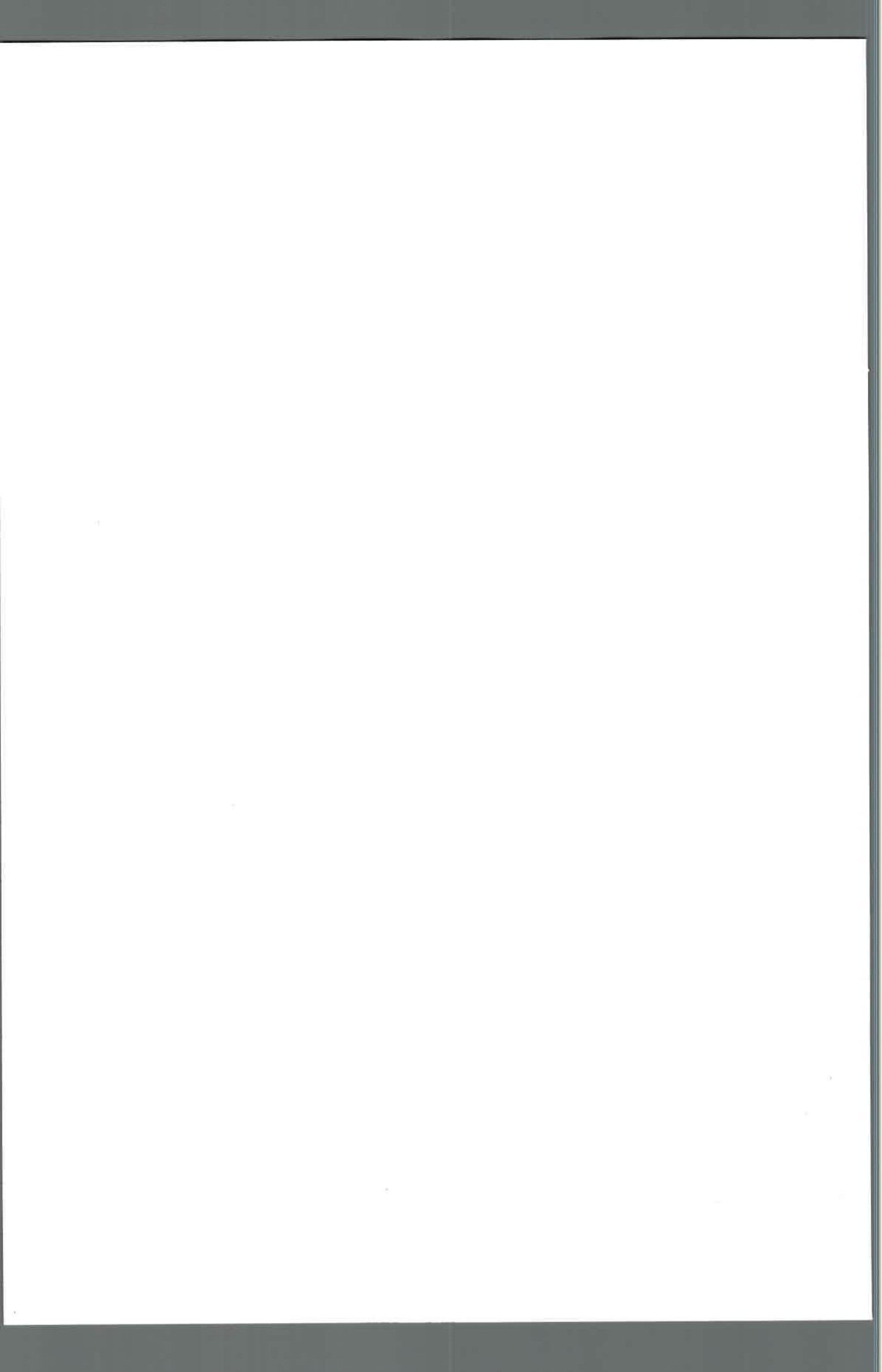


76139

CENDOYA, EUGENIA

Colectora de fauna porifera e invertebrados marinos

2017 **76139**





Crear... Crear... Crecer...

Universidad Nacional de Río Cuarto

Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales

Tesis para acceder al título de Doctor en Ciencias Biológicas

ECOFISIOLOGÍA DE *Fusarium proliferatum* E INCIDENCIA DE FUMONISINAS EN TRIGO Y SUB-PRODUCTOS

Mic. Eugenia Cendoya

DIRECTOR: Dra. María Laura Ramirez

CO-DIRECTOR: Dra. María Cecilia Farnochi

Río Cuarto, Junio 2017

MPA:
Clasif:
T- 1096

COMISIÓN ASESORA

Dr. Marcelo Helguera, INTA Marcos Juarez

Dra. Teresa Alconada, Universidad Nacional de La Plata

Dra. Andrea Nesci, Universidad Nacional de Río Cuarto

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

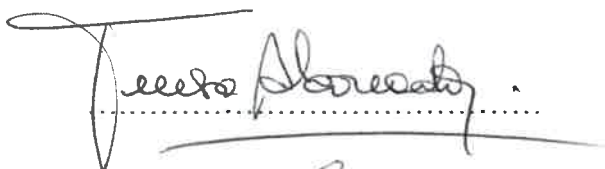
Universidad Nacional de Río Cuarto de Junio de 2017

Calificación... 10 (SOBRESALIENTE)

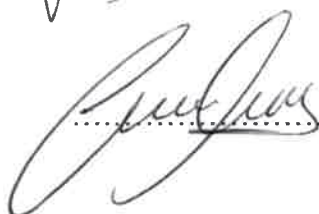
JURADO



.....
Dr. Marcelo Helguera



.....
Dra. Teresa Alconada



.....
Dra. Andrea Nesci

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, en especial al Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Exactas por darme la posibilidad de desarrollar la presente tesis.

A CONICET, por brindarme los recursos necesarios para llevar a cabo esta tesis.

A los miembros de la Comisión Evaluadora y Jurado, Dr. Marcelo Helguera, Dra. Teresa Alconada y Dra. Andrea Nesci, por la dedicación y sugerencias que permitieron el progreso del proyecto de trabajo.

A la Dra. María Laura Ramirez y Dra. María Cecilia Farnochi, por contribuir con mi formación profesional en sus roles de Directora y Co-directora, respectivamente de la presente Tesis.

A mis compañeros del Laboratorio de Micología de la UNRC, Carla, Ceci, Ema, Gaby, Juli, Laura GP, Meli, Nadia, Palala, Silvi, Sofi, Vale, Vane, Vero, Jessi, Guille, Mauri, Nico, Pía, Juan, Peto por todo lo aprendido y los buenos momentos compartidos.

Al Dr. Michel Sulyok del Instituto BOKU, Austria, y a la Dra. Estella M. Chiacchiera por su colaboración en la realización de una parte de la presente Tesis.

A la Dra. Sofía Chulze y Dra. Adriana Torres por sus aportes en la realización de la presente tesis.

Al programa BEC.AR, Argentina y Campus France, por otorgarme la posibilidad de viajar a Francia a realizar una Estadía de Investigación, y a la Dra. Florence Richard-Forget y al Dr. Christian Barreau de MycSa, INRA-Bordeaux Aquitaine, por recibirme en sus laboratorios. A Ccori, Benoit, Silvá, Christine, Lea, Laetitia de MycSa, INRA-Bordeaux Aquitaine, por su gran colaboración en las tareas de laboratorio realizadas allí, y brindarme su amistad durante mi estadía.

A mis amigos de La Rouquette, Awatef, Gerardo, Zaza, Noelia, Franklin, Carolina y Antonio, por todos los buenos momentos compartidos.

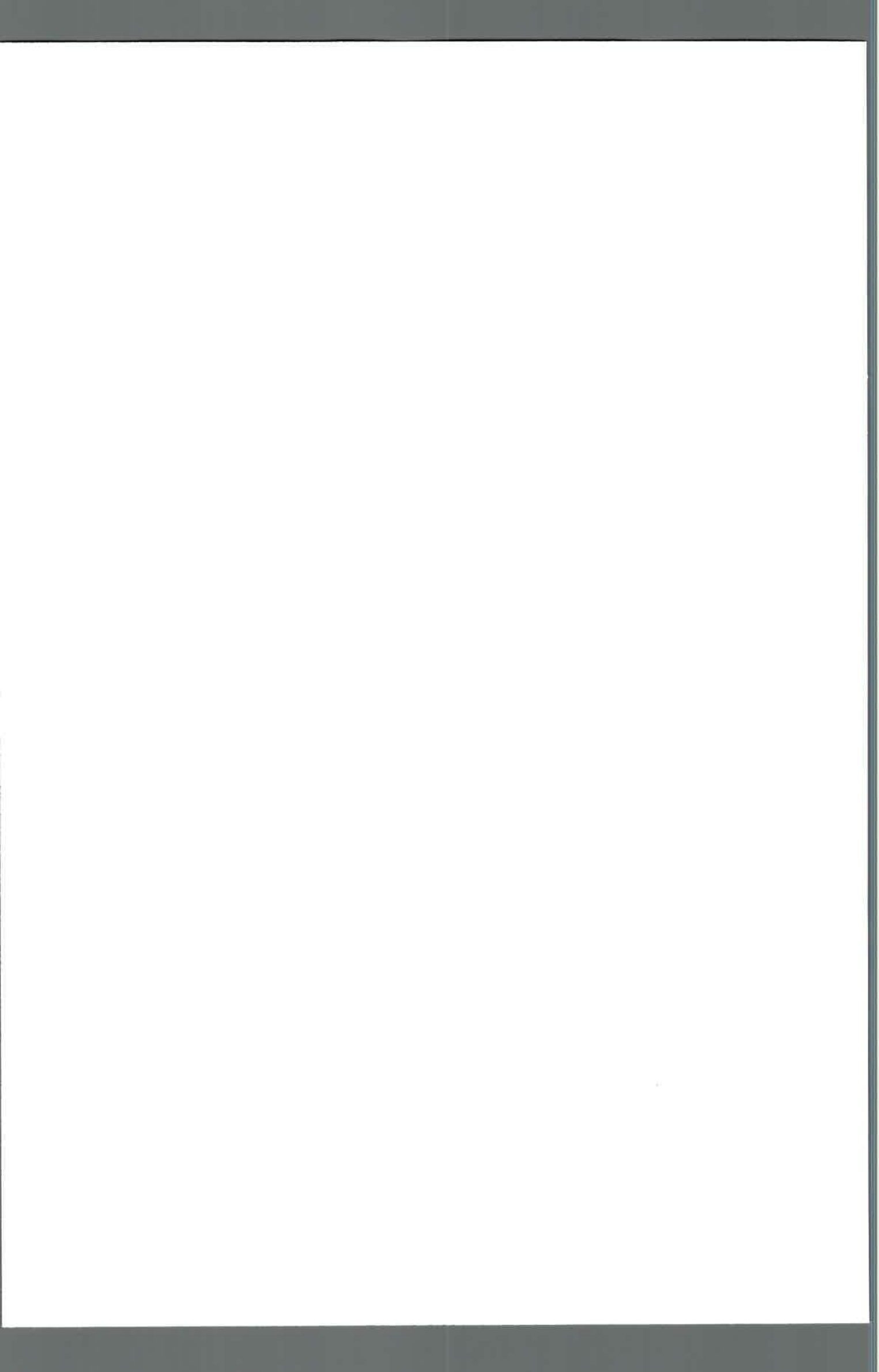
¡Muchas gracias a todos!

RESUMEN

El trigo en Argentina es un cereal estratégico desde el punto de vista del consumo humano, puede ser molido para la fabricación de productos como harinas y semolina, los cuales conforman los ingredientes básicos para la elaboración del pan, pasta u otros productos de panadería. Su consumo por habitante en Argentina se estima en 86 kg/habitante/año. En los últimos años numerosos trabajos han informado acerca de la prevalencia de *Fusarium proliferatum*, y la consecuente contaminación con fumonisinas (FBs) en granos de trigo en el mundo, inclusive en Argentina. Las FBs son micotoxinas que en humanos han sido asociadas al cáncer de esófago y a defectos en la formación del tubo neural. La prevención de la contaminación de alimentos con micotoxinas se considera muy importante, y tiende a examinar los puntos críticos en los que los hongos micotoxigenicos y las micotoxinas podrían entrar a la cadena alimentaria. La colonización y la producción de micotoxinas por especies de *Fusarium* en un sustrato son consecuencia de la interacción de numerosos factores, dentro de los cuales la actividad de agua (a_w) y la temperatura serían los más importantes. En el siguiente trabajo de tesis se analizó mediante HPLC-MS/MS la incidencia natural de fumonisinas en 40 muestras de granos de trigo duro y 135 muestras de trigo pan obtenidas de la principal zona triguera de Argentina (sur de la provincia de Buenos Aires) y la co-ocurrencia de esa toxina con deoxinivalenol (DON) en 25 muestras. Por otro lado, se analizó la incidencia de FBs en 46 muestras de subproductos de trigo obtenidos de góndolas de supermercados de la ciudad de Río Cuarto. Considerando, que *F. proliferatum* podría ser uno de los principales responsables de la contaminación de granos de trigo con fumonisinas, se realizaron ensayos ecofisiológicos utilizando cepas de esta especie aisladas de granos de trigo en medio de cultivo a base de trigo y en granos de trigo irradiados. Se complementó el ensayo ecofisiológico analizando la expresión relativa de los genes *FUM8* y *FUM19* bajo diferentes condiciones de temperaturas y a_w , en un medio de cultivo a base de trigo. Como resultado se encontró contaminación natural con fumonisinas en el 93% del total de muestras de trigo analizadas, con niveles que variaron desde 0,15 hasta 1304,39 ng/g, siendo FB₁ la micotoxina más abundante, presente en todas las muestras positivas. La mayoría de las muestras de trigo común y duro analizadas se encontraron contaminadas con FB₁ y FB₂, 4 muestras de trigo común y 9 muestras de trigo duro no mostraron niveles detectables de FBs, mientras que el 9%, y el 7,5% de las muestras de trigo común y trigo duro, respectivamente mostraron niveles mayores a 100 ng/g. En 24 de 25 muestras de granos de trigo DON estuvo presente (niveles desde 51 hasta 28650 ng/g), y co-ocurió con FBs en 21 muestras de 25. El 100% de muestras de subproductos se encontraron contaminadas con FB₁ y/o FB₂, con niveles de FBs que variaron desde 0,04 hasta 18,94 ng/g, con una mediana de 1,43 ng/g. Un gran número de muestras analizadas contenían niveles más elevados de FB₂ que de FB₁. Los niveles óptimos de a_w para el crecimiento de cepas de *F. proliferatum* variaron en un rango de 0,995 a 0,96 a una temperatura óptima de 25 - 30 °C, y a niveles de a_w iguales o menores a 0,90 las cepas no crecieron. La producción máxima de FBs se observó en todos los casos a niveles de a_w elevados (0,995; 0,99 y 0,98) y a 25 o 15 °C dependiendo de la cepa y del sustrato. Las cepas bajo estudio mostraron diferentes perfiles de producción de fumonisinas (dos de ellas fueron capaces de producir FB₁ y FB₂, y la tercera FB₁, FB₂ y FB₃), y a su vez los perfiles de producción de cada tipo de fumonisina para cada cepa estuvieron sujetos a las temperaturas de incubación. La expresión relativa de los genes *FUM* a 25 °C mostró correlación con la producción de fumonisinas, a cualquier a_w , mientras que a 15 °C la producción de FBs fue menor que a 25 °C, pero los genes *FUM8* y *FUM19* se expresaron de la misma manera que a 25 °C. Así, este estudio informa la presencia de fumonisinas en trigo pan y en subproductos por primera vez en Argentina, y proporciona información que será útil para considerar posibles factores de riesgo relacionados a la contaminación de trigo con fumonisinas en el campo, durante la cosecha y el almacenamiento.

ABSTRACT

Wheat is the most important cereal consumed by the Argentine population. It can be milled to produce flour and semolina mostly used for bread, pasta or other bakery products elaboration. It is remarkable that wheat flour consumption per capita in Argentina was estimated at 86 kg/habitant/year in 2016. During the last few years, several reports had point out the high frequency of *F. proliferatum*, and fumonisin occurrence wheat grains worldwide. Fumonisin are toxic fungal metabolites that have been epidemiologically associated with esophageal cancer and neural tube defects in some human populations. It is well known that fungal growth and mycotoxin production result from the complex interaction between several factors and, therefore, an understanding of each factor involved is essential to understand the overall process and to predict and prevent mycotoxin development. Temperature and water activity (a_w) are the primary environmental factors that influence growth and mycotoxin production by fungi, including *Fusarium* species. A survey was carried out to determine fumonisin contamination in 135 common and 40 durum wheat samples in the main wheat production area of Argentina using HPLC-MS/MS. Among all the samples, 25 were selected for deoxynivalenol (DON) analysis. Also, FBs occurrence was analyzed in 46 wheat-based products obtained from supermarkets in Río Cuarto city. Considering that *F. proliferatum* could be the responsible for fumonisin presence in wheat and wheat-based products, two ecophysiological surveys were made using strains isolated from wheat, grown in a wheat based-media and in irradiated wheat grains. Moreover, relative *FUM8* and *FUM19* genes expression was analyzed under different a_w and temperature using a wheat-based media. As a result 93% of total wheat grains samples showed fumonisin contamination, with levels ranging from 0.15 to 1304.39 ng/g, being FB₁ the fumonisin most frequently found. Most samples were contaminated with FB₁ and FB₂. Four and 9 common and durum wheat samples, respectively, showed no contamination with fumonisins, while 9% and 7.5% of common and durum wheat samples, respectively, showed levels higher than 100 ng/g. DON contamination was present in 24 out of 25 wheat samples, (levels ranging from 50.60 to 28650 ng/g), and co-occurrence with FBs was found in 21 out of 25 wheat samples. All wheat-based products were contaminated with FBs (levels ranging from 0.04 to 18.94 ng/g, median: 1.43 ng/g). A large number of samples had higher levels of FB₂ than FB₁. Optimal a_w levels for *F. proliferatum* strains growth rate ranged from 0.995 to 0.96 at 25–30 °C, when a_w was lower than 0.90 strains were not able to grown. The maximum amounts of FBs were obtained at higher levels of a_w (0.995; 0.99 and 0.98) and 25 or 15 °C depending on the substrate and the strain. Studied strains showed different fumonisin production profiles: 2 of them were able to produced FB₁ and FB₂, while the third one produced FB₁, FB₂ and FB₃. Fumonisin production profiles for each particular strain were related to incubation temperatures. *FUM* genes expression at 25 °C correlated with fumonisin production, regardless the a_w , while at 15 °C FBs production was lower than at 25 °C, but *FUM* genes were expressed as at 25 °C. This is the first report of natural fumonisin presence in common wheat grains and wheat-based products in Argentina, as well as of DON co-occurrence in both types of wheat and provide very useful guidelines for facilitating effective management of predicting risk for growth and mycotoxin production during ripening, harvesting and storage of wheat.



ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ABREVIATURAS	xvi
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL	
I. 1. El trigo	1
I.1.1. Origen y generalidades	1
I.1.2. Importancia del trigo en Argentina	2
I.2. Género <i>Fusarium</i>	3
I.2.1. Generalidades	3
I.2.2. <i>Fusarium</i> como patógeno de cereales	6
I.2.3. <i>Fusarium proliferatum</i>	7
I.2.4. <i>Fusarium proliferatum</i> en trigo y subproductos	9
I.3. Micotoxinas	10
I.3.1. Generalidades	10
I.4. Fumonisinas	13
I.4.1. Estructura y generalidades	13
I.4.2. Toxicidad	14
I.4.3. Límites permitidos de fumonisinas en alimentos	17
I.4.4. Vía biosintética de las fumonisinas	19
I.4.5. Incidencia natural de fumonisinas en trigo y derivados	22
I.5. Factores que determinan el desarrollo fúngico y la producción de micotoxinas	28
I.6. Prevención y control de la contaminación de cereales con hongos y toxinas	31
CAPÍTULO II. INCIDENCIA NATURAL DE FUMONISINAS EN TRIGO Y SUB-PRODUCTOS	
II. Introducción	34
II. Hipótesis	35
II. Objetivo general	35
II. Objetivos específicos	35
II. Materiales y métodos	35

II.1. Determinación de la incidencia natural de fumonisinas en trigo duro y trigo pan	35
II.1.1. Muestreo	35
II.1.2. Extracción de fumonisinas de trigo	37
II.1.3. Análisis de fumonisinas mediante HPLC-MS/MS	37
II.1.4. Análisis estadístico	38
II.2. Determinación de la incidencia natural de deoxinivalenol en trigo duro y trigo pan	39
II.2.1. Muestreo	39
II.2.2. Extracción de deoxinivalenol	39
II.2.3. Análisis de deoxinivalenol mediante HPLC	39
II.2.4. Análisis estadístico	40
II.3. Determinación de la incidencia natural de fumonisinas en productos derivados de trigo para consumo humano	40
II.3.1. Muestreo	40
II.3.2. Extracción de fumonisinas	40
II.3.3. Análisis de fumonisinas mediante HPLC-MS/MS	40
II.3.4. Análisis estadístico	41
II. Resultados y discusión	41
II. Conclusiones	57

CAPÍTULO III. ECOFISIOLOGÍA DE *Fusarium proliferatum* EN MEDIO DE CULTIVO A BASE DE TRIGO Y EN GRANOS DE TRIGO IRRADIADOS

III. Introducción	58
III. Hipótesis	59
III. Objetivo general	60
III. Objetivos específicos	60
III. Materiales y métodos	60
III.1. Influencia de factores abióticos (actividad acuosa y temperatura) sobre el crecimiento y la producción de fumonisinas por cepas de <i>Fusarium proliferatum</i> , aisladas de granos de trigo, en un medio de cultivo a base de trigo	60
III.1.1. Cepas	60
III.1.2. Medios de cultivo	60
III.1.3. Inoculación e incubación	61

III.1.4. Evaluación del crecimiento	61
III.1.5. Extracción de fumonisinas	62
III.1.6. Detección y cuantificación de fumonisinas por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	62
III.1.7. Análisis estadístico	63
III.2. Influencia de factores abióticos (actividad acuosa y temperatura) sobre el crecimiento y la producción de fumonisinas por cepas de <i>Fusarium proliferatum</i> , aisladas de granos de trigo, en granos de trigo irradiados	64
III.2.1. Cepas	64
III.2.2. Acondicionamiento del sustrato	64
III.2.3. Inoculación e incubación	65
III.2.4. Evaluación del crecimiento	65
III.2.5. Extracción de fumonisinas	65
III.2.6. Detección y cuantificación de fumonisinas por cromatografía líquida de alta eficacia acoplado a un espectrómetro de masas (HPLC-MS/MS)	66
III.2.7. Análisis estadístico	67
III. Resultados	68
III.1. Influencia de factores abióticos (actividad acuosa y temperatura) sobre el crecimiento y la producción de fumonisinas por cepas de <i>Fusarium proliferatum</i> , aisladas de granos de trigo, en un medio de cultivo a base de trigo	68
III.2. Influencia de factores abióticos (actividad acuosa y temperatura) sobre el crecimiento y la producción de fumonisinas por cepas de <i>Fusarium proliferatum</i> , aisladas de granos de trigo, en granos de trigo irradiados	80
III. Discusión	90
III. Conclusiones	95

CAPÍTULO IV. INFLUENCIA DE FACTORES ABIÓTICOS EN LA EXPRESIÓN DE GENES *FUM* POR CEPAS DE *Fusarium proliferatum* EN MEDIO DE CULTIVO A BASE DE TRIGO

IV. Introducción	96
IV. Hipótesis	97
IV. Objetivo general	97
IV. Objetivos específicos	97
IV. Materiales y métodos	97

IV.1. Capacidad toxicogénica y análisis de expresión de genes <i>FUM</i> en medio de cultivo a base de trigo y maíz	97
IV.1.1. Cepas	97
IV.1.2. Medios de cultivo	98
IV.1.3. Preparación del inóculo	98
IV.1.4. Inoculación e incubación	99
IV.1.5. Expresión de genes <i>FUM</i>	99
IV.1.5.1. Extracción de ARN total	99
IV.1.5.2. Tratamiento con ADNasa, determinación de concentración, pureza y calidad del ARN total	99
IV.1.5.3. Síntesis de ADNc	100
IV.1.5.4. Preparación de las soluciones de trabajo de ADNc	101
IV.1.5.5. RT-PCR en tiempo real	101
IV.1.5.6. Análisis cuantitativo de los datos obtenidos por RT-PCR en tiempo real	102
IV.1.6. Fumonisinas	103
IV.1.6.1. Extracción de fumonisinas	103
IV.1.6.2. Análisis de fumonisinas	103
IV.2. Ensayo cinético de expresión de genes <i>FUM</i> y de producción de fumonisinas a distintos tiempos de incubación de cepas de <i>Fusarium proliferatum</i>	104
IV.2.1. Cepas	104
IV.2.2. Medio de cultivo	104
IV.2.3. Inoculación e incubación	105
IV.2.4. Expresión de genes <i>FUM</i>	105
IV.2.4.1. RT-PCR en tiempo real	105
IV.2.4.2. Análisis cuantitativo de los datos obtenidos por RT-PCR en tiempo real	106
IV.2.5. Fumonisinas	107
IV.2.6. Análisis estadístico	107
IV.3. Efecto de la actividad acuosa y la temperatura sobre la producción de fumonisinas, la expresión de los genes <i>FUM8</i> y <i>FUM19</i>, y el crecimiento de 3 cepas de <i>Fusarium proliferatum</i> aisladas de trigo en un medio de cultivo a base de trigo	107
IV.3.1. Cepas	107
IV.3.2. Medio de cultivo	107

IV.3.3. Inoculación e incubación	108
IV.3.4. Evaluación del crecimiento	108
IV.3.5. Expresión de genes <i>FUM</i>	108
IV.3.5.1. RT-PCR en tiempo real	108
IV.3.6. Fumonisinias	110
IV. Resultados y discusión	110
IV. Conclusiones	124
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS	
V. 1. Conclusiones finales	125
V. 2. Perspectivas futuras	125
CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA	127
PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS	144

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Tabla 1.	Incidencia de <i>Fusarium proliferatum</i> en trigo y derivados	9
Tabla 2.	Reglamentaciones vigentes para los niveles máximos de fumonisinas en alimentos a base de maíz destinados al consumo humano	18
Tabla 3.	Incidencia mundial de fumonisinas en trigo y subproductos	24

CAPÍTULO II. INCIDENCIA NATURAL DE FUMONISINAS EN TRIGO Y SUB-PRODUCTOS

Tabla 1.	Parámetros utilizados para analizar fumonisinas mediante HPLC-MS/MS	38
Tabla 2.	Porcentajes de muestras de trigo duro y común contaminadas con FB ₁ ; FB ₁ y FB ₂ ; y FB ₁ , FB ₂ y FB ₃	41
Tabla 3.	Incidencia y concentración de fumonisinas en granos de trigo común y duro de Argentina.	42
Tabla 4.	Co-ocurrencia de fumonisinas y deoxinivalenol en muestras de trigo	45
Tabla 5.	Incidencia natural de fumonisinas en productos derivados de trigo	50
Tabla 6.	Rangos de contenidos de fumonisinas B ₁ , B ₂ , y B ₁ + B ₂ , número de muestras positivas y mediana para muestras de harina 000, harina 0000 y muestras totales	52

CAPÍTULO III. ECOFISIOLOGÍA DE *Fusarium proliferatum* EN MEDIO DE CULTIVO A BASE DE TRIGO Y EN GRANOS DE TRIGO IRRADIADOS

Tabla 1.	Cantidades necesarias de agua para alcanzar los diferentes niveles de a _w en granos de trigo irradiados	64
Tabla 2.	Programa de gradiente para HPLC-MS/MS	67
Tabla 3.	Parámetros utilizados para analizar fumonisinas mediante HPLC-MS/MS	67
Tabla 4.	Relación entre la temperatura y la actividad de agua (a _w) sobre la fase de latencia (hs) de <i>Fusarium proliferatum</i> en un medio de cultivo a base de trigo	69
Tabla 5.	Análisis de la varianza del efecto de la actividad de agua (a _w), temperatura (T), cepas diferentes (C), y sus interacciones sobre la fase de latencia de <i>Fusarium proliferatum</i> en el medio de cultivo a base de	70



trigo

Tabla 6.	Influencia de la actividad acuosa (a_w), temperatura (T), y cepas (C) sobre los parámetros de crecimiento (velocidad de crecimiento y fase de latencia) y la producción de fumonisinas por cepas de <i>Fusarium proliferatum</i> sobre un medio a base de trigo	70
Tabla 7.	Análisis de la varianza del efecto de la actividad de agua (a_w), temperatura (T), cepas diferentes (C), y sus interacciones sobre el crecimiento de <i>Fusarium proliferatum</i> en el medio de cultivo a base de trigo	71
Tabla 8.	Análisis de la varianza del efecto de la actividad de agua (a_w), temperatura (T), días de incubación (d), y sus interacciones sobre la producción de fumonisinas por 3 cepas de <i>Fusarium proliferatum</i> en un medio de cultivo a base de trigo	74
Tabla 9.	Relación entre la temperatura y la actividad de agua (a_w) sobre la fase de latencia (hs) de <i>Fusarium proliferatum</i> en granos de trigo irradiados	81
Tabla 10.	Análisis de la varianza del efecto de la actividad de agua (a_w), temperatura (T), cepas diferentes (c), y sus interacciones sobre la fase de latencia de <i>Fusarium proliferatum</i> en granos de trigo irradiados	81
Tabla 11.	Influencia de la actividad acuosa (a_w) y temperatura (T) sobre los parámetros de crecimiento (velocidad de crecimiento y fase de latencia) y la producción de fumonisinas por cepas de <i>Fusarium proliferatum</i> sobre granos de trigo irradiados	82
Tabla 12.	Análisis de la varianza del efecto de la actividad de agua (a_w), temperatura (T), cepas diferentes (C), y sus interacciones sobre el crecimiento de <i>Fusarium proliferatum</i> en granos de trigo irradiados	83
Tabla 13.	Análisis de la varianza del efecto de la actividad de agua (a_w), de la temperatura (T), y su interacción sobre la producción de fumonisinas por 3 cepas de <i>Fusarium proliferatum</i> en granos de trigo irradiados	86

CAPÍTULO IV. INFLUENCIA DE FACTORES ABIÓTICOS EN LA EXPRESIÓN DE GENES *FUM* POR CEPAS DE *Fusarium proliferatum* EN MEDIO DE CULTIVO A BASE DE TRIGO

Tabla 1.	Secuencias de los cebadores y programas utilizados para la amplificación de los genes <i>FUM1</i> , <i>FUM9</i> y β - <i>tubulina</i>	102
Tabla 2.	Parámetros utilizados para analizar fumonisinas mediante HPLC-MS/MS	104

Tabla 3.	Secuencias de los cebadores y programas utilizados para la amplificación de los genes <i>FUM8</i> , <i>FUM19</i> , β - <i>tubulina</i> (β - <i>tub</i>) e <i>Histona 3</i> (<i>H3</i>)	106
Tabla 4.	Eficiencias de RT-PCR en tiempo real obtenidas para cepas de <i>Fusarium proliferatum</i>	109
Tabla 5.	Producción de fumonisinas y expresión de genes <i>FUM</i> por cepas de <i>Fusarium proliferatum</i> en medio de cultivo a base de trigo y maíz, luego de 3 días de incubación	111
Tabla 6.	Análisis de varianza (ANOVA) del factor días en la producción de fumonisinas (B_1 , B_2 y B_3) y en la expresión relativa de los genes <i>FUM8</i> y <i>FUM19</i> de 3 cepas de <i>Fusarium proliferatum</i> (ITEM 15654, ITEM15661 e ITEM 15664) en un medio de cultivo agar trigo 2%	115
Tabla 7.	Análisis de la varianza del efecto de la temperatura (T) y la actividad de agua (a_w) sobre la producción de fumonisinas (B_1 , B_2 y B_3) y la velocidad de crecimiento de cepas <i>Fusarium proliferatum</i> (ITEM 15654, ITEM 15661 e ITEM 15664) en un medio de cultivo agar trigo 2%	121

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

- Figura 1.** Características microscópicas de *Fusarium proliferatum*. A y B: 7
macroconidios; C y D: microconidios; E y F: microconidios *in situ* en
agar hojas de clavel (Leslie y Summerell, 2006).
- Figura 2.** Características macroscópicas de *Fusarium proliferatum* en agar hojas 8
de clavel y agar papa glucosado.
- Figura 3.** Estructura química de las principales fumonisinas (Scott, 2012). 13
- Figura 4.** Biosíntesis de fumonisinas. A: Estructura genómica del locus *FUM* en 20
el cromosoma 1 de *Fusarium verticillioides*. B: Ruta biosintética de las
fumonisinas. Se indican los pasos en los que participan los productos
de los genes del locus *FUM* (De la Torre-Hernández *et al.*, 2014).

CAPÍTULO II. INCIDENCIA NATURAL DE FUMONISINAS EN TRIGO Y SUB- PRODUCTOS

- Figura 1.** Mapa indicando la localización de las 6 compañías acopiadoras de las 36
cuales se obtuvieron las muestras de trigo común (1 a 6), y la
localización de los 5 campos comerciales de los cuales se obtuvieron
las muestras de trigo duro (7 a 11). 1. Junín; 2. Baigorrita; 3. Alberti; 4.
Bragado; 5. 9 de Julio; 6. Casares; 7. Bordenave; 8. Barrow; 9. La
Dulce; 10. Balcarce; 11. Miramar.

CAPÍTULO III. ECOFISIOLOGÍA DE *Fusarium proliferatum* EN MEDIO DE CULTIVO A BASE DE TRIGO Y EN GRANOS DE TRIGO IRRADIADOS

- Figura 1.** Mapa de contorno de *Fusarium proliferatum* ITEM 15654, en relación 72
a la actividad de agua y a la temperatura. Los números en las líneas
de contorno se refieren a la velocidad de crecimiento (mm/día)
- Figura 2.** Efecto de la actividad acuosa y la temperatura sobre la velocidad 73
crecimiento (valores medios) de tres cepas de *Fusarium proliferatum*,
crecidas en un medio a base de trigo. Las barras de error
representan el desvío estándar para los triplicados
- Figura 3.** Mapas de contorno de *Fusarium proliferatum* ITEM 15654 (A) y 76
15664 (B), en relación a la actividad de agua y a la temperatura. Los

números en las líneas de contorno se refieren a las concentraciones medias de fumonisinas totales ($\mu\text{g/g}$)

- Figura 4.** Valores medios de fumonisinas producidas por *Fusarium proliferatum* ITEM 15664 en un medio de cultivo a base de trigo ajustado a diferentes niveles de actividad acuosa e incubadas a: (A) 15 °C; (B) 25 °C y (C) 30 °C 77
- Figura 5.** Valores medios de fumonisinas producidas por *Fusarium proliferatum* ITEM 15661 en un medio de cultivo a base de trigo ajustado a diferentes niveles de actividad acuosa e incubadas a: (A) 15 °C; (B) 25 °C y (C) 30 °C 78
- Figura 6.** Valores medios de fumonisinas producidas por *Fusarium proliferatum* ITEM 15654 en un medio de cultivo a base de trigo ajustado a diferentes niveles de actividad acuosa e incubadas a: (A) 15 °C; (B) 25 °C y (C) 30 °C 79
- Figura 7.** Mapa de contorno de *Fusarium proliferatum* ITEM 15654, en relación a la actividad de agua y a la temperatura. Los números en las líneas de contorno se refieren a la velocidad de crecimiento (mm/día). 84
- Figura 8.** Efecto de la actividad acuosa y la temperatura sobre la velocidad de crecimiento (valores medios) de tres cepas de *Fusarium proliferatum*, crecidas en granos de trigo irradiados. Las barras de error representan el desvío estándar de cada triplicado 85
- Figura 9.** Mapas de contorno de *Fusarium proliferatum* ITEM 15654 (A), 15664 (B) y 15661 (C) en relación a la actividad de agua y a la temperatura. Los números en las líneas de contorno se refieren a las concentraciones medias de fumonisinas totales (ng/g). 88
- Figura 10.** Niveles medios de fumonisinas producidos por cepas de *Fusarium proliferatum* en granos de trigo irradiados ajustados a diferentes niveles de actividad acuosa e incubadas diferentes temperaturas 15, 25 y 30 °C. A: ITEM 15661; B: ITEM 15664; C: ITEM 15654. 89

CAPÍTULO IV. INFLUENCIA DE FACTORES ABIÓTICOS EN LA EXPRESIÓN DE GENES *FUM* POR CEPAS DE *Fusarium proliferatum* EN MEDIO DE CULTIVO A BASE DE TRIGO

- Figura 1.** Programa de transcripción inversa. A: Incubación de mix dNTP/ARN/Oligo dT. B: Detención del programa, incubación en frío y 100

agregado de RT mix en cada microtubo. C: incubación. D: Modificación de temperatura de incubación. E: Detención del programa, incubación en frío y agregado de RNasa H a cada tubo. F: Incubación. G: Finalización.

- Figura 2.** Concentración media de FB₁, FB₂ y FB₃, y expresión relativa de los genes *FUM8* y *FUM19*, a 3, 5 y 7 días de incubación, por 3 cepas *Fusarium proliferatum*. Los valores de Ct fueron normalizados con los valores de Ct de las corridas de los ADNc del gen *β-tubulina*, y representan el nivel de expresión de los genes *FUM8* y *FUM19* de las cepas de *Fusarium proliferatum* a 5 y 7 días de incubación en comparación con las mismas cepas crecidas a 3 días de incubación. Medias con una letra común no son significativamente diferentes $p > 0,05$. Análisis de varianza con prueba de Tukey para cada uno de los tipos de fumonisinas, y para la expresión relativa de los genes *FUM8* y *FUM19*. 113
- Figura 3.** Efecto de la actividad acuosa (control ~1, 0,97 y 0,95) y temperatura (25 y 15 °C) sobre la velocidad de crecimiento (■) y la producción de fumonisinas (■ FB₁, ■ FB₂ y □ FB₃) por 3 cepas de *Fusarium proliferatum* crecidas en un medio a base de trigo. Las barras de error representan el error estándar entre replicas independientes. Los valores medios de los datos triplicados con letras en común para cada tipo de fumonisinas (letras minúsculas) y para las velocidades de crecimiento (letras minúsculas) no son significativamente diferentes de acuerdo al test de Tukey HSD ($p \geq 0,05$). 116
- Figura 4.** Expresión relativa de los genes *FUM8* y *FUM19* bajo las diferentes condiciones de cultivo (0,97 a_w 25 °C, 0,95 a_w 25 °C, control 15 °C, y 0,97 a_w 15 °C) en relación a la condición de cultivo control a 25 °C, para las cepas de *Fusarium proliferatum* ITEM 15654, ITEM 15661, e ITEM 15664. Los valores fueron calculados utilizando el programa REST (Pfaffl, 2001; Pfaffl *et al.*, 2002). * Significativo ($p < 0,001$). 120

ABREVIATURAS

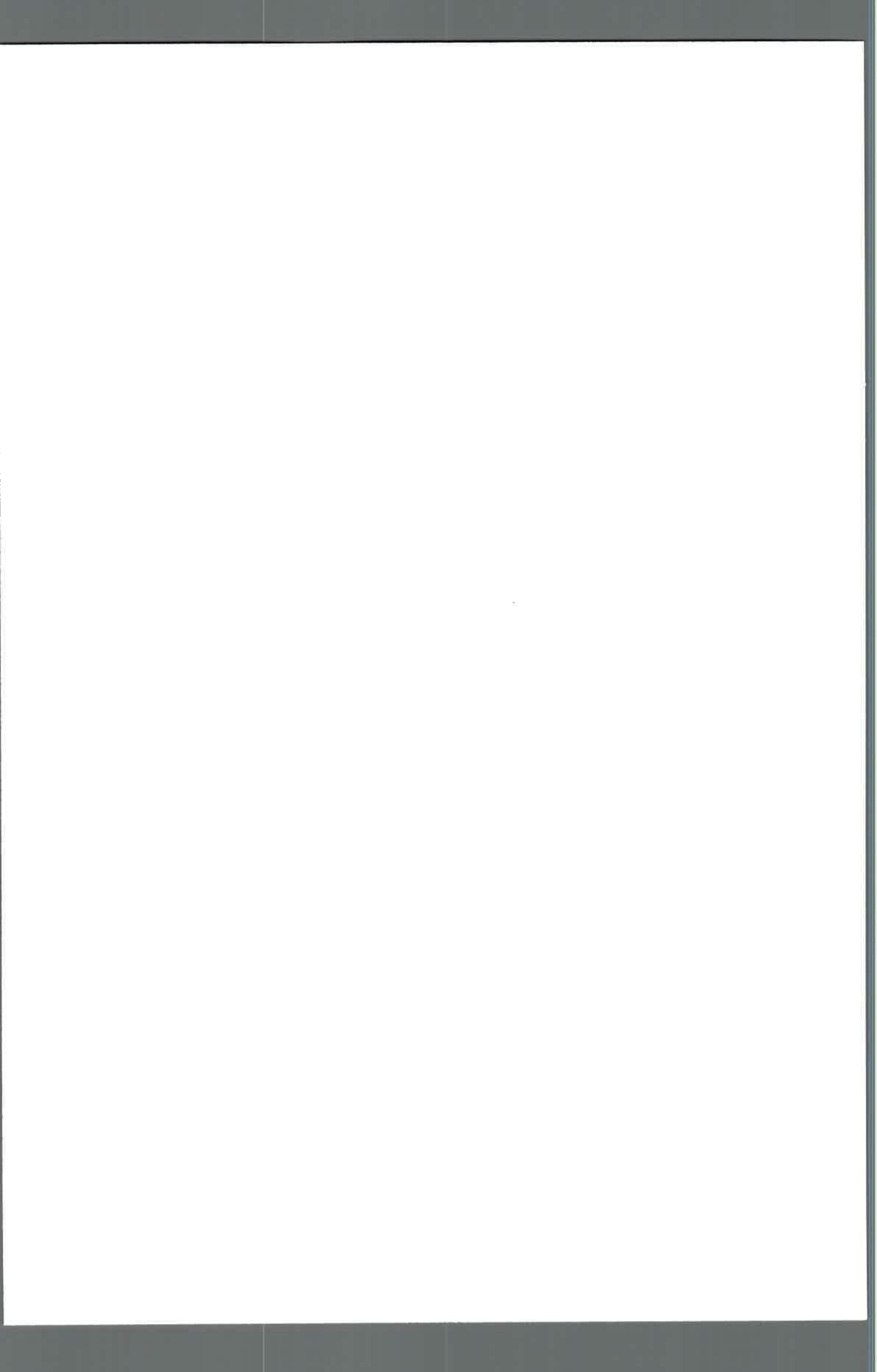
[M + H] ⁺	ion precursor
°C	Grado centígrado
AC	Antes de Cristo
ANOVA	Análisis de la Varianza
ANS	Agar Spezieller Nährstoffarmer
APG	Agar papa glucosado
ARN	Ácido Ribonucléico
ARNm	ARN mensajero
a _w	Actividad de agua
CCCF:	Comité del Codex sobre contaminantes de los alimentos
CCFF:	Complejo de especies <i>Fusarium fujikuroi</i>
cDNA:	ADN complementario del ARN mensajero
CE	Energía de colisión
CM	Cuadrado medio
CO ₂	Dióxido de carbono
CODEX	Codex Alimentarius
CT	Ciclo Umbral de la PCR a Tiempo Real
CV	Voltaje de cono
d.i	Diámetro interno
DDGS	Burlanda seca
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNasa	Deoxirribonucleasa
dNTP	Deoxinucleótido Trifosfato
DON	Deoxinivalenol
EC	Comisión Europea
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetracético
<i>EF-1α</i>	Gen codificador del Factor de Elongación 1α
ELISA	Enzimoimmunoensayo
F	F-Snedecor
FAIM	Federación Argentina de la Industria Molinera
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> . Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FB	Fumonisina
FB ₁	Fumonisina B ₁
FB ₂	Fumonisina B ₂

FB ₃	Fumonisina B ₃
FBs	Fumonisinias
FBt	Fumonisinias totales
FET	Fusariosis de la espiga de trigo
FV	Fuente de variación
g	Gramo
GenBank	<i>International Nucleotide Sequence Database</i>
gl	Grados de libertad
H3	Histona 3
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
HPLC-MS/MS	Cromatografía líquida de Alta Eficacia acoplada a un espectrómetro de masa
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
Kg	Kilogramo
L	Litro
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
MAGYP	Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MSPD	Matriz de dispersión en fase sólida
ND	No hay datos disponibles
Nd	No detectado
ng	Nanogramo
NIV	Nivalenol
nm	Nanómetro
O ₂	Oxígeno
OPA	O-ptaldialdehído
OTA	Ocratoxina A
Pb	Pares de Bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PM	Peso molecular

PMTDI	Máximo provisional tolerable de consumo diario
ppm	Partes por millón
RT	Transcripción inversa
SDS	Dodecilsulfato sódico
<i>sp.</i>	Especie
<i>spp.</i>	Especies
TAE	Tampón Tris-Acetato y EDTA
t_R	Tiempo de retención
UV	Ultravioleta
WHO	<i>World Health Organization</i> . Organización Mundial de la Salud
ZEA	Zearalenona
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
rpm	Revoluciones por minuto



CAPÍTULO I.



CAPÍTULO I. INTRODUCCION GENERAL

I. 1. El trigo

I.1.1. Origen y generalidades

Los cereales, entre los que se incluyen, el trigo, el arroz, el maíz, la cebada, el centeno, la avena y el mijo, conforman la mayor parte de la producción del sector agrícola a nivel mundial, y constituyen la fuente de alimentación más importante para el consumo humano. La utilización total de cereales (para alimentos, piensos y otros usos) en el mundo durante 2016 fue de 2.577 millones de toneladas y la producción alcanzó un récord de 2.606 millones de toneladas. El consumo total de cereales para piensos en la actualidad se proyecta en 756,6 millones de toneladas, mientras que el consumo de cereales para alimentación humana en 2016 se estimó en 1106 millones de toneladas. Esta cifra representa una cantidad suficiente para mantener el promedio de consumo per cápita estable alrededor de los 149 kg/año. La producción total de cereales en Argentina en 2016 se estimó en 63,7 millones de toneladas, lo que refleja un aumento importante en la producción de trigo y maíz (FAO, 2016; FAO, 2017).

El trigo es una gramínea perteneciente a la tribu *Triticeae*, a la subtribu *Triticinae* y al género *Triticum*. La palabra “trigo” proviene del latín *triticum* que significa ‘quebrado’, ‘triturado’ o ‘trillado’, haciendo referencia a la actividad que se debe realizar para separar el grano de trigo de la cáscara que lo recubre (Gómez Pallarés *et al.*, 2007). *Triticum* significa entonces “el grano que es necesario trillar para ser consumido”. La palabra trigo se utiliza tanto para designar a la planta como a sus semillas, al igual que ocurre con el nombre de otros cereales (Trujillo Torres, 2015).

