracción de ADN genómico a partir de los cultivos monospóricos mediante el método de bromuro de cetiltrimetilamonio (2% CTAB) (Leslie y Summerell, 2006).

La identificación de *Fusarium graminearum sensu stricto* (*F. graminearum s. s.*), se realizó mediante la metodología descrita por Garmendia et al. (2018). Para ello se utilizó el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación del gen correspondiente al factor de elongación-1 α (TEF-1 α) y posteriormente se realizó la técnica de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) utilizando la enzima *Bsa*HI. La amplificación del gen TEF -1 α se realizó en un volumen final de 25 μ L de reacción conteniendo, 1X Buffer (Nzytech, Portugal), 0.5 μ L de cada (1 mM) cebador, 2 μ L de dNTPs (2,5 mM) (Nzytech, Portugal), 0.5 U de Taq polimerasa (Nzytech, Portugal) y 1 μ L (50 ng) de ADN genómico. Se utilizaron los cebadores EF1 (5'-ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC-3') y EF2 (5'-GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT-3') (O'Donnell et al., 1998), sintetizados por Macrogen Inc. (Seoul, Korea). Todas las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador automático GeneAmp PCR system 9700 (Perkin-Elmer, USA). Las condiciones para la PCR fueron: un paso inicial de desnaturalización de 95° por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización de 94° por 1 minuto, un paso de hibridación a 55°C por 30 segundos y un paso de extensión de 72°C por 1.5 minutos. El último ciclo fue seguido de un paso de extensión a 72°C por 10 minutos. Para el análisis de restricción se tomó un volumen de 10 μ L de los productos de amplificados y se les adiciono 1 μ L de enzima *Bsa*HI y se incubó en baño seco a 65°C durante 1 hr. Posteriormente, se realizó el análisis electroforético de los productos de restricción en gel de agarosa al 1.5% conteniendo colorante GreenSafe Premium (Nzytech, Portugal) (3 mL/100 mL) y las bandas resultantes fueron visualizadas bajo luz UV. Los tamaños de los fragmentos fueron estimados en comparación con un marcador de peso molecular (GeneRuler™ 1Kb Plus DNA ladder, Fermentas International Inc., Canadá). Se identificaron los aislamientos de *Fusarium graminearum s. s.* por la presencia de dos fragmentos de 367 y 291 pb cada uno.

Los aislamientos de *F. verticillioides* se identificaron mediante PCR utilizando primers específicos para esta especie, VER-1 y VER -2 (5'-CTTCCTGCGATGTTTCTCC-3' y 5' -AATTGGCCATTGGTATTATATATCTA-3', respectivamente) (Mulè et al., 2004). Para la reacción de amplificación se utilizaron 25 ng de ADN fúngico, 1X de Buffer, 0.75 μ L de MgCl (50 mM), 1 μ L de cada cebador (10mM), 2.5 μ L de dNTP (2,5 mM) (Nzytech, Portugal) y 0.25 μ L de Taq polimerasa (Nzytech, Portugal). El ADN fue inicialmente desnaturalizado a 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificación donde cada uno consistía de un primer paso de desnaturalización de 50 segundos a 95°C, un paso de hibridación de 50 segundos a 56°C y de extensión de 1 minuto a 72°C. El último ciclo fue seguido de un paso final de extensión a 72 °C por 10 minutos. Posteriormente los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% para confirmar la identidad de los aislamientos. Los aislamientos de *Fusarium verticillioides* fueron identificados por la presencia de un fragmento de 578 pb.

Para el resto de los aislados pertenecientes al género *Fusarium* se realizó la amplificación del TEF-1 α para su posterior secuenciación e identificación (Geiser et al., 2004).

Aspergillus spp.

Para la identificación de aislamientos pertenecientes al género *Aspergillus*, se realizó la extracción de ADN a partir de cultivos monospóricos, según la metodología de Specht et al. (1982). Se amplificó el gen de la calmodulina en un ciclo de PCR con los siguientes pares de cebadores; CMD5 5'-CCGAGTACAAGGAGGCCTTC- 3' y CF4 5'- TTTYTGATCATRAGYTGGAC -3'. Para la reacción de amplificación se utilizaron 25 ng de ADN fúngico, 5 μ L de Buffer 10x (Nzytech, Portugal), 5 μ L de MgCl (25 mM), 2 μ L de cada cebador (10mM), 5 μ L de dNTP (2,5 mM) (Nzytech, Portugal) y 0,5 μ L de Taq polimerasa (Nzytech, Portugal) en un volumen final de 50 μ L. El ADN fue inicialmente desnaturalizado a 94 °C por 5 minutos, seguido de 34 ciclos de amplificación donde cada uno consistía de un primer paso de desnaturalización de 50 segundos a 94 °C, un paso de hibridación de 50 segundos a 58°C y de extensión de 1 minuto a 72 °C. El último ciclo fue seguido de un paso final de extensión a 72 °C por 7 minutos.

Los productos de amplificación obtenidos para todas las especies estudiadas, se visualizaron bajo luz UV luego de una electroforesis en gel de agarosa (1,5%), conteniendo el colorante GoodView TM. El tamaño de los amplicones se estimó por comparación con un marcador de peso molecular (GeneRulerTM 1Kb Plus DNA ladder, Fermentas International Inc., Canadá). Los productos de PCR obtenidos fueron luego enviados a secuenciar a MACROGEN Inc. (Seúl, Korea). Las secuencias consenso fueron obtenidas mediante el programa Seqman (Lasergene, Madison, WI) y comparadas con las secuencias almacenadas en la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) mediante la herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) y en el Instituto Westerdijk de Biodiversidad Fúngica (CBS-KNAW) (<http://www.cbs.knaw.nl>).

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MICOTOXINAS EN MUESTRAS DE MAÍZ

Se realizó la detección y cuantificación de las micotoxinas DON, ZEA, NIV, FB1 y FB2 y aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2), mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El análisis de las muestras se realizó en el Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) en base a las metodologías descritas en la AOAC (970.45; 995.15; 991.31; 994.08; 986.17 cap.49). Los límites de la cuantificación informables (LOQs) fueron: 80 μ g/kg (FBs); 30 μ g/kg (ZEA); 88 μ g/kg (DON) y 50 μ g/kg (NIV). Se analizaron un total de 119 muestras de maíz, 61 correspondientes al 2018 y 58 del 2019.

Resultados

ESPECIES ASOCIADAS AL MAÍZ

En base a las muestras analizadas durante las zafras 2018 y 2019, (2018 n=94, 2019 n=58), las especies de *Fusarium* fueron las principales contaminantes asociadas a granos de maíz (45%), con una incidencia, definida como colonias emergentes por grano, sobre un total de 100 granos analizados, que varió desde 7 a 100%. En segundo lugar se encontraron los hongos pertenecientes al género *Aspergillus* (15%), cuya incidencia en las muestras estuvo comprendida entre 0 y 95%.

En relación a los hongos pertenecientes al género *Fusarium*, en total, se lograron aislar 507 *Fusarium* de las muestras. En base a la identificación morfológica, 337 (66%) aislamientos pertenecían a la especie *F. verticillioides*, 97 (19%) al complejo *Fusarium graminearum* (FGSC), 45 (9%) a *F. subglutinans* y 28 (6%) a *F. proliferatum*. *Fusarium verticillioides* fue la especie mayormente aislada, con una incidencia promedio en las muestras de 44% y 30% en 2018 y 2019, respectivamente. En segundo lugar se encontró la presencia de especies pertenecientes al complejo FGSC con 3% de promedio de incidencia en ambos años de estudio. La presencia de aislamientos pertenecientes a las especies *F. proliferatum* y *F. subglutinans* fue a bajos niveles de incidencia en ambos años, promediando 1,5 y 0,2% en 2018 y 2019, respectivamente para *F. proliferatum* y 1,2 y 0,3% en 2018 y 2019, respectivamente para *F. subglutinans* (Figura 1-1).

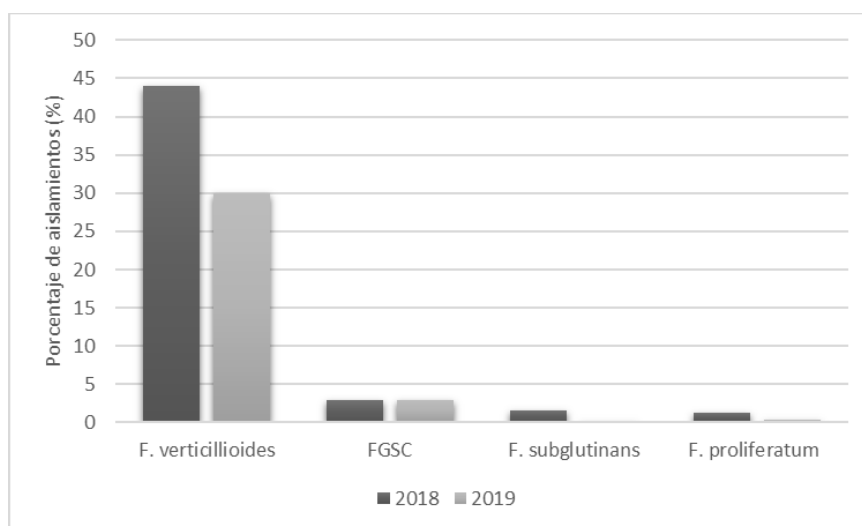


Figura 1-1. Distribución de especies pertenecientes al género *Fusarium* en muestras de maíz durante las dos zafras de estudio

Del total de aislamientos obtenidos del género *Fusarium*, se seleccionaron un total de 236 aislamientos para la identificación mediante el empleo de técnicas moleculares. Los aislamientos se seleccionaron al azar dentro de los obtenidos para cada complejo de especies de acuerdo a las

características morfológicas. De esta manera se lograron identificar 115 (49%) aislamientos como *F. verticillioides*, 89 (38%) como *F. graminearum* s. s., 14 (6%) aislamientos como *F. subglutinans*, 10 (4%) como *F. proliferatum*, 6 (2%) aislamientos como *F. meridionale*, y finalmente un aislamiento como *F. pseudograminearum* y 1 como *F. armeniacum*.

En relación al género *Aspergillus*, se obtuvieron un total de 177 aislamientos a partir de las muestras analizadas en ambos años, de los cuales, en base a las características macro y micro morfológicas, el 68% (n=121) perteneció a la sección *Flavi*, mientras que el 32% (n=56) a la sección *Nigri*. Dentro de este género, los hongos pertenecientes a la sección *Flavi* fueron los más frecuentes en las muestras analizadas en ambos años, con una incidencia promedio de 9% y 3,4%, respectivamente, en función del total de aislamientos para cada año de estudio. La incidencia promedio de la sección *Nigri* fue de 2 y 0,3% para 2018 y 2019, respectivamente. Para el estudio de los hongos pertenecientes a la sección *Flavi*, se seleccionaron 46 aislamientos (38%) para su identificación por métodos moleculares, todos ellos pertenecen a la especie *A. flavus*.

MICOTOXINAS EN MUESTRAS DE MAÍZ

Se realizó la determinación de micotoxinas a un total de 119 muestras, 61 muestras correspondientes a 2018 y a 58 muestras del 2019. En cuanto a la presencia de micotoxinas de *Fusarium*, se pudo determinar la presencia de DON, ZEA, NIV, FB1 y FB2. La micotoxina mayormente encontrada como contaminante de las muestras fue la FB1, alcanzando niveles de contaminación del 96.7% de las muestras analizadas en 2018 y 86.2 % de las muestras del 2019. Asimismo, fue la toxina que presentó mayores niveles de concentración en ambos años de estudio, promediando niveles de 4.071 µg/kg, con máximos de 59.004 µg/kg en 2018 y 1.252 µg/kg con valores máximos de 9.881 µg/kg en 2019 (Tabla 1-1). Para FB2 la concentración promedio fue de 1.529 µg/kg, con máximos de 14.908 µg/kg en 2018, mientras que en 2019 el valor promedio en las muestras fue de 427 µg/kg con 4.138 µg/kg de valor máximo (Tabla 1-1). La mayoría de las muestras analizadas presentaron niveles de contaminación con fumonisinas menores a 2.000 µg/kg, con un 31% de muestras analizadas que superan concentraciones de 2.000 µg/kg, siendo estas últimas más frecuentes en 2018 donde se correspondieron con el 48% de las muestras positivas, mientras que del total de muestras positivas de 2019, el 17% superó esa concentración (Figura 1-2).

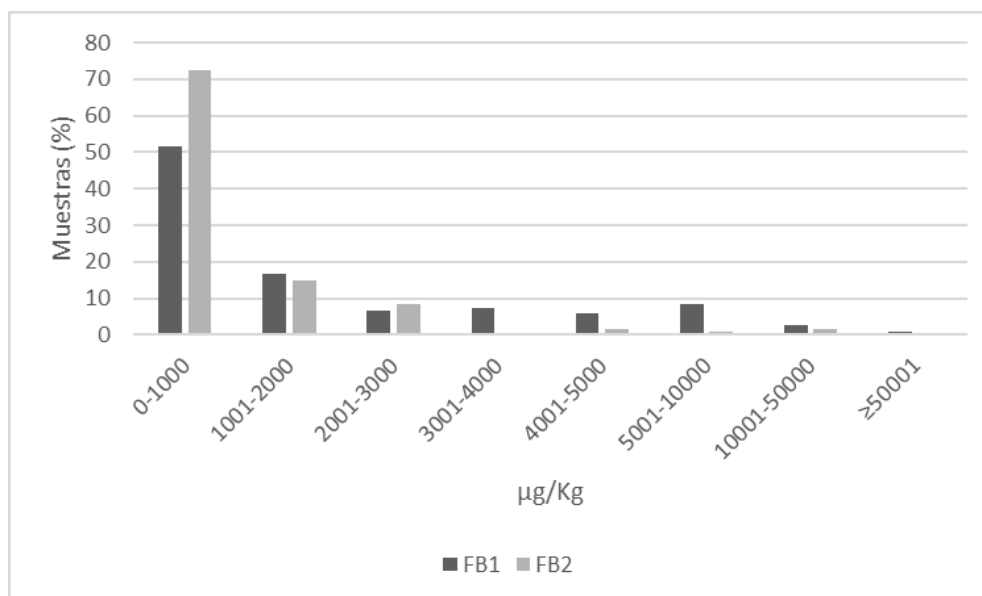


Figura 1-2. Distribución de las muestras de maíz (%) según los niveles de contaminación con FB1 y FB2 (µg/kg)

Por otro lado, NIV fue la toxina con menor número de muestras positivas, encontrándose un total de cuatro entre ambos años de estudio, con niveles de 66 µg/kg y 151 µg/kg en 2018 y 2019, respectivamente (Tabla 1-1). La concentración promedio de DON y ZEA en las muestras analizadas variaron de forma significativa entre ambos años de estudio. Para DON los valores de contaminación promediaron 278 µg/kg en 2018 y 118 µg/kg en 2019 (Tabla 1-1). Para ZEA, el valor promedio de las muestras de 2018 fue de 302 µg/kg en comparación con las correspondientes a 2019 cuyos valores promedio fueron de 18 µg/kg (Tabla 1-1).

Tabla 1-1. Niveles de micotoxinas promedio presentes en muestras de maíz de la cosecha 2018 (n=61) y 2019 (n=58)

Toxinas	Contaminación total (µg/Kg) ± SD		Porcentaje de muestras contaminadas (%)		Contaminación promedio en las muestras positivas (µg/Kg)			
					Muestras positivas (µg/Kg) ± SD	Rango de positivas	Muestras positivas (µg/Kg) ± SD	Rango de positivas
	2018	2019	2018	2019	2018		2019	
FB1	4071±9893	1252±2002	96.7	86.2	4860±10023	80 - 59004	1453±2089	80 - 9881
FB2	1529±2774	427±756	90.2	60.4	1695±2874	80 - 14908	708±868	80 - 4138
DON	278±456	118±233	52.5	46.5	530±513	59 - 2471	253±289	59 - 922
ZEA	302±732	18±45	64.0	17.2	472±874	30 - 2522	103±58	30 - 200
NIV	3±15	3±20	5.0	1.7	66±16	50 - 84	151	-
AFB1	7±12	-	37.0	-	18,5±14	1.1 - 31.1	-	-
AFG1	0.4±2	-	7.0	-	5±6	1.2 - 12	-	-

A 43 muestras de maíz de la cosecha 2018 se les realizó además la determinación de micotoxinas de *Aspergillus*; AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2. La concentración promedio de AFB1 en las muestras positivas (37%) fue de 18,5 µg/kg, variando entre 1,1 y 31,1 µg/kg, y para AFG1 la concentración promedio en las muestras positivas (7%) fue de 5 µg/kg, variando entre 1,2 y 12 µg/kg. No se detectó la presencia

de AFB2 y AFG2. Si consideramos los niveles de aflatoxinas totales (B1+B2+G1+G2), el valor promedio en las muestras positivas fue de 19,6 µg/kg variando entre 1,1 y 32,3 µg/kg.

Discusión

En relación a las especies fúngicas asociadas a granos de maíz, *F. verticillioides* fue la especie predominante, seguido de *F. graminearum* s. s., otro importante contaminante asociado a este cultivo. Trabajos realizados en el sur de Brasil y Argentina, donde las condiciones climáticas y las características del suelo son similares a las de nuestro país, también demostraron la presencia de *F. verticillioides* como la especie prevalente de *Fusarium* asociada a granos de maíz (van der Westhuizen et al., 2003; Stumpf et al., 2013; Castañares et al., 2019). Por otro lado, se determinó la presencia de otras dos especies pertenecientes al complejo FFSC *F. subglutinans* y *F. proliferatum*. Ambas especies habitualmente coexisten con *F. verticillioides* a nivel mundial en las cosechas de maíz, dificultando el desarrollo de variedades híbridas resistentes (Fallahi et al., 2019). Hasta el momento, pocos trabajos relacionados al estudio del complejo FFSC asociado a granos de maíz han sido llevados a cabo en nuestro país, por lo que es importante avanzar en estudios en relación a este complejo para, a futuro, poder desarrollar estrategias adecuadas para el control de la pudrición de la mazorca del maíz y la presencia de micotoxinas en maíz.

En relación al complejo FGSC, varios autores plantean una adaptación de *F. meridionale* al agroecosistema del maíz, ya que es la especie perteneciente al complejo FGSC que prevalece en maíz en Brasil y Argentina (Alvarez et al., 2009; Del Ponte et al., 2015; Kuhnem et al., 2016; Sampietro et al., 2011). Sin embargo, en este trabajo encontramos que en Uruguay la principal especie perteneciente al complejo FGSC en maíz es *F. graminearum* s. s.. Es posible que la presencia de grandes extensiones con cultivos como trigo y cebada, que usualmente están colonizados por *F. graminearum* s. s. (Garmendia et al., 2018b; Pan et al., 2015; Umpierrez et al., 2013), sean un factor de importancia en la distribución de especies. Estos cultivos coexisten en rotación con maíz, en las mismas áreas cultivadas en nuestro país. La diferencia en los niveles de contaminación por las distintas especies de *Fusarium* podría obedecer principalmente a la gran adaptación de *F. verticillioides* a la colonización del maíz, persistiendo como endófito en raíces y hojas (Blacutt et al. 2018) y al hecho de que esta especie se ve favorecida por las altas temperaturas y actividades hídricas medias, características climáticas frecuentes en los veranos de nuestro país.

Si bien existe una fuerte asociación de la contaminación de los cultivos con *Aspergillus* durante la postcosecha debido a un almacenamiento inadecuado y a condiciones de temperatura y humedad

elevadas asociadas al almacenamiento, la contaminación con estos hongos puede ocurrir previo a la cosecha y en consecuencia, asociar contaminación con aflatoxinas. Además de la presencia del inóculo, deben darse condiciones ambientales favorables para el desarrollo y producción de toxinas. *Aspergillus flavus* presenta un crecimiento óptimo entre 30 –35°C (Abdel-Hadi et al., 2012), y actividades hídricas de 0.99 - 0.98. A pesar de que el maíz es un cultivo de verano, las temperaturas durante el verano en nuestro país no alcanzan a ser muy elevadas, generalmente varían entre 15 - 29°C, siendo el promedio de temperaturas para los meses de verano en ambos años de estudio cercano a los 23°C. Por otro lado, los niveles de precipitación acumulados en el periodo de diciembre a marzo, en la región cerealera fueron aproximadamente de 130 mm en ambos años, sin embargo, el porcentaje de agua disponible en el suelo de esta región fue muy bajo en 2018 con niveles entre 0 y 11% en comparación con 2019 donde este fue de 60 -70% (Basado en registros de INIA -GRAS). Es así que la baja prevalencia de esta especie en los cultivos puede ser explicada en parte debido a las condiciones ambientales con baja disponibilidad de agua y bajas temperaturas. Sin embargo, la detección de esta especie desde etapas tempranas en los granos, son un riesgo potencial para el deterioro del grano y la contaminación con aflatoxinas en un almacenamiento posterior, ya que si éste se realiza en condiciones de elevada humedad y temperatura, se favorece su desarrollo.

Como se mencionó, *F. verticillioidea* fue la principal especie aislada de maíz, especie que se caracteriza por ser una de las principales productoras de fumonisinas, junto con *F. proliferatum* y *F. sambucinum*. La alta prevalencia de esta especie indica que el maíz puede estar expuesto a la contaminación por fumonisinas, lo que configura un riesgo para la salud tanto humana como animal. Tal es así, que las fumonisinas fueron las toxinas con mayor distribución en el total de muestras analizadas, evidenciándose un 98% de muestras positivas en 2018 y 86% en 2019, siendo la FB1 además la que presentó niveles mayores en el total de muestras analizadas en ambos años (4.860 µg/kg en 2018 y 1.453 µg/kg en 2019). Considerándose que en Uruguay el principal destino del maíz es la alimentación del ganado bovino y porcino, 24% (n=15) de las muestras de 2018 y 10% (n=6) de las de 2019 superaron los niveles recomendados por el CODEX (2019) para alimentos y raciones (4.000 µg/kg FB1+FB2), mientras que una única muestra excede los niveles recomendados por la Comunidad Europea para granos de maíz y subproductos para alimentación animal (60000 µg/kg FB1+FB2).

A pesar de haberse encontrado una incidencia similar de *F. verticillioidea* en ambos años de estudio (44% y 30% en 2018 y 2019, respectivamente), la detección de mayores niveles de fumonisinas en 2018 en comparación al 2019 podría estar vinculada a la presencia no solo de esta especie, sino también otras especies capaces de producir esta toxina como *F. proliferatum* y *F. subglutinans*.

Asimismo, otro factor incidente podría ser la baja disponibilidad de agua en el suelo en 2018 en comparación con 2019 considerando que bajos niveles de actividad hídrica (0.93 - 0.95 aw) y temperaturas no tan elevadas (25 - 30°C) han demostrado ser las condiciones óptimas para la síntesis de FB1 (Marín et al., 2004, Fumero et al., 2016).

Los niveles de DON y ZEA encontrados en el presente estudio fueron similares en comparación con los reportes de maíz de la región (Castañares et al., 2019; Mendes de Souza et al. 2013). Sólo 6% (n=7) de las muestras superan los niveles recomendados para DON en la reglamentación de Uruguay para porcinos y equinos (1.000 µg/kg). Ninguna muestra supera los niveles máximos recomendados para materias primas destinadas a la producción de alimentos para animales (10.000 µg/kg) (resolución MGAP S/N/001, 2001; FDA, 2010). Considerando los niveles de ZEA, el 11% (n=13) de las muestras excedieron los niveles recomendados en Uruguay de 250 µg/kg, pudiendo esto explicarse por la baja incidencia de FGSC (3%) en ambos años estudiados.

En suma, este estudio permite evidenciar que las especies de *Fusarium* son las principales contaminantes del maíz. Siendo *F. verticillioides* la especie toxicogénica prevalente y en consecuencia las fumonisinas las principales toxinas asociadas a este cultivo. Considerando los elevados niveles de contaminación con estas toxinas es necesario su monitoreo continuo para evitar impactos en la salud humana y animal asociados al consumo de este cultivo. Asimismo, importante ahondar en el desarrollo de estrategias que permitan minimizar la colonización del maíz por especies toxicogénicas evitando así su contaminación con micotoxinas.

Bibliografía

- Abdullah, N., Nawawi, A., Othman, I., 1998. Survey of fungal counts and natural occurrence of aflatoxins in Malaysian starch-based foods. *Mycopathologia*, 143(1):53-8.
- Assunção, R., Martins, C., Viegas, S., Viegas, C., Jakobsen, L., Pires, S., Alvito, P., 2018. Climate change and the health impact of aflatoxins exposure in Portugal – an overview. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 1–12.
- Bullerman, L., Draughon, F., 1994. *Fusarium moniliforme* and fumonisins symposium introduction. *J. Food Protection*, 57: 513.
- Castañares, E., Martínez, M., Cristos, D., Rojas, D., Lara, B., Stenglein, S., Dinolfo, M., 2019. *Fusarium* species and mycotoxin contamination in maize in Buenos Aires province, Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, (4) 1265-1275
- Chulze, S., 2010. Strategies to reduce mycotoxin levels in maize during storage: a review. *Food Add. Contam.* 27 (5), 651e657.

- Cardwell, K., King, J., Maziya-Dixon, B., Bosque-Perez, N., 2000. Interactions between *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus flavus*, and insect infestation in four maize genotypes in Lowland Africa. *Phytopathology* 90, 276–284
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) Rome 2004. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO FOOD AND NUTRITION PAPER 81
- Garmendia, G., Umpierrez-Failache, M., Ward, T., Vero, S., 2018. 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 microbiology*, 70, 28-32.
- Geiser, D. , del Mar Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T., Zhang, N.,Kuldau, G., O'donnell, K., 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European journal of plant pathology*, 110, 473-479.
- Gelderblom, W., Marasas, W., Lebepe-Mazur, S., Swanevelder, S., Vessey, C., De la M Hall, P., 2002. Interaction of fumonisin B1 and aflatoxin B1 in a short-term carcinogenesis model in rat liver. *Toxicology*, 171(2-3), 161-173.
- Getachew, A., Chala, A., Hofgaard, I., Brurberg, M., Sulyok, M., Tronsmo, A., 2017. Multimycotoxin and fungal analysis of maize grains from south and southwestern Ethiopia. *Food Additives & Contaminants: Part B* 11(1):64-74
- Harrison, L., Colvin, B., Greene, J., Newman, L., Cole Jr, J., 1990. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2(3), 217-221.
- Klich, M., 2002. Identification of Common *Aspergillus* Species. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
- Klich, M., 2007. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Mol. Plant Pathol.* 8:713–22
- Leslie, J., Summerell, B.; 2006. The *Fusarium* laboratory manual. 1st ed. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, London.
- Marasas, W., Kellerman, T., Gelderblom, W., Thiel, G., Van der Lugt, J., Coetzer, J., 1988. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*.
- Marin, S., Sanchis, V., Ramos, A. J., Vinas, I., Magan, N., 1998. Environmental factors, in vitro interactions, and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize grain. *Mycological Research*, 102(7), 831-837.

- MGAP. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca 2001. Resolución S/N/001 Límites máximos de DON en alimentos para animales. Pagina visitada por ultima vez en 04/2024: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/institucional/normativa/resolucion-sn001-limites-maximos-don-alimentos-para-animales>
- Michailides T, Thomidis T. 2007. First report of *Aspergillus flavus* causing fruit rots of peaches in Greece. Plant Pathol. 56:352
- Mulè, G., Susca, A., Stea, G., Moretti, A., 2004. A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. European Journal of Plant Pathology, 110, 495-502.
- Oldenburg, E., Höppner, F., Ellner, F., Weinert, J., 2017. *Fusarium* diseases of maize associated with mycotoxin contamination of agricultural products intended to be used for food and feed. Mycotoxin research, 33(3), 167-182.
- Orsi, R., Corrêa, B., Possi, C., Schammas, E., Nogueira, J., Dias, S., Malozzi, M., 2000. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. J Stored Products Res. 36:75–87.
- Picco, M., Nesci, A., Barros, G., Cavaglieri, L., Etcheverry, M., 1999. Aflatoxin B1 and fumonisin B1 in mixed cultures of *Aspergillus flavus* and *Fusarium proliferatum* on maize. Nat. Toxins 7, 331–336.
- Pleadin, J.; Kos, J.; Radić, B.; Vulić, A.; Kudumija, N.; Radović, R.; Janić Hajnal, E.; Mandić, A.; Anić, M. 2023. Aflatoxins in Maize from Serbia and Croatia: Implications of Climate Change. Foods, 12, 548.
- RBN, 2012. Reglamento Bromatológico Nacional 5ª edición. Consultado On-line: <https://montevideo.gub.uy/sites/default/files/biblioteca/bromatologico5a.edicion.pdf>
- Samson, R., Hocking, A., Pitt, J., King, A., 1992. Modern Methods in Food Mycology. Elsevier, Amsterdam.
- Shabana, Y., Ghoneem, K., Rashad, Y., Arafat, N., Fitt, B., Richard, B., Qi, A., 2022. Distribution and Biodiversity of Seed-Borne Pathogenic and Toxigenic Fungi of Maize in Egypt and Their Correlations with Weather Variables. Plants, 11, 2347.
- Specht, C., DiRusso, C., Novotny, C., Ullrich, R., 1982. A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi. Analytical biochemistry, 119(1), 158-163.
- Stumpf, R., Dos Santos, J., Gomes, L., Silva, C., Tessmann, D., Ferreira, F., Machinski, M., Del Ponte, E., 2013. *Fusarium* species and fumonisins associated with maize kernels produced in

Rio Grande do Sul State for the 2008/09 and 2009/10 growing seasons. Braz J Microbiol. May 31;44(1):89-95.

- Tolleson, W., Melchior, W., Morris, S., McGarrity, J., Domon, O., Muskhelishvili, L., James, J., Howard, P., 1996. Apoptotic and anti-proliferative effects of fumonisin B1 in human keratinocytes, fibroblasts, esophageal epithelial cells and hepatoma cells. Carcinogenesis, 17(2), 239-249.
- Van Der Westhuizen, L., Shephard, G., Scussel, V., Costa, L., Vismer, H., Rheeder, J., Marasas, W., 2003. Fumonisin contamination and *Fusarium* incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(18), 5574-5578.
- Yu, J., Cleveland, T., Nierman, W., Bennett, J., 2005. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. Rev. Iberoam. Mycol. 22:192–202
- Widstrom, N., 1996. The aflatoxin problem with corn grain. Adv. Agron.

Capítulo 2.

Caracterización de las especies fúngicas toxicogénicas asociadas al maíz

Introducción

La presencia de micotoxinas en los granos está estrechamente relacionada al crecimiento fúngico, por lo que si no hay desarrollo de hongos no habrá micotoxinas. Sin embargo, la existencia de hongos en un cultivo, no implica la producción de micotoxinas, ya sea porque no se dieron las condiciones adecuadas (principalmente disponibilidad de agua y temperatura) o por la ausencia de cepas toxigénicas (Santin, 2008). La producción de toxinas por parte de las cepas fúngicas es variable, habiéndose definido, para algunas especies, diferentes quimiotipos en base a su perfil toxigénico (Ward et al., 2002; Giorni et al., 2007), por lo que la identificación de las especies contaminantes de los diferentes sustratos permite predecir las potenciales toxinas contaminantes (Mulè et al., 1997; Tan y Niessen, 2003; Kristensen et al., 2005). Especies o cepas muy relacionadas filogenéticamente pueden tener perfiles de producción diferentes, como ocurre en *F. verticillioides*, donde se han descrito 2 linajes que difieren en la capacidad de producir o no fumonisinas (Mirete et al., 2004). Los aislamientos que forman parte del complejo *F. graminearum* se sabe que presentan cuatro perfiles específicos en relación a la producción de tricotecenos, denominados quimiotipos. Estos son: deoxinivalenol (DON), para cepas productoras de DON únicamente, DON/3-AcDON para cepas que productoras de DON y su acetilado 3- AcDON, DON/15-AcDON para las cepas que productoras de DON y el acetilado 15- AcDON, y nivalenol (NIV) para las cepas que únicamente producen NIV (Zhang et al., 2007; Alvarez et al., 2009; Scoz et al., 2009). Por otro lado se han observado cepas capaces de producir tanto DON como NIV y se les adjudica el quimiotipo DON/NIV, como también DON/3-15 AcDON a las que son capaces de producir los dos acetilados simultáneamente (Castañares et al., 2014). Asimismo, se ha observado la asociación de ciertos quimiotipos a la agresividad de los aislamientos y a la capacidad de síntesis de micotoxinas, estableciéndose que cepas productoras de DON/3-AcDON exhiben mayor agresividad que las productoras de DON/15-AcDON como también mayor producción de micotoxinas (Ward et al., 2008; Zhang et al., 2012). Los distintos quimiotipos se han encontrado asociados a regiones geográficas diferentes, habiéndose registrado el quimiotipo NIV predominantemente en Asia, Europa y África, mientras que en América del Norte y del Sur se ha encontrado que predomina el quimiotipo DON (Zhang et al., 2007; Ward et al., 2008; Scoz et al., 2009; Lee et al., 2010; Nielsen et al., 2011; Prodi et al., 2011; Sampietro et al., 2011; Aoki et al., 2012; Pan et al., 2013). La presencia de los quimiotipos de DON con distintos acetilados también se ha

observado en regiones geográficas particulares, predominando 3-AcDON en Asia y 15-AcDON en Sudamérica (Alvarez et al., 2009). Se han diseñado ensayos de PCR específicos dirigidos a genes que participan en la síntesis de tricotecenos para la determinación de genotipos que permitan predecir los quimiotipos (Desjardins, 2008). Sin embargo, estudios demuestran que no siempre existe una relación certera entre estos, por lo que la determinación de los quimiotipos sigue siendo de gran utilidad a la hora de predecir las potenciales micotoxinas contaminantes en los sustratos (Crippin et al., 2019).

La contaminación fúngica y la síntesis de micotoxinas, tanto en el campo como durante el almacenamiento, es en gran parte dependiente de factores ecofisiológicos. En particular en este estudio pudimos evidenciar que las principales especies toxigénicas asociadas al maíz están comprendidas en los géneros de *Fusarium* y *Aspergillus*, como se mencionó en el capítulo 1. Los principales determinantes para el desarrollo y síntesis de toxinas de los hongos asociados a estos géneros son la actividad de agua (aw) y la temperatura (Doohan et al., 2003, Lahouar et al., 2016). La actividad hídrica se define como la relación entre el agua contenida en el grano y la presión de vapor del agua libre. El agua libre determina la germinación de las esporas, la tasa de crecimiento y afecta a la regulación de la biosíntesis de las toxinas (Marín et al., 2004; Ramírez et al., 2004, 2006). La temperatura también afecta el crecimiento fúngico y a la producción de toxinas. Cada especie fúngica tiene una temperatura mínima, máxima y óptima para su crecimiento (Lacey, 1991) y para la síntesis de las toxinas. Asimismo, existe una variabilidad en los requerimientos de agua para el crecimiento fúngico y la producción de toxinas a diferentes temperaturas. Por lo que cada factor por separado y su interacción tiene influencia sobre las especies fúngicas que colonizan los sustratos, pudiéndose establecer especies más tolerantes a diferentes condiciones ambientales (Magan y Aldred, 2007). En relación al crecimiento de *F. verticillioides*, está descrito que esta especie requiere de aw superiores a 0.90 (óptimo 0.98) y temperaturas entre 4 – 37°C, con un óptimo a 35°C para su crecimiento (Marin et al., 1999). Sin embargo, niveles bajos de actividad hídrica (0.93 - 0.95 aw) y temperaturas no tan elevadas (25 - 30°C) han demostrado ser las condiciones óptimas para la síntesis de fumonisina B1 (Marín et al., 2004, Fumero et al., 2016). Las condiciones óptimas de temperatura para el crecimiento de *F. graminearum* son de 25°C, con un rango comprendido entre 20 y 30°C y niveles de aw de 0.99 (Marín, 2010). Mientras que para la síntesis de DON, las condiciones óptimas descritas para esta especie son de temperaturas comprendidas entre 29–30°C y niveles de aw de 0.99 (Sanchis y Magan, 2004). Finalmente, para el crecimiento de *A. flavus*, en general, altas temperaturas (30-35°C) y bajas actividades hídricas (0.95), hacen de *A. flavus* se desarrolle como especie dominante contaminando el maíz en campo, pudiendo continuar su actividad durante la post-cosecha (Sanchis y Magan, 2004; Giorni et al., 2009; Abdel-Hadi et al., 2012). También se ha

visto que la expresión de genes responsables de la producción de aflatoxinas responde a variaciones en la actividad hídrica, temperatura y sustrato (Giorni, 2008). Ensayos realizados *in vitro* sugieren que la producción máxima de aflatoxina ocurre en rangos de actividad hídrica comprendidos entre 0.95 y 0.99 y a una temperatura óptima de 33°C (Sanchis y Magan, 2004; Giorni et al., 2011; Abdel-Hadi et al., 2012; Battilani et al., 2013).

La presencia de hongos toxicogénicos de *Fusarium* y *Aspergillus* como agentes frecuentes de contaminación en cultivos de maíz de nuestro país, y la producción de micotoxinas asociadas a ellos, enfatiza la necesidad de desarrollar estrategias de control tanto del crecimiento y desarrollo del patógeno como de los factores que favorecen la síntesis de micotoxinas. Para desarrollar estrategias efectivas para lograr los objetivos antes mencionados, es necesario recabar información sobre las poblaciones actuales, su variabilidad, y los factores climáticos que favorecen su desarrollo, así como sobre la capacidad toxicogénica y el perfil genético asociado a la síntesis de toxinas de estos patógenos.

Objetivos

- Determinar los perfiles toxicogénicos de las principales especies fúngicas aisladas y conocer las condiciones de temperatura y actividad hídrica que favorecen su crecimiento y la producción de micotoxinas.
- Desarrollar modelos *in vitro* que permitan predecir, en función de la temperatura y la actividad hídrica, patrones de crecimiento y síntesis de micotoxinas de las especies estudiadas

Las hipótesis planteadas en relación a este objetivo son:

- Las especies *Fusarium verticillioides*, *Fusarium graminearum* s. s. y *Aspergillus flavus* aisladas de maíz tienen diferentes capacidades para sintetizar micotoxinas y estas varían en función de las condiciones de actividad hídrica y temperatura. *Fusarium verticillioides* y *Aspergillus flavus* tienen una mayor capacidad de síntesis de micotoxinas en condiciones de actividad hídrica moderada, y temperaturas elevadas, mientras que *Fusarium graminearum* s. s. tiene un rango más amplio de actividad hídrica óptima y temperaturas intermedias.

Materiales y Métodos

CARACTERIZACIÓN TOXICOGÉNICA

Del total de aislamientos identificados se seleccionaron un total de 232 cepas al azar de cada una de las especies predominantes, resultando en el estudio de 84 cepas de *F. verticillioides*, 74 de *F. graminearum* s. s., 4 de *F. meridionale* y 70 de *A. flavus*. A las cepas seleccionadas se les analizó la capacidad de producción de toxinas *in vitro*. Se realizó el análisis para la producción de ZEA, DON y NIV para *F. graminearum* s. s. y *F. meridionale*; producción de FB1 y FB2 para *F. verticillioides* y producción de aflatoxinas AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 y Ácido ciclopiazónico (ACP) por *A. flavus*.

