

ESPECIES DE *Fusarium* TOXIGENICAS EN SORGO DE GRANO

(Toxicogenic *Fusarium* species in grains of Sorghum)

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

Palabras clave: *Fusarium* spp., fumonisinas, tricotecenos *Sorghum bicolor*, sorgo
Key words: *Fusarium* spp., fumonisins, trichotecenes, *Sorghum bicolor*, sorghum

RESUMEN

Se aislaron cepas de *Fusarium* endofíticos de *Sorghum bicolor* (L.) Moench ssp. *bicolor*, cosechado en el noroeste argentino y se identificaron por sus 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 enmohecidos 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. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, productor de fumonisinas de un lote de sorgo de la pampa húmeda argentina.

SUMMARY

Endophytic *Fusarium* strains were isolated from germinated grains of *Sorghum bicolor* (L.) Moench ssp. *bicolor*, harvested in the northwest of Argentina and they were identified as *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg, *F. chlamydosporum* Wollenw. & Reinking and *F. semitectum* Berk. & Revenel, according to the macro-micro-morphological characteristics. The investigation for fumonisins in the grains of germinated sorghum and the white maize culture was carried out by means of ELISA while that one for trichotecenes by TLC. *F. chlamydosporum* strain produced T-2, DON and other trichotecenes of groups A and B. Concentration of fumonisins observed in sorghum grains germinated and moulded with *F. proliferatum* was 2 to 6,5 mg/kg, whereas in cultures it reached as far as 16 mg/kg. Besides, *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, a fumonisin producer was isolated from a sorghum lot taken at an argentinian humid pampa.

INTRODUCCION

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

Cuando se inicia la germinación de algunos granos infectados por hongos, por ejemplo en el maíz, se producen además de las defensas proteicas, ácidos hidroxámicos cíclicos (benzoxazinoides) y los hongos capaces de hidrolizar estos inhibidores de la actividad fúngica pueden persistir 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, se 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 verticillioides* (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, se em-

plea la prueba competitiva indirecta de ELISA, 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. verticillioides*, la especie dominante en maíz argentino (12,13,14) así como en alimentos balanceados (15).

El objetivo de este trabajo, consistió en conocer las especies endofíticas de *Fusarium* en los granos de sorgo cultivado en el noroeste argentino, y comprobar la posible producción de fumonisinas y tricotecenos

MATERIALES Y METODOS

1.- 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).

2.- 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 placas 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.

3.- 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 fue: KH_2PO_4 1g, KNO_3 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 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 para estimular la esporulación (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.

4.- 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 los trabajos de Booth (18), Pitt & Hocking (16) y Seifert (17).

5.- Investigación de toxinas.

La investigación de fumonisinas 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 enmohecidos, 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 µl 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 calentándose de igual manera con el fin de que los tricotecenos A tomaran fluorescencia celeste y muchos de ellos adquirieran un 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 $\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (5+3) (20). Se empleó como testigo una solución que contenía T-2 y DON.

RESULTADOS

1.- Aislamientos.

A partir de los granos de sorgo desinfectados e incubados, se obtuvieron los siguientes aislamientos de *Fusarium*: lote A7 n° 759, 761 y 766 (todos *F. proliferatum*); lote C6 ninguna; lote L8 n° 751 (*F. chlamydosporum*), 752, 753 (ambas *F. proliferatum*), 754 (*F. semitectum*); lote SF8 n° 764 (*F. verticillioides*). 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* entre los granos desinfectados y los no tratados antes de la germinación.

2.- Identificación.

Las cepas de *Fusarium* aisladas de los granos des-

infectados fueron identificadas por las características macromorfológicas sobre PDA y CYA, y las micromorfológicas sobre agar SN y agar zapallo.

Fusarium chlamydosporum Wollenw. & Reinking (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; presencia de mono y polifálides; clamidosporas relativamente grandes hasta 15 µm de diámetro luego de dos semanas; crecimiento escaso a 5°C.

Fusarium semitectum Berk. & Ravenel (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; presencia de mono y polifálides; clamidosporas escasas, intercalares, a veces en cadenas a las dos semanas; sin microconidios. No crece a 37°C.

F. proliferatum (Matsush.) Nirenberg (Cepas 752, 753, 759, 761, 766).

Micelio blanco a salmón con reverso pálido a parduzco sobre CYA y PDA; cadenas y falsas cabezas de microconidios de 6-8 x 2-3 µm; presencia de mono y polifálides; macroconidios escasos con 3 o 4 septos, de 27-40 x 3-4 µm. No crece a 5°C.

F. verticillioides (Sacc.) Nirenberg. (Cepa 764).

Micelio plano, 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. Presencia exclusiva de monofálides.

Aún cuando nuestra metodología no incluyó un estudio cuantitativo, se pudo observar un predominio de *Fusarium proliferatum* en los sorgos de la provincia de Salta.

3.- Producción de toxinas.

En los cultivos sobre maíz blanco, la cepa n° 751 (*F. chlamydosporum*) produjo toxina T-2 y otros tricotecnos

del grupo A, además de DON y otros del grupo B, que no fueron cuantificados.