El origen del trigo se ubica al sudoeste de Asia, en la región de la mesopotamia del Tigris y el Éufrates, actual zona de Irak, Irán y Siria; su domesticación data de unos 8000 años AC. Este cereal fue el cultivo que aseguró la fundación de las civilizaciones occidentales, muy dependientes de una dieta a base de cereales. Se convirtió así en la principal fuente de nutrientes de las dietas occidentales. Luego, fue introducido en América desde Europa por los conquistadores españoles, quienes incluían el pan como alimento diario. En Argentina, este cultivo fue introducido en el año 1527, en la provincia de Santa Fe. Trescientos cincuenta años después, con el avance de la agricultura en la Región Pampeana, el trigo pan se pudo difundir masivamente, convirtiéndose en el motor de la expansión agrícola.

Las especies de trigo más importantes en la agricultura son *Triticum aestivum* ssp. *aestivum* (trigo harinero o trigo pan) y *Triticum turgidum* ssp. *durum* (trigo fideo, duro o candeal) (García y Espeleta, 2004). Es una planta que crece en ambientes con

temperaturas que oscilan entre los 3 °C como mínimo y los 30 - 33 °C como máximo, siendo el rango de temperatura óptima entre 10 y 25 °C. Requiere una humedad relativa entre 40 y 70%; y desde el espigamiento hasta la cosecha es la época que tiene mayores requerimientos relacionados a estas condiciones climáticas, ya que exige una humedad relativa entre el 50 y 60% y un clima seco para su maduración. Tiene bajos requerimientos de agua, y los mejores suelos para su crecimiento deben ser sueltos, profundos, fértiles y libres de inundaciones (MAGYP, 2015).

En general, el trigo y los alimentos a base de este cereal, son sustratos excelentes para el crecimiento fúngico. Sin embargo, la presencia de los hongos puede no ser visible y la apariencia del grano y/o subproducto puede no presentar modificaciones aparentes. Así, los hongos son los microorganismos más importantes que infectan a los granos, siendo responsables no solo de la diseminación de enfermedades, sino también de la pudrición de semillas en el suelo, del deterioro durante el almacenamiento y de la producción de micotoxinas (Gutiérrez *et al.*, 2004).

I.1.2. Importancia del trigo en Argentina

En Argentina se utilizan variedades de trigo de hábito primaveral. La siembra se realiza en otoño-invierno y la cosecha a fines de primavera-principio de verano. El ciclo del mismo oscila entre 130 y 210 días, según la variedad y fecha de siembra. En este país, las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, Entre Ríos y La Pampa concentran el 98% de la producción total del país (MAGYP, 2013).

Este cereal es considerado estratégico desde el punto de vista del consumo humano, ya que puede ser molido para la fabricación de productos como harinas y semolina, los cuales conforman los ingredientes básicos para la elaboración del pan, pasta u otros productos de panadería. En Argentina, la harina de trigo se utiliza principalmente para la elaboración del pan tradicional (aproximadamente el 70%), seguido de la harina empaquetada que se destina a fines domésticos (10%), y el resto a la elaboración de pasta, galletitas y bizcochos, pan industrial, entre otros usos (Alimentos Argentinos, 2016).

En Argentina el área de siembra destinada a este cultivo creció durante 2016, y de la misma manera lo hizo su producción: fueron sembradas un total de 6.346.000 de hectáreas y se obtuvo una cosecha récord de 18,3 millones de toneladas (MAGYP, 2017; FAO, 2017). Es interesante destacar que nuestro país produce granos de trigo suficientes como para abastecer el mercado interno e incluso para exportar a otros países, así Argentina se encuentra dentro de los principales países exportadores de este cereal a nivel mundial junto con Australia, Canadá, la Unión Europea, Kazakstán, Rusia, Ucrania y

Estados Unidos (FAO, 2016). En cuanto a la producción mundial de trigo, la FAO estimó que en 2016 fue de 760,1 millones de toneladas (FAO, 2017).

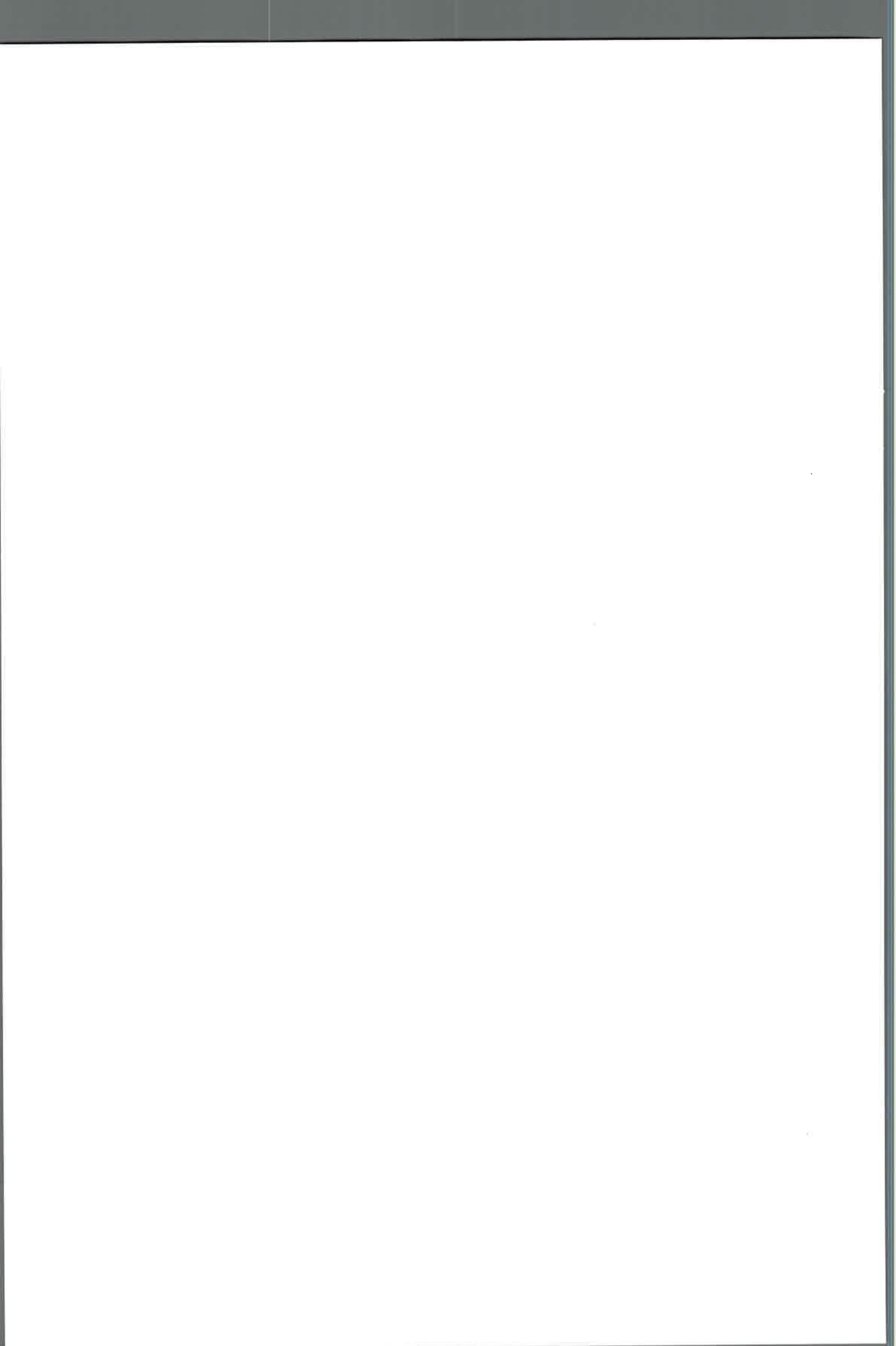
Por otro lado, durante 2016 en Argentina, se molieron 5,8 millones de toneladas de granos de trigo, se produjeron 4,3 millones de toneladas de harina de trigo y el consumo humano se estimó alrededor de 3,7 millones de toneladas (86 kg/habitante/año). Además, se registraron exportaciones de 625.000 toneladas de harina de trigo, siendo Brasil y Bolivia los principales países importadores (FAIM, 2017).

I.2. Género *Fusarium*

I.2.1. Generalidades

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, los cuales se basaban en descripciones realizadas por los aztecas, que habían observado la podredumbre que producía en el maíz el hongo que ahora es reconocido como *Fusarium verticillioides*. Este género se encuentra dentro del Reino Fungi, Phylum Ascomycota, Clase Deuteromycete, Orden Hypocreales, Familia Hypocreaceae (Leslie y Summerell, 2006). Presenta un alto grado de variabilidad en sus características morfológicas y fisiológicas, lo que explica la gran capacidad que poseen sus miembros para colonizar diversos nichos ecológicos (Nelson *et al.*, 1994; Díaz de Castro *et al.*, 2007). Usualmente se encuentran como saprófitos del suelo, aunque también se los ha informado como parásitos facultativos de numerosos hospederos entre los que se incluyen plantas, animales y humanos (Burgess y Bryden, 2012). Asimismo miembros de este género son capaces de infectar especies vegetales y producir enfermedades: podredumbre de raíces o tallos, canchales, marchitamiento, podredumbre de frutos o semillas y enfermedades en las hojas (Leslie y Summerell, 2006). El género *Fusarium* posee una distribución mundial, y es responsable de grandes pérdidas económicas no solo debido a la reducción en los rendimientos de las cosechas, sino también debido a una reducción en la calidad de los alimentos (Leslie y Summerell, 2006; 2013).

En humanos, las especies de este género pueden causar infecciones localizadas en las uñas (Arrese *et al.*, 1996), en huesos y articulaciones, (Koehler *et al.*, 2014), en heridas de quemaduras (Latenser, 2003), en piel (Nucci y Anaissie, 2002; Gurusidappa y Mamatha, 2011). Además, son la causa más frecuente de infecciones micóticas oculares conocidas como "queratitis fúngica" (Jurkunas *et al.*, 2009), que lleva a una destrucción corneal progresiva y a endoftalmítis, con pérdida de la visión o incluso pérdida del ojo afectado (Dursun *et al.*, 2003; Edelstein *et al.*, 2012). Por otro lado, en personas



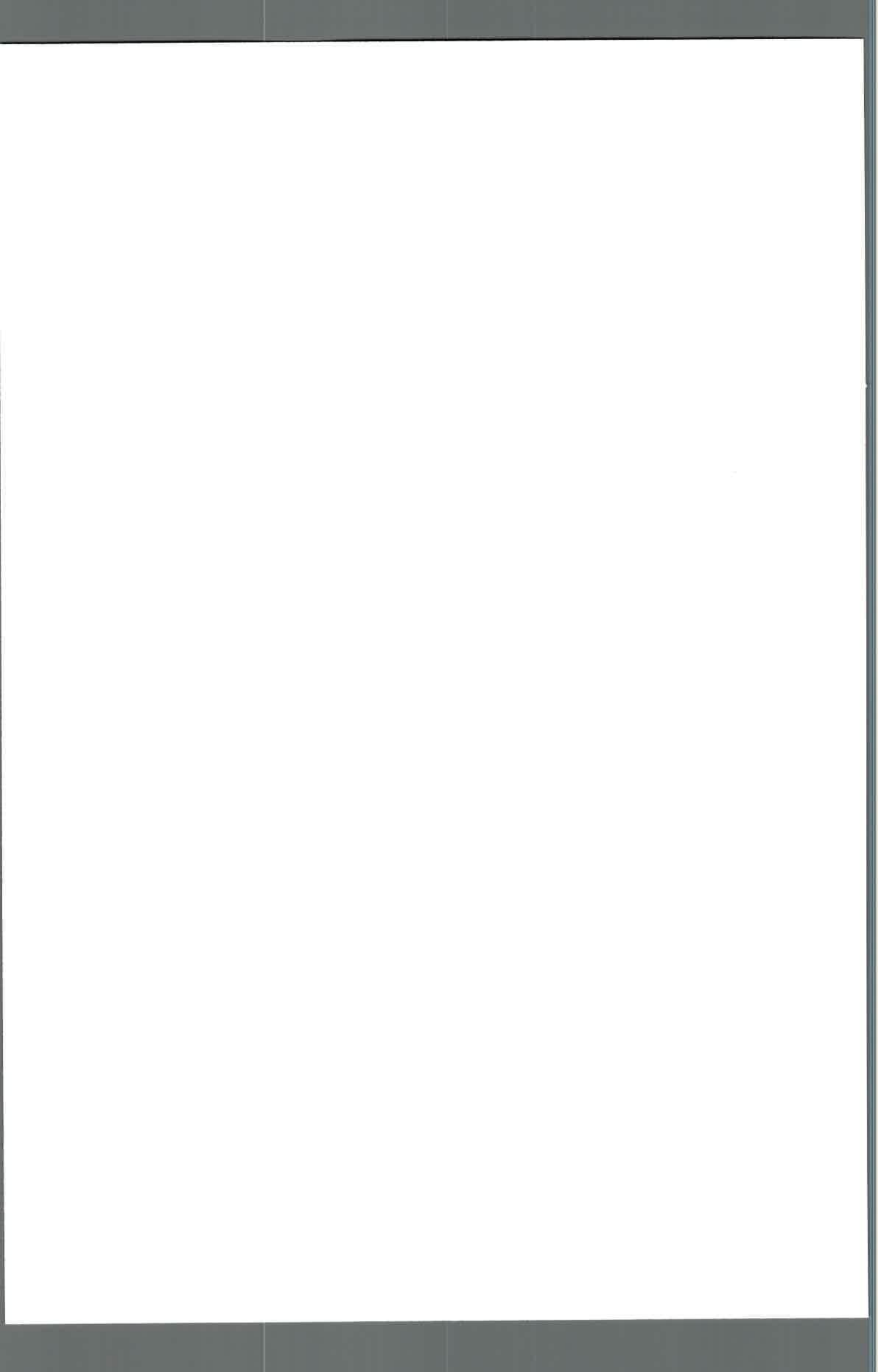
inmunodeprimidas algunas especies de este género están cobrando importancia como patógenos oportunistas emergentes, capaces de causar una diseminación fatal conocida como fusariosis, con una tasa de mortalidad del 50-75% (Boutati y Anaissie, 1997; Girmenia *et al.*, 2000; Musa *et al.*, 2000; Dignani y Anaissie, 2004; Jensen *et al.*, 2004; Nucci y Anaissie, 2007).

En cuanto a sus características morfológicas, las especies de *Fusarium* producen esporas asexuales multicelulares, denominadas macroconidios, que se caracterizan por ser curvados, multiseptados, con una célula apical más o menos puntiaguda y en muchas especies con una célula basal en forma de pie. También producen microconidios, que son comúnmente unicelulares, con formas que van desde elipsoidales hasta fusiformes, y además, algunas especies producen clamidosporas (tipo de espora de paredes gruesas y resistentes). Los macro y microconidios aseguran la dispersión del hongo, mientras que las clamidosporas son importantes para la supervivencia del hongo a largo plazo y en condiciones adversas (Leslie y Summerell, 2006). Algunas especies del género sólo presentan una fase asexual (anamorfo o forma imperfecta), mientras que otras especies pueden presentar además un estado teleomórfico (forma sexual o perfecta). Los encargados de regular la reproducción sexual son los productos de los genes que determinan el tipo de apareamiento ("*mating type*", MT), que consisten en un locus con dos alelos funcionales, a menudo designados como *MAT-1* y *MAT-2* (Yoder *et al.*, 1986; Glass *et al.*, 1990; Kerenyi *et al.*, 2004; Hornok *et al.*, 2007; Keszthelyi *et al.*, 2007).

Desde su primera descripción se han realizado numerosas clasificaciones dentro de este género, por lo que su taxonomía ha estado y está en continua revisión. En la clasificación basada en las características morfológicas se ha tenido en cuenta la forma y pigmentación de la colonia, y la ausencia, presencia y forma de los tres tipos de esporas asexuales, además de características fisiológicas. Sin embargo, la clasificación dentro de este género en base a la morfología, presenta la dificultad de que el número de caracteres morfológicos necesarios para la identificación de una especie es menor al número de especies existentes, y su expresión está fuertemente influenciada por el medio ambiente (Leslie y Summerell, 2006). Otro concepto utilizado para la clasificación en la taxonomía de *Fusarium* es el de "especie biológica", que establece que los individuos pueden reproducirse sexualmente. Así, por ejemplo, *Fusarium fujikuroi* es un complejo de al menos 13 especies biológicas ("*mating populations*") aisladas reproductivamente (Leslie, 1995; Klaasen y Nelson, 1996; Britz *et al.*, 1999; Zeller *et al.*, 2003; Aoki *et al.*, 2014), que se reconocen como especies diferentes (Desjardins, 2003). Sin embargo, la dificultad en la aplicación de este concepto, radica en que muchas especies no poseen teleomorfos conocidos y que la interfertilidad en condiciones de

laboratorio ha sido observada para algunas especies (Leslie y Summerell, 2006). Actualmente se ha incorporado el concepto de “especie filogenética”, según el cual, los límites de una especie estarían determinados por la congruencia entre las filogenias derivadas de diferentes genes en un grupo de organismos (Taylor *et al.*, 2000). A pesar de que no existe ningún manual disponible para abordar el tema de una manera clara y rápida, en la actualidad, se han descrito alrededor de 300 especies morfológicas y/o filogenéticamente diferentes (Aoki *et al.*, 2014). La identificación precisa de cada una de las especies de *Fusarium* se basa en ensayos específicos sobre una región determinada del ADN, para esto se consideran secuencias codificadoras de copia única ricas en intrones, tales como los genes codificadores de la calmodulina, la β -tubulina, la histona H3 o el factor de elongación 1α (*EF-1 α*). En este sentido, este último gen tiene una gran utilidad a nivel filogenético, ya que permite la discriminación a nivel de especie dentro del género. 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* (Seifert y Lévesque, 2004). A partir de esto último se creó FUSARIUM-ID v. 1.0, una base de datos de secuencias parciales de *EF-1 α* (Geiser *et al.*, 2004).

Las especies de *Fusarium*, al igual que otros hongos, pueden producir distintos metabolitos secundarios, algunos son utilizados como promotores de crecimiento de plantas o como precursores para la síntesis química de tales compuestos, mientras que otros, como las micotoxinas, resultan perjudiciales tanto para la salud como para la economía (Desjardins, 2006). Las especies toxicogénicas de *Fusarium* presentan perfiles de toxinas propios, por lo que la identificación precisa de estas especies permite predecir potencialmente las toxinas presentes en los sustratos que contaminan. Sin embargo, especies o cepas muy relacionadas pueden tener perfiles de producción diferentes, incluso dentro de la misma especie en idénticas condiciones de cultivo, la producción de toxinas puede ser variable (Torres *et al.*, 2010). En el caso de *Fusarium*, esencialmente patógeno de campo, las micotoxinas son sintetizadas principalmente durante la infección de la planta, y en el caso de los cereales, se pueden acumular en el grano. Las principales micotoxinas producidas por especies de este género son: fumonisinas (FBs), zearalenona, moniliformina, fusarina, ácido fusárico, tricotecenos, entre los que se incluyen diacetoxiscirpenol, toxina T-2, toxina HT-2, deoxinivalenol (DON) y nivalenol (Glenn, 2007; Nayara *et al.*, 2011), y las micotoxinas emergentes: fusaproliferina, beauvericina y eniantina (Jestoi, 2008).



1.2.2. *Fusarium* como patógeno de cereales

De manera general el ciclo infectivo de miembros del género *Fusarium* en cereales parte de un inóculo primario que se encuentra en materiales vegetales infectados, los cuales proceden de los residuos de la cosecha previa, que pueden encontrarse sobre o dentro del suelo en el mismo campo o en campos cercanos (Xu, 2003). En estos residuos, *Fusarium* puede vivir de forma saprófita o bien encontrarse en forma de peritecios, clamidosporas, macro y microconidios, según la especie (Goswami y Kistler, 2004). Asimismo, las condiciones meteorológicas tales como viento y lluvia, y algunos insectos favorecen la dispersión de las esporas a larga distancia afectando a cultivos cercanos (viento e insectos) o a corta distancia (agua), por ejemplo en un mismo cultivo (Munkvold, 2003; Xu, 2003). El inóculo puede encontrarse también en semillas infectadas, y en ese caso tras la germinación puede producirse la colonización de la plántula por *Fusarium* (Bacon *et al.*, 2001). Esta colonización por el micelio del hongo se produce tanto intra como intercelularmente, y se ve favorecida por la degradación de compuestos como xilano, pectina y celulosa mediadas por los equipos enzimáticos del hongo (Kang y Buchenauer, 2002).

La severidad de las enfermedades causadas por especies de *Fusarium* y la incidencia de las mismas puede variar de un año a otro en la misma región, o entre regiones diferentes en un mismo año, dependiendo de las condiciones climáticas (temperatura, precipitaciones, humedad, entre otras), las prácticas agrícolas (rotación de cultivos, el uso de fertilizantes, etc), el genotipo del hospedador e incluso el daño que pueden causar los insectos sobre el material vegetal (Ma *et al.*, 2013).

Una de las principales enfermedades causada por especies de *Fusarium* que afecta tanto al trigo pan como al trigo duro es la Fusariosis de la Espiga de Trigo (FET), donde su desarrollo en el cultivo es dependiente de las condiciones climáticas existentes al momento de la antesis: principalmente alta humedad relativa y temperaturas que oscilan los 25 °C. En Argentina, el principal patógeno asociado a esta enfermedad es *F. graminearum* sensu estricto (Lori *et al.*, 2003; Ramirez *et al.*, 2006a, 2007). Esta enfermedad se monitorea y es de importancia ya que causa disminución del rendimiento en la cosecha y de la calidad de los granos, y al mismo tiempo la presencia del hongo, puede generar la aparición de micotoxinas tales como el DON y otros tricotecenos, perjudiciales para la salud tanto del hombre como de los animales. Sin embargo, estudios realizados sobre la microbiota presente en granos de trigo durante años en los que *F. graminearum* no fue la especie aislada predominantemente, indicaron que la especie de *Fusarium* más frecuentemente aislada fue *F. proliferatum* (Ramirez *et al.*, 2006b; Palacios

et al., 2011), y de hecho en las muestras de granos de trigo duro analizadas se encontraron fumonisinas, micotoxinas producidas por esta y otras especies fúngicas.

1.2.3. *Fusarium proliferatum*

Fusarium proliferatum pertenece al complejo de especies *Fusarium fujikuroi* (CEFF), un grupo formado por aproximadamente 40 especies estrechamente relacionadas, definidas por características morfológicas, compatibilidad sexual, y análisis de secuencias de ADN (Leslie y Summerell, 2006). Este hongo se caracteriza por formar microconidios en cadenas y en falsas cabezas a partir de monofiálides y polifiálides (Figura 1), estas cadenas de microconidios son de longitud moderada y por lo general más cortas que las de *F. verticillioides*. Otra característica distintiva que presenta esta especie es la ausencia de clamidosporas, cuando desarrolla en agar papa glucosado (APG) forma micelio blanco que con el tiempo se torna violáceo (Figura 2) (Leslie y Summerell, 2006). Es un hongo heterotálico y por lo tanto necesita de cruzamientos entre cepas compatibles para reproducirse sexualmente.

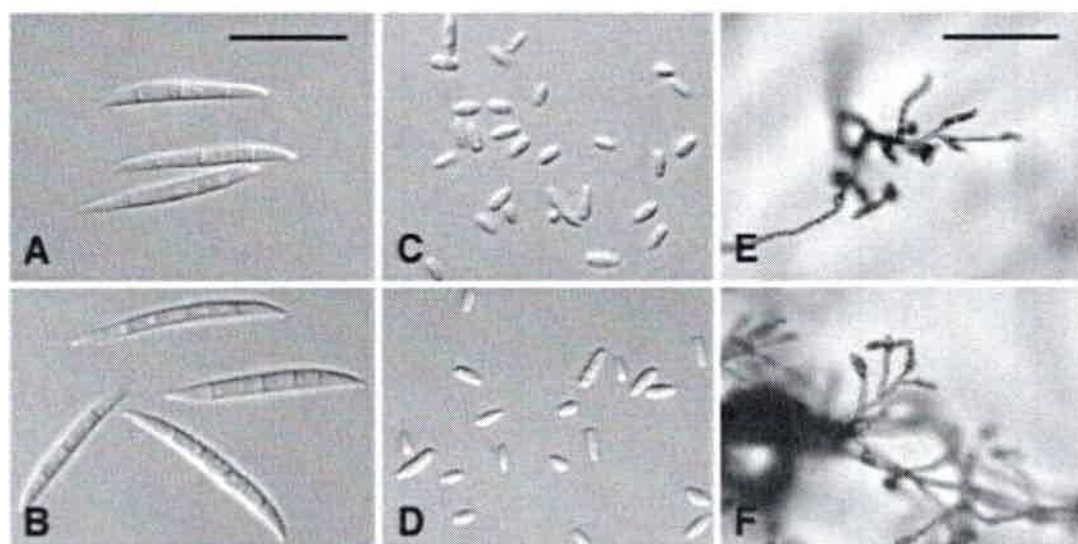


Figura 1. Características microscópicas de *Fusarium proliferatum*. A y B: macroconidios; C y D: microconidios; E y F: microconidios *in situ* en agar hojas de clavel (Leslie y Summerell, 2006).

En cuanto a su capacidad infecciosa, este hongo se caracteriza por tener un amplio rango de hospederos: banana (Jiménez *et al.*, 1993), pino (Ocamb *et al.*, 2002), palmera (Abdalla *et al.*, 2000; Armengol *et al.*, 2005), frutas cítricas (Hyun *et al.*, 2000), espárrago (Elmer, 1995), cebolla, ajo (Stankovic *et al.*, 2007) como así también en

cereales tales como arroz (Desjardins *et al.*, 2000), sorgo (Leslie *et al.*, 1990), y trigo, en donde se lo ha asociado a la enfermedad de punta negra en Estados Unidos (Desjardins y Proctor, 2007). Cabe aclarar que en muchos de estos hospederos, este hongo, puede encontrarse sin causar síntomas (Proctor *et al.*, 2010). Sin embargo, el principal interés respecto de *F. proliferatum* está en su capacidad de ser patógeno de maíz (cereal de distribución mundial), en donde junto con *F. verticillioides* está implicado en la podredumbre de la mazorca (Logrieco *et al.*, 2002; Ghiasian *et al.*, 2006) con la consecuente contaminación de los granos con micotoxinas, debido a que ambas especies tienen la capacidad de producir diferentes tipos de toxinas que se acumulan en los granos de este cereal (Desjardins, 2006).

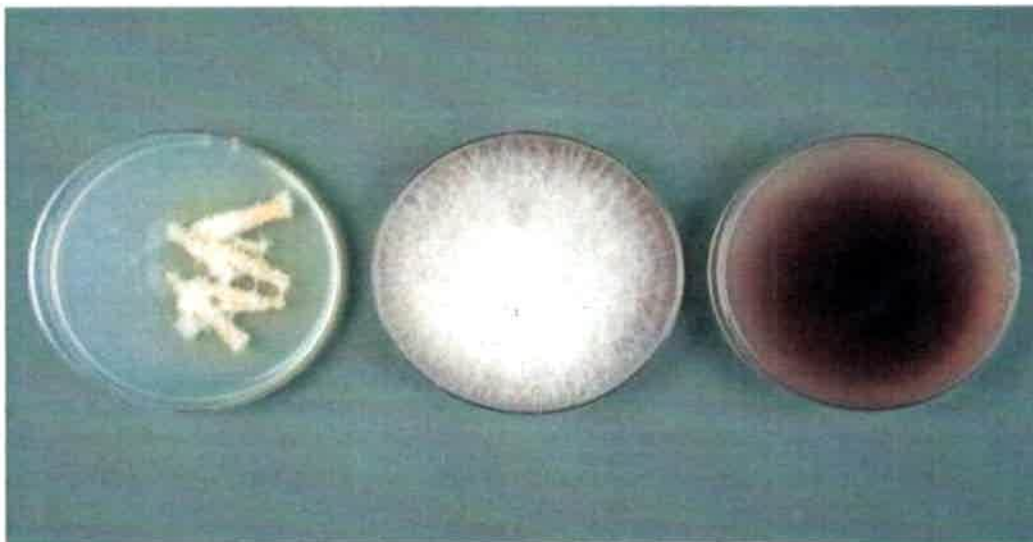


Figura 2. Características macroscópicas de *Fusarium proliferatum* en agar hojas de clavel y agar papa glucosado.

En general *F. proliferatum* es aislado en menor frecuencia que *F. verticillioides* cuando co-ocurren en maíz (Proctor *et al.*, 2010), sin embargo en algunas áreas productoras de este cereal, dependiendo de las condiciones medioambientales y geográficas existen casos en los que *F. proliferatum* ha sido informado como el principal contaminante (Logrieco *et al.*, 1995; Chulze *et al.*, 1996).

Entre las micotoxinas producidas por *F. proliferatum* se encuentran: FBs, moniliformina, beauvericina, ácido fusárico, eniantina, fusarina y fusaproliferina, aunque existen diferencias entre cepas dentro de la especie con respecto a la capacidad de producción de cada una individualmente. Incluso cepas aisladas del mismo huésped difieren en su perfil micotoxicogénico (Desjardins, 2006). Entre estas micotoxinas las

fumonisininas son las más importantes desde el punto de vista de la toxicidad, y por lo tanto las más extensamente estudiadas.

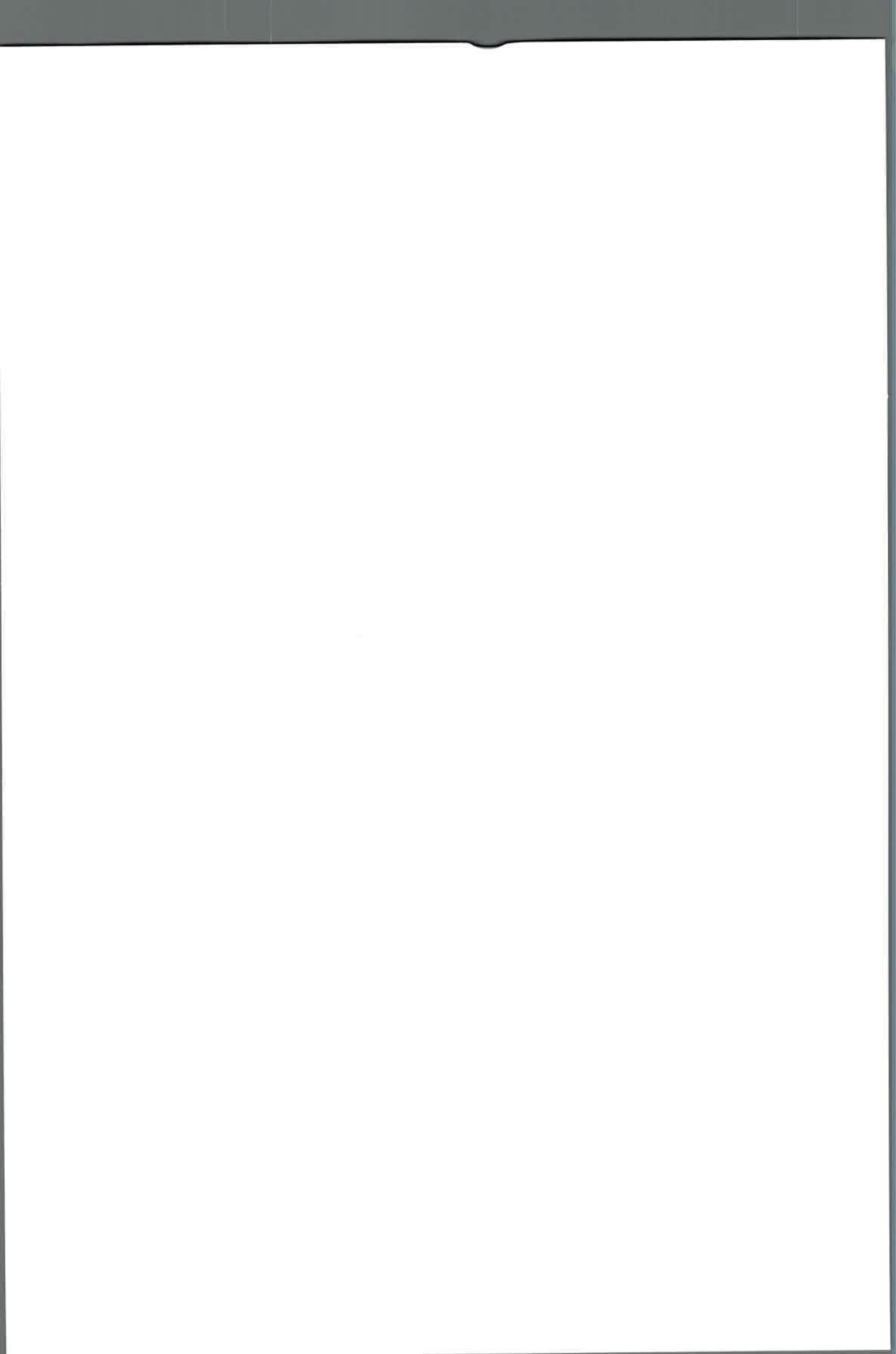
1.2.4. *Fusarium proliferatum* en trigo y subproductos

Estudios realizados sobre la contaminación del trigo y subproductos con *F. proliferatum* han demostrado su presencia, en algunos casos asociada a la contaminación de estos granos con fumonisininas (Chehri *et al.*, 2010; Palacios *et al.*, 2011), y en otros casos no (Conner *et al.*, 1996; Moretti *et al.*, 1999; Ramirez *et al.*, 2006b; Stankovic *et al.*, 2007; Tančinová *et al.*, 2009). En la tabla 1 se resumen algunos trabajos en los cuales se demuestra la presencia de este hongo como uno de los principales contaminantes del trigo y subproductos.

Tabla 1. Incidencia de *Fusarium proliferatum* en trigo y derivados

País	Año	Muestra	Especies de <i>Fusarium</i> predominantes¹	Referencia
Argentina	2007-2008	Trigo duro	<i>F. proliferatum</i>	Palacios <i>et al.</i> , 2011
Eslovaquia	2004	Salvado de trigo	<i>F. proliferatum</i> , <i>F. subglutinans</i>	Tančinová y Labuda, 2009
Estados Unidos	1996	Granos de trigo con puntas negras	<i>F. proliferatum</i>	Conner, <i>et al.</i> , 1996
Irán	ND	Trigo	<i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. proliferatum</i> y <i>F. verticillioides</i> ,	Chehri <i>et al.</i> , 2010
Irán	ND	Trigo	<i>F. proliferatum</i>	Mohammadi <i>et al.</i> , 2016
Italia	2008-2010	Trigo duro	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. tricinctum</i> y <i>F. proliferatum</i> .	Amato <i>et al.</i> , 2015
Serbia	2005	Trigo	<i>F. graminearum</i> , <i>F. poae</i>	Stankovic <i>et al.</i> , 2007
Serbia	2006	Trigo	<i>F. graminearum</i> , <i>F. proliferatum</i>	Stankovic <i>et al.</i> , 2007

ND, No hay datos disponibles; ¹ Especies en orden de incidencia decreciente.

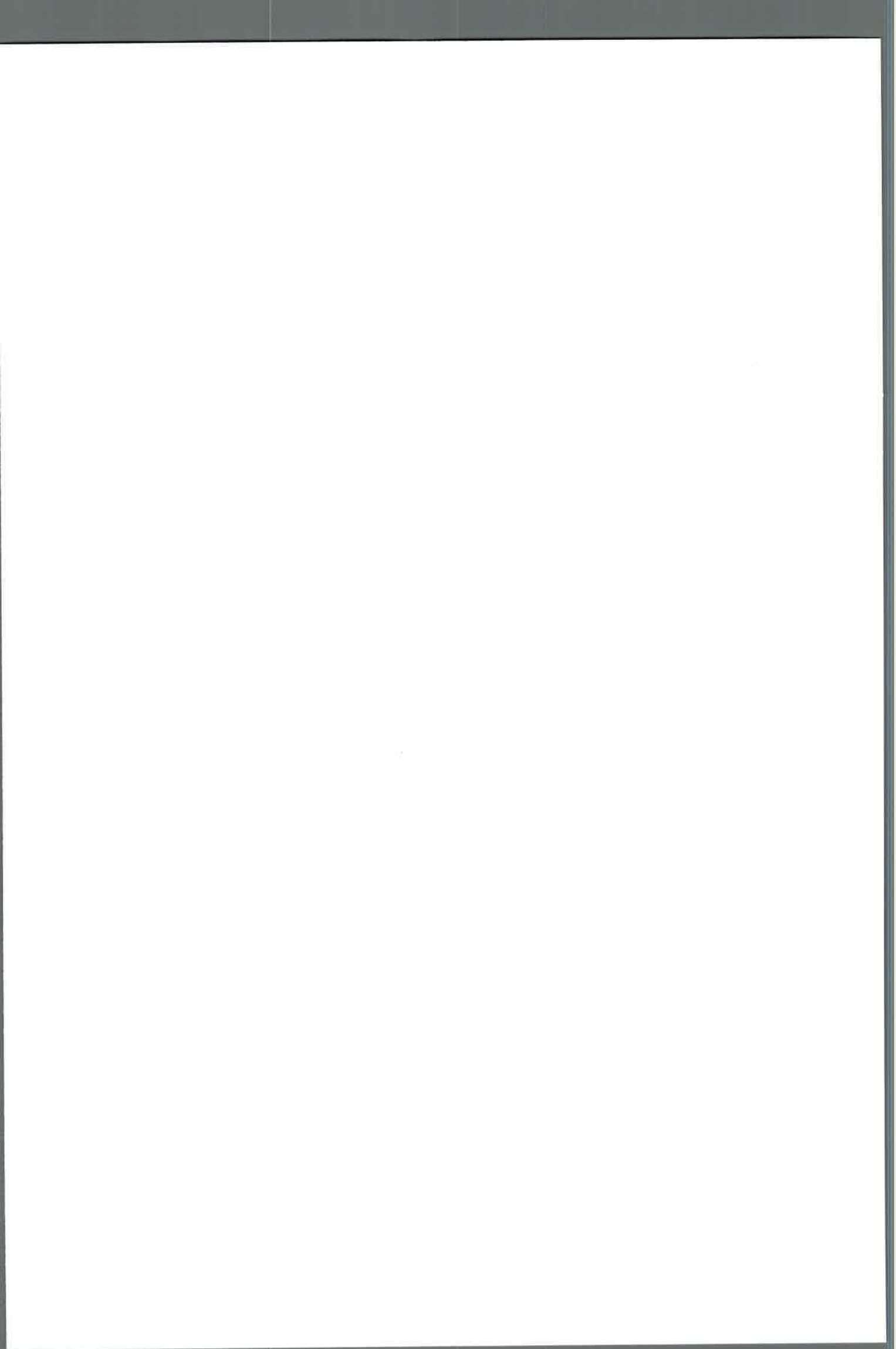


De manera similar a lo que ocurre en el maíz, el origen de las fumonisinas en el trigo se atribuiría a *F. proliferatum* y *F. verticillioides* (principales hongos productores de esta micotoxina). Según Infantino *et al.* (2012) en Italia *F. verticillioides* sería la principal fuente de fumonisinas en trigo. Sin embargo, como se muestra en la tabla 1, muchos trabajos que han estudiado la incidencia de las especies de *Fusarium* en granos de trigo en diferentes países del mundo han encontrado que *F. proliferatum* es una de las especies de *Fusarium* aisladas con mayor frecuencia (Palacios *et al.*, 2011; Amato *et al.*, 2015; Mohammadi *et al.*, 2016). Incluso Amato *et al.* (2015), propusieron que sería ésta especie y no *F. verticillioides* la fuente más importante de fumonisinas en el trigo. En línea con este supuesto, Gamanya y Sibanda (2001) observaron en un estudio realizado en Zimbabwe una menor incidencia de *F. verticillioides* en trigo que en maíz. En cuanto a la capacidad de producción de fumonisinas de cepas de *F. proliferatum*, diversos estudios han demostrado que en comparación con *F. verticillioides*, si bien la mayoría de las cepas son capaces de producir estas toxinas, en general los niveles suelen ser menores (Sanchis *et al.*, 1995; Tančinová y Labuda, 2009; Palacios *et al.*, 2015; Mohammadi *et al.*, 2016). Con respecto a este último punto, Jurado *et al.* (2010) concluyen en su trabajo que la habilidad de producir fumonisinas puede ser considerada una característica ampliamente distribuida en *F. proliferatum*, de manera similar a *F. verticillioides*, y que podría jugar un rol ecológico durante la colonización debido a la alta proporción de cepas de esta especie productoras de fumonisinas. De esta manera, la presencia de *F. proliferatum* en ciertos granos podría significar contaminación con fumonisinas de manera similar a lo que ocurre con *F. verticillioides*, lo que podría ser relevante en cereales no considerados hasta ahora, como un riesgo de ser susceptibles a la contaminación con estas toxinas, como es el caso del trigo o la cebada, entre otros. De hecho, ha sido observado recientemente que cepas de *F. proliferatum* aisladas de diferentes hospederos son capaces de infectar el trigo a través de las semillas, causando acumulación de fumonisinas y beauvericina en los granos (Guo *et al.*, 2015).

I.3. Micotoxinas

I.3.1. Generalidades

Las micotoxinas se definen como metabolitos secundarios producidos por hongos, tóxicos para humanos y animales. Son compuestos orgánicos biológicamente activos que pueden causar problemas de intoxicaciones agudas, subagudas o crónicas con efectos carcinogénicos, teratogénicos, mutagénicos, neurotóxicos e inmunosupresores (Peraica *et al.*, 1999; Richard, 2007). Los hongos capaces de sintetizar estos compuestos se



denominan toxicogénicos y generalmente crecen en plantas comestibles, ingresando a la cadena alimentaria, contaminando así los alimentos (Berthiller *et al.*, 2013).

En general las micotoxinas son moléculas pequeñas ($PM < 700$ g/mol) y suelen ser específicas para un grupo de especies de un mismo género, aunque el mismo compuesto también puede ser sintetizado por hongos pertenecientes a géneros distintos: cuanto más compleja es la vía de biosíntesis de la micotoxina, un número menor de especies fúngicas serán capaces de sintetizarla (Abarca *et al.*, 2000). Además, la producción de las mismas, es el resultado de la interacción entre el hospedero, el ambiente y la especie toxicogénica; así la interacción entre estas partes puede resultar en mayor o menor producción de toxinas (Magan y Aldred, 2007). En la naturaleza es muy grande la variabilidad en el metabolismo secundario, esta variación puede ser intergénica, intraespecífica y aún entre cepas de la misma especie (Keller *et al.*, 2005)

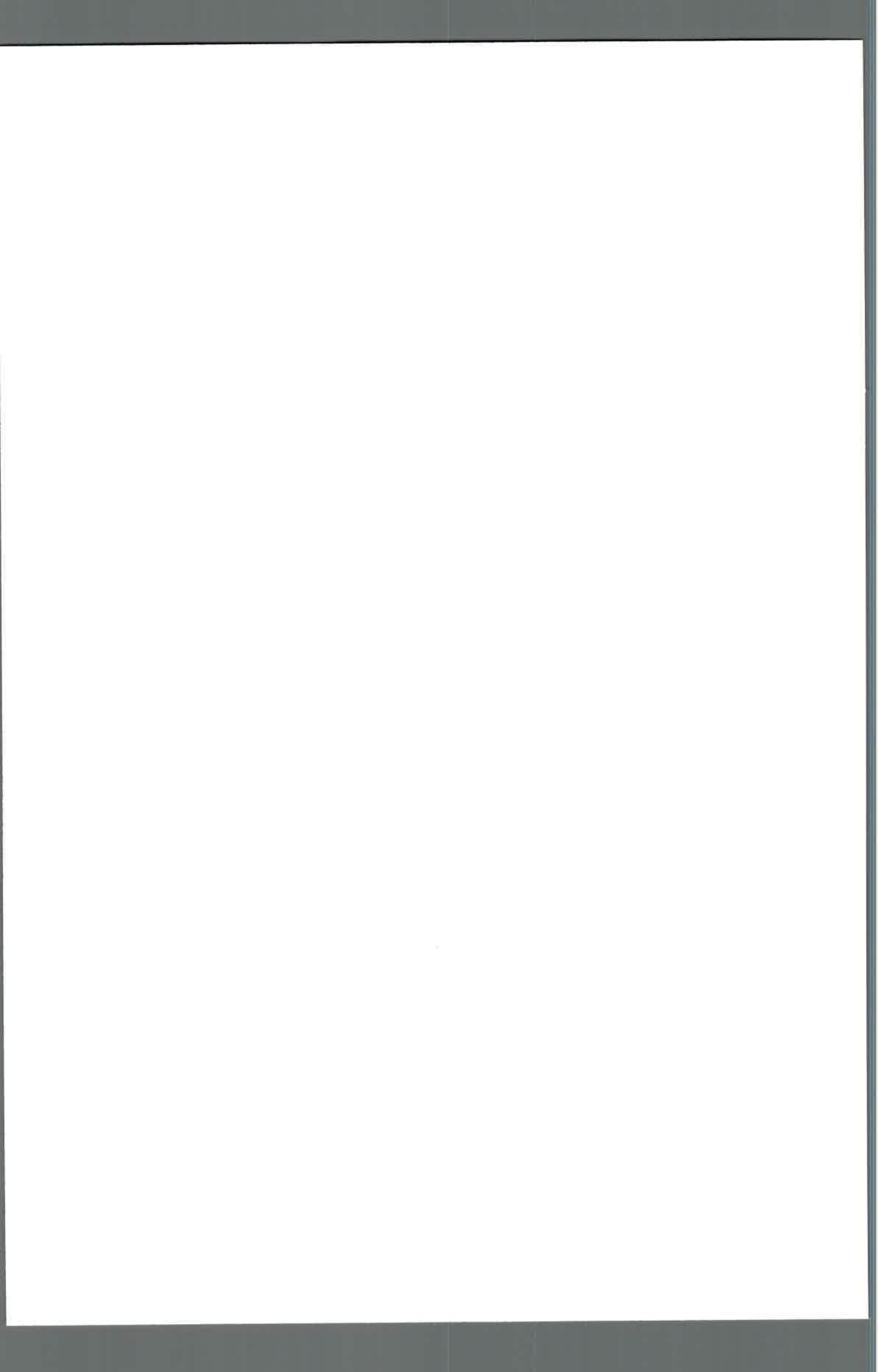
Se han identificado aproximadamente 400 micotoxinas diferentes, pero sólo alrededor de 20 son consideradas como contaminantes naturales relevantes en los productos agrícolas. Estos metabolitos han sido detectados en una amplia variedad de productos de origen vegetal (almidón, arroz, trigo, centeno, cebada, maíz, sorgo, frutas secas, etc.), en alimentos y bebidas (jugos y concentrados de frutas, cervezas y vinos), y en productos de origen animal (derivados lácteos, cárnicos y huevos, etc.) (FAO, 2004). Así, la exposición de los humanos a las micotoxinas puede darse tanto por el consumo de alimentos derivados de plantas contaminadas con toxinas, como por la transferencia de toxinas a los productos animales como leche, carne, huevos, ó simplemente por la exposición al aire o polvo con toxinas. Además, muchos alimentos son susceptibles a la contaminación con micotoxinas en las distintas etapas de la cadena alimenticia (Bryden, 2007).