La producción de toxinas fue analizada mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de fase reversa compuesto por una bomba Shimadzu LC-10ADvp, para la detección de fumonisinas y aflatoxinas se utilizó el detector de fluorescencia RF-10Axl, mientras que para DON, ZEA , NIV y ACP se realizó mediante detector de arreglo de fotodiodos (SPD). Todas las evaluaciones se realizaron utilizando una columna C18 de fase reversa (150 x 4.6 mm i.d., 5 µm tamaño de partícula; Nucleodur®, Macherey-Nagel, Düren, Germany) conectada a una precolumna Security Guard (8 x 4 mm i.d., 5 µm tamaño de partícula; Nucleodur®, Macherey-Nagel, Düren, Germany). Los estándares utilizados para todas las toxinas analizadas fueron los de Trilogy Analytical Laboratory Inc., Washington, MO.

Toxinas de *Fusarium*

Para evaluar la capacidad de producir FB1 y FB2, 20 g de granos de arroz con 10 mL de agua estéril fueron autoclavados por 30 minutos en dos oportunidades en días contiguos. Para DON, NIV y ZEA, se utilizaron 25 g de arroz con 10 mL de agua esteril. Las bolsas con arroz autoclavado fueron inoculadas con 3 discos de micelio tomados a partir de cultivos puros de cada cepa. Las bolsas inoculadas se incubaron en la oscuridad a 25°C durante 28 días, luego se secaron los granos en horno a 60°C, posteriormente se molieron y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

La extracción de FB1 Y FB2 se realizó en base al método AOAC: 995.15, las toxinas se extrajeron a partir de 5 g de arroz molido con metanol:agua (3:1 v/v), el extracto filtrado fue purificado utilizando una columna de intercambio de aniones (Strata® SAX, 55 µm, 70Å, Phenomenex), las fumonisinas fueron eluidas con una solución de ácido acético:metanol (1:99 v/v), se llevaron a sequedad y posteriormente el residuo se disolvió con 1 mL de metanol. A cada muestra analizada se le adiciono O-ftaldialdehído (Sigma-Aldrich, Milan, Italy) para que se de la formación de los derivado fluorescentes de las fumonisinas. Se utilizó el detector de fluorescencia con ondas de emisión y

excitación de 335 nm y 440 nm, respectivamente. La fase móvil utilizada estaba compuesta por metanol: NaH_2PO_4 0.1M (77:23 v/v) pH 3.5, el flujo utilizado fue de 1 mL/min y se inyectaron 20 μL de muestra. La presencia de fumonisinas fue determinada mediante la comparación con estándares externos.

El análisis de la producción de ZEA se realizó en base a la metodología AOAC 985.18. Cinco gramos de arroz molido se utilizaron para la extracción de la toxina utilizando metanol:agua (80:20 v/v), el extracto filtrado se purificó utilizando una columna MycoSep®226 (Romer Labs Inc., MO, USA). La elución fue primero evaporada y luego resuspendida en metanol:agua (70:30 v/v), la misma solución fue utilizada como fase móvil, el flujo utilizado fue de 1 mL/min, y el volumen de inyección fue 50 μL . La presencia de ZEA se determinó en base a la comparación con estándares externos.

Deoxinivalenol y NIV fueron detectados mediante la metodología descrita por Reynoso et al., 2011. Las toxinas se extrajeron a partir de 7.5 g de arroz molido con acetonitrilo:metanol (14:1 v/v) y luego se filtró el extracto por una columna de aluminio-C-activado (20:1, w/w) fabricada en el laboratorio. La elución obtenida se evaporó a sequedad y posteriormente se resuspendió con metanol:agua (5:95 v/v). Se utilizó un detector UV con una longitud de onda de 220 nm. La fase móvil estaba compuesta de metanol:agua (12:88 v/v), la velocidad del flujo fue de 1.5 mL/min y el volumen de inyección fue de 50 μL . La presencia de DON y NIV se determinó en base a la comparación con estándares externos.

Toxinas de *Aspergillus*

El análisis de la producción de aflatoxinas se realizó según la metodología descrita por Bragulat et al. (2001). Para ello las cepas se incubaron en placas de Petri conteniendo medio Agar Extracto de Levadura Sacarosa (YES) (Extracto de levadura 2%, Sacarosa 15 %, Agar 2%) a 25°C durante 14 días en oscuridad. Luego, tres discos de agar fueron cortados de cada placa y se les adiciono 1 mL de metanol. Luego de 1 hora en metanol, la solución fue filtrada a través de un un filtro Millipore ($\varnothing$ 0.22 mm) y una alícuota (200 μL) fue derivatizada con 700 μL de ácido trifluoroacético: ácido acético: agua Mili Q (20:10:70, v/v). La solución derivatizada fue analizada por detector de fluorescencia con longitud de onda de emisión y excitación de 360 nm y 440 nm, respectivamente. La fase móvil utilizada fue agua Mili Q: metanol: acetonitrilo (4:1:1, v/v/v) a un flujo de 1.5 mL/ min. El volumen de inyección fue de 20 μL . La presencia de aflatoxina G1, G2, B1 y B2 se determinó en base a la comparación con estándares externos.

Se determinó la producción de ACP en base a la metodología descrita por Mamo et al., 2018. Para esto se inocularon las cepas en placas conteniendo medio YES y se incubaron en oscuridad durante 7

días a 28°C. Para la extracción de ACP se colocaron 3 discos de micelio en 1 ml de una mezcla conteniendo metanol: agua (70:30, v:v), el metanol fue modificado con una solución al 1% de bicarbonato de sodio. Luego de 1 hora en la solución, las muestras se filtraron a través de un filtro Millipore ($\varnothing$ 0.22 mm) y se inyectaron 20 μ L al equipo. Las muestras se analizaron utilizando un detector UV (285 nm). La fase móvil utilizada fue acetonitrilo: 50 mM acetato de amonio (3:1, v/v), pH 5, con un flujo de 1.0 ml/min. La presencia de ACP se determinó en base a la comparación con estándares externos.

DETERMINACIÓN DE GENOTIPOS VINCULADOS A LA SÍNTESIS DE TRICOTECENOS

A las cepas pertenecientes al complejo FGSC, *F. graminearum* s. s. y *F. meridionale*, se les realizó además, la determinación de los genotipos asociados a tricotecenos mediante técnicas de PCR. Se realizaron dos PCR múltiples para la amplificación de la región de los genes *Tri3* y *Tri12*, genes involucrados en la biosíntesis de tricotecenos. La amplificación de estos genes permite diferenciar los genotipos NIV, 15-AcDON, y 3-AcDON (Ward et al., 2002). Además, se realizó otra PCR para la amplificación de una porción del gen *Tri13* para identificar cepas con genotipo DON (Chandler et al., 2003) (Tabla 2-1). La multiplex realizada para la amplificación del gen *Tri3* incluye un cebador común a todos los genotipos (3CON) y tres cebadores específicos para cada uno de los tres genotipos: 3NA, 3D15A, y 3D3A. Esta reacción produce amplicones de aproximadamente 840-, 610-, y 243-pb para cepas con genotipo NIV, 15-AcDON, y 3-AcDON, respectivamente. La reacción multiplex para el gen *Tri12*, de forma similar, incluye un cebador común a todos los genotipos, 12CON, y tres específicos a cada genotipo: 12NF, 12-15F, y 12-3F. Esta PCR amplifica fragmentos de aproximadamente 840-, 670-, y 410- pb para aislamientos con genotipo NIV, 15-AcDON, y 3-AcDON, respectivamente. Para la amplificación del gen *Tri13* se realizó utilizando los cebadores Tri13F y Tri13DONR, los productos de PCR de aproximadamente 282-bp indica aislamientos con genotipo DON. La PCR múltiple se realizó en un volumen final de 25 μ L que contiene 50 ng de DNAg, 1X PCR buffer (Nzytech), 2 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 0.5U ADN Taq polimerasa (Nzytech) y 0.2 mM de cada cebador. La reacción para la amplificación de los genes *Tri3* y *Tri12* consiste en un paso inicial de desnaturalización de 2 min a 94°C, seguido de 25 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 52°C, y 1 min a 72°C.

Las reacciones para la amplificación del gen *Tri13* se realizó a partir de 50 ng de ADN fúngico en un volumen total de 25 μ L que contiene 1.5X PCR buffer (Nzytech), 2 mM $MgCl_2$, 0.2 mM de cada dNTPs, 0.75 U de ADN Taq polymerase (Nzytech), y 0.4 mM de cada cebador. La amplificación de PCR del gen *Tri13* consiste en una primer paso de desnaturalización de 2 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 65°C, y 30 s a 72°C. Todos los productos de amplificación se revelaron en gel de

agarosa al 1.5% (g/v), se corrieron en presencia de un marcador de peso molecular de ADN de 100-bp (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA).

Tabla 2-1. Secuencias de cebadores utilizados para la caracterización genotípica mediante PCR múltiple (*Tri3*, *Tri12*) y PCR (*Tri13*)

GEN	CEBADOR	SECUENCIA
<i>Tri 3</i>	3CON	TGGCAAAGACTGGTTCAC
	3NA	GTGCACAGAATATACGAGC
	3D15A	ACTGACCCAAGCTGCCATC
	3D3A	CGCATTGGCTAACACATG
<i>Tri 12</i>	12CON	CATGAGCATGGTGATGTC
	12NF	TCTCCTCGTTGTATCTGG
	12-15F	TACAGCGGTCGCAACTTC
	12-3F	CTTTGGCAAGCCCGTGCA
<i>Tri 13</i>	Tri13F	CATCATGAGACTTGTKCRAGTTTGGG
	Tri13DONR	GCTAGATCGATTGTTGCATTGAG

CARACTERIZACIÓN ECOFISIOLÓGICA

Del total de aislamientos identificados como *F. verticillioides*, *F. graminearum* s. s. y *A. flavus*, se seleccionaron 3 cepas toxigénicas de cada especie para determinar el efecto de la actividad hídrica (aw) y la temperatura sobre el crecimiento y la producción de micotoxinas. Con base en la literatura, se seleccionaron tres actividades hídricas y tres temperaturas dentro de los rangos óptimos de crecimiento y de producción de toxinas de las tres especies estudiadas. Los niveles de actividad hídrica seleccionados fueron 0.950, 0.980 y 0.995, y las temperaturas fueron 15°C, 25°C y 30°C. Las cepas seleccionadas se hicieron crecer sobre granos de maíz previamente esterilizados por radiación gamma (12 kGy) ajustados a las diferentes actividades hídricas. Para esto, se les adicionó a los granos diferentes volúmenes de agua estéril calculados tomando como base la curva de absorción de humedad diseñada por Samsudin (2015), para maíz (Figura 2-1).

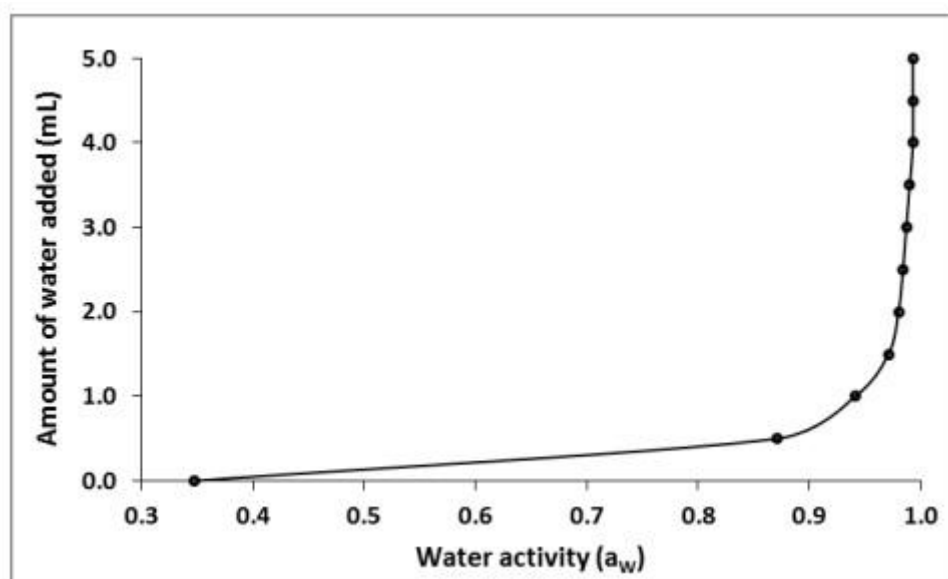


Figura 2-1. Curva de absorción de humedad para 5 g de granos de maíz, tomada de Samsudin 2015.

Los granos hidratados se equilibraron a 4°C durante 72 hs y se midieron los niveles de actividad hídrica utilizando un medidor automático Aqualab Series 3. Para lograr los niveles de actividad hídrica deseados se adicionaron distintos volúmenes de agua esteril a placas de petri conteniendo 20 g de maíz esteril (Figura 2-1) y se incubaron en recipientes herméticos en presencia de una mezcla de glicerol:agua ajustada a cada actividad hídrica para generar una atmósfera controlada (Tabla 2-2).

Tabla 2-2. Volúmenes de glicerol:agua adicionados a granos de maíz para cada actividad hídrica (a_w)

a_w	0.995	0.980	0.950
glicerol:agua	2.2 ml/97.8 ml	7.3 ml/ 92.7ml	18.3 ml/ 81.7ml
maíz (20 g)	7.5 ml	5.0 ml	3.0 ml

Una vez alcanzados los niveles de actividad hídrica objetivo en las placas conteniendo los granos de maíz, en el centro de cada placa se colocó un disco de micelio de medio Papa Dextrosa Agar (PDA) de 0.8 mm de diámetro obtenido del margen de una colonia de 5-7 días de cada cepa a estudiar. Los granos de maíz fueron incubados a cada actividad hídrica (0.95, 0.98 y 0.995) y en las distintas temperaturas seleccionadas (15°C, 25°C y 30°C) durante 28 días. Se realizaron tres réplicas por cada tratamiento.

Se midió diariamente el diámetro de las colonias en dos direcciones perpendiculares hasta que la colonia alcanzó el margen de la placa (8.5 cm). Los diámetros de las colonias se analizaron en relación al tiempo (días) y se realizó una regresión lineal para obtener la velocidad de crecimiento de las cepas (mm/día). Cumplidos los 28 días de incubación, las placas fueron retiradas de la incubación y se procedió al análisis de las micotoxinas correspondientes para cada especie mediante HPLC, siguiendo las mismas metodologías utilizadas para el análisis de toxinas en muestras de maíz (AOAC).

Para el análisis de los datos obtenidos en el estudio ecofisiológico se utilizaron los programas SigmaPlot V.15, e Infostat (Di Rienzo et al. 2020). La significancia estadística de las variables analizadas (aw y temperatura) se analizó mediante un análisis de ANOVA de dos variables con significancia estadística si p -valor $<0,0001$. Se construyeron modelos gráficos de superficie en 3 dimensiones que permiten predecir, en función de la temperatura y la actividad hídrica, patrones de crecimiento y síntesis de micotoxinas de las especies estudiadas. Para analizar si existe una predominancia en la incidencia de los factores estudiados (T y aw), se realizó un análisis de varianza de dos vías con la prueba de igual varianza de Tukey.

Resultados

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD TOXIGÉNICA

Fusarium verticillioides

Al 73% de los aislamientos (n=84) identificados molecularmente como *F. verticillioides* se les estudió la capacidad de producir fumonisinas, 48 cepas pertenecieron al 2018 y 36 al 2019. La FB1 fue producida por el 69% (n=33) de las cepas pertenecientes al 2018 y en el 75% (n=27) de las cepas de 2019, la proporción de cepas productoras de FB2 fue de 31% y 33% para cada uno de los dos años estudiados, respectivamente (n=15 de 2018, n=12 de 2019) (Figura 2-2).

Complejo *Fusarium graminearum*

La producción de DON, NIV y ZEA fue estudiada en el 86% (n=74) de las cepas identificadas como *F. graminearum* s. s. y en el 86% (n=4) de las cepas identificadas como *F. meridionale*. La proporción de cepas de *F. graminearum* s. s. capaces de producir micotoxinas superó el 50% en ambos años estudiados, alcanzando niveles de 70.6% (n=24) y 72.5% (n=29) de cepas productoras de ZEA en 2018 y 2019, respectivamente; 85.3% (n=29) y 85% (n=34) de cepas productoras de DON en cada año de estudio. Por otro lado, las cepas productoras de NIV fueron menos frecuentes, con una proporción de 23.5 % (n=8) y 7.5% (n=3) de cepas productoras en 2018 y 2019, respectivamente (Figura 2-2). Por otro lado, los aislamientos identificados como *F. meridionale*, presentaron un perfil toxicogénico

diferente en comparación con las cepas *F. graminearum* s. s., con 50% (n=2) de cepas productoras de NIV en 2018 y ninguna cepa productora de ZEA o DON.

Aspergillus flavus

Del total de cepas de *A. flavus* obtenidas en ambos años de estudio (n=121), se estudió la capacidad de producir micotoxinas al 58% (n=70) de las cepas seleccionadas de forma representativa del total de muestras analizadas donde se obtuvieron cepas de esta especie. Se determinó el potencial de producir tanto aflatoxinas como ACP en el 52% (n=43) de cepas de 2018 y en el 69% (n=27) de las obtenidas en 2019. Las cepas no toxigénicas predominaron en ambos años, correspondiendo al 67% (n=29) en 2018 y 59% (n=16) en 2019. Dentro de las cepas toxigénicas, la principal micotoxina sintetizada fue el ACP en ambos años de estudio, con 28% (n=12) y 41% (n=11) de cepas productoras en 2018 y 2019, respectivamente. Dentro de las aflatoxinas, en 2018 se observaron igual porcentaje de cepas productoras de aflatoxinas B1 y B2 (16%; n=7), mientras que en 2019 predominaron las cepas productoras de AFB1 (26%; n=7), seguida de las productoras de aflatoxina B2 (18.5%; n= 5). No se encontraron cepas capaces de producir aflatoxinas del tipo G en ninguno de los años de estudio.

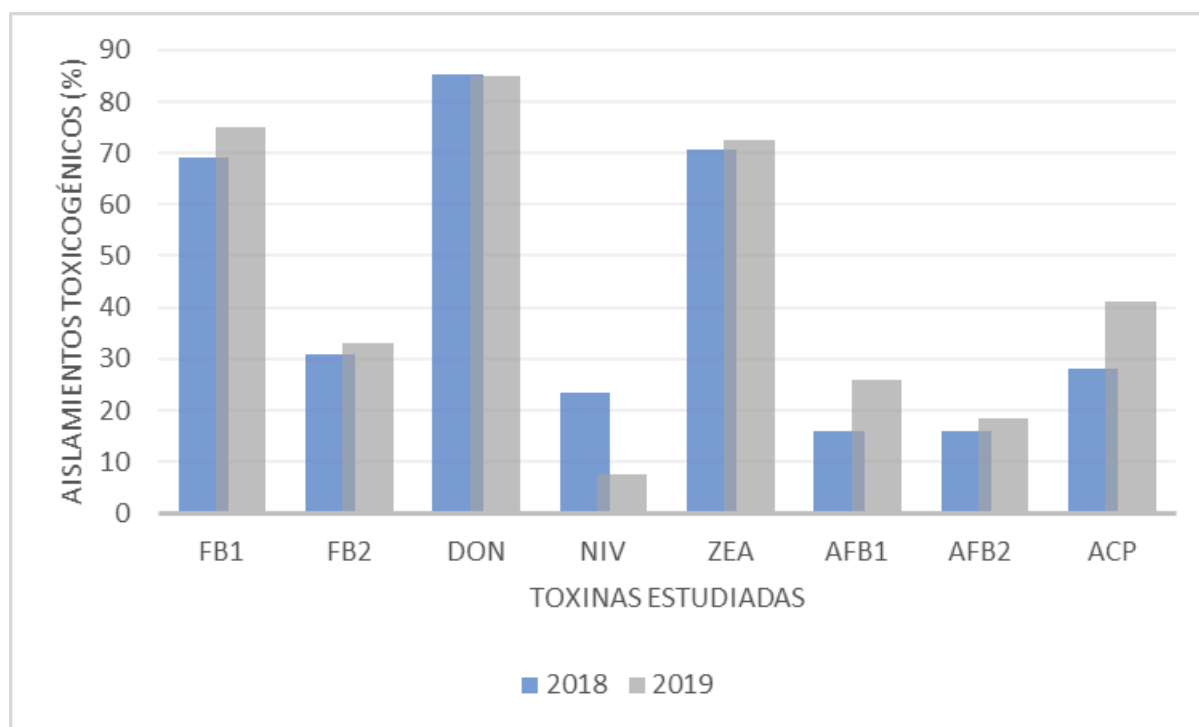


Figura 2-2. Porcentaje de aislamientos toxicogénicos identificados como *F. verticillioides* (FB1 y FB2), *F. graminearum* s. s. (DON, NIV y ZEA) y *A. flavus* (AFB1, AFB2 y ACP) en ambos años de estudio.

DETERMINACIÓN DE GENOTIPOS VINCULADOS A LA SÍNTESIS DE TRICOTECENOS

Del total de aislamientos identificados como *F. graminearum* s. s. se les determinó el genotipo vinculado a la síntesis de tricotecenos a un total de 79 cepas, de las cuales 85% (n=29) corresponden a los aislamientos obtenidos en el 2018 y 96% (n=50) de los aislamientos del 2019. Además, se determinaron los genotipos para el total de aislamientos identificados como *F. meridionale*. El total de cepas identificadas como *F. graminearum* s. s. pertenecen al genotipo DON / 15 Ac-DON. Mientras que el total de cepas de *F. meridionale* (n=6) presentaron genotipo NIV/DON (Tabla 2-3).

Tabla 2-3. Distribución (%) de genotipos de los aislamientos de FGSC para los genes *Tri 3*, *Tri 12* y *Tri 13*

	<i>Tri 3</i>			<i>Tri 12</i>			<i>Tri 13</i>
	3 ADON	15 ADON	NIV	3 ADON	15 ADON	NIV	DON
<i>F. graminearum</i>	-	100%	-	-	100%	-	100%
<i>F. meridionale</i>	-	-	100%	-	-	100%	100%
<i>F. pseudograminearum</i>	-	100%	-	-	100%	-	100%
<i>F. armeniacum</i>	-	100%	-	-	100%	-	100%

CARACTERIZACIÓN ECOFISIOLÓGICA

Se analizaron los resultados obtenidos en base al promedio de las tres cepas estudiadas, se pudo determinar que para todas las especies estudiadas, el crecimiento fue afectado por ambas variables (aw y temperatura), observándose variaciones estadísticamente significativas entre todas las condiciones estudiadas ($p<0,05$) (Figura 2-3). Las especies de *Fusarium* presentaron una menor velocidad de crecimiento a una temperatura de 15°C, mientras que *A. flavus* no presentó crecimiento a la temperatura mencionada. También se pudo determinar que *A. flavus* presenta una velocidad de crecimiento mayor en comparación con ambas especies de *Fusarium*. Asimismo, se obtuvieron para cada especie los niveles óptimos y sub-óptimos de crecimiento y producción de micotoxinas.

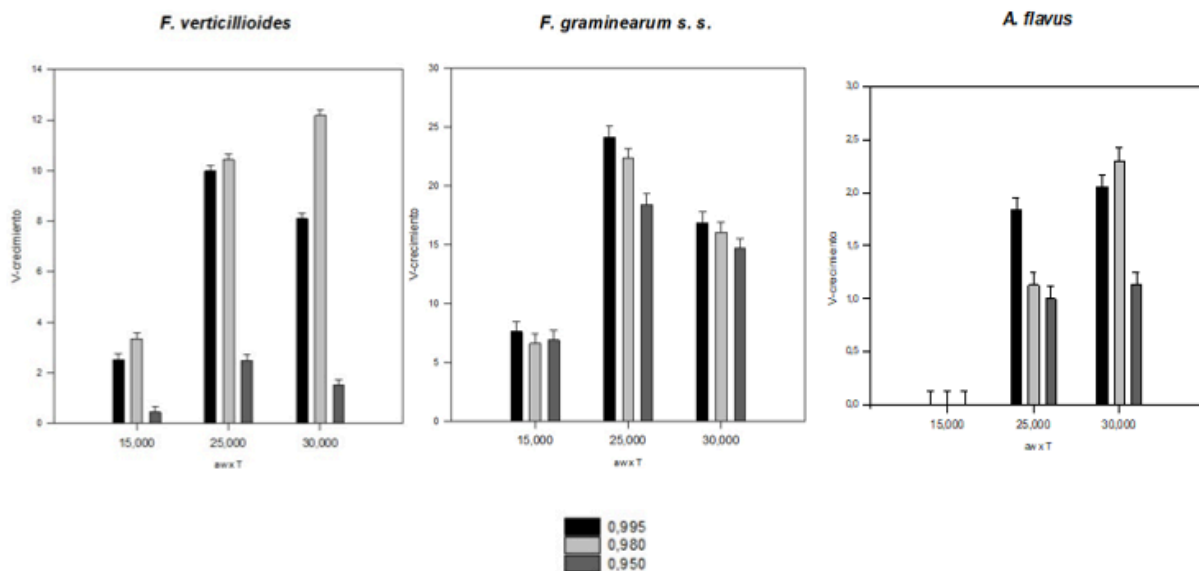


Figura 2-3. Efecto de la temperatura y actividad hídrica sobre la velocidad de crecimiento (mm/día) para las especies de *F. verticillioides*, *F. graminearum s. s.* y *A. flavus*

Fusarium verticillioides

Para *F. verticillioides* se pudo determinar que tanto la temperatura como la actividad hídrica influyen estadísticamente en el crecimiento ($p < 0,001$), siendo discretamente más influyentes las variaciones en la aw (ANOVA - test F aw: 809,710; T: 539,359). En *F. verticillioides* se observó una velocidad de crecimiento máxima a 0.97-0.98 y 29-30°C y una producción máxima de FB1 y FB2 a 0.995 y 23°C durante el crecimiento en granos de maíz (Figura 2-4). Se observó que tanto la actividad hídrica como la temperatura son factores influyentes estadísticamente en la producción de FB2, siendo discretamente más significativas las variaciones de temperatura (ANOVA - test F aw 10,989; T: 16,200). Sin embargo, ninguno de los factores estudiados tiene significancia estadística en la producción de FB1.

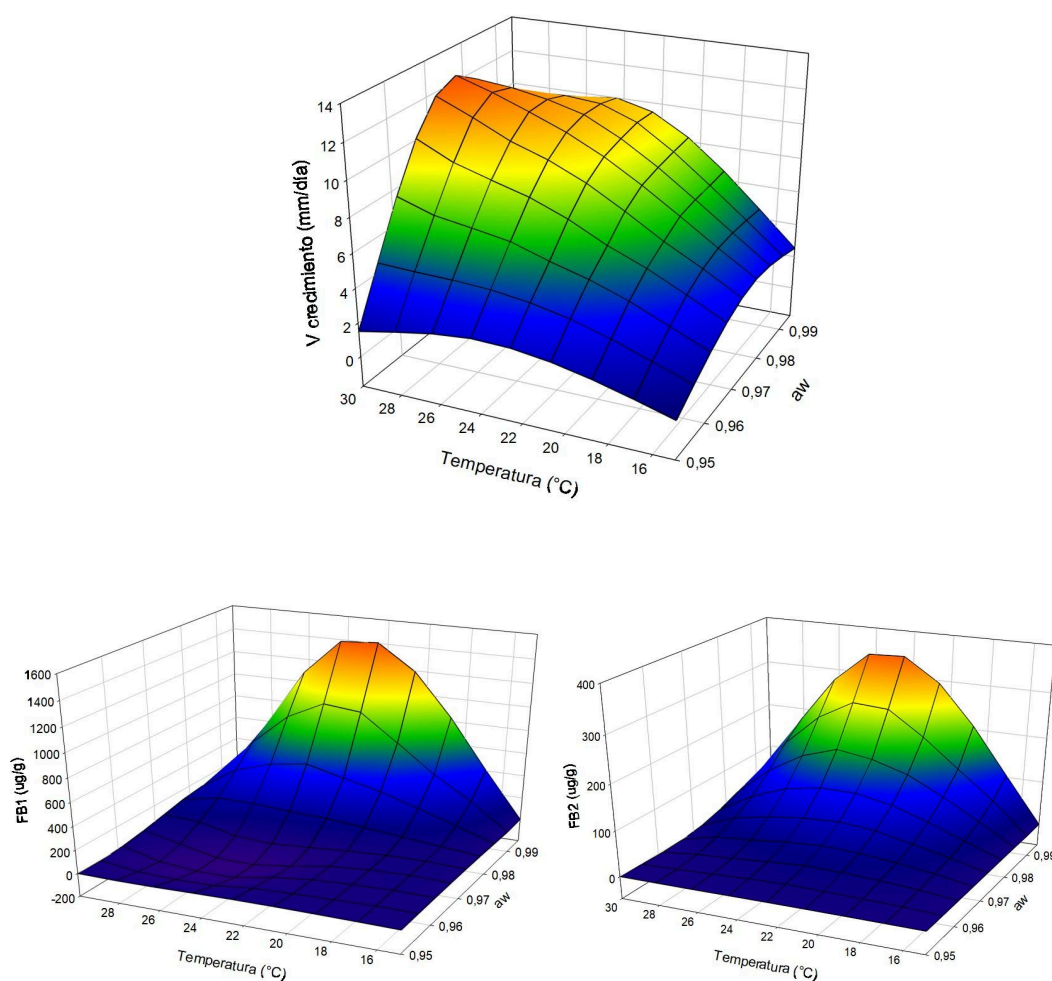


Figura 2-4. Mapa de calor sobre el efecto de diferentes actividades hídricas y temperaturas sobre la velocidad de crecimiento y la producción de FB1 y FB2 por *F. verticillioides*.

***Fusarium graminearum* s. s.**

Para *F. graminearum* se pudo determinar que únicamente la temperatura influye estadísticamente en el crecimiento ($p < 0,001$), siendo el efecto de las variaciones de aw no significativas a las temperaturas analizadas. Las condiciones óptimas de crecimiento se observaron a una temperatura de 24°C y aw de 0.995 (Figura 2-5). En cuanto a la síntesis de toxinas, se vio que únicamente para la síntesis de la ZEA la temperatura es el factor con significancia estadística en su producción ($p < 0,001$). Para la síntesis de DON, como para el acetilado 3-AcDON se observó un comportamiento bimodal, con condiciones óptimas de producción de ambas toxinas a 25°C y aw de 0.95 y un segundo pico en la síntesis de DON a 30°C de temperatura y 0.998 de aw, mientras que para 3-AcDON el segundo pico se observó a 30°C con aw de 0.98. Para 15-AcDON los máximos de producción se observan a 25°C de

temperatura y aw de 0.95. Para la ZEA las condiciones óptimas de síntesis se observaron a una temperatura de 25°C y 0.98 de aw (Figura 2-5).

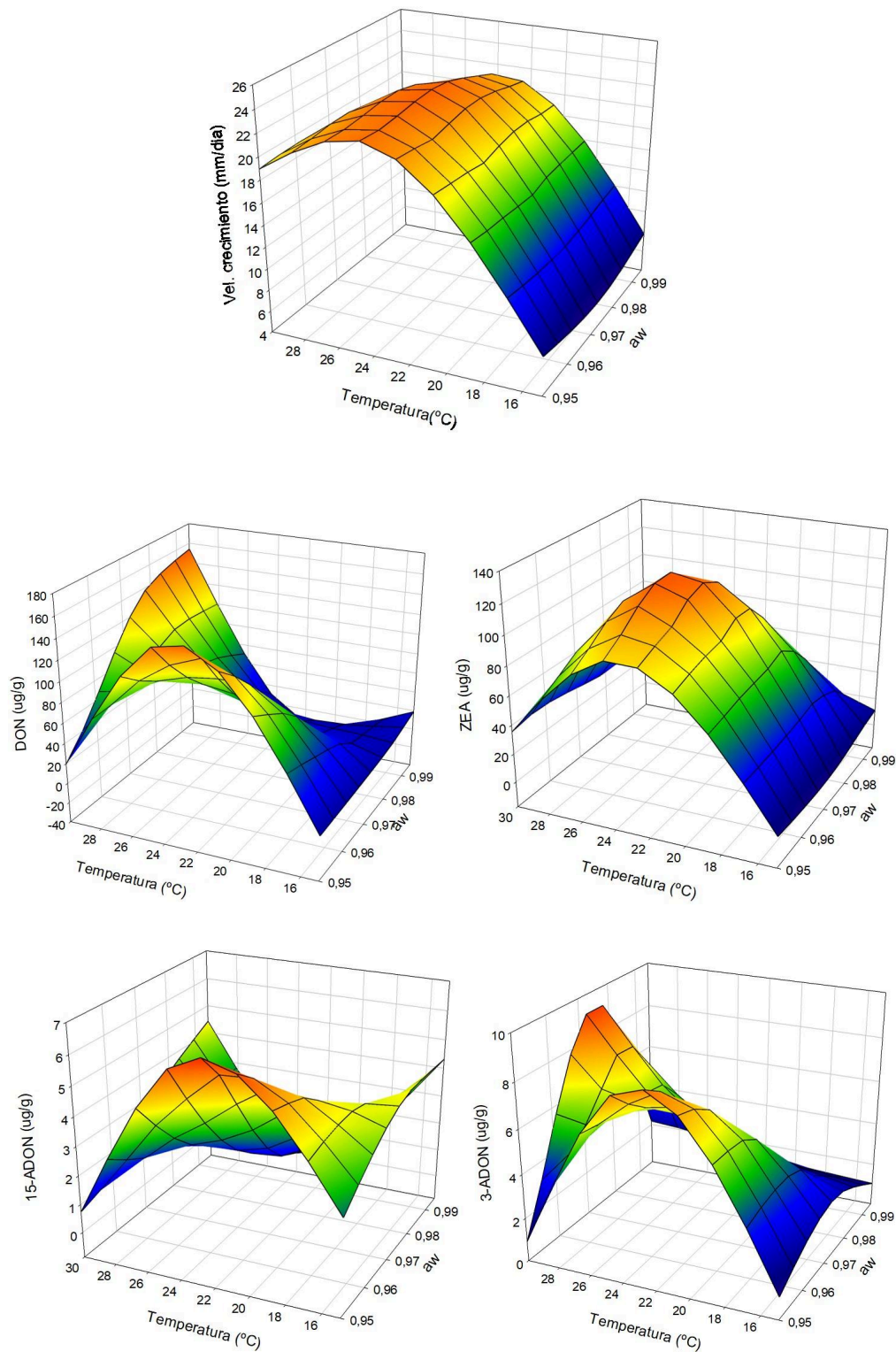


Figura 2-5. Mapa de calor sobre el efecto de diferentes actividades hídricas y temperaturas sobre la velocidad de crecimiento y la producción de DON, ZEA, 15-AcDON Y 3-AcDON por *F. graminearum* s. s..

Aspergillus flavus

En el estudio de *A. flavus* se pudo establecer que únicamente las variaciones en los niveles de temperatura tiene influencia estadística cuando se lo compara con la a_w , tanto en el crecimiento ($p < 0,001$) como en la síntesis de AFB1 ($p < 0,001$). Observándose condiciones óptimas de crecimiento a 30°C y niveles de a_w de 0.98 (Figura 2-6). En cuanto a la síntesis de aflatoxina B1, las condiciones óptimas para su síntesis se observaron a temperaturas de 25°C y niveles bajos de actividad hídrica (0.95) (Figura 2-6).

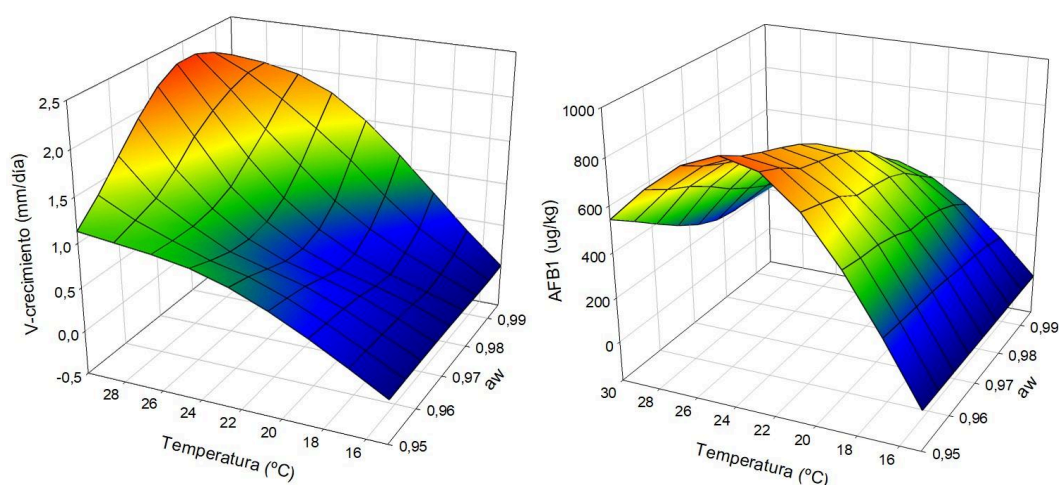


Figura 2-6. Mapa de calor sobre el efecto de diferentes actividades hídricas y temperaturas sobre la velocidad de crecimiento y la producción de AFB1 por *A. flavus*.

Discusión

En este trabajo se evidenció que la mayoría (70%) de las cepas de *F. verticillioides* asociadas a granos de maíz en nuestro país son productoras de fumonisinas, principalmente FB1. En base a análisis filogenéticos se plantea que existen al menos dos linajes de esta especie, en el que uno correspondería a una población importante productora de fumonisinas con una amplia distribución geográfica, amplias preferencias de huésped (principalmente cereales), que muestra variabilidad y mayor incidencia de reproducción sexual, y una segunda población menor, no productora de fumonisinas, con preferencia de huésped restringida (banana), con baja variabilidad y estrategia reproductiva asexual (Mirete et al. 2004). Considerando la alta incidencia de cepas toxicogénicas de esta especie, vinculada a la alta prevalencia de esta especie en maíz, y la presencia de elevadas concentraciones de fumonisinas en granos de maíz encontradas en este trabajo, se puede inferir que las cepas encontradas corresponden al linaje asociado a reproducción sexual. Asimismo, esto

configura un riesgo para la salud humana y animal vinculado a los altos niveles de contaminación con toxinas encontrados. Si bien es importante tener en cuenta que la producción de fumonisinas es muy variable entre las distintas cepas y que las condiciones ambientales son determinantes en su producción, los test de toxicidad indican que las fumonisinas son capaces de causar efectos adversos en una gran variedad de especies animales, pudiendo generar síntomas a partir de niveles de 5000 - 10000 ug/kg de FB1 en alimentos, si bien los cambios fisiológicos ocurrirían a concentraciones mayores (Munkvold y Desjardins, 1997).