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

DISCUSION

Se pudo apreciar en nuestros resultados, la prevalencia de *F. proliferatum* toxicogénico en los sorgos de la provincia de Salta (Argentina), acompañado de otras dos especies (*F. chlamydosporum* y *F. semitectum*). Sin embargo, en el sorgo de la pampa húmeda sólo se encontró *F. verticillioides*. 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 de un 88,9% en *F. verticillioides* un 66,7% en *F. chlamydosporum*, 22,2 %, en *F. semitectum* y 11,1% en *F. subglutinans*. En sorgos del centro y sur de África (23), de las 13 especies de *Fusarium* aisladas, se observó un predominio de *F. verticillioides* (65,2%). Klittich *et al.* (24) identificaron en sorgo una especie de la sección Liseola que no produce fumonisinas (*F. thapsinum*).

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), las 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 se 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 otras relacionadas con el edema pulmonar porcino alcanzaron 10 mg de fumonisina B₁ /kg (8).

REFERENCIAS

1. Sarasola, A.A. & Rocca, M. A. (1981). Enfermedades y daños sobre maíz, sorgo y girasol en la Argentina. Hemisferio Sur, B. Aires.
2. Glenn, A.E.; Hinton, D.M.; Yates, I.E.; Bacon, C.W. (2001). Detoxification of corn antimicrobial compounds as the basis for the isolating *Fusarium verticillioides* and some other *Fusarium* species from corn. Applied and Environmental Microbiology 67: 2973-2981
3. Hlywka, J.J. & Bullerman, L.B. (1999). Occurrence of fumonisin B₁ and B₂ in beer. Food Additives and Contaminants 16: 319-324

4. Ross, P.F.; Nelson, P.E.; Richard, J.L.; Osweiler, G.D.; Rice, L.G.; Plattner, R.D.; Wilson, T.M. (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. (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, J.A. & Nelson, P.E. (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, H.K. & Shier, W.T. (1998). Fumonisin as mycotoxins and phytotoxins. Recent Res. Devel. In Agricultural & Food Chem. 2: 27-47
9. Peralta-Sanhueza, C.E. & Resnik, S.L. (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, n°5-1
10. Sydenham, E.W.; Shephard, G.S.; Thiel, P.G.; Marasas, W.F.O.; Peralta-Sanhueza, C.E.; Resnik, S.L. (1993). Fumonisin in argentinian field-trial corn. J. Agric. Food Chem. 41: 891-895
11. Velazco, V.; Idiart, J.R.; Faifer, G.; Godoy, H.M.; Costa, S.F.; 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, n° 1025
12. Gonzáles, H.H.L.; Resnik, S.L.; Boca, R.T.; Marasas, W.F.O. (1995). Mycoflora of argentinian corn harvested in the main production area in 1990. Mycopathologia 130: 29-36
13. Chulze, M.C. (1998). Ecophysiology, fumonisins production and some genetic aspects of *Fusarium* section Liseola on maize in Argentina. 8th International *Fusarium* Workshop, CABI Bioscience, Egham.
14. Saubois, A.; Nepote, M.C. & Piontelli, E. (1996). Regional distribution of *Fusarium* strains in corn from the province of Santa Fe, Argentina. Boletín Micológico 11: 75-90
15. Dalcero, A.; Magnoli, C.; Luna, M.; Ancasi, G.; Reynoso, M.M.; Chiacchiera, S.; Miazzi, R.; Palacio, G. (1998). Mycoflora and naturally occurring mycotoxins in poultry feeds in Argentina. Mycopathologia 141: 37-43
16. Pitt, J.I. & 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, J.A.; Terhune, S.J. & Qureshi, S.A. (1983). Use of chromotropic acid for improved thin-layer chromatographic visualization of trichothecene mycotoxins. Journal of Chromatography 261: 130-133
21. Gonzales, H.H.L.; Martínez, E.J. & Resnik, S.L. (1997). Fungi associated with sorghum grain from Argentina. Mycopathologia 139:35-41
22. Saubois, A.; Piontelli, E.; Nepote, M.C.; Wagner, M.L. (1999). Mycological evaluation of a sorghum grain of Argentina, with emphasis on the characterization of *Fusarium* species. Food Microbiology 16: 435-445
23. Onyike, N.B. & Nelson, P.E. (1992). *Fusarium* species associated with sorghum grain from Nigeria, Lesotho and Zimbabwe. Mycologia 84: 452-458
24. Klittich, C.J.R.; Leslie, Nelson, P.E.; Marasas, W.F.O. (1997). *Fusarium thapsinum* (*Gibberella thapsina*): A new species in section Liseola from sorghum. Mycologia 89: 643-652
25. Chulze, S.N.; Ramírez, M.L.; 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, R.V.; Shetty, P.H.; Amruth, R.P.; Sudershan, R.V. (1997). A foodborne disease outbreak due to consumption of moldy sorghum and maize containing fumonisin mycotoxins. Journal of Toxicology, Clinical Toxicology 35:249-255