Cuando las toxinas fúngicas son ingeridas o inhaladas en determinadas concentraciones (tanto por los animales como por el hombre) producen un cuadro clínico-patológico conocido como micotoxicosis, que puede a su vez ser clasificado como primario o secundario; agudo o crónico; teniendo en cuenta el origen de la intoxicación y la concentración de la micotoxina ingerida en el tiempo, respectivamente. Esto resulta en efectos perjudiciales para la salud, debido a que disminuyen la disponibilidad de alimentos proteicos, afectan la inmunidad humoral y celular causando una mayor predisposición a las infecciones microbianas. Las alteraciones asociadas con micotoxicosis son: reacciones alérgicas, inmunosupresión, cuadros nerviosos y hemorrágicos, disminución de la eficiencia productiva y reproductiva, deficiencias metabólicas y bioquímicas, enfermedades autoinmunes, alteraciones genéticas, teratogénesis, carcinogénesis y hasta la muerte (CAST, 2003).

En la actualidad, raramente se registran casos de micotoxicosis agudas en humanos por el consumo de alimentos contaminados con niveles elevados de micotoxinas, excepto en algunos países subdesarrollados o en vías de desarrollo (Wagacha y Muthomi, 2008). El Comité Mixto FAO/WHO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/Organización Mundial de la Salud) de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) ha evaluado los efectos tóxicos de diversas micotoxinas, considerando que el riesgo de intoxicación aguda es entre moderado y bajo en comparación con otras familias de compuestos de origen microbiológico. Sin embargo, según el organismo de Naciones Unidas, el riesgo se incrementa cuando se habla de efectos crónicos (WHO, 2002). En los países en desarrollo, la situación es diferente, allí los alimentos básicos (como los cereales) son susceptibles de contaminación, y tanto la población humana, como la ganadería se ven afectadas de forma significativa por el índice de morbilidad dentro de las que se incluyen las muertes prematuras (Wagacha y Muthomi, 2008). Así, las micotoxinas vuelven los alimentos menos seguros.

Las principales micotoxinas han sido reconocidas como productos metabólicos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria* (Sidhu, 2002). Entre los sustratos más apropiados para la biosíntesis de micotoxinas se ubican productos de origen vegetal (cereales y oleaginosas), ricos en proteínas y calorías. De esta manera, los productos agrícolas son siempre susceptibles a la contaminación por hongos siendo excelentes sustratos para la producción de micotoxinas durante las diferentes fases de cultivo, cosecha, secado, transporte, procesamiento y almacenamiento. Año tras año hay fluctuaciones en los niveles de micotoxinas en los alimentos, dependiendo de factores que favorezcan o no la invasión y el crecimiento de ciertos hongos. Estas son de distribución mundial y por eso es importante relevar su presencia. En general la producción de toxinas en los granos está influenciada por factores que causen estrés a la planta: daño por insectos, contenido de humedad, temperatura y deficiencia de nutrientes (Lee y Hogler, 1991, Humphreys *et al.*, 2001; Miller, 2001; Abbas *et al.*, 2002).

La presencia de micotoxinas en los productos vegetales causa una disminución en el rendimiento y en la calidad de los granos, y reducción en la producción animal (baja convertibilidad alimentaria) ocasionando pérdidas económicas. A dicho efecto se debe agregar el costo que representa el diseño de programas de monitoreo y la necesidad de establecer regulaciones que determinen los niveles máximos permitidos a fin de minimizar riesgos para la salud humana y animal. Además, se deben considerar las pérdidas económicas indirectas: los productores reciben baja rentabilidad porque sus productos son rechazados en los mercados internos y externos (FAO, 2004).



I.4. Fumonisin

I.4.1. Estructura y generalidades

Las fumonisinas son micotoxinas producidas principalmente por especies miembros del género *Fusarium*. La primer micotoxina de este grupo descrita, la fumonisina B₁ (FB₁), fue aislada de cultivos de *F. moniliforme* (ahora llamado *F. verticillioides*) (Seifert *et al.*, 2003) en 1988 por investigadores sudafricanos (Bezuidenhout *et al.*, 1988). Las fumonisinas poseen una estructura relativamente simple si se las compara con otras micotoxinas policíclicas, y entre sus efectos más sobresalientes se destaca la inhibición del metabolismo de esfingolípidos, lo cual puede tener efectos de lo más diversos y complejos en los sistemas animales. La fumonisina B₁ (FB₁) es un diéster de propanol ácido 1,2,3-tricarboxílico y un 2-amino-12,16-dimetil-3,5,10,14,15-pentahidroxicosano, donde ambos grupos hidroxilo (C14 y C15) están esterificados con el grupo carboxilo terminal de los ácidos (Figura 3).

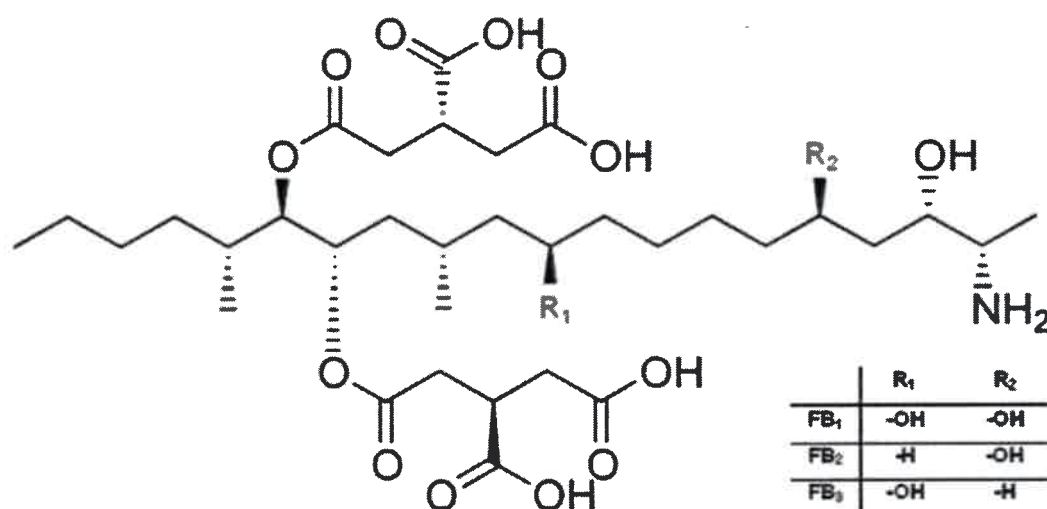


Figura 3. Estructura química de las principales fumonisinas (Scott, 2012).

Luego del descubrimiento de la FB₁ se aislaron y caracterizaron la FB₂ y FB₃, las cuales son metabolitos cercanamente relacionados que suelen co-ocurrir en concentraciones menores. Estas 3 fumonisinas de la serie B conforman la mayoría de las fumonisinas que se encuentran naturalmente en granos contaminados con *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y otras especies productoras de estas toxinas. La FB₄ es un metabolito menor al igual que la FB₆. Existen también otros compuestos análogos a las fumonisinas que pertenecen a las series A, C y P. Recientemente se han descubierto

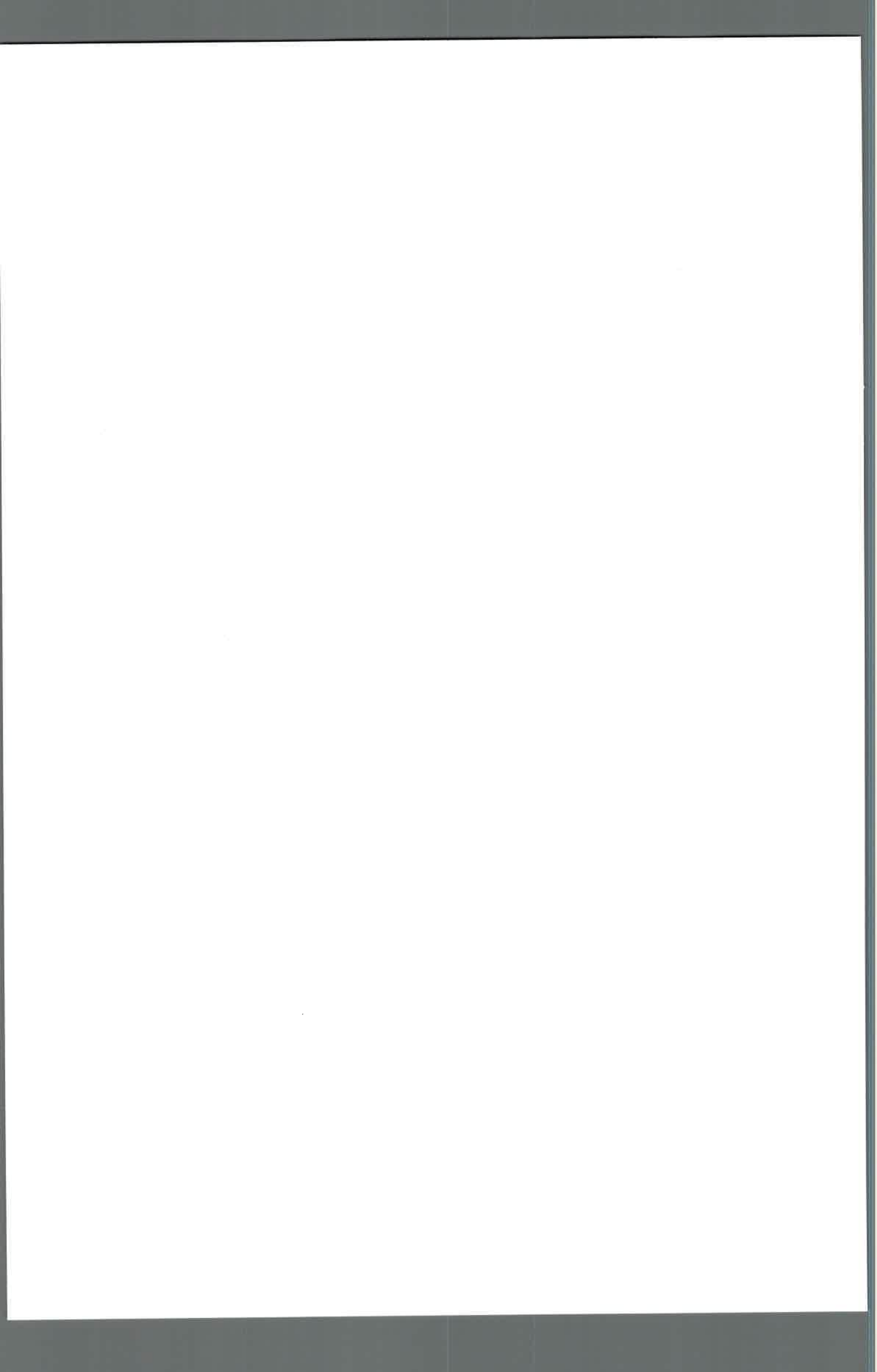
otras, que incluyen las series X, D y muchos otros metabolitos relacionados a ellas (Bartók *et al.*, 2006), como por ejemplo 28 isómeros de FB₁ (Bartók *et al.*, 2010) detectados por LC-MS/MS en cultivos de *F. verticillioides*.

Como fue comentado líneas arriba, muchas especies de *Fusarium* productoras de fumonisinas son capaces de infectar una gran variedad de plantas, lo que implica que estas micotoxinas pueden encontrarse en una gran variedad de alimentos, siendo el maíz el principal sustrato asociado. Sin embargo, están geográficamente muy distribuidas, y su incidencia ha sido reportada también en otros alimentos como cerveza, triticale, frijoles, soja, espárragos (Scott, 2012), té negro (Martins *et al.*, 2001), arroz (Sempere Ferre, 2016), sorgo (Ediage *et al.*, 2015), cebada (Piacentini *et al.*, 2015), alimento para animales (Castellá *et al.*, 1999), granos de café (Noonim *et al.*, 2009), mandioca (Manjula *et al.*, 2009); ajo en polvo (Boonzaaijer *et al.*, 2008), bulbos de ajo (Seefelder *et al.*, 2002), cebolla en polvo (Boonzaaijer *et al.*, 2008), rábano negro (Di Mavungu *et al.*, 2009), higos (Karbancioglu-Güler y Heperkan 2009), maní (Sangare-Tigori *et al.*, 2006), leche de vaca (Gazzotti *et al.*, 2009), plantas medicinales (Sewram *et al.*, 2006), hojas de árbol de naranja, hojas y flores de árbol de tilo y manzanilla (Martins *et al.*, 2001), menta y ortiga (Omurtag y Yazicioglu, 2004), hojas de salvia, anís (Santos *et al.*, 2009), vino (Logrieco *et al.*, 2009; Mogensen *et al.*, 2010) y en los últimos tiempos se han publicado varios reportes de contaminación con fumonisinas en trigo y productos derivados, lo cual se detallará en el punto 1.4.5.

Si bien estas micotoxinas son producidas principalmente por *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, también pueden ser producidas por otras especies como: *F. globosum*, *F. anthophilum*, *F. kozum*, *F. nygamai*, *F. subglutinans*, *F. ramigenum* y *F. oxysporum* (Moretti *et al.*, 2010; Waskiewicz *et al.*, 2010) entre otras. Incluso, por especies de otros géneros fúngicos tales como: *Alternaria alternata f. sp. Lycopersici* (Chen *et al.*, 1992), y *Aspergillus niger* (Frisvad *et al.*, 2007; Logrieco *et al.*, 2009; Manson *et al.*, 2010; Chiotta *et al.*, 2011; Nielsen *et al.*, 2015).

1.4.2. Toxicidad

La mayoría de las toxicosis que resultan de la exposición a fumonisinas pueden ser explicadas por la habilidad de las mismas de alterar el metabolismo de los esfingolípidos mediante la inhibición de la enzima ceramida sintetasa, una enzima responsable de la acilación de la esfinganina y esfingosina. Así, el bloqueo de la vía de biosíntesis de esfingolípidos lleva a una disminución de los mismos, y a un incremento en los niveles de sus precursores. Como resultado, en los tejidos aumentan los niveles de esfinganina iniciando así una cascada de alteraciones celulares que pueden resultar en

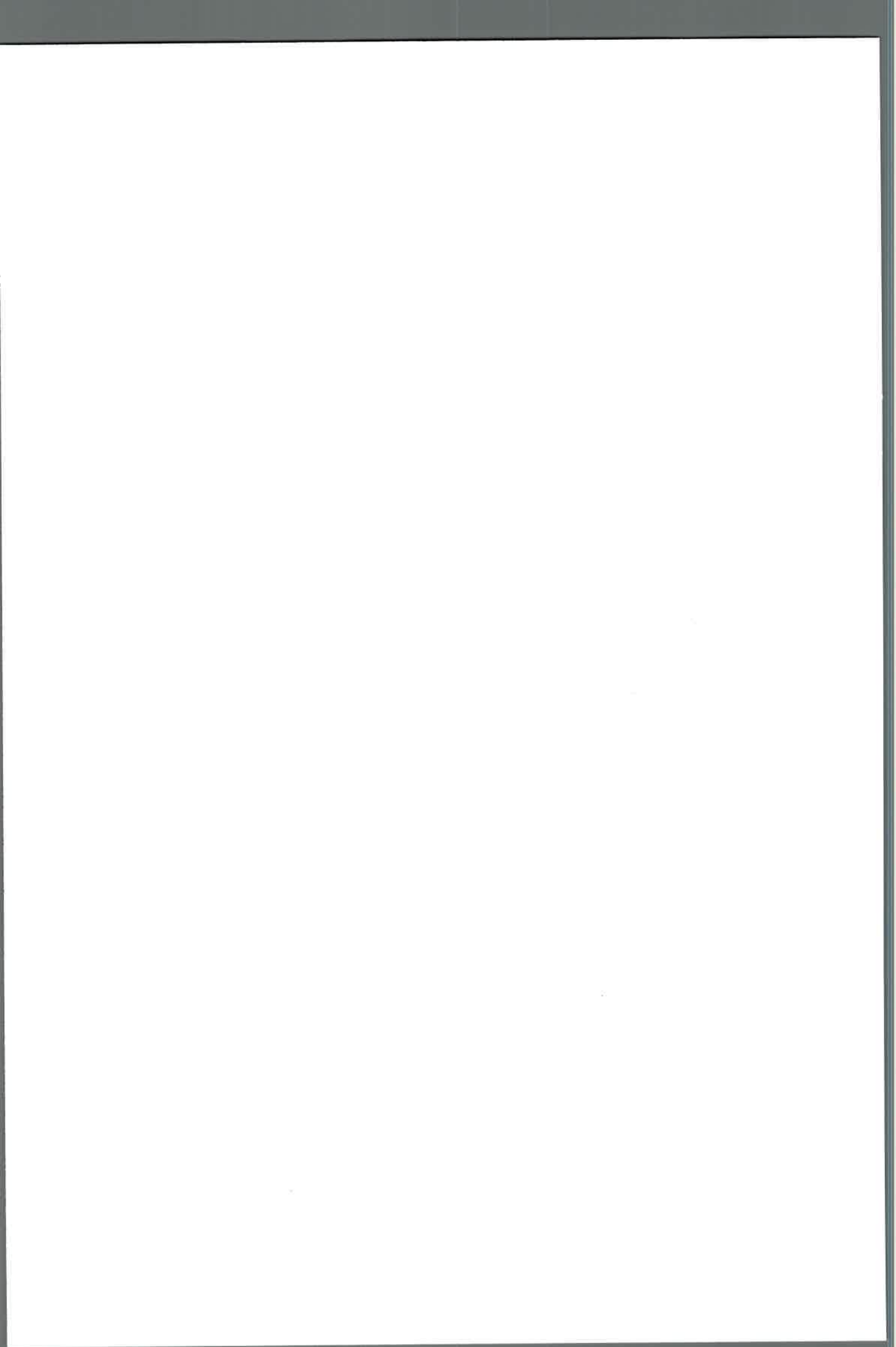




toxicidad y carcinogenicidad (Tsunoda *et al.*, 1998; DeLongchamp y Young, 2001; Seefelder *et al.*, 2001; Merrill *et al.*, 2001; Riley *et al.*, 2001; Desai *et al.*, 2002). Aún no se conocen el/los mecanismos mediante los cuales esta cascada resulta en carcinogénesis, aunque se cree que la esfinganina induce la apoptosis, y la proliferación celular consiguiente podría incrementar la incidencia de cáncer (DeLongchamp y Young, 2001; Kodell *et al.*, 2001). Esta intervención en la síntesis de esfingolípidos, afecta el desarrollo de la membrana celular, lo cual puede tener efectos graves en los sistemas animales. La genotoxicidad de FB₁ no se conoce claramente, la alteración en la metilación del ADN, el estrés oxidativo y la peroxidación lipídica causada por la misma podría jugar un rol importante en su toxicidad (Kouadio *et al.*, 2005; Theumer *et al.*, 2010; Demirel *et al.*, 2015).

Basados en la inhibición de la biosíntesis de esfingolípidos, la alteración en la relación de esfinganina/esfingosina (Sa/So) puede ser detectada en tejidos, sangre y orina determinando así el grado de exposición a fumonisinas (Castegnaro *et al.*, 1998; Riley *et al.*, 2015). A la fecha se conoce que la absorción gastrointestinal de FB₁ es pobre y la toxina absorbida se distribuye rápidamente en la sangre. Si bien la mayoría de la fumonisina absorbida se acumula en hígado y riñón, pequeñas cantidades de toxina han sido encontradas en otros tejidos corporales (Voss *et al.*, 2001). Estas son rápidamente excretadas del intestino y han sido encontradas en heces y orina de consumidores de maíz (Shephard *et al.*, 1994a; Shephard *et al.*, 1994b; Martínez-Larranaga *et al.*, 1999; Gong *et al.*, 2008). En la actualidad no está claro si la microbiota intestinal es capaz de metabolizar a las fumonisinas, aunque durante una digestión simulada se observó que hidrolizados de FB₁ (HFB₁) fueron parcialmente metabolizados por la microbiota del colon a compuestos desconocidos (Cirlini *et al.*, 2015).

Se han realizado numerosos estudios en el mundo utilizando biomarcadores a los fines de evaluar la exposición de las poblaciones humanas a las fumonisinas, pero solo unos pocos fueron realizados en Latinoamérica. En uno de estos trabajos, se midieron los niveles de esfinganina y esfingosina en muestras de orina (como biomarcadores de FB₁) en poblaciones con alto consumo de maíz del norte argentino y sur de Brasil mostrando una relación Sa/So media significativamente mayor en comparación con áreas no consumidoras o con niveles bajos de consumo de maíz, principalmente al sur de Brasil (Solfrizzo *et al.*, 2004). En México, se midieron los niveles de FB₁ en orina (UFB₁) y se compararon con los datos de consumo diario de tortillas de maíz, y como resultado encontraron que tanto la frecuencia de muestras positivas como los niveles de FB₁ se asociaron con el consumo de tortillas (Gong *et al.*, 2008). En Guatemala, la UFB₁ reflejó la estimación del consumo de FB₁ y mostró que cuando la UFB₁ tuvo valores entre 0,1 y 0,5



ng/mL, el riesgo relativo de exceder el máximo provisional tolerable de consumo diario (PMTDI) propuesto por la JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) aumentó en comparación con los casos en los que la UFB₁ no fue detectada (Torres *et al.*, 2014). Así, los resultados obtenidos en estos estudios indicaron que en áreas en donde el maíz se encuentra contaminado con fumonisinas, la población tiene un mayor riesgo de exposición a esta micotoxina. Si consideramos esto último, en las regiones en las que el consumo de trigo contaminado con fumonisinas es alto, deberían realizarse estudios futuros para determinar si la presencia de estas micotoxinas en alimentos a base de trigo podría ser un factor que contribuya a la aparición de alguna enfermedad en humanos.

Como se mencionó líneas arriba, las fumonisinas son un contaminante común de granos de maíz. El consumo de estos granos contaminados con estas micotoxinas está epidemiológicamente asociado con cáncer de esófago y con defectos en el tubo neural en poblaciones humanas (Marasas, 2001; Suarez *et al.*, 2012). Estudios recientes sugieren que la exposición a fumonisinas podría también relacionarse con retraso del crecimiento en niños (Kimanya *et al.*, 2010; Shirima *et al.*, 2015). También pueden causar cáncer y defectos del tubo neural en roedores de laboratorio, lesiones de cerebro (leucoencefalomalacia) en caballos y edema pulmonar en cerdos. Los principales órganos blancos de las FBs en los organismos son hígado y riñón, pero también afectan cerebro, pulmón y corazón. Su inmunotoxicidad predispone a enfermedades infecciosas y podría alterar la “inmunovigilancia tumoral” de humanos y animales, donde se propone como posible mecanismo la inducción de estrés oxidativo (Mary *et al.*, 2012).

Leucoencefalomalacia: Fue descrita por científicos veterinarios por el 1900 en Estados. Afecta principalmente a caballos y mulas, que al ingerir la toxina en ciertas dosis se vuelven letárgicos, nerviosos y descoordinados, y en los casos más serios padecen temblores, parálisis y convulsiones que pueden ser fatales a los 2-3 días luego de que los síntomas aparecen (Graham, 1913; Marasas *et al.*, 1984; Peters, 1904; Marasas *et al.*, 1988; Kellerman *et al.*, 1990).

Edema pulmonar: En 1989, granjeros estadounidenses reportaron casos fatales de edema pulmonar en cerdos, asociados al consumo de maíz. Luego con la inyección y la administración oral de la toxina pura se correlacionó la enfermedad con la fumonisina (Kriek *et al.*, 1981; Harrison *et al.*, 1990; Osweiler *et al.*, 1992; Gumprecht *et al.*, 1998; Haschek *et al.*, 2001).

Cáncer de esófago: Se logró correlacionar la incidencia de contaminación con *F. verticillioides* en maíz, con una gran incidencia de casos de cáncer de esófago y con altos niveles de FB₁ y FB₂ (Marasas *et al.*, 1981; Sydenham *et al.*, 1990; Rheeder *et al.*, 1992).

Sin embargo esta enfermedad no ha sido reproducida en animales experimentales alimentándolos con fumonisina pura.

Defectos del tubo neural: En 1989 en México se correlacionaron altos niveles de fumonisinas en maíz utilizado para la alimentación, con un gran número de casos de leucoencefalomalacia equina, y con aumentos en defectos de tubos neurales (incluyendo espina bífida y anencefalia). Los defectos en tubos neurales son anomalías congénitas que resultan de una falla del tubo neural para cerrarse durante el desarrollo temprano, una de las principales causas en humanos es la deficiencia en ácido fólico. En una línea celular, las fumonisinas disminuyeron los niveles celulares de esfingolípidos en las membranas bloqueando la absorción de folatos (receptor de folato anclado en la membrana), se piensa que así las fumonisinas podrían causar defectos en el tubo neural por deficiencia de folatos (Stevens y Tang, 1997). En un estudio realizado en ratones, se demostró que las fumonisinas pueden causar toxicidad, defectos en tubos neurales, y defectos craneofaciales en embriones de ratones, y que el aporte de ácido fólico era capaz de prevenir la mayoría de los efectos causados por las fumonisinas (Sadler *et al.*, 2002).

I.4.3. Límites permitidos de fumonisinas en alimentos

Debido a la alta toxicidad de las fumonisinas y a que FB₁ es la que se detecta con mayor frecuencia, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) la incluyó en el grupo 2B como un posible carcinógeno para humanos (IARC, 2002), y el JECFA ha determinado un máximo provisional tolerable de consumo diario de 2 µg/kg de peso corporal por día para FB₁, FB₂ y FB₃ individualmente o en combinación (WHO, 2002). Por esto, y por su amplia distribución mundial, se busca supervisar y controlar los niveles de las mismas en los principales sustratos y alimentos. Mientras que en 1995 las fumonisinas estaban reglamentadas solo en un país, actualmente son al menos seis los que reglamentan el nivel de fumonisinas en maíz. Los límites actuales por categoría y país se muestran en la tabla 2.

En cuanto al consumo de alimentos destinados a la alimentación animal, también existen reglamentaciones vigentes establecidas por la Unión Europea, y por Estados Unidos (datos no mostrados).

Tabla 2. Reglamentaciones vigentes para los niveles máximos de fumonisinas en alimentos a base de maíz destinados al consumo humano

UNION EUROPEA¹	
Categoría	Contenido máximo (µg/kg) FB₁ + FB₂
Maíz no elaborado, excepto el destinado a molienda por vía húmeda	4000
Maíz y alimentos a base de maíz destinados al consumo humano directo, a excepción de los que se citan en los siguientes apartados	1000
Cereales para el desayuno a base de maíz y aperitivos de maíz	800
Alimentos elaborados a base de maíz, y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad	200
Fracciones de la molienda de maíz con tamaños de partículas > 500 µm, y otros productos de la molienda de maíz con un tamaño de partícula > 500 µm, no destinados al consumo humano directo	1400
Fracciones de la molienda de maíz con tamaños de partículas < 500 µm, y otros productos de la molienda de maíz con un tamaño de partícula < 500 µm, no destinados al consumo humano directo	2000
BRASIL²	
Categoría	Contenido máximo (µg/kg) FB₁ + FB₂
Harina de maíz, crema de maíz, maíz molido, copos de maíz, maíz amarillo pelado, sémola de maíz	1500
Maíz para almidón y otros productos de maíz	1000
Maíz sin procesar	5000
SUIZA¹	
Categoría	Contenido máximo (µg/kg) FB₁ + FB₂
Maíz (expresado como materia seca)	1 mg/kg
ESTADOS UNIDOS³	
Categoría	FBt (FB₁ + FB₂ + FB₃)
Productos de maíz molido en seco sin germen (e.j., sémola, copos de maíz, harina de maíz, harina de maíz con niveles de grasa < 2,25%, en peso seco)	2 ppm

Productos de maíz molido en seco sin o parcialmente sin germen (e.j., sémola, copos de maíz, harina de maíz, harina de maíz con niveles de grasa \geq 2,25%, en peso seco)	4 ppm
Salvado de maíz molido en seco	4 ppm
Maíz limpio para producción de masa	4 ppm
Maíz limpio para producción de pochoclo	3 ppm

¹(Legislación de la Unión Europea sobre contenidos máximos de micotoxinas en productos alimenticios. MICOTOXINAS. Revisión Marzo 2017). ² ANVISA, (2011). ³ FDA (Revisión Marzo 2017).

I.4.4. Vía biosintética de las fumonisinas

En los últimos años, la toxicología de *Fusarium* ha entrado en la “era de la genómica”. Se ha secuenciado el genoma haploide completo de dos de las especies toxicogénicas más importantes: *F. graminearum* y *F. verticillioides* (con 46 Mb en 12 cromosomas) en el 2003 y en el 2006, respectivamente (Brown *et al.*, 2006).

De manera general, los genes implicados en la vía biosintética de las fumonisinas se encuentran agrupados en una misma región cromosómica denominada “cluster”, aunque no todos están formando parte de él, como ocurre con otros hongos productores de micotoxinas (como *Aspergillus flavus*). Esto podría facilitar la transferencia horizontal de genes y coordinar la regulación transcripcional de aquellos que se encuentran en el cluster biosintético. Este cluster consiste en 17 genes co-regulados transcripcionalmente. Las fumonisinas se sintetizan a partir de unidades de acetato para formar un policétido lineal dimetilado, que se condensa con el aminoácido L-alanina, seguido de hasta cinco reacciones de oxigenación y dos esterificaciones. El primer paso es catalizado por una policétido sintasa, codificada por el gen *FUM1* (Figura 4). Se trata de una enzima modular que tiene varios dominios catalíticos: β -cetoacil sintasa, aciltransferasa y acarreadora de acilos, responsables de la extensión de la cadena del policétido (Huffman *et al.*, 2010). Corriente abajo del gen *FUM1* se ubican otros genes que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis, entre ellos el gen *FUM8* que codifica una aminotransferasa que acarrea el grupo amino de la alanina al policétido de 18 carbonos por medio de la condensación descarboxilativa. Posteriormente ocurren oxidaciones en las posiciones C-14 y C-15, posiblemente por la acción del producto del gen *FUM6* (Uhlig *et al.*, 2012). Otros 4 genes (*FUM7*, *FUM10*, *FUM11*, *FUM14*) también son requeridos para la esterificación de ácidos tri carbalílicos. Además de los genes estructurales, en el locus *FUM* se hallan los genes *FUM19* y *FUM21*. El primero codifica para un transportador de tipo ABC, que podría actuar en la excreción de la toxina para evitar su acumulación en la célula fúngica

(Stergiopoulos *et al.*, 2002). El producto de *FUM21* es un factor de transcripción del tipo Zn(II)-2Cys6, regulador de la expresión de los genes estructurales del locus. Los factores ambientales tales como el pH, disponibilidad de agua y nutrientes, también regulan la síntesis de fumonisinas. Asimismo, hay genes fuera del locus *FUM* que participan, a distintos niveles, en las vías de señalización que conducen a la expresión de los genes del locus *FUM* y a la producción de fumonisinas (Sagaram *et al.*, 2006; Picot *et al.*, 2010). En relación a la influencia del pH en la síntesis de fumonisinas, se observa una marcada producción de la toxina a pH ácido (4,5), en contraste con el pH alcalino, mayor a 8. El gen *PAC1* actúa como represor de la síntesis de fumonisina, siendo el gen *FUM1* un blanco potencial de este regulador ya que se ha demostrado que en cepas mutantes de este gen hay niveles mayores del transcritpo (Flaherty *et al.*, 2003).

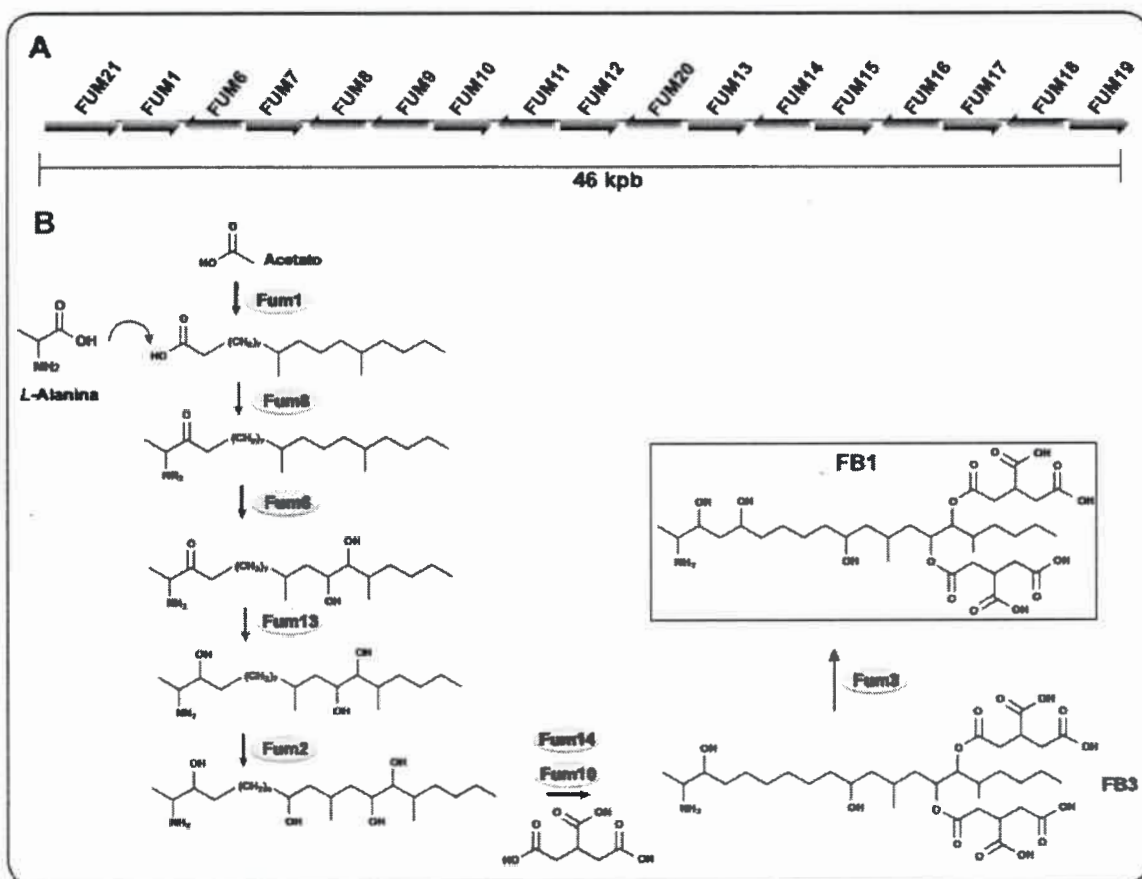
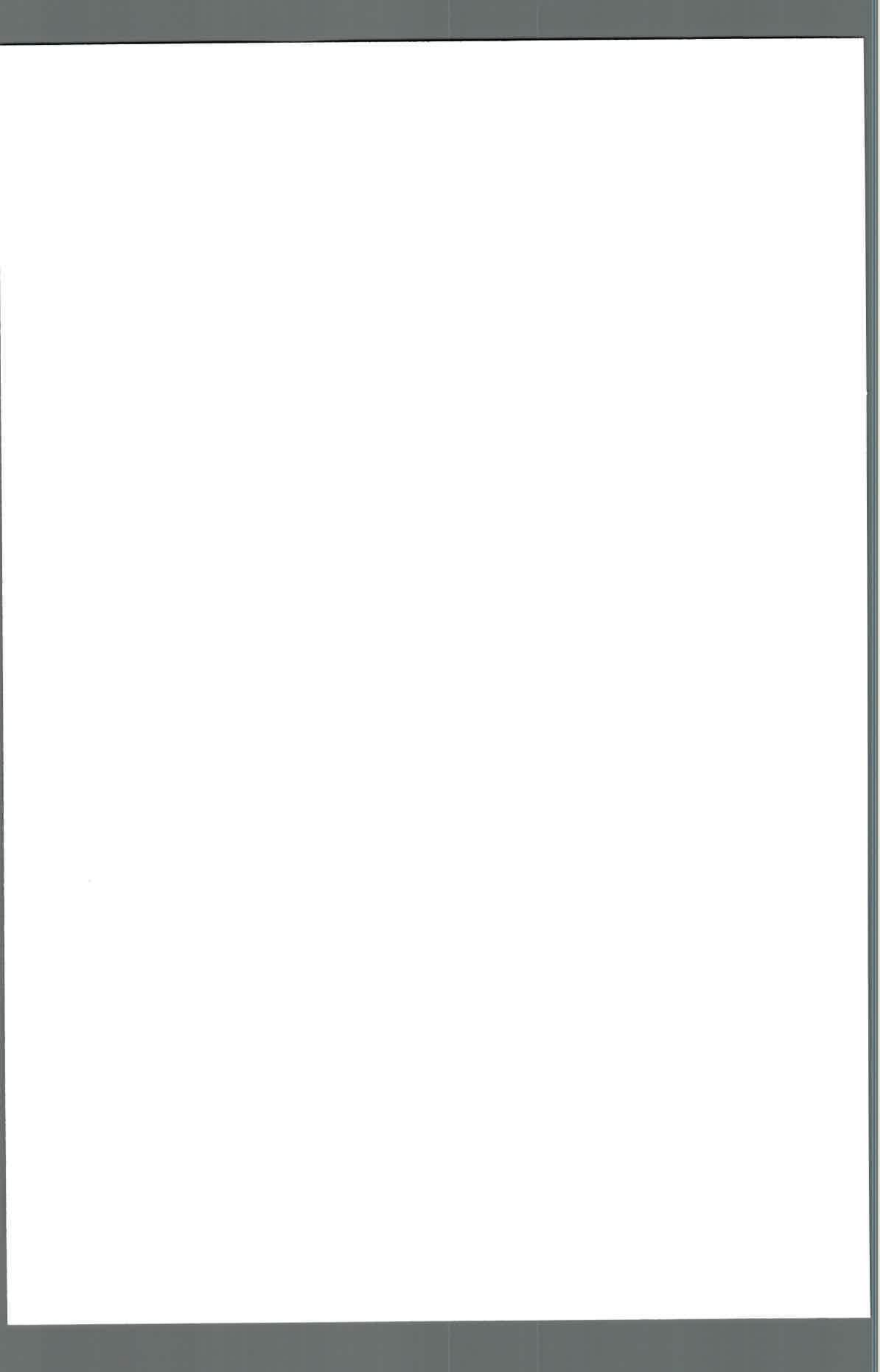


Figura 4. Biosíntesis de fumonisinas. A: Estructura genómica del locus *FUM* en el cromosoma 1 de *Fusarium verticillioides*. B: Ruta biosintética de las fumonisinas. Se indican los pasos en los que participan los productos de los genes del locus *FUM* (De la Torre-Hernández *et al.*, 2014).

Otro de los factores que influyen en la síntesis de fumonisinas es la fuente de nitrógeno, ya que el amonio reprime la producción de la toxina. La relación Carbono/Nitrógeno también afecta la síntesis: si ésta es baja ocurre la supresión. Se ha demostrado que cuando *F. verticillioides* crece en granos de maíz en estadios tempranos de desarrollo, con bajo contenido de almidón, se da una pobre producción de fumonisina (Bluhm y Woloshuk, 2005). El gen *AREA* de *F. verticillioides* codifica la proteína que contiene una región altamente conservada entre los reguladores del metabolismo de nitrógeno. Kim y Woloshuk (2008) mostraron que cepas de *F. verticillioides* mutadas en este gen producen menores cantidades de la toxina, por lo que este gen es un regulador positivo de la síntesis de fumonisina. También tiene influencia el tipo de carbohidratos presentes en los granos de maíz, por ejemplo se ha demostrado que en un medio de cultivo cuya única fuente de carbono es la amilosa la cantidad de toxina producida es muy baja. El gen *HXK1* participa en la percepción de azúcares y contribuye en la regulación de la síntesis de fumonisinas. Cuando se muta este gen se reduce en un 80% la síntesis de FB₁ (Kim *et al.*, 2011). Las cepas con mutación en *FST1* no se ven afectadas en el crecimiento ni en la colonización del grano, pero sí en la producción de FB₁. La expresión del gen *FST1* se halla controlada por el factor transcripcional Zfr1, que es un regulador positivo de la síntesis de fumonisinas y entre sus blancos podrían estar incluidos los genes del locus *FUM*. Asimismo, el factor transcripcional Sda1 participa negativamente en la regulación de la síntesis de fumonisina. La percepción del medio ambiente y los nutrientes que influyen en la expresión de genes del locus *FUM* y en la síntesis de FBs requiere de señalización celular. Hay varios genes cuyos productos participan en estas rutas de señalización y regulan la producción de la micotoxina. A su vez, como ocurre en otros eucariotas, el estado de la cromatina: acetilación/desacetilación de histonas contribuye al control de la expresión genética del metabolismo secundario (De la Torre-Hernández *et al.*, 2014).

Mediante un análisis de genómica comparativa se determinó la presencia del *cluster FUM* en *F. proliferatum* y se reveló que los genes presentan el mismo orden y orientación que los genes descritos en *F. verticillioides* y *F. oxysporum* (Proctor *et al.*, 2003, 2008). Sin embargo, el bajo nivel de identidad (77–89% a nivel de aminoácidos) de los genes *FUM* y los diferentes lugares de ubicación genómica del *cluster* en *F. verticillioides* y *F. proliferatum* indican que cada especie podría haber adquirido el mismo de manera independiente (Waalwijk *et al.*, 2004).

El objetivo fundamental que se persigue con el estudio de estas rutas metabólicas es reducir la contaminación de micotoxinas en cereales. Así, conociendo los genes biosintéticos principales y usando las herramientas moleculares disponibles actualmente,



se puede estudiar la regulación de éstos, en relación a factores ambientales (por ejemplo, temperatura y estrés hídrico). El conocimiento de esto último nos proporciona información sobre el riesgo de contaminación de los cereales y nos permite establecer estrategias de control y prevención sobre las micotoxinas (Brul *et al.*, 2006). Como la producción de fumonisinas depende de la expresión de genes *FUM*, se espera que la expresión de los mismos este influenciada por condiciones ecológicas. Hay pocos trabajos que estudian la relación entre la expresión de genes *FUM*, la síntesis de fumonisinas y las condiciones ecológicas, y aunque los factores de estrés pueden ser transitorios, en una situación de cambio climático, podrían convertirse en permanentes en ciertas regiones (Miraglia *et al.*, 2009). Por lo tanto, la información que pueda tenerse acerca del comportamiento de diferentes especies fúngicas, teniendo en cuenta patrones de crecimiento y producción de toxina en condiciones de estrés ambiental podría ser crítica para mejorar la predicción y controlar el riesgo de aparición de las mismas.

I.4.5. Incidencia natural de fumonisinas en trigo y derivados

Si bien se mencionó en los puntos anteriores que las fumonisinas son micotoxinas asociadas principalmente al maíz, existen en la literatura numerosos trabajos en los que se ha detectado contaminación natural con estas micotoxinas en granos de trigo y de productos derivados en varios países, inclusive en Argentina (Tabla 3). Aunque los niveles de esta toxina en trigo generalmente son menores a los detectados en maíz, la incidencia en muchos casos es alta. Además, teniendo en cuenta que el consumo humano de trigo en el mundo, salvo en algunas excepciones, es mayor que del maíz, los datos existentes acerca de su posible contaminación con fumonisinas adquieren particular relevancia (Palacios *et al.*, 2011). Por otro lado, los niveles de fumonisinas en trigo, bajos pero frecuentes, podrían haber permanecido indetectables, hasta hace relativamente poco tiempo, dado que los programas de monitoreo de micotoxinas en trigo no incluyen a éstas (Amato *et al.*, 2015). De hecho, la presencia de fumonisinas en este cereal ha sido cuestionada en los casos en los que se utilizaron para su detección métodos analíticos no cromatográficos (Shephard *et al.*, 2005). Sumado a esto, se ha demostrado que cuando los alimentos son procesados se detectan menores niveles de fumonisinas que cuando no son sometidos a este proceso, sugiriendo que ocurre degradación de las toxinas, sin embargo, otra explicación indica que las FBs “se esconden” y no se pueden recuperar por los métodos convencionales de extracción/purificación (Kim *et al.*, 2003), pero que aun así son tóxicas en el tracto gastrointestinal. En este sentido, Kim *et al.* (2003) encontraron que muchas de las pérdidas de fumonisinas en comidas tratadas con calor pueden deberse a la unión de las

FBs a proteínas propias de los alimentos, ya que en copos de maíz tratados con SDS (dodecilsulfato sódico) e hidróxido de potasio durante la extracción de fumonisinas se recuperaron 2,6 veces más toxina en comparación con lo observado cuando se usaron métodos de extracción convencionales. Con respecto a esto, Dall'Asta y Battilani, (2016) concluyeron que las formas modificadas de las FBs deberían estar incluidas en los planes de monitoreo, de manera tal de tener una información general acerca de la posible contribución a la exposición humana, ya que cuando se analizan los alimentos no se las tiene en cuenta. Como consecuencia, las poblaciones podrían estar más expuestas a las toxinas de lo que los métodos convencionales lo indican. Por lo tanto la presencia de fumonisinas en trigo, que suele ocurrir en bajos niveles, sería un punto importante a considerar.

Szabó-Fodor *et al.* (2015) estudiaron FB₁ enmascarada en muestras de maíz y trigo previamente inoculados con *F. verticillioides*, comparando un procedimiento de extracción de rutina con un procedimiento que tenía un pre-tratamiento de digestión *in vitro*. Como resultado, todas las muestras mostraron un alto contenido de FB₁ luego de la digestión, en comparación con las fumonisinas libres, obtenidas solo por los métodos de extracción convencionales. El porcentaje de toxinas enmascaradas fue de 38,6% ($\pm 18,5$) en maíz y 28,3% ($\pm 17,8$) en trigo, (expresado como proporción total de FB₁). Estos resultados indican que la exposición a la toxina determinada por los métodos convencionales, es generalmente subestimada (generalmente en un 40%), ya que la biodisponibilidad no se tiene en cuenta, así los métodos analíticos convencionales utilizados para analizar el contenido de fumonisinas en alimentos fallan en no considerar el contenido de micotoxina unido a la matriz, que puede ser absorbido del tracto gastrointestinal.

Si bien en la actualidad no existe legislación que regule los niveles de fumonisinas en trigo y derivados, en el programa conjunto FAO/WHO sobre normas alimentarias se estableció que debido a la frecuencia en que las fumonisinas son detectadas en trigo, se necesitan estudios para evaluar la necesidad y viabilidad de establecer niveles máximos permitidos. Este objetivo se encuentra dentro de las Propuestas de la CCCF (Comité del Codex para los contaminantes de alimentos) de nuevos contaminantes y sustancias tóxicas naturales para la lista de prioridades para el JECFA (FAO/WHO, 2016).

