

ESPECIES DE *Fusarium* TOXIGÉNICAS EN SORGO DE GRANO

Leonor Carrillo*, Silvia Eugenia Gómez Molina, Marcelo Rafael Benítez Ahrendts.

Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Jujuy, Alberdi 47, 4600 SS Jujuy, Argentina.

* lcarrillo@arnet.com.ar

Boletín Micológico (Valparaíso) 16: 15-18, 2001

Resumen

Se aislaron cepas de *Fusarium* endofíticos de *Sorghum bicolor* (L.) Moench ssp. *bicolor* cosechado en el noroeste argentino, y se identificaron por las características macro y micromorfológicas como *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg, *F. chlamydosporum* Wollenw. & Reinking y *F. semitectum* Berk. & Revenel. La investigación de fumonisinas, en los granos de sorgo germinados y en los cultivos sobre maíz blanco, se hizo por ELISA y la de tricotecenos por TLC. La cepa de *F. chlamydosporum* produjo T-2, DON y otros tricotecenos de los grupos A y B. La concentración de fumonisinas observada en los granos de sorgo germinados y amohosados con *F. proliferatum* fue de 2 a 6,5 mg/kg, mientras que en los cultivos alcanzó hasta 16 mg/kg. Además se aisló *F. verticilloides* (Sacc.) Nirenberg productor de fumonisinas, de un lote sorgo de la pampa húmeda argentina.

Palabras clave: *Fusarium* spp., fumonisinas, tricotecenos, *Sorghum bicolor*, sorgo

Summary

Endophytic *Fusarium* strains were isolated from germinated grains of *Sorghum bicolor* (L.) Moench ssp. *bicolor* harvested in the northwest of Argentina. *F.*

proliferatum (Matsush.) Nirenberg, *F. chlamydosporum* Wollenw. & Reinking and *F. semitectum* Berk. & Revenle were identified. *F. chlamydosporum* white maize culture investigated by TLC showed T-2, DON and others A & B trichotecenes. Mouldy germinated sorghum grains investigated for fumonisins with ELISA kit had 2 - 6.5 mg /kg and *F. proliferatum* cultures on white maize reached to 16 mg fumonisins /kg. Sorghum samples from argentinian humid pampa, had a fumonisins producer *F. verticilloides* (Sacc.) Nirenberg.

Key words: *Fusarium* spp., fumonisins, trichotecenes, *Sorghum bicolor*, sorghum

Introducción

En la Argentina los granos del sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench ssp. *bicolor*) se usan principalmente en mezclas balanceadas para alimento animal, aunque también se emplea para la fermentación alcohólica (1).

Cuando se inicia la germinación de algunos granos infectados, por ejemplo de maíz, se producen además de las defensas proteicas ácidos hidroxámicos cíclicos (benzoxazinoides) y los hongos capaces de hidrolizar estos inhibidores de la actividad fúngica persisten como endófitos (2). El sorgo, que no forma benzoxazinoides, suele contener algunos mohos endofíticos especialmente del género *Fusarium* (2) que durante la germinación para el malteado desarrollan conduciendo al deterioro de los granos y a la producción de micotoxinas que pueden llegar a las bebidas elaboradas (3).

Una de las toxinas producida por el género *Fusarium* es la fumonisina B₁, que daña las células cerebrales,

hepáticas y renales (4,5,6) y es generada con gran variabilidad por las cepas de *Fusarium proliferatum* (Matsush.) Nirenberg, *Fusarium verticilloides* (Sacc.) Nirenberg y otras especies en diversos granos(5,7).

Las fumonisinas de la serie B son las más frecuentes y las más tóxicas para plantas y animales. Entre los métodos para cuantificar fumonisinas totales está la prueba ELISA competitiva indirecta que usa peroxidasa como enzima marcadora y da valores algo mayores a los que se obtienen con HPLC (8).

La presencia de fumonisinas en maíz cosechado en la pampa húmeda alcanza valores de hasta 10 mg/kg (9,10) y está relacionada con los casos de leucoencefalomalacia equina registrados en la zona (11), siendo *F. verticilloides* la especie de *Fusarium* dominante en maíz argentino (12,13,14) así como en alimentos balanceados (15).

El objetivo del trabajo consistió en conocer las especies endofíticas de *Fusarium* en los granos de sorgo cultivado en el noroeste argentino, y comprobar si eran productoras de fumonisinas.

Materiales y métodos

Muestreo. Se tomaron al azar y en distintas oportunidades, tres muestras de cada uno de los lotes de sorgo de grano cosechados en tres localidades de la provincia de Salta, Argentina (C6, A7, L8), las que fueron almacenadas en condiciones de temperatura y humedad relativa ambiente desfavorables para el crecimiento fúngico. Con fines comparativos se estudiaron también muestras de un lote del norte de la pampa húmeda (SF8).