En relación al perfil de micotoxinas producidas por *F. graminearum* s. s., DON, fue la principal toxina producida, seguida de ZEA. Otros trabajos realizados en América del Sur en relación a esta especie contaminando diferentes cultivos, también demostraron que DON era la principal toxina producida (Del Ponte et al., 2022). Por otra parte, es de destacar la alta proporción de cepas productoras de ZEA, y a pesar de que hay pocos estudios en relación al potencial de cepas de *F. graminearum* s. s. de producir esta toxina, es frecuente la contaminación con esta toxina en diferentes cultivos como el maíz (Salay y Mercadante, 2002; Maragos, 2010). Asimismo, la alta proporción de cepas con el potencial de producir ZEA podrían representar un riesgo para la salud tanto humana como animal. Por otro lado, si bien no se encontraron niveles significativos de NIV en las muestras y el porcentaje de cepas de *F. graminearum* s. s productoras de NIV *in vitro* fue bajo en ambos años de estudio, monitorizar la presencia de especies capaces de producirla es de gran interés considerando que es sabido que el NIV es más tóxico que DON en la mayoría de órganos y sistemas animales (Desjardins, 2006, Luongo et al., 2008, Cheat et al., 2015), por lo que la presencia de cepas capaces de producirlo implica un riesgo potencial para los consumidores finales y la necesidad de desarrollar estrategias para su control. Por otro lado, todas las cepas de *F. graminearum* s. s. analizadas en este trabajo presentaron genotipo DON - 15-AcDON pero ninguna presentó genotipo NIV ni 3 AcDON. Esta discordancia entre los quimiotipos y los genotipos también ha sido previamente reportada por otros autores (Beccari et al., 2017), lo que demuestra la necesidad del estudio de los quimiotipos para poder predecir el verdadero riesgo potencial en relación a la presencia de micotoxinas en los distintos sustratos. Por otro lado, los genotipos encontrados en este trabajo concuerda con trabajos previos realizados en aislamientos provenientes de distintos cultivos de nuestro país (Umpierrez et al., 2013; Pan et al., 2013, 2016; Garmendia et al., 2018), donde también se observó la prevalencia del genotipo DON-15-AcDON en cepas de *F. graminearum* s. s., lo que demuestra la estabilidad de este genotipo, a pesar del paso del tiempo y la variedad de cultivos. Así mismo, en los últimos años, trabajos realizados en Europa, han reportado la prevalencia del genotipo 15-AcDON en trigo y maíz, con una distribución global en cereales de hasta 83% (Pasquali et al., 2016).

Las cepas de *Fusarium meridionale* estudiadas fueron no toxigénicas o productoras de NIV. Aunque en baja frecuencia, la presencia de cepas de *F. meridionale* potencialmente productoras de NIV indican un riesgo potencial de contaminación de granos de maíz con esta toxinas, sumado a la presencia de cepas de *F. graminearum* s. s. que son capaces o potencialmente capaces de producirla. La presencia de hongos de esta especie, en baja frecuencia, podría explicar la contaminación, a niveles bajos, con NIV en las muestras de maíz analizadas. Considerando que, si bien ninguna cepa de *F. graminearum* s. s. presentó el quimiotipo NIV, algunas fueron capaces de sintetizar esta toxina en el estudio de capacidad toxicogénica *in vitro*.

En relación a los resultados obtenidos del estudio de cepas de *A. flavus*, el alto porcentaje de cepas no toxigénicas ya había sido reportado en trabajos previos en nuestro país (del Palacio y Pan, 2020) en cepas asociadas a trigo y sorgo, así como también el alto porcentaje de cepas productoras de ACP. En este trabajo, si bien se detectó la presencia de aflatoxinas en un 37% de las muestras analizadas, la baja presencia de cepas toxigénicas se correlacionó con los bajos niveles de contaminación encontrados en las muestras de maíz analizadas, no superando concentraciones de 31,1 µg/Kg para AFB1. Así mismo, si bien se detectaron cepas capaces de sintetizar AFB2 en el estudio *in vitro*, no se detectó la presencia de esta toxina en las muestras de maíz, en cambio se detectó presencia de AFG1 en una de las muestras de maíz analizadas sin haberse identificado cepas capaces de sintetizarla *in vitro*. A nivel mundial, varios trabajos realizados en distintas partes del mundo también han reportado altos porcentajes de cepas no toxigénicas de *A. flavus* en trigo, sorgo, maíz, arroz y soja (Razzaghi-Abyaneh et al., 2006; Mauro et al. 2013; Tran-Dinh et al., 2014; Katsurayama et al. 2018). Se ha establecido que la alta prevalencia de cepas no toxicogénicas en los cultivos podría estar determinada por una mayor capacidad de las cepas no toxicogénicas de esporulación, favoreciendo así la colonización y dispersión de estas cepas en los distintos cultivos. A su vez, la síntesis de micotoxinas implica mayores requerimientos nutricionales que irían en detrimento de la capacidad reproductiva de estas cepas manifestándose con niveles reducidos de esporulación en cepas toxicogénicas (Mehl y Cotty, 2010). Esto podría explicar la alta prevalencia de las no toxicogénicas respecto a las cepas productoras de micotoxinas, así como también puede ser un aspecto importante del porqué del éxito de las cepas no toxicogénicas en el control biológico de la contaminación por cepas toxicogénicas.

Además de las aflatoxinas, *A. flavus* es capaz de producir ACP, un ácido indol-tetratómico tóxico para una gran variedad de animales y humanos (Chang et al. 2009). En este trabajo la mayoría de cepas toxigénicas fueron productoras de ACP. Como se menciona previamente, resultados similares han sido observados en nuestro país en cepas de trigo y sorgo, donde el porcentaje de cepas productoras de ACP y de aflatoxinas fue prácticamente el mismo (del Palacio y Pan, 2020), además de otros

trabajos en los que también se ha reportado una alta presencia de cepas de *A. flavus* productoras de ACP aisladas de maíz (Resnik et al., 1996; Razzaghi-Abyaneh et al., 2006), así como también en otros sustratos (Vaamonde et al., 2003; dos Santos-Ciscon et al., 2019). Debido a la alta prevalencia de cepas productoras de ACP en nuestro país, asociadas a diferentes cultivos, sería de interés evaluar las condiciones que favorecen su producción, los posibles efectos de la co-ocurrencia con aflatoxinas como así también evaluar si es necesario considerar a esta micotoxina en los productos alimentarios como medida sanitaria para su consumo. Si bien es sabido que la presencia de cepas toxicogénicas no asegura la síntesis de toxinas en el sustrato, la presencia de cepas potencialmente productoras como contaminantes naturales de los granos debe ser considerado un factor de riesgo y plantea la necesidad de realizar un monitoreo continuo acerca de la presencia de aflatoxinas y ACP de manera de establecer el riesgo de contaminación existente. Si bien en nuestro país existen regulaciones que establecen límites de aflatoxinas en granos de maíz y derivados, no es así para el ACP.

Se determinó además las características ecofisiológicas de poblaciones fúngicas locales y de especies aún no estudiadas en el país. Se evidenció que tanto la temperatura como la actividad hídrica son factores determinantes tanto en el crecimiento como en la síntesis de toxinas de estas especies, siendo en general la temperatura el principal factor. Asimismo, se determinó que las condiciones menos favorables para el crecimiento son a bajos niveles de aw y temperatura. Tanto *F. verticillioides* como *A. flavus* presentan mayor crecimiento a temperaturas y aw elevadas, mientras que *F. graminearum* s. s. crece mejor a temperaturas menores (25°C). Las condiciones climáticas de nuestro país, durante los meses de verano muestran en los últimos años una tendencia al aumento en las precipitaciones (Barreiro et al. 2021) y temperaturas entre 25- 30°C (INUMET, 2022) con variaciones durante la noche. Considerando que la temperatura es el principal determinante tanto en el crecimiento como en la síntesis de toxinas y que el maíz pertenece a los cultivos de verano, es de esperar la presencia de estas especies como contaminantes del cultivo, así como también la prevalencia de *F. verticillioides* respecto a *F. graminearum* s. s.. Asimismo, se lograron desarrollar modelos que permiten interpretar la interacción entre el comportamiento de especies fúngicas nativas y factores ambientales como la actividad hídrica y temperatura. Disponer de estos modelos permite conocer las condiciones óptimas y marginales para el crecimiento y producción de micotoxinas para las especies fúngicas toxicogénicas estudiadas en este trabajo, lo cual es muy útil para determinar los factores de riesgo durante la cosecha y el manejo poscosecha de los granos. En general, los resultados asociados a las condiciones de temperatura y aw que favorecen el crecimiento de las especies estudiadas, son coincidentes con los resultados presentes en la bibliografía. Sin embargo, si bien algunos autores plantean que bajos niveles de actividad hídrica (0.93 - 0.95 aw) y temperaturas no tan elevadas (25 - 30°C) han demostrado ser las condiciones óptimas para la síntesis

de FB1 (Marín et al., 2004, Fumero et al., 2016), estos resultados contrastan con los obtenidos en este trabajo en el que los requerimientos de aw para la síntesis de FB1 como de FB2 serían más elevados (0.99). Asimismo, para la síntesis de aflatoxinas se ha reportado que la producción máxima de aflatoxina ocurre en rangos de actividad hídrica comprendidos entre 0.95 y 0.99 y a una temperatura óptima de 33°C (Sanchis y Magan, 2004; Giorni et al., 2011; Abdel-Hadi et al., 2012; Battilani et al., 2013), en nuestro trabajo la síntesis máxima de esta toxina se evidenció a temperaturas un poco más bajas, cercanas a los 25°C. Si bien existen múltiples estudios de las características ecofisiológicas de las especies aquí estudiadas realizados en diversas partes del mundo, conocer las características ecofisiológicas de las especies de nuestro país nos permite evidenciar probables adaptaciones a las condiciones climáticas que aquí ocurren. Esto nos ayuda en el desarrollo de estrategias de manejo para minimizar la contaminación con patógenos y sus micotoxinas en nuestros cultivos.

Bibliografía

- Abdel-Hadi, A., Schmidt-Heydt, M., Parra, R., Geisen, R., Magan, N., 2012. A systems approach to model the relationship between aflatoxin gene cluster expression, environmental factors, growth and toxin production by *Aspergillus flavus*. J. R. Soc. Inter. 9 757–767.
- Alvarez, C., Azcarate, M., Pinto, V., 2009. Toxigenic potential of *Fusarium graminearum sensu stricto* isolates from wheat in Argentina. International Journal of Food Microbiology, 135(2), 131-135.
- Aoki, T., Ward, T., Kistler, H., O'Donnell, K., 2012. Systematics, phylogeny and trichothecene mycotoxin potential of *Fusarium* head blight cereal pathogens. Mycotoxins. 62:91–102
- Barreiro, M., Arizmendi, F., Díaz, N., Trinchin R., 2021. Análisis del clima y escenarios de cambio y variabilidad climática en Uruguay. CONVENIO PNUD-UDELAR Proyecto URU/18/002 “Integración del enfoque de adaptación en ciudades, infraestructura y ordenamiento territorial en Uruguay”
- Battilani, P., Camardo Leggieri, M., Rossi, V., Giorni, P., 2013. AFLA-maize, a mechanistic model for *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin B1 contamination in maize. Comput. Electron Agric. 94, 38-46
- Beccari, G., Prodi, A., Tini, F., Bonciarelli, U., Onofri, A., Oueslati, S., Limayma, M., Covarelli, L., 2017. Changes in the *Fusarium* head blight complex of malting barley in a three-year field

experiment in Italy. *Toxins*, 9(4), 120.

- Castañares, E., Albuquerque, D., Dinolfo, M., Pinto, V., Patriarca, A., Stenglein, S., 2014. Trichothecene genotypes and production profiles of *Fusarium graminearum* isolates obtained from barley cultivated in Argentina. *International journal of food microbiology*, 179, 57-63.
- Chandler, E., Simpson, D., Thomsett, M., Nicholson, P., 2003. Development of PCR assays to Tri7 and Tri13 trichothecene biosynthetic genes, and characterisation of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62(6), 355-367.
- Chang, P., Ehrlich, K., Fujii, I., 2009. Cyclopiazonic acid biosynthesis of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Toxins*, 1(2), 74-99.
- Cheat, S., Gerez, J. R., Cognié, J., Alassane-Kpembi, I., Bracarense, A., Raymond-Letron, I., Oswal, I., Kolf-Clauw, M., 2015. Nivalenol has a greater impact than deoxynivalenol on pig jejunum mucosa in vitro on explants and in vivo on intestinal loops. *Toxins*, 7(6), 1945-1961.
- Crippin, T., Renaud, J., Sumarah, M., Miller, J., 2019. Comparing genotype and chemotype of *Fusarium graminearum* from cereals in Ontario, Canada. *PLOS ONE* 14(5): e0216735
- del Palacio, A., Pan, D., 2020. Occurrence and toxigenic potential of *Aspergillus* section *Flavi* on wheat and sorghum silages in Uruguay. *Mycology*, 11(2), 147-157.
- Del Ponte, E., Moreira, G., Ward, T., O'Donnell, K., Nicolli, C., Machado, F., Duffeck, M., Alves, K., Tessmann, D., Waalwijk, C., van der Lee, T., Zhang, H., Chulze, S., Stenglein, S., Pan, D., Vero, S., Vaillancourt, L., Schmale III, D., Esker, P., Moretti, A., Logrieco, A., Kistler, C., Bergstrom, G., Viljoen, A., Rose, L., van Coller, G., 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.
- Desjardins, A., 2006. *Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics, and biology. American Phytopathological Society (APS Press).
- Desjardins, A., 2008. Natural product chemistry meets genetics: when is a genotype a chemotype?. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(17), 7587-7592.
- dos Santos-Ciscon, B., van Diepeningen, A., da Cruz Machado, J., Dias, I., Waalwijk, C., 2019. *Aspergillus* species from Brazilian dry beans and their toxigenic potential. *International Journal of Food Microbiology*, 292, 91-100.
- Instituto Uruguayo de Meteorología (INUMET), 2022. Sequía meteorológica en Uruguay 2020-2023.

https://www.inumet.gub.uy/sites/default/files/2023-02/Sequ%C3%ADa_2020%20al%202023

- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C., 2020. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Doohan, F., Brennan, J., Cooke, B., 2003. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. Epidemiology of Mycotoxin Producing Fungi: Under the Aegis of COST Action 835 'Agriculturally Important Toxigenic Fungi 1998–2003', EU project (QLK 1-CT-1998–01380), 755-768.
- Fumero, M., Sulyok, M., Chulze, S., 2016. Ecophysiology of *Fusarium temperatum* isolated from maize in Argentina. Food Additives & Contaminants: Part A, 33(1), 147-156.
- Garmendia, G., Pattarino, L., Negrín, C., Martínez-Silveira, A., Pereyra, S., Ward, T., Vero, S., 2018. Species composition, toxigenic potential and aggressiveness of *Fusarium* isolates causing head blight of barley in Uruguay. Food Microbiology, 76, 426-433.
- Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., Bertuzzi, T., Battilani, P., 2007. Studies on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in northern Italy. Int J Food Microbiol 113, 330–338
- Giorni, P., 2008. Effect of aw and CO2 level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post-harvest. International Journal of Food Microbiology, 122(1–2), 109–113
- Giorni, P., Magan, N., Battilani, P., 2009. Environmental factors modify carbon nutritional patterns and niche overlap between *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* strains from maize. Int. J. Food Microbiol. 130, 213-218.
- Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., Battilani, P., 2011. Growth and aflatoxin production of an Italian strain of *Aspergillus flavus*: influence of ecological factors and nutritional substrates. World Mycotoxin J. 4, 425-432.
- Katsurayama, A., Martins, L., Iamanaka, B., Fungaro, M., Silva, J., Frisvad, J., Pitt, J., Taniwaki, M., 2018. Occurrence of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in Brazilian rice: From field to market. International journal of food microbiology, 266, 213-221.
- Kristensen, R., Mona, T., Kosiak, B., Holst-Jensen, A., 2005. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. Mycological research, 109(2), 173-186.
- Lacey, J., Ramakrishna, N., Hamer, A., Magan, N., Marfleet, I., 1991. Grain fungi. Handbook of applied mycology, 3, 121-177.
- Lahouar, A., Marin, S., Crespo-Sempere, A., Saïd, S., Sanchis, V., 2016. Effects of temperature, water activity and incubation time on fungal growth and aflatoxin B1 production by

toxigenic *Aspergillus flavus* isolates on sorghum seeds. *Revista Argentina de microbiología*, 48(1), 78-85.

- Lee, S., Lee, J., Nam, Y., Lee, S., Ryu, J., Lee, T., 2010. Population structure of *Fusarium graminearum* from maize and rice in 2009 in Korea. *The Plant Pathology Journal*, 26(4), 321-327.
- Luongo, D., De Luna, R., Russo, R., Severino, L., 2008. Effects of four *Fusarium* toxins (fumonisin B1, α -zearalenol, nivalenol and deoxynivalenol) on porcine whole-blood cellular proliferation. *Toxicon*, 52(1), 156-162.
- Magan, N., Aldred, D., 2007. Why do fungi produce mycotoxins?. In *Food Mycology* (pp. 135-148). CRC Press.
- Maragos, C., 2010. Zearalenone occurrence and human exposure. *World Mycotoxin Journal*, 3(4), 369-383.
- Marin, S., Magan, N., Serra, J., Ramos, A., Canela, R., Sanchis, V., 1999. Fumonisin B1 production and growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* on maize, wheat, and barley grain, *Journal of Food Protection*, 64, 921-4.
- Marín, S., Magan, N., Ramos, A., Sanchis, V., 2004. Fumonisin-producing strains of *Fusarium*: a review of their ecophysiology. *Journal of food protection*, 67(8), 1792-1805.
- Marín, P., 2010. Análisis de factores ecofisiológicos que influyen en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de toxinas en especies de " *Fusarium*". Tesis de la Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología III, <https://hdl.handle.net/20.500.14352/47420>
- Mauro, A., Battilani, P., Callicott, K., Giorni, P., Pietri, A., Cotty, P., 2013. Structure of an *Aspergillus flavus* population from maize kernels in northern Italy. *International journal of food microbiology*, 162(1), 1-7.
- Mehl, H., Cotty, P., 2010. Variation in competitive ability among isolates of *Aspergillus flavus* from different vegetative compatibility groups during maize infection. *Phytopathology*, 100(2), 150-159.
- Mulè, G., Logrieco, A., Stea, G., Bottalico, A., 1997. Clustering of trichothecene-producing *Fusarium* strains determined from 28S ribosomal DNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(5), 1843-1846.
- Munkvold, G., Desjardins, A., 1997. Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence?. *Plant disease*, 81(6), 556-565.
- Mirete, S., Vázquez, C., Mulè, G., Jurado, M., González-Jaén, M., 2004. Differentiation of *Fusarium verticillioides* from banana fruits by IGS and EF-1 α sequence analyses. In: Mulè, G.,

Bailey, J.A., Cooke, B.M., Logrieco, A. (eds) Molecular Diversity and PCR-detection of Toxigenic *Fusarium* Species and Ochratoxigenic Fungi. Springer, Dordrecht.

- Nielsen, L., Jensen, J., Nielsen, G., Jensen, J., Spliid, N., Thomsen, I., Justesen, A., Collinge, D., Jørgensen, L., 2011. *Fusarium* head blight of cereals in Denmark: species complex and related mycotoxins. *Phytopathology*. 101:960–969.
- 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.
- Pan, D., Mionetto, A., Calero, N., Reynoso, M., Torres, A., Bettucci, L., 2016. Population genetic analysis and trichothecene profiling of *Fusarium graminearum* from wheat in Uruguay.
- Pasquali, M., Beyer, M., Logrieco, A., Audenaert, K., Balmas, V., Basler, R., Anne-Laure, B., Chrprová, J., Czembor, E., Gagkaeva, T., González-Jaén, M., Hofgaard, I., Köycü, N., Hoffmann, L., Lević, J., Marin, P., Miedaner, T., Migheli, Q., Moretti, A., Müller, M., Munaut, F., Parikka, P., Pallez-Barthel, M., Piec, J., Scaufaire, J., Scherm, B., Stanković S., Thrane, U., Uhlig, S., Vanheule, A., Yli-Mattila, T., Vogelgsang, S., 2016. A European database of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* trichothecene genotypes. *Frontiers in microbiology*, 7, 406.
- Prodi, A., Purahong, W., Tonti, S., Salomoni, D., Nipoti, P., Covarelli, L., Pisi, A., 2011. Difference in chemotype composition of *Fusarium graminearum* populations isolated from durum wheat in adjacent areas separated by the Apennines in Northern-Central Italy. *Plant Pathol J*. 27:354–359
- Ramirez, M., Chulze, S., Magan, N., 2004. Impact of environmental factors and fungicides on growth and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentinian wheat. *Crop Protection*, 23(2), 117-125.
- Ramirez, M., 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. *International journal of food microbiology*, 106(3), 291-296.
- Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Allameh, A., Kazeroon-Shiri, A., Ranjbar-Bahadori, S., Mirzahoseini, H., Rezaee, M., 2006. A survey on distribution of *Aspergillus* section *Flavi* in corn field soils in Iran: population patterns based on aflatoxins, cyclopiazonic acid and sclerotia production. *Mycopathologia*, 161, 183-192.

- Resnik, S., González, H., Pacin, A., Viora, M., Caballero, G., Gros, E., 1996. Cyclopiazonic acid and aflatoxins production by *Aspergillus flavus* isolated from Argentinian corn. *Mycotoxin Research*, 12, 61-66.
- Salay, E., Mercadante, A., 2002. Mycotoxins in Brazilian corn for animal feed: occurrence and incentives for the private sector to control the level of contamination. *Food Control*, 13(2), 87-92.
- Sampietro, D., Díaz, C., Gonzalez, V., Vattuone, M., Ploper, L., Catalan, C., Ward, T., 2011. Species diversity and toxigenic potential of *Fusarium graminearum* complex isolates from maize fields in northwest Argentina. *Int J Food Microbiol.*145:359–364
- Samsudin, N., 2015. Potential biocontrol of fumonisin B1 production by *Fusarium verticillioides* under different ecophysiological conditions in maize. Applied Mycology Group Cranfield Soil and Agrifood Institute School of Energy, Environment and Agrifood. PHD THESIS CRANFIELD UNIVERSITY
- Sanchis, V., Magan, N., 2004. Environmental conditions affecting mycotoxins. In: Magan, N., Olsen, M. (Eds.), *Mycotoxins in Food*. Woodhead Publishing, Cambridge, England, pp. 174-189.
- Santin, E., 2008. crecimiento de los hongos toxicogénicos y producción de micotoxinas. En: El libro Azul de Micotoxinas (Ed. Diaz, D.). Nottingham University Press, Nottingham, UK. pp 239-250.
- Scoz, L., Astolfi, P., Reartes, D., Schmale III, D., Moraes, M., Del Ponte, E., 2009. Trichothecene mycotoxin genotypes of *Fusarium graminearum* sensu stricto and *Fusarium meridionale* in wheat from southern Brazil. *Plant Pathology*, 58(2), 344-351.
- Tan, M., Niessen, L., 2003. Analysis of rDNA ITS sequences to determine genetic relationships among, and provide a basis for simplified diagnosis of, *Fusarium* species causing crown rot and head blight of cereals. *Mycological Research* 107, 811–821.
- Tran-Dinh, N., Pitt, J., Markwell, P., 2014. Selection of non-toxigenic strains of *Aspergillus flavus* for biocontrol of aflatoxins in maize in Thailand. *Biocontrol science and Technology*, 24(6), 652-661.
- Umpiérrez-Failache, M., Garmendia, G., Pereyra, S., Rodríguez-Haralambides, A., Ward, T., Vero, S., 2013. Regional differences in species composition and toxigenic potential among *Fusarium* head blight isolates from Uruguay indicate a risk of nivalenol contamination in new wheat production areas. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), 135-140.
- Vaamonde, G., Patriarca, A., Pinto, V., Comerio, R., Degrossi, C., 2003. Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *Flavi* from different substrates in

Argentina. International journal of food microbiology, 88(1), 79-84.

- Ward, T., Bielawski, J., Kistler, H., Sullivan, E., O'Donnell, K., 2002. Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99(14), 9278-9283.
- Ward, T., Clear, R., Rooney, A., O'Donnell, D., Gaba, D., Patrick, S., Starkey, D., Gilbert, J., Geiser, D., Nowicki, T., 2008. An adaptive evolutionary shift in *Fusarium* head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America. Fungal and Genetics Biology 45, 473-484.
- Zhang, J., Li, H., Dang, F., Qu, B., Xu, Y., Zhao, C., Liao, Y., 2007. Determination of the trichothecene mycotoxin chemotypes and associated geographical distribution and phylogenetic species of the *Fusarium graminearum* clade from China. Mycological research, 111(8), 967-975.
- Zhang H, Van der Lee T, Waalwijk C, Chen W, Xu Jin, Xu Jinsheng, Zhang Y, Feng J. 2012. Population analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat in China show a shift to more aggressive isolates. PLoS One, 7(2), 31722.

Capítulo 3.

Análisis *in vitro* del perfil de sensibilidad de las principales especies de *Fusarium* a antifúngicos de uso convencional

Introducción

Los cereales representan uno de los cultivos más importantes ya que constituyen la base de la alimentación humana, siendo el maíz el principal cereal cultivado a nivel mundial desde los últimos 20 años (FAOSTAT, 2023). Sin embargo, bajo condiciones climáticas adecuadas, la contaminación de este cultivo con especies de hongos toxicogénicos causa importantes pérdidas económicas y productivas. Entre las principales especies de hongos toxicogénicos se encuentran *Fusarium* y *Aspergillus*, que puede contaminar al cultivo desde la maduración del grano, y producir múltiples micotoxinas que se pueden acumular en los productos finales (Logrieco et al. 2002; Logrieco et al. 2007). En el presente trabajo se demostró que las principales especies toxicogénicas contaminantes del maíz en nuestro país pertenecen a *F. verticillioides*, *F. graminearum* s.s. y *A. flavus*. Identificándose a las fumonisinas como las principales contaminantes en las muestras analizadas, seguidas de DON y ZEA.

Dado que la contaminación del maíz con hongos toxicogénicos es cada vez más frecuente a nivel mundial, existe una necesidad urgente de poder controlar estos patógenos (Folcher et al. 2009; EFSA 2014). Se han desarrollado múltiples estrategias en este sentido como ser, desarrollo de cultivares híbridos, modificación en prácticas de manejo a campo y el uso de controladores biológicos (Folcher et al. 2009; Mesterhazy et al. 2012, Abdallah et al. 2018). Sin embargo el uso de controladores químicos es aún considerado una herramienta clave en limitar las enfermedades causadas por hongos en los principales cultivos destinados a alimentación. Actualmente es poca la información en relación a la eficacia de los fungicidas para el control fúngico en maíz (Blandino et al. 2004). Al momento no hay tratamientos químicos que permitan el control de enfermedades del maíz causadas por especies de *Fusarium*. Asimismo, los fungicidas no serían suficientes para el control de especies de este género y su eficacia estaría fuertemente influenciada por la presión de la enfermedad (Blandino et al., 2012; Scarpino et al., 2015). También hay que considerar que su uso puede resultar en un aumento significativo de la contaminación del cultivo con micotoxinas (Simpson et al., 2001). El carbendazim es un fungicida de amplio espectro, perteneciente al grupo de los benzimidazoles, capaz de proporcionar un control eficaz de las enfermedades fúngicas en una variedad de cultivos. Su mecanismo de acción consiste en inhibir la mitosis mediante su unión a la β -tubulina generando alteraciones a nivel del ensamblado de los microtúbulos, esencial para la

formación del huso cromático en la división celular, por lo que las células detienen su multiplicación llevando a la detención del crecimiento y muerte (Zhou et al., 2016). Los fungicidas azoles son utilizados para el control de un amplio espectro de patógenos fúngicos de plantas y varios estudios indican que son los más efectivos para el control de especies de *Fusarium* (Pirgozliev et al., 2002; Amarasinghe et al., 2013). Su mecanismo de acción radica en actuar inhibiendo la síntesis de ergosterol mediante la inhibición de la enzima citocromo P450 esterol 14 α - desmetilasa (CYP51), llevando a la pérdida de la integridad de la membrana (Buchenauer, 1987). Sin embargo, la utilización a largo plazo y el uso excesivo de estos compuestos químicos en los diferentes cultivos ha causado la emergencia de patógenos resistentes. Teniendo todo esto en consideración, es de gran importancia el estudio de diferentes fungicidas tanto en ensayos iniciales *in vitro* para luego desarrollar ensayos a campo para valorar los efectos potenciales de su aplicación en el cultivo.

Objetivo

- Evaluar la sensibilidad de las principales especies toxicogénicas de *Fusarium* a fungicidas de uso común

La hipótesis en relación a este objetivo:

- Las especies *Fusarium verticillioides* y *Fusarium graminearum* aisladas de maíz muestran diferentes niveles de sensibilidad a los fungicidas, con variaciones en la eficacia que puede estar asociada al tipo de fungicida utilizado, factores genéticos o a la historia de exposición a fungicidas de estas especies

Materiales y métodos

Se determinó la sensibilidad a fungicidas de las dos especies prevalentes de *Fusarium*, *F. verticillioides* y *F. graminearum* s. s., en base a la metodología descrita por Becher et al. (2010). Se utilizaron dos grupos de fungicidas, los triazoles y los benzimidazoles. Los fungicidas seleccionados pertenecientes al grupo de los triazoles fueron metconazol, tebuconazol y epoxiconazol, mientras que el carbendazim fue el representante utilizado perteneciente al grupo de los benzimidazoles. El ensayo fue realizado sobre un total de 40 cepas, 20 de *F. graminearum* s. s. y 20 de *F. verticillioides*, 10 cepas de cada zafra estudiada (2018 y 2019), todas ellas seleccionadas al azar. Los fungicidas fueron diluidos en dimetilsulfóxido (DMSO) e incorporados al medio Papa Dextrosa Agar (PDA) para lograr concentraciones de 0.25, 0.50, 0.75, 1.5, 3, 6 y 10 mg/L. Se realizaron tres réplicas de cada concentración de fungicida por cepa. Un disco de micelio de 8 mm de diámetro de cada aislamiento tomado de una colonia de 5 días fue colocado en el centro de placas conteniendo PDA con los distintos fungicidas a las concentraciones mencionadas.

Las cepas de *F. verticillioidea* se incubaron durante 7 días a 25 °C en oscuridad, mientras que las cepas de *F. graminearum* s. s. se incubaron durante 5 días en las mismas condiciones.

Los diámetros de las colonias fueron medidos diariamente en dos direcciones perpendiculares. La evaluación se realizó en base al crecimiento radial en las placas conteniendo PDA con diferentes concentraciones de fungicidas, en comparación a placas control que contenían PDA+DMSO (Becher et al., 2010; Tateishi et al., 2010). Se determinó la concentración efectiva de cada fungicida que logró la inhibición del 50% (EC50) del crecimiento micelial de cada cepa. La dosis EC50 se calculó en base al análisis por regresión lineal de los valores de inhibición del crecimiento relativo frente a las concentraciones de fungicida transformadas por logaritmo en base 10 según el modelo Probit (Finney 1952). Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de los valores de EC50 obtenidos para determinar diferencias en sensibilidad entre las diferentes especies (*F. verticillioidea* y *F. graminearum* s. s.), entre los distintos fungicidas y entre las especies para un mismo fungicida. Las medias se compararon utilizando el test de Fisher (LSD) ($\alpha = 0.05$). Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa Infostat (Di Rienzo et al., 2011).

Resultados

Teniendo en consideración el total de cepas de *F. verticillioidea* analizadas (n=20), los valores de EC50 de epoxiconazol estuvieron comprendidos entre 0,002 y 0,107 mg/L con una media de 0,050 mg/L (Figura 3-1). En lo que respecta al carbendazim, el rango de sensibilidad estuvo comprendido entre 0,181 y 0,651 mg/L con un valor de media de 0,410 mg/L (Figura 3-1). Los niveles de EC50 para el tebuconazol estuvieron comprendidos en un rango de 0,040 mg/L a 0,499 mg/L con una media de 0,107 mg/L (Figura 3-1). Finalmente, los valores de EC50 del metconazol estuvieron comprendidos entre 0,009 mg/L y 0,186 mg/L con una media de 0,340 mg/L (Figura 3-1). En la tabla 3-1 se observan los valores de EC50 para cada cepa estudiada de *F. verticillioidea*, puede apreciarse que la cepa A61 fue la que presentó los menores niveles de sensibilidad frente a tebuconazol y metconazol del total de las cepas analizadas, con valores de EC50 de 0,499 y 0,186 mg/L, respectivamente.

Tabla 3-1. Valores de EC50 de las cepas de *F. verticillioides* frente a los diferentes fungicidas estudiados

	<i>F. verticillioides</i>	Origen	epoxiconazol (mg/L)	carbendazim (mg/L)	tebuconazol (mg/L)	metconazol (mg/L)
2018	A1	Florida	0,050	0,367	0,080	0,037
	A46	Rio Negro	0,003	0,387	0,046	0,009
	A52	Rio Negro	0,060	0,433	0,077	0,018
	A54	Paysandú	0,075	0,245	0,095	0,021
	A58	Colonia	0,066	0,382	0,116	0,045
	A61	Durazno	0,091	0,537	0,499	0,186
	A66	Colonia	0,044	0,365	0,065	0,028
	A67	Durazno	0,057	0,417	0,069	0,026
	A68	Colonia	0,047	0,651	0,066	0,032
	A119	Rocha	0,088	0,181	0,111	0,024
2019	A531	Rio Negro	0,061	0,549	0,116	0,023
	A536	Soriano	0,056	0,271	0,120	0,034
	A550	Soriano	0,002	0,504	0,072	0,018
	A562	Colonia	0,037	0,358	0,074	0,019
	A571	Colonia	0,036	0,389	0,057	0,013
	A591	Soriano	0,097	0,508	0,094	0,030
	A595	Soriano	0,005	0,596	0,127	0,049
	A600	Colonia	0,107	0,409	0,112	0,035
	A624	Colonia	0,018	0,215	0,040	0,009
	A760	San José	0,003	0,445	0,113	0,027

En lo que respecta a las cepas de *F. verticillioides*, no se observaron diferencias entre los valores de EC50 exhibidos para el metconazol y el epoxiconazol, sin embargo, el tebuconazol demostró ser el menos efectivo, mostrando diferencias significativas ($p=0.0029$ y $p=0.0155$) cuando se lo comparó con metconazol y epoxiconazol. Asimismo, los aislamientos mostraron ser menos sensibles a la presencia de carbendazim ($p < 0.0001$).

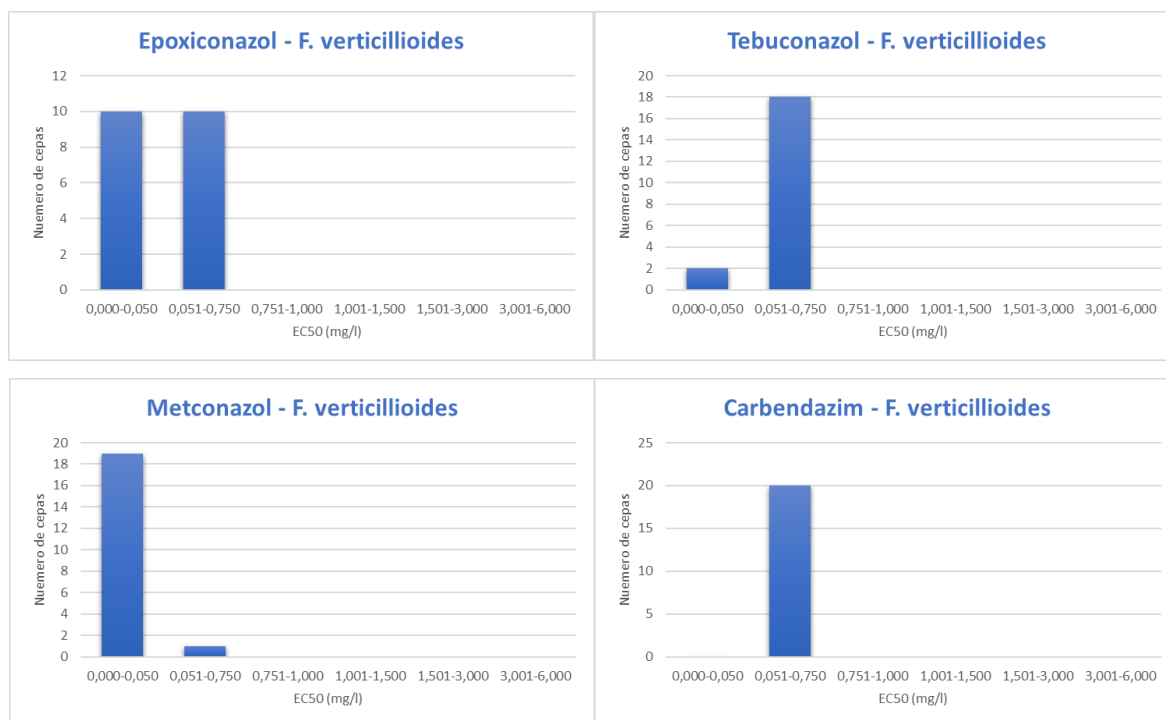


Figura 3-1. Rangos de EC50 de los fungicidas analizados para las cepas de *F. verticillioides* estudiadas

De las cepas de *F. graminearum* s.s estudiadas (n=20), los valores de EC50 correspondientes al grupo de los triazoles, se vio una variación entre 0,217 mg/L y 4,544 mg/L con una media de 1,565 mg/L para el epoxiconazol, 0,001 mg/L a 0,710 mg/L con una media de 0,156 mg/L para el metconazol y 0,040 mg/L a 1,788 mg/L con una media de 0,974 mg/L para el tebuconazol (Tabla 3-2). Por otro lado, los valores de EC50 para el carbendazim estuvieron comprendidos entre 0,130 mg/L y 1,145 mg/L con una media de 0,649 mg/L (Tabla 3-2).

Tabla 3-2. Valores de EC50 de las cepas de *F. graminearum* s. s. frente a los diferentes fungicidas estudiados

	<i>F. graminearum</i> s. s.	Origen	epoxiconazol (mg/L)	metconazol (mg/L)	tebuconazol (mg/L)	carbendazim (mg/L)
2018	A211	Colonia	0,217	0,001	0,040	0,440
	A364	Colonia	0,930	0,166	0,995	0,130
	A367	Colonia	0,558	0,026	0,858	0,649
	A368	Colonia	0,958	0,132	0,748	0,175
	A451	Soriano	0,521	0,074	0,392	0,760
	A461	Colonia	1,439	0,045	0,247	0,690
	A480	Colonia	0,605	0,023	0,140	0,473
	A484	Colonia	1,738	0,088	1,052	0,423
	A489	Soriano	0,499	0,077	0,431	0,750
	A511	Colonia	1,596	0,343	1,578	0,897
2019	A539	Soriano	3,939	0,126	0,471	0,712
	A560	Soriano	4,544	0,403	4,658	1,087
	A545	Soriano	2,155	0,710	1,656	1,145
	A638	Colonia	1,050	0,110	0,433	0,478
	A647	Soriano	0,703	0,032	0,456	0,613
	A650	Soriano	2,934	0,177	1,120	1,166
	A673	Colonia	1,134	0,098	0,642	0,496
	A676	Colonia	3,085	0,179	1,350	0,708
	A752	Soriano	1,830	0,265	1,788	0,839
	A754	Soriano	0,860	0,042	0,416	0,346

En relación con el epoxiconazol, las cepas A539 y A560 fueron las que mostraron menor sensibilidad, con valores de EC50 de 3,939 y 4,544 mg/L, respectivamente (Tabla 3-2). Además, las cepas A545 y A560 mostraron los menores niveles de sensibilidad al metconazol con valores de 0,710 y 0,403 mg/L, respectivamente (Tabla 3-2).