Tabla 3. Incidencia mundial de fumonisinas en trigo y subproductos

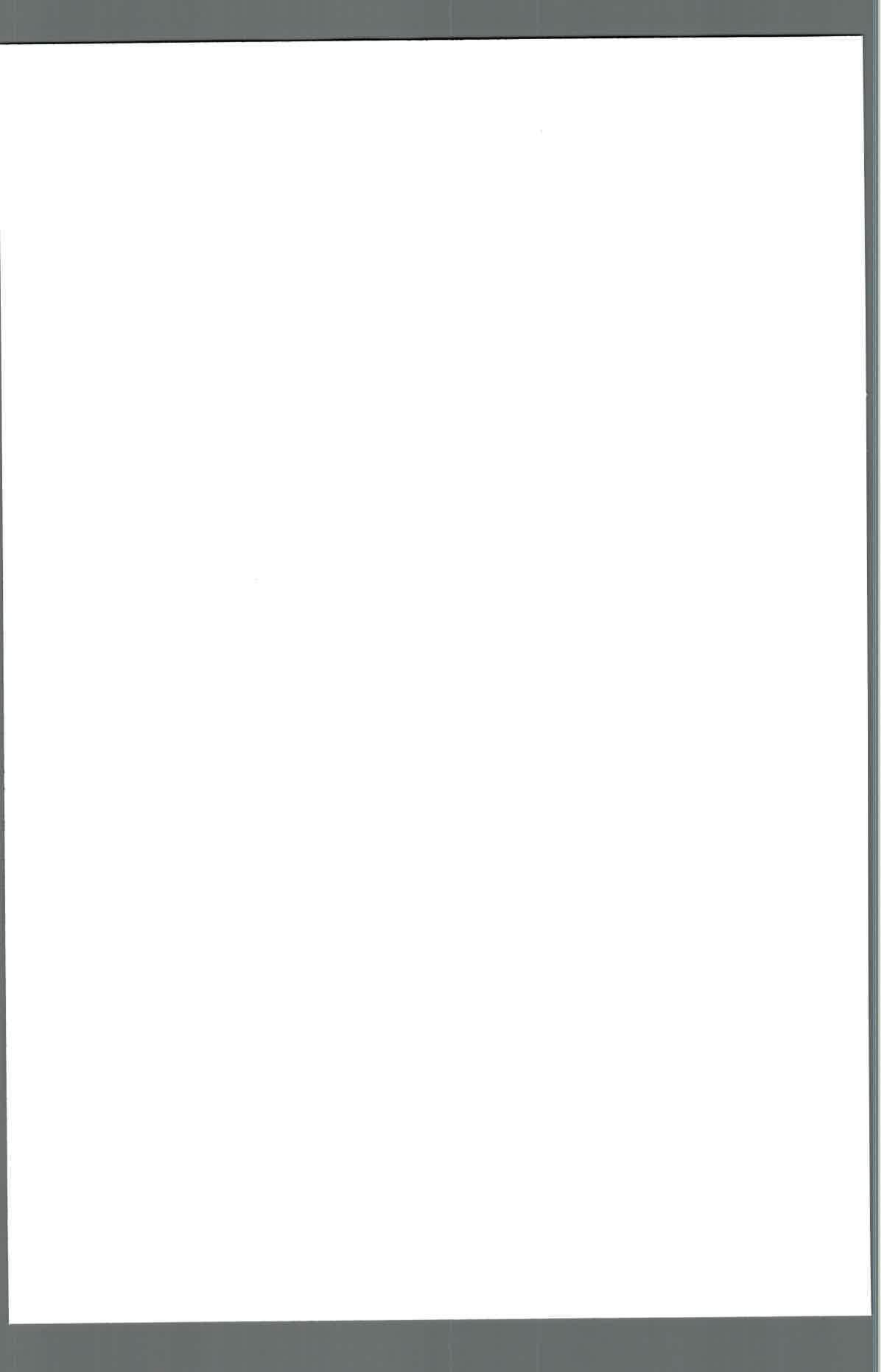
País	Año	Alimento	FB ₁		FB ₂		FBt		Método	Referencia
			Incidencia ¹	Rango ²	Incidencia	Rango	Incidencia	Rango		
Alemania	2009 a 2012	Copos de trigo orgánico	6/44/14/ND	20,2-59,8	5/44/11/ND	25,4-41,8			HPLC-MS/MS	Rubert <i>et al.</i> , 2013
Argentina	2007	Trigo duro	29/30/97/193,7	10,5-987,2	25/30/83/66,15	15-258,5			HPLC-MS/MS	Palacios <i>et al.</i> , 2011
Argentina	2008	Trigo duro	6/25/24/ND	<LOQ					HPLC-MS/MS	Palacios <i>et al.</i> , 2011
Argentina	2012	Trigo duro	31/40/77,5/84,75	0,15-1304,4	17/40/42,5/10,47	0,43-47			HPLC-MS/MS	Cendoya <i>et al.</i> , 2014b
Argentina	2012	Trigo pan	131/135/97/30,07	0,16-680,4	69/135/51/2,88	0,25-23,7			HPLC-MS/MS	Cendoya <i>et al.</i> , 2014b
Brazil	2010/2011	Cultivares de trigo	6/11/54/2814,33	958-4906					HPLC-FL	Mendes <i>et al.</i> , 2015
Canadá	1999-2001	Trigo					5/29/17/16	LC- 51	HPLC	Roscoe <i>et al.</i> , 2008
Canadá	1999-2001	Trigo					1/1/100/5	5	HPLC	Roscoe <i>et al.</i> , 2008
China	ND	Harina de trigo					13/16/81/200	0-400	ELISA HPLC	Sun <i>et al.</i> , 2011
China	ND	Harina de trigo					2/30/7/0,1	ND	LC-MS/MS	Liu <i>et al.</i> , 2012
China	2014	Harina de trigo	23/369/6,2/ND	0,3-34,6					UPLC-MS/MS	Li <i>et al.</i> , 2015
España	1994,1995,1996	Trigo	8/17/47/2900	200-8800	1/17/6/200	200	8/17/47/2900	200-8800	LC-MS	Castellà <i>et al.</i> , 1999
España	2009 a 2012	Gofio orgánico de trigo ³	27/35/77/ND	787,5-1001,4	27/35/77/ND	645,2-952,1			HPLC-MS/MS	Rubert <i>et al.</i> , 2013
Estados Unidos	2006-2007-2008	Trigo	9/43/21/464,11	5-2210	4/43/9,3/121,25	2-249			LC-MS	Busman <i>et al.</i> , 2012
Europa	2009/2011	Trigo/Salvado					3/9/33/268	LC-	ELISA	Rodrigues

Central		de trigo					450		y Naehrer, 2012
Europa Sur	2009-2011	Trigo/salvado de trigo				3/10/30/386	-925	ELISA-HPLC	Rodrigues y Naehrer, 2012
Francia	2011	Pan y productos de panadería secos	ND/14/ND/1,4	ND	ND/14/ND/0,3	ND		LC-MS/MS	Sirot <i>et al.</i> , 2013
Francia	2011	Galletitas y barritas dulces y saladas	ND/8/ND/35	ND	ND/8/ND/75	ND		LC-MS/MS	Sirot <i>et al.</i> , 2013
Francia	2009 a 2012	Copos de avena, centeno y trigo organicos con miel	3/27/11/ND	75,7-98,1	3/27/11/ND	62,1-81,1		HPLC-MS/MS	Rubert <i>et al.</i> , 2013
Francia	2009 a 2012	Copos de trigo orgánico	9/63/14/ND	75,8-125,8	9/63/14/ND	63,8-101,1		HPLC-MS/MS	Rubert <i>et al.</i> , 2013
Francia	2009 a 2012	Trigo y maiz Convencionales	9/54/16/ND	29,5-48,7	9/54/16/ND	21,7-32,5		HPLC-MS/MS	Rubert <i>et al.</i> , 2013
Irán	2011	Harina de trigo para panaderia				18/21/86/300	LC-4500	ELISA	Roohi <i>et al.</i> , 2012
Irán	2011	Harina de trigo para confiteria				17/21/81/290	LC-4100	ELISA	Roohi <i>et al.</i> , 2012
Irán	ND	Trigo almacenado	56/82/68/ND	15-155	35/82/43/ND	12-86		HPLC	Chehri <i>et al.</i> , 2010
Italia	2000	Farro	5/8/62/36,18	20,05-70	NC ³	<LC		HPLC-MS	Castoria <i>et al.</i> , 2005
Italia	2001-2002	cereales, harina integral	36/111/32/70	10-2870	34/111/31/60	10-420		LC-MS	Cirillo <i>et al.</i> , 2003a
Italia	2001-2002	Pan y productos relacionados	7/24/29/50	30-150	8/24/33/118	56-400		LC-MS	Cirillo <i>et al.</i> , 2003a

Italia	2001-2002	Galletitas	2/24/8/ND	80-200	6/24/25/88	10-220	LC-MS	Cirillo <i>et al.</i> , 2003a
Italia	2003	Alimentos convencionales a base de trigo	14/44/31/97	40-2870	17/44/38/25	15-67	LC/MS	Cirillo <i>et al.</i> , 2003b
Italia	2003	Alimentos organicos a base de trigo	7/36/20/90	10-380	12/36/32/210	70-790	LC/MS	Cirillo <i>et al.</i> , 2003b
Italia	2008	Trigo duro	4/4/100/6,2	2,8-9,6			HLPC-MS/MS	Amato <i>et al.</i> , 2015
Italia	2009	Trigo duro	4/4/100/5,3	2,7-7,9			HLPC-MS/MS	Amato <i>et al.</i> , 2015
Italia	2010	Trigo duro	4/4/100/33	15-51			HLPC-MS/MS	Amato <i>et al.</i> , 2015
Japón		trigo	1/47/2/ND	> 10			LC-ESI MS/MS	Kushiro <i>et al.</i> , 2009
Norte de Asia	2009-2011	Trigo/Salvado de trigo			8/73/11/371	-874	ELISA-HPLC	Rodrigues y Naehrer, 2012
Oceanía	2009-2011	Trigo/salvado de trigo			13/109/12/269	-1196	ELISA-HPLC	Rodrigues y Naehrer, 2012
Serbia	2005	Trigo	23/28/82/2079,45	750-5400			ELISA	Stanković <i>et al.</i> , 2012
Serbia	2007	Trigo	69/75/92/918,76	750-4900			ELISA	Stanković <i>et al.</i> , 2012
Serbia	2007-2009	Trigo	109/180/61/852,7	750-4900			ELISA	Stanković <i>et al.</i> , 2011
Serbia	2010	Trigo			39/75/51/241	27-614	ELISA	Jakšić <i>et al.</i> , 2012
Siria	2009-2010	Trigo duro	4/40/10/5	5-6	1/40/2/12	12	HPLC-MS/MS	Alkadri <i>et al.</i> , 2014
Sudáfrica	ND	Trigo y subproductos	4/210/2/ND	1000-30000			TLC, HPLC,	Mashinini y Dutton,

Sudamérica	2009-2011	Trigo/salvado de trigo			2/40/5/1047	-1715	MS/MS ELISA- HPLC	2006 Rodrigues y Naehrer, 2012
Sudeste Asiático	2009-2011	Trigo/salvado de trigo			2/40/5/172	-292	ELISA- HPLC	Rodrigues y Naehrer, 2012
Túnez	2010	Producto a base de trigo (1 pasta-1sopa)	2/65/3/ND	<LC (88,33)-184			LC- MS/MS	Serrano <i>et al.</i> , 2012
Túnez	2010	Trigo			2/21/9/ND	121-158	LC- MS/MS	Serrano <i>et al.</i> , 2012
Zimbabwe	1995-1997	Trigo	5/5/100/4200	2500-6000			HPLC	Gamanya y Sibanda, 2001

¹Muestras positivas/muestras totales/ incidencia % / valores medios (ng/g); ² ng/g; ³Harina obtenida de pan tostado; NC, No cuantificable; LC, Límite de cuantificación; ND, No hay datos disponibles.



Bakker *et al.* (2003) estimaron la ingesta de FB₁ por la población holandesa utilizando datos de las concentraciones de FB₁ en diferentes productos alimenticios y combinándolos con los niveles de consumo de los mismos. Como resultado observaron que la mayor contribución a la ingesta total de FB₁ (73%) estuvo dada por el trigo. Sin embargo, calculando la ingesta diaria en el peor de los escenarios, la misma fue considerablemente menor a la ingesta diaria tolerable. Finalmente, los autores concluyeron que la ingesta de fumonisinas ocurre principalmente mediante el consumo de trigo y subproductos, y si bien la concentración de FB₁ en maíz es mucho mayor que en trigo, parecería ser que este último constituye la principal fuente de fumonisinas en la población de ese país.

I.5. Factores que determinan el desarrollo fúngico y la producción de micotoxinas

La contaminación fúngica y la síntesis de micotoxinas, tanto a campo como durante el almacenamiento de los productos agrícolas, depende en gran parte de factores ecofisiológicos, la actividad de agua (a_w) y la temperatura, además del pH y la composición gaseosa de la atmósfera (O_2 y CO_2), entre otros, siendo los dos primeros los más importantes, particularmente para el género *Fusarium* (Doohan *et al.*, 2003; Ramirez *et al.*, 2006c). Otros factores también pueden influir en la proliferación fúngica, como la composición del sustrato, las interacciones microbianas o fúngicas, las interacciones con vectores invertebrados y/o el genotipo del hospedador (Magan y Lacey, 1984a, 1984b; Magan y Aldred, 2007; Marín *et al.*, 2011).

La disponibilidad de agua es uno de los factores más importantes y limitantes de la colonización fúngica de un determinado sustrato y/u hospedador, y de la producción de las toxinas. El agua disponible determina la germinación de las esporas, la tasa de crecimiento y puede afectar la regulación de la biosíntesis de las toxinas (Marín *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2004a,b, 2006c). De todos los microorganismos que colonizan vegetales, los hongos filamentosos son los principales causantes del deterioro de los mismos, ya que requieren menor cantidad de agua disponible (Lacey y Magan, 1991).

La actividad de agua (a_w) se define como el agua libre de un sustrato en equilibrio con la humedad relativa ambiente, disponible para el crecimiento microbiano. Para las especies del género *Fusarium*, la germinación de las esporas se produce a partir de valores de a_w de 0,88, mientras que el crecimiento se observa a partir de 0,90 (Marín *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2004a; Sanchis *et al.*, 2006; Palmero *et al.*, 2008). Varios estudios han demostrado el efecto de la a_w con otros factores ecofisiológicos

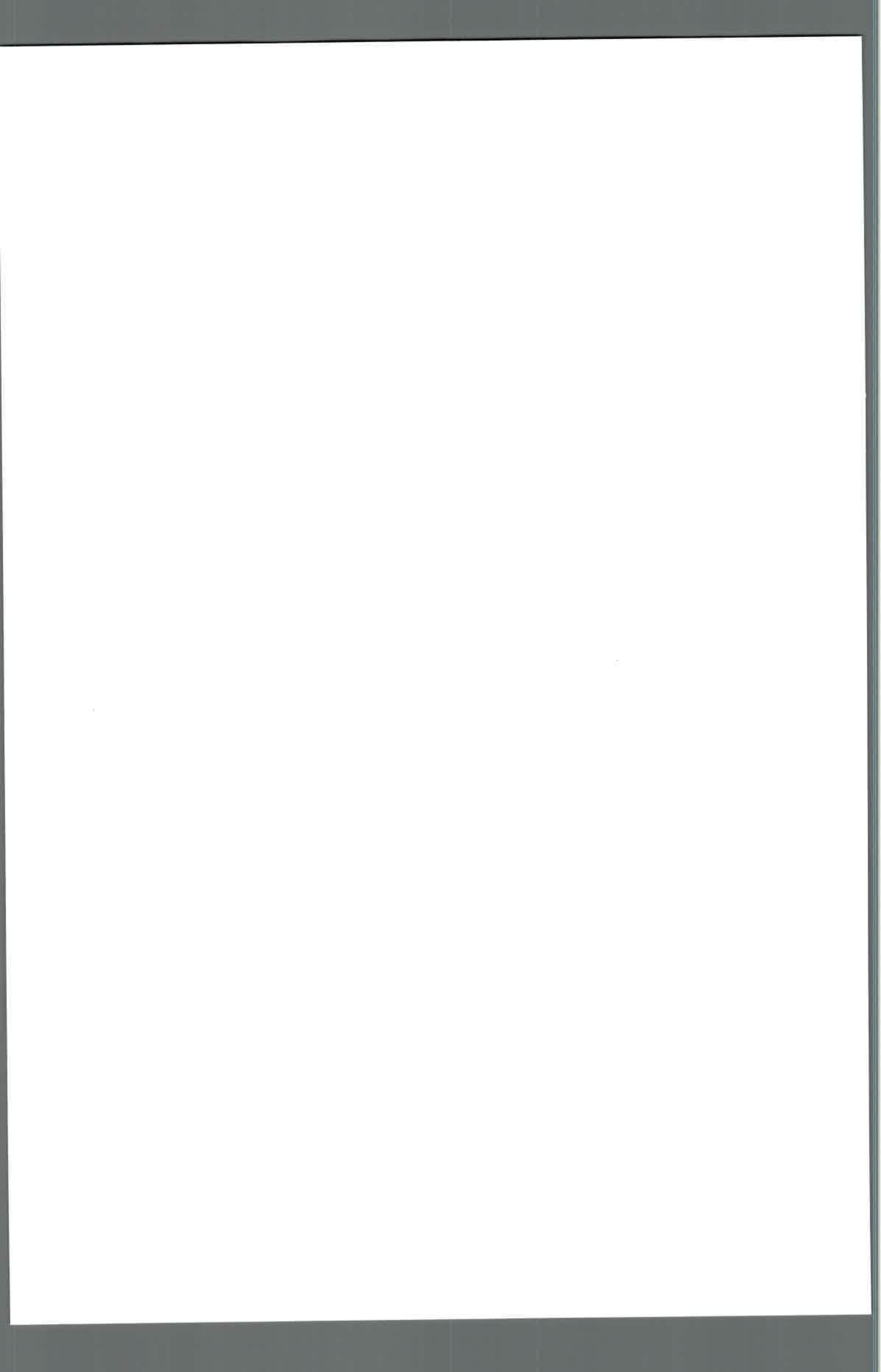
(temperatura, substrato y pH) y su influencia en el crecimiento y en la producción de micotoxinas usando tanto técnicas cromatográficas (detectando la toxina, por ejemplo HPLC) como técnicas moleculares (detectando los niveles de expresión de los genes principales que intervienen en la ruta de síntesis de la toxina, por ejemplo RT-PCR a tiempo real) (Velluti *et al.*, 2000; Llorens *et al.*, 2004; Marín *et al.*, 2004; Mateo *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2006a; Schmidt-Heydt *et al.*, 2008).

La temperatura es otro de los factores más importantes que afecta al crecimiento fúngico y a la producción de las toxinas. Cada especie fúngica tiene una temperatura permisiva y una óptima para su crecimiento (Lacey, 1989) y para la síntesis de las toxinas. La mayoría de los hongos que colonizan cereales antes y durante la cosecha, crecen entre 0 y 35 °C (Lacey, 1989; Marín *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2006a). El rango de temperatura para producción de las toxinas difiere con respecto al de crecimiento y dependerá de cada especie fúngica. Los requerimientos mínimos de disponibilidad de agua para el crecimiento fúngico y la producción de la toxina son distintos a diferentes temperaturas y en diferentes substratos (Magan y Aldred, 2007).

Los hongos suelen crecer en un rango de pH de 4 a 7 (también pueden desarrollarse a pH inferiores o superiores). Cuanto más extrema sea la condición de pH, más difícil resulta el crecimiento fúngico, y comienza la producción de metabolitos secundarios (Holmquist *et al.*, 1983). El pH óptimo para casi todas las especies contaminantes de vegetales es de 5,6 y algunos estudios han demostrado que a valores de pH ácido el ambiente es más propicio para la síntesis de toxinas, como fue anteriormente descrito para las fumonisinas en el punto 1.4.4. (Flaherty *et al.*, 2003).

El crecimiento y la producción de toxinas para la mayor parte de los hongos contaminantes de cereales, se ve influenciado por los niveles ambientales de O₂ y CO₂ (Pitt y Hocking, 1985). Estudios recientes sugieren que la producción de micotoxinas es más sensible a los niveles de gases atmosféricos que el crecimiento fúngico, y que la sensibilidad de cada especie fúngica a la composición gaseosa es un factor relevante, especialmente en condiciones de almacenamiento (Samapundo *et al.*, 2007).

Los hongos productores de micotoxinas son capaces de crecer en una amplia gama de substratos. Las diferencias en cuanto al crecimiento y producción de micotoxinas pueden atribuirse entre otros factores a diferencias en las características físicas y químicas de cada sustrato. En cuanto a las características físicas se incluyen parámetros como la a_w intrínseca del sustrato, la resistencia mecánica al embalaje (determina su integridad y la disponibilidad de oxígeno), y la conductividad térmica (Le



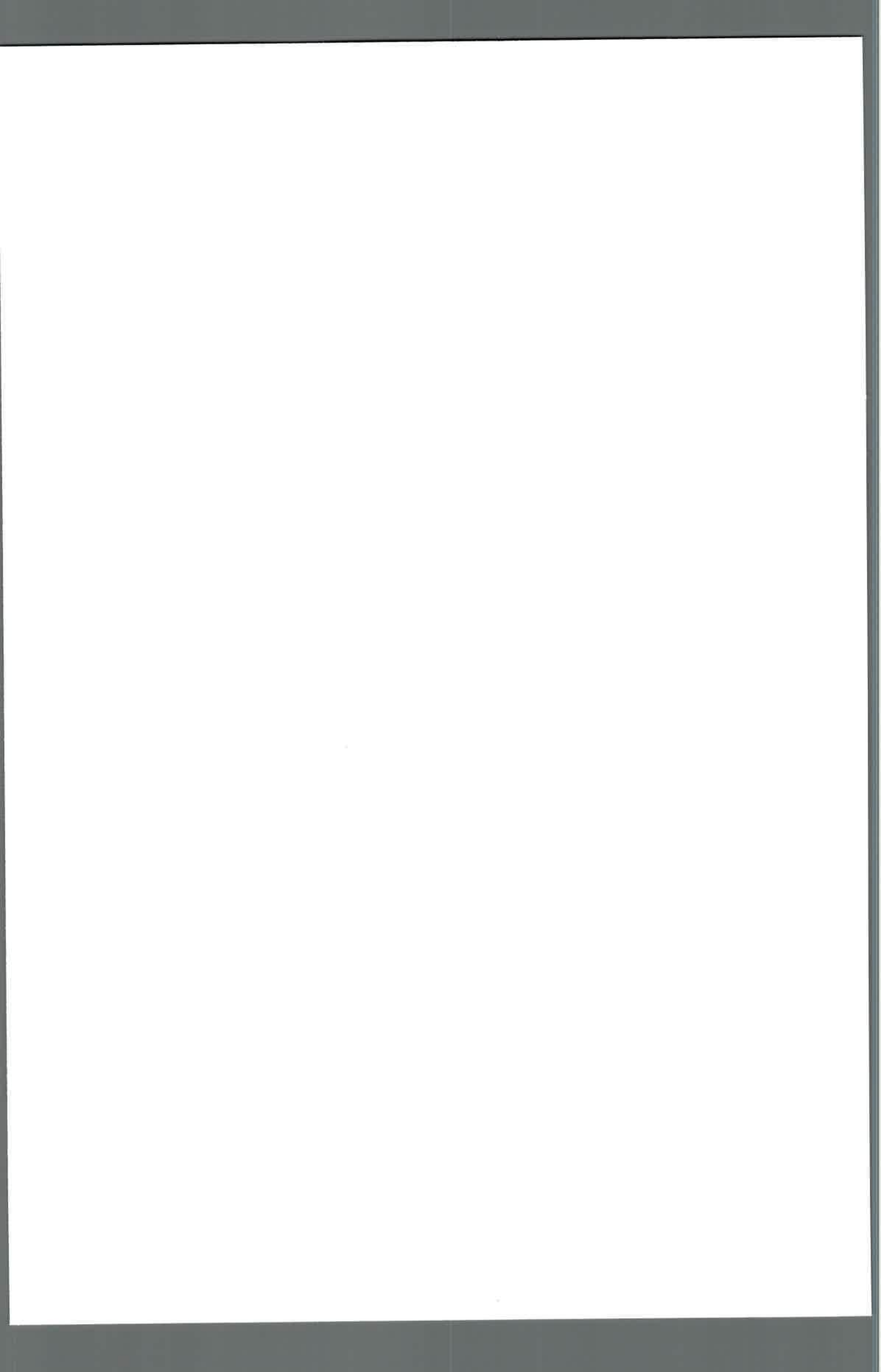
Bars, 1982). En cuanto a las características químicas se incluyen: el contenido en grasas, proteínas, minerales traza, composición en ácidos grasos y aminoácidos, que pueden influir en la producción de micotoxinas.

Se ha observado que el nitrógeno también influye en el crecimiento fúngico y en la producción de toxinas. Kohut *et al.* (2009) demostraron que la disminución del ión amonio por debajo de 10 mM aumentó de manera significativa la expresión del gen *FUM1* en una cepa de *F. proliferatum*, por lo tanto existiría un riesgo potencial de aumento significativo de la producción de las fumonisinas cuando se limita el nitrógeno.

Las interacciones entre hifas de hongos que cohabitan en un mismo sustrato o entre hongos y bacterias ocurren inevitablemente. Estas interacciones pueden ser intra e inter-específicas. Las interacciones de hongos entre sí, y con el resto de la microbiota del grano pueden tener un profundo efecto en el crecimiento y en la capacidad de las especies fúngicas para producir toxinas (Cuero *et al.*, 1987) debido a la competitividad que se establece especialmente por los nutrientes disponibles del medio (Wicklow *et al.*, 1980). Por ejemplo en estudios sobre las especies que colonizan los granos de maíz y sus interacciones, se ha observado que *F. proliferatum* y *F. verticillioides* reducen la tasa de crecimiento en presencia de *F. graminearum* (Marín *et al.*, 1998; Velluti *et al.*, 2000). De manera similar, la producción de fumonisinas se inhibe en ambas especies cuando interactúan con *F. graminearum* (Velluti *et al.*, 2000).

Los insectos causan importantes deterioros del grano antes, durante y después de la cosecha, ya que producen un daño mecánico alterando la integridad de la cubierta de la semilla, pero además también interactúan con la microbiota presente en el grano de diferentes formas: producen un calentamiento y liberación de agua debido a su actividad metabólica y respiración, y como consecuencia crean un ambiente propicio para el crecimiento fúngico (Sinha y Wallace, 1966). Además pueden actuar como vectores de la infección transportando esporas fúngicas en pelos, boca, intestino, ya que algunas larvas de estos insectos se desarrollan en el interior del grano afectado (Dunkel, 1988).

Existen hospederos más susceptibles que otros a la colonización por las especies fúngicas y por tanto a la producción de las micotoxinas. En muchos casos, la resistencia de un hospedero a ser infectado, dependerá de la población de especies o de la comunidad de especies fúngicas que se desarrolla sobre él (Xu *et al.*, 2008), además se sugiere que cultivares de diferentes zonas geográficas responden de



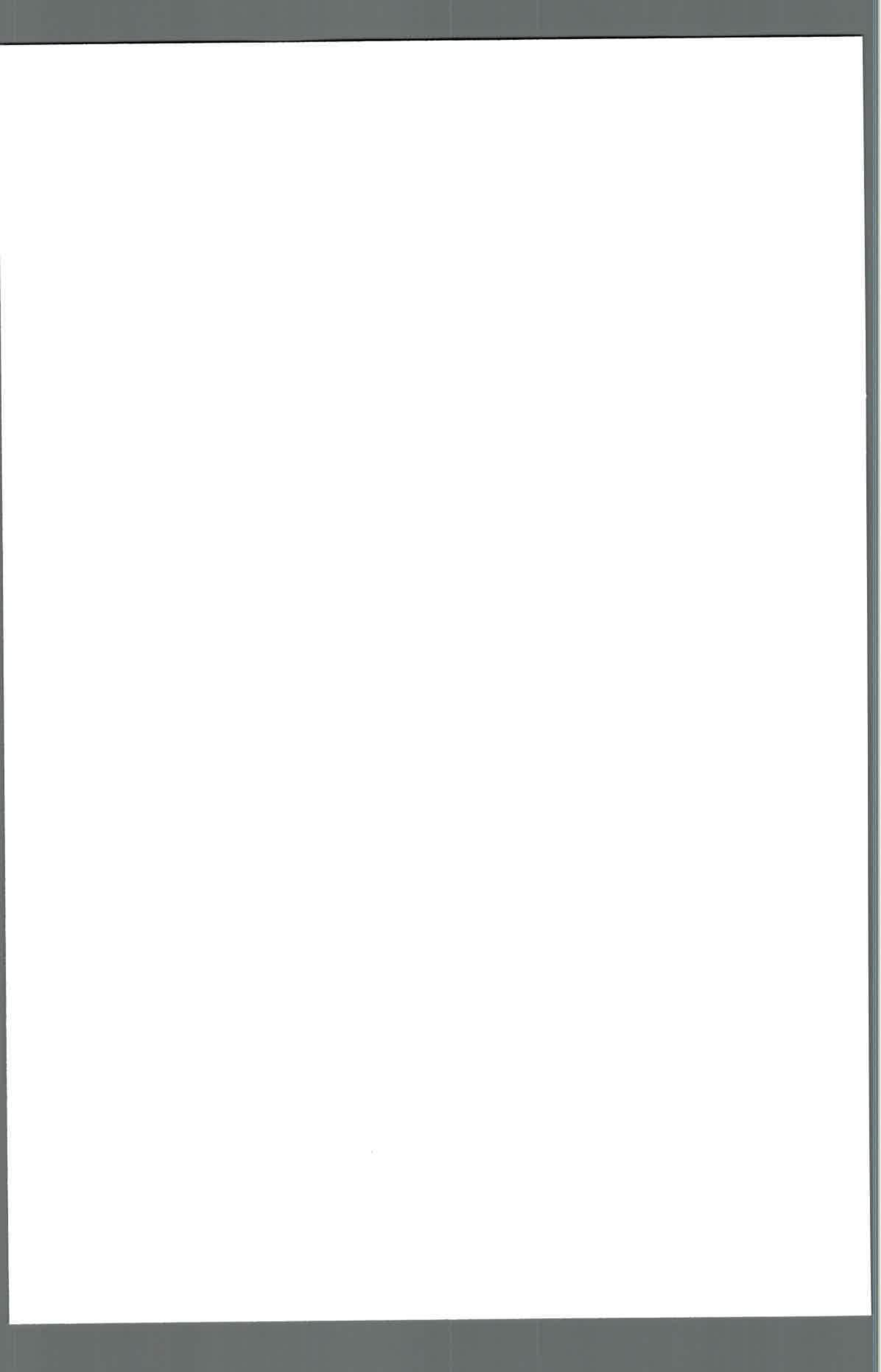
manera distinta a la agresión, debido a que las condiciones ambientales a las que están sometidos son diferentes (Reynoso *et al.*, 2009).

1.6. Prevención y control de la contaminación de cereales con hongos y toxinas

La contaminación de los cereales con especies micotoxicogénicas es un problema que ocasiona pérdidas en la agricultura, en la industria, en la ganadería, y en la salud pública, debido al consumo de alimentos potencialmente contaminados por parte de la población humana y animal. En la actualidad no es factible eliminar por completo los productos contaminados por micotoxinas, por lo que se tiende a prevenir su presencia en los sustratos, de hecho el CODEX alimentarius posee un apartado: "Código de prácticas para prevenir y reducir la contaminación de los cereales por micotoxinas". En el mismo se establecen buenas prácticas agrícolas y buenas prácticas de fabricación de los alimentos, a los fines de evitar la contaminación de los granos y alimentos con micotoxinas (CODEX, 2003).

Por este motivo, estudiar las condiciones ambientales que permiten el crecimiento fúngico, nos permite conocer los parámetros óptimos para el crecimiento y la producción de toxinas, de manera tal de predecir el riesgo potencial que tiene un determinado cultivo de estar contaminado con un determinado hongo o con su toxina. Para llevar a cabo esto, es imprescindible poseer información de numerosos aspectos relacionados entre sí, que incluyen el conocimiento de los factores ecofisiológicos que condicionan el crecimiento de los hongos y la producción de las micotoxinas, el desarrollo de estudios epidemiológicos para conocer las especies fúngicas asociadas a una zona geográfica y a un hospedador, como así también el estudio de la estructura de las poblaciones y la variabilidad inter o intra-específica, que es la base para el desarrollo de métodos de diagnóstico adecuados y eficaces (Marín, 2010).

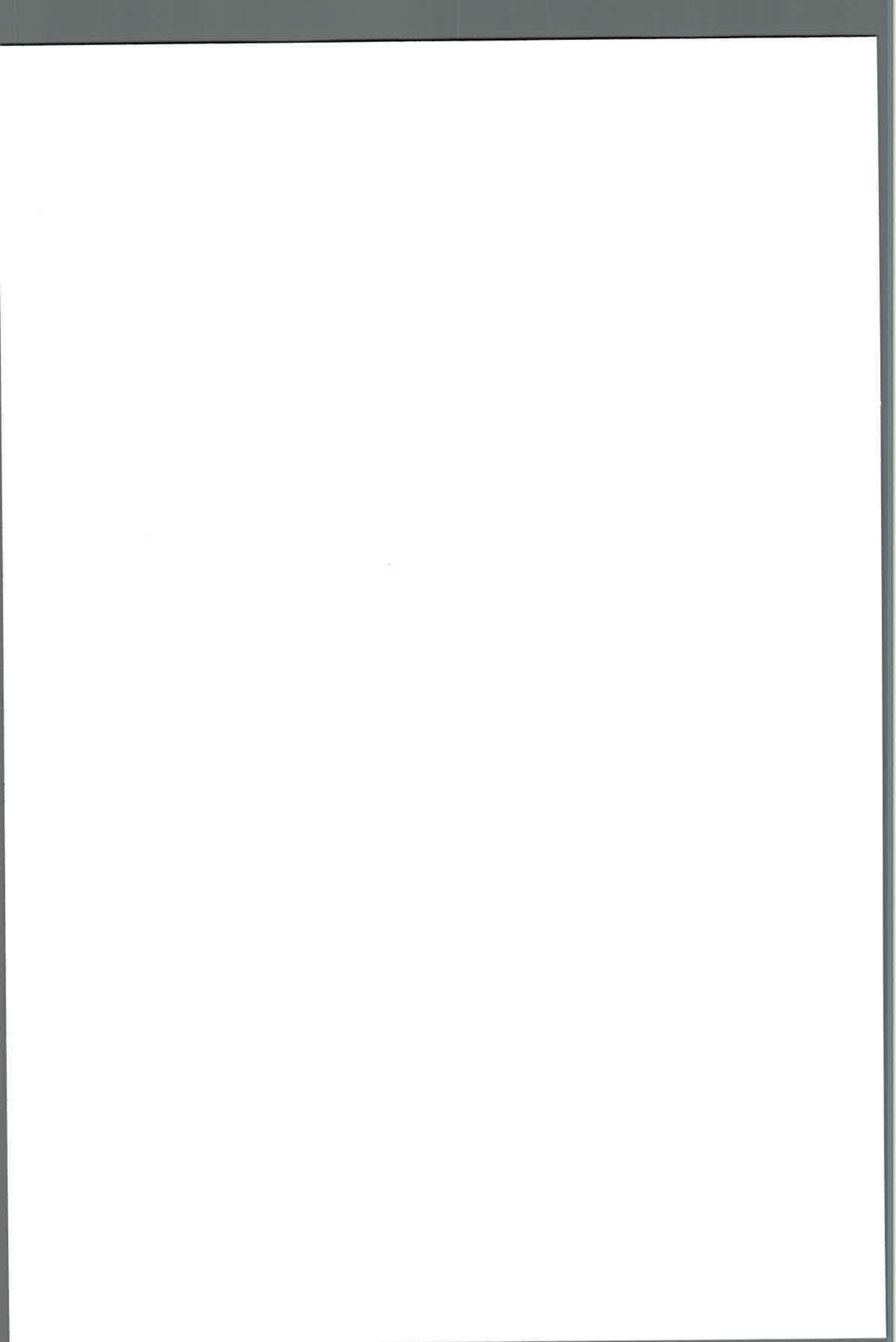
Los puntos más importantes para evitar la formación de las micotoxinas en el género *Fusarium* son: pre-cosecha y cosecha (Marín *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2004a). Entre las estrategias de prevención a campo se destacan la rotación de los cultivos, la selección de variedades resistentes al patógeno micotoxicogénico (Muehlbauer y Bushnell, 2003) y el control biológico (Khan *et al.*, 2004). Para inhibir el crecimiento fúngico pueden también utilizarse fungicidas, sin dejar de considerar que dosis subletales pueden inducir la síntesis de micotoxinas (Milus y Parson, 1994; D'Mello *et al.*, 1998; Ramirez *et al.*, 2004a; Magan, 2006; Schmidt-Heydt *et al.*, 2008). La cosecha debe ser realizada cuando el grano esté suficientemente seco, y en el almacenamiento es especialmente importante controlar las condiciones de



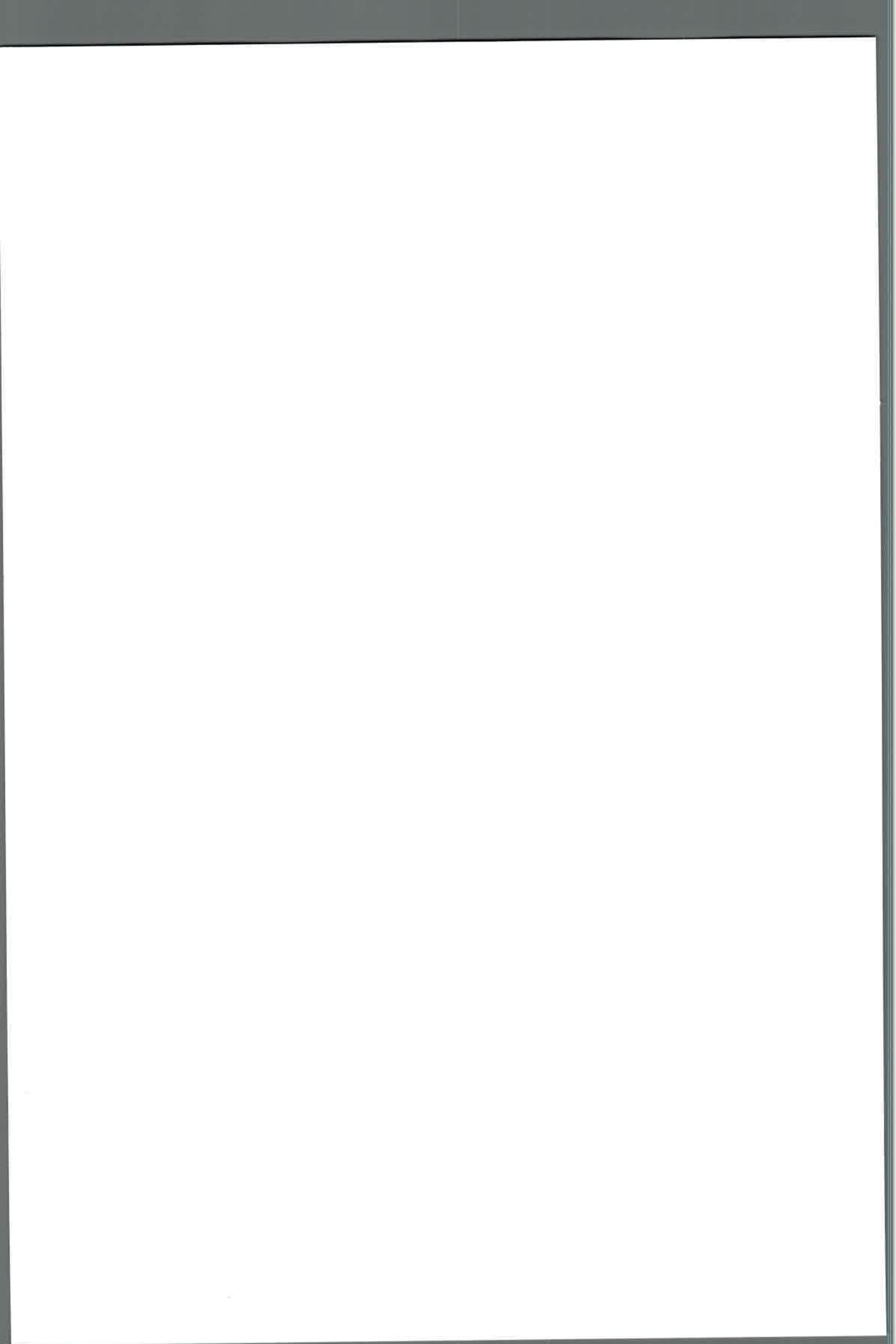
temperatura, humedad y aireación y también resulta importante controlar la presencia de insectos (Aldred y Magan, 2004).

Como las medidas son tendientes a la prevención, resulta entonces aconsejable la detección temprana de las especies micotoxicogénicas de *Fusarium*, y el conocimiento de los factores ecofisiológicos que determinan su crecimiento y la producción de las toxinas sobre cada sustrato en particular. En los últimos años, muchos estudios han resaltado el impacto de diversas condiciones de estrés en la producción de micotoxinas (Schmidt-Heydt y Geisen, 2007a,b; Jurado *et al.*, 2008; Schmidt-Heydt *et al.*, 2008). Estos estudios han utilizado (RT)-PCR y ensayos basados en microarrays, que permiten una rápida y correcta cuantificación del efecto de factores y tratamientos en la biosíntesis de micotoxinas, reduciendo el tiempo de incubación necesario para que la toxina se acumule hasta niveles detectables por métodos analíticos. Estos métodos moleculares, se basan en la expresión de los genes *FUM* y en sus homólogos (en especies en las que aún no se ha secuenciado completamente su genoma). Así, por ejemplo, se ha demostrado correlación positiva entre la cantidad de fumonisina producida en *F. verticillioides* y los niveles de expresión del gen *FUM1* (López-Errasquín *et al.*, 2007). De esta manera, esta técnica permite estudiar los niveles de expresión de los principales genes de la ruta biosintética de las toxinas, y así analizar la capacidad productora de una especie.

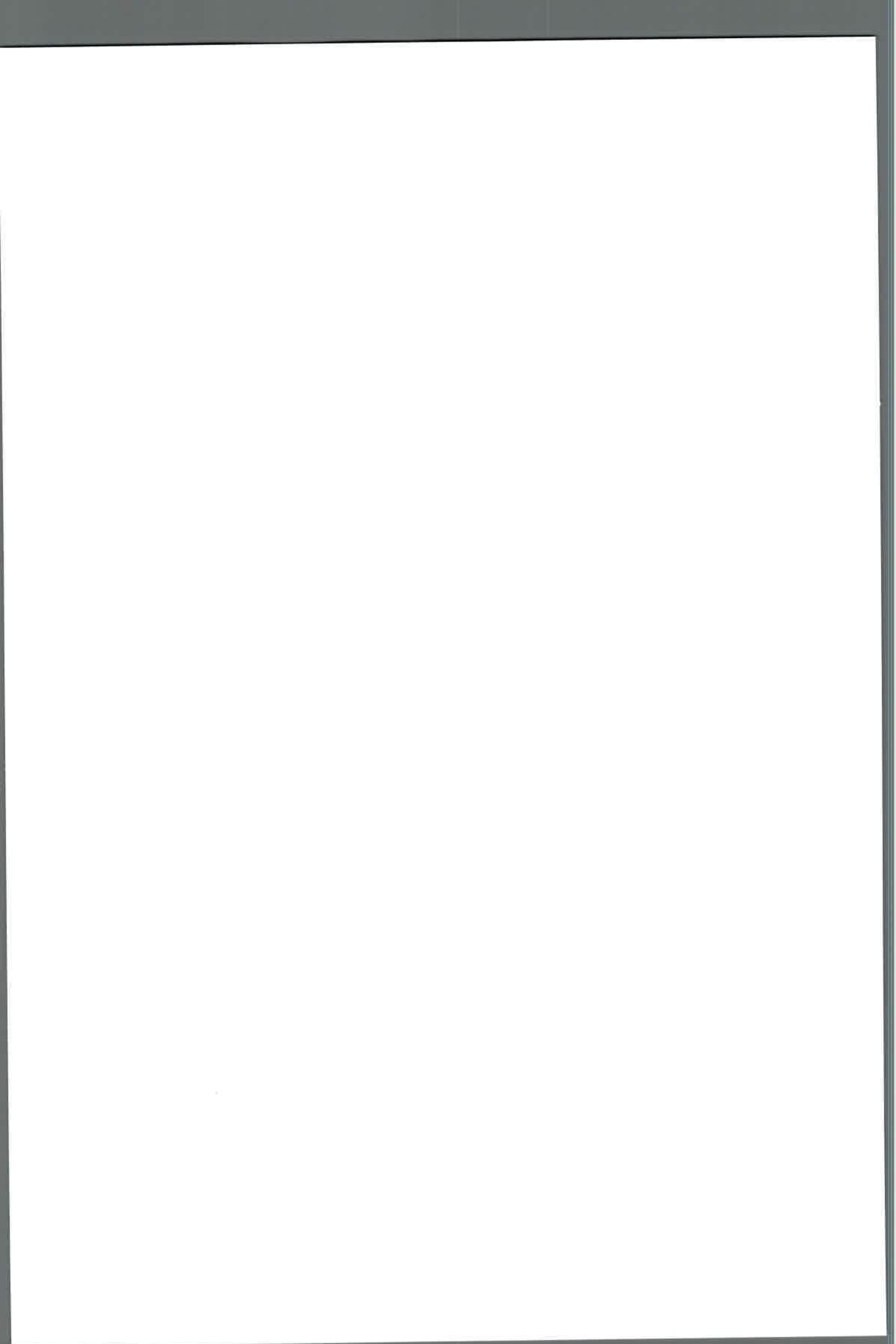
Teniendo en cuenta la importancia del trigo en la dieta de la población argentina y los datos anteriormente expuestos acerca de la posible contaminación de este sustrato con fumonisinas, en el siguiente trabajo de tesis se muestran, por un lado los resultados obtenidos del análisis de incidencia de fumonisinas en trigo común, trigo duro, y subproductos; y por otro lado, los resultados de ensayos ecofisiológicos utilizando cepas de *F. proliferatum* aisladas de granos de trigo (realizado en un medio de cultivo a base de trigo y en granos de trigo irradiados) a los fines de conocer bajo qué condiciones de temperatura y disponibilidad de agua (a_w) tres cepas de *F. proliferatum* productoras de fumonisinas, podrían ser capaces de crecer y de producir niveles de toxina detectables. Dado que las especies de *Fusarium* pueden permanecer en un sustrato por largos periodos de tiempo en los que la a_w podría cambiar, incluso, en el campo, las fluctuaciones de temperatura, los cambios en la humedad relativa, y las lluvias, podrían influenciar la colonización durante el desarrollo del grano por *F. proliferatum*. También se proporcionan resultados obtenidos de un análisis de expresión relativa de los genes *FUM8* y *FUM19* de las mismas cepas analizadas en los ensayos ecofisiológicos bajo diferentes condiciones de temperaturas y a_w , y utilizando un medio de cultivo a base de trigo. Así, este estudio en su conjunto



proporciona información que será útil para considerar posibles factores de riesgo relacionados a la contaminación de trigo con fumonisinas en el campo, durante la cosecha y el almacenamiento, y de este modo se puedan tomar medidas preventivas.