Incubación. Se desinfectaron los granos con etanol 70% v/v durante 2 minutos y con lavandina (4-5% cloro activo) diluida 1:10 en volumen, durante 2 minutos y se enjuagaron con agua estéril (16). Se colocaron los granos sobre papel estéril humedecido dentro de cajas de Petri (20 en cada una) las que permanecieron a la temperatura ambiente (18-22°C) durante 2 semanas, siendo observadas cada tres días. También se incubaron en iguales condiciones granos sin desinfectar.

Cultivos. Los hongos desarrollados sobre los granos fueron repicados en PDA (agar papa glucosa) y agar SN e incubados a 25°C. La composición del agar SN era KH_2PO_4 1g, KNO_3 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, KCl 0,5 g, glucosa 0,2 g, sacarosa 0,2 g, agar 20 g, agua 1 L, y se depositaron trozos de papel de filtro estéril en la superficie de las placas (17). Las cepas se conservaron en agar zapallo. Éste se preparó hirviendo 200 g de zapallo en 1 L de agua corriente durante 30 minutos, luego de filtrar y restaurar el volumen se agregó 20 g de agar y se esterilizó. También se cultivaron en placas de CYA (agar Czapek con extracto de levadura) con una sola picadura central, las que se incubaron a 5, 25 y 37°C (16).

Para observar la formación de toxinas se hicieron cultivos sobre maíz quebrado blanco, esterilizado en dos volúmenes de agua, y se incubaron a la temperatura ambiente.

Identificación. Para observar la evolución de la morfología microscópica se realizaron microcultivos en agar SN y agar zapallo, incubados a temperatura ambiente bajo luz solar indirecta. Para la identificación se consultaron las obras de Booth (18), Pitt & Hocking (16) y Seifert(17).

Investigación de toxinas. La investigación de

fumonisinias se hizo por ELISA competitivo con un equipo Neogen sobre el extracto, en metanol al 70% v/v, de material seco molido proveniente de los granos germinados y amohosados así como de los granos sin desarrollo fúngico y de los cultivos sobre maíz blanco.

Para la búsqueda de tricotecenos se depositó un trozo de grano del maíz colonizado sobre una placa de TLC normal (10 cm x 10 cm) con el micelio hacia la capa de silicagel y 20 μ L de cloroformo. Se hizo la corrida con tolueno-acetato de etilo-ácido fórmico 90% (5+4+1) (19). Se observó bajo luz UV larga antes y después de rociar la placa con $AlCl_3$ al 20% p/v y calentarla a 100°C durante 5 minutos para que los tricotecenos B desarrollaran una fluorescencia celeste. Luego se roció la placa con reactivo cromotrópico y se la calentó de igual manera con el fin de que los tricotecenos A tomaran fluorescencia celeste y muchos de ellos se vieran de color púrpura con luz visible. El reactivo se preparó mezclando 1 parte de solución acuosa de ácido cromotrópico al 10% p/v con 5 partes de $H_2SO_4-H_2O(5+3)$ (20). Se empleó como testigo una solución que contenía T-2 y DON.

Resultados

Cepas. Se aislaron las siguientes cepas de *Fusarium* a partir de los granos de sorgo desinfectados e incubados: lote A7 n° 759, 761 y 766; lote C6 ninguna; lote L8 n° 751, 752, 753, 754; lote SF8 n° 764. La incidencia de granos desinfectados que contenían *Fusarium*, fue del 5,4% en los lotes A7 y L8, mientras que en el lote SF8 fue del 11%. Se observó poca diferencia en la incidencia de *Fusarium* Link entre los granos desinfectados y los no tratados antes de la germinación.

Identificación. Las cepas de *Fusarium* aisladas de los granos desinfectados fueron identificadas por las características macromorfológicas sobre PDA y CYA, y las micromorfológicas sobre agar SN y agar zapallo.

Características de la cepa 751: micelio algodonoso blanco a salmón sobre CYA, pulverulento sobre PDA con reverso rojizo; macroconidios relativamente escasos con 3 a 5 septos de 32-38 x 3,5-4 μm ; microconidios abundantes, alargados, de 10-13 x 2,5-3 μm , algunos con 1 septo; fiálides y polifiálides; clamidosporos relativamente grandes hasta 15 μm de diámetro luego de dos semanas; crecimiento escaso a 5°C; identificada con *Fusarium chlamydosporum* Wollenw. & Reinking.