Por otro lado, las cepas de *F. graminearum* s. s. mostraron ser más sensibles al metconazol cuando se lo comparó con el resto de los fungicidas analizados ($p < 0.005$) y el epoxiconazol fue el fungicida menos eficiente en el control de crecimiento de las cepas de *F. graminearum* s. s. ($p=0.0202$, $p<0.0001$, $p=0.0045$ para tebuconazol, metconazol y carbendazim, respectivamente) (Figura 3-2).

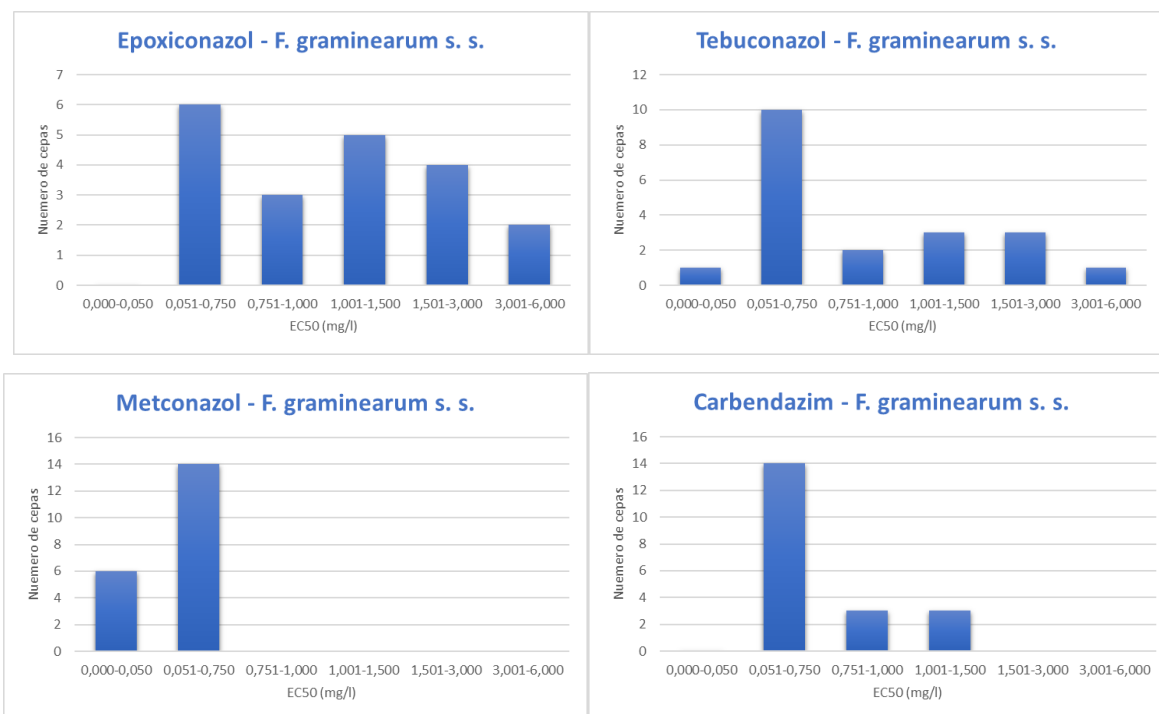


Figura 3-2. Rangos de EC50 de los fungicidas analizados para las cepas de *F. graminearum* s. s. estudiadas

En general, las cepas de *F. verticillioides* demostraron ser más sensibles cuando se las compara con las de *F. graminearum* s. s. para todos los fungicidas analizados ($p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $p = 0.0032$, $p = 0.0017$ para epoxiconazol, tebuconazol, metconazol y carbendazim, respectivamente) (Figura 3-3).

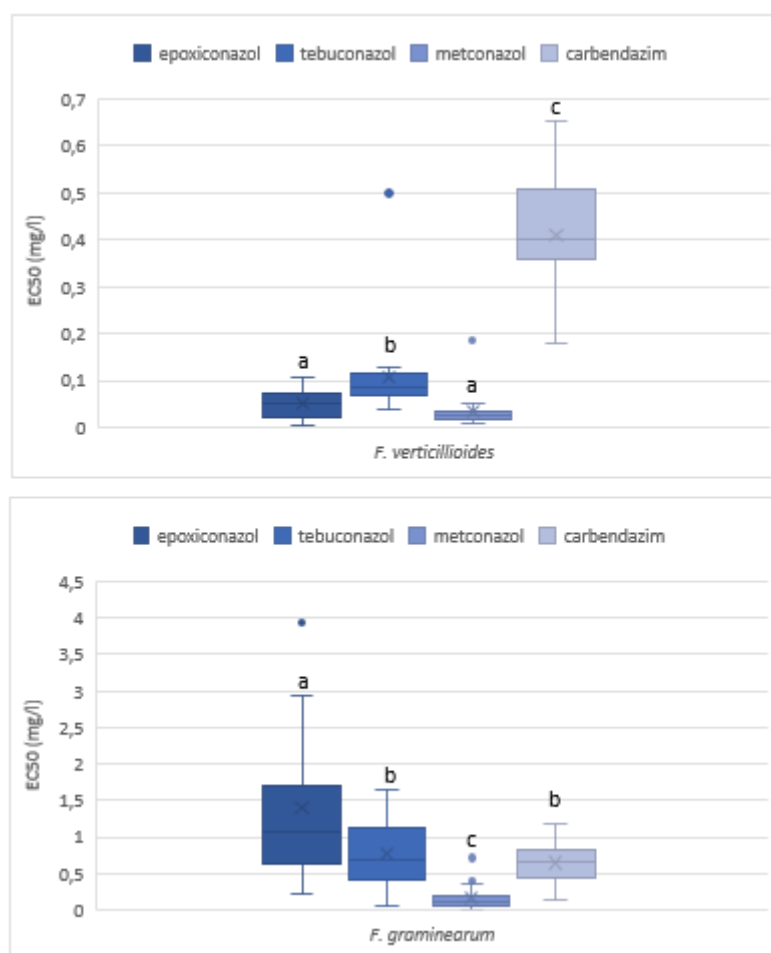


Figura 3-3. Concentraciones de EC50 de cada fungicida para los aislamientos de *F. verticillioides* y *F. graminearum* s. s. estudiados. Las letras minúsculas indican diferencias entre los fungicidas dentro de cada especie (Fisher LSD $p < 0.05$).

Para todos los fungicidas analizados, las cepas menos sensibles pertenecieron a *F. graminearum* s. s.. Los valores de EC50 para los aislamientos de *F. graminearum* s. s. con menor sensibilidad fueron de 4,544 mg/l para epoxiconazol, 0,710 mg/L para metconazol, 4,658 mg/L para tebuconazol y 1,166 mg/l para carbendazim.

Discusión

El uso de fungicidas químicos para el control de los hongos del género *Fusarium*, que causan la pudrición de la mazorca, no es una práctica habitual en el cultivo de maíz y pocos estudios han demostrado la eficacia de los fungicidas en el control de estas especies, especialmente las comprendidas en el complejo *Fusarium fujikuroi* (Masiello et al., 2019; Tava et al., 2021). Este estudio aporta nueva información sobre la sensibilidad de las principales especies toxicogénicas de *Fusarium* involucradas en la pudrición de la mazorca frente a diferentes fungicidas comúnmente utilizados en otros cultivos. La sensibilidad de cepas uruguayas de *F. verticillioides* frente a los fungicidas testeados fue similar a la reportada por otros autores años anteriores en diferentes

regiones geográficas (Ivić et al., 2011; Marin et al., 2013). Recientemente, Masiello et al., (2019) reportó una inhibición de crecimiento promedio del 95% a concentraciones de 0.9 mg/L de metconazol, en concordancia con los resultados aquí obtenidos. En ese mismo trabajo se informó inhibición del crecimiento en el 97% de las cepas de *F. verticillioides* a concentraciones de tebuconazol de 3,2 mg/L, mostrando las especies de nuestro país mayor sensibilidad a este fungicida con una inhibición del 100% a concentraciones de 0,75 mg/L. No hay trabajos en los que se informe la sensibilidad de *F. verticillioides* frente a epoxiconazol y carbendazim. Sin embargo, en este trabajo se evidenció que estos no fueron los de mayor eficacia en el control del crecimiento de hongos de esta especie. De forma similar, el metconazol fue el fungicida más eficiente en la inhibición del crecimiento de cepas uruguayas de *F. graminearum* s.s., seguido de carbendazim, a pesar de que algunos estudios informan sobre la presencia de aislamientos resistentes a benzimidazol en otros cultivos (Brent y Hollomon 2007; Chen et al. 2007; Liu et al., 2010). En relación con otros trabajos realizados en la región, los valores máximos de EC50 aquí obtenidos para metconazol (0,710 mg/L) fueron sensiblemente mayores a los reportados por Garmendia et al., (2018) y Spolti et al., (2012), quienes encontraron niveles máximos de 0,362 mg/L, en cepas uruguayas de *F. graminearum* s.s. aisladas de cebada y niveles de 0,320 mg/L, en aislamientos de trigo en Brasil, respectivamente. Demostrando que nuestros aislamientos fueron más resistentes a este fungicida.

Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas en la sensibilidad de las dos principales especies toxicogénicas de *Fusarium* asociadas al maíz frente a cuatro fungicidas de uso habitual, y se observó que *F. verticillioides* fue más sensible a la presencia de fungicidas que *F. graminearum* s.s. Esta diferencia en la sensibilidad podría deberse a la exposición a largo plazo de aislamientos de *F. graminearum* s.s. a las diferentes clases de fungicidas, además, se sabe que *F. graminearum* s.s. es el patógeno más frecuente en trigo y cebada en Uruguay, causando la fusariosis de la espiga de trigo (Umpierrez et al., 2013; Garmendia et al., 2018). Estos cultivos, especialmente el trigo, son usualmente tratados con fungicidas para el control de esta enfermedad. Por otro lado, en este trabajo se demostró que *F. verticillioides* es un contaminante asociado principalmente al maíz, y en Uruguay, no es frecuente el uso de fungicidas en este cultivo, ya que su principal destino es la alimentación del ganado y se consume principalmente en el propio establecimiento. Este ensayo *in vitro* utilizando fungicidas disponibles en el mercado, nos brinda información para seleccionar el químico más eficiente en el control del crecimiento de las principales especies fúngicas toxicogénicas asociadas al maíz. Estos resultados deberían corroborarse a campo y comprobar así la eficacia observada en los ensayos *in vitro*.

Bibliografía

- Abdallah, M., Ameye, M., De Saeger, S., Audenaert, K., Haesaert, G., 2018. Biological control of mycotoxigenic fungi and their toxins: An update for the pre-harvest approach. In *Fungi and Mycotoxins—Their Occurrence, Impact on Health and the Economy as Well as Pre- and Postharvest Management Strategies*; Berka Njobeh, P., Ed.; IntechOpen: London, UK.
- Amarasinghe, C., Tamburic-Ilincic, L., Gilbert, J., Brûlé-Babel, A., Dilantha Fernando, W., 2013. Evaluation of different fungicides for control of *Fusarium* head blight in wheat inoculated with 3ADON and 15ADON chemotypes of *Fusarium graminearum* in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 35(2), 200-208.
- Becher, R., Hettwer, U., Karlovsky, P., Deising, H., Wirsal, S. 2010. Adaptation of *Fusarium graminearum* to tebuconazole yielded descendants diverging for levels of fitness, fungicide resistance, virulence, and mycotoxin production. *Phytopathology* 100:444-453.
- Blandino, M., Haidukowski, M., Pascale, M., Plizzari, L., Scudellari, D., Reyneri, A., 2012. Integrated strategies for the control of *Fusarium* head blight and deoxynivalenol contamination in winter wheat. *Field Crops Res.* 133, 139–149.
- Blandino, M., Reyneri, A., Vanara, F., Ferrero, C., 2004. Control of mycotoxins in corn from harvesting to processing operation. In *Proceedings of the International Quality Grains Conference*, Indianapolis, Indiana, IN, USA, 19–22
- Brent, K., Hollomon, D., 2007. Fungicide resistance: the assessment of risk. In *Global Crop Protection Federation. (FRAC Monograph No. 2.)*; The Fungicide Resistance Action Committee Brussels: Brussels, Belgium
- Buchenauer, H. 1987. Mechanism of action of triazole fungicides and related compounds. Pages 205-232 in: *Modern Selective Fungicides*. H. Lyr, ed. Gustav-Fischer-Verlag, Jena, Germany.
- Chen, C., Wang, J., Luo, Q., Yuan, S., Zhou, M., 2007. Characterization and fitness of carbendazim-resistant strains of *Fusarium graminearum* (wheat scab). *Pest Manag Sci* 63:1201–1207
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C., 2020. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2014. Evaluation of the increase of risk for public health related to a possible temporary derogation from the maximum level of

deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins for maize and maize products. EFSA J., 12, 3699.

- Folcher, L., Jarry, M., Weissenberger, A., G rault, F., Eychenne, N., Delos, M., Regnault-Roger, C., 2009. Comparative activity of agrochemical treatments on mycotoxin level with regard to corn borers and *Fusarium* mycoflora in maize (*Zea mays* L.) fields. Crop Prot., 28, 302–308.
- Garmendia, G., Pattarino, L., Negrin, C., Martinez-Silveira, A., Pereyra, S., Ward, T., Vero, S., 2018. Species composition, toxigenic potential and aggressiveness of *Fusarium* isolates causing Head blight of barley in Uruguay. Food Microbiol 76:426–433
- Ivi , D., Sever, Z., Kumanovska, B., 2011. In vitro sensitivity of *Fusarium graminearum*, *F. avenaceum* and *F. verticillioides* to carbendazim, tebuconazole, flutriafol, metconazole and prochloraz. Pestic Phytomed (belgrade) 26:35–42
- Liu, S., Chen, Y., Yu, J., Chen, C., Wang, J., Zhou, M., 2010. Transfer of the beta-tubulin gene of *Botrytis cinerea* with resistance to carbendazim into *Fusarium graminearum*. Pest Manag Sci 66:482–489
- Logrieco, A., Mul , G., Moretti, A., Bottalico, A., 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. In Mycotoxins in Plant Disease; Logrieco, A., Bailey, J., Corazza, L., Cooke, B., Eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands; pp. 597–609. ISBN 0-4020-0871-6.
- FAOSTAT. Acceso online: www.fao.org/faostat/en (visitado el 9 marzo de 2023).
- Logrieco, A., Moretti, A., Perrone, G., Mul , G., 2007. Biodiversity of complexes of mycotoxigenic fungal species associated with *Fusarium* ear rot of maize and *Aspergillus* rot of grape. Int. J. Food Microbiol., 119, 11–16.
- Marín, P., De Ory, A., Cruz, A., Magan, N., González-Jaén, M., 2013. 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 165:251–258
- Masiello, M., Somma, S., Ghionna, V., Logrieco, A., Moretti, A., 2019. In Vitro and in Field Response of Different Fungicides against *Aspergillus flavus* and *Fusarium* Species Causing Ear Rot Disease of Maize. Toxins, 11, 11.
- Mesterh zy,  ., Lemmens, M., Reid, L., 2012. Breeding for resistance to ear rots caused by *Fusarium* spp. in maize—a review. Plant breeding, 131(1), 1-19.

- Pirgozliev, S., Edwards, S., Hare, M., Jenkinson, P., 2002. Effect of dose rate of azoxystrobin and metconazole on the development of *Fusarium* head blight and the accumulation of deoxynivalenol (DON) in wheat grain. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 469-478.
- Scarpino, V., Reyneri, A., Sulyok, M., Krska, R., Blandino, M., 2015. Effect of fungicide application to control *Fusarium* head blight and 20 *Fusarium* and *Alternaria* mycotoxins in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *World Mycotoxin J.* 1–12.
- Simpson, D., Weston, G., Turner, J., Jennings, P., Nicholson, P., 2001. Differential control of head blight pathogens of wheat by fungicides and consequences for mycotoxin contamination of grain. *Eur. J. Plant Pathol.* 107, 421–431.
- Spolti, P., Del Ponte, E., Dong, Y., Cummings, J., Bergstrom, G., 2014. Triazole sensitivity in a contemporary population of *Fusarium graminearum* from New York wheat and competitiveness of a tebuconazole-resistant isolate. *Plant Dis* 98:607–613
- 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.
- Tava, V., Prigitano, A., Cortesi, P., Esposto, M., Pasquali, M., 2021. *Fusarium musae* from diseased bananas and human patients: susceptibility to fungicides used in clinical and agricultural settings. *J. Fungi (basel)* 7:784
- Umpiérrez-Failache, M., Garmendia, G., Pereyra, S., Rodríguez-Haralambides, A., Ward, T., Vero, S., 2013. Regional differences in species composition and toxigenic potential among *Fusarium* head blight isolates from Uruguay indicate a risk of nivalenol contamination in new wheat production areas. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), 135-140.
- Zhou, Y., Xu, J., Zhu, Y., Duan, Y., Mingguo, Z., 2016. Mechanism of Action of the Benzimidazole Fungicide on *Fusarium graminearum*: Interfering with Polymerization of Monomeric Tubulin But Not Polymerized Microtubule. *Phytopathology*.

Capítulo 4.

Impacto de la co-existencia de especies fúngicas en el crecimiento y producción de micotoxinas en granos de maíz

Introducción

El maíz es un sustrato en el que es frecuente encontrar co-ocurrencia de especies toxicogénicas, como se demostró en este trabajo, donde se evidencio la presencia tanto de *F. verticillioides*, *F. graminearum* s. s. y *A. flavus* de forma concomitante como contaminantes del cultivo. Es por esta razón que estudios sobre el posible efecto de la interacción entre las diferentes especies en relación al crecimiento y síntesis de toxinas son de gran interés. En este sentido se han postulado varias teorías, entre ellas, hay autores que plantean que como consecuencia del calentamiento global, una mayor presencia de *A. flavus* y *F. verticillioides* puede ocurrir en detrimento de la persistencia de *F. graminearum* (Juroszek y Von Tiedemann, 2013). En vistas a las consecuencias en salud humana y animal este cambio es definitivamente no deseado (Miraglia et al., 2009), considerando que las toxinas (aflatoxinas y fumonisinas) producidas por hongos de estas especies son consideradas incluso más tóxicas que otras, por ejemplo zearalenona (ZEA) y deoxynivalenol (DON). Por estas razones, es importante prevenir y conocer de antemano el efecto de la interacción entre estas especies. Se han realizado diferentes estudios sobre las principales especies que colonizan los granos de maíz (*Fusarium*, *Aspergillus*) y sus interacciones (Marín et al., 1998; Velluti et al., 2000). Existen estudios que demostraron cierta inhibición del crecimiento entre especies de *Fusarium* (Marín et al., 1998; Velluti et al., 2000), y se ha llegado a postular que granos colonizados por *Fusarium* serían resistentes a la infección por *A. flavus* (Wicklow, 1988). Otros autores plantean que los nichos ecológicos que ocupan *F. verticillioides* y *A. flavus* en el maíz son diferentes debido a que utilizan diferentes fuentes de carbono, existiendo una dominancia de *F. verticillioides* frente a *A. flavus* únicamente bajo condiciones extremas (Giorni et al., 2009). En relación al efecto de la interacción en la síntesis de toxinas, se han observado variaciones en sus concentraciones cuando otras especies toxigénicas están presentes (Velluti et al., 2000). Dado que el efecto de la interacción de especies no ha sido completamente definido, es de gran importancia continuar estudiando sus consecuencias ya que conocer cómo interactúan las distintas especies toxicogénicas nos permitiría predecir el riesgo de contaminación del sustrato por estas especies y sus micotoxinas. A su vez es necesario valorar las potenciales consecuencias de la co-existencia de las toxinas que estas especies producen, ya que la presencia de diferentes micotoxinas en un mismo sustrato puede implicar interacciones que resulten en efectos aditivos, sinérgicos y/o antagónicos entre ellas (Bracarense et al., 2012).

En relación a las técnicas disponibles para estudios de este tipo, en los últimos años el uso de las técnicas de PCR en tiempo real han permitido una estimación adecuada de la biomasa de diferentes especies fúngicas, facilitando así su identificación y cuantificación en los distintos sustratos. Para la identificación de las diferentes especies de *Fusarium* se ha implementado el uso de cebadores específicos diseñados para la amplificación de un fragmento del gen *EF1α*, ya que este gen permite diferenciar entre la mayoría de las especies del género (Kristensen et al., 2005). Para *A. flavus* la determinación de biomasa que permite la diferenciación entre cepas toxicogénicas y no toxicogénicas se basa en la amplificación de la región de segmentos espaciadores intergénicos (IGS) ya que la presencia de inserciones/deleciones en esta región permite su diferenciación (Mylroie et al. 2016).

Asimismo, la producción de toxinas se puede estimar en base a la expresión de genes involucrados en su síntesis mediante la técnica cuantitativa de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-qPCR). Las fumonisinas son micotoxinas derivadas de policétidos, producidas por varias especies de *Fusarium*, y su ruta biosintética está controlada por el grupo *fum*, un grupo de genes que exhiben un patrón de expresión común durante la biosíntesis de fumonisinas (Stępień et al., 2011). El gen *fum1* es el primer gen de la ruta biosintética para la síntesis de fumonisinas, este gen codifica una policétido sintasa, siendo su síntesis temprana un paso clave en el ensamblaje de la fumonisina (Scala et al., 2017) (Figura 4-1). Hacia abajo del gen *fum1* se ubican otros genes que codifican enzimas participantes en la síntesis de estas toxinas (Figura 1). Se ha demostrado que existen cepas de *F. verticillioides* incapaces de sintetizar fumonisinas porque tienen una mutación en el gen *fum1* o, bien, carecen del locus *fum* (Proctor et al. 1999; Glenn, et al. 2008). Asimismo se ha observado que mutaciones en otros genes del locus que hace que las cepas no sean capaces de sintetizar FB1 pero si FB2 (Proctor et al., 2006).

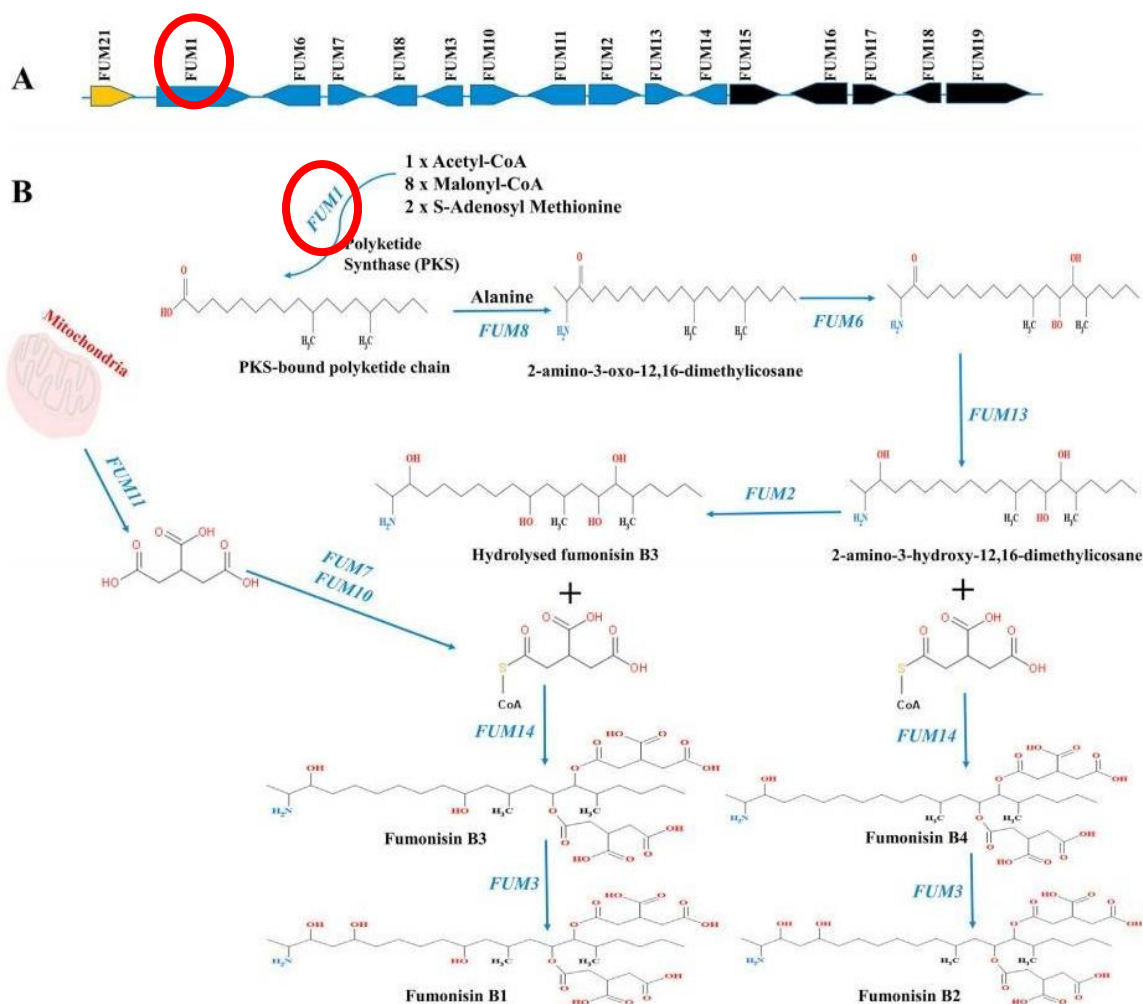


Figura 4-1. A. Cluster de genes implicados en la biosíntesis de fumonisinas en *F. verticillioides*. Las flechas amarillas indican los genes reguladores, las flechas negras indican genes que no son necesarios para la biosíntesis de fumonisinas, el círculo rojo indica el gen utilizado en este trabajo. B. Ruta biosintética de las fumonisinas con los genes implicados en cada reacción y las estructuras químicas de los productos intermediarios. Tomado de; Kolawole et al. 2021.

Múltiples genes vinculados a la síntesis de DON han sido estudiados y caracterizados. Entre los genes claves asociados a la síntesis de esta toxina se ha descrito a los genes *tri5* y *tri6*. El pirofosfato de farnesilo (PFF), es el principal precursor o sustrato para la biosíntesis de tricotecenos (Chen et al., 2019; Suzuki e Iwahashi, 2012), éste es ciclado por la enzima tricodieno sintasa codificada por el gen *tri5*, para producir tricodieno (Chen et al., 2019; Kimura et al., 2007). A partir de esta modificación, las enzimas codificadas por los genes *tri4*, *tri101*, *tri11* y *tri3*, catalizan secuencialmente la conversión de tricodieno en calonectrina, sustrato para la formación de DON y NIV (Chen et al., 2019; Kimura et al., 2007). A su vez, el gen *tri6* codifica un factor involucrado en la regulación transcripcional de los genes *tri*, incluido *tri5* (Proctor et al., 1995) (Figura 4-2).

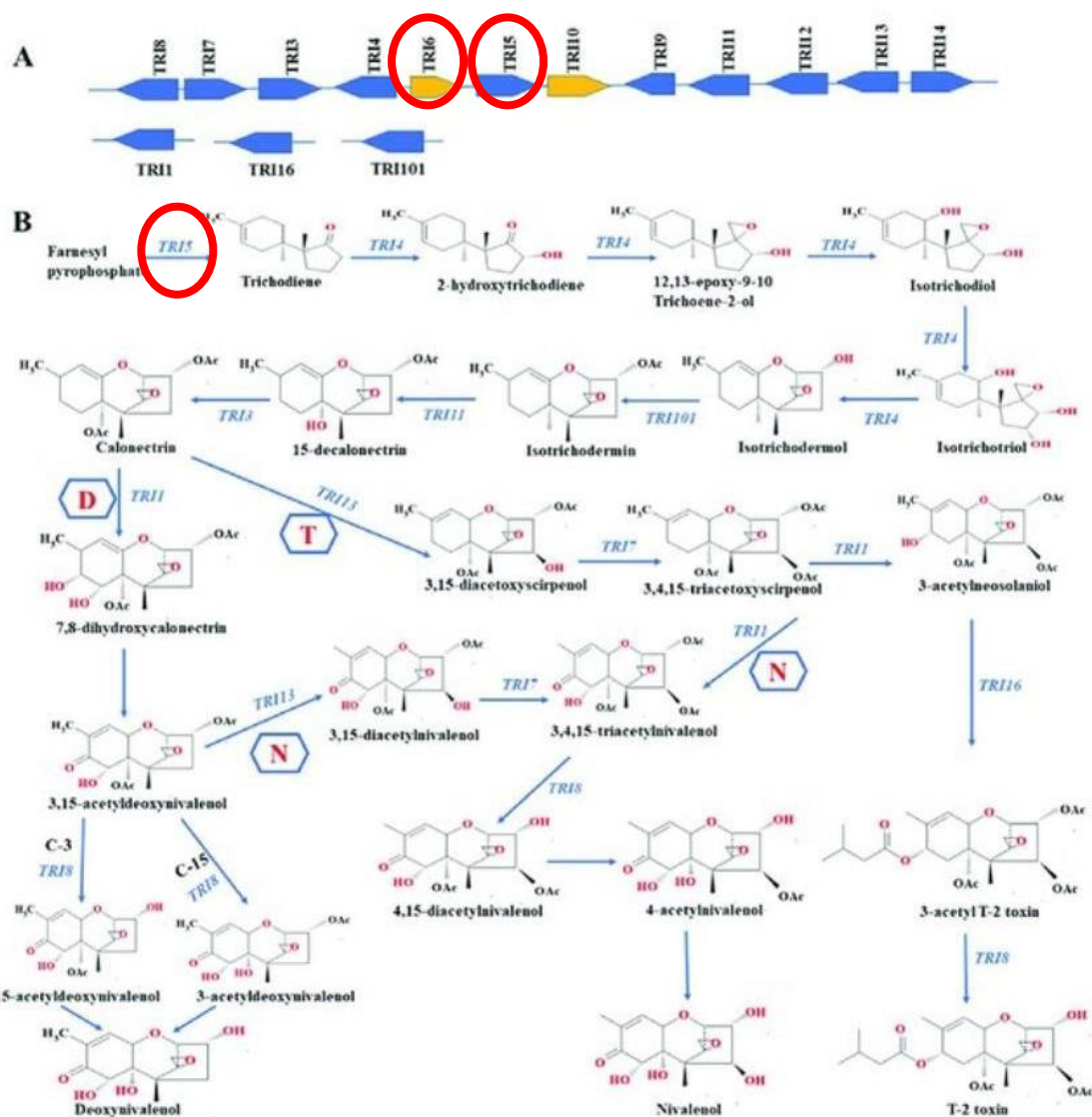


Figura 4-2. A. Genes involucrados en la producción de tricoteceno por especies de *Fusarium*. Las flechas amarillas representan los genes reguladores, el círculo rojo indica los genes utilizados en este trabajo. B. Vías de biosíntesis de tricotecenos, con los genes implicados en cada reacción y las estructuras químicas de los productos intermedios. T representa la vía biosintética de la toxina T-2; N representa la vía biosintética del nivalenol; y D representa la vía biosintética del deoxinivalenol. Tomado de: Kolawole et al. 2021.

La zearalenona (ZEA) es un policétido y se produce por la ruta del acetato-polimalonato (Dewick 2001), en la que participan las policétido sintasas fúngicas (PKS), grandes enzimas multidominio con función iterativa del tipo I (Hopwood, 1997; Kennedy et al., 1999). Hasta el momento se ha demostrado que solo cuatro genes participan en la biosíntesis de ZEA en *F. graminearum*: *pks4*, *pks13*, *zeb1* y *zeb2* (Lysøe et al., 2006; Gaffoor y Trail 2006; Huffman et al., 2010; Mahato et al. 2021), (Figura 3). Pks4 cataliza la síntesis de la estructura principal de la ZEA mediante la unión de acetil coenzima A (Co-A) y moléculas de malonil-CoA (Kim et al., 2005). La unidad inicial resultante es

un hexacétido que posteriormente sufre transilación. El gen *pks13* cataliza la extensión de esta estructura mediante la adición de tres moléculas adicionales de malonil-CoA. Posteriormente se da un proceso de aromatización espontánea no enzimática resultado en la formación de zearalenol. El paso final de la conversión de zearalenol a zearalenona está catalizada por Zeb1 (Gaffoor y Trail, 2006) (Figura 4-3). Finalmente, Zeb2 es responsable de la regulación de los genes *pks4*, *pks13* y *zeb1* (Gaffoor y Trail, 2006; Kim et al., 2005).

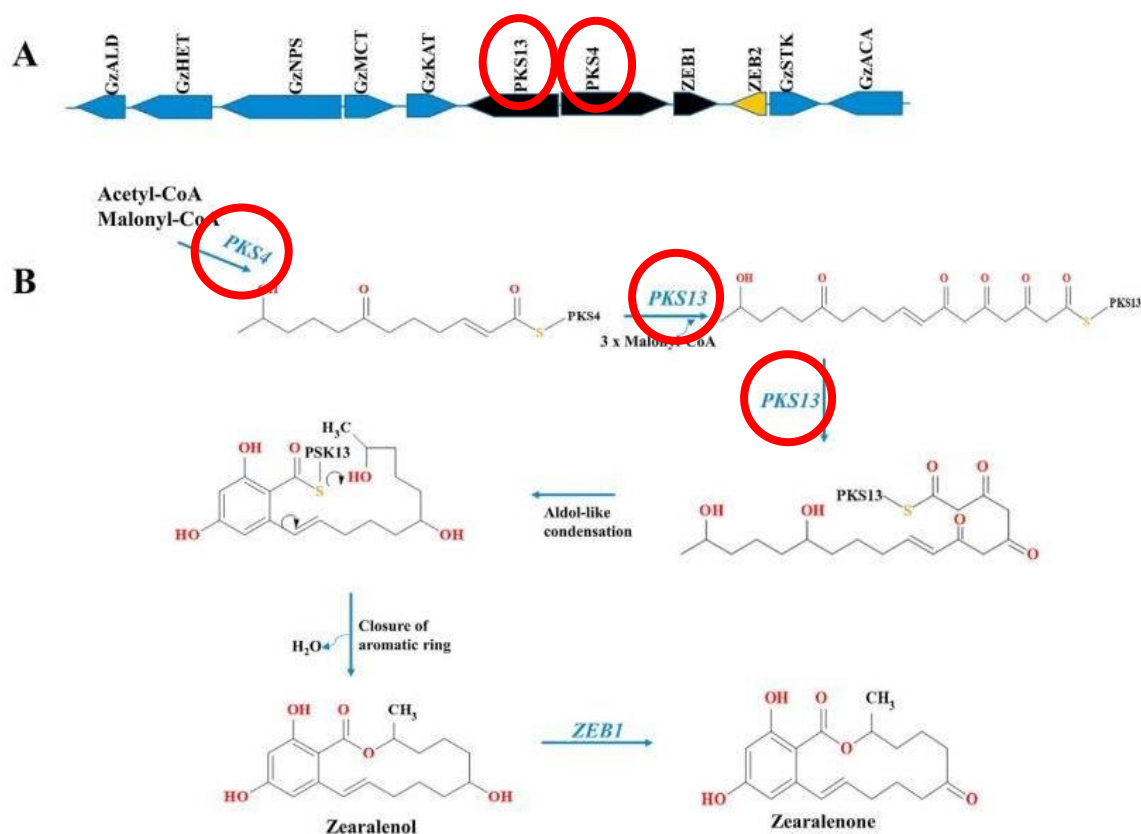


Figura 4-3. A. Cluster de genes para la síntesis de Zearalenona (ZEA) de *F. graminearum*. Las flechas en amarillo indican genes reguladores, flechas negras indican genes involucrados en la biosíntesis e ZEA, el círculo rojo indica los genes utilizados en este trabajo. B. Ruta biosintética para la síntesis de zearalenona, con los genes implicados en cada reacción y las estructuras químicas de los productos intermedios; Tomado de Kolawole et al. 2021.

Las aflatoxinas son compuestos bisfuranocumarinicos y el cluster de genes que participa en la síntesis de aflatoxinas ha sido bien estudiado y caracterizado. Se ha clasificado a los genes que participan en la ruta biosintética de estas toxinas en tres grupos; genes tempranos (*afIA*, *afIB*, *afIC*, *hypC*, *afID*, *afIR*, *afIS*); genes medios (*afIG*, *afIH*, *afII*, *afIK*, *afIL*, *afIM*, *afIN*, *afIV*, *afIW*), y genes tardíos (*afIO*, *afIP*, *afIQ*, *afIX*, *afIY*, *afIE*, *afIB*, *afIC* y *afIE*) (Zeng et al., 2020; Yu et al., 2004). La

regulación de este cluster de genes está a cargo de los genes *aflR* y *aflS*, siendo éstos claves en la expresión de estas toxinas (Abdel-Hadi, et al., 2011). La transcripción de genes biosintéticos de aflatoxinas puede activarse cuando la proteína expresada por el gen *aflR* se une a la secuencia palindrómica 5'-TCG(N5)CGA-3' en la región promotora de los genes estructurales, activando su transcripción (Fernandes, et al., 1998; Ehrlich, et al., 1999a; 1999b). El gen *aflS*, que reside junto al *aflR*, también está implicado en la regulación de la biosíntesis de aflatoxinas, implicado en la regulación de genes de expresión temprana actuando como cofactor del gen *aflR* (Meyers et al., 1998; Du et al., 2007). (Figura 4-4).