CAPÍTULO II.

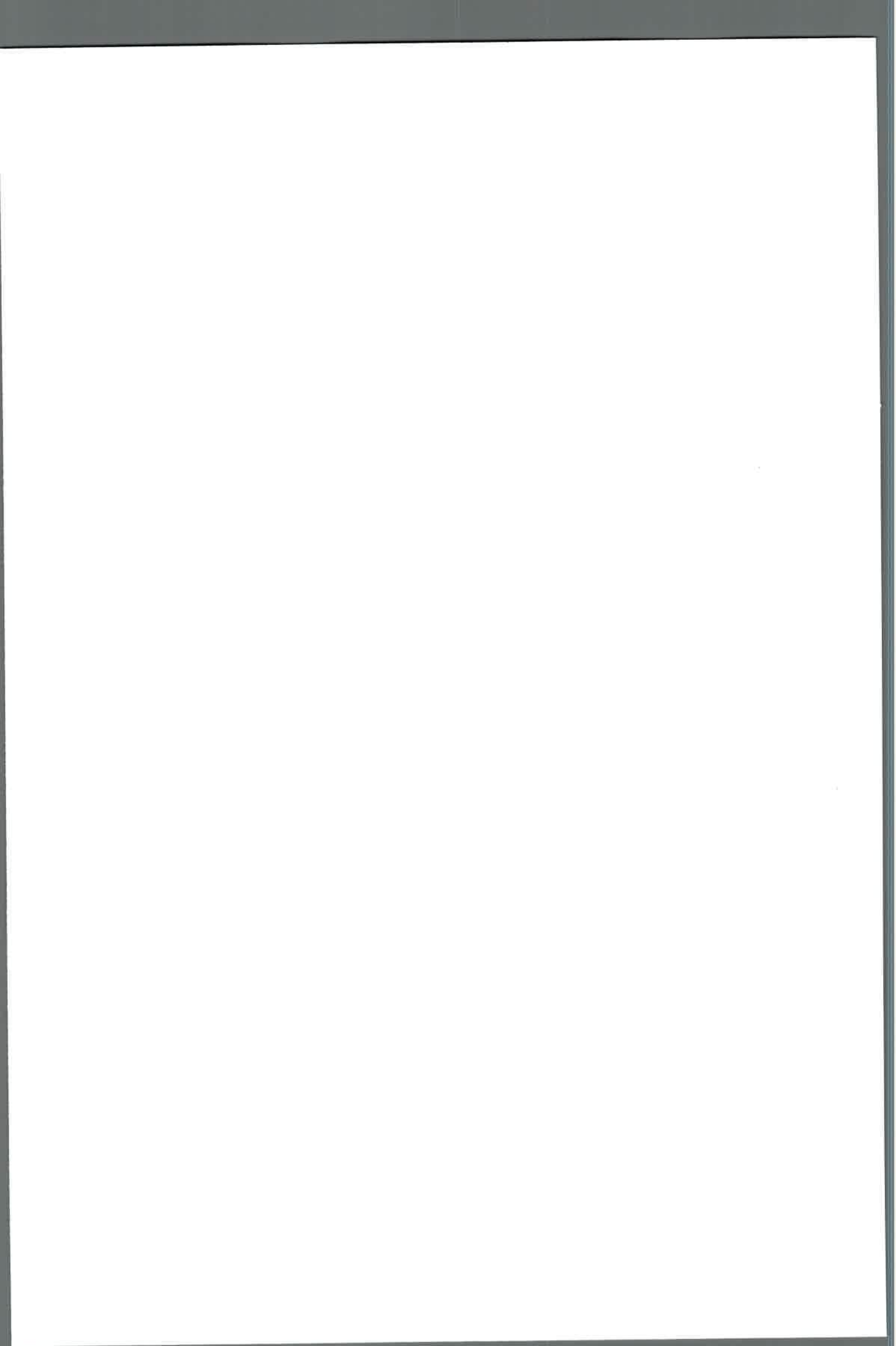


CAPÍTULO II. INCIDENCIA NATURAL DE FUMONISINAS EN TRIGO Y SUB-PRODUCTOS

II. Introducción

Actualmente las exigencias internacionales en materia alimentaria son cada vez mayores, las legislaciones de algunos países desarrollados establecen parámetros más estrictos en procura de ejecutar políticas que aseguren un elevado nivel de protección de la vida y salud de las personas asegurando el consumo de alimentos de calidad e inocuos. Estas exigencias se basan, principalmente, en factores higiénico-sanitarios, como es el caso de la presencia de micotoxinas. La ingestión de alimentos que contengan estas sustancias, entre ellas las fumonisinas, puede generar diversos efectos adversos sobre la salud humana y animal, dependiendo de las dosis ingeridas y las condiciones propias de los individuos. Numerosas especies dentro del género *Fusarium* son capaces de producir fumonisinas, siendo las más importantes *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, especies comúnmente asociadas a maíz, pero que también han sido aisladas de otros sustratos como trigo. Las fumonisinas se encuentran ampliamente distribuidas a nivel mundial y su incidencia natural ha sido casi exclusivamente estudiada en maíz y productos a base de maíz. En los últimos años se han publicado trabajos acerca de la incidencia natural de fumonisinas en trigo, productos derivados de trigo (ej. semolina, harina), pan, etc. (Roscoe *et al.*, 2008; Palacios *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012; Rubert *et al.*, 2013; Cendoya *et al.*, 2014b; Mendes *et al.*, 2015). Shephard *et al.* (2005) hicieron una recopilación y re-análisis de varios reportes sobre la incidencia natural de fumonisinas en trigo. Estos autores afirmaron que la mayoría de los estudios mostraban resultados falsos positivos, y concluyeron que se necesitaba una cuidadosa evaluación de los métodos analíticos usados y las posibles fuentes de contaminación, además de la confirmación a través de métodos apropiados y validados, para evitar información errónea.

En nuestro país el consumo por parte de la población de productos manufacturados con trigo duro (*Triticum turgidum* L. var. durum) o trigo pan (*Triticum aestivum*), es mayor que el consumo de aquellos productos elaborados a base de otros cereales (Pacin *et al.*, 2010; Food Balance Sheet, 2007). Se puede encontrar en la literatura trabajos que han detectado en los últimos años bajos niveles de contaminación con fumonisinas en granos de trigo y alimentos a base de trigo en diferentes países del mundo (Cirillo *et al.*, 2003b; Roscoe *et al.*, 2008; Chehri *et al.*, 2010; Jakšić *et al.*, 2012; Busman *et al.*, 2012), incluido Argentina en donde se detectó por primera vez en muestras de trigo duro del año 2007 (Palacios *et al.*, 2011).



Considerando las cifras de producción y consumo de trigo en Argentina, asumiendo que éste es un cereal de importancia en la dieta de la población, y teniendo en cuenta que ha sido propuesto en Holanda que el consumo de fumonisinas ocurre principalmente a través del consumo de trigo y sub-productos (Bakker *et al.*, 2003), se consideró interesante analizar la presencia de las mismas en granos de este cereal en Argentina, como así también en productos derivados del mismo.

Hay evidencias que sugieren que las micotoxinas podrían tener efectos sinérgicos cuando co-ocurren en un substrato (Javed *et al.*, 1993). La detección simultánea de múltiples toxinas en cereales resulta útil para evaluar de una mejor manera el riesgo a la salud humana y animal (Cirillo *et al.*, 2003a). Como existen pocos datos en la bibliografía acerca de la co-ocurrencia de fumonisinas con otras toxinas en trigo, en este trabajo se incluye un análisis de co-ocurrencia de fumonisinas y deoxinivalenol (DON).

II. Hipótesis

El trigo duro y el trigo pan son susceptibles a la contaminación con especies de *Fusarium* pertenecientes al Complejo de Especies *Fusarium fujikuroi*, y por lo tanto este cereal y sus productos derivados presentan contaminación con fumonisinas.

II. Objetivo general

Analizar la incidencia de fumonisinas en trigo y subproductos, y la co-ocurrencia con deoxinivalenol.

II. Objetivos específicos

1. Determinar la incidencia natural de fumonisinas en trigo duro y trigo pan.
2. Analizar la incidencia natural de deoxinivalenol en granos de trigo duro y trigo pan contaminadas o no con fumonisinas.
3. Determinar la incidencia natural de fumonisinas en productos derivados de trigo destinados al consumo humano.

II. Materiales y métodos

II.1. Determinación de la incidencia natural de fumonisinas en trigo duro y trigo pan

II.1.1. Muestreo

Se recolectaron 135 muestras de trigo común (trigo pan) correspondientes a la cosecha argentina de trigo 2011 de 6 compañías acopiadoras localizadas en: Junín,

Bragado, Casares, Baigorrita, 9 de Julio y Alberti (Figura 1), ubicadas en la provincia de Buenos Aires, la cual se caracteriza por ser la principal área de producción triguera nacional. Las muestras fueron tomadas de los camiones (25-30 toneladas de capacidad) al arribo a la planta con un calador hidráulico (de 2,5 m de profundidad), realizando 6 calados en el acoplado de manera tal de obtener una muestra agregada de 10 kg de semillas al azar. Cada muestra fue dividida por cuarteo hasta la obtención de una submuestra de 1 Kg. Las submuestras de 1 Kg se llevaron al laboratorio en donde fueron finamente molidas utilizando un molino Romer (Romer, Union, MO, USA), debidamente homogenizadas, y guardadas en bolsas en oscuridad a 4 °C hasta el momento del análisis. Por otro lado, 40 muestras de trigo duro (500 g) fueron recolectadas aleatoriamente durante la cosecha 2011 en 5 campos diferentes localizados en el sur de la provincia de Buenos Aires, la zona de mayor área de producción de trigo duro en Argentina (Figura 1). Las muestras fueron recolectadas de cada campo y mezcladas; de este *pool* se tomaron sub-muestras (500 g), las cuales fueron inmediatamente almacenadas a 4 °C hasta el correspondiente análisis. Todas las muestras de trigo, tanto de trigo duro como de trigo común, no presentaban daño visible.

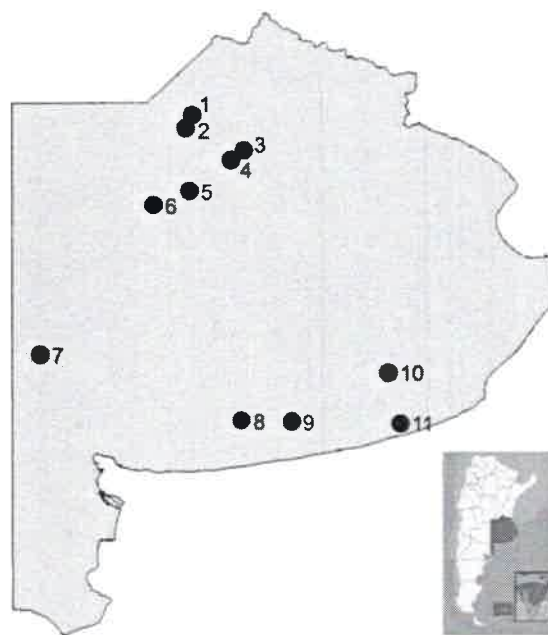


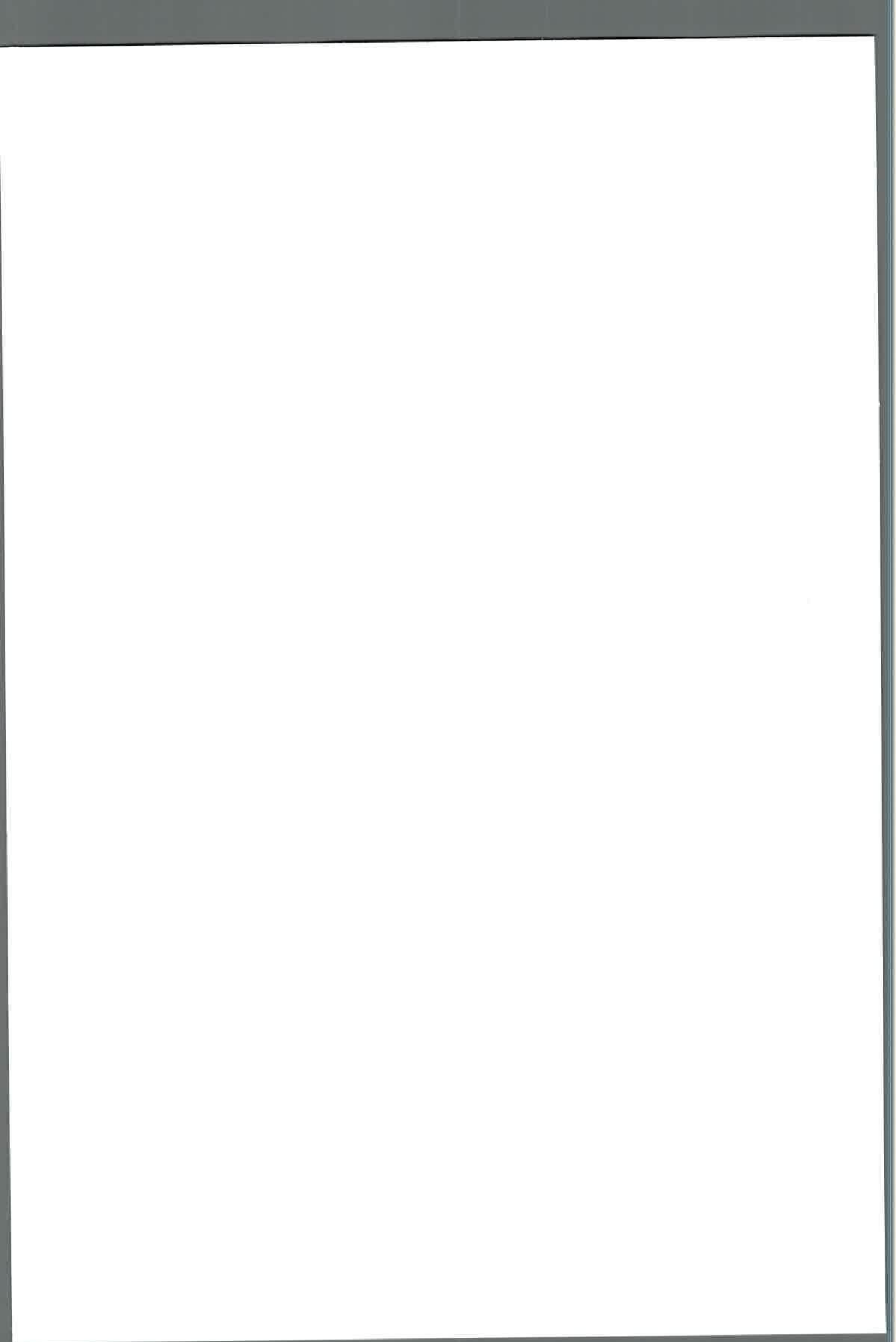
Figura 1. Mapa indicando la localización de las 6 compañías acopiadoras de las cuales se obtuvieron las muestras de trigo común (1 a 6), y la localización de los 5 campos comerciales de los cuales se obtuvieron las muestras de trigo duro (7 a 11). 1. Junín; 2. Baigorrita; 3. Alberti; 4. Bragado; 5. 9 de Julio; 6. Casares; 7. Bordenave; 8. Barrow; 9. La Dulce; 10. Balcarce; 11. Miramar.

II.1.2. Extracción de fumonisinas de trigo

Para la extracción de las fumonisinas se siguió la metodología propuesta por Shephard *et al.* (1990) y modificada por Doko *et al.* (1995). A partir de 25 g de cada muestra previamente molida, se extrajeron las toxinas con 50 mL de metanol-agua (3:1). El extracto se agitó durante 30 minutos en agitador rotatorio, y luego se filtró a través de papel filtro (Whatman N° 4). El filtrado (10 mL) se pasó a través de una columna SAX (Bond Elut strong anion-exchange) previamente acondicionada por el pasaje sucesivo de metanol (5 mL) y metanol-agua (3:1, 5 mL). La columna luego fue lavada con metanol-agua (3:1, 8 mL) seguido de metanol (3 mL). Las fumonisinas fueron eluidas con una solución de ácido acético al 0,5% en metanol (14 mL) y posteriormente se evaporaron a sequedad a 40 °C bajo un flujo de nitrógeno. Los extractos secos se guardaron a 4 °C hasta el momento del análisis por HPLC-MS/MS.

II.1.3. Análisis de fumonisinas mediante HPLC-MS/MS

Los análisis fueron realizados en HPLC-MS/MS Waters Alliance 2695 (Waters Corporation, Milford, MA, USA) equipado con una bomba Waters Alliance 2685, un autoinyector Waters Alliance 2695, un detector de arreglo de diodos Waters 2996 PDA acoplado a un espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolos en tándem (Quattro Ultima Platinum) con fuente de electro spray ionización (ESI). La columna utilizada fue una A XBridge™ C18 3,5 µm (2,1x150 mm) con precolumna. La interfase se trabajó en modo de ionización electrospray positiva. Como gas de nebulización y de desolvatación se utilizó nitrógeno calentado a temperaturas de 150 y 200 °C, respectivamente. El voltaje del capilar fue de 3,00 kV. El flujo de nitrógeno se ajustó a 109 L/h y 726 L/h para los gases de cono y desolvatación, respectivamente. Para la determinación de fumonisinas se utilizó el método de monitoreo de reacciones múltiples (MRM). Se obtuvieron los cromatogramas correspondientes a las trazas de las transiciones del ión precursor de FB $[M+H]^+$ a dos iones productos o hijas para dar cumplimiento a criterios cualitativos y cuantitativos. La adquisición de los datos y el procesamiento de los mismos se realizaron mediante un software Mass Lynx V.4.1 – Copyright 2005, Waters INC. Se desarrolló un procedimiento cromatográfico isocrático con 5 mM de acetato de amonio en metanol:agua:ácido acético (39,5:59,5:1 v/v) como fase móvil. El flujo fue de 0,18 mL/minuto. La temperatura de la columna se mantuvo a 35 °C. Se analizaron extractos blanco de matriz, de modo tal de confirmar que no haya interferencias espectrométricas que provengan de la matriz. Se inyectaron alícuotas de 45 µL de los extractos de las muestras en la unidad HPLC. Se tuvieron en cuenta cuatro puntos para la identificación de las fumonisinas: el tiempo de retención, el ion precursor $[M + H]^+$ y los dos iones productos. Se realizó una curva de calibración inyectando 10 µL



de diferentes soluciones estándar con mezclas de FB₁ y FB₂ (0,25; 0,5; 1,0; y 2,0 µg/mL) obteniéndose una buena linealidad con un coeficiente de correlación mayor a 0,996 para el rango de calibración. El límite de detección (LD), basados en la relación señal-ruido (3:1) y cuantificación (LC), basados en la relación señal-ruido (5:1) del instrumental para FB₁ y FB₂ fueron de 0,01 ng/g y 0,05 ng/g, respectivamente y la relación de desvíos estándar durante un día y entre días (% RSD) fue de 6,5. Para la cuantificación de FB₁ se utilizó la traza m/z 722 > 352, mientras que para la identificación de FB₂ y FB₃ se utilizó la traza 706 > 336.

El pico precursor [M + H]⁺ y dos picos productos, los tiempos de retención y la configuración del detector, se muestran en la tabla 1. Se realizó un experimento de recuperación por triplicado, contaminando 25 g de muestras de trigo molido libres de fumonisinas con FB₁ y FB₂ a niveles de 10, 100, y 200 ng/g. Las muestras contaminadas se dejaron durante toda la noche a temperatura ambiente para permitir la evaporación del solvente antes de proceder con el paso de extracción. Las medias de las recuperaciones para FB₁ y FB₂ fueron 98,98% y 94,9%, respectivamente.

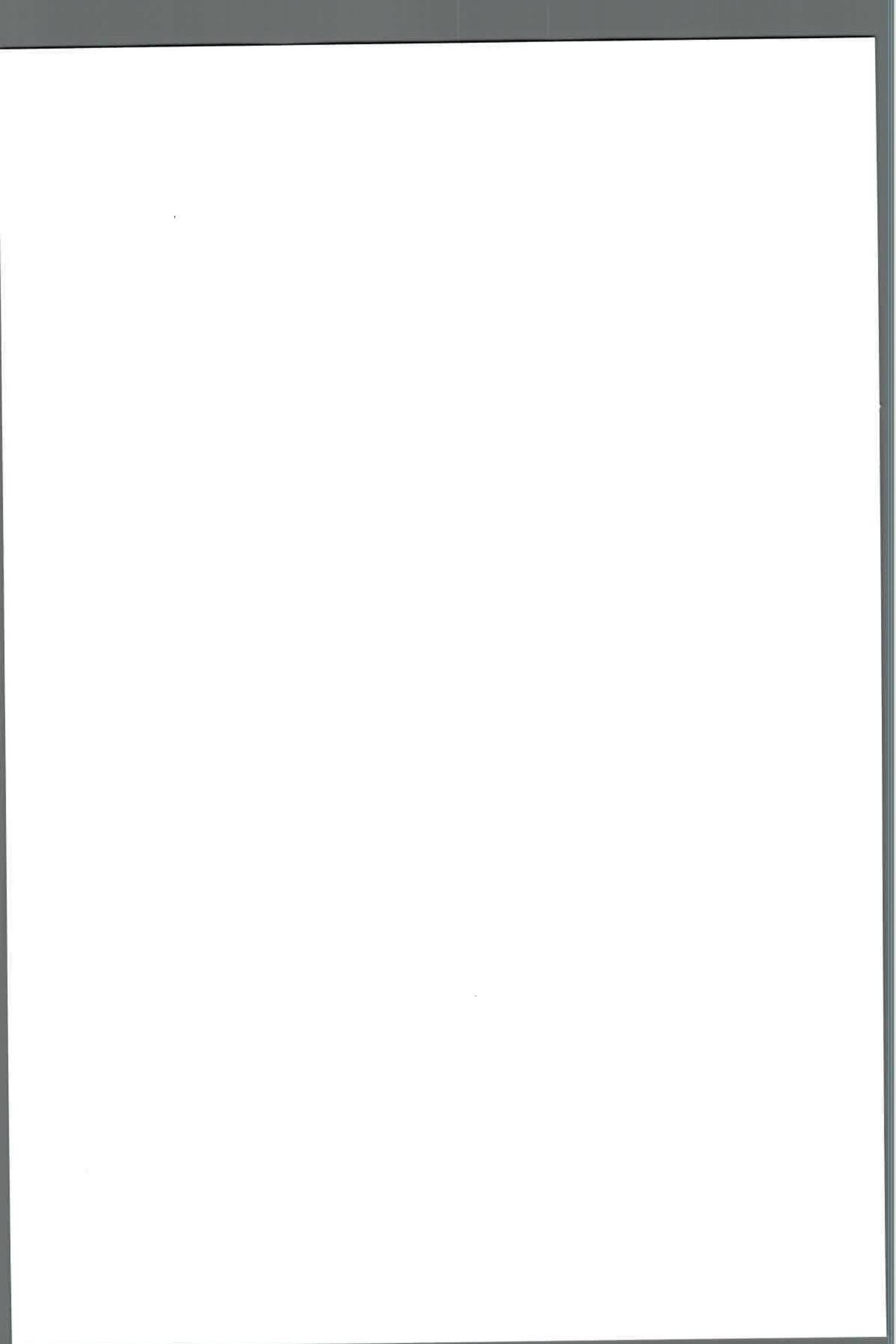
Tabla 1. Parámetros utilizados para analizar fumonisinas mediante HPLC-MS/MS

Compuesto	[M+H] ⁺	t _R / min	Productos (m/z)	CV (V)	CE (V)
FB ₁	722	5,4	334	91	57
			352		55
FB ₂	706.3	17,6	318,5	96	51
			336,3		59
FB ₃	706.3	9,3	318,5	96	51
			336,3		59

[M + H]⁺, ion precursor; t_R, tiempo de retención; Productos, (m/z); CV (V), voltaje de cono; CE (V), energía de colisión.

II.1.4. Análisis estadístico

Para determinar diferencias en el contenido de fumonisinas en relación al tipo de trigo y a la localización geográfica, se realizó un análisis de coeficiente de correlación de Pearson. Se utilizó el programa SigmaStat para Windows versión 2.03 (SPSS Inc.). El nivel estadístico de significancia fue determinado con un $p < 0,05$.



II.2. Determinación de la incidencia natural de deoxinivalenol en trigo duro y trigo pan

II.2.1. Muestreo

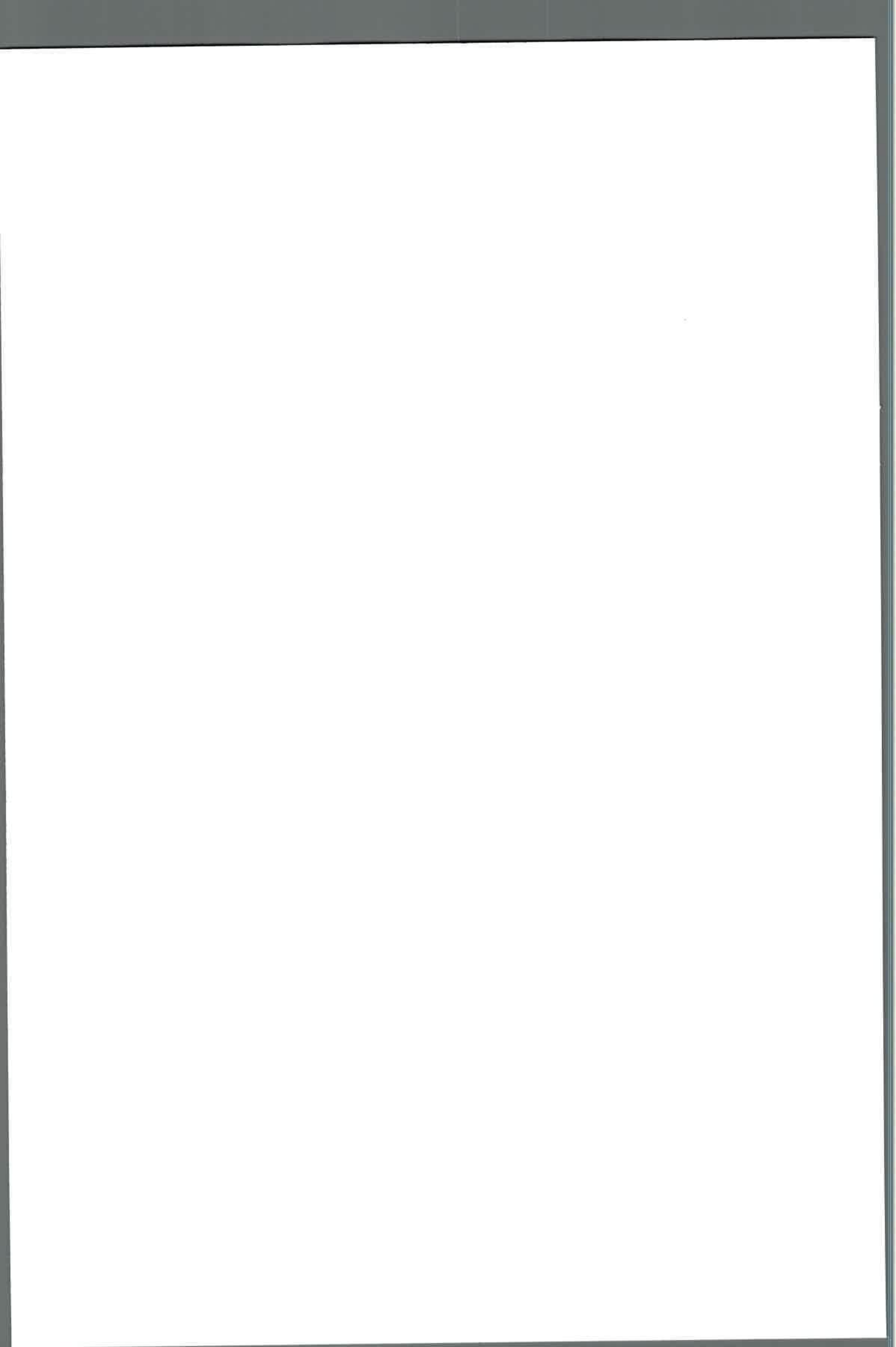
Del total de muestras analizadas para el contenido de fumonisinas, veinticinco fueron seleccionadas (15 muestras de trigo común y 10 muestras de trigo duro) para analizar el contenido de DON. Se utilizó como criterio de selección diferentes niveles en el contenido de fumonisinas.

II.2.2. Extracción de deoxinivalenol

Para la extracción y detección de DON se utilizó la metodología propuesta por AOAC (1995). Cada muestra fue finamente molida y homogeneizada. Una submuestra (25 g) fue extraída con 100 mL de una mezcla de acetonitrilo:agua (84:16) y colocada en agitador rotatorio (120 rpm) por 30 minutos. Posteriormente el extracto se filtró a través de papel de filtro (Whatman N° 4) y 8 mL del filtrado se pasaron por una columna de limpieza Mycosep 227 (Laboratorios Romer, USA). Se recolectaron 4 mL del extracto a partir de la columna y se evaporaron a sequedad bajo un flujo de nitrógeno. Dichos extractos secos se conservaron a 4 °C hasta el análisis por HPLC.

II.2.3. Análisis de deoxinivalenol mediante HPLC

Para el análisis de los extractos por HPLC-UV los mismos se resuspendieron en 400 µL de metanol:agua (12:88). El sistema HPLC consistió en una bomba Hewlett Packard 1100 (Palo Alto, CA), conectada a un detector UV Hewlett Packard serie 1100. La cuantificación se realizó por medio de una estación de trabajo Hewlett Packard. La separación se realizó en una columna de fase reversa C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm de tamaño de partícula, Luna-Phenomenex), conectada a una pre-columna Supelguard LC-ABZ (20 x 4,6 mm, 5 µm de tamaño de partícula, Supelco). Para realizar la curva de calibración se utilizaron soluciones estándar de DON de 0,5; 1,0; 2,0 y 4,0 µg/mL, las cuales fueron preparadas diluyendo cantidades adecuadas de una solución stock de DON en metanol, previamente evaporada hasta la sequedad y resuspendida en metanol:agua (95:5). Estas soluciones siempre se conservaron a -20 °C. La fase móvil consistió en una mezcla de metanol:agua 12:88 v/v a un flujo de 1,5 mL/min. La detección se realizó a 220 nm con una atenuación de 0,01 AUFS. El volumen inyectado fue de 50 µL, y el tiempo de retención promedio fue de 10 min. El límite de detección (LD) de la técnica fue de 50 ppb (µg/kg).



Se realizó un experimento de recuperación por triplicado contaminando muestras de grano de trigo molidos (25 g), libres de contaminación con DON, en los siguientes niveles de concentración: 500, 1000 y 1500 ng/g. Las muestras enriquecidas se dejaron reposar bajo campana extractora toda la noche con el objeto de permitir la evaporación del solvente previo a su extracción. El recuperado medio para DON fue del 88,5%.

II.2.4. Análisis estadístico

Para determinar si había correlación entre el contenido de fumonisinas y el de DON se calculó el coeficiente de correlación de Pearson. Este análisis estadístico se realizó utilizando el programa SigmaStat para Windows versión 2.03 (SPSS Inc.). El nivel estadístico de significancia fue determinado con un $p < 0,05$.

II.3. Determinación de la incidencia natural de fumonisinas en productos derivados de trigo para consumo humano

II.3.1. Muestreo

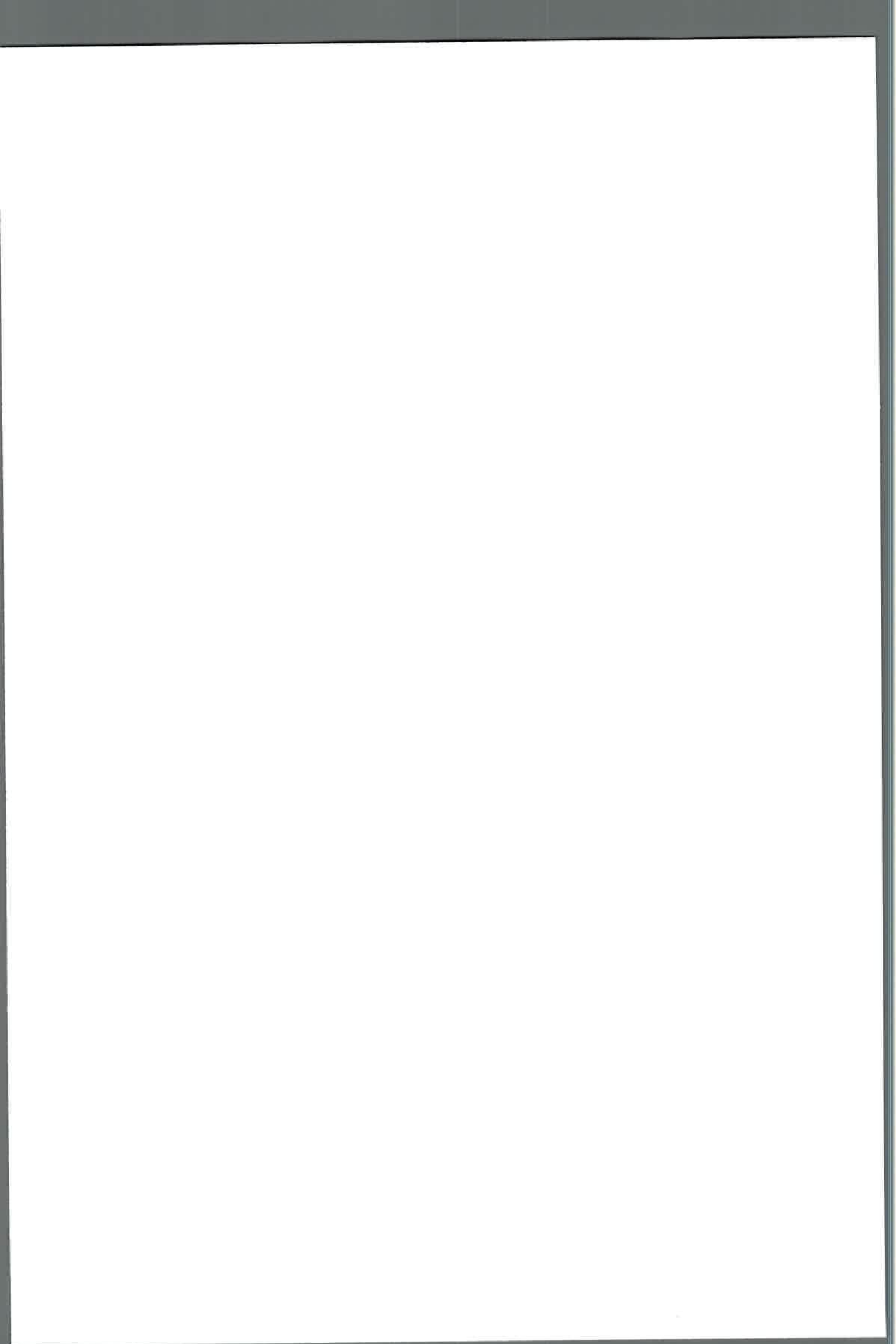
Se recolectaron 46 muestras de productos derivados de trigo (harina 000, harina 0000, harina leudante, harina integral, salvado, sémola, y distintas pre-mezclas para productos de panificación) en distintos supermercados de la ciudad de Río Cuarto. Cada muestra fue llevada al laboratorio en donde fueron debidamente homogenizadas, y guardadas en la oscuridad a 4 °C hasta el momento del análisis.

II.3.2. Extracción de fumonisinas

Para la extracción de las fumonisinas se siguió la metodología propuesta por Shephard *et al.* (1990) y modificada por Doko *et al.* (1995) a partir de 25 g de cada muestra como fue descrito en el punto II.1.2.

II.3.3. Análisis de fumonisinas mediante HPLC-MS/MS

La detección y cuantificación de fumonisinas fue realizada en HPLC-MS/MS de la misma manera en que fue descrito en el punto II.1.3. Para este análisis se realizó un experimento de recuperación por triplicado contaminando 25 g de una muestra de harina de trigo con FB₁ y FB₂ a niveles de 10, 100, y 200 ng/g. Las muestras contaminadas se dejaron durante toda la noche a temperatura ambiente para permitir la evaporación del solvente antes de proceder con el paso de extracción. Las medias de las recuperaciones para FB₁ y FB₂ fueron 99,85% y 93,6%, respectivamente. Cabe aclarar que para el resto de las muestras de subproductos no se realizó análisis de recuperación por no poseer un



amplio número de las mismas, el análisis de recuperación debería realizarse para cada tipo de muestra que se decida analizar.

II.3.4. Análisis estadístico

Para determinar diferencias entre el contenido de fumonisinas en relación al tipo de harina de trigo (harina 000, y harina 0000), se realizó un análisis de varianza (ANOVA). Este análisis estadístico se realizó utilizando el programa SigmaStat para Windows versión 2.03 (SPSS Inc.). El nivel estadístico de significancia fue determinado con un $p < 0,05$.

II. Resultados y discusión

En el estudio de incidencia natural de fumonisinas en granos de trigo duro y común, pudo observarse contaminación con esta toxina en el 93% del total de muestras analizadas (162/175). Los niveles de fumonisinas totales encontrados ($FB_1 + FB_2 + FB_3$) variaron desde 0,15 hasta 1304,39 ng/g. Ciento treinta y un muestras de un total de 135 muestras de trigo común, y 31 muestras de un total de 40 muestras de trigo duro estaban contaminadas con fumonisinas. Fumonisina B_1 estuvo presente en todas las muestras positivas, siendo esta micotoxina la más abundante (alta relación FB_1/FB_2). Como se muestra en la tabla 2 la mayoría de las muestras de trigo común y de trigo duro analizadas contenían ambas fumonisinas B_1 y B_2 (51 y 55%, respectivamente), mientras que el 36% de las muestras de trigo común contenían solo FB_1 , y el 13% FB_1 , FB_2 y FB_3 . En la misma tabla también se observa que esta relación se invierte en las muestras de trigo duro, en donde el 29% de las muestras tenían FB_1 , FB_2 y FB_3 , y el 16% solo FB_1 .

Tabla 2. Porcentajes de muestras de trigo duro y común contaminadas con FB_1 ; FB_1 y FB_2 ; y FB_1 , FB_2 y FB_3

Fumonisinas	Trigo	
	Común	Duro
FB_1	36%	16%
FB_1, FB_2	51%	55%
FB_1, FB_2, FB_3	13%	29%

En todas las muestras analizadas tanto de trigo común como de trigo duro el porcentaje de incidencia de FB_1 fue mayor que el de FB_2 , como también el grado de

contaminación. Los niveles medios de FB₁ fueron 10 y 8 veces mayores que los de FB₂ en las muestras de trigo común y trigo duro respectivamente. Las diferencias de contaminación con FB₁ y FB₂ entre las muestras de ambos tipos de trigo analizadas se muestran en la tabla 3.

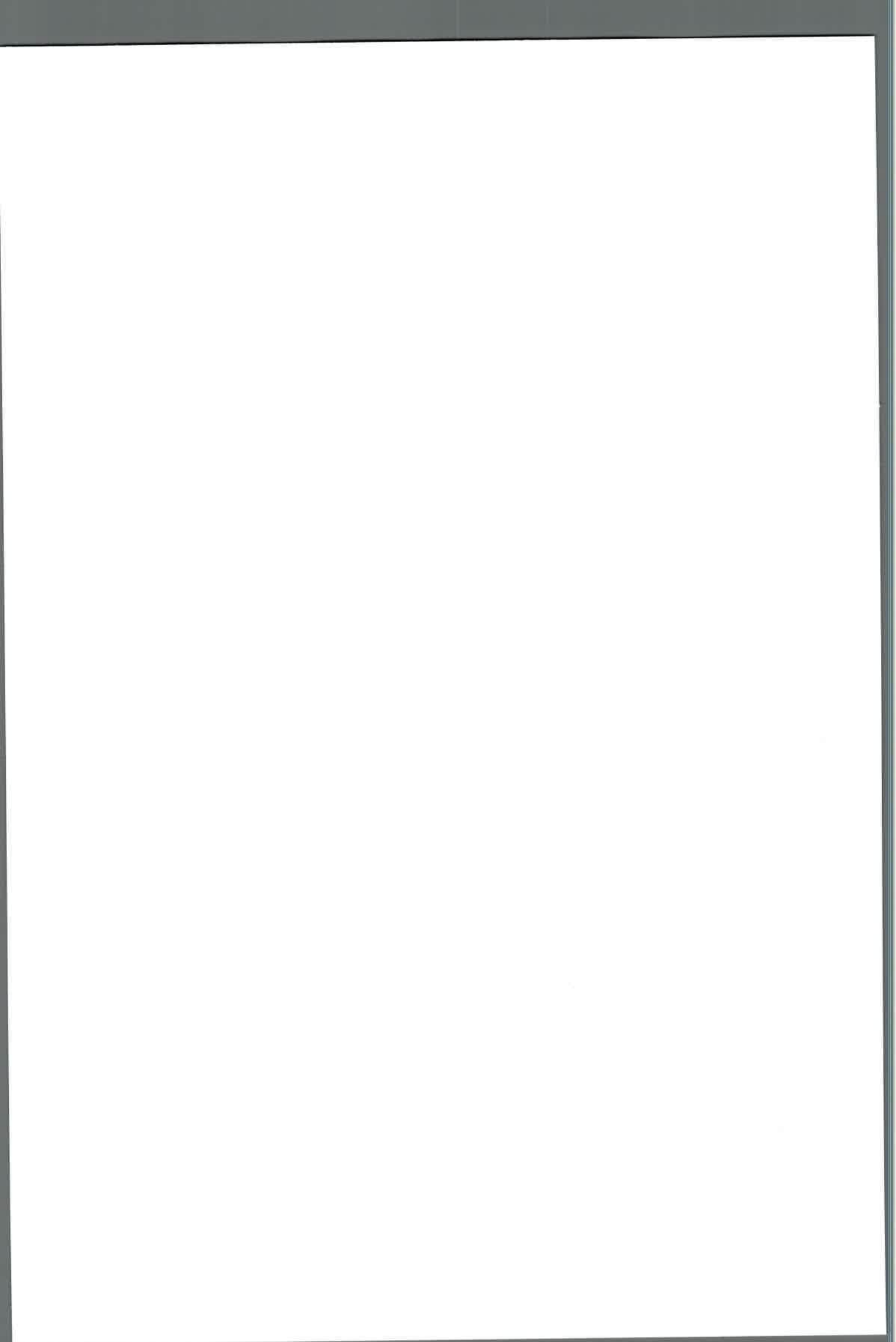
Considerando que FB₁ es la fumonisina más importante desde el punto de vista toxicológico, clasificamos las muestras de trigo según los niveles de FB₁ en 3 categorías: < LC; entre el LC y 100 ng/g; y FB₁ > 100 ng/g. Los niveles de FB₁ variaron entre el LC y 100 ng/g en el 88,5% de las muestras de trigo común y en el 70% de las muestras de trigo duro. En el trigo común solo 4 muestras y el 9% mostraron niveles mayores a 100 ng/g alcanzando una muestra los 680 ng/g. Mientras que en el trigo duro 9 muestras no mostraron niveles detectables de fumonisinas, y el 7,5% alcanzaron valores mayores a 100 ng/g, incluyendo el mayor nivel encontrado en todas las muestras (1304 ng/g).

Tabla 3. Incidencia y concentración de fumonisinas en granos de trigo común y duro de Argentina.