Características de la cepa 754: micelio blanco a beige pálido con densos penachos sobre CYA y PDA, reverso pálido; macroconidios con 3 a 5 septos, de 25-40 x 2,5-4 μm ; polifiálides; clamidosporos escasos, intercalares, a veces en cadenas a las dos semanas; sin microconidios ni crecimiento a 37°C; identificada con *Fusarium semitectum* Berk. & Ravenel.

Características de las cepas 752, 753, 759, 761 y 766: micelio blanco a salmón con reverso pálido a parduzco sobre CYA y PDA; cadenas y pseudocabezuelas de microconidios de 6-8 x 2-3 μm ; mono y polifiálides; macroconidios escasos con 3 o 4 septos, de 27-40 x 3-4 μm ; sin crecimiento a 5°C; identificadas con *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg.

Características de la cepa 764: micelio chato, blanco a lila con reverso parduzco a violáceo sobre CYA y PDA; microconidios de 4,5-9 x 1,5-2,5 μm en cadenas; macroconidios escasos de 25-40 x 2,7-3,5 μm ; sólo

fiálides; identificada con *F. verticilloides* (Sacc.) Nirenberg.

Como no se aislaron las cepas de la totalidad de los granos contaminados no se puede expresar cuantitativamente la frecuencia de cada especie, pero predominó *Fusarium proliferatum* en los sorgos de la provincia de Salta.

Producción de toxinas. En los cultivos sobre maíz blanco, la cepa n° 751 de *F. chlamydosporum* formó T-2 y otros tricotecenos del grupo A, además de DON y otros del grupo B, pero no fueron cuantificados.

Las cepas de *F. proliferatum* n° 761 y 766 y *F. verticilloides* n° 764 produjeron fumonisinas. La concentración de fumonisinas en los granos de sorgo amohosados con *F. proliferatum* fue de 2 a 6,5 mg/kg, mientras que en los cultivos puros sobre maíz alcanzó hasta 16 mg/kg.

Discusión

Como se expuso en los resultados prevalece *F. proliferatum* toxigénico en los sorgos de la provincia de Salta (Argentina) acompañada de otras dos especies (*F. chlamydosporum*, *F. semitectum*), pero en el sorgo de la pampa húmeda solo se encontró *F. verticilloides*. Esto concuerda en parte con las observaciones de Gonzalez et al.(21) y Saubois et al.(22) donde la frecuencia de las especies halladas fué *F. verticilloides* 88,9%, *F. chlamydosporum* 66,7%, *F. semitectum* 22,2% y *Fusarium subglutinans* 11,1%. También en sorgos del centro y sur de África (23) predominó *F. verticilloides* aislado en el 65,2% de los casos, y la variedad alcanzó a 13 especies de *Fusarium*. Además suele hallarse en sorgo una especie de la

sección *Liseola* que no produce fumonisinas: *F. thapsinum* Klittich et al. (24).

Las cepas aisladas de sorgo en este trabajo produjeron menos del 1% de la concentración de fumonisinas totales en comparación con unas cepas de *F. proliferatum*, aisladas de maíz argentino (25), que formaron un promedio de 2 g de fumonisinas totales /kg de maíz *in vitro*, donde la cantidad de fumonisina B₂ duplicó la de fumonisina B₁.

La mayor concentración de fumonisinas totales alcanzada en los granos de sorgo donde desarrolló el micelio del endófito superó los niveles máximos recomendados para los forrajes de equinos (5 mg/kg) (26).

Las muestras de sorgo consumido en hogares hindúes afectados por un brote de intoxicación contenían hasta 7,8 mg de fumonisina B₁ /kg (27). Por otra parte, unos forrajes relacionados con la leucoencefalomalacia equina contenían hasta 27 mg de fumonisina B₁ /kg y 12 mg de B₂ /kg, mientras que otros conectados con el edema pulmonar porcino alcanzaban 10 mg de fumonisina B₁/kg (8).

Referencias

1. Sarasola AA, Rocca MA. 1981. Enfermedades y daños sobre maíz, sorgo y girasol en la Argentina. Hemisferio Sur, Buenos Aires.
2. Glenn AE, Hinton DM, Yates IE, Bacon CW. 2001. Detoxification of corn antimicrobial compounds as the basis for the isolating *Fusarium verticilloides* and some other *Fusarium* species from corn. Applied and Environmental Microbiology 67: 2973-2981.
3. Hlywka JJ, Bullerman LB. (1999) Occurrence of fumonisin B₁ and B₂ in beer. Food Additives and Contaminants 16: 319-324.
4. Ross PF, Nelson PE, Richard JL, Osweiler GD, Rice LG, Plattner RD, Wilson TM. (1990) Production of fumonisins by *Fusarium*

- moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. Applied and Environmental Microbiology 56: 3225-3226.
5. Monnet-Tschudi F et al. (1999) The naturally occurring food mycotoxin fumonisin B1 impairs myelin formation in aggregating brain cell culture. NeuroToxicology 20: 41-48.
 6. FAO/OMS/PNUMA. 1999. Micotoxinas de interés creciente: fumonisinas. Tercera Conferencia Internacional Mixta sobre Micotoxinas. Túnez, p.4-5.
 7. Klaasen JA, Nelson PE. (1998) Fumonisin production by field strains of *Fusarium nygamai* (*Gibberella nygamai*) and ascospore progeny of laboratory crosses. World Journal of Microbiology and Biotechnology 14: 873-877.
 8. Abbas HK, Shier WT. (1998) Fumonisin as mycotoxins and phytotoxins. Recent Res. Devel. In Agricultural & Food Chem. 2: 27-47.
 9. Peralta Sanhueza CE, Resnik SL. 1997. Co-ocurrencia natural de fumonisinas, aflatoxinas y zearalenona en maíz argentino. Libro de Resúmenes, X Seminario Latinoamericano y del Caribe de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Buenos Aires, nº5-1.
 10. Sydenham EW, Shephard GS, Thiel PG, Marasas WFO, Peralta Sanhueza CE, Resnik SL. 1993. Fumonisin in argentinian field-trial corn. J. Agric. Food Chem. 41: 891-895.
 11. Velazco V, Idiart JR, Faifer G, Godoy HM, Costa SF, Giorgio N. 1993. Leucoencefalomalacia equina en la provincia de Buenos Aires: estudios anatómo-patológicos y micotoxicológicos. Libro de Resúmenes, VI Congreso Argentino de Micología, Buenos Aires, nº 1025.
 12. González HHL, Resnik SL, Boca RT, Marasas WFO. 1995. Mycoflora of argentinian corn harvested in the main production area in 1990. Mycopathologia 130: 29-36.
 13. Chulze MC et al. 1998. Ecophysiology, fumonisin production and some genetic aspects of *Fusarium* section *Liseola* on maize in Argentina. 8th International *Fusarium* Workshop, CABI Bioscience, Egham.

14. Saubois A, Nepote MC, Piontelli E. 1996. Regional distribution of *Fusarium* strains in corn from the province of Santa Fe, Argentina. *Boletín Micológico* 11: 75-90.
15. Dalcerro A, Magnoli C, Luna M, Ancasi G, Reynoso MM, Chiacchiera S, Miazzo R, Palacio G. 1998. Mycoflora and naturally occurring mycotoxins in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia* 141: 37-43.
16. Pitt JI, Hocking A. (1997) *Fungi and Food Spoilage*. Blackie A&P, London.
17. Seifert K. (1996) *FusClé*. Clé Interactive de *Fusarium*. Agriculture et Agroalimentaire Canada.
18. Booth C. (1971) The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
19. Betina V. (1985) Thin-layer chromatography of mycotoxins. *Journal of Chromatography* 334: 211-276.
20. Baxter JA, Terhune SJ, Qureshi SA. (1983) Use of chromotropic acid for improved thin-layer chromatographic visualization of trichothecene mycotoxins. *Journal of Chromatography* 261: 130-133.
21. Gonzales HHL, Martínez EJ, Resnik SL. (1997) Fungi associated with sorghum grain from Argentina. *Mycopathologia* 139: 35-41.
22. Saubois A, Piontelli Laforet E, Nepote MC, Wagner ML. (1999) Mycological evaluation of a sorghum grain of Argentina, with emphasis on the characterization of *Fusarium* species. *Food Microbiology* 16: 435-445.
23. Onyike NB, Nelson PE. (1992) *Fusarium* species associated with sorghum grain from Nigeria, Lesotho and Zimbabwe. *Mycologia* 84: 452-458.
24. Klittich CJR, Leslie, Nelson PE, Marasas WFO. 1997. *Fusarium thapsinum* (*Gibberella thapsina*): A new species in section *Liseola* from sorghum. *Mycologia* 89: 643-652.
25. Chulze SN, Ramírez ML, Pascale M, Visconti A. 1998. Fumonisin production by, and mating populations of, *Fusarium* section *Liseola* isolates from maize in Argentina. *Mycological Research* 102: 141-144.
26. FDA/CFSAN. 2000. Fumonisin levels in human foods and animal feeds. Draft guidance for industry. U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition.

27. Bhat RV, Shetty PH, Amruth RP, Sudershan RV. 1997. A foodborne disease outbreak due to consumption of moldy sorghum and maize containing fumonisin mycotoxins. *Journal of Toxicology, Clinical Toxicology* 35:249-255.