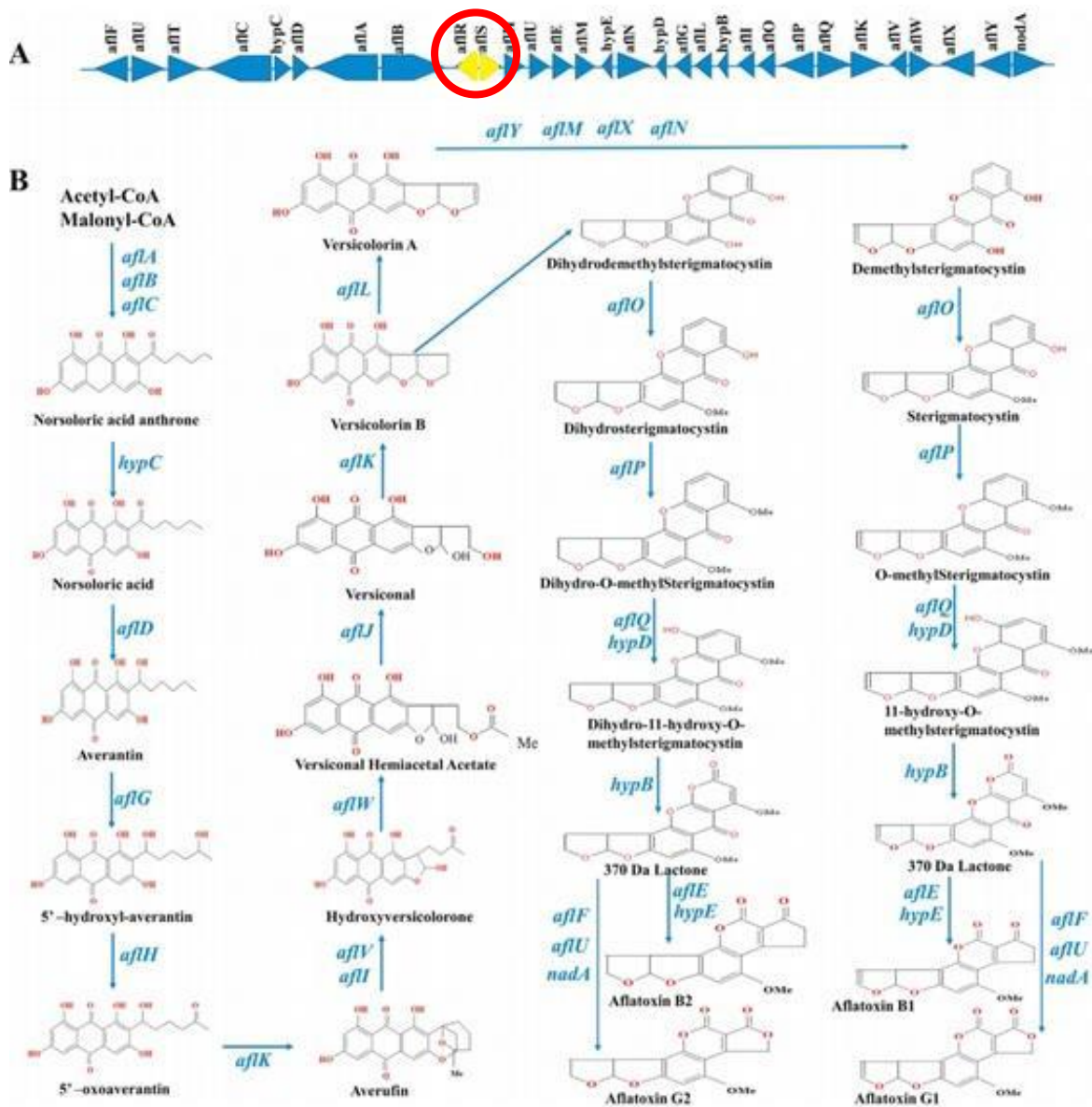


Figura 4-4. A. Cluster de genes responsables de la síntesis de aflatoxinas en *Aspergillus* spp. Las flechas amarillas indican genes reguladores, el círculo rojo indica los genes utilizados en este trabajo. B. Ruta biosintética para la síntesis de aflatoxinas, con los genes implicados en cada reacción y las estructuras químicas de los productos intermedios. Tomado de; Kolawole et al. 2021.

Es de gran interés conocer el efecto de la interacción entre las diferentes especies toxicogénicas contaminantes del maíz, para evaluar el riesgo potencial de contaminación, sabiendo que la incidencia de cada una de las toxinas producidas por estas especies podría estar influenciada por la presencia de las otras especies en el cultivo y por la existencia de condiciones ambientales favorables para el desarrollo fúngico y para la síntesis de cada una de las toxinas. Por otra parte, es importante evaluar las variaciones en el crecimiento y la síntesis de toxinas de las cepas, mediante métodos de diagnóstico moleculares rápidos y específicos para poder implementar esta herramienta en futuros estudios.

Objetivo

Determinar el efecto de la interacción entre especies fúngicas toxicogénicas aisladas de maíz a través del estudio de la expresión de genes que permiten determinar el crecimiento (estimación de biomasa) y la biosíntesis de toxinas.

Hipótesis en relación con este objetivo:

- La co-inoculación de *F. verticillioides*, *F. graminearum* y *A. flavus* en maíz afecta el crecimiento y la capacidad de síntesis de toxinas pudiendo inducir cambios significativos en la expresión génica que modulan tanto el crecimiento de los hongos como la producción de micotoxinas.
- Algunas especies pueden experimentar un crecimiento reducido o potenciado debido a las interacciones competitivas o sinérgicas entre ellas
- La síntesis de toxinas tiende a aumentar en presencia de otras especies

Materiales y métodos

Se seleccionaron cepas aisladas de granos de maíz pertenecientes a *F. verticillioides*, *F. graminearum* s. s. y *A. flavus*. Las cepas seleccionadas fueron previamente identificadas mediante métodos moleculares y se les determinó su capacidad toxigénica y se determinaron parámetros de temperatura y actividad hídrica óptimos para su crecimiento y producción de toxinas. Se seleccionaron un total de 5 cepas, 4 cepas toxigénicas que fueron seleccionadas con base en su capacidad de producir micotoxinas *in vitro* a concentraciones elevadas y además, se seleccionó una cepa no toxicogénica de *A. flavus* (Tabla 4-1).

Tabla 4-1. Cepas seleccionadas para estudio del efecto de la co-existencia de especies en el crecimiento y producción de toxinas

CEPA (código colección)	ESPECIE	TOXINAS
A68	<i>F. verticillioides</i>	FB1 y FB2
A52	<i>F. verticillioides</i>	FB1 y FB2
A368	<i>F. graminearum s. s.</i>	DON y ZEA
A36	<i>A. flavus</i>	AFB1 y AFB2
A631	<i>A. flavus</i>	No toxicogénica

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizaron un total de 6 ensayos en los que se inocularon combinaciones de las distintas especies como se detalla en la tabla 4-2.

Tabla 4-2. Cepas de especies co-inoculadas en cada ensayo experimental.

Especies para cada ensayo realizado	Códigos colección cepas co-inoculadas en cada ensayo	
<i>F. graminearum s. s.</i> + <i>F. verticillioides</i>	A368+A68	A368+A52
<i>F. graminearum s. s.</i> + <i>A. flavus</i> toxicogénico	A368+A36	
<i>F. graminearum s. s.</i> + <i>A. flavus</i> no toxigénico	A368+A631	
<i>F. verticillioides</i> + <i>A. flavus</i> toxicogénico	A68+A36	A52+A36
<i>F. verticillioides</i> + <i>A. flavus</i> no toxicogenico	A68+A631	A52+A631
<i>A. flavus</i> toxicogénico + <i>A. flavus</i> no toxigénico	A36+A631	

Los ensayos fueron incubados a 25°C y a una actividad hídrica (a_w) de 0.95 durante un total de 14 días. De cada ensayo se realizaron 4 réplicas y se realizó una medición al día 5 y al día 14 de incubación de los parámetros de crecimiento y expresión de toxinas. Además se cuantificó la concentración de micotoxinas en las muestras al finalizar incubación.

Inicialmente, las cepas seleccionadas se hicieron crecer en medios de cultivos específicos para favorecer la formación de esporas, las cepas de *Fusarium* se crecieron en medio soja-PDA (400 ml de caldo de soja (60 g de soja en 1 L de agua), 1,2% agar, 2,4% medio comercial PDA) y las de *Aspergillus* en medio PDA durante 7-10 días. De cada una de las cepas se preparó una suspensión de esporas en agua destilada esteril, con una concentración final de 10^6 esporas/mL. Se utilizaron granos de maíz previamente esterilizados por radiación gamma (12 kGy) como sustrato para los distintos ensayos. Se utilizó un tratador de semilla de aire comprimido, Wintersteiger Hege 11, para adicionar agua estéril a los granos y de esta forma alcanzar el nivel deseado de a_w (0.95). El volumen de agua a adicionar se determinó en base al contenido de humedad inicial en los granos (MC) mediante la siguiente ecuación:

$$W_f = W_o + ((1/(100 - M_f))(M_f - M_o)(W_o))$$

Donde W_f y W_o son el peso de la muestra final e inicial (kg), respectivamente y M_f y M_o es el contenido de humedad final e inicial, respectivamente. Para la correlación entre la a_w y el MC se utilizó la ecuación GAB (Guggenheim-Andersen-de Boer)(Van den Berg, 1985), que permite calcular el contenido de humedad de equilibrio (M):

$$M = \frac{m_o C K a_w}{[(1 - K a_w) (1 - K a_w + C K a_w)]}$$

Donde los parámetros m_o (contenido de humedad en la monocapa (kg/100 kg materia seca)), C y K que son constantes del modelo se obtuvieron del trabajo realizado por Samapundo et al., 2007 en los que se analizaron curvas de absorción hídrica a distintas temperaturas para granos de maíz. Siendo los valores obtenidos: m_o 7.444; C 34.557 y K 0.764 para el modelo GAB a 25°C de temperatura. Una vez hidratados los granos, se corroboraron los niveles de a_w y se almacenaron durante 48 horas en heladera para estabilizar. Se alcanzó un contenido de humedad en los granos de 20.5% lo que equivale a una a_w de 0.95. En recipientes estériles, se colocaron 200 g de granos del maíz previamente hidratado y se inocularon con 20 mL de suspensión de esporas de cada cepa. Como control se inocularon 40 mL de cada cepa por separado para poder evaluar el crecimiento de

cada aislamiento. Se realizó un control negativo inoculado con agua esteril. Los granos inoculados se incubaron en una estufa con ambiente controlado, a 25°C de temperatura como se muestra en la Figura 4-5.



Figura 4-5. Estufa de ambiente controlado para la incubación de los recipientes de los distintos ensayos

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA ANÁLISIS

Se realizaron determinaciones del nivel de biomasa fúngica y de la expresión de genes asociados a rutas biosintéticas para la síntesis de toxinas en dos oportunidades, al día 5 y al día 14 de incubación. Para esto, de cada recipiente se tomó una submuestra de 50 g de maíz que fue colocada inmediatamente en nitrógeno líquido para preservación del ARN. Para su análisis las submuestras se molieron utilizando un molinillo en el que cada muestra fue procesada de forma individual y fueron posteriormente almacenadas a -80°C para su conservación hasta su utilización.

EVALUACIÓN DE BIOMASA

Se determinaron los niveles de biomasa de cada aislamiento a los 5 y a los 14 días de incubación, se realizó la evaluación por duplicado de las cuatro réplicas de cada tratamiento y los controles de cada aislamiento. A partir de las sub-muestras almacenadas a -80°C se tomaron entre 30-90 mg de muestra y se colocaron en tubos eppendorf estériles para la posterior extracción de ADN y determinación de biomasa. Para la extracción de ADN se utilizó el kit comercial MagMAX™ Plant

DNA Isolation , Thermo Scientific™ y se siguieron las instrucciones del fabricante, la extracción se realizó utilizando un equipo KingFisher flex, Thermo Scientific™ de 96 pocillos. Una vez obtenido el ADN de cada tratamiento, se utilizaron distintos cebadores específicos para cada especie (Tabla 4-3) para estimar por qPCR la cantidad de biomasa de cada aislamiento presente en las muestras.

Tabla 4-3. Secuencias de los distintos cebadores utilizados para la cuantificación de la biomasa de cada especie fúngica

Especie	Cebador	Secuencia 5'-3'	Bibliografía
<i>F. graminearum</i> s. s.	FgramB411 rev	CCTATTGACAGGTGGTTAGTGACTGG	Nicolaisen et al. 2009
	FgramB379 fwd	CCATTCCCTGGGCGCT	
<i>F. verticillioides</i>	Fver356 fwd	CGTTTCTGCCCTCTCCA	
	Fver412 rev	TGCTTGACACGTGACGATGA	
<i>A. flavus</i> toxicogénicos	3357-F2	GGAGCGGGATCTCAGACC	Mylroie et al. 2016
	3357-R8	GTAGGAGGTAGGGTGATCAGAGC	
<i>A. flavus</i> no toxicogénico	21882-F2 b	GGAGCGGGATCTCAGAGAC	
	3357-R8	GTAGGAGGTAGGGTGATCAGAGC	

Tanto la composición de la reacción de amplificación como el ciclado utilizado fueron los mismos para los aislamientos de *Fusarium* como los de *Aspergillus*. Para la realización de las PCR se preparó una reacción de volumen final 10 µL conteniendo, 5 µL 2× SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.3 µL de cada cebador [10 uM] y 2 µL de ADN. El protocolo de amplificación utilizado consistió en 3 min a 95°C; seguido de 39 ciclos compuestos por una primera etapa de denaturalización a 95°C 15 seg y una etapa de hibridación/extensión a 62°C por 60 seg y un paso final de 95°C por 10 seg. La curva de disociación se realizó en ciclos de 5 seg comenzando a 60°C con incrementos de 0.5°C hasta alcanzar los 95°C. Para la estimación de los niveles de biomasa de cada cepa en cada tratamiento, en cada ciclo de PCR se realizaron las curvas de calibración correspondientes a cada aislamiento que se utilizaron como referencia de crecimiento en la evaluación posterior. Para las curvas de calibración se hicieron crecer los aislamientos en medio líquido YEPD y se realizó la extracción de ADN mediante la metodología de CTAB descrita por Leslie y Summerell 2006. Una vez obtenido el ADN se midió la concentración de ADN utilizando un equipo

Nanodrop, y se realizaron 4 diluciones consecutivas 1:10 para la construcción de la curva de calibración. Para análisis de los resultados obtenidos se utilizó el programa BioRad CFX Maestro.

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS A SÍNTESIS DE TOXINAS

Para evaluar la expresión de micotoxinas, se determinaron los niveles de expresión de genes claves vinculados a la síntesis de las principales toxinas asociadas a cada especie a los 5 y a los 14 días de incubación. Se realizó la evaluación por duplicado de las cuatro réplicas de cada tratamiento y los controles de cada aislamiento. A partir de las sub-muestras almacenadas a -80°C se tomaron entre 30-90 mg de muestra y se colocaron en tubos eppendorf estériles para la posterior extracción de ARN, durante todo el procedimiento se mantuvieron las muestras en frío utilizando nitrógeno líquido. Se utilizaron kits comerciales para la extracción de ARN MagMAX™ Plant RNA Isolation, Thermo Scientific™ siguiendo las instrucciones del fabricante y la extracción se realizó utilizando un equipo KingFisher flex, Thermo Scientific™ de 96 pocillos. Una vez obtenido el ARN de cada tratamiento, se realizó la transcripción reversa para obtener el ADN copia (ADNc) para la determinación de los niveles de expresión de genes. La síntesis del ADNc se realizó utilizando el kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System para RT-PCR de Thermo Fisher siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción para la retrotranscripción de ADN consistió en la preparación de una pre-mix para la unión del cebador al fragmento de ARN que contenía; 10 µL de agua DEPC (desionizada, tratada con dietilpirocarbonato y filtrada por membrana de 0,22 µm), 1 µL de cada cebador [2 µM], 1 µL de dNTPs [10 mM de cada dNTP] y 1 µL de ARN. Esta pre-mix fue colocada a 65°C por 5 min y posteriormente incubada en hielo por 1 min. Luego se combinó la reacción anterior con un volumen final de 7 µL de una mix que contenía 4 µL de buffer, 1 µL de DTT, 1µL de inhibidor de la ribonucleasa y 1µL de transcriptasa reversa [200 U/ µL]. La combinación de reacciones se incubó a 50°C por 10 min y posteriormente 10 min a 80°C para inactivar la reacción. Una vez obtenido el ADNc de cada ensayo se procedió al análisis de la expresión de genes vinculados a la síntesis de toxinas. Para los aislamientos de *F. verticillioides* se estudiaron genes vinculados a la expresión de fumonisinas (*fum 1*), para los aislamientos de *F. graminearum* s. s. se analizaron genes vinculados a la expresión de DON (*tri5* y *tri6*), y ZEA (*pks4* y *pks13*) y finalmente, para los aislamientos toxigénicos de *A. flavus* se analizaron los genes vinculados a la expresión de aflatoxinas (*aflR* y *aflS*). Los cebadores utilizados para cada gen se resumen en la tabla 4-4.

Tabla 4-4. Secuencias de los distintos cebadores utilizados para los análisis por RT-qPCR

Especie	Toxina	Gen	Cebador	Secuencia 5'-3'	Gen constitutivo	Secuencia 5'-3'	Bibliografía
<i>F. graminearum</i> s. s.	DON	<i>Tri 5</i>	Tri5F	AAGAACTTTGTC ACCTGTCA	EF1-PS.1	GGCTTTCAC CGACTACCC TCCTCT	Diao et. al., 2018
			Tri5R	CCTGATCCTTGAC CTTTCA			
		<i>Tri 6</i>	Tri6F	CGACTTGCAACT AGGGAAT			
			Tri6R	GACATTGACAAC TTCCCCA			
	ZEA	<i>PKS 4</i>	PKS4-PS.1	GTGGGCTTCGCT AGACCGTGAGTT	EF1-PS.2	ACTTCTCGA CGGCCTTGA TGACAC	Lysøe et al., 2006
			PKS4-PS.2	ATGCCCTGATGA AGAGTTTGAT			
		<i>PKS 13</i>	PKS13- PS.1	CCCCAACTCGA CGTCAAATCTAT			
			PKS13- PS.2	TTCTTCCCGCCGA CTTCAAAACA			
<i>F. verticillioides</i>	FBs	<i>FUM1</i>	PQF1-F	GAGCCGAGTCAG CAAGGATT	β tub_F	ACATTCGTC GGAAACTCC AC	Scala et al., 2017
			PQF1-R	AGGGTTCGTGAG CCAAGGA	β tub_R	CAGCATCCT GGTACTGCT GA	
<i>A. flavus</i>	AFs	<i>afIR</i>	AfIRTaQ1	TCGTCCTTATCGT TCTCAAGG	F-TUBjd	TCTTCATGGT TGGCTTCGCT	Peromingo et al., 2017
			AfIRTaQ2	ACTGTTGCTACA GCTGCCACT			
		<i>afIS</i>	AfISqPCR1	TGGTGCGACCAT ATTACA	R-TUBjd	CTTGGGGT CGAACATC TGCT	
			AfISqPCR2	GGTTGGGTCACG AACTGTTT			

La reacción de amplificación a partir de ADNc, se realizó siguiendo las recomendaciones adjuntas al Kit de SYBR green Bio Rad. Para todas las cepas, se preparó una reacción de volumen final 10 μ L conteniendo, 5 μ L 2 $\times$ SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.3 μ L de cada cebador [10 μ M] y 2 μ L de ADNc. El protocolo de amplificación de PCR utilizado tanto para el análisis de *fum 1*, como para la determinación de *afIS* y *afIR* consistió en 3 min a 95°C (1 ciclo) seguido de 39 ciclos de 10 seg a 95°C y 30 seg a 60°C. La curva de disociación se realizó en ciclos de 5 seg comenzando a 60°C con incrementos de 0.5°C hasta alcanzar los 95°C. La determinación de *tri 5* y *tri 6* se realizó con un protocolo de PCR que consistió en 3 min a 95°C (1 ciclo) seguido de 39 ciclos de 10 seg a 95°C y 30 seg a 55°C. La curva de disociación se realizó en ciclos de 5 seg comenzando a 60°C con incrementos de 0.5°C hasta alcanzar los 95°C.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el programa BioRad CFX Maestro, las determinaciones de los ciclos umbral (Ct, por sus siglas en inglés; threshold cycle (primer ciclo en el que los productos de PCR son detectados)) fueron realizadas automáticamente por el instrumento utilizando parámetros predeterminados. La estimación de biomasa se realizó mediante la comparación de la expresión de los genes mencionados en la Tabla 4-3 en cada uno de los ensayos planteados, versus la expresión de los mismos genes en las muestras control, se construyeron gráficas en las que se muestran los intervalos de confianza del 95% y se analizó la significancia de los resultados para un p -valor < 0.05 .

La comparación de los niveles de expresión entre los controles a los distintos tiempos de incubación se realizó utilizando el programa sigma stat mediante comparación de grupos por test de Student's, se consideró significativos valores de $p < 0.05$. Para estimar los niveles de expresión de los diferentes genes asociados a la síntesis de toxinas se realizó una comparación en la misma muestra entre los niveles de expresión del gen de interés (*fum1*, *tri5* y *tri6*, *pks4*, *pks13*, *afIS* y *afIR*) y los genes constitutivos para cada especie en particular (Tabla 4-4). La cuantificación es relativa al gen de constitutivo, y se calcula restando el ciclo umbral (Ct) del gen constitutivo a partir del Ct del gen de interés (Δ Ct). La diferencia resultante en el número de ciclos se divide luego por el valor objetivo normalizado del calibrador y el valor obtenido ($\Delta\Delta$ CT) es el exponente de base 2 (debido a la función de duplicación de la PCR) para generar los niveles de expresión relativa. En base a los resultados, se construyeron gráficas en las que se muestran los intervalos de confianza del 95% y se analizó la significancia de los resultados para un p -valor < 0.05 .

DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE MICOTOXINAS EN LAS MUESTRAS

Luego de 14 días de incubación, las muestras fueron enviadas para la determinación de micotoxinas al laboratorio de diagnóstico veterinario de la Universidad de Iowa (ISU-VDL). La extracción de toxinas se realizó mediante solventes en base a una metodología validada por la Sección de Servicio de Análisis de la Universidad de Iowa (ISU-VDL). Las muestras fueron analizadas mediante la técnica de cromatografía líquida unida a espectrómetro de masa (LC-MS/MS). Los límites de detección para las toxinas analizadas fueron de 10 µg/kg para aflatoxinas; 100 µg/kg para DON y FB, y 200 µg/kg para ZEA.

Resultados

BIOMASA

Fusarium verticillioides

Del estudio de la interacción de las cepas de *F. verticillioides* en presencia de *A. flavus* y *F. graminearum* s. s., se desprende que hay una disminución significativa en los niveles de biomasa en presencia de cepas de *A. flavus*, tanto toxigénicas como no toxigénicas, evidenciándose esta disminución a ambos días de incubación (Figura 4-6). En relación con la presencia de *F. graminearum* s. s., no se observan diferencias estadísticas en la biomasa de *F. verticillioides* respecto al control (Figura 4-6).

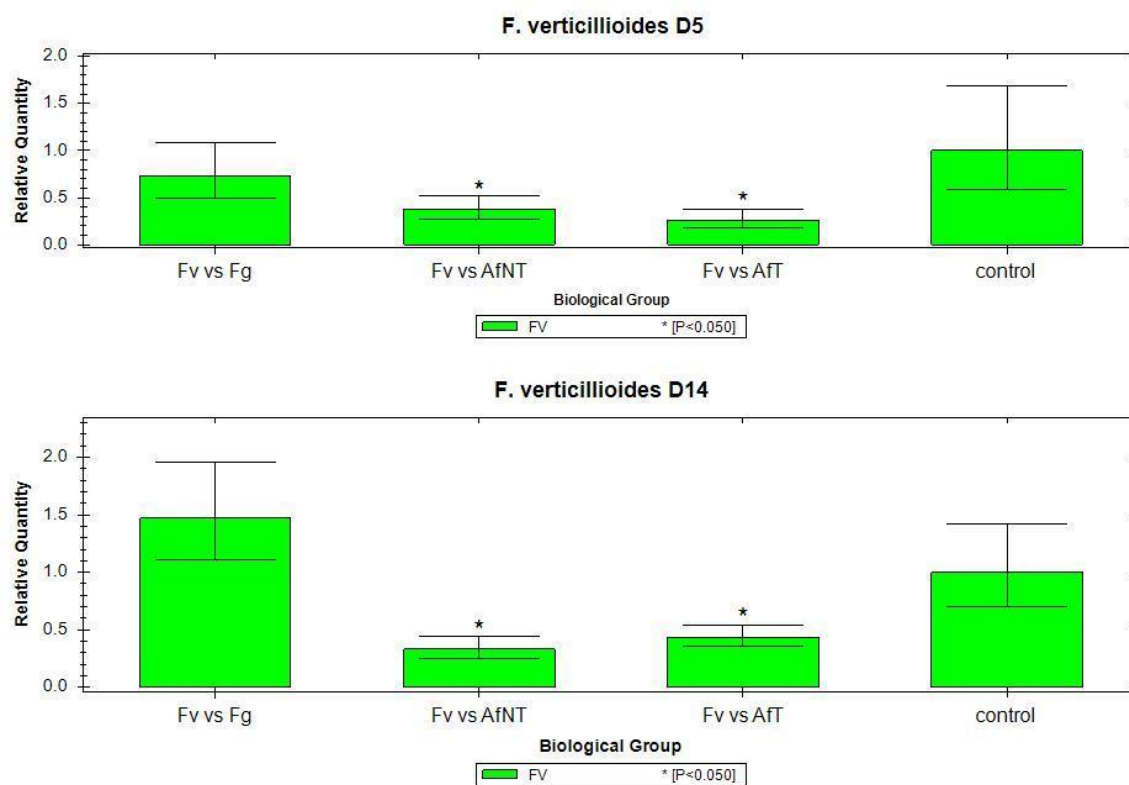
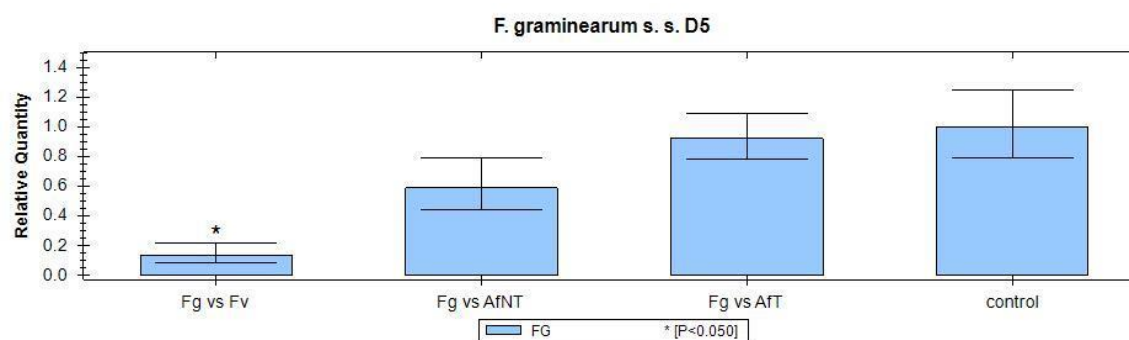


Figura 4-6. Evaluación de los niveles de biomasa al día 5 y día 14 de incubación de *F. verticillioides* (Fv) en presencia de *F. graminearum* s. s. (Fg) y *A. flavus* no toxicogénico (AfNT) y toxicogénico (AfT). Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto al control.

Fusarium graminearum s. s.

La cepa de *F. graminearum* s. s. demostró una disminución significativa de su biomasa frente a la presencia de todas las especies estudiadas a los 14 días de incubación, mientras que frente a *F. verticillioides*, la disminución de biomasa se observó desde los 5 días de incubación (Figura 4-7).



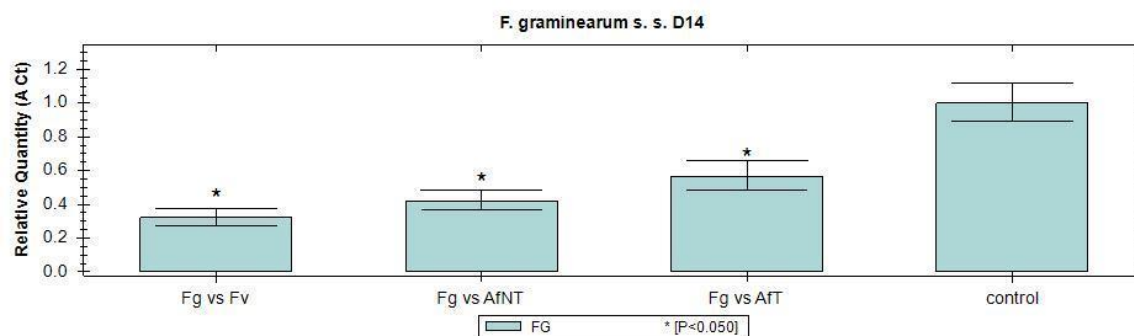


Figura 4-7. Evaluación de los niveles de biomasa al día 5 y día 14 de incubación de *F. graminearum* s. s. (Fg) en presencia de *F. verticillioides* (Fv) y *A. flavus* no toxicogénico (AfNT) y toxicogénico (AfT). Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto al control.

Aspergillus flavus toxicogénicos

La cepa de *A. flavus* toxicogénica evidenció una reducción de biomasa estadísticamente significativa respecto al control a los 5 días de incubación en presencia de todas las especies analizadas, mientras que a los 14 días esta reducción significativa se mantuvo únicamente frente a las especies de *Fusarium* (Figura 4-8).

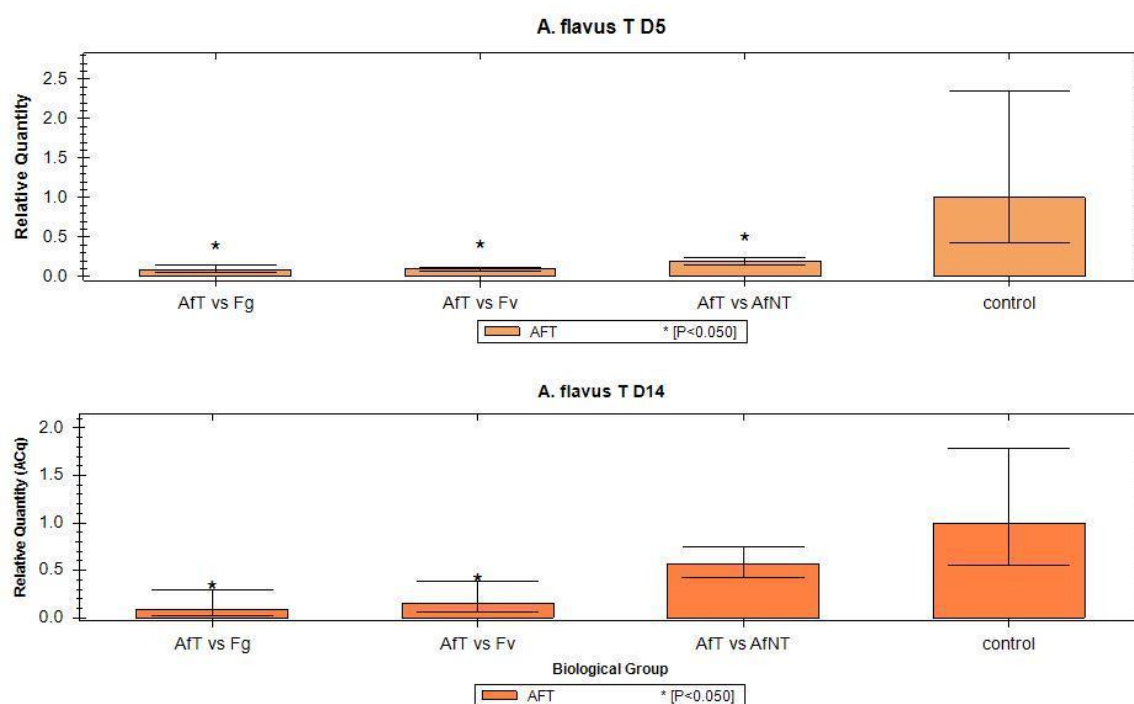


Figura 4-8. Evaluación de los niveles de biomasa al día 5 y día 14 de incubación de *A. flavus* toxicogénico (Aft) en presencia de *F. verticillioides* (Fv), *F. graminearum* s. s. (Fg) y *A. flavus* no toxicogénico (AfNT). Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto al control.

Aspergillus flavus no toxicogénico

Para el caso de la cepa de *A. flavus* no toxigénica estudiada, a los 5 y 14 días de incubación se observó una disminución de su biomasa en presencia de todas las especies analizadas respecto al control (Figura 4-9).

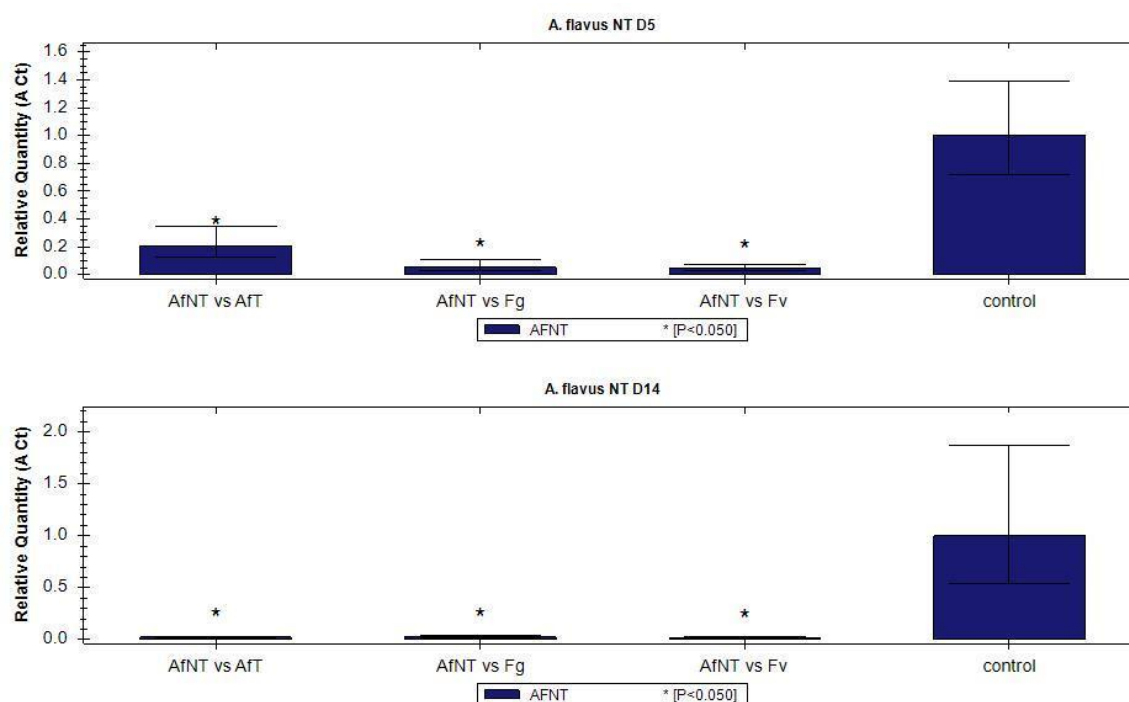


Figura 4-9. Evaluación de los niveles de biomasa al día 5 y día 14 de incubación de *A. flavus* no toxicogénico (AfNT) en presencia de *F. graminearum* s. s. (Fg), *F. verticillioides* (Fv) y *A. flavus* toxicogénico (AfT). Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) respecto al control.

EXPRESIÓN DE GENES VINCULADOS A LA SÍNTESIS DE TOXINAS

Inicialmente se buscó evaluar cómo varían los niveles de expresión de genes asociados a la síntesis de toxinas en las cepas analizadas en función del tiempo en los ensayos control. Esto permitió evidenciar diferencias en el comportamiento de las diferentes especies, en ausencia de competidores. Si bien la comparación entre los distintos tiempos de expresión no fue significativa para la mayoría de los genes estudiados, se observó que *F. verticillioides* aumenta los niveles de expresión del gen *fum1* a mayores periodos de tiempo ($p=0,555$), al igual que *A. flavus* (*aflR* $p=0,352$; *aflS* $p=0,337$). Sin embargo, *F. graminearum* s. s. exhibe un aumento significativo en la expresión de uno de los genes asociado a la ruta biosintética de los tricotecenos a los 14 días de incubación (*tri5* $p<0,001$), mientras que la expresión del gen *tri6* no varía de forma significativa (*tri6* $p=0,233$). Por otro lado, se observa una disminución, aunque no significativa, en ambos genes de la ruta

biosintética de la ZEA (*psk4* $p=0,327$; *psk13* $p=0,173$) a mayor tiempo de incubación. A su vez, de la comparación entre las diferentes especies se puede evidenciar que predominan los niveles de expresión de *fum1* respecto al resto de los genes analizados (Figura 4-10).

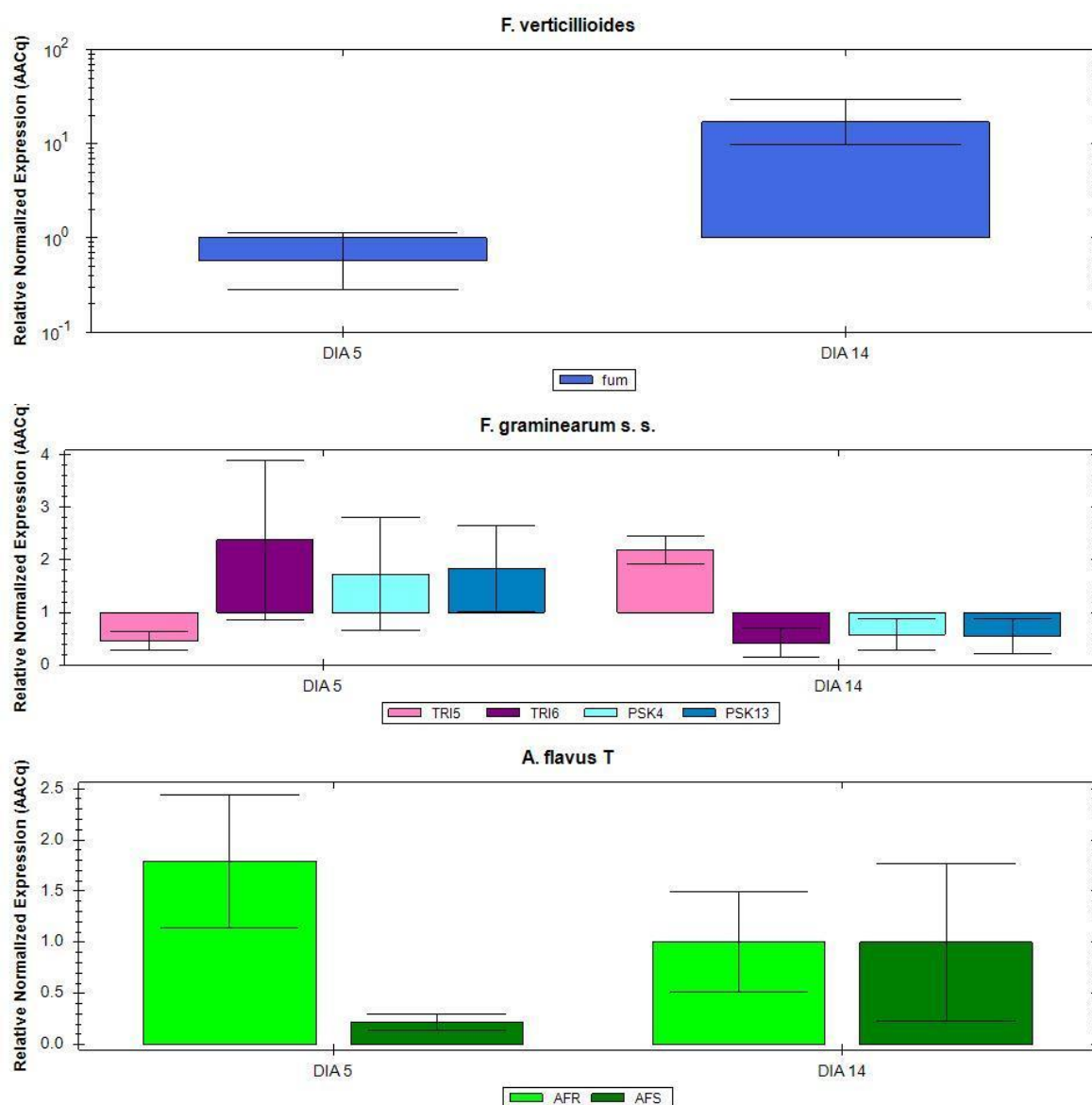


Figura 4-10. Niveles de expresión de los diferentes genes involucrados en la síntesis de toxinas para cada una de las especies estudiadas (*fum1*, *tri5*, *tri6*, *psk4*, *psk13*, *afR*, *afS*) a los 5 y 14 días de incubación en las muestras control.