	Trigo común		Trigo duro	
	FB ₁	FB ₂	FB ₁	FB ₂
Número de muestras ¹	131/135	69/135	31/40	17/40
Incidencia (%)	97	51	77,5	42,5
Rangos (ng/g)	0,16 – 680,44	0,25 – 23,67	0,15 – 1304,39	0,43 – 46,94
Medias ² (ng/g)	30,07	2,88	84,75	10,47
Mediana ³ (ng/g)	2,29	1,66	5,27	5,14

¹Número de muestras positivas/Número de muestras totales; ²Concentraciones medias en muestras positivas; ³ Concentraciones medianas en muestras positivas

En los últimos años, se han publicado trabajos en diferentes países del mundo que reportan la presencia de fumonisinas en muestras de granos de trigo (tanto de trigo duro como de trigo común), como así también en productos derivados de este cereal destinados tanto para el consumo humano como para el consumo animal. Los resultados descriptos anteriormente muestran una alta incidencia de fumonisinas en granos de trigo, con niveles mayoritariamente bajos, pero con muestras cuyos niveles de contaminación merecen atención. Nuestros resultados se asemejan a muchos de los datos que han sido publicados respecto de la presencia de esta toxina en granos de trigo. En España, Castellá *et al.* (1999) analizaron la incidencia natural de fumonisinas (FB₁ y FB₂) en 17 muestras de trigo mediante HPLC y posterior confirmación de los resultados mediante HPLC-MS encontrando que 8 de 17 muestras de trigo contenían niveles de FB₁ que



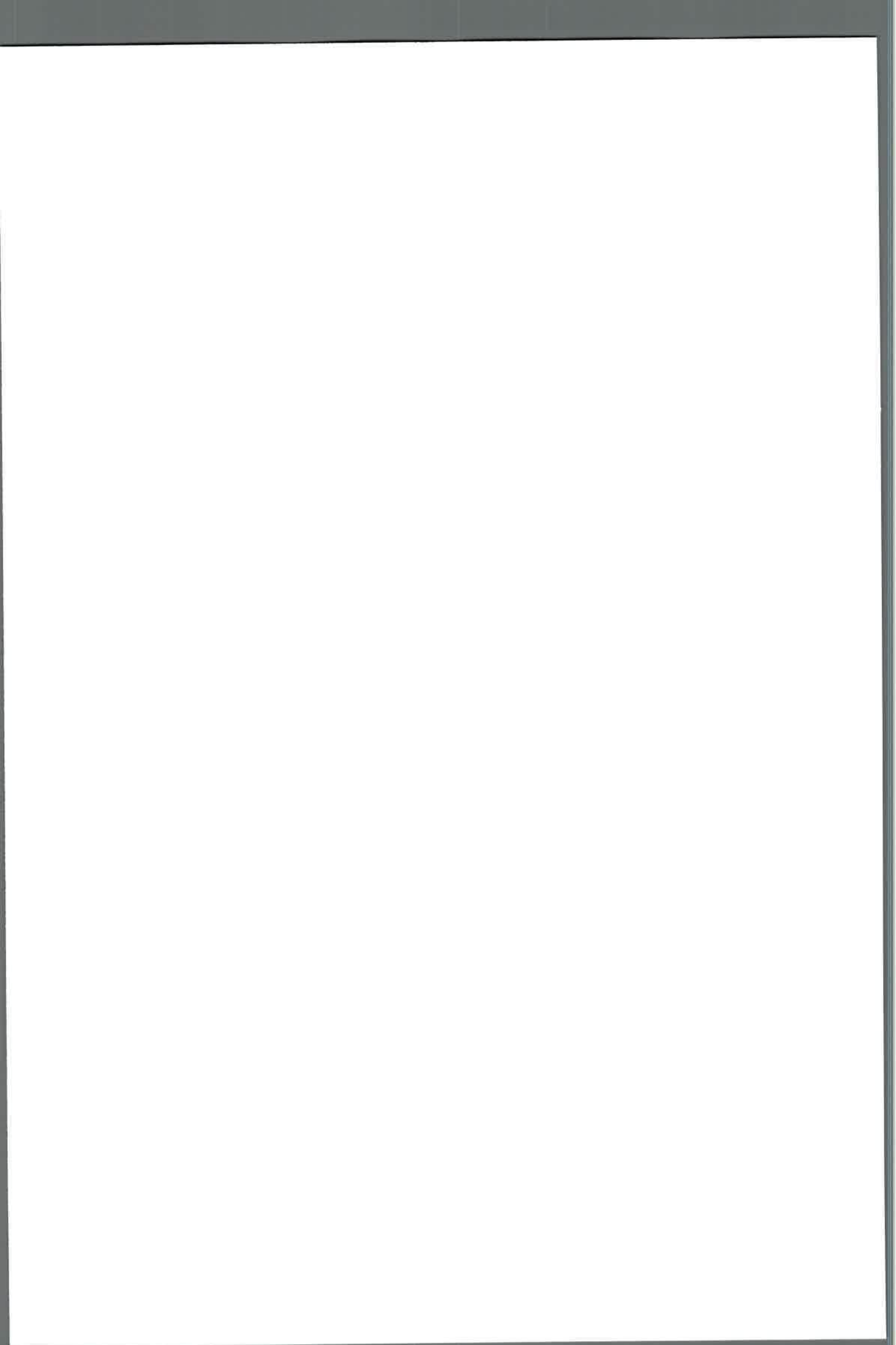
variaron desde 200 a 8800 ng/g. Busman *et al.* (2012) en Estados Unidos, analizaron la presencia de fumonisinas mediante HPLC-MS en 43 muestras de trigo común con síntomas de puntas negras de diferentes regiones geográficas. Estos autores observaron que en la mayoría de las muestras (34), los niveles de las 3 fumonisinas (FB₁, FB₂ y FB₃) estuvieron por debajo del LC (1 ng/g), 4 muestras tuvieron niveles bajos (< 10 ng/g) de FB₁, dos muestras niveles moderados, y sólo se detectaron altos niveles (4500 ng/g) en tres muestras. En Serbia, Stanković *et al.* (2011) realizaron un estudio para evaluar la contaminación natural de granos de maíz, trigo y cebada con FB₁, para lo cual tomaron muestras de diferentes almacenes locales entre los años 2007 y 2009 (203 muestras de granos de maíz, 180 muestras de granos de trigo y 120 muestras de granos de cebada). El 70,7%, 60,6% y 34,1% de las muestras de maíz, trigo y cebada, respectivamente, mostraron contaminación con FB₁. Los niveles de toxina encontrados variaron entre: 750-4900 ng/g, 750-4300 ng/g, y 750-1225 ng/g, para las muestras de trigo, maíz y cebada, respectivamente. Los niveles medios de FB₁ fueron de 1225,7 ng/g en maíz, 852,7 ng/g en trigo, y 768,2 ng/g en cebada. Una gran cantidad de muestras contenían FB₁ en niveles menores a 1000 ng/g, y en el 15% de las muestras de trigo las concentraciones fueron mayores a los niveles máximos recomendados para piensos por la Comunidad Europea. Los autores de ese trabajo concluyeron que las condiciones agroecológicas en Serbia parecerían favorecer la incidencia natural de FB₁ no sólo en granos de maíz, sino también en granos de trigo y cebada. En China, Wang *et al.* (2013) encontraron que de un total de 20 muestras de trigo analizadas, sólo 3 mostraron contaminación con FB₁ en niveles que variaron desde 94,4 hasta 379,93 ng/g. La determinaciones se llevaron a cabo usando IC-ELISA con posterior confirmación de las muestras positivas mediante HPLC-MS/MS. Mallmann *et al.* (2001) realizaron un estudio para evaluar la contaminación natural de cereales y piensos con FB₁ en el sur de Brasil, para esto recolectaron 407 muestras de diferentes almacenes locales y de industrias de piensos durante 1996-1998. Los mayores niveles de FB₁ detectados fueron: 14,21 µg/g en arroz, 68,33 µg/g en piensos, 78,92 µg/g en maíz, 24,35 µg/g en trigo, 0,17 µg/g en avena, y 2,43 µg/g en cebada. Estos autores concluyeron que las poblaciones de Brasil podrían estar expuestas a FB₁, no sólo a través del consumo directo de productos a base de maíz, arroz y trigo contaminados, sino también de manera indirecta a través de la ingesta de carne contaminada con micotoxinas proveniente de animales que han estado expuestos a piensos contaminados, como ha sido propuesto por Prelusky *et al.* (1996).

Otros trabajos en los que se analizó la presencia de fumonisinas en granos de trigo, informaron niveles de toxina menores a los encontrados en el presente trabajo. En Italia, Castoria *et al.* (2005) confirmaron mediante HPLC-MS, la presencia de

contaminación natural con FB₁ y FB₂, en 5 de 8 muestras de Farro (*Triticum monococcum* L., *Triticum dicoccon* Schrank y *Triticum spelta* L.) analizadas: FB₁ se detectó en bajas concentraciones (hasta 70 ng/g), y los niveles de FB₂ fueron menores al LC (12 ng/g). En Irán, Chehri *et al.* (2010) analizaron la contaminación natural con fumonisinas en 82 muestras de granos de trigo recolectados de diferentes supermercados y los resultados demostraron que el 68,2%, el 42,6% y el 31,7% de las muestras estaban contaminadas con FB₁, FB₂ y FB₃ respectivamente. Los niveles de toxinas variaban desde 15 a 155 µg/g, 12 a 86 µg/kg y 13 a 64 µg/kg, para FB₁, FB₂ y FB₃ respectivamente. Por otro lado, en Japón, Kushiro *et al.* (2009) investigaron la incidencia natural de fumonisinas en muestras de arroz integral y trigo mediante HPLC-MS/MS. De un total de 47 muestras de trigo analizadas, sólo una fue positiva para FB₁ en un nivel mayor al del límite de detección (10 ng/g).

Hoy en día, el consumo de productos orgánicos se ha incrementado y los estudios vinculados a ellos también, la mayoría de estos estudios se han centrado en investigar el valor nutritivo de los mismos, ya que han mostrado ventajas en comparación con su contraparte convencional (poseen mayores niveles de nutrientes y menor cantidad de residuos como pesticidas). Sin embargo, otros compuestos pueden estar presentes como por ejemplo las micotoxinas. En este sentido, Rubert *et al.* (2013) analizaron la incidencia de FB₁ y FB₂ en 1250 productos orgánicos y convencionales a base de cereal obtenidos de supermercados y mercados locales en Francia, Alemania y España. Estos autores detectaron ambos tipos de fumonisinas en alimentos a base de cereal, siendo mayor la incidencia observada en maíz y trigo orgánicos.

Respecto a la exposición simultánea a más de una micotoxina de animales y humanos, cabe destacar que representa un tema de importancia y requiere de mayores estudios, ya que ha sido postulado que efectos sinérgicos podrían explicar porque los animales algunas veces se ven afectados por niveles de micotoxinas mucho menores que a aquellos usados en estudios científicos, capaces de causar micotoxicosis (Rodrigues y Naehrer, 2012). En este sentido, en la bibliografía hay disponibles numerosos trabajos que resaltan la importancia de la co-ocurrencia de micotoxinas en un mismo sustrato, y que por ejemplo estudian la presencia de más de una micotoxina en trigo y derivados, entre los cuales, varios incluyen el análisis de fumonisinas. *Fusarium graminearum* es una de las principales especies productoras de DON, y se aísla con frecuencia de granos de trigo, siendo capaz de contaminar los granos con esta toxina. Como se detalló en el capítulo I, *F. proliferatum*, que es uno de los principales productores de fumonisinas, también es aislado con frecuencia de granos de trigo, siendo capaz de contaminar los granos con esta toxina. Como resultado en los granos de



trigo pueden co-ocurrir ambas toxinas, ya sea porque ambas especies se encuentran contaminando esos granos al mismo tiempo, o porque las dos hayan sido capaces de colonizar esos granos en algún momento y las toxinas persistan. Los resultados de co-ocurrencia de DON y FBs obtenidos durante el presente estudio se resumen en la tabla 4.

Tabla 4: Co-ocurrencia de fumonisinas y deoxinivalenol en muestras de trigo

Tipo de trigo	Muestra	Fumonisin (ng/g)	Deoxinivalenol (ng/g)
Común	101	nd	1113,1
	82	2,7	627,2
	41	4,7	249,2
	62	5,7	286,5
	22	9,2	387,1
	50	23	214,3
	23	24,5	216,1
	113	100,1	757,4
	40	105,7	209,4
	5	209,4	188,3
	100	236,7	150,6
	61	266,3	12468,3
	1	328,6	221,8
	81	661,5	913,9
	49	680,4	865,7
Duro	106-7	nd	194,4
	101-7	nd	15141,3
	104-4	0,41	1731,5
	102-5	0,71	4117,9
	103-4	2,83	1261,9
	101-6	11,8	2871,0
	102-7	96,0	2727,7
	106-8	508,4	nd
	103-3	531,2	1458,1
104-3	1304,4	336,3	

nd, No detectable, < LC.

En la misma puede observarse que la contaminación natural de muestras de granos de trigo con DON estuvo presente en 24 de 25 muestras analizadas y que los niveles de DON variaron desde 50,6 hasta 28650 ng/g, siendo la media de 3211 ng/g en

las muestras positivas, por otro lado, 9 de las 25 muestras alcanzaron valores mayores a 1000 ng/g. Sin embargo no se encontró correlación entre la contaminación con fumonisinas y DON ($p > 0,05$) es decir, que tanto muestras que contenían altos niveles de contaminación con fumonisinas como muestras que no presentaron niveles detectables de contaminación con esta micotoxina, presentaron niveles importantes de contaminación con DON. En cuanto a la co-ocurrencia de ambas toxinas en las muestras de trigo analizadas, se observó que 21 muestras de 25 muestras totales estuvieron contaminadas con ambas micotoxinas.

Estos resultados son comparables con los obtenidos en otros trabajos publicados sobre co-ocurrencia de fumonisinas y DON en trigo y sub-productos. En Italia, Cirillo *et al.* (2003b) analizaron la incidencia natural de DON, FB₁ y FB₂ en dos lotes de alimentos destinados a la alimentación humana de marcas comerciales tanto convencionales como orgánicas obtenidas de supermercados. Estos autores observaron que el 20% y el 31% de las muestras de comida orgánica y convencional, respectivamente estaban contaminadas con FB₁, mientras que FB₂ se encontró en más del 32% de las muestras de alimentos de ambos tipos de prácticas agrícolas. La concentración media más alta de FB₁ se encontró en los alimentos convencionales a base de maíz (345 ng/g), mientras que interesantemente los niveles medios más altos de FB₂ se encontraron en los alimentos orgánicos a base de trigo (210 ng/g). Las muestras de alimentos a base de trigo consistían en materias primas y comidas preparadas con cereales procesados (galletitas, harina, salvado, pan, y pasta): 44 lotes de productos convencionales y 36 de productos orgánicos. Los niveles de FB₁ fueron significativamente mayores en los alimentos a base de trigo convencionales que en los correspondientes orgánicos, sin embargo en este trabajo no se publican los valores de co-ocurrencia de estas toxinas. Luego, los mismos autores realizaron un trabajo posterior de manera tal de obtener la frecuencia y los niveles de contaminación con DON, FB₁ y FB₂ de alimentos comercializados en Italia. En esta oportunidad, analizaron un total de 202 muestras, entre las que se incluyeron materias primas y alimentos procesados de cereales (pan, pasta, cereales de desayuno, galletitas, alimentos para bebé y niños). Como resultado de este estudio observaron que el 84% de las muestras analizadas presentaban contaminación con DON, el 26% presentaban contaminación con FB₁ (con niveles que iban desde 10 hasta 2870 ng/g), y el 35% de las muestras estaban contaminadas con FB₂ (con niveles que variaban entre 10 y 790 ng/g). Los niveles más elevados de DON y FB₁ fueron detectados en los cereales crudos y harinas integrales, mientras que los niveles más elevados de FB₂ fueron detectados en pasta de trigo duro donde en el 44% de las muestras co-ocurrió con DON, mientras que FB₁ no fue detectada en estas muestras

(Cirillo *et al.*, 2003a). En Canadá, Roscoe *et al.* (2008) recolectaron 166 muestras de cereales de desayuno (cereales a base de maíz, trigo, arroz, y avena, y también mezclas de granos de cereales) del mercado minorista canadiense durante un período de 3 años y analizaron la presencia de DON, nivalenol (NIV), HT-2, zearalenona (ZEA), ochratoxina A (OTA), y fumonisina B₁ y B₂. Como resultado de este estudio encontraron que DON fue la micotoxina más frecuentemente detectada (40% de las muestras), luego OTA, mientras que las fumonisinas fueron detectadas en el 30% de las muestras, y zearalenona en el 20%, nivalenol y HT-2 solo fueron detectadas en una muestra. Por otra parte, DON y FBs se detectaron en el 17% (5/29) de las muestras a base de trigo. En Francia, Sirot *et al.* (2013) realizaron el Segundo Estudio de la dieta total francesa (TDS) y analizaron la presencia de micotoxinas en 577 muestras de alimentos recolectadas en el continente de manera que fueran representativas de la dieta de la población y preparadas tal cual se consumen. Como resultado, el trigo y los productos a base de cereales mostraron ser los productos más frecuentemente contaminados; por ejemplo, galletitas con ZEA (3 µg/kg) y FBs (35 ng/g FB₁ y 75 ng/g FB₂), pan y productos de panificación con OTA (0,13 ng/g) y DON (132 ng/g), pasta con OTA (0,10 ng/g), pizza-pasteles salados, y hamburguesas con DON (101 y 83 ng/g, respectivamente). Tanto en pan, productos de panificación secos y cereales de desayuno, se encontraron de manera simultánea ambas fumonisinas B₁ y B₂, como también en galletitas y barras de cereales (dulces y saladas). Por otro lado, los autores determinaron la exposición de la población adulta y de los niños a las micotoxinas combinando los datos del consumo nacional de alimentos con los resultados analíticos de la contaminación de los mismos con micotoxinas, y concluyeron que tanto en adultos como en niños el pan y los productos de panificación parecerían ser los mayores contribuidores a la exposición con OTA (20% y 80%, respectivamente), DON (60% y 40%, respectivamente), NIV (20% y 50%, respectivamente), ZEA (41% y 20%, respectivamente), y FB₁ solo para adultos (36%). En Serbia, Stanković *et al.* (2012) analizaron la ocurrencia de FB₁ y su co-ocurrencia con ZEA, T-2, y DON en 103 muestras de trigo de invierno recolectadas luego de 4 a 6 meses de almacenamiento en graneros familiares de diferentes localidades. Como resultado encontraron presencia de FB₁ en el 82,1% y 92% de las muestras totales con niveles que variaron entre 750 a 5400 ng/g (media 2079,45 ng/g) y entre 750 y 4900 ng/g (media 918,75 ng/g) en 2005 y 2007, respectivamente. Además una gran cantidad de muestras (53,1% en 2005 y 64,0% en 2007) contenían niveles de FB₁ mayores a 1000 ng/g. En cuanto a los resultados de co-ocurrencia de FB₁ con otras toxinas encontraron: en 2005: 78,6% (DON), 60,7% (T-2), 67,9% (ZEA), y durante 2007: 86,7% (DON), 52,0% (T-2), 88,0% (ZEA). Jakšić *et al.* (2012) también realizaron un estudio en Serbia para evaluar la contaminación natural de

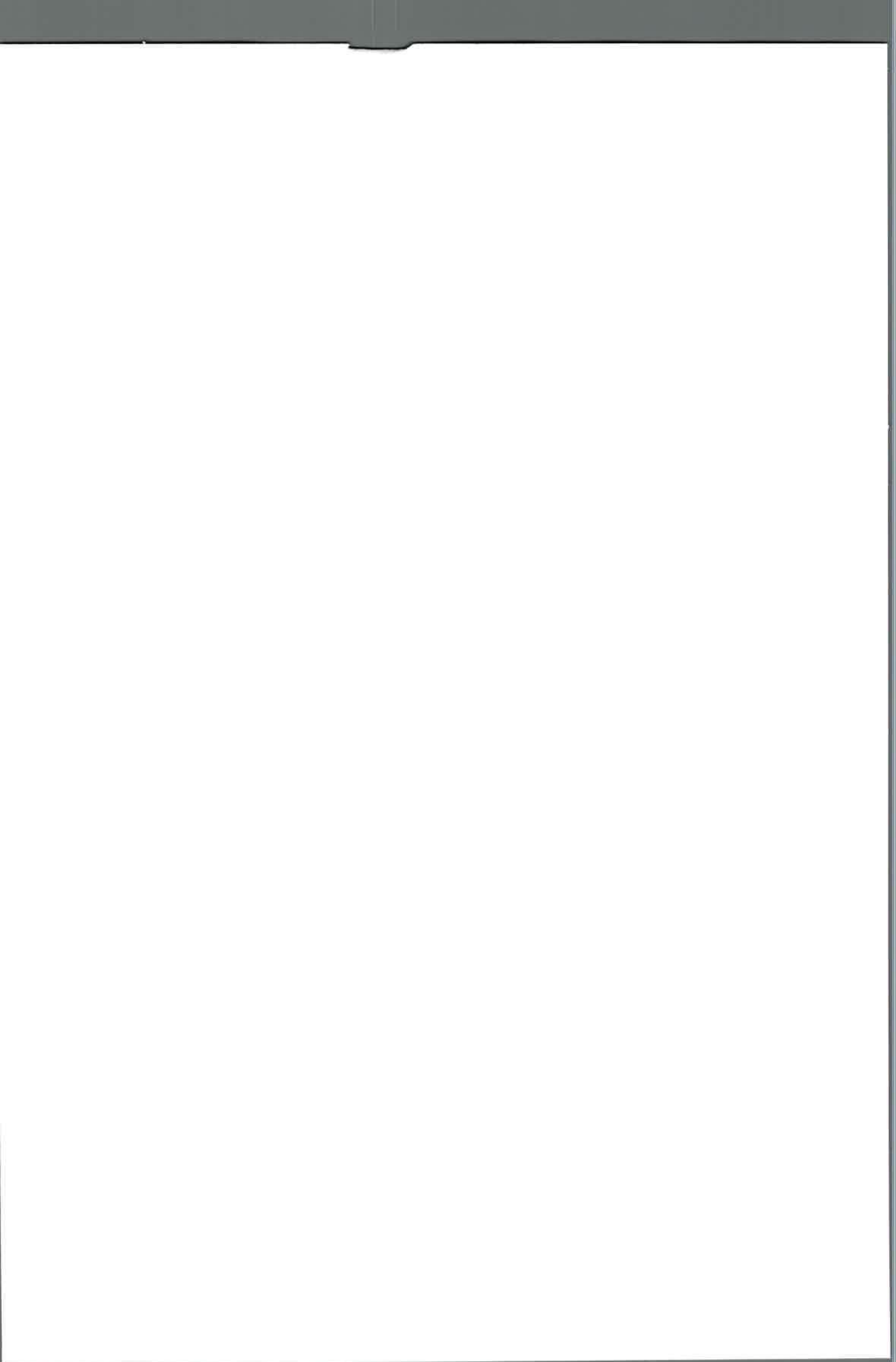
III.1.5. Extracción de fumonisinas

A diferentes períodos de incubación (7, 14, 21, y 28 días) se tomaron placas correspondientes a los cultivos de cada cepa a cada a_w y temperatura ensayada por triplicado. El contenido de medio de cultivo de cada placa se cortó en pequeñas porciones y se colocó en un Erlenmeyer previamente pesado. Los frascos Erlenmeyer fueron pesados nuevamente con el micelio y medio en su interior y se determinó, por diferencia, el peso real del medio de cultivo + micelio. Para la extracción de las fumonisinas a cada Erlenmeyer se le agregó 40 mL de una mezcla de acetonitrilo:agua (1:1 v/v) y se lo agitó durante 30 minutos en agitador rotatorio. Luego se filtró y se tomó 1 mL del filtrado que se colocó en un microtubo que se conservó a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su posterior análisis por HPLC.

III.1.6. Detección y cuantificación de fumonisinas por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Una alícuota de 50 μL del filtrado fue derivatizada adicionándole 200 μL de una solución de O-ptaldialdehído (OPA). La solución derivatizante se preparó disolviendo 40 mg de OPA en 1 mL de metanol, 5 mL de tetraborato de Na 0,1 M y 50 μL de 2-mercaptoetanol. Las fumonisinas derivatizadas (50 μL de la solución) fueron analizadas usando un sistema de detección de fluorescencia/HPLC fase reversa. El sistema HPLC consistió de una bomba Hewlett Packard modelo 1100 (Palo Alto, CA), conectada a un detector de fluorescencia Hewlett Packard serie 1100. La cuantificación se realizó por medio de una estación de trabajo Hewlett Packard Kayak XA (HP ChemStation Rev A.06.01). Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo utilizando una columna de fase reversa de C18 (150 mm x 4,6 mm d.i., 5 μm tamaño de partícula; Luna-Phenomenex, Torrance, CA, USA), conectada a una precolumna SecurityGuard™ (4 x 3,0 mm) con el mismo empaquetamiento de la columna. Como fase móvil se utilizó una mezcla metanol: fosfato de sodio dihidrogenado 0,1 M (75:25 v/v) cuyo pH se ajustó a 3,35 mediante la adición de ácido ortofosfórico y el flujo de la misma fue de 1,5 mL/min. El rango de excitación y emisión usados fueron 335 y 440 nm, respectivamente.

Las soluciones stock de testigos de fumonisinas fueron preparadas disolviendo FB_1 y FB_2 (SigmaAldrich) puras en acetonitrilo:agua (1:1, v/v) a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A partir de la solución stock se prepararon 3 soluciones de trabajo 0,5; 1 y 2 $\mu\text{g/mL}$. La cuantificación de las fumonisinas se basó en las medidas de las áreas de los picos comparados con la medida de las áreas de los picos de soluciones testigos de referencia de FB_1 y FB_2 . La concentración de FB_3 se calculó por comparación con el testigo de FB_2 . El tiempo de retención promedio fue de 7,5; 16,7 y 18,5 min. para FB_1 , FB_3 y FB_2 , respectivamente.



Se realizó un ensayo de recuperación que consistió en el enriquecimiento de placas con medio de cultivo agar trigo 2%. Se colocó la cantidad necesaria de cada solución de trabajo de toxina para obtener los niveles de 1- 10 µg/mL de FB₁ de FB₂, respectivamente, en el medio de cultivo, previamente esterilizado y enfriado hasta 50 °C aproximadamente. Se homogenizó por agitación el medio y se plaqueó a razón de 20 mL por placa de Petri. Una vez solidificado el medio de cultivo se procedió a la extracción, detección y cuantificación de las toxinas siguiendo la metodología detallada líneas arriba. El experimento se llevó a cabo por triplicado. Se obtuvieron porcentajes de recuperación de 98% y 94%, para FB₁ y FB₂ respectivamente.

El número de ensayos fue: 7 a_w x 3 temperaturas x 3 cepas x 3 réplicas x 4 períodos de incubación. Las respuestas medidas fueron las concentraciones de tres micotoxinas: FB₁, FB₂ y FB₃.

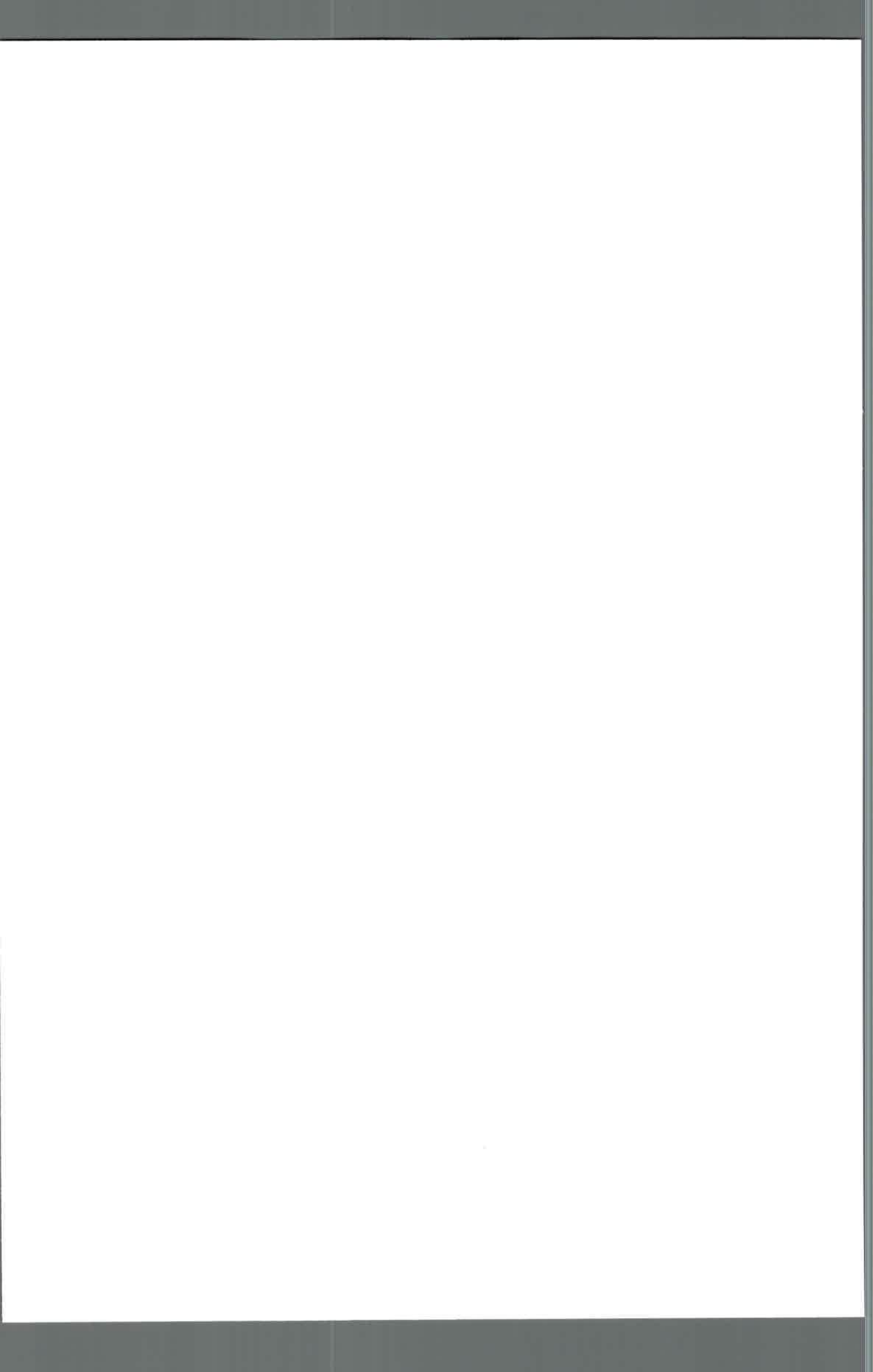
III.1.7. Análisis estadístico

Los datos obtenidos para las fases de latencia fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para obtener el efecto de un factor simple (a_w, temperatura, cepa), de dos factores (a_w x temperatura, a_w x cepa, temperatura x cepa), y de tres factores (a_w x temperatura x cepa) sobre este parámetro. El nivel de significancia fue de $p < 0,01$. Para los factores que mostraron tener mayor efecto significativo (a_w y temperatura) se realizó un test a posteriori LSD-Fisher ($p > 0,01$).

Los datos obtenidos de velocidad de crecimiento fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para obtener el efecto de un factor simple (a_w, temperatura, cepa), de dos factores (a_w x temperatura, a_w x cepa, temperatura x cepa), y de tres factores (a_w x temperatura x cepa) sobre este parámetro. El nivel de significancia fue de $p < 0,01$. Para los factores que mostraron tener mayor efecto significativo (a_w y temperatura) se realizó un test a posteriori LSD-Fisher ($p > 0,01$).

Los datos obtenidos de producción de fumonisinas totales (FBt) transformados (ln) fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para obtener el efecto de un factor simple (a_w, temperatura, días de incubación), de dos factores (a_w x temperatura, a_w x días de incubación, temperatura x días de incubación), y de tres factores (a_w x temperatura x días de incubación) sobre este parámetro. El nivel de significancia fue de $p < 0,01$. Tanto para a_w, como para temperatura y tiempo de incubación se realizó un test a posteriori LSD-Fisher ($p > 0,01$).

Para todos los análisis se utilizó el programa SigmaStat para Windows Versión 2.03 (SPSS Inc.).



III.2. Influencia de factores abióticos (actividad acuosa y temperatura) sobre el crecimiento y la producción de fumonisinas por cepas de *Fusarium proliferatum*, aisladas de granos de trigo, en granos de trigo irradiados

III.2.1. Cepas

Se utilizaron las cepas de *F. proliferatum* ITEM 15654, ITEM 15664 e ITEM 15661, descritas en el punto III.1.1.

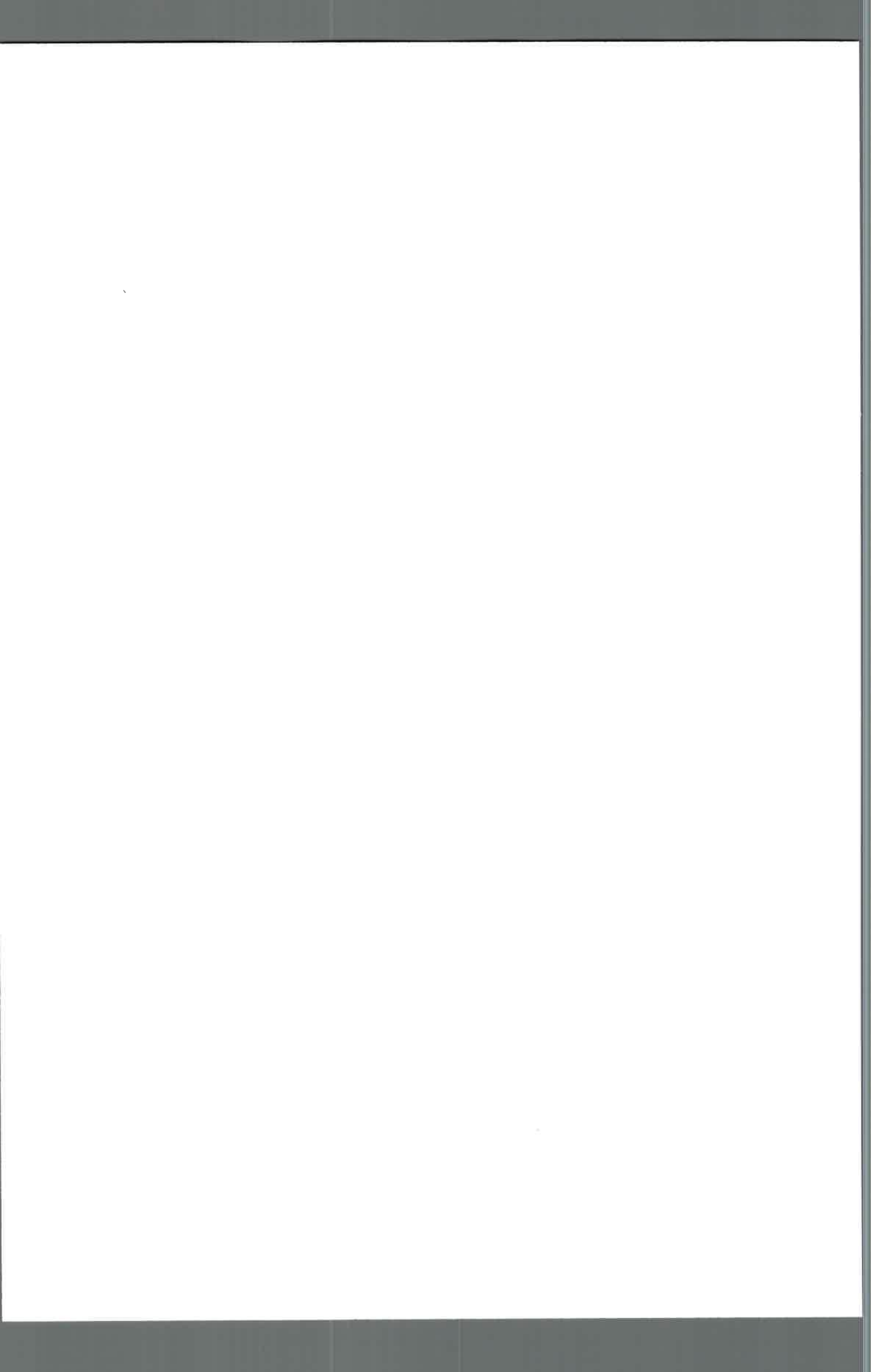
III.2.2. Acondicionamiento del sustrato

Los granos de trigo fueron esterilizados con radiación gamma (10-12 Kgrays) y conservados asépticamente a 4 °C hasta el momento de su utilización. La principal ventaja de la utilización de la irradiación gamma es que destruye la microbiota natural de los granos sin afectar su germinación, viabilidad y valor nutritivo. Se realizaron controles de esterilidad para determinar la eficiencia del tratamiento de irradiación.

A fin de determinar la cantidad de agua requerida para equilibrar los granos a las distintas a_w deseadas en este estudio, en primer lugar se realizó una curva de adsorción de agua, para lo cual se adicionó a una cantidad conocida del sustrato (granos de trigo) distintos volúmenes de agua (Tabla 1). Estos granos se dejaron a 4 °C durante 3 días para favorecer la homogenización de la humedad, y durante este período los granos fueron agitados diariamente. Una vez transcurrido el período, se midió la a_w de los granos en cada caso mediante un equipo Aqualab Series 3 (Decágon Devices, Inc, WA, EE.UU). Una vez obtenida la curva, los granos fueron rehidratados hasta obtener las siguientes a_w : 0,995; 0,98; 0,96; 0,94; 0,92 y 0,88, teniendo en cuenta la curva de adsorción en relación a la a_w inicial de los granos de trigo (0,654). Finalmente, los granos rehidratados fueron colocados en forma estéril en placas de Petri formando una capa superficial fina (aproximadamente de 20 g por placa).

Tabla 1. Cantidades necesarias de agua para alcanzar los diferentes niveles de a_w en granos de trigo irradiados

a_w	Agua (mL/100 g)
0,65	0,0
0,88	8,4
0,92	13,9
0,94	16,4
0,96	22,8
0,98	31,7
0,995	40,7



III.2.3. Inoculación e incubación

Las placas de Petri conteniendo los granos de trigo, acondicionados a las diferentes a_w , fueron inoculadas centralmente con un taco de micelio de 3 mm de diámetro, tomado con un sacabocado estéril, de la zona de activo crecimiento de los cultivos de las 3 cepas de *F. proliferatum* crecidas durante 7 días en el medio ASN a 25 °C con períodos de 12 horas de luz blanca y 12 horas de luz negra. Una vez inoculadas, las placas de Petri con igual a_w fueron colocadas en recipientes de plástico cerrados herméticamente, en los cuales se incluyó un vaso de precipitado conteniendo una solución de NaCl-H₂O de la misma a_w que el tratamiento a fin de mantener constante la humedad relativa de equilibrio dentro de los recipientes durante todo el período de incubación. Las placas se incubaron a 15, 25 y 30 °C durante un periodo de 28 días. El ensayo se realizó por triplicado.

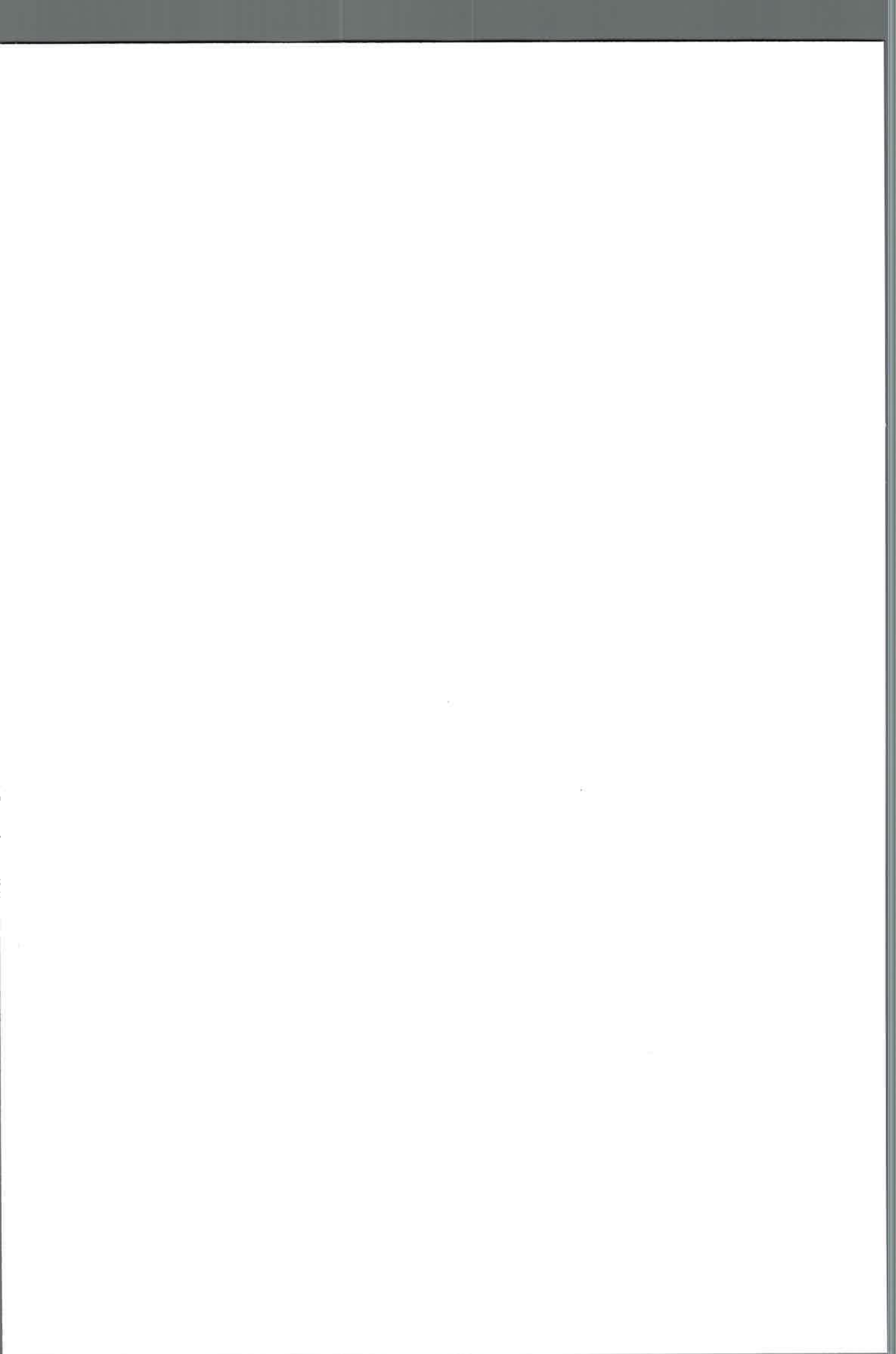
Se aplicó un diseño factorial completo con 3 réplicas. Los factores estudiados fueron cepas (3) x niveles de a_w (6) x temperatura (3), y como respuesta se utilizó, fase de latencia y velocidad de crecimiento.

III.2.4. Evaluación del crecimiento

La evaluación del crecimiento se realizó diariamente de manera similar a lo explicado en el punto III.1.4. del ensayo realizado en placas de medio de cultivo a base de trigo, y de la misma manera se definió también la fase de latencia para cada tratamiento.

III.2.5. Extracción de fumonisinas

Una vez concluido el período de incubación los granos de cada placa se secaron en estufa de aire forzado durante 24 hs a 60 °C y se molieron. Para la extracción de las toxinas el contenido de cada placa (seco y molido) fue colocado en un Erlenmeyer previamente pesado. Los frascos Erlenmeyer fueron pesados nuevamente y se determinó, por diferencia, el peso real de los granos de trigo + micelio. Para la extracción de las fumonisinas a cada Erlenmeyer se le agregó 40 mL de una mezcla de acetonitrilo-agua (1:1 v/v) y se lo agitó durante 30 minutos en agitador rotatorio. Luego se filtró y se tomó 1 mL del filtrado que se colocó en un microtubo que se conservó a -20 °C hasta su posterior análisis por HPLC-MS/MS.



III.2.6. Detección y cuantificación de fumonisinas por cromatografía líquida de alta eficacia acoplado a un espectrómetro de masas (HPLC-MS/MS)

Los análisis fueron realizados en HPLC-MS/MS Waters Alliance 2695 (Waters Corporation, Milford, MA, USA) equipado con una bomba Waters Alliance 2685, un autoinyector Waters Alliance 2695, un detector de arreglo de diodos Waters 2996 PDA acoplado a un espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolos en tándem (Micromass®-Quattro Ultima™ Platinum) con fuente de electro spray ionización (ESI). La columna utilizada fue una A XBridge™ C18 (3,5 μm , 2,1 x 150 mm) con precolumna XBridge BEH C18 Sentry Guard Cartridge (130 Å, 3,5 μm , 2,1 x 10 mm). La interfase se trabajó en modo de ionización electrospray positiva. Como gas de nebulización y de desolvatación se utilizó nitrógeno calentado a temperaturas de 150 °C y 200 °C, respectivamente. El voltaje del capilar fue de 3,00 kV. El flujo de nitrógeno se ajustó a 109 L/h y 726 L/h para los gases de cono y desolvatación, respectivamente. Para la determinación de las fumonisinas se utilizó el método de monitoreo de reacciones múltiples (MRM). Se obtuvieron los cromatogramas correspondientes a las trazas de las transiciones del ión precursor de FB $[\text{M}+\text{H}]^+$ a dos iones productos o hijas para dar cumplimiento a criterios cualitativos y cuantitativos. La adquisición de los datos y el procesamiento de los mismos se realizaron mediante un software Mass Lynx V.4.1 – Copyright 2005, Waters INC. Se desarrolló un procedimiento cromatográfico en gradiente con ácido fórmico en agua 1% (Solución A) y ácido fórmico 1% en metanol (Solución B) como fase móvil. El programa del gradiente se muestra en la tabla 2. El flujo fue de 0,2 mL/minuto. La temperatura de la columna se mantuvo a 20 °C. Se analizaron extractos blancos de matriz de modo tal de confirmar que no haya interferencias espectrométricas que provengan de la matriz. Alícuotas de 45 μL de los extractos de las muestras se inyectaron en la unidad HPLC. Se tuvieron en cuenta cuatro puntos para la identificación de las fumonisinas: el tiempo de retención, el ion precursor $[\text{M} + \text{H}]^+$ y los dos iones productos. Se realizó una curva de calibración inyectando 10 μL de diferentes soluciones estándar con mezclas de FB₁ y FB₂ (0,25; 0,5; 1,0 y 2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Para lo cual se obtuvo buena linealidad con un coeficiente de correlación mayor a 0,98 para el rango de calibración. El límite de detección (LD), basados en la relación señal-ruido (3:1) y cuantificación (LC), basados en la relación señal-ruido (5:1) del instrumental para FB₁ y FB₂ fueron de 0,01 ng/g y 0,05 ng/g, respectivamente y la relación de desvíos estándar durante un día y entre días (% RDE) fue de 6,5. Para la cuantificación de FB₁ se utilizó la traza m/z 722 > 352, mientras que para la identificación de FB₂ y FB₃ se utilizó la traza 706 > 336. El pico precursor $[\text{M} + \text{H}]^+$ y dos picos productos, los tiempos de retención y la configuración del detector, se muestran en la tabla 3.

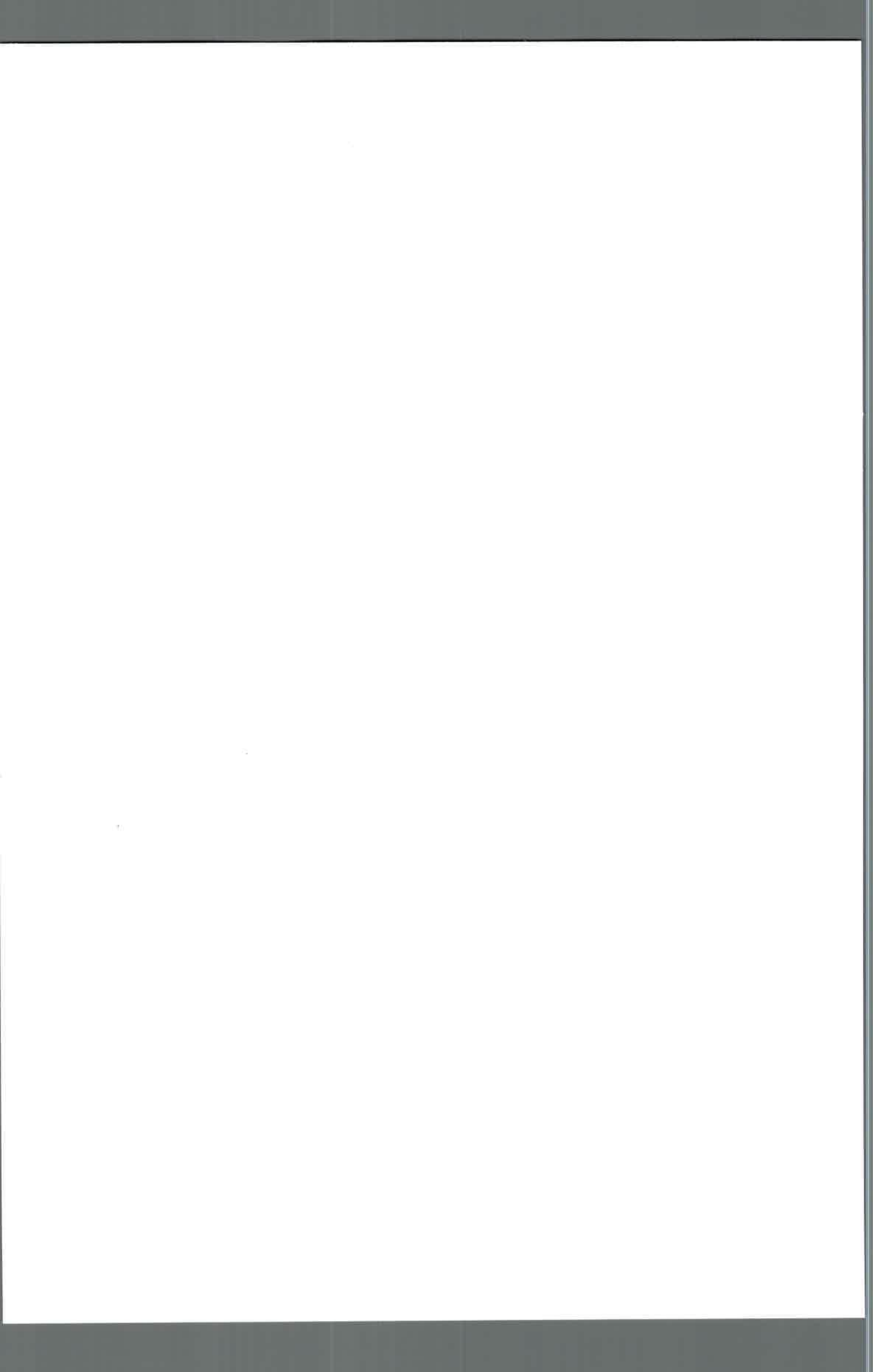


Tabla 2. Programa de gradiente para HPLC-MS/MS

Paso	Tiempo (min)	Solución A ¹ (%)	Solución B ² (%)	Flujo (mL/min)	Curva
1	0,00	90,5	9,5	0,2	1
2	2,00	90,5	9,5	0,2	1
3	3,00	50	50	0,2	6
4	14,00	2,5	97,5	0,2	6
5	17,00	2,5	97,5	0,2	6
6	17,00	90,5	9,5	0,2	6
7	22,00	90,5	9,5	0,2	6

¹ Acido fórmico en agua (1%); ² Acido fórmico en metanol (1%).