Fusarium verticillioides

Se estudiaron los niveles de expresión del gen *fum1* como responsable de la síntesis de fumonisinas en cepas de *F. verticillioides*, en presencia de otras especies fúngicas. Sin embargo, no se observaron variaciones en sus niveles de expresión, por lo que la expresión de este gen no estaría condicionado por la presencia de otras especies (Figura 4-11).

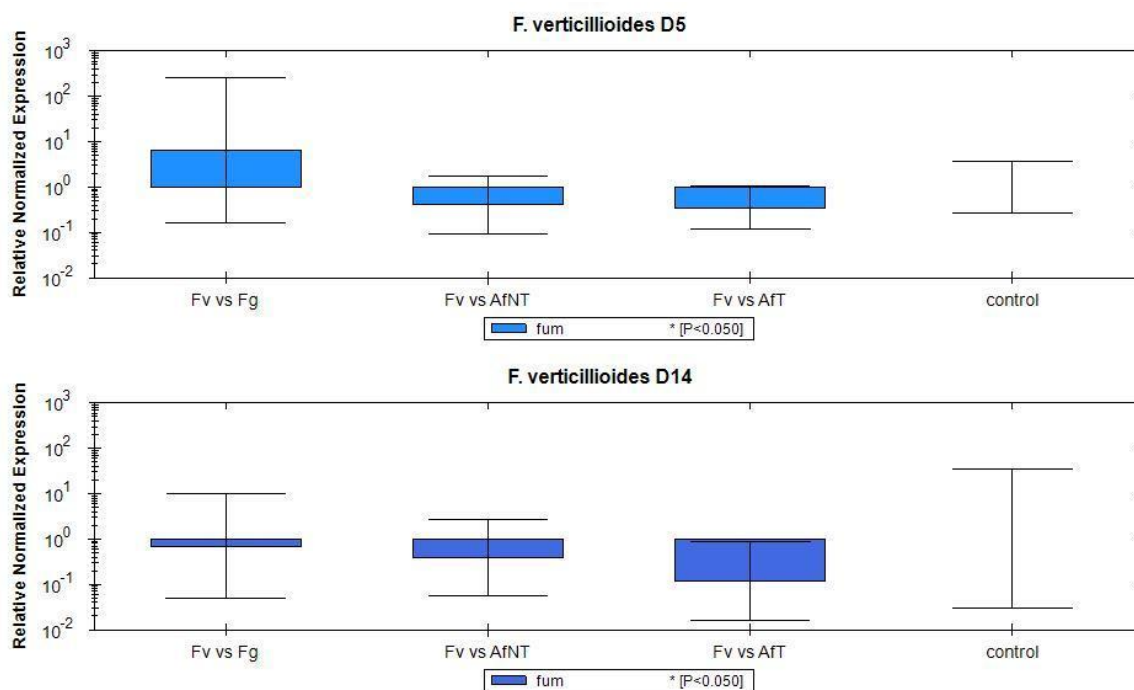


Figura 4-11. Niveles de expresión del gen FUM1 por *F. verticillioides* a los 5 y 14 días de incubación en presencia de *F. graminearum* s. s. (Fg) y *A. flavus* toxicogénico (AfT) y no toxicogénico (AfNT). Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) respecto al control.

Fusarium graminearum s. s.

Para determinar si existen variaciones en la síntesis de tricotecenos por *F. graminearum* s. s. en presencia de otras especies toxicogénicas, se estudió la expresión de los genes *tri 5* y *tri 6* vinculados a la síntesis de DON y los genes *psk4* y *psk13* asociados a la síntesis de ZEA. Si bien en presencia de *F. verticillioides* al día 5 se observó un aumento significativo en la expresión de *tri5*, esto no se mantuvo al día 14, sin evidenciarse variaciones significativas en la expresión de ninguno de los genes vinculados a la biosíntesis de DON en presencia de *F. verticillioides*. Sin embargo, la expresión de genes vinculados a la síntesis de ZEA sí mostró diferencias significativas respecto al control en presencia de *F. verticillioides*, observándose una disminución de la expresión de *psk4* y *psk13* tanto a los 5 como a los 14 días de incubación frente a *F. verticillioides* (Figura 4-12). Los genes *tri* no mostraron variaciones significativas en su expresión en presencia de cepas de *A. flavus* no toxicogénicas. Sin embargo, el gen *tri5* mostró diferencias significativas a los 5 días de incubación en presencia de *A. flavus* toxicogénico, pero esto no se mantuvo a los 14 días de incubación. Nuevamente se observaron variaciones en la expresión de genes vinculados a la síntesis de ZEA, en este caso se vio un aumento significativo de la expresión al día 14 de incubación en presencia de cepas de *A. flavus* (Figura 4-12).

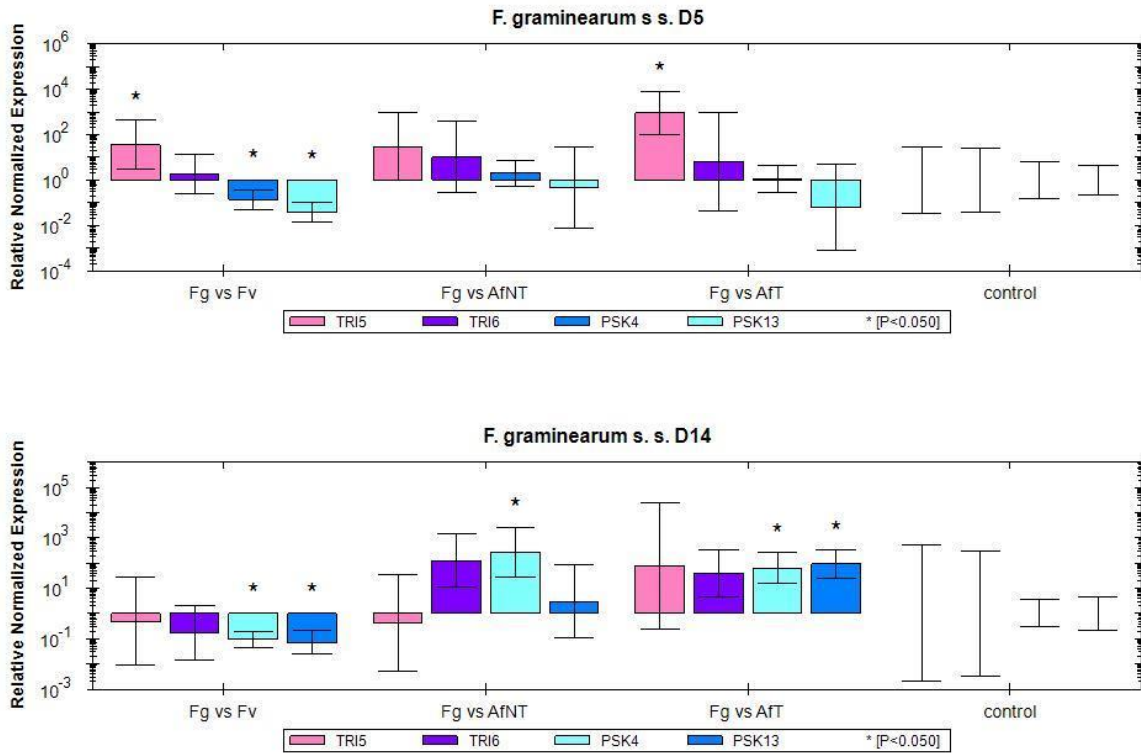
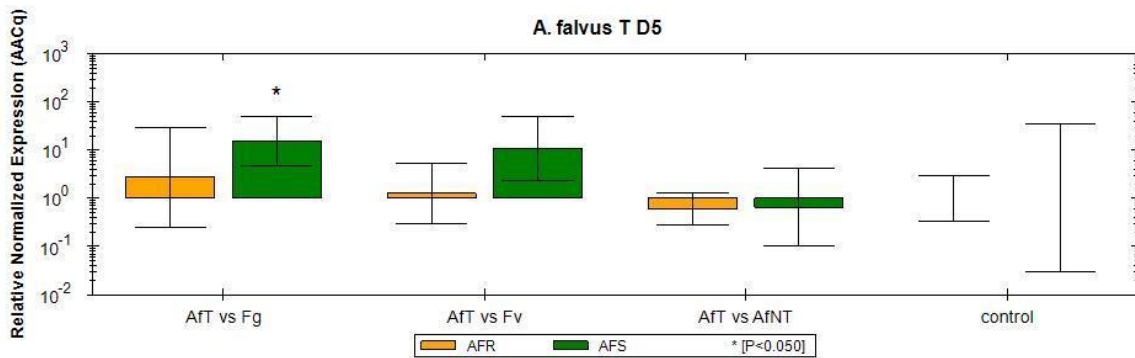


Figura 4-12. Niveles de expresión de los genes *tri5*, *tri6*, *psk13* y *psk4* por *F. graminearum* s. s. (Fg) a los 5 y 14 días de incubación en presencia de *F. verticillioides* (Fv) y *A. flavus* toxicogénico (AfT) y no toxicogénico (AfNT). Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto al control.

Aspergillus flavus

Las variaciones en la expresión de aflatoxinas en los distintos ensayos realizados se evaluaron en función de los niveles de expresión de los genes *aflR* y *aflS*. En presencia de *F. graminearum* s. s. se observó un aumento significativo en la expresión de ambos genes en la cepa de *A. flavus* toxicogénica respecto al control. Por otro lado, en presencia de *F. verticillioides* y *A. flavus* no toxicogénico, se vio un aumento significativo en la expresión únicamente del gen *aflR* al día 14 de incubación respecto al control (Figura 4-13).



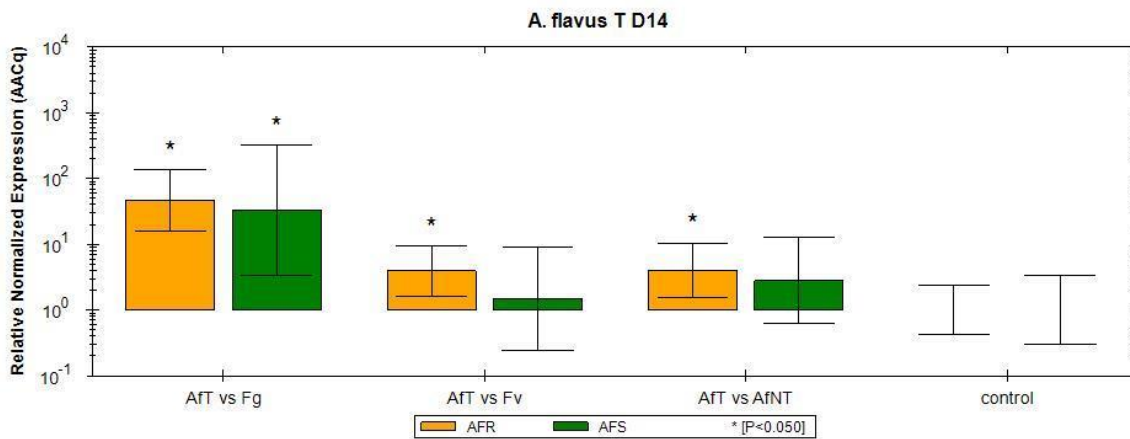


Figura 4-13. Niveles de expresión de los genes *afIR* y *afIS* por *A. flavus* (AfT) a los 5 y 14 días de incubación en presencia de *F. graminearum* s. s. (Fg), *F. verticillioides* (Fv) y *A. flavus* no toxicogénico (AfNT). Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto al control.

MICOTOXINAS

Se analizaron los niveles de fumonisinas presentes en las muestras a los 14 días de incubación en todas las muestras inoculadas con cepas de *F. verticillioides*. Se analizaron las cepas de *F. verticillioides* por separado debido a que presentaron diferentes perfiles toxicogénicos y diferencias significativas en los rangos de producción de toxinas. La cepa A68 produjo tanto FB1 como FB2 mientras que la cepa A52 produjo únicamente FB1. Los niveles de producción de FB1 para la muestra control de la cepa A68 promedió los 37 mil $\mu\text{g}/\text{kg}$, mientras que para la cepa 52 el promedio fue de 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$. En el estudio de la cepa A68, la concentración de FB1 superó la de FB2 en todos los casos. Tanto la presencia de *F. graminearum* s. s. como *A. flavus* generó una disminución significativa de la síntesis de ambas fumonisinas, siendo ésta más significativa en presencia de cepas de *A. flavus*. Se inhibió la producción de fumonisinas al 50% en presencia de *F. graminearum* s. s., 89% en presencia de *A. flavus* no toxicogénicos y 94% frente a *A. flavus* toxicogénico (Figura 4-14).

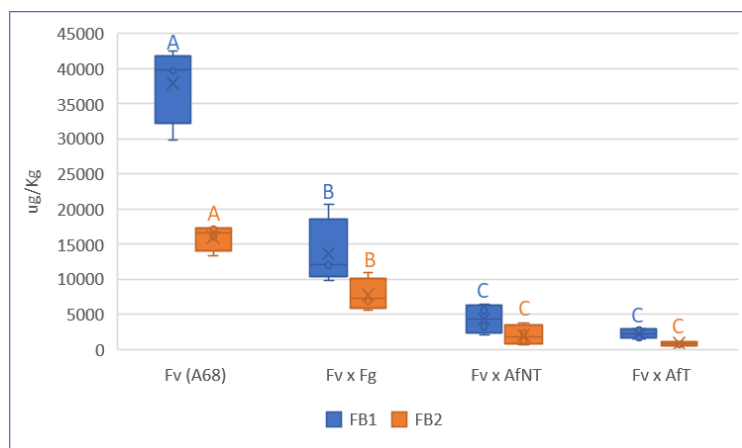


Figura 4-14. Niveles de FB1 y FB2 ($\mu\text{g/kg}$) producidas por la cepa A68 de *F. verticillioides* y en presencia de *F. graminearum* s. s. (Fg) y cepas toxicogénicas y no toxicogénicas de *A. flavus* (AfT y AfNT, respectivamente). Las letras sobre las cajas indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control (A68), (Fisher LSD $p < 0.05$).

En relación a la cepa A52, también se observó un descenso significativo en la síntesis de FB1 en presencia de todas las cepas estudiadas (Figura 4-15).

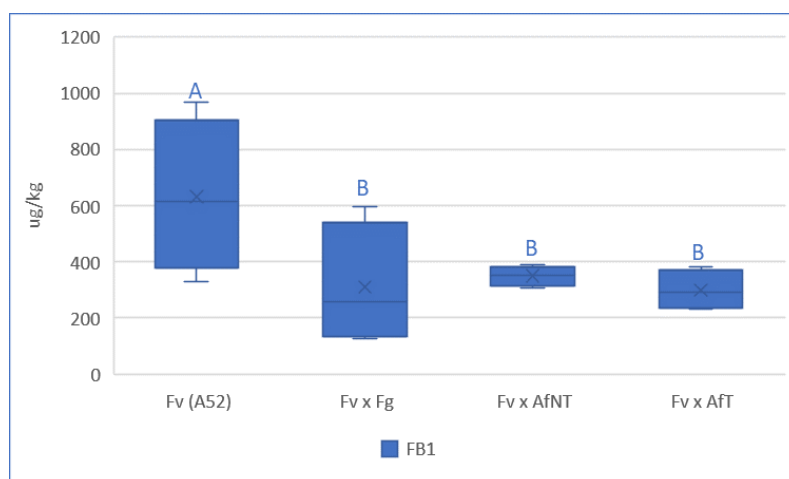


Figura 4-15. Niveles de FB1 ($\mu\text{g/kg}$) producidas por la cepa A52 de *F. verticillioides* y en presencia de *F. graminearum* s. s. (Fg) y cepas toxicogénicas y no toxicogénicas de *A. flavus* (AfT y AfNT, respectivamente). Las letras sobre las cajas indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control (A52), (Fisher LSD $p < 0.05$).

Se analizó la presencia de DON y ZEA en los ensayos en los que estaba presente la cepa de *F. graminearum* s. s.. La toxina mayormente encontrada fue DON, seguida de ZEA. Para el caso de DON no se observaron diferencias en sus niveles de síntesis en presencia de la cepa de *A. flavus* no toxicogénica. Sin embargo, tanto la presencia de *A. flavus* toxicogénica como la presencia de *F. verticillioides*, generaron una disminución significativa en su síntesis, siendo ésta más marcada en presencia de *F. verticillioides*, con una disminución del 75% en la producción de DON para *F. verticillioides* y del 42% para *A. flavus* (Figura 4-16). Por el contrario, la presencia de la cepa de *A. flavus* toxicogénica generó un aumento significativo en la síntesis de ZEA. En presencia de las

otras especies estudiadas, no se observó un cambio significativo respecto al control (Figura 4-16).

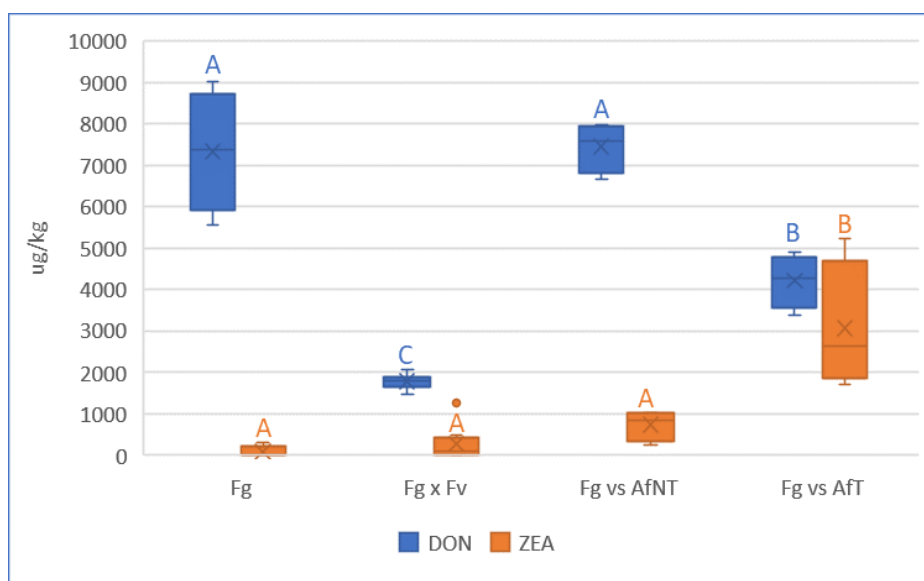


Figura 4-16. Niveles de DON y ZEA (ug/Kg) producidas por la cepa A368 de *F. graminearum* s. s. en presencia de *F. verticillioides* (A68 y A52) y cepas toxicogénicas y no toxicogénicas de *A. flavus* (A36 y A631, respectivamente). Las letras sobre las cajas indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control (A368), (Fisher LSD $p < 0.05$).

Se estudiaron las variaciones en los niveles de aflatoxinas en las muestras correspondientes a los distintos ensayos. Se determinó la presencia de AFB1 y AFB2, no habiéndose detectado en ninguna de las muestras aflatoxinas del tipo G. Se pudo observar que la AFB1 se encontró en niveles mayores respecto a la AFB2 y que en presencia de todas las especies estudiadas los niveles de ambas aflatoxinas disminuyeron de forma significativa respecto al control (Figura 4-17). La presencia de *A. flavus* no toxicogénica provocó niveles de inhibición de la síntesis de AFB1 del 90% (Figura 4-17).

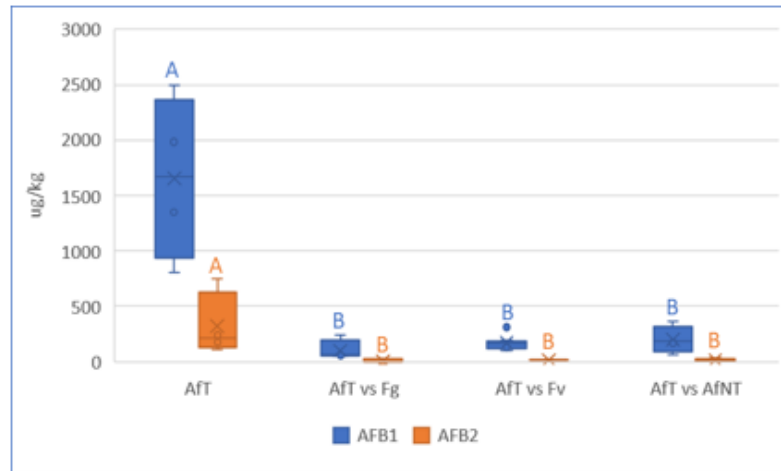


Figura 4-17. Niveles de AFB1 y AFB2 ($\mu\text{g/Kg}$) producidas por *A. flavus* en presencia de *F. graminearum* s. s. (Fg), *F. verticillioides* (Fv) y la cepa no toxicogénica de *A. flavus* (AfNT). Las letras sobre las cajas indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control, (Fisher LSD $p < 0.05$).

Discusión

La ocurrencia de *F. verticillioides*, *F. graminearum* s. s. y *A. flavus* ha sido informada con frecuencia asociada a granos de maíz (Pearson y Wicklow, 2006; Mukanga et al., 2010; Krnjaja et al., 2019). La presencia de hongos de diferentes especies en un mismo sustrato puede tener diferentes implicancias tanto a nivel del desarrollo como de la síntesis de toxinas, pudiendo generar tanto efecto aditivo como supresor de estas últimas. Por otro lado, también es sabido que las condiciones ambientales juegan un papel clave en la determinación del desarrollo de estas especies cuando éstas coexisten. Pudiendo ser estos, determinantes fundamentales en el establecimiento de la dominancia de una especie frente a otra. Las condiciones seleccionadas que permitieron implementar los diferentes ensayos (a_w de 0.95 y 25°C) estuvieron basadas principalmente en las condiciones climáticas asociadas a la zafra del cultivo en nuestro país y en el hecho que permiten el desarrollo de todas las especies seleccionadas haciendo posible evaluar el efecto de la interacción entre las mismas.

En relación al efecto de la interacción en el crecimiento fúngico, a través de la evaluación de los niveles de biomasa para cada una de las especies estudiadas en los distintos ensayos, pudimos observar que, en general, la tendencia es hacia la reducción de biomasa en presencia de otras especies. Únicamente dos interacciones tuvieron un efecto diferente sobre los niveles de biomasa, *F. verticillioides* en presencia de *F. graminearum* s. s., en la que se vio que la presencia de este último no genera un impacto en el crecimiento del primero y *A. flavus* toxicogénico que no se vio afectada

por la presencia de la cepa de *A. flavus* no toxicogénica. El hecho de que el crecimiento de *F. verticillioides* no se vea afectado por la presencia de *F. graminearum*, pero que sí exista una reducción de los niveles de biomasa de *F. graminearum* en presencia de *F. verticillioides*, en conjunto con la determinación de este último como la principal especie contaminante del maíz evidenciado en los capítulos anteriores, pone de manifiesto el alto grado de asociación de esta especie y el cultivo de maíz. Es en este sentido que algunos autores plantean que la predominancia de *F. verticillioides* podría ser explicada considerando a la infección por esta especie como disuasivo para la contaminación con otros hongos y pudiendo de cierta forma proteger mazorcas de maíz contra la contaminación por otros patógenos (Wicklow et al., 1988; Velluti, 2002). Así mismo, hay quienes plantean que *F. verticillioides* es de las primeras especies que colonizan las mazorcas de maíz en el campo, infectando los granos antes que otros hongos confiriéndoles esto una ventaja temporal para la colonización del nicho frente al resto de los competidores (Hesseltine y Bothast 1977; King, 1981). Esto puede no verse completamente reflejado en este estudio en el que el inóculo de las diferentes especies fue concomitante, no necesariamente reflejando una situación que ocurriría naturalmente en campo. Sin embargo, en los resultados obtenidos de la evaluación de ambas especies en campo, se vio un claro predominio de *F. verticillioides* no solo frente a *F. graminearum*, sino también frente a *A. flavus*, en sintonía con lo antes mencionado. Hay quienes sugieren que el crecimiento de *A. flavus* estaría más afectado por la presencia de *F. verticillioides* que de *F. graminearum* en plantas de maíz (Giorni et al., 2019), si bien no se observa este comportamiento en nuestro trabajo *in vitro*, esto también va en línea con la predominancia de *F. verticillioides* frente al resto de las especies como contaminante del maíz. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la presencia de otras especies en el maíz genera un efecto en el crecimiento de todas las especies estudiadas, evidenciando así, su rol como competidores.

Cuando analizamos los resultados correspondientes a los niveles de expresión de genes involucrados en las rutas biosintéticas de las diferentes toxinas en función del tiempo de incubación vemos un marcado aumento en las concentraciones del gen asociado a la síntesis de fumonisinas en comparación con la expresión de genes en las otras especies estudiadas además del aumento en función del tiempo. A su vez, cuando analizamos los distintos co-inóculos, podemos ver que los niveles de expresión del gen *fum1* no se modifica por la presencia de otras especies. Así mismo, si consideramos que los niveles de biomasa se vieron significativamente reducidos en presencia de competidores podemos inferir, bajo estas circunstancias, una sobreexpresión génica por unidad de biomasa respecto al control. Pudiendo todo ésto correlacionarse con el rol ecológico de las micotoxinas como mecanismo de respuesta frente a competidores, considerando que es el principal contaminante del sustrato, en línea con lo anteriormente mencionado en relación a los niveles de

biomasa. Sin embargo, el aumento en la expresión del gen *fum1* no se correlaciona con los niveles de FBs encontrados en las muestras, las cuales disminuyeron de forma significativa respecto a los controles. En este sentido, es posible que a pesar de una sobreexpresión del gen *fum1*, implicado en los pasos iniciales de la ruta biosintética de las fumonisinas, existan interacciones corriente abajo en la expresión de genes de esta ruta que llevan a una menor concentración final de estas toxinas, así como también es posible que exista una degradación posterior de la toxina ya sintetizada disminuyendo así su concentración final. Podemos concluir que la síntesis de toxinas se ve afectada por la presencia de diferentes especies disminuyendo su síntesis significativamente, a pesar de generar un aumento de la expresión génica por unidad de biomasa del gen *fum1*. Otros autores reportan resultados *in vitro* similares a los aquí obtenidos cuando *F. verticillioides* se co-inocula en presencia de especies de *A. flavus* y *F. graminearum* (Marin et al., 1998).

Por otro lado, del análisis de la expresión de genes para la síntesis de toxinas por la cepa estudiada de *F. graminearum* s. s. se pudo concluir que en presencia de las distintas especies estudiadas no se observó variación significativa en la expresión de los genes involucrados en la síntesis de tricotecenos respecto al control a los 14 días de incubación. Sin embargo, en el análisis de toxinas en las muestras se vieron variaciones significativas en las concentraciones de DON, evidenciándose un descenso significativo en su concentración en presencia de *A. flavus* toxigénico y un descenso aún más significativo en presencia de *F. verticillioides*. Si bien hay autores que postulan que la síntesis de DON podría ser considerada una estrategia de defensa frente a competidores, particularmente *F. verticillioides* (Velluti et al. 2000), nuestros resultados no evidencian dicho mecanismo. El hecho de que no se observen variaciones en relación a la expresión de los genes estudiados, pero sí haya una disminución en la concentración final de toxina en la muestra analizada, podría ser consecuencia de interacciones que ocurren a nivel de genes de la ruta biosintética que no fueron estudiados en este trabajo. Así mismo, el hecho de que en presencia de *A. flavus* no toxicogénico no se vieran variaciones en las concentraciones de DON mientras que frente a *A. flavus* toxicogénico se evidenciara un descenso significativo en su concentración hace pensar en un rol restrictivo para la síntesis de DON ejercido por las aflatoxinas. Por otro lado, el comportamiento de la expresión de los genes involucrados en la síntesis de ZEA fue bastante diferente al de los genes de tricotecenos. Si bien se observó un aumento significativo en su expresión tanto en el control como frente *A. flavus* y un descenso significativo frente a *F. verticillioides*, la concentración de ZEA en las muestras en los distintos ensayos no difirieron respecto al control. Únicamente en presencia de *A. flavus* toxigénico las concentraciones de ZEA en las muestras fueron significativamente mayores, coincidente con la sobreexpresión génica previamente mencionada. El aumento significativo en las concentraciones de ZEA frente a la cepa toxicogénica de *A. flavus* podría ser interpretado como un mecanismo de

defensa frente a la presencia de aflatoxinas, si bien hace falta más evidencia para poder concluirlo. Sin bien las otras variaciones observadas en la expresión génica no se vieron reflejadas en la concentración de la toxina en las muestras, el descenso significativo de la expresión de genes en presencia de *F. verticillioides* parece indicar un efecto restrictivo de esta especie sobre *F. graminearum*, como se mencionó anteriormente. Al igual que en el trabajo de Velluti et al., 2000, se observó que la presencia de *F. verticillioides* no genera modificaciones en los niveles de síntesis de ZEA.

Finalmente, del estudio de la expresión de genes involucrados en la síntesis de aflatoxinas por *A. flavus* se pudo concluir que si bien en presencia de todas las especies estudiadas se evidenció un aumento significativo en el gen promotor de ruta biosintética de las aflatoxinas, los niveles, tanto de AFB1 como AFB2, encontrados en las muestras fueron significativamente menores respecto al control. Esto podría deberse a la activación de algún mecanismo que pudiera inhibir la traducción de estos mensajeros determinando una disminución en la activación de la ruta biosintética de las aflatoxinas, y en consecuencia, la presencia de estas toxinas en las muestras. Si bien hay autores que postulan que *A. flavus* se vería más afectado por la presencia de *F. verticillioides* que de *F. graminearum* s. s., viéndose esto reflejado no solo en el crecimiento sino también en la síntesis de toxinas (Giorni et al., 2019), en este trabajo este comportamiento no se vio reflejado, generando la presencia de ambos disminución en la síntesis de aflatoxinas en niveles similares. La diferencia en el comportamiento entre el crecimiento fúngico (biomasa) y la síntesis de toxinas ha sido reportado previamente por otros autores (Obradovic et al., 2018; Giorni et al., 2019). En estos trabajos no se observó correlación positiva en el crecimiento entre *A. flavus* y *F. verticillioides*, mientras que sí se observó una correlación significativa positiva entre sus micotoxinas, no siendo así para el caso de nuestro trabajo en el que los niveles de ambas toxinas disminuyen cuando estas especies coexisten.

Con base en los resultados aquí obtenidos podemos concluir que la coexistencia de especies de *F. graminearum* s. s., *F. verticillioides* y *A. flavus* impacta en el crecimiento y expresión génica de las mismas. A su vez, vimos que no existe una correlación directa entre los niveles de expresión de los genes estudiados y las concentraciones de las toxinas en las muestras, concluyendo que ésta no sería una herramienta válida para predecir las concentraciones de micotoxinas en las muestras, al menos con base en los genes aquí seleccionados. También podemos concluir que si bien la presencia de diferentes especies toxigénicas implica la posibilidad de contaminación del sustrato con más de una toxina, en general los niveles de las mismas se reducen cuando las distintas especies coexisten.

Bibliografía

- Abdel-Hadi, A., Caley, D., Carter, D., Magan, N., 2011. Control of aflatoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* using RNA silencing technology by targeting aflD (nor-1) gene. *Toxins*, 3, 647–659.
- Bracarense, A., Luciola, J., Grenier, B., Pacheco, G., Moll, W., Schatzmayr, G., Oswald, I., 2012. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. *British Journal of Nutrition*, 107(12), 1776-1786.
- Butchko, R., Plattner, R., Proctor, R., 2006. Deletion analysis of FUM genes involved in tricarballic ester formation during fumonisin biosynthesis. *J Agric Food Chem.* 54:9398–9404.
- Chen, Y., Kistler, H., Ma, Z., 2019. *Fusarium graminearum* trichothecene mycotoxins: biosynthesis, regulation, and management. *Annu. Rev. Phytopathol.* 57, 15-39.
- Dewick, P., 2001. The acetate pathway: fatty acids and polyketides, p. 35–117. In P. N. Dewick (ed.), *Medicinal natural products. A biosynthetic approach*, 2nd ed. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, England
- Diao, X., Han, Y., Liu, C., 2018. The fungicidal activity of tebuconazole enantiomers against *Fusarium graminearum* and its selective effect on DON production under different conditions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(14), 3637-3643.
- Du, W., Obrian, G., Payne, G., 2007. Function and regulation of aflJ in the accumulation of aflatoxin early pathway intermediate in *Aspergillus flavus*. *Food additives and contaminants*, 24(10), 1043-1050.
- Ehrlich, K., Cary, J., Montalbano, B., 1999a. Characterization of the promoter for the gene encoding the aflatoxin biosynthetic pathway regulatory protein AFLR. *BBA- Gene Struct. Expr.*, 1444, 412–417.
- Ehrlich, K., Montalbano, B., Cary, J., 1999b. Binding of the C6-zinc cluster protein, AFLR, to the promoters of aflatoxin pathway biosynthesis genes in *Aspergillus parasiticus*. *Gene*, 230, 249–257.
- Ehrlich, K., Yu, J., Cotty, P., 2005. Aflatoxin biosynthesis gene clusters and flanking regions. *Journal of Applied Microbiology*, 99(3), 518-527.
- Fernandes, M., Keller, N., Adams, T., 1998. Sequence-specific binding by *Aspergillus nidulans* AflR, a C6 zinc cluster protein regulating mycotoxin biosynthesis. *Mol. Microbiol.*, 28, 1355–1365.

- Gaffoor, I., Trail, F., 2006. Characterization of two polyketide synthase genes involved in zearalenone biosynthesis in *Gibberella zeae*. Appl. Environ. Microbiol.;72:1793–1799.
- Giorni, P., Magan, N., Battilani, P., 2009. Environmental factors modify carbon nutritional patterns and niche overlap between *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* strains from maize. Int. J. Food Microbiol. 130, 213e218.
- Giorni, P., Bertuzzi, T., Battilani, P., 2019. Impact of fungi co-occurrence on mycotoxin contamination in maize during the growing season. Frontiers in microbiology, 10, 461889.
- Glenn, A., Zitomer, N., Zimeri, A., Williams, L., Riley, R., Proctor, R., 2008. Transformation-mediated complementation of a FUM gene cluster deletion in *Fusarium verticillioides* restores both fumonisin production and pathogenicity on maize seedlings. Mol Plant Microbe Interact. Jan;21(1):87-97.
- Huffman J., Gerber R., Du L. Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins. Biopolymers. 2010;93:764–776.
- Juroszek, P., von Tiedemann, A., 2013. Climate change and potential future risks through wheat diseases: a review. European Journal of Plant Pathology, 136, 21-33.
- King, S., 1981. Time of infection of maize kernels by *Fusarium moniliforme* and *Cephalosporium acremonium*. Phytopathology 71: 796–799.
- Krnjaja, V., Mandić, V., Stanković, S., Obradović, A., Vasić, T., Lukić, M., Bijelić, Z., 2019. Influence of plant density on toxigenic fungal and mycotoxin contamination of maize grains. Crop Protection, 116, 126-131.
- Leslie, J., Summerell, B., 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell publishing, Iowa, USA.
- Lysøe, E., Klemsdal S., Bone K., Frandsen R., Johansen T., Thrane U., y Henriette G. The PKS4 Gene of *Fusarium graminearum* Is Essential for Zearalenone Production. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, June 2006, p. 3924–3932 Vol. 72, No. 6
- Marín, S., V. Sanchis, F. Rull, A. J. Ramos, and N. Magan. 1998. Colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in the presence of competing fungi and their impact on fumonisin production. J. Food Prot. 61:1489–1496.
- Mahato D.K., Devi S., Pandhi S., Sharma B., Maurya K.K., Mishra S., Dhawan K., Selvakumar R., Kamle M., Mishra A.K., et al. Occurrence, impact on agriculture, human health, and management strategies of zearalenone in food and feed: A review. Toxins. 2021;13:92.
- Meyers, D., Obrian, G., Du, W., Bhatnagar, D., Payne, G., 1998. Characterization of aflJ, a gene required for conversion of pathway intermediates to aflatoxin. Applied and Environmental Microbiology, 64(10), 3713-3717.

- Miraglia, M., Marvin, H. J. P., Kleter, G. A., Battilani, P., Brera, C., Coni, E., Cubadda, F., Croci, L., De Santis, B., Dekkers, S., Filippi, L., Hutjes, R., Noordam, M., Pisante, M., Piva, G., Prandini, A., Toti, L., van den Born, G., Vespermann, A., 2009. Climate change and food safety: an emerging issue with special focus on Europe. *Food and chemical toxicology*, 47(5), 1009-1021.
- Mukanga, M., Derera, J., Tongoona, P., Laing, M., 2010. A survey of pre-harvest ear rot diseases of maize and associated mycotoxins in south and central Zambia. *International journal of food microbiology*, 141(3), 213-221.
- Mylroie, J., Ozkan, S., Shivaji, R., Windham, G., Alpe, M., Williams, W., 2016. Identification and quantification of a toxigenic and non-toxigenic *Aspergillus flavus* strain in contaminated maize using quantitative real-time PCR. *Toxins*, 8(1), 15.
- Nicolaisen, M., Supronienė, S., Nielsen, L., Lazzaro, I., Spliid, N., Justesen, A., 2009. Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. *Journal of Microbiological Methods*, 76(3), 234-240.
- Obradović, A., Krnjaja, V., Nikolić, M., Delibašić, G., Filipović, M., Stanković, G., Stanković, S., 2018. Impacts of climatic conditions on aflatoxin B 1 and fumonisins contamination of maize kernels and their co-occurrence. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 34(4), 469-480.
- Pearson, T. C., & Wicklow, D. T. (2006). Detection of corn kernels infected by fungi. *Transactions of the ASABE*, 49(4), 1235-1245.
- Peromingo, B., Rodríguez, M., Delgado, J., Andrade, M., Rodríguez, A., Gene expression as a good indicator of aflatoxin contamination in dry-cured ham, *Food Microbiology* (2017)
- Scala V., Visentin I., y Cardinale F., 2017. Evaluating Fumonisin Gene Expression in *Fusarium verticillioides*. *Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 1542, capítulo 16. Antonio Moretti and Antonia Susca (eds.)
- Skory, C., Chang, P., Cary, J., Linz, J., 1992. Isolation and characterization of a gene from *Aspergillus parasiticus* associated with the conversion of versicolorin A to sterigmatocystin in aflatoxin biosynthesis. *Applied and environmental microbiology*, 58(11), 3527-3537.
- Stępień, L., Koczyk, G., Waśkiewicz, A., 2011. FUM cluster divergence in fumonisins-producing *Fusarium* species. *Fungal Biology* 115(2), 0–123.
- Suzuki, T., Iwahashi, Y., 2012. Comprehensive gene expression analysis of type B trichothecenes. *J. Agric. Food Chem.* 60, 9519-9527.
- Proctor RH, Hohn TM, McCormick SP, Desjardins AE. Tri6 encodes an unusual zinc finger protein involved in regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides*. *Appl Environ Microbiol* 1995;61: 1923–30.