Tabla 3. Parámetros utilizados para analizar fumonisinas mediante HPLC-MS/MS

Compuesto	[M + H] ⁺	t _R /min	Iones producto (m/z)	CV (V)	CE(V)
FB ₁	722	13,5	334	101	38
			352		35
FB ₂	706,3	15,5	318,5	106	31
			336,3		49
FB ₃	706,3	14,5	318,5	106	31
			336,3		49

[M + H]⁺, ion precursor; t_R, tiempo de retención; iones producto (m/z), iones hijos; CV (V), voltaje de cono; CE (V), energía de colisión.

III.2.7. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las fases de latencia en horas, fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para obtener el efecto de un factor simple (a_w, temperatura y cepa), de dos factores (a_w x temperatura, a_w x cepa, temperatura x cepa,) y de tres factores (a_w x temperatura x cepa) sobre este parámetro. El nivel de significancia fue de $p < 0,01$. Para los factores que mostraron tener mayor efecto significativo (a_w y temperatura) se realizó un test a posteriori LSD-Fisher ($p > 0,01$).

Los datos obtenidos de velocidad de crecimiento fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para obtener el efecto de un factor simple (a_w, temperatura, cepa), de dos factores (a_w x temperatura, a_w x cepa, temperatura x cepa,) y de tres factores (a_w x temperatura x cepa) sobre estos parámetros. El nivel de

significancia fue de $p < 0,01$. Para los factores que mostraron tener mayor efecto significativo (temperatura y a_w) se realizó un test a posteriori LSD-Fisher ($p > 0,01$).

Los datos obtenidos de producción de toxina fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) para obtener el efecto de un factor simple (a_w , temperatura), y de dos factores (a_w x temperatura), sobre la producción de FB_1 , FB_2 y FB_3 por cada una de las cepas evaluadas. El nivel de significancia fue de $p < 0,01$. Para los factores que mostraron tener efecto significativo (temperatura y a_w) se realizó un test a posteriori LSD-Fisher ($p > 0,01$).

Para todos los análisis se utilizó el programa SigmaStat para Windows Versión 2.03 (SPSS Inc.).

III. Resultados

III.1. Influencia de factores abióticos (actividad acuosa y temperatura) sobre el crecimiento y la producción de fumonisinas por cepas de *Fusarium proliferatum*, aisladas de granos de trigo, en un medio de cultivo a base de trigo

Los resultados obtenidos de las fases de latencia de las distintas cepas bajo las diferentes condiciones de cultivo en medio de cultivo a base de trigo se resumen en la tabla 4. Como puede observarse, las 3 cepas de *F. proliferatum* analizadas mostraron un comportamiento similar, de hecho, de la tabla 5 se desprende que el efecto cepa no fue estadísticamente significativo en el análisis de ANOVA, como si lo fueron los factores a_w , temperatura, y todas las interacciones (a_w x temperatura, a_w x cepa, cepa x temperatura, a_w x cepa x temperatura). El factor que más influencia tuvo en estos resultados según el análisis de varianza fue la a_w , seguido del efecto de la temperatura (Tabla 5). Las fases de latencia fueron más cortas (< 24 hs) entre los niveles de 0,995 y 0,98 de a_w . El análisis a posteriori de los datos de a_w , indicó que no fueron significativamente distintos solamente los valores de a_w comprendidos entre 0,995 y 0,98 (LSD-Fisher, $p > 0,01$) (Tabla 6). También se observaron fases de latencia más cortas a 30 y 25 °C, y estas temperaturas no fueron significativamente diferentes según el análisis a posteriori LSD-Fisher ($p > 0,01$). A la menor temperatura evaluada (15 °C) y a valores bajos de a_w las fases de latencia se incrementaron considerablemente (Tabla 4).

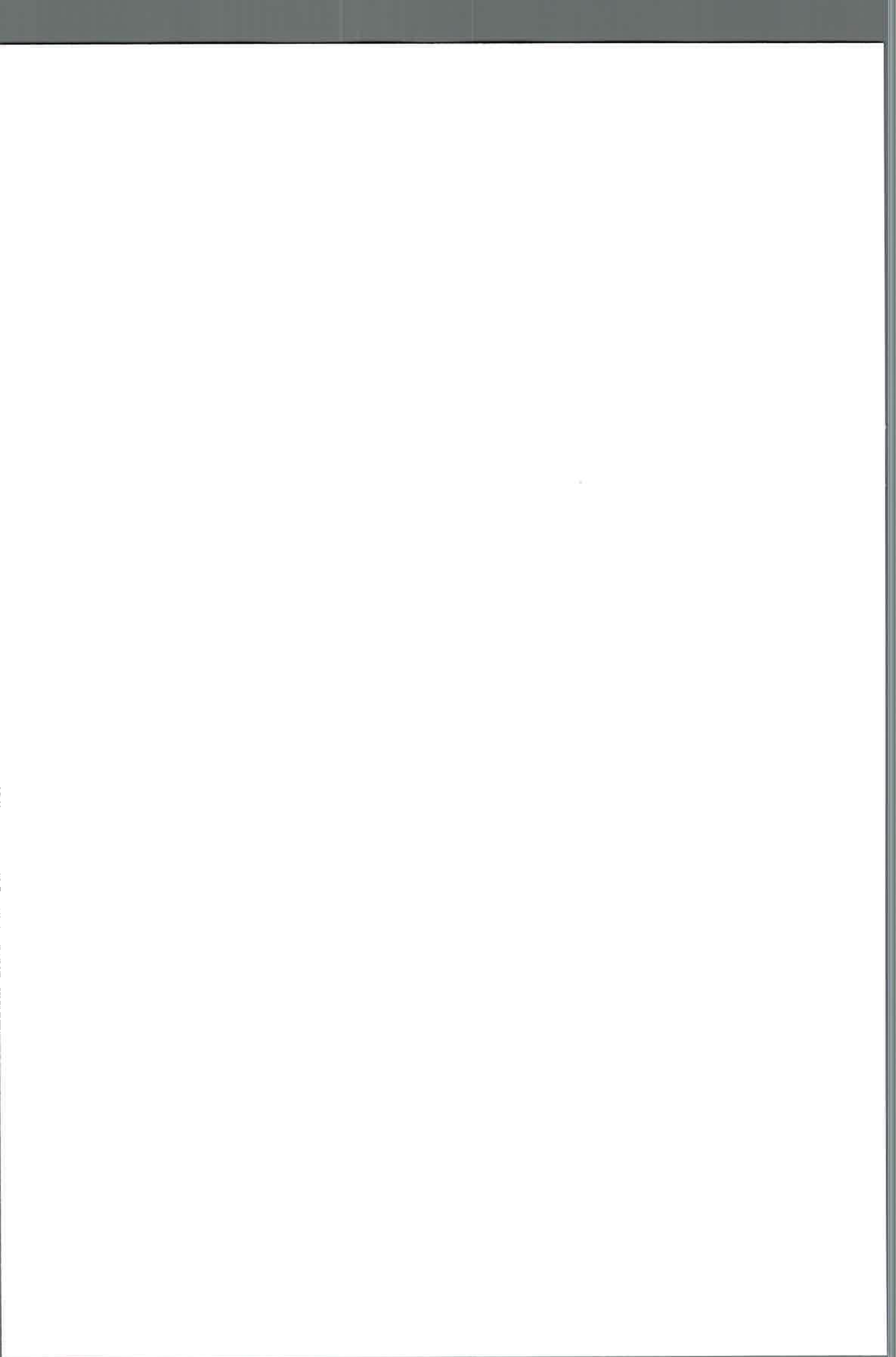


Tabla 4. Relación entre la temperatura y la actividad de agua (a_w) sobre la fase de latencia (hs) de cepas de *Fusarium proliferatum* en un medio de cultivo a base de trigo

Cepa (ITEM)	a_w	Fase de latencia (hs) \pm D.E		
		15 °C	25 °C	30 °C
15654	0,995	23 \pm 0,7	14 \pm 2,4	14 \pm 0,2
	0,99	25 \pm 0,4	17 \pm 0,2	14 \pm 0,1
	0,98	32 \pm 1,5	21 \pm 0,1	17 \pm 0,2
	0,96	64 \pm 1,1	27 \pm 1,3	26 \pm 0,8
	0,94	106 \pm 5,8	57 \pm 2,7	76 \pm 3,1
	0,92	222 \pm 10,6	149 \pm 28,9	150 \pm 2,3
	0,90	> 672 \pm 0	333 \pm 55,2	347 \pm 39,4
15661	0,995	24 \pm 0,3	15 \pm 0,1	13 \pm 0,2
	0,99	25 \pm 0,5	15 \pm 0,1	15 \pm 0,2
	0,98	32 \pm 0,1	19 \pm 0,6	16 \pm 0,3
	0,96	51 \pm 1	27 \pm 0,6	24 \pm 0,3
	0,94	104 \pm 4,2	54 \pm 2	63 \pm 1,7
	0,92	267 \pm 5,7	139 \pm 21,1	131 \pm 3,8
	0,90	> 672 \pm 0	324 \pm 15	296 \pm 19
15664	0,995	24 \pm 0,2	15 \pm 0,1	13 \pm 0,3
	0,99	25 \pm 0,1	15 \pm 0,1	14 \pm 0,1
	0,98	30 \pm 0,6	18 \pm 0,1	16 \pm 0,3
	0,96	52 \pm 1,3	27 \pm 1	24 \pm 0,3
	0,94	118 \pm 1,1	55 \pm 1	67 \pm 5,6
	0,92	225 \pm 5,9	125 \pm 16,3	135 \pm 4,8
	0,90	> 672 \pm 0	296 \pm 14	331 \pm 31,4

D.E, Desvío estándar.

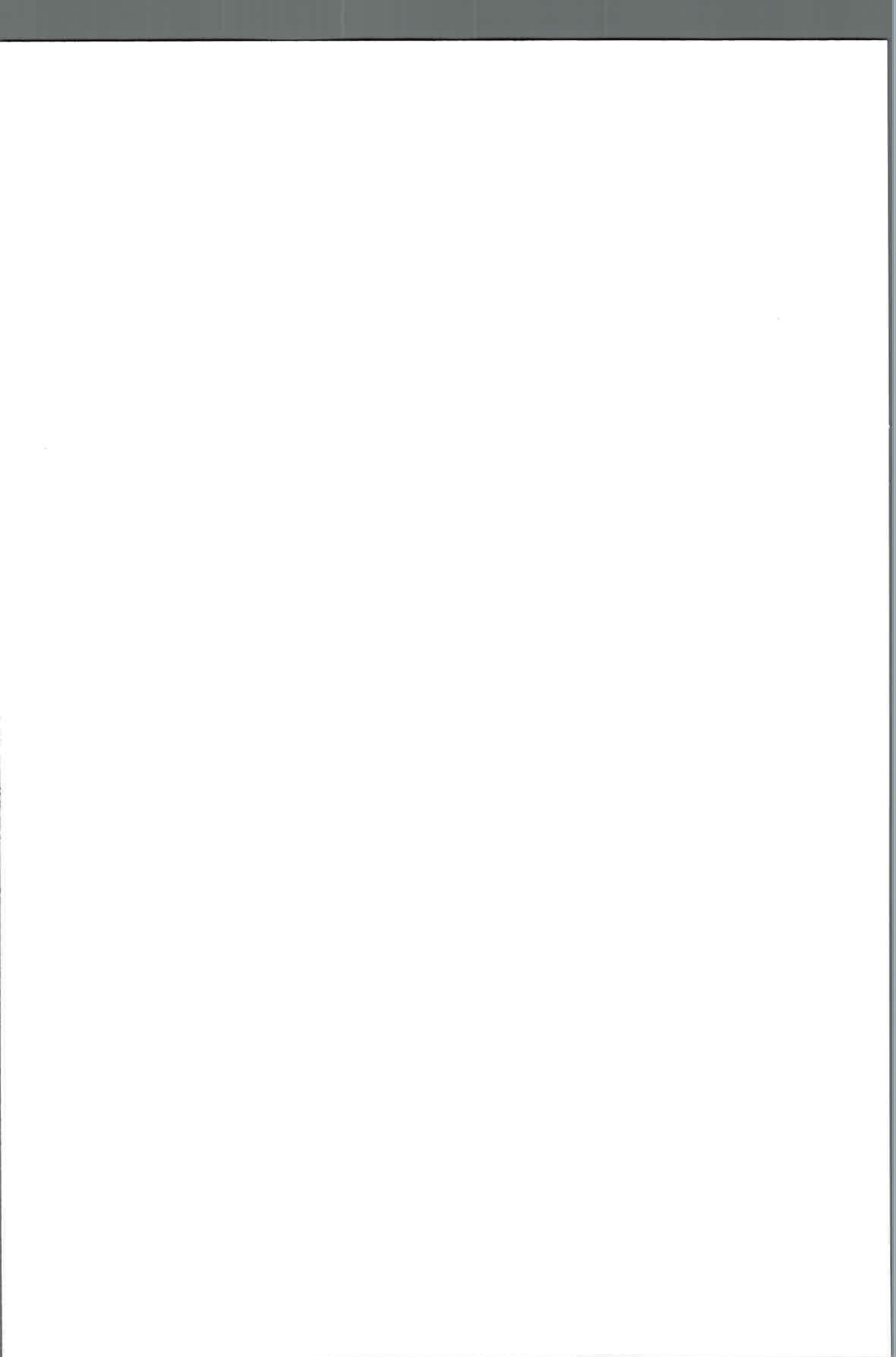


Tabla 5. Análisis de la varianza del efecto de la actividad de agua (a_w), temperatura (T), cepas diferentes (C), y sus interacciones sobre la fase de latencia de cepas de *Fusarium proliferatum* en el medio de cultivo a base de trigo

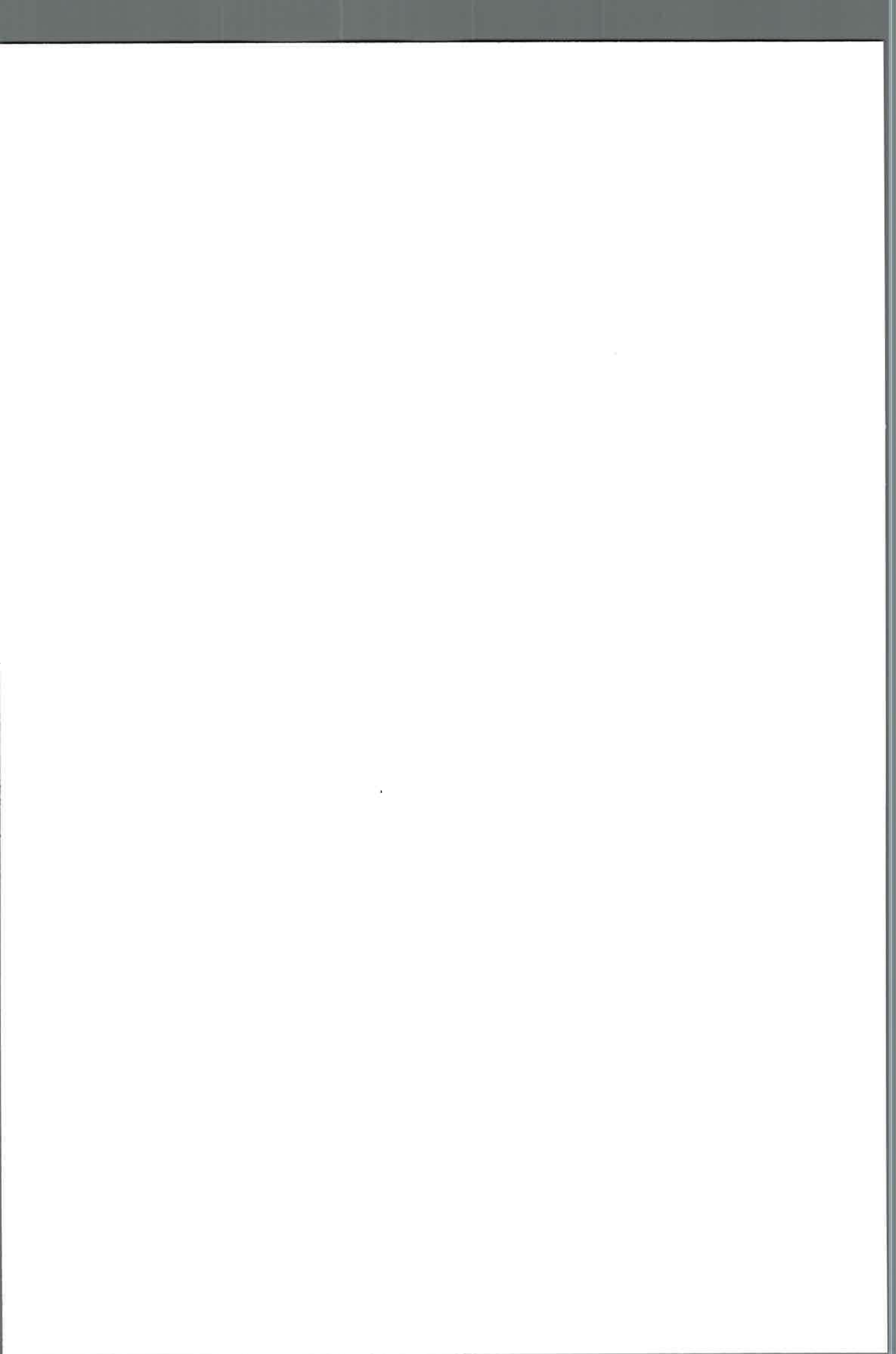
Fuentes de variación	Grados de libertad	Cuadrado medio	F-Snedecor
a_w	6	641578,1	4896,14*
T	2	134923,8	1029,66*
C	2	472	3,6
$a_w \times T$	10	45926,7	350,49*
$a_w \times C$	10	260,3	1,99*
T x C	4	474,4	3,62*
$a_w \times T \times C$	20	277,6	2,12*

* Significativo $p < 0,01$.

Tabla 6. Influencia de la actividad acuosa (a_w), y temperatura (T), sobre la velocidad de crecimiento, la fase de latencia y la producción de fumonisinas por cepas de *Fusarium proliferatum* sobre un medio a base de trigo

Tratamientos	Fase de latencia (hs)	Velocidad de crecimiento (mm/día)	Producción de FB ₁ (µg/g)
Actividad acuosa	Media ± D.E		
0,995	0,51 ± 0,74 ^a	5,80 ± 1,68 ^a	1443 ± 1652 ^a
0,99	0,20 ± 0,16 ^a	5,75 ± 1,38 ^b	2470 ± 2921 ^a
0,98	0,41 ± 0,46 ^a	4,55 ± 1,28 ^c	1687 ± 2579 ^a
0,96	0,87 ± 0,40 ^b	2,98 ± 1,08 ^d	543 ± 791 ^b
0,94	3,03 ± 1,80 ^c	1,30 ± 0,43 ^e	84 ± 2489 ^c
0,92	11,03 ± 9,14 ^d	0,56 ± 0,16 ^f	9 ± 19 ^d
0,90	19,33 ± 19,37 ^e	0,18 ± 0,13 ^g	-
Temperatura °C			
15	1,96 ± 2,81 ^a	2,00 ± 1,51 ^a	760 ± 1959 ^a
25	7,80 ± 13,73 ^b	3,47 ± 2,48 ^b	1479 ± 2315 ^b
30	5,45 ± 10,87 ^b	3,57 ± 2,74 ^c	500 ± 920 ^c

Para cada columna y tratamiento, valores con letras iguales no son significativamente diferente (LSD-Fisher $p > 0,01$).



En cuanto a las velocidades de crecimiento de las 3 cepas de *F. proliferatum* desarrolladas en un medio de cultivo a base de trigo bajo diferentes condiciones de temperatura y a_w , el análisis de la varianza del efecto de un único factor (cepa, a_w y temperatura), dos y tres vías de interacción mostró que todos los factores por sí solos y todas las interacciones fueron estadísticamente significativas sobre la velocidad de crecimiento (Tabla 7). Sin embargo, el principal efecto estuvo dado por la a_w , seguido de la temperatura, y luego por el efecto de la interacción entre estos dos factores, de la misma manera que ocurrió con los valores de fase de latencia. Los análisis a posteriori (LSD-Fisher, $p > 0,01$) para los factores temperatura y a_w , mostraron que todas las condiciones fueron significativamente diferentes entre sí (Tabla 6).

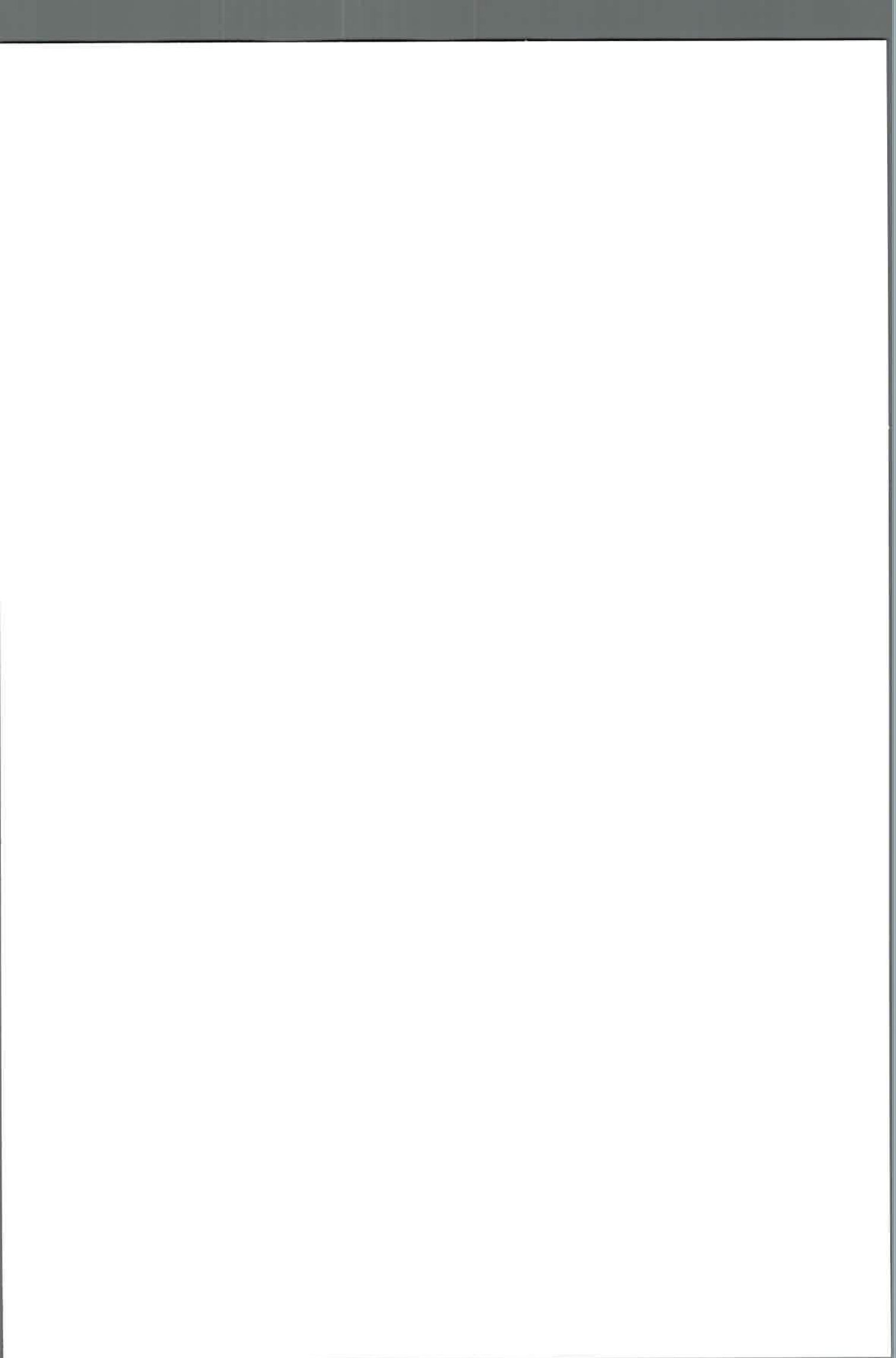
Tabla 7. Análisis de la varianza del efecto de la actividad de agua (a_w), temperatura (T), cepas diferentes (C), y sus interacciones sobre la velocidad de crecimiento de cepas de *Fusarium proliferatum* en un medio de cultivo a base de trigo

Fuentes de variación	Grados de libertad	Cuadrado medio	F-Snedecor
a_w	5	130,57	22954,3*
T	2	61,539	10818,5*
C	2	0,921	161,9*
$a_w \times T$	10	3,932	691,2*
$a_w \times C$	10	0,105	18,4*
T x C	4	0,0942	16,6*
$a_w \times T \times C$	20	0,111	19,5*

* Significativo $p < 0,01$.

Con los datos obtenidos de velocidad de crecimiento de las 3 cepas evaluadas bajo las diferentes condiciones de cultivo, se graficaron mapas de contorno a fin de identificar las velocidades de crecimiento óptimas y marginales para las cepas de *F. proliferatum*, cabe destacar que sólo se muestra el gráfico de contorno obtenido para una sola de las cepas analizadas debido a que las tres cepas presentaron comportamientos semejantes (Figura 1). De esta figura se desprende que los niveles óptimos de a_w para el crecimiento variaron en un rango de 0,995 a 0,96 a una temperatura óptima entre 25 - 30 °C.

La figura 2 muestra detalladamente los datos de las velocidades de crecimiento para cada cepa en cada una de las condiciones ensayadas. La máxima velocidad de crecimiento para todas las cepas analizadas fue a la mayor a_w (0,995) y temperatura ensayada (30 °C), con disminución de la velocidad de crecimiento cuando la



disponibilidad de agua del medio fue reducida. Las tres cepas fueron capaces de crecer a la menor a_w ensayada (0,90) a 25 y 30 °C, pero no se observó crecimiento a esa a_w cuando la temperatura de incubación fue de 15 °C durante los 28 días de incubación. Todas las cepas de *F. proliferatum* evaluadas mostraron comportamientos de crecimiento similares a todas las a_w y temperaturas ensayadas, con la excepción de la cepa ITEM 15664, la cual a 25 °C creció más rápido a una a_w de 0,99 que a 0,995 (Figura 2).

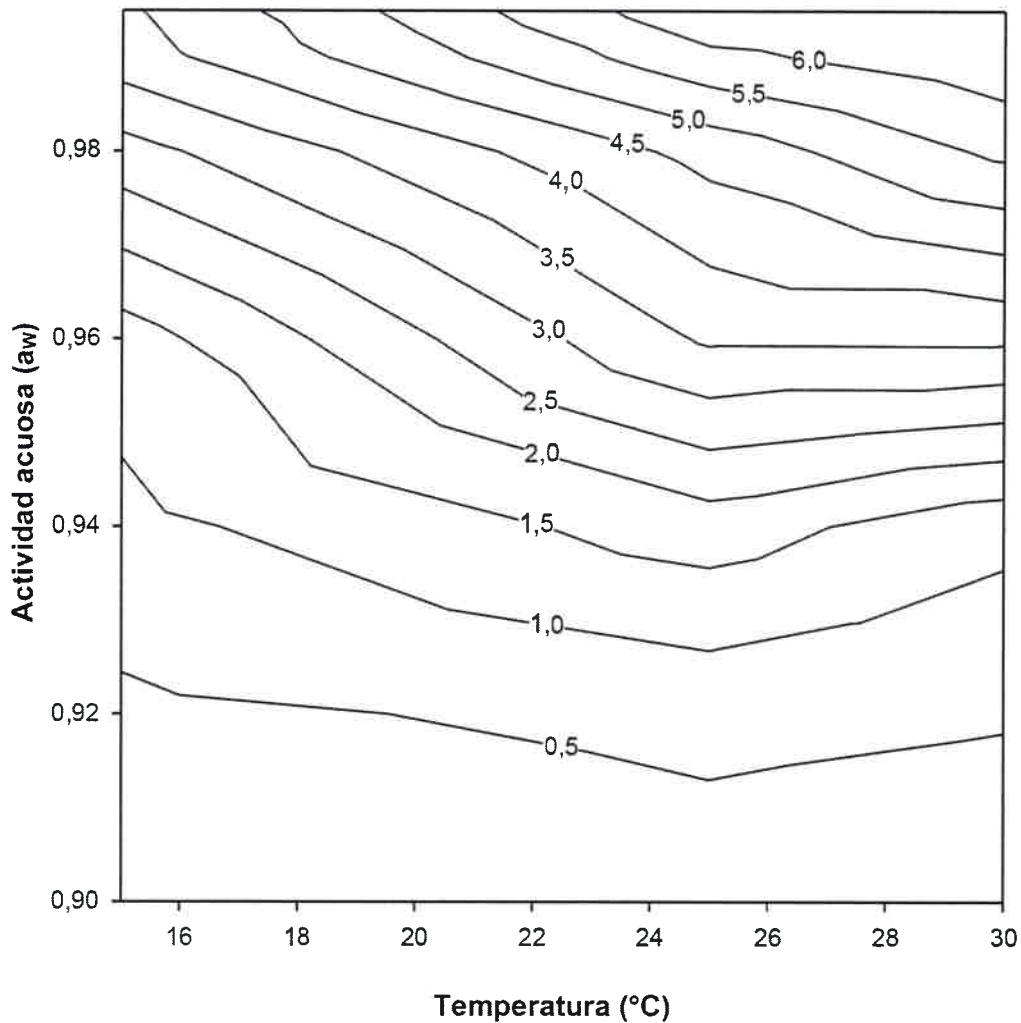
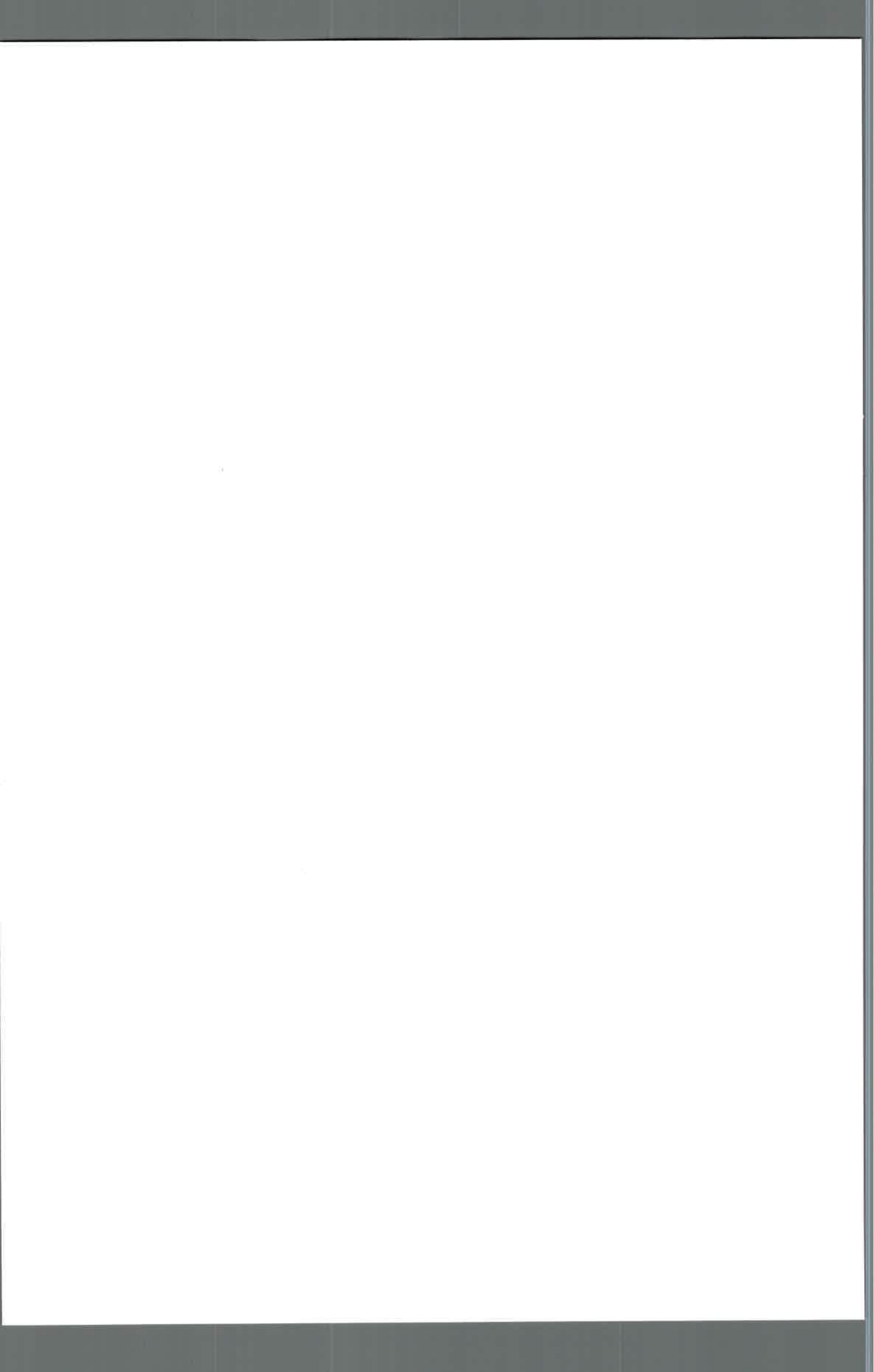


Figura 1. Mapa de contorno de *Fusarium proliferatum* ITEM 15654, en relación a la actividad de agua y a la temperatura. Los números en las líneas de contorno se refieren a la velocidad de crecimiento (mm/día).



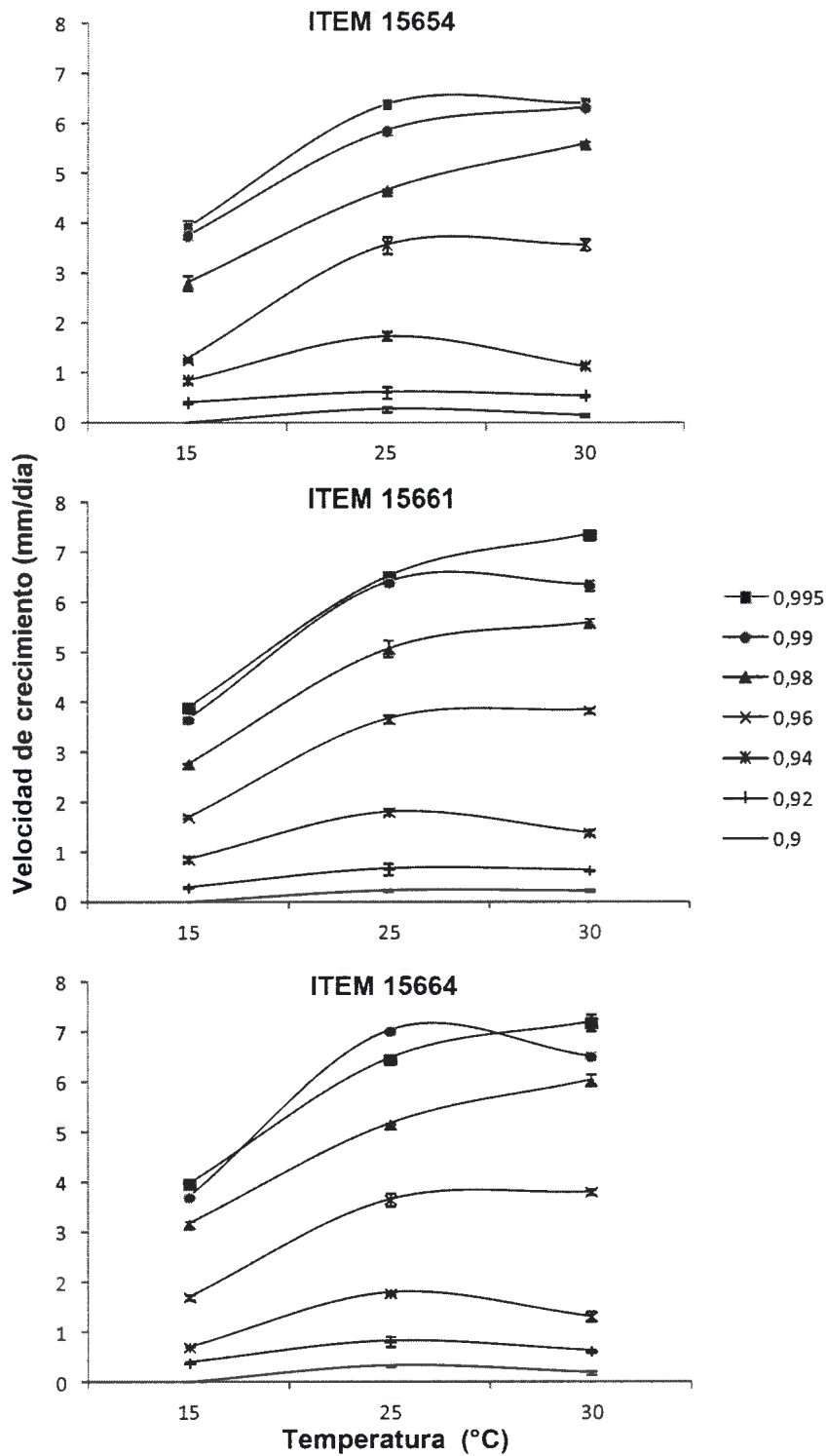
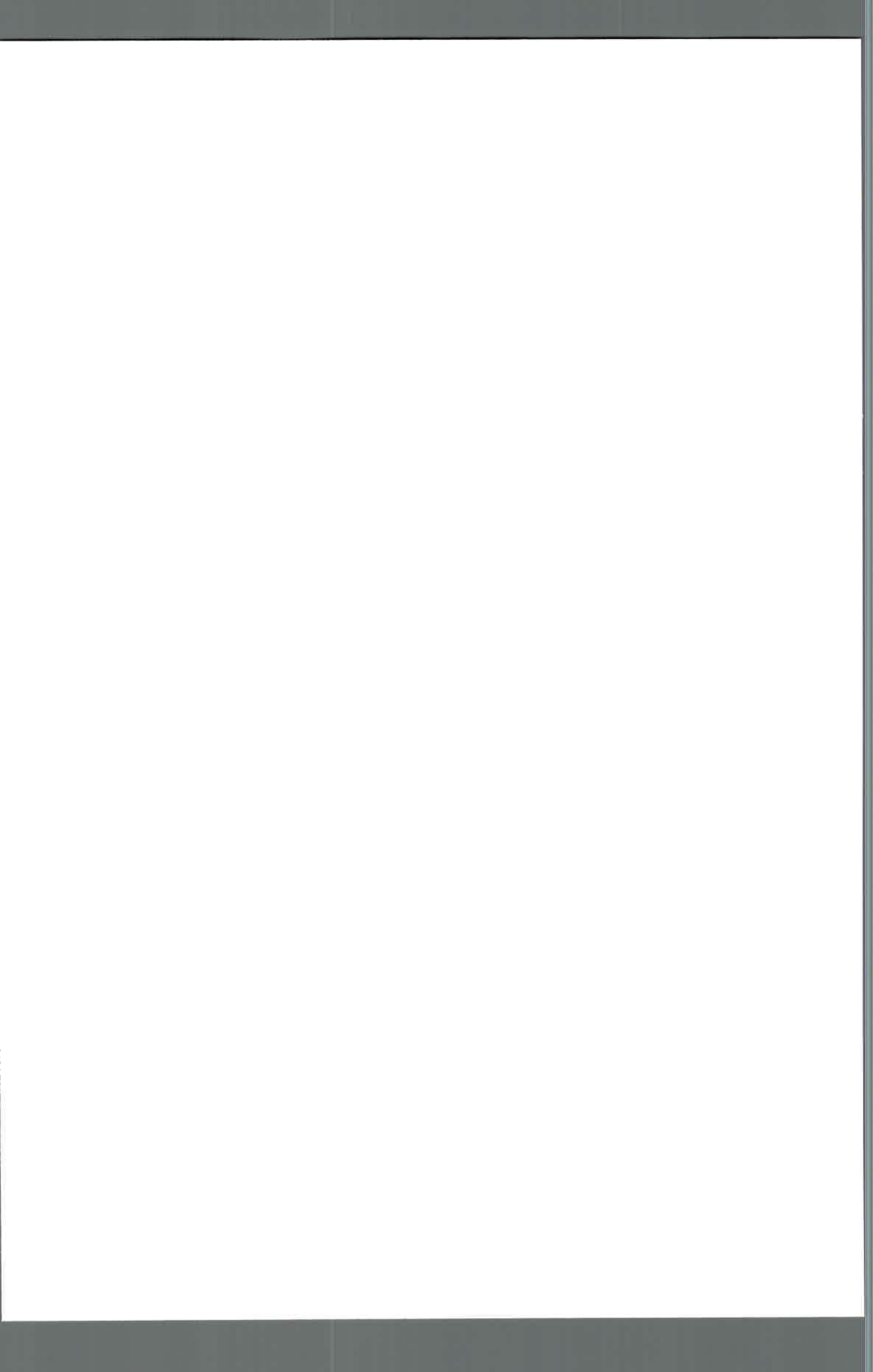


Figura 2. Efecto de la actividad acuosa y la temperatura sobre la velocidad crecimiento (valores medios) de tres cepas de *Fusarium proliferatum*, crecidas en un medio a base de trigo. Las barras de error representan el desvío estándar para los triplicados.



En relación a la producción de fumonisinas, el análisis de varianza de los datos de FB_t transformados (\ln) indicó que todos los factores individuales (a_w , temperatura y días de incubación) así como dos, y tres vías de interacción influenciaron significativamente la producción de FB_t para las 3 cepas de *F. proliferatum* (Tabla 8). De este mismo análisis se desprende que la a_w fue el factor más influyente para la producción de FB_t , independientemente de la cepa estudiada, luego el orden en que influyeron el resto de los factores estuvo sujeto a cada una de las cepas en particular (Tabla 8). Los test a posteriori LSD-Fisher ($p > 0,01$) para el análisis de FB_t mostraron que los máximos niveles de a_w (0,98; 0,99 y 0,995) no fueron significativamente diferentes entre sí, como si lo fueron respecto de los otros niveles de a_w para las tres cepas. Para el caso de los días de incubación, el mismo tipo de análisis indicó que 21 o 28 días de incubación tampoco fueron significativamente diferentes entre sí para las 3 cepas ensayadas (datos no mostrados). Por último, en cuanto a las temperaturas de incubación, las 3 temperaturas analizadas mostraron ser significativamente diferentes para las 3 cepas (Tabla 6).

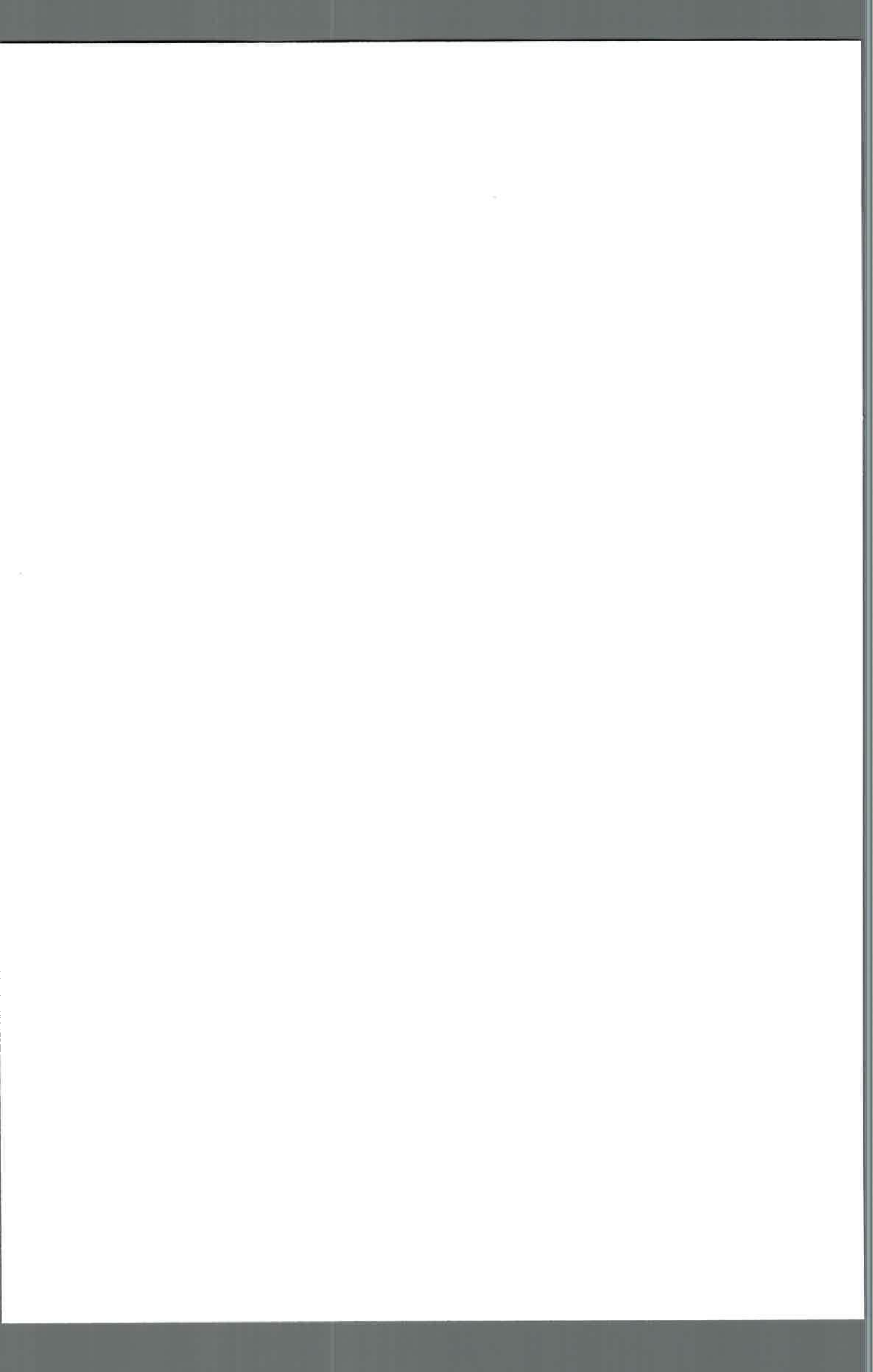
Tabla 8. Análisis de la varianza del efecto de la actividad de agua (a_w), temperatura (T), días de incubación (D), y sus interacciones sobre la producción de fumonisinas totales por 3 cepas de *Fusarium proliferatum* en un medio de cultivo a base de trigo

FV	ITEM 15661			ITEM 15664			ITEM 15654		
	gl	CM	F	gl	CM	F	gl	CM	F
T	2	64,28	76,12*	2	6,57	15,64*	2	129,34	159,43*
a_w	4	124,08	146,9*	4	132,35	315,26*	4	215,32	265,4*
D	3	18,68	22,12*	3	57,74	137,54*	3	133,69	164,78*
T x a_w	8	10,94	12,95*	8	4,48	10,66*	8	8,00	9,86*
T x D	6	10,91	12,92*	6	29,13	69,39*	6	17,30	21,32*
a_w x D	12	4,21	4,99*	12	6,91	16,46*	12	11,37	14,02*
T x a_w x D	24	3,71	4,39*	24	1,73	4,12*	24	5,21	6,43*

FV, Fuente de variación; gl, Grados de libertad; CM, Cuadrado medio; F, F-Snedecor;

*Significativo $p < 0,01$.