- Proctor RH, Desjardins AE., Plattner R.D., Hohn TM. 1999. A poliketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. Fungal Genet. Biol., 27, pp. 100-112
- Proctor, R., Plattner, R., Desjardins, A. Busaman, M., Butchko, R., 2006. Fumonisin production in the maize pathogen *Fusarium verticillioides*: genetic basis of naturally occurring chemical variation. J. Agric. Food Chem., 54, pp. 2424-2430
- Hesseltine, C. W., and R. J. Bothast. 1977. Mold development in ears of corn from tasseling to harvest. Mycologia 69:328–340.
- Hopwood, D. A. 1997. Genetic contributions to understanding polyketide synthases. Chem. Rev. 97:2465–2497.
- Kennedy, J., K. Auclair, S. G. Kendrew, C. Park, J. C. Vederas, and C. R. Hutchinson. 1999. Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis. Science 284:1368–1372.
- Kim, Y., Lee, Y., Jin, J., Han, K., Kim, H., Kim, J., Lee, T., Yun, S., Lee, Y., 2005. Two different polyketide synthase genes are required for synthesis of zearalenone in *Gibberella zeae*. Molecular microbiology, 58(4), 1102-1113.
- Kimura, M., Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Ohsato, S., Fujimura, M., 2007. Molecular and Genetic Studies of *Fusarium* Trichothecene Biosynthesis: Pathways, Genes, and Evolution.
- Kolawole, O., Meneely, J., Petchkongkaew, A., Elliott, C., 2021. A review of mycotoxin biosynthetic pathways: Associated genes and their expressions under the influence of climatic factors. Fungal Biol. Rev. 37, 8–26
- Kristensen, R., Mona, T., Kosiak, B., Holst-Jensen, A., 2005. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. Mycological research, 109(2), 173-186.
- Van den Berg, C., 1985. Development of BET-like models for sorption of water on foods, theory and relevance. In Properties of water in foods: in relation to quality and stability (pp. 119-131). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Velluti, A., Marín, S., Bettucci, L., Ramos, A., Sanchis, V., 2000. The effect of fungal competition on colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* and on fumonisin B1 and zearalenone formation. Int J Food Microbiol 59:59±66
- Velluti, A., 2002. Ecofisiología de especies de *Fusarium* productoras de fumonisinas, zearalenona y deoxinivalenol en maíz: aceites esenciales como inhibidores fúngicos. Universitat de Lleida.

- Wicklow, D., Horn, B., Shotwell, O., Hesseltine, C., Caldwell, R., 1988. Fungal interference with *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination of maize grown in a controlled environment. *Phytopathology* 78:68–74.
- Yu, J., Chang, P. , Ehrlich, K., Cary, J., Bhatnagar, D., Cleveland, T., Payne, G., Linz, J., Woloshuk C., Bennett, J., 2004. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied and environmental microbiology*, 70(3), 1253-1262.
- Zeng, H., Cai, J., Hatabayashi, H., Nakagawa, H., Nakajima, H., Yabe, K., 2020. VerA gene is involved in the step to make the xanthone structure of demethylsterigmatocystin in aflatoxin biosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 6389.

Discusión general.

El trabajo realizado tiene como objetivo principal conocer y caracterizar las especies fúngicas toxicológicas asociadas al maíz, y en base a lo encontrado, implementar estrategias de manejo del cultivo que permitan disminuir el impacto de estas especies, así como también estudiar el efecto de la interacción entre los distintos contaminantes fúngicos.

El cultivo de maíz en nuestro país ha tenido un gran desarrollo con aumento de la superficie sembrada en el último periodo de tiempo (Methol, 2021). Este cultivo suele destinarse a alimentación animal en nuestro país, y es un cultivo en el cual el uso de fungicidas no es una práctica habitual a nivel mundial. Sin embargo, la contaminación de este cultivo por especies fúngicas es muy frecuente, principalmente por especies toxicogénicas, siendo considerado uno de los cultivos más susceptibles a la contaminación con micotoxinas a nivel mundial (Barug et al., 2004). Considerando las especies toxicogénicas contaminantes del maíz, las pertenecientes al género *Fusarium* fueron las predominantes y dentro de éste, la especie *F. verticillioides*. Estos resultados concuerdan con los reportados en la región por autores de Argentina y Brasil (van der Westhuizen et al., 2003; Stumpf et al., 2013; Castañares et al., 2019). A su vez, esta especie se caracteriza por ser una de las principales productoras de fumonisinas. En concordancia, las fumonisinas fueron las toxinas con mayor incidencia en el total de muestras analizadas, y la mayoría de las cepas analizadas fueron capaces de producirlas. Otras especies toxigénicas encontradas fueron *F. graminearum* s.s. y *A. flavus*. La prevalencia de *F. graminearum* s. s. en relación a otras especies del complejo FGSC asociadas a este cultivo en nuestro país, podría estar en relación con grandes extensiones de cultivos, fuertemente asociados a la contaminación por este patógeno.

En relación a la síntesis de toxinas, las cepas de *F. graminearum* s. s. fueron en su mayoría productoras de ZEA, seguido de DON y NIV. A su vez, al igual que otros autores (Beccari et al., 2017), se puso de manifiesto la discordancia entre quimiotipos y genotipos reafirmando la importancia de la determinación de quimiotipos en esta especie. En relación a las cepas de *A. flavus*, éstas se presentaron en baja incidencia presumiblemente por condiciones climáticas inadecuadas para su desarrollo y en su mayoría fueron no toxicogénicas, como se reportó previamente en especies de nuestro país (del Palacio y Pan, 2020), disminuyendo el riesgo de contaminación del cultivo con las toxinas de esta especie, como se demostró en la determinación de toxinas en granos de maíz. En relación con la ecofisiología para el crecimiento y síntesis de toxinas de *F. graminearum* s.s., *F. verticillioides* y *A. flavus*, en general la temperatura es el principal determinante ecofisiológico. El crecimiento de las especies de *Fusarium* se ve favorecido a temperaturas de 25°C y aw de 0.98-0.995 mientras que *A. flavus* crece mejor a 30°C y aw de 0.98. En relación a la síntesis de toxinas asociadas

a las especies estudiadas, todas se ven favorecidas a temperaturas en torno a los 24°C, mientras que los niveles óptimos de aw varían según la especie, requiriendo *F. verticillioides* aw más elevadas, mientras que *F. graminearum* s.s. y *A. flavus* se asociaron aw más bajas. Esto, sumado a que en Uruguay, en los meses de verano hay una tendencia hacia las altas temperaturas y variaciones extremas en las precipitaciones, es esperable la prevalencia de *F. verticillioides*.

En relación a la evaluación de la sensibilidad a fungicidas de *F. verticillioides* y *F. graminearum*, s.s. se logró determinar que las cepas más resistentes pertenecieron a *F. graminearum* s.s., probablemente vinculado a mayor exposición al uso de fungicidas en otros cultivos. Para ambas especies el metconazol fue el fungicida con mayor eficiencia en el control del crecimiento. Y este fue el primer trabajo en reportar sensibilidad de *F. verticillioides* frente a epoxiconazol y carbendazim.

La coexistencia de especies de *F. graminearum* s. s., *F. verticillioides* y *A. flavus* demostró que, en general, la presencia de otras especies genera una disminución en los niveles de biomasa y esto pone en evidencia su rol como competidores. A su vez, se puso de manifiesto el alto grado de asociación de la especie *F. verticillioides* al maíz, considerando que su presencia genera disminuciones de biomasa en todos sus competidores, mientras que sus niveles de biomasa no se modifican en presencia de *F. graminearum* que es el segundo contaminante en incidencia. En este sentido también, los niveles de expresión de genes asociados a la síntesis de toxinas por esta especie aumentan a lo largo del tiempo y no se modifican en presencia de competidores. Esto pone de manifiesto un posible rol de esta especie como disuasivo para la contaminación con otros hongos, así como también se plantea que se vea favorecido por una ventaja temporal ya que suele ser de los primeros contaminantes en invadir el cultivo (Wicklow et al., 1988; Velluti, 2002; Hesseltine y Bothast 1977; King, 1981). Por otro lado se vio que la variación en expresión de genes asociados a la síntesis de micotoxinas no siempre se correlaciona con los niveles de toxinas encontrados en las muestras, observándose discretas variaciones en su expresión en presencia de otras especies toxicogénicas. Sin embargo de la determinación de micotoxinas en el sustrato se desprende que, para la mayoría de las toxinas, hay una disminución significativa en su concentración en presencia de otras especies toxicogénicas, con excepción de la ZEA que aumenta su concentración en presencia de *A. flavus* pudiendo interpretarse esta respuesta como un mecanismo de defensa frente a las aflatoxinas, sin bien falta mayor evidencia para afirmarlo.

El conocimiento de los hongos toxicogénicos asociados al maíz, su comportamiento en relación a variables ecofisiológicas y en relación a otras especies y finalmente su sensibilidad a fungicidas, son el paso inicial para el desarrollo de estrategias que permitan su control y por tanto minimizar la contaminación con micotoxinas en este sustrato.

Bibliografía

- Barug, D., van Egmond, H., López-García, R., Van Osen-bruggen, W., Visconti, A., 2004. Meeting the mycotoxin menace. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.
- Beccari, G., Prodi, A., Tini, F., Bonciarelli, U., Onofri, A., Oueslati, S., Limayma, M., Covarelli, L., 2017. Changes in the *Fusarium* head blight complex of malting barley in a three-year field experiment in Italy. *Toxins*, 9(4), 120.
- Castañares, E., Martínez, M., Cristos, D., Rojas, D., Lara, B., Stenglein, S., Dinolfo, M., 2019. *Fusarium* species and mycotoxin contamination in maize in Buenos Aires province, Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, (4) 1265-1275
- del Palacio, A., Pan, D., 2020. Occurrence and toxigenic potential of *Aspergillus* section *Flavi* on wheat and sorghum silages in Uruguay. *Mycology*, 11(2), 147-157.
- Hesseltine, C. W., and R. J. Bothast. 1977. Mold development in ears of corn from tasseling to harvest. *Mycologia* 69:328–340.
- King, S., 1981. Time of infection of maize kernels by *Fusarium moniliforme* and *Cephalosporium acremonium*. *Phytopathology* 71: 796–799.
- Methol, M. 2021. Maíz y sorgo. Anuario OPYPA 2021. último acceso 02/2023: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/anuario-opypa-2021/analisis-sectorial-cadenas-productivas/maiz-sorgo>
- Stumpf, R., Dos Santos, J., Gomes, L., Silva, C., Tessmann, D., Ferreira, F., Machinski, M., Del Ponte, E., 2013. *Fusarium* species and fumonisins associated with maize kernels produced in Rio Grande do Sul State for the 2008/09 and 2009/10 growing seasons. *Braz J Microbiol.* May 31;44(1):89-95.
- Van Der Westhuizen, L., Shephard, G., Scussel, V., Costa, L., Vismer, H., Rheeder, J., Marasas, W., 2003. Fumonisin contamination and *Fusarium* incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18), 5574-5578.
- Velluti, A., 2002. Ecofisiología de especies de *Fusarium* productoras de fumonisinas, zearalenona y deoxinivalenol en maíz: aceites esenciales como inhibidores fúngicos. Universitat de Lleida.
- Wicklow, D., Horn, B., Shotwell, O., Hesseltine, C., Caldwell, R., 1988. Fungal interference with *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination of maize grown in a controlled environment. *Phytopathology* 78:68–74.
-

Conclusiones generales.

- *Fusarium verticillioides* fue la principal especie contaminante del maíz en Uruguay.
- Las fumonisinas fueron las toxinas con mayor incidencia en el total de muestras analizadas, y la mayoría de las cepas analizadas fueron capaces de producirlas.
- Tanto la temperatura como la aw son factores determinantes en el crecimiento y síntesis de toxinas de las especies estudiadas, siendo en general la temperatura el principal factor.
- Las condiciones menos favorables para el crecimiento son bajos niveles de aw y temperatura.
- *Fusarium verticillioides* es más sensible al tratamiento con fungicidas, siendo el metconazol el fungicida con mayor eficiencia en el control del crecimiento de *F. verticillioides* y *F. graminearum s. s.*
- La presencia de otras especies tiene un impacto en el crecimiento de las especies estudiadas, y modifica tanto la expresión génica como la síntesis de toxinas

Perspectivas.

- Dado la alta incidencia de micotoxinas en muestras de maíz el monitoreo continuo de las especies fúngicas y micotoxinas en este cultivo es de gran relevancia a nivel salud y económico
- En ese sentido, es de gran relevancia establecer límites en concentraciones de toxinas a nivel nacional e internacional
- Vigilancia de especies fúngicas emergentes y de micotoxinas asociadas a las mismas
- Implementar ensayos a campo que permitan evaluar estrategias de manejo con base en el conocimiento aquí adquirido para así poder mitigar el daño generado por estas especies y sus micotoxinas
- Realizar seguimiento, en relación a hongos toxicogénicos y micotoxinas, a lo largo de la cadena alimentaria hasta la llegada al consumidor final



Major *Fusarium* species and mycotoxins associated with freshly harvested maize grain in Uruguay

A. del Palacio¹ · B. Corallo¹ · M. Simoens² · Jacqueline Cea² · I. de Aurrecoechea³ · I. Martinez⁴ · A. Sanchez⁴ · S. Stewart⁵ · D. Pan¹ 

Received: 5 December 2022 / Revised: 22 May 2023 / Accepted: 27 June 2023

© The Author(s) under exclusive licence to Society for Mycotoxin (Research Gesellschaft für Mykotoxinforschung e.V.) and Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2023

Abstract

Fusarium species are common fungal pathogens of maize. *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides*, among others, can cause maize ear rot, and they are also mycotoxin producers. The aims of this work were to determine the frequency and diversity of *Fusarium* species in Uruguayan maize kernels, evaluate the toxigenic potential of the isolates, determine toxin contamination levels on freshly harvested grain, and assess the sensitivity of main *Fusarium* species against fungicides. *Fusarium verticillioides* was the most frequent species isolated, followed by *Fusarium graminearum sensu stricto*. Of *F. verticillioides* isolates studied for fumonisin production, 72% produced fumonisin B1 and 32% fumonisin B2. Considering *in vitro* toxin production by *F. graminearum sensu stricto* isolates, deoxynivalenol was the main toxin produced, followed by zearalenone and nivalenol. Fumonisins were the most frequently found toxins on freshly harvested maize samples (98% in 2018 and 86% in 2019), and also, fumonisin B1 was the toxin with highest concentration in both years studied (4860 µg/kg in 2018 and 1453 µg/kg in 2019). Deoxynivalenol and zearalenone were also found as contaminants. Metconazole and epoxiconazole were the most effective fungicides tested on *F. verticillioides* isolates. *Fusarium graminearum sensu stricto* isolates also were more sensitive to metconazole compared to other fungicides; nevertheless, epoxiconazole was less efficient in controlling this species. This is the first study that reports *Fusarium* species and mycotoxin contamination levels associated with maize grain in Uruguay. Its detection is the main step to develop management strategies in order to minimize fungal infection in maize crops.

Keywords Maize · *Fusarium graminearum* · *Fusarium verticillioides* · Mycotoxins · Fungicides

Introduction

Maize, *Zea mays* L., is considered to be one of the most susceptible crops to mycotoxin contamination worldwide. *Fusarium* species are common fungal pathogens of maize, and these fungi are responsible for various diseases including seedling blight, stalk, and ear rot. Within *Fusarium* species, *Fusarium graminearum* and some species of the *Fusarium fujikuroi* complex (FFSC) such as *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum*, and *Fusarium subglutinans* are considered among the predominant species causing maize ear rot (Logrieco et al. 2002).

Fusarium verticillioides is capable of producing fumonisins, dangerous toxins for animals and humans. They have been classified into four main groups: fumonisins A, B, C, and P. Fumonisin B (FB) is divided into 4 analogs (FB1, FB2, FB3, and FB4) and is the most abundant naturally

✉ D. Pan
dpan@fing.edu.uy

¹ Laboratorio de Micología, Facultad de Ciencias-Facultad de Ingeniería, UdelaR, 565, 11200 Montevideo, Julio Herrera Reissig, Uruguay

² Departamento de Análisis de Productos Agropecuarios, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, Montevideo, Uruguay

³ Departamento de Granos, Ministerio de Ganadería, Dirección General de Servicios Agrícolas, Agricultura y Pesca, Montevideo, Uruguay

⁴ Fundación del Laboratorio Tecnológico del Uruguay, Montevideo, Uruguay

⁵ Programa Cultivos de Secano, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Estación Experimental La Estanzuela, Colonia, Uruguay

occurring fumonisin (Picot et al. 2010; Reddy et al. 2010; Sundheim and Tsehaye 2015). Also, FB1 is the most toxic and usually appears in the highest concentrations in grains contaminated with *F. verticillioides* (Alexander et al. 2009; Baldwin et al. 2014). This mycotoxin is classified as possibly carcinogenic to humans and livestock and also causes equine leukoencephalomalacia, rat hepatocarcinoma, and porcine pulmonary edema (Gelderblom et al. 1988; Marasas et al. 1988).

Species in the *Fusarium graminearum* species complex (FGSC) are important pathogens of small-grain cereals and maize in many areas of the world. These fungi often cause crop diseases at different stages of development, and they are also mycotoxin producers. *Fusarium graminearum* species complex can produce different mycotoxins such as zearalenone (ZEN), nivalenol (NIV), and deoxynivalenol (DON). Deoxynivalenol is also divided into two acetylated derivatives, 3-acetyldeoxynivalenol (3-AcDON) and 15-acetyldeoxynivalenol (15-AcDON), where 3-AcDON has shown to be more phytotoxic and isolates that produce it may have higher pathogenic potential than those producing 15-AcDON (Pestka 2010; McCormick et al. 2011). In South America, 15-AcDON-producing isolates are usually predominant, while 3-AcDON and NIV isolates are less frequent (Del Ponte et al. 2022). Zearalenone is a toxin which has an estrogenic effect on humans and animals, causing hyperestrogenism, especially in swine (Sundlof and Strickland 1986).

Fungicides have always been a useful strategy for limiting fungal diseases on important crops. However, long-term and extensive use of chemical compounds in different crops can cause the emergence of fungicide resistance in pathogens. For this reason, monitoring the efficacy of fungicides against *Fusarium* species plays a key role in managing chemical control strategies. Carbendazim, a benzimidazole fungicide, has been widely applied for *Fusarium* control, and in recent years, carbendazim-resistant field populations have been increasing in isolates from small-grain cereals (Duan et al. 2014). On the other hand, sterol biosynthesis inhibitors, which include triazoles, are reported to be the most effective chemicals against *Fusarium* (Pirgozliev et al. 2002; Amarasinghe et al. 2013).

In Uruguay, the area planted with corn has been increasing over the last 3 years, reaching 143,000 hectares in the 2020/2021. At the same time, the productivity of the crop has increased (an accumulated 45% in the last 10 years) due to the professionalization of corn production with the incorporation of technological improvements and the use of late sowing varieties. Maize in Uruguay is mainly used as livestock feed for beef and dairy cattle (Methol 2021). In addition to this, surveys to determine prevalence of different *Fusarium* species and mycotoxins in maize have not been extensively carried out in Uruguay. This is extremely

important, since a comprehensive knowledge of the *Fusarium* species occurring on maize kernels, as well as the mycotoxins present, has important practical implications for the development of appropriate strategies to limit the presence of fungi in maize and ensure animal health.

Considering the information mentioned above, the aims of this study were (i) to determine the frequency and diversity of *Fusarium* species in Uruguayan maize kernels, (ii) to evaluate the toxigenic potential of the isolates, (iii) to determine mycotoxin contamination levels on freshly harvested maize grain, and (iv) to evaluate the sensitivity of different fungicides to the main *Fusarium* species associated to maize.

Materials and methods

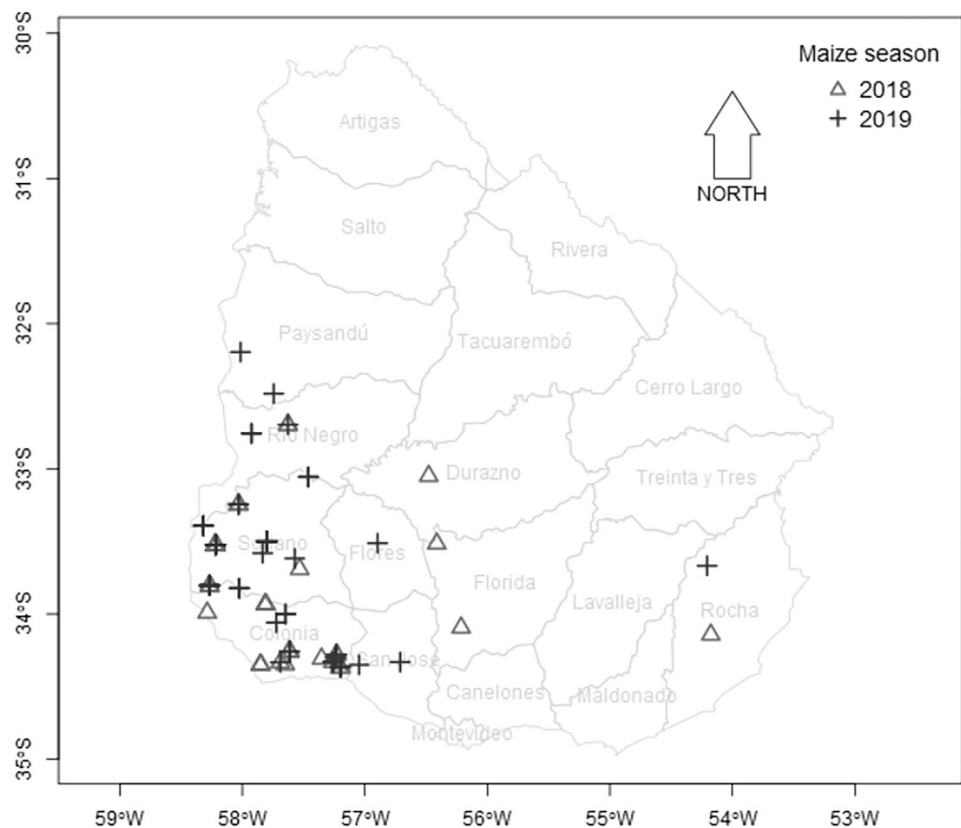
Sampling and fungal isolation

A total of 152 maize kernel samples were collected from fields located in the major maize growing area south-west of Uruguay, at the departments of Paysandú ($n=4$), Río Negro ($n=21$), Soriano ($n=47$), Colonia ($n=71$), Flores ($n=1$), San José ($n=2$), Florida ($n=1$), Durazno ($n=3$), and Rocha ($n=2$) (Fig. 1). Samples from the two crop seasons, 2018 ($n=94$) and 2019 ($n=58$), were analyzed. Kernels were surface sterilized for 1 min in 0.4% sodium hypochlorite solution, rinsed twice in sterile distilled water, and dried on sterilized filter paper. One hundred kernels from each sample were placed in Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA) and incubated at 25 °C under a 12 h white /12 h black fluorescent light photoperiod for 7 days. Fungal colonies presumably belonging to *Fusarium* spp. were purified and transferred to new Petri dishes with PDA, using a single-spore technique, for subsequent identification to species level.

Identification of *Fusarium* spp

Identification to species level was performed based on morphological characteristics following mycological methods according to Leslie and Summerell (2006). Subsequently, in order to confirm morphological identification, molecular methods were performed. For this, genomic DNA (gDNA) was extracted from single-spore culture isolates with a cetyltrimethylammonium bromide (2% CTAB) method (Leslie and Summerell 2006). All PCR reactions were carried out in a GeneAmp PCR system 9700 thermocycler (Perkin-Elmer, USA). *Fusarium graminearum sensu stricto* (*Fusarium graminearum* s. s.) was identified by RFLP of the *TEF-1 α* gene method using enzyme BsaHI (Garmendia et al. 2018a). *Fusarium graminearum* s. s. strains were identified by two fragments of 367 bp and 291 bp each. The identification of *F. verticillioides* strains was carried out by PCR detection

Fig. 1 Map depicting the location of departments in Uruguay where maize kernel samples were harvested in two maize growing seasons, 2018 and 2019



assays using sets of species specific primers VER-1 and VER-2 (5'-CTTCCTGCGATGTTTCTCC-3' and 5'-AATTGGCCATTGGTATTATATATCTA-3', respectively) (Mulè et al. 2004). Also, elongation factor-1 α (tef-1 α) gene sequence was used to identify other *Fusarium* isolates obtained (Geiser et al. 2004). DNA sequences were analyzed using the SeqMan software (Lasergene, Madison, WI) and compared with the sequences of closely related species in GenBank database by using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) and in the CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre's *Fusarium* MLST website (<https://fusarium.mycobank.org/databases>). The generated sequences were deposited in the GenBank database under accession numbers OQ948480–OQ948506.

Toxigenic capacity of fungal isolates

A random subsample of all collected isolates of *F. verticillioides* ($n=86$) and FGSC ($n=79$) was selected in order to analyze their in vitro toxigenic profile. Toxins were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) consisting of a Shimadzu LC-10ADvp pump. A RF-10Axl fluorescence detector and a photodiode array detector were used for fumonisins and trichothecenes, respectively (Shimadzu). For all toxin evaluations, a C18 column (150 mm $\times$ 4.6 mm i.d., 5 μ m particle size; Nucleodur®, Macherey–Nagel, Düren, Germany) connected to a pre-column security guard

(8 mm $\times$ 4 mm i.d., 5 μ m particle size; Nucleodur®, Macherey–Nagel, Düren, Germany) was used. Fumonisin B1 and B2, DON, NIV, and ZEN standards were supplied by Trilogy Analytical Laboratory Inc., Washington, MO. For FB1 and B2 evaluation, 20 g of rice kernels with 10 ml of sterile water was autoclaved for 30 min twice on alternate days. For DON, NIV, and ZEA production, 25 g of rice with 10 ml of water was used. Bags of autoclaved rice were inoculated with 3 mycelium plugs taken from pure cultures of each selected isolate. Bags were incubated in the dark at 25 °C for 28 days, and developed cultures were then oven dried at 60 °C, finely ground with a laboratory blender, and stored at –20 °C until use.

Fumonisin extraction was performed according to the AOAC: 995.15 method. Toxins were extracted from 5g of grinded rice with methanol:water (3:1 v/v), filtered extract was applied to an anion-exchange (SAX) column (Strata®SAX, 55 μ m, 70 Å, Phenomenex), and fumonisins were eluted with acetic acid: methanol (1:99 v/v). Eluate was evaporated to dryness, and the residue was dissolved in methanol. O-Phthaldialdehyde (Sigma-Aldrich, Milan, Italy) reagent solution was added to form fluorescent fumonisin derivatives. A fluorescence detector with excitation and emission wavelengths of 335nm and 440 nm, respectively, was used. The mobile phase was methanol: NaH₂PO₄ 0.1M solution (77:23 v/v) pH 3.5, at a flow rate of 1ml/min; the

injection volume was 20 µl. Fumonisin concentration was determined by comparison with external standards.

Zearalenone production was performed based on the methodology described by AOAC 985.18. Five grams of ground rice was used for toxin extraction using methanol: water (80:20 v/v); the filtered extract was cleaned using a MycoSep®226 column (Romer Labs Inc., MO, USA). The eluate was first evaporated and then dissolved in methanol: water (70:30 v/v), the same solution was used as mobile phase, the flow rate was 1ml/min, and the injection volume was 50 µl. ZEN concentration was determined by comparison with external standards.

Deoxynivalenol and NIV were detected using methods described by Reynoso et al. (2011). Toxins were extracted from 7.5 g of ground rice with acetonitrile: methanol (14:1 v/v) and then filtered through an aluminum C-activated (20:1, w/w) laboratory made column. Eluate was evaporated to dryness and resuspended with methanol: water (5:95 v/v). An UV detector (220 nm) was used. The mobile phase was methanol: water (12:88 v/v), at a flow rate of 1.5 ml/min. The injection volume was 50 µl. DON and NIV concentration was determined by comparison with external standards.

Trichothecene genotype determination

For FGSC isolates, trichothecene genotypes were also determined using three different PCR assays. First, two multiplex assays targeted a portion of trichothecene biosynthesis genes *Tri3* and *Tri12* to determine NIV, 15-AcDON, and 3-AcDON genotypes (Ward et al. 2002), while the third assay targeted portions of the *Tri13* gene to determine DON genotypes (Chandler et al. 2003) (Table 1). The *Tri3* multiplex included a primer common to all genotypes (3CON) and three genotype-specific primers: 3NA, 3D15A, and 3D3A. This reaction produces amplicons of approximately 840, 610, and 243 bp for isolates that match NIV, 15-AcDON, and 3-AcDON genotypes, respectively. The *Tri12* multiplex

similarly included a primer common to all genotypes, 12CON, and three genotype-specific primers: 12NF, 12-15F, and 12-3F. This multiplex produced amplicons of approximately 840, 670, and 410 bp for isolates that match NIV, 15ADON, and 3ADON genotypes, respectively. The *Tri13* gene amplification was performed using primers Tri13F and Tri13DONR; the PCR amplifies a fragment of 282 bp for DON-producing isolates. The multiplex PCR was conducted in 25 µl reaction mixtures containing 50 ng of DNA, 1X PCR buffer (Nzytech), 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.5U DNA Taq polymerase (Nzytech), and 0.2 mM each primer. 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 assays for *Tri13* genes were conducted using 50 ng of fungal DNA in a total volume of 25 µl containing 1.5X PCR buffer (Nzytech), 2 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTPs, 0.75 U of DNA Taq polymerase (Nzytech), and 0.4 mM each primer. 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.

All amplification products were resolved on 1.5% (wt/vol) agarose gels and scored by size in comparison to a 100-bp DNA size ladder (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA).

Natural mycotoxin occurrence in maize grain

Sixty-one representative samples of maize grain from the 2018 harvest and 58 samples from 2019 were selected for mycotoxin determination. One kilogram of each sample was ground in a Romer mill, range of 60–200 mesh (Romer Labs Inc., MO, USA) and stored in the freezer at –80 °C until analysis. Before the analysis, a ground subsample (20 g) was obtained by the quartering sampling method following Codex guidelines. Fumonisin and ZEN determination were performed according to AOAC methods described above (AOAC 2019). All toxins were determined using HPLC connected to a reversed-phase Gemini C18 (4.60 mm × 150 mm, 5 µm, for fumonisins and DON and 4.60 mm × 250 mm, 5 µm, for ZEA and NIV) analytical column (Phenomenex, USA) connected to a pre-column security guard (8 mm × 4 mm i.d., 5 µm particle size; Nucleodur®, Macherey–Nagel, Düren, Germany). The HPLC system consisted of a Waters 1525 pump, Waters 717 Injector, and Waters TCM oven. For fumonisins and ZEN, the HPLC system was coupled to a Waters 2475 Fluorescence detector. The mobile phase and standard solutions used were that described above. Deoxynivalenol and NIV extraction was performed according to the AOAC: 986.17 method. A Waters 2996 photodiode array detector (220 nm) was used. The mobile phase and standard solutions used were that described above. Veracity and precision of the method were evaluated by using maize

Table 1 Primer sequences used for genotype characterization by multiplex PCR (*Tri3*, *Tri12*) and PCR (*Tri13*)

Gene	Primer	Sequence (5'-3')
<i>Tri 3</i>	3CON	TGGCAAAGACTGGTTCAC
<i>Tri 3</i>	3NA	GTGCACAGAATATACGAGC
<i>Tri 3</i>	3D15A	ACTGACCCAAGCTGCCATC
<i>Tri 3</i>	3D3A	CGCATTGGCTAACACATG
<i>Tri 12</i>	12CON	CATGAGCATGGTGATGTC
<i>Tri 12</i>	12NF	TCTCCTCGTTGTATCTGG
<i>Tri 12</i>	12-15F	TACAGCGTTCGCAACTTC
<i>Tri 12</i>	12-3F	CTTTGGCAAGCCCGTGCA
<i>Tri 13</i>	Tri13F	CATCATGAGACTTGTGTGACAGTTGGG
<i>Tri 13</i>	Tri13DONR	GCTAGATCGATTGTTGCATTGAG

kernels spiked with each toxin (DON, NIV, ZEN, FB1, or FB2 as appropriate). Replicates of spiked samples were performed, and the relative standard deviation was calculated among them to stipulate the precision of the method. The veracity of the analytical method was evaluated in terms of recovery. Recoveries were determined by spiked maize samples with known levels of standards. Percent method recovery was 93% for DON, 87% for NIV, 76% for FB1, 77% for FB2, and 77% for ZEA. The limits of report quantification (LOQs) were 80 µg/kg (FBs), 30 µg/kg (ZEN), 88 µg/kg (DON), and 50 µg/kg (NIV).

Fungicide sensitivity assay

Sensitivity of *F. verticillioides* and *F. graminearum* s. s. isolates was evaluated against two different chemical classes of fungicides, triazoles and benzimidazoles. Fungicides belonging to triazoles were metconazole, tebuconazole, and epoxiconazole, while carbendazim belongs to benzimidazole class. The assay was performed on a total of 20 isolates per species, 10 isolates from each crop season (2018 and 2019). Fungicides were diluted in dimethylsulfoxide 0.1% (DMSO) and incorporated into PDA to achieve concentrations of 0.25, 0.50, 0.75, 1.5, 3, 6, and 10 mg/l. Three replicates of each fungicide concentration per isolate were performed. A mycelial plug (8 mm in diameter) of each isolate was taken from a 5-day-old colony and placed on the center of a PDA plate amended with each fungicide at each concentration. *Fusarium verticillioides* isolates plates were incubated for 7 days at 25 °C in darkness; *F. graminearum* s. s. strains were incubated for 5 days under the same conditions. Colony diameters were measured daily in two perpendicular directions. Evaluation was performed based on the radial growth

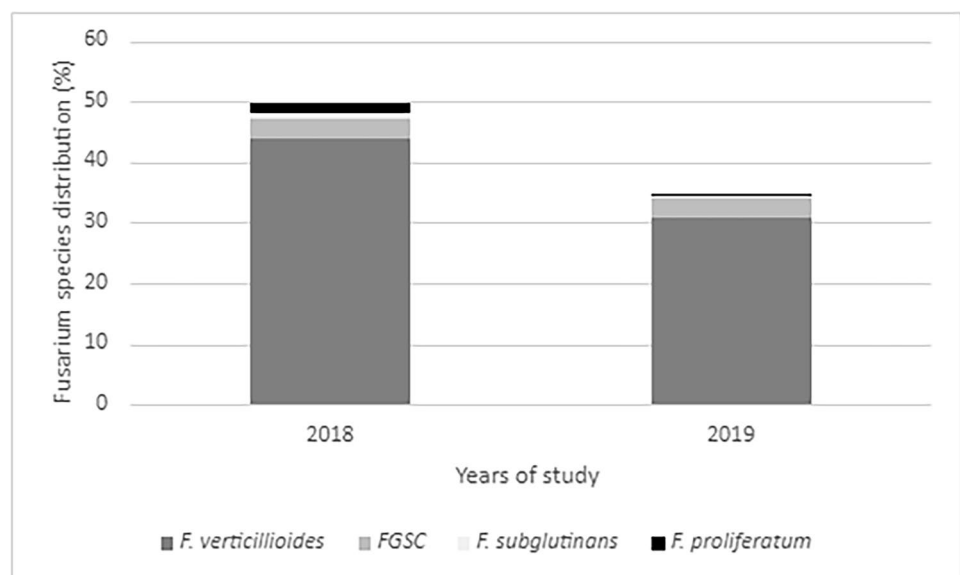
on PDA containing different concentrations of each fungicide, compared to control plates (PDA + DMSO) (Becher et al. 2010; Tateishi et al. 2010). Effective concentration of fungicides leading to a 50% inhibition (EC₅₀) of mycelial growth of each strain was determined. The EC₅₀ was calculated on the basis of linear regression analysis of relative growth inhibition values against the log₁₀-transformed fungicide concentrations based on Probit analysis (Finney 1952). Analysis of variance (ANOVA) of the EC₅₀ values were conducted to determine differences in sensitivity among species (*F. verticillioides* and *F. graminearum* s. s.) for each fungicide and among fungicides within each species. Means were compared using Fisher's least significant difference (LSD) ($\alpha = 0.05$). Statistical analysis was performed using Infostat (Di Rienzo et al. 2011).

Results

Frequency of *Fusarium* in maize kernels

According to the 152 field samples analyzed over both years (2018 $n = 94$, 2019 $n = 58$), *Fusarium* species were the most frequent toxigenic contaminants in maize kernels (45%) with incidence values ranging between 7 and 100%, followed by *Aspergillus* species (15%). Within the *Fusarium* species, *Fusarium verticillioides* was the most frequent species isolated, with an average frequency of 44% and 30% in 2018 and 2019, respectively. The second most frequent *Fusarium* species isolated was the FGSC with 3% average frequency for both years studied. Other *Fusarium* species identified were *F. proliferatum* and *F. subglutinans*, but they were in low frequency over both years (Fig. 2).

Fig. 2 *Fusarium* species distribution according to morphological features in both seasons studied



To correctly assign the *Fusarium* species identification, 236 *Fusarium* isolates from both years were selected as representatives of the *Fusarium* population isolated from maize kernels and were molecularly identified. This allowed to identify 115 isolates as *F. verticillioides*, 89 isolates as *F. graminearum* s.s., 14 isolates as *F. subglutinans*, 10 isolates as *F. proliferatum*, 6 isolates as *F. meridionale*, 1 isolate as *F. pseudograminearum*, and 1 as *F. armeniacum*.

Toxicogenic capacity of fungal isolates

Fumonisin production was assessed for 84 of the isolates identified molecularly as *F. verticillioides*. Fumonisin B1 was produced by 69% ($n=33$) of the isolates from 2018 and 75% ($n=27$) from 2019; the proportion of FB2 producers was 31% and 33% for each year ($n=15$ from 2018, $n=12$ from 2019) (Fig. 3).

Deoxynivalenol, NIV, and ZEN production was studied in 74 of the *F. graminearum* s. s. isolates and in 4 of the *F. meridionale* strains found. The proportion of *F. graminearum* s. s. mycotoxin producer strains was high during both years of study, with 70.5% ($n=24$) and 72.5% ($n=29$) ZEN producer strains in 2018 and 2019, respectively, and 85% of DON producer strains for each year of study. On the other hand, NIV producer strains were less frequent with 23.5% ($n=8$) and 7.5% ($n=3$) in 2018 and 2019, respectively (Fig. 3). Finally, *F. meridionale* strains showed a different mycotoxin profile compared to *F. graminearum* s. s. strains, with 2 out of 4 isolates being NIV producers in 2018, while ZEN and DON producer strains were not found.

Trichothecene genotypes

Trichothecene genotype study was performed on 85% ($n=29$) and 86% ($n=45$) of *F. graminearum* s. s. isolates from 2018 and 2019, respectively. Moreover, genotype profile was assessed for four *F. meridionale* isolates. All isolates identified as *F. graminearum* s. s. belong to genotypes DON-15-AcDON, and all *F. meridionale* isolates have a genotype NIV-DON.

Natural mycotoxins occurrence on freshly harvested maize grain

The presence of *Fusarium* mycotoxins (DON, ZEN, NIV, FB1, and FB2) was assessed on 119 maize samples, 61 belonging to 2018 and 58 from 2019. About 97% and 86% of freshly harvested samples from 2018 and 2019, respectively, were contaminated with FB1, which was the main contaminant found in the study (Table 2). Higher concentrations of fumonisins were found on samples from 2018, FB1 averaged 4071 $\mu\text{g/kg}$ and 1529 $\mu\text{g/kg}$ for FB2 (Table 2). Most samples studied had contamination levels of fumonisins lower than 2000 $\mu\text{g/kg}$, and only 10% or less of the samples showed levels of contamination above 5000 $\mu\text{g/kg}$ (Fig. 4).

The presence of DON was also detected in maize samples, but at lower concentrations during 2018 and 2019 with a mean content of 278 $\mu\text{g/kg}$ and 118 $\mu\text{g/kg}$, respectively (Table 2). Regarding ZEN, the contamination levels were higher during 2018, with 64% positive freshly harvested samples and a mean value of 302 $\mu\text{g/kg}$ (Table 2). On the other hand, NIV was detected in one sample each year and at low levels.

Fig. 3 Percent of *F. verticillioides* isolates that produced FB1 and FB2 and of *F. graminearum* s. s. isolates that produced DON, NIV, and ZEN, in vitro for both years of study

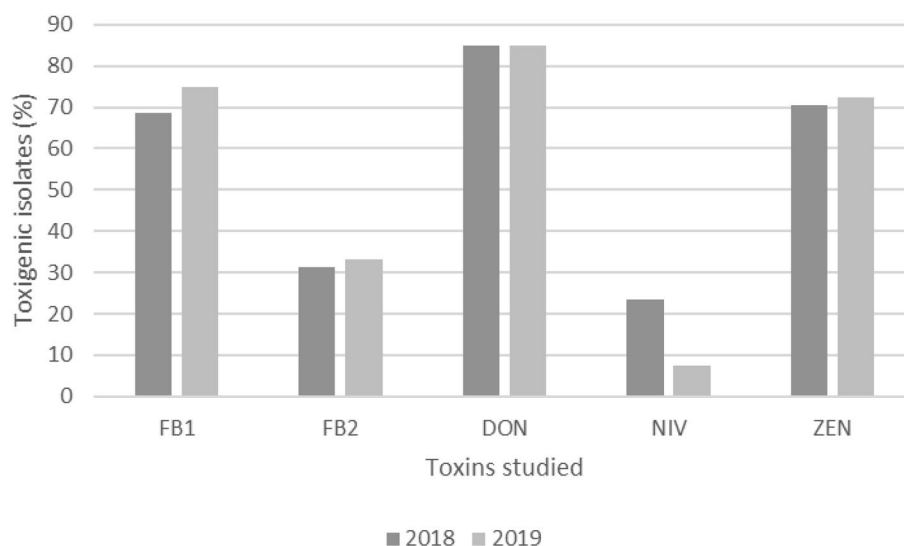


Table 2 Presence of mycotoxins (DON, ZEN, NIV, FB1, and FB2) on harvest maize grain samples from Uruguay during the years 2018 ($n=61$) and 2019 ($n=58$)

Maize	Average contamination ($\mu\text{g/kg}$) $\pm$ SD		Percentage of contaminated samples (%)		Average contamination on contaminated samples ($\mu\text{g/kg}$)			
					Average of contaminated samples ($\mu\text{g/kg}$) $\pm$ SD	Contamination range	Average of contaminated samples ($\mu\text{g/kg}$) $\pm$ SD	Contamination range
	2018	2019	2018	2019				
FB1	4071 $\pm$ 9893	1252 $\pm$ 2002	96.7	86.2	4860 $\pm$ 10023	80–59004	1453 $\pm$ 2089	80–9881
FB2	1529 $\pm$ 2774	427 $\pm$ 756	90.2	60.4	1695 $\pm$ 2874	80–14,908	708 $\pm$ 868	80–4138
DON	278 $\pm$ 456	118 $\pm$ 233	52.5	46.5	530 $\pm$ 513	59–2471	253 $\pm$ 289	59–922
ZEN	302 $\pm$ 732	18 $\pm$ 45	64	17.2	472 $\pm$ 874	30–2522	103 $\pm$ 58	30–200
NIV	3 $\pm$ 15	3 $\pm$ 20	5	1.7	66 $\pm$ 16	50–84	-	-

Sensitivity to fungicides

EC₅₀ values of epoxiconazole for the tested *F. verticillioides* isolates ($n=20$) ranged between 0.002 and 0.107 mg/l with a mean of 0.040 mg/l (Fig. 5). For metconazole, the sensitivity range was between 0.004 and 0.146 mg/l with a mean value of 0.027 mg/l (Fig. 5). EC₅₀ values for tebuconazole ranged from 0.03 to 0.429 mg/l with a mean value of 0.093 mg/l (Fig. 5). Lastly, carbendazim EC₅₀ values ranged between 0.181 and 0.651 mg/l with a mean of 0.410 mg/l (Fig. 5). One of the *F. verticillioides* isolates (A61) was less sensitive for both tebuconazole and metconazole with EC₅₀ values of 0.499 and 0.186 mg/l, respectively (online resource 1).

In the case of *F. graminearum s. s* isolates ($n=20$), the EC₅₀ values for triazole fungicide class ranged from 0.217 to 3.951 mg/l with a mean of 1.392 mg/l for epoxiconazole, 0.001 to 0.710 mg/l with a mean of 0.155 mg/l for metconazole, and 0.040 to 1.656 mg/l with a mean of 0.763 mg/l for tebuconazole (Fig. 5). Additionally, carbendazim EC₅₀ values ranged between 0.130 and 1.145 mg/l with a mean of 0.649 mg/l (Fig. 5). In the case

of epoxiconazole, isolates A539 and A545 were observed to be the least sensitive, with EC₅₀ values of 3.939 and 3.951 mg/l, respectively. Also, isolates A545 and A560 showed low levels of sensitivity for metconazole, with values of 0.710 and 0.403 mg/l (online resource 2).

Considering *F. verticillioides*, no differences were shown between epoxiconazole and metconazole, although tebuconazole appears to be less effective showing significant differences on EC₅₀ values ($p < 0.05$) when compared to metconazole and epoxiconazole. Also, isolates were significantly less sensitive to the presence of carbendazim ($p < 0.05$). On the other hand, *F. graminearum s. s* isolates were more sensitive to metconazole ($p < 0.05$) than other fungicides tested and least sensitive to epoxiconazole.

Overall, *F. verticillioides* isolates were more sensitive than *F. graminearum s. s* strains for all fungicides tested ($p < 0.05$).

Less sensitive isolates of *F. graminearum s. s* were observed in the case of all fungicides assessed (Fig. 5). The EC₅₀ for the least sensitive isolates was 3.951 mg/l for epoxiconazole, 1.656 mg/l for tebuconazole, 0.710 mg/l for metconazole, and 1.145 mg/l for carbendazim.

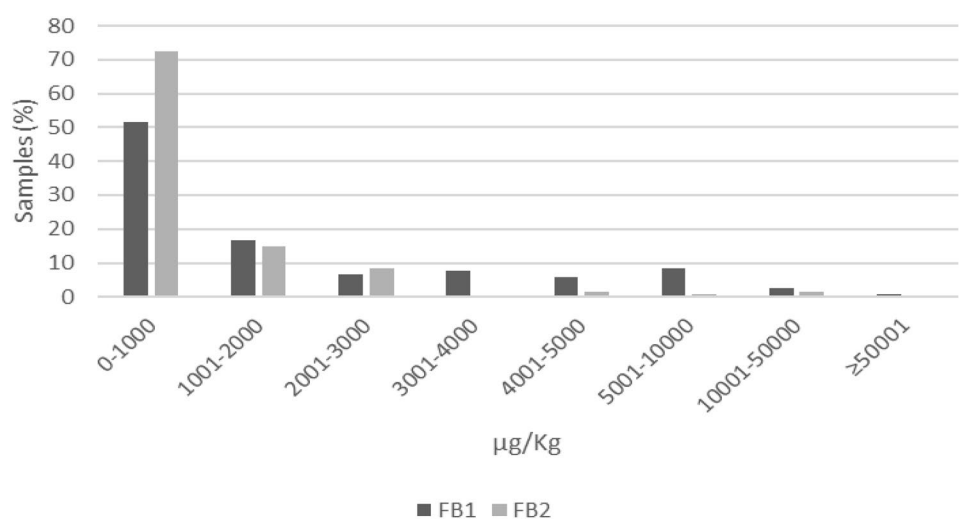
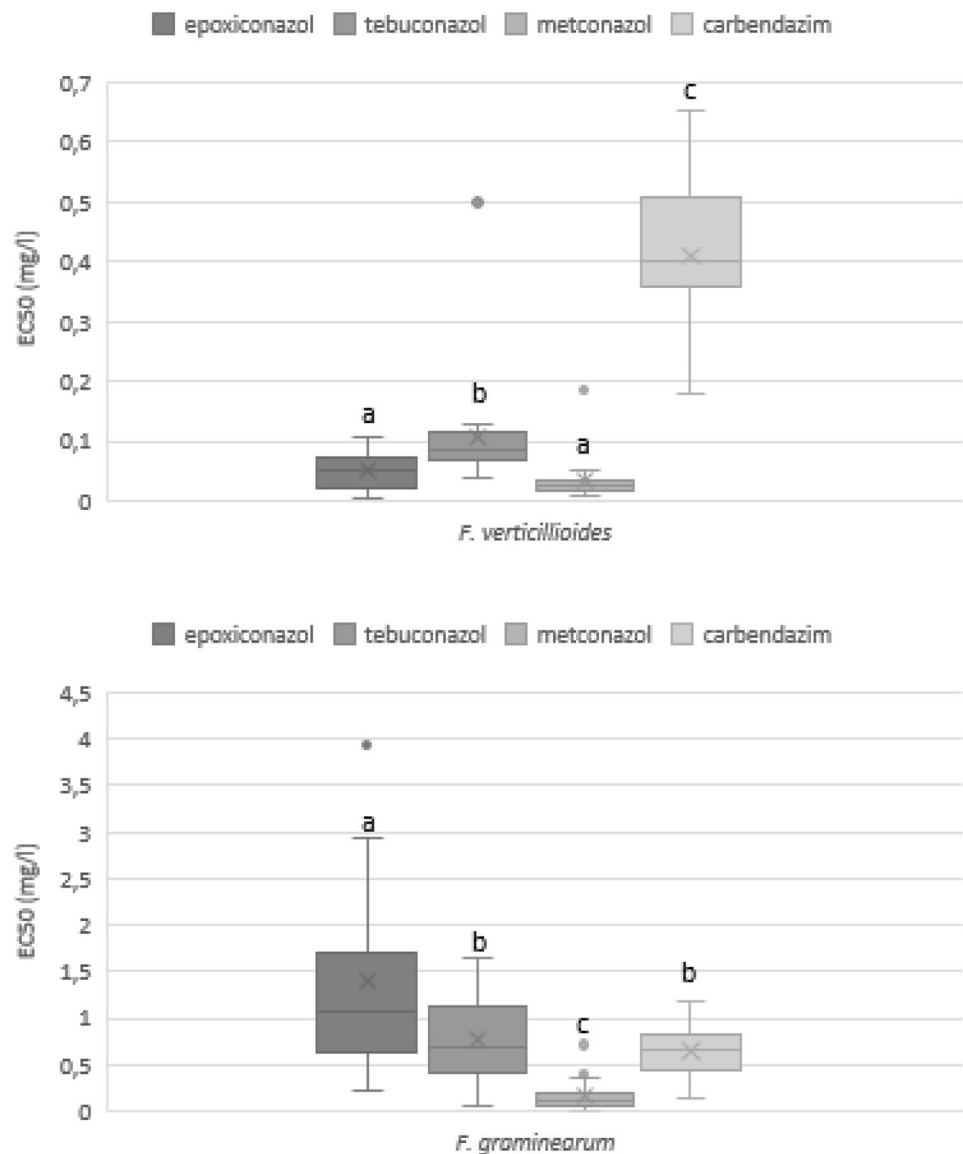
Fig. 4 Sample distribution (%) according to FB1 and FB2 contamination levels ($\mu\text{g/kg}$) considering all samples analyzed

Fig. 5 Fungicide EC50 values for *F. verticillioides* and *F. graminearum* s. s. strains. Letters above boxes indicate statistical differences; lower cases indicate differences in between fungicides within each species (Fisher LSD $p < 0.05$)



Discussion

This work represents the first survey on *Fusarium* species associated with maize kernels in Uruguay. *Fusarium verticillioides* appeared as the predominant species, and to a lesser extent, *F. graminearum* s. s. was also identified as an important contaminant of this crop. Studies carried out in other regions, in particular, in Brazil and Argentina, showed that *F. verticillioides* was the most prevalent *Fusarium* species in freshly harvested maize (Castañares et al. 2019; van der Westhuizen et al. 2003). In our study, *F. verticillioides* was isolated with a frequency of 37% that is similar to that found in maize samples from Brazil (Almeida et al. 2002), Korea (Choi et al. 2018), Iran (Fallahi et al. 2019), Bélgica (Scaufaire et al. 2011), and China (Zhou et al. 2018). However, our frequency is lower

than those observed by other authors. In Brazil, Stumpf et al. (2013) determined that *F. verticillioides* was present in a frequency of 96% and Barroso et al. (2017) between 54.1 and 91.8% on commercial hybrids of maize. Same results were obtained from Argentina (Castañares et al. 2019), Brazil (Lanza et al. 2014), China (Qin et al. 2020), Nigeria (Bankole and Mabekoje 2004) and Spain (Aguín et al. 2014). These differences could be due to several factors, including climatic conditions, maize genotypes, and cultural practices that influence the occurrence and prevalence of *F. verticillioides* and other *Fusarium* species that affect maize (Munkvold 2003).

On the other hand, two more species members of FFSC have been detected with significant frequency: *F. subglutinans* and *F. proliferatum* (O'Donnell et al. 1998). Both species often co-occur with *F. verticillioides* worldwide on

maize, making the development of resistant hybrids more difficult for breeders (Fallahi et al. 2019). Considering that this is the first report of some of the species within the FFSC in crops of Uruguay, more studies about this species complex should be carried on in order to develop adequate strategies to control *Fusarium* ear rot and minimize mycotoxin contamination of maize.

When it comes to FGSC, it is usually suggested that *F. meridionale* is adapted to maize agroecosystems, as it is the most prevalent contaminant of the FGSC in maize in Brazil and Argentina, despite the prevalence of other FGSC species on wheat and rice in those countries (Alvarez et al. 2009; Del Ponte et al. 2015; Kuhnem et al. 2016; Sampietro et al. 2011). However, our data indicate that *F. graminearum* s. s. is the main contaminant of the FGSC in maize in Uruguay, suggesting that extended areas of crops such as wheat and barley, usually contaminated with *F. graminearum* s. s. (Garmendia et al. 2018b; Pan et al. 2016; Umpiérrez-Failache et al. 2013), may be a very important factor in species distribution when these crops coexist in rotation on the same cultivated areas like in our country.

The present study showed that over 70% of *F. verticillioides* isolated from maize in Uruguay are *in vitro* fumonisins producers, being FB1 the principal toxin produced by this species. Considering this, and the fact that *F. verticillioides* was the most prevalent species, the presence of fumonisins in maize grain is a potential threat to human and animal health in our country. In this sense, the presence of *F. proliferatum* and *F. subglutinans* of further concern due to the ability of these species to produce fumonisins increases risks of consumption of contaminated maize due to the coexistence of these toxigenic species in maize.

Regarding *F. graminearum* s. s., *in vitro* mycotoxin production profile, DON, was the most frequently produced toxin, followed by ZEN and NIV. Previous studies in South America about this species contaminating different crops have also found DON as the main toxin produced (Del Ponte et al. 2022). Nevertheless, our study also showed a very high proportion of isolates being ZEN producers (70.5% and 72.5% from 2018 and 2019, respectively). Although there are very few studies on potential ZEN production by *F. graminearum* s. s. isolates, it is well known that the levels of ZEN are frequently present in grains from different crops, including maize (Salay and Mercadante 2002; Maragos 2010). On the other hand, *F. graminearum* s. s. isolates evaluated in this study showed DON-15-AcDON genotype, and none of them had NIV genotype. This result is consistent with the previous reports from different crops in Uruguay (Garmendia et al. 2018b; Pan et al. 2013, 2016; Umpiérrez-Failache et al. 2013), where DON-15-AcDON genotype prevails for *F. graminearum* s. s., showing stability of genotype composition across crops and years in our country. Moreover, in recent years, it has been shown that

in Europe, 15-AcDON genotype is the predominant one in wheat and maize, with an overall distribution in cereals up to 83% (Pasquali et al. 2016).

Previous studies that evaluated the toxigenic potential of *F. meridionale* from Argentina, Brazil, and other parts of the world including Europe, China, and Mexico (Scoz et al. 2009; Astolfi et al. 2012; Sampietro et al. 2011; Desjardins and Proctor 2011; Boutigny et al. 2014) suggested a very strong association of this species to NIV genotype. However, our results showed that all strains of *F. meridionale* studied were characterized as a DON/NIV genotype and were either non-toxin producers or NIV producers by chemical analysis. Some studies reported the presence of DON/NIV genotype in different species of FGSC. Furthermore, isolates of this genotype showed different chemical profiles (Del Ponte et al. 2022; Lee et al. 2012; Sampietro et al. 2013; Reynoso et al. 2011). Moreover, Barros et al. (2012) found that all *F. meridionale* strains isolated from Argentinian soybean grain showed the DON/NIV genotype. However, these DON/NIV isolates of *F. meridionale* produced detectable DON and NIV levels and only DON by chemical analysis. Further studies will be necessary in order to characterize the *F. meridionale* DON/NIV strains.

The fact that *F. verticillioides* was the most prevalent species found on maize samples and that most of the isolates were able to produce FB1 was to be expected that over 85% of the maize samples were naturally contaminated with fumonisins, being FB1 the predominant toxin. Piñeiro et al. (1997) studied the levels of fumonisins in unprocessed corn kernels from Uruguay; their results showed average contamination levels with FB1 of 963 µg/kg, with a range from ND to 3688 µg/kg, with 50% of contaminated samples with FB1, and no contaminated samples with FB2. Although their results are based only on 22 samples, both surveys show that FB1 contamination of maize grains is frequent in Uruguay, and it is frequently found at high levels. Also, our results are similar to those reported for maize in other parts of the world (Garrido et al. 2012; Scussel et al. 2014; Udovicki et al. 2018; Yli-Mattila and Sundheim 2022) and support the idea that this crop is very prone to fumonisin contamination (Ponce-García et al. 2018).

In Uruguay, maize is principally used for feeding cattle, dairy cattle, poultry, and swine. Considering current international regulations, the levels found on 24% ($n = 15$) of the samples from 2018 and 10% ($n = 6$) of the samples from 2019 are higher than those recommended by CAC (2019) for food and feed (4000 µg/kg FB1 + FB2), and only one sample exceeded China recommended levels (GB 13078, 2017) in maize grain and maize by-products for animal feed (60,000 µg/kg FB1 + FB2). Despite the similar incidence of *F. verticillioides* in both years of study (44% and 30% in 2018 and 2019, respectively), the levels of fumonisins were much higher in 2018 compared to 2019. This could be explained by

fumonisin production being very variable among strains and that environmental conditions play an important role in its production (Munkvold and Desjardins 1997).

The levels of DON and ZEN found in the present study were similar when compared to the reports from maize of the region (Castañares et al. 2019; Mendes de Souza et al. 2013). Only the DON levels present in 6% ($n=7$) of samples exceed the recommended levels in Uruguay for swines and equines (1000 µg/kg). No samples exceed the levels for raw materials destined for the production of animal feed (10,000 µg/kg) (MGAP resolución S/N/001 2001; FDA 2010). Considering levels of ZEN, 11% ($n=13$) of the samples exceeded the recommended levels in Uruguay of 250 µg/kg. It could be explained by the low incidence of FGSC (3%) in both years studied.

Chemical applications to control *Fusarium* ear rot are not a widely used practice, and few studies have demonstrated the efficacy of synthetic fungicide to control *Fusarium* ear rot in maize, especially against *Fusarium fujikuroi* species complex (Masiello et al. 2019; Tava et al. 2021). This study provides new information on the sensitivity of the two main toxigenic *Fusarium* species associated with *Fusarium* ear rot of maize to different fungicides commonly used in other crops. Sensitivity of *F. verticillioides* Uruguayan isolates to tebuconazole, metconazole, and carbendazim was similar to those reported by other authors years ago in other geographical regions (Ivić et al. 2011; Marin et al. 2013). No reported data was found on sensitivity of *F. verticillioides* to epoxiconazole.

Metconazole was the most effective fungicide to inhibit growth of *F. graminearum* s. s. isolates in this study, followed by carbendazim, despite some reports mentioning the occurrence of resistant field strains to benzimidazole fungicides in other crops (Brent and Hollomon 2007; Chen et al. 2007; Liu et al. 2010). However, our results showed EC50 values higher than 0.362 mg/l and 0.320 mg/l for metconazole, which were the highest values reported by Garmendia et al. (2018b) for isolates of *F. graminearum* s. s. from barley in Uruguay and Spolti et al. (2014) from wheat in Brazil, respectively.

Results showed significant differences in sensitivity of two important *Fusarium* toxigenic species to four fungicides commonly used, with *F. verticillioides* being more sensitive to fungicides than *F. graminearum* s. s. These differences are probably due to long-term exposure of *F. graminearum* s. s. strains to different classes of fungicides; thus, *F. graminearum* s. s. is known to be the most frequent pathogen on barley and wheat in Uruguay, causing severe *Fusarium* head blight (Umpiérrez-Failache et al. 2013; Garmendia et al. 2018b). These crops, especially wheat, are usually treated with fungicides to control this disease. On the other hand, *F. verticillioides* appears here as the most important contaminant of maize, but generally in Uruguay,

farmers produce maize primarily to feed their animals, so no fungicide is applied.

The *in vitro* assay on fungicides available in the market allowed us to select the most effective chemical against the most occurring pathogenic and toxigenic fungi on maize. Results of fungicide assays should be taken into account to design experiments in the field to confirm *in vitro* tests.

In conclusion, this is the most extensive study that reports *Fusarium* species associated with maize kernels in Uruguay and the presence of *Fusarium* toxins on grain samples. This knowledge is an important step for developing management strategies to minimize *Fusarium* infection and the presence of their toxins in maize. To this purpose, it was determined that the most effective fungicide for the control of the *Fusarium* species analyzed is metconazole. However, it is important to continue studying the sensitivity of Uruguayan *Fusarium* strains to fungicides, considering this an important strategy to control the disease in the field and improve crop sustainability.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s12550-023-00498-y>.

Funding This work was financed by the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), project number FSA-I-2017–1-139531.

Declarations

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

References

- Aguín O, Cao A, Pintos C, Santiago R, Mansilla P, Butrón A (2014) Occurrence of *Fusarium* species in maize kernels grown in north-western Spain. *Plant Pathol* 63:946–951
- Alexander NJ, Proctor RH, McCormick SP (2009) Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. *Toxin Rev* 28:198–215
- Almeida AP, Fonseca H, Fancelli AL, Direito GM, Ortega EM, Corrêa B (2002) Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian corn from sowing to harvest. *J Agric Food Chem* 50:3877–3882
- Alvarez CL, Azcarate MP, Pinto VF (2009) Toxigenic potential of *Fusarium graminearum* sensu stricto isolates from wheat in Argentina. *Int J Food Microbiol* 135:131–135
- Amarasinghe C, Tamburic-Ilincic L, Gilbert J, Brûlé-Babel AL, Fernando WG (2013) Evaluation of different fungicides for control of *Fusarium* head blight in wheat inoculated with 3ADON and 15ADON chemotypes of *Fusarium graminearum* in Canada. *Can J Plant Pathol* 35:200–208
- AOAC International Official Methods of Analysis of AOAC International (2019)
- Astolfi P, Reynoso MM, Ramirez ML, Chulze SN, Alves TCA, Tessmann DJ, Del Ponte EM (2012) Genetic population structure and trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat in southern Brazil. *J Plant Physiol* 61:289–295
- Baldwin TT, Zitomer NC, Mitchell TR, Zimeri AM, Bacon CW, Riley RT, Glenn AE (2014) Maize seedling blight induced by *Fusarium verticillioides*: accumulation of fumonisin B1 in leaves without colonization of the leaves. *J Agric Food Chem* 62:2118–2125

- Bankole S, Mabekoje O (2004) Occurrence of aflatoxins and fumonisins in pre-harvest maize from South-Western Nigeria. *Food Addit Contam* 21:251–255
- Udovicki B, Audenaert K, De Saeger S, Rajkovic A (2018) Overview on the mycotoxins incidence in Serbia in the period 2004–2016. *Toxins (basel)* 10:279
- Barros G, Alaniz Zanon M, Abod A, Oviedo M, Ramirez ML, Reynoso MM, Torres A, Chulze S (2012) Natural deoxynivalenol occurrence and genotype and chemotype determination of a field population of the *Fusarium graminearum* complex associated with soybean in Argentina. *Food Add Cont* 29:293–303
- Barroso V, Rocha L, Reis T, Reis G, Duarte A, Michelotto M, Correa B (2017) *Fusarium verticillioides* and fumonisin contamination in Bt and non-Bt maize cultivated in Brazil. *Mycotoxin Res* 33:121–127
- Becher R, Hettwer U, Karlovsky P, Deising HB, Wirsig SG (2010) Adaptation of *Fusarium graminearum* to tebuconazole yielded descendants diverging for levels of fitness, fungicide resistance, virulence, and mycotoxin production. *Phytopathology* 100:444–453
- Boutigny AL, Ward TJ, Ballois N, Iancu G, Ioos R (2014) Diversity of the *Fusarium graminearum* species complex on French cereals. *Eur J Plant Pathol* 138:133–148
- Brent KJ, Hollomon DW (2007) Fungicide resistance: the assessment of risk. In Global Crop Protection Federation. (FRAC Monograph No. 2.); The Fungicide Resistance Action Committee Brussels: Brussels, Belgium
- Castañares E, Martínez M, Cristos D, Rojas D, Lara B, Stenglein S, Dinolfo M (2019) *Fusarium* species and mycotoxin contamination in maize in Buenos Aires province, Argentina. *Eur J Plant Pathol* 155:1265–1275
- Chandler EA, Simpson DR, Thomsett MA, Nicholson P (2003) Development of PCR assays to Tri7 and Tri13 trichothecene biosynthetic genes, and characterization of chemotypes of *Fusarium*. *Physiol Mol Plant Pathol* 62:355–367
- Chen CJ, Wang JX, Luo QQ, Yuan SK, Zhou MG (2007) Characterization and fitness of carbendazim-resistant strains of *Fusarium graminearum* (wheat scab). *Pest Manag Sci* 63:1201–1207
- Choi J-H, Lee S, Nah J-Y, Kim H-K, Paek J-S, Lee S, Ham H, Kee Hong S, Yunb S-H, Lee T (2018) Species composition of and fumonisin production by the *Fusarium fujikuroi* species complex isolated from Korean cereals. *Int J Food Microbiol* 267:62–69
- Codex Alimentarius Commission (CAC) (2019). General standard for contaminants and toxins in food and feed. CXS 193–1995. 2019. Available from: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B193-1995%252FCXS_193e.pdf
- Del Ponte EM, Moreira GM, Ward TJ et al (2022) *Fusarium graminearum* species complex: a bibliographic analysis and web-accessible database for global mapping of species and trichothecene toxin chemotypes. *Phytopathology* 112:741–751
- Del Ponte EM, Spolti P, Ward TJ, Gomes LB, Nicolli CP, Kuhnem PR, Silva CN, Tessmann DJ (2015) Regional and field-specific factors affect the composition of *Fusarium* head blight pathogens in subtropical no-till wheat agroecosystem of Brazil. *Phytopathology* 105:246–254
- Desjardins AE, Proctor RH (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* 115:38–48
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, Robledo CW (2011) InfoStat (versión 2011). FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, Grupo InfoStat
- Duan Y, Zhang X, Ge C, Wang Y, Cao J, Jia X, Wang J, Zhou M (2014) Development and application of loop-mediated isothermal amplification for detection of the F167Y mutation of carbendazim-resistant isolates in *Fusarium graminearum*. *Sci Rep* 4:Article 7094
- Fallahi M, Saremi H, Javan-Nikkhah M, Somma S, Haidukowski M, Logrieco AF, Moretti A (2019) Isolation, molecular identification and mycotoxin profile of *Fusarium* species isolated from maize kernels in Iran. *Toxins* 11:297
- FDA – US Food and Drug Administration (2010). Guidance for industry and FDA: advisory levels for deoxynivalenol (DON) in finished wheat products for human consumption and grains and grain by-products used for animal feed. Available from: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-and-fda-advisory-levels-deoxynivalenol-don-finished-wheat-products-human>
- Finney DJ (1952) Probit Analysis (2nd Ed). J Inst Act 783: 388–390
- Garrido CE, Hernández Pezzani C, Pacin A (2012) Mycotoxins occurrence in Argentina's maize (*Zea mays* L.) from 1999 to 2010. *Food Control* 25:660–665
- Garmendia G, Pattarino L, Negrin C, Martinez-Silveira A, Pereyra S, Ward TJ, Vero S (2018b) Species composition, toxigenic potential and aggressiveness of *Fusarium* isolates causing Head blight of barley in Uruguay. *Food Microbiol* 76:426–433
- Umpiérrez-Failache M, Garmendia G, Pereyra S, Rodríguez-Haralambides A, Ward T, 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
- Garmendia G, Umpiérrez-Failache M, Ward TJ, 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* 70:286–332
- GB13078-2017 Hygienic Standard for Feeds (2017) https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/report/downloadreportbyfilename?filename=Hygienic%20Standard%20for%20Feeds_Beijing_China%20-%20Peoples%20Republic%20of_10-24-10.1007/s12550-023-00498-y2017.pdf
- Geiser DM, del Mar J-G, Kang S, Makalowska I, Veeraraghavan N, Ward TJ, Zhang N, Kuldau GA, O'donnell K, (2004) FUSARIUM-ID vol 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Euro J Plant Pathol* 110:473–479
- Gelderblom WC, Jaskiewicz K, Marasas WF, Thiel PG, Horak RM, Vleggaar R, Kriek NP (1988) Fumonisin—novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol* 54(7):1806–1811
- Ivić D, Sever Z, Kumanovska B (2011) In vitro sensitivity of *Fusarium graminearum*, *F. avenaceum* and *F. verticillioides* to carbendazim, tebuconazole, flutriafol, metconazole and prochloraz. *Pestic Phyto-med (belgrade)* 26:35–42
- Yli-Mattila T, Sundheim L (2022) Fumonisin in African Countries *Toxins* 14:419
- Kuhnem P, Ward T, Silva C, Spolti P, Ciliato M, Tessmann D, Del Ponte E (2016) Composition and toxigenic potential of the *Fusarium graminearum* species complex from maize ears, stalks and stubble in Brazil. *Plant Pathol* 65:1185–1191
- Lanza F, Zambolim L, Veras da Costa R, Vieira Queiroz V, Cota L, da Silva D, Coelho de Souza A, Fontes Figueiredo J (2014) Prevalence of fumonisin-producing *Fusarium* species in Brazilian corn grains. *Crop Prot* 65:232–237
- Lee J, Kim H, Jeon J-J, Kim H-S, Zeller K, Carter L, Leslie J, Lee Y-W (2012) Population Structure of and Mycotoxin Production by *Fusarium graminearum* from Maize in South Korea. *Appl Environ Microbiol* 78:2161–2167
- Leslie JF, Summerell BA (2006) The *Fusarium* laboratory manual. Ames, IA, USA: Blackwell Professional
- Liu SM, Chen Y, Yu JJ, Chen CJ, Wang JX, Zhou MG (2010) Transfer of the beta-tubulin gene of *Botrytis cinerea* with resistance

- to carbendazim into *Fusarium graminearum*. *Pest Manag Sci* 66:482–489
- Logrieco A, Mule G, Moretti A, Bottalico A (2002) Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *Eur J Plant Pathol* 108:597–609
- Maragos C (2010) Zearalenone occurrence and human exposure. *World Mycotoxin J* 3:369–383
- Marasas WF, Kellerman TS, Gelderblom WC, Coetzee JA, Thiel PG, van der Lugt JJ (1988) Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort J Vet Res* 55(4):197–203
- Marín P, De Ory A, Cruz A, Magan N, González-Jaén MT (2013) 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* 165:251–258
- Masiello M, Somma S, Ghionna V, Logrieco A, Moretti A (2019) *In vitro* and in field response of different fungicides against *Aspergillus flavus* and *Fusarium* species causing ear rot disease of maize. *Toxins* 11:11
- van der Westhuizen L, Shepard G, Scussel V, Costa L, Vismer H, Marasas RJ, W, (2003) Fumonisin contamination and *Fusarium* incidence in corn from Santa Catarina. *Brazil J Agric Food Chem* 51:5574–5578
- McCormick SP, Stanley AM, Stover NA, Alexander N (2011) Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. *Toxins* 3:802–814
- Mendes de Souza M, Sulyok M, Freitas-Silva O, Soares S, Brabet C, Machinski M, Leiko B, Azevedo E, Krska R, Schuhmache R (2013) Cooccurrence of mycotoxins in maize and poultry feeds from Brazil by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Sci World J* 2013:427369
- Methol M (2021) Maíz y sorgo: situación y perspectivas. In *Anuario de OPYPA*, pp193. Available from: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/anuario-opypa-2021/anuario-opypa-2021>
- MGAP, Resolución S/N/001 (2001) Límites máximos de DON en alimentos para animales. <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/institucional/normativa/resolucion-sn001-limitesmaximos-don-alimentos-para-animales>
- Mulè G, Susca A, Stea G, Moretti A (2004) Specific detection of the toxigenic species *Fusarium proliferatum* and *F. oxysporum* from asparagus plants using primers based on calmodulin gene sequences. *FEMS Microbiol Lett* 230:235–240
- Munkvold GP, Desjardins AE (1997) Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence? *Plant Dis* 82:556–565
- Munkvold GP (2003) Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. *Eur J Plant Pathol* 109:705–713
- O'Donnell K, Cigelnick E, Nirenberg HI (1998) Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90:465–493
- Pan D, Calero N, Mionetto A, Bettucci L (2013) Trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* from wheat in Uruguay. *Int J Food Microbiol* 162:120–123
- Pan D, Mionetto A, Calero N, Reynoso MM, Torres A, Bettucci L (2016) Population genetic analysis and trichothecene profiling of *Fusarium graminearum* from wheat in Uruguay. *Genet Mol Res* 15:1–11
- Pasquali M, Beyer M, Logrieco A et al (2016) A European database of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* trichothecene genotypes. *Front Microbiol* 7:406. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00406>
- Piñero S, Silva G, Scott P, Lawrence G, Stack M (1997) Fumonisin levels in Uruguayan corn products. *J. Assoc off Anal Chem Int* 80:825–829
- Ward T, Bielawski JP, Kistler HC, 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
- Pestka JJ (2010) Deoxynivalenol: Mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. *Arch Toxicol* 84:663–679
- Picot A, Barreau C, Pinson-Gadais L, Caron D, Lannou C, Richard-Forget F (2010) Factors of the *Fusarium verticillioides*-maize environment modulating fumonisin production. *Crit Rev Microbiol* 36:221–231
- Pirgozliev SR, Edwards SG, Hare MC, Jenkinson P (2002) Effect of dose rate of azoxystrobin and metconazole on the development of *Fusarium* head blight and the accumulation of deoxynivalenol (DON) in wheat grain. *Eur J Plant Pathol* 108:469–478
- Zhou D, Wang X, Chen G, Sun S, Yang Y, Zhu Z, Duan C (2018) The major *Fusarium* species causing maize ear and kernel rot and their toxigenicity in Chongqing. *China Toxins* 10:90
- Ponce-García N, Serna-Saldivar SO, García-Lara S (2018) Fumonisin and their analogues in contaminated corn and its processed foods - a review. *Food Addit Contam Part A* 35:2183–2203
- QinP XuJ, Jiang Y, Hu L, van der Lee T, Waalwijk C, Zhang W, Xu X (2020) Survey for toxigenic *Fusarium* species on maize kernels in China. *World Mycotoxin J* 13:213–223
- Reddy K, Salleh B, Saad B, Abbas H, Abel C, Shier W (2010) An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. *Toxin Rev* 29:3–26
- Reynoso MM, Ramirez ML, Torres A, Chulze S (2011) Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* strains isolated from wheat in Argentina. *Int J Food Microbiol* 145:444–448
- Salay E, Mercadante A (2002) Mycotoxins in Brazilian corn for animal feed: occurrence and incentives for the private sector to control the level of contamination. *Food Control* 13:87–92
- Sampietro D, Apudí G, BelizánI M, VattuoneI M, Catalán C (2013) Toxigenic potential of *Fusarium graminearum* isolated from maize of northwest Argentina. *Braz J Microbiol* 44:2
- Sampietro DA, Díaz CG, González V, Vattuone MA, Ploper LD, Catalán CA, Ward T (2011) Species diversity and toxigenic potential of *Fusarium graminearum* complex isolates from maize fields in northwest Argentina. *Int J Food Microbiol* 145:359–364
- Scauflaire J, Mahieu O, Louvieaux J, Foucart G, Renard F, Munaut F (2011) Biodiversity of *Fusarium* species in ears and stalks of maize plants in Belgium. *Eur J Plant Pathol* 131:59–66
- Scorz LB, Astolfi P, Reartes DS, Schmale DG, Moraes MG, Del Ponte EM (2009) Trichothecene mycotoxin genotypes of *Fusarium graminearum* sensu stricto and *Fusarium meridionale* in wheat from southern Brazil. *Plant Pathol* 58:344–351
- Scussel V, Savi G, Freitas Costas L, Mendonça J, Manfio D, Bittencourt K, Aguiar K, Stein S (2014) Fumonisin in corn (*Zea mays* L.) from Southern Brazil. *Food Addit Contam: Part B* 7:151–155
- Spolti P, Del Ponte EM, Dong Y, Cummings JA, Bergstrom GC (2014) Triazole sensitivity in a contemporary population of *Fusarium graminearum* from New York wheat and competitiveness of a tebuconazole-resistant isolate. *Plant Dis* 98:607–613
- Stumpf R, dos Santos J, Gomes L, Silva C, Tessmann D, Ferreira F, Machinski Junior M, Del Ponte E (2013) *Fusarium* species and fumonisins associated with maize kernels produced in Rio Grande do Sul State for the 2008/09 and 2009/10 growing seasons. *Braz J Microbiol* 44:89–95
- Sundheim L, Tsehaye H (2015) Fumonisin in Zambia and neighboring countries in a changing climate. *Adv Environ Res* 39:69–84
- Sundlof SF, Strickland C (1986) Zearalenone and zearanol: potential residue problems in livestock. *Vet Hum Toxicol* 28:242–250
- Tateishi H, Miyake T, Mori M, Kimura R, Sakuma Y, Saishoji T (2010) Sensitivity of Japanese *Fusarium graminearum* species complex isolates to metconazole. *J Pestic Sci* 35:419–430

Tava V, Prigitano A, Cortesi P, Esposito MC, Pasquali M (2021) *Fusarium musae* from diseased bananas and human patients: susceptibility to fungicides used in clinical and agricultural settings. J Fungi (basel) 7:784

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.