Con los datos obtenidos de la producción de fumonisinas por las cepas evaluadas se graficaron mapas de contorno, a fin de identificar las condiciones óptimas de a_w y temperatura, y el rango de las condiciones para la producción de fumonisinas (Figura 3). De este gráfico pueden leerse dos situaciones diferentes: en un caso, la máxima

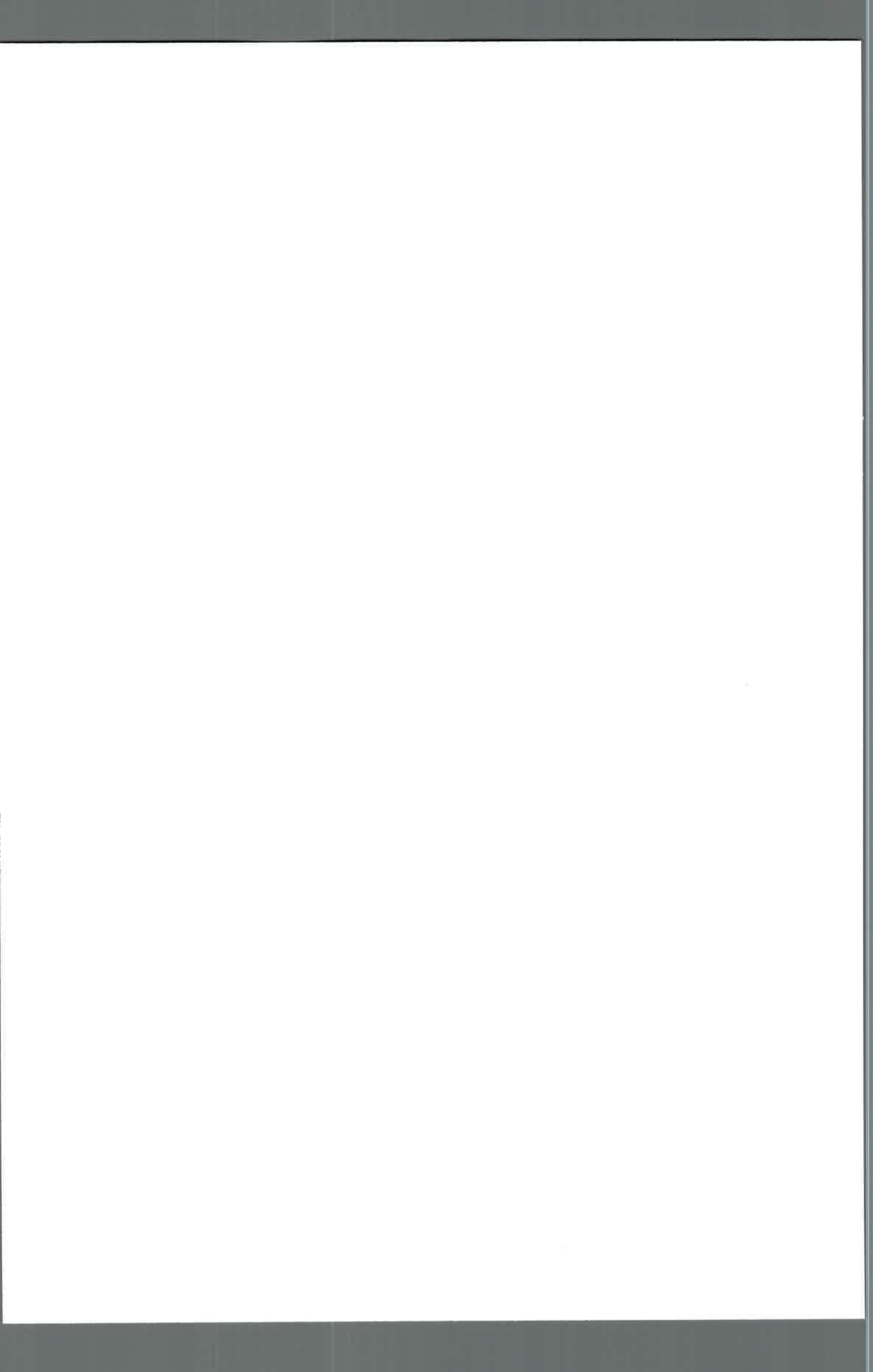


producción de fumonisinas ocurre a 15 °C y a 0,98 de a_w (Figura 3 B), mientras que en la otra situación los niveles máximos de fumonisinas se observan a 25 °C y a 0,99 de a_w (Figura 3 A), en este caso se muestran sólo dos gráficos de contorno (de dos cepas) a los fines de observar los dos comportamientos diferentes. En ambas figuras el efecto de la a_w es muy claro, y puede observarse que a medida que éste parámetro disminuye, también se ve disminuida la producción total de fumonisinas.

Las figuras 4, 5 y 6 muestran los niveles de producción de fumonisinas (FB_1 , FB_2 , FB_3 y FB_t) para las 3 cepas de *F. proliferatum* evaluadas bajo las diferentes condiciones de incubación previamente descritas. Como resultado general, no se observó producción de fumonisinas a 0,90 de a_w en todas las temperaturas evaluadas durante los 28 días de incubación, mientras que la producción máxima de fumonisinas totales (FB_1 , FB_2 y FB_3) se observó a 25 °C y a 0,99 a_w después de 21 y 28 días de incubación para las cepas ITEM 15664 y 15661 respectivamente, y a 15 °C y a una a_w de 0,98, después de 28 días de incubación para la cepa ITEM 15654. En general, se observó que los niveles de toxinas producidas por la cepa ITEM 15664 fueron superiores a los producidos por las otras cepas evaluadas, a todas las temperaturas ensayadas.

Teniendo en cuenta la temperatura de incubación, encontramos dos comportamientos diferentes entre las cepas evaluadas. La producción de fumonisinas totales (FB_t) fue mayor a 25 °C, decreciendo en el siguiente orden: 15 y 30 °C para las cepas ITEM 15661 y 15664, respectivamente. Mientras que para la cepa ITEM 15654 la producción de FB_t fue mayor a 15 °C, decreciendo en el siguiente orden: 25 y 30 °C, respectivamente.

Las cepas bajo estudio mostraron tener diferentes perfiles de producción de fumonisinas. Las cepas ITEM 15661 y 15664 fueron capaces de producir FB_1 y FB_2 . Por otro lado, la cepa ITEM 15654 mostró capacidad de producir FB_1 , FB_2 y FB_3 . Es importante destacar que los perfiles de producción de cada tipo de fumonisina para cada cepa en particular estuvieron sujetos a las temperaturas de incubación ensayadas (Figuras 4, 5 y 6). La cepa de *F. proliferatum* ITEM 15664 a 25 y 15 °C produjo principalmente FB_2 , sin embargo, a 30 °C produjo principalmente FB_1 .



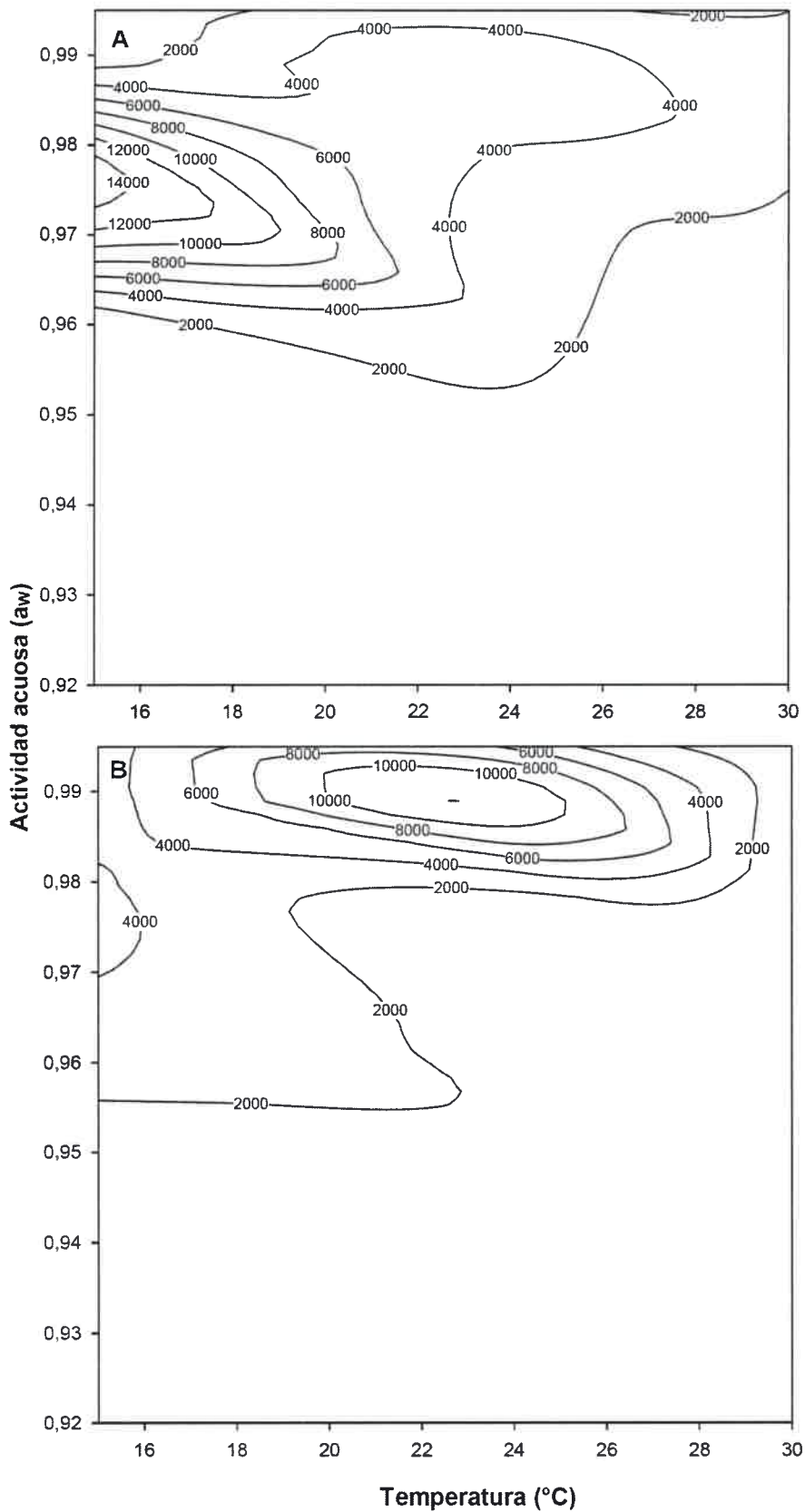
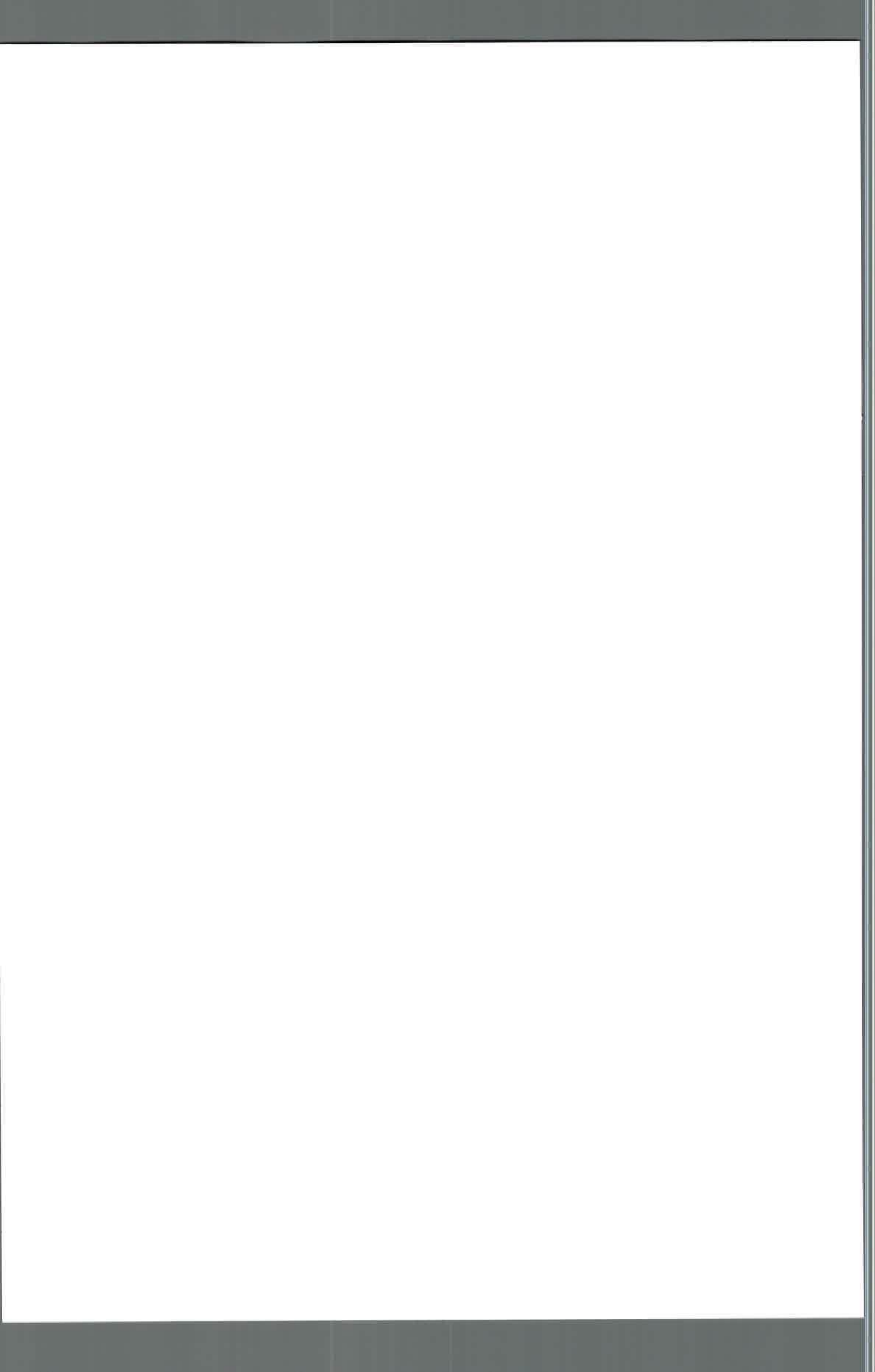


Figura 3. Mapas de contorno de *Fusarium proliferatum* 15654 (A), ITEM 15664 (B) y, en relación a la actividad de agua y a la temperatura. Los números en las líneas de contorno se refieren a las concentraciones medias de fumonisinas totales (µg/g).



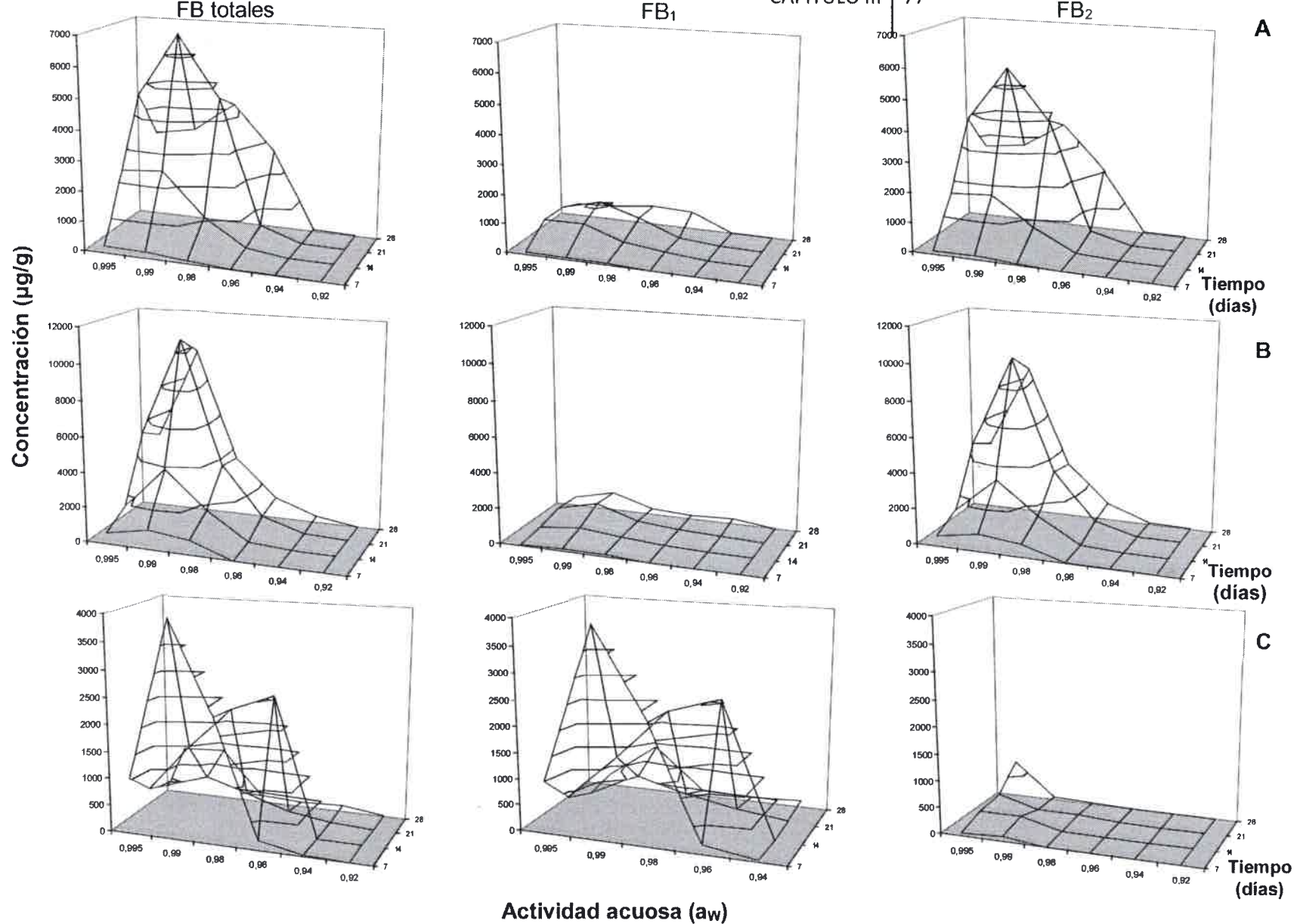
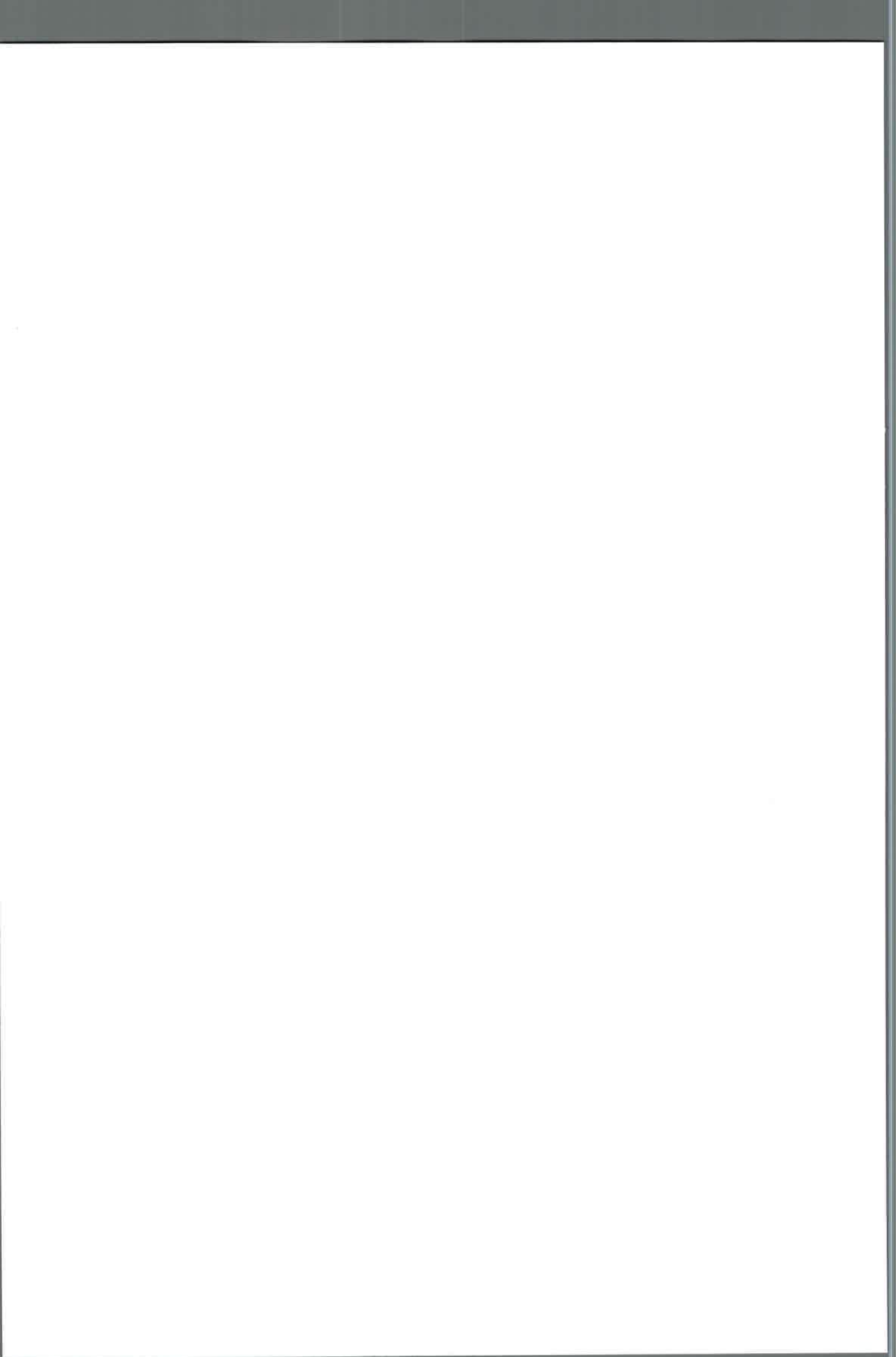


Figura 4. Valores medios de fumonisinas producidas por *Fusarium proliferatum* ITEM 15664 en un medio de cultivo a base de trigo ajustado a diferentes niveles de actividad acuosa e incubadas a: (A) 15 °C; (B) 25 °C y (C) 30 °C.



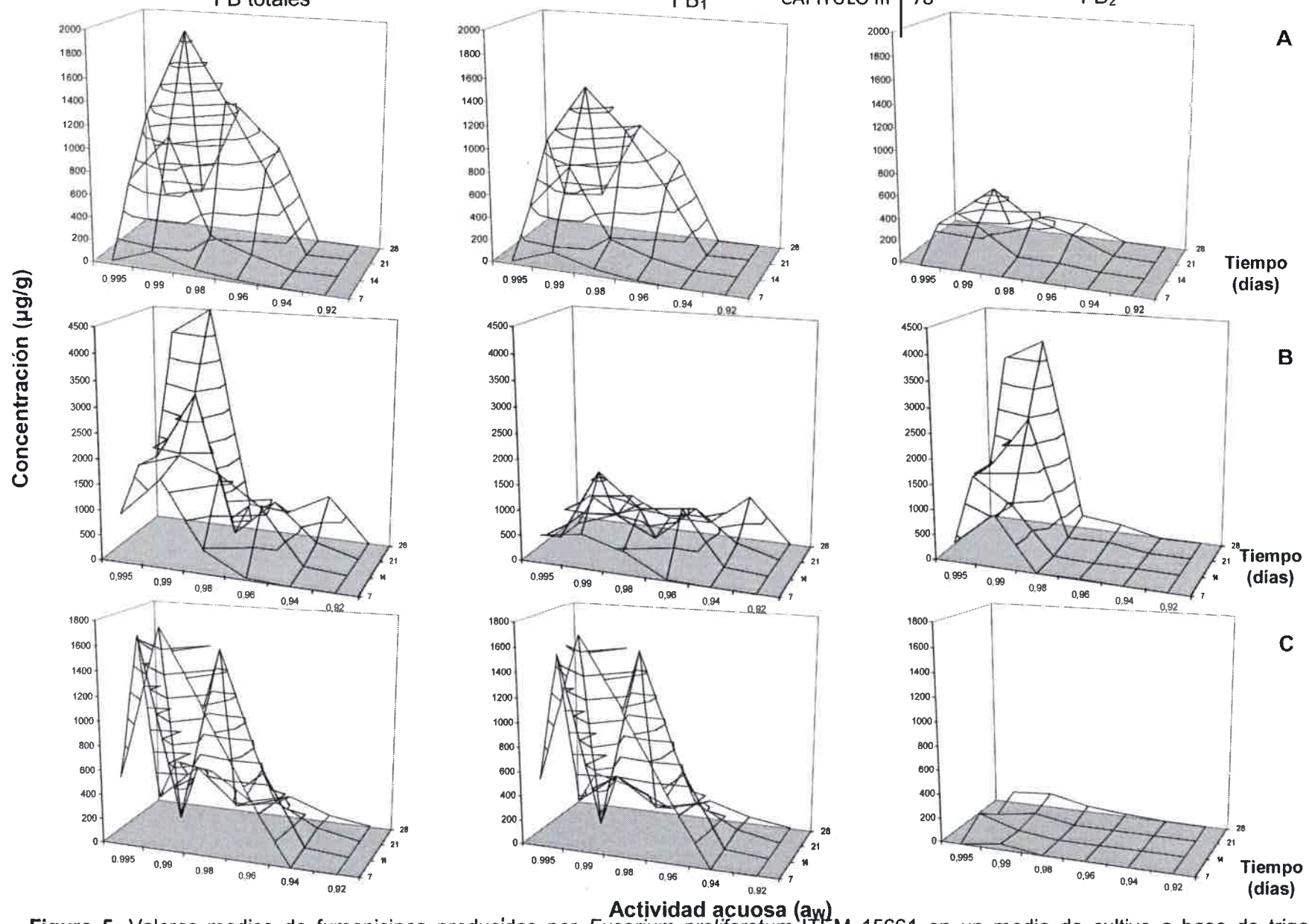
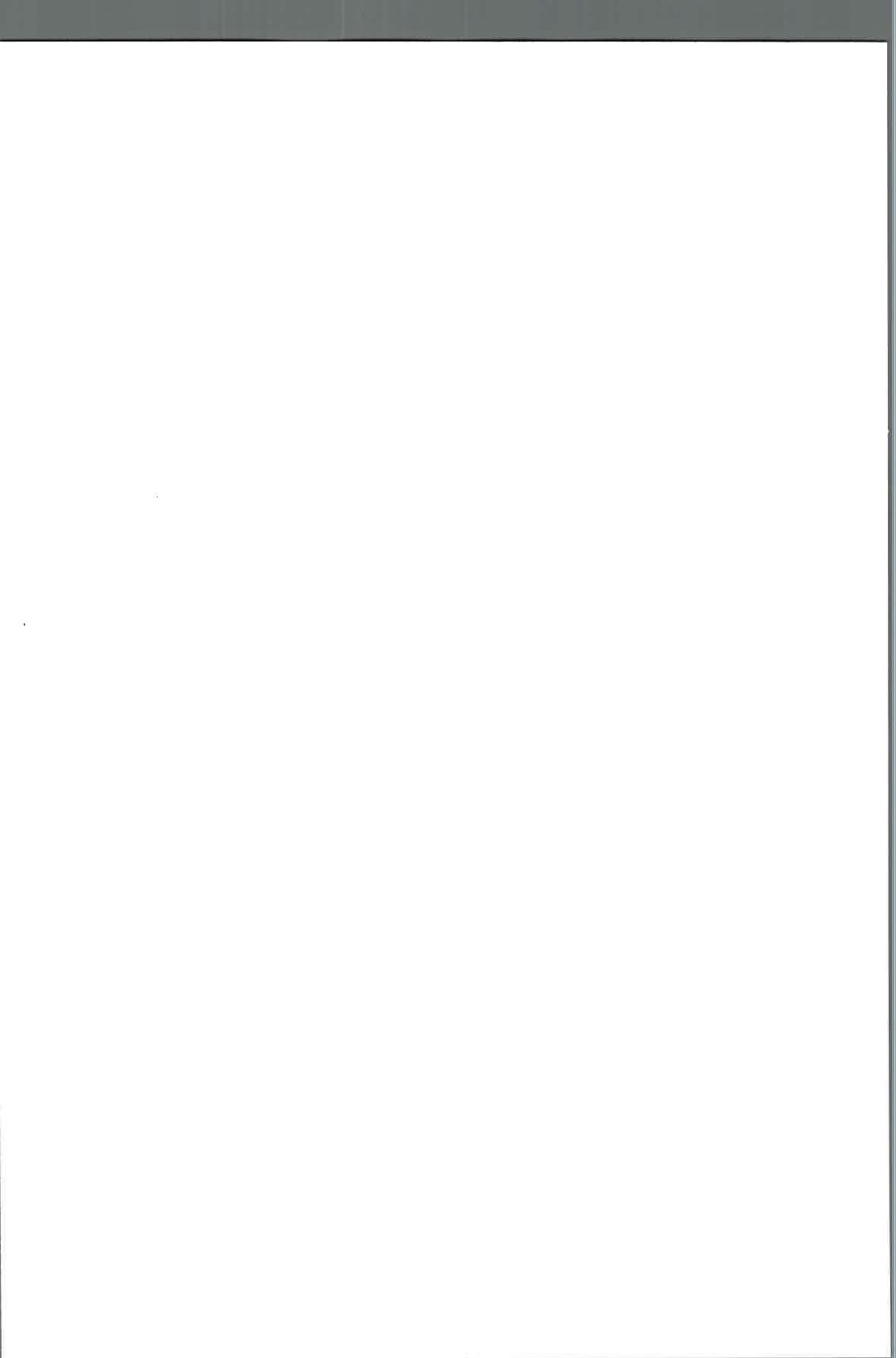


Figura 5. Valores medios de fumonisin producidas por *Fusarium proliferatum* ITEM 15661 en un medio de cultivo a base de trigo ajustado a diferentes niveles de actividad acuosa e incubadas a: (A) 15 °C; (B) 25 °C y (C) 30 °C.



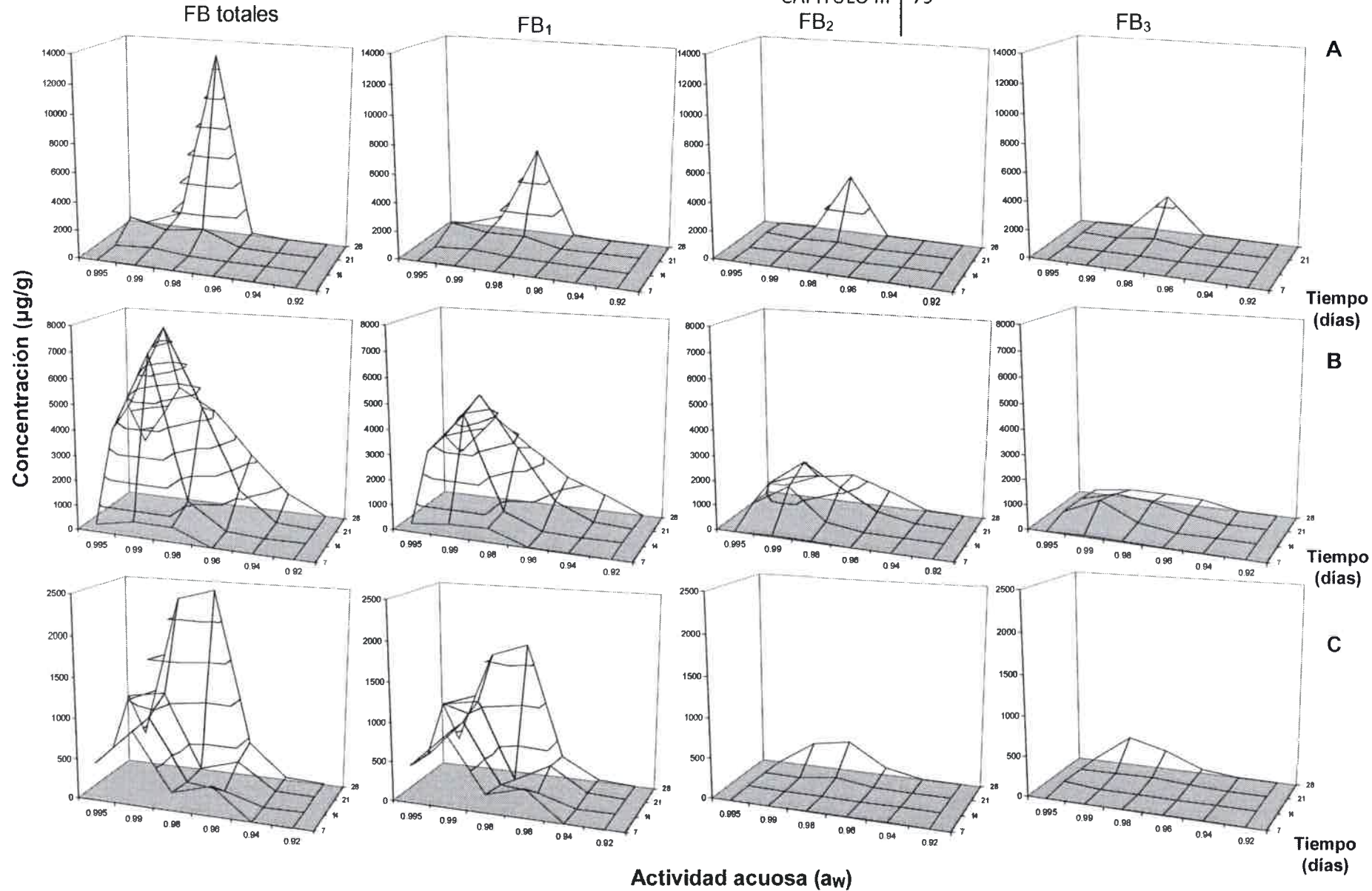
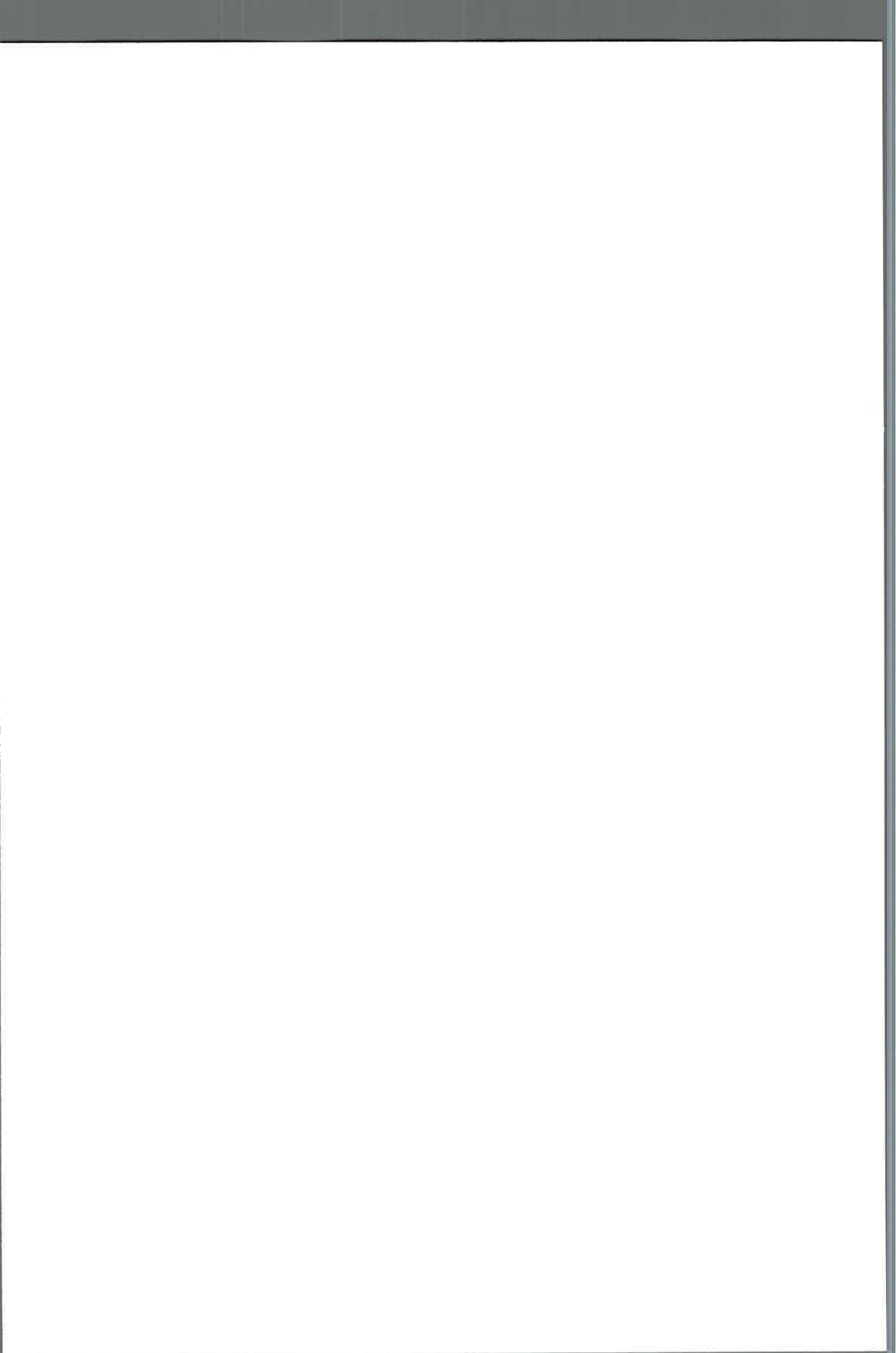


Figura 6. Valores medios de fumonisinas producidas por *Fusarium proliferatum* ITEM 15654 en un medio de cultivo a base de trigo ajustado a diferentes niveles de actividad acuosa e incubadas a: (A) 15 °C; (B) 25°C y (C) 30 °C.



III.2. Influencia de factores abióticos (actividad acuosa y temperatura) sobre el crecimiento y la producción de fumonisinas por cepas de *Fusarium proliferatum*, aisladas de granos de trigo, en granos de trigo irradiados

Se ha sugerido que la fuente de nutrientes puede influir en la a_w mínima para el crecimiento (Griffin, 1972) y, por lo tanto, los estudios sobre sustratos artificiales no reflejan con exactitud la capacidad de crecimiento sobre sustratos naturales (Magan y Lacey, 1984b). Por esta razón, se llevó a cabo el presente estudio sobre granos de trigo irradiados, para que de esta manera se pudiera obtener información específica sobre la relación entre los patrones de colonización y la producción de micotoxinas, en este sustrato.

En cuanto a los resultados obtenidos del ensayo realizado sobre los granos de trigo irradiados, los resultados de las fases de latencia de las 3 cepas de *F. proliferatum* crecidas bajo diferentes condiciones de a_w y de temperatura se resumen en la tabla 9. De la misma manera que se observó en el ensayo realizado con las mismas cepas en un medio de cultivo a base de trigo, las 3 cepas de *F. proliferatum* analizadas mostraron un comportamiento similar, de hecho, de la tabla 10 se desprende que el efecto cepa no fue estadísticamente significativo en el análisis de ANOVA, cómo sí lo fueron los factores a_w , temperatura, y algunas de las interacciones (a_w x temperatura, a_w x cepa, a_w x cepa x temperatura). Los factores que más influencia tuvieron en estos resultados, según el análisis de varianza fueron la temperatura y la a_w (Tabla 10). Las fases de latencia fueron más cortas (< 24 hs) a 25 y 30 °C, y entre los niveles de 0,995; 0,98 y 0,96 de a_w . El análisis a posteriori de los datos de a_w , indicó que no fueron significativamente distintos los valores de a_w 0,995 y 0,98 (LSD-Fisher, $p > 0,01$), mientras que el mismo análisis indicó que todas las temperaturas fueron significativamente diferentes entre sí ($p > 0,01$) (Tabla 11). A la menor temperatura evaluada (15 °C) y a medida que los valores de a_w disminuyeron por debajo de 0,96, las fases de latencia se incrementaron considerablemente (Tabla 9). Sin embargo, a 15 °C y a 0,98 de a_w se encuentra la fase de latencia más corta. Estos resultados son similares a aquellos observados en el ensayo realizado con las mismas cepas utilizando un medio de cultivo a base de trigo.

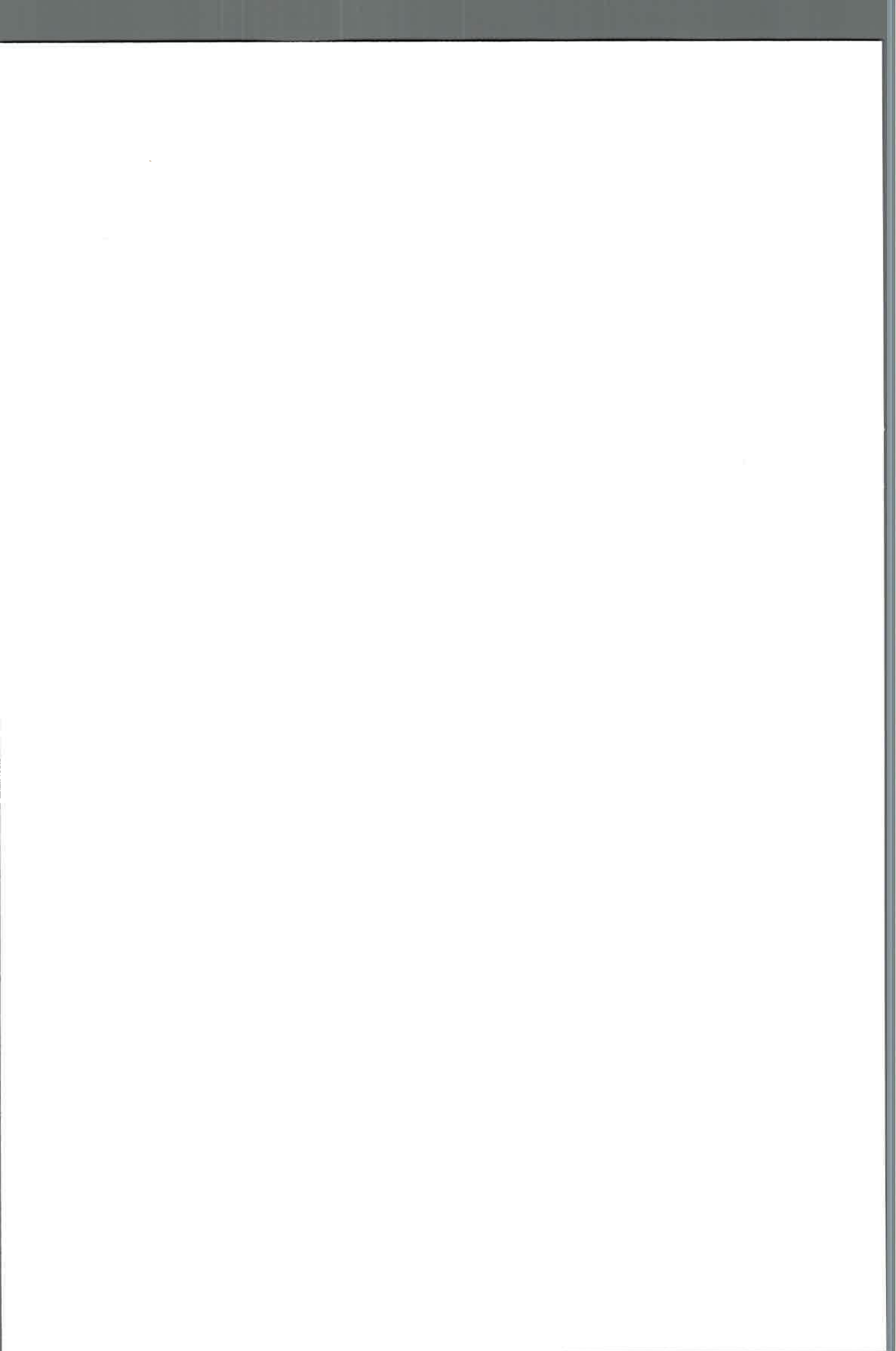


Tabla 9. Relación entre la temperatura y la actividad de agua (a_w) sobre la fase de latencia (hs) de cepas de *Fusarium proliferatum* en granos de trigo irradiados

Cepa (ITEM)	a_w	Fase de latencia (hs) \pm D.E		
		15 °C	25 °C	30 °C
15654	0,995	61,7 \pm 3,3	15,2 \pm 2,3	19,8 \pm 2,7
	0,98	6,8 \pm 3,5	18,2 \pm 0,9	27,4 \pm 4,9
	0,96	18,7 \pm 1,4	22,7 \pm 4,2	22,3 \pm 0,9
	0,945	41,7 \pm 5,9	47,6 \pm 7,7	35,7 \pm 4,5
	0,92	108,8 \pm 8,6	92,4 \pm 22,5	60,5 \pm 9,5
	0,88	>672 \pm 0	>672 \pm 0	>672 \pm 0
15661	0,995	36,5 \pm 1,6	18,4 \pm 2,4	12 \pm 2,4
	0,98	31,2 \pm 2,3	13,8 \pm 2,4	17,5 \pm 1,8
	0,96	36,9 \pm 1,6	23,4 \pm 1,9	22,6 \pm 2,8
	0,945	52,4 \pm 1,5	26,3 \pm 3,5	32,5 \pm 4
	0,92	81,4 \pm 4	42 \pm 4,2	57,8 \pm 2,2
	0,88	>672 \pm 0	>672 \pm 0	>672 \pm 0
15664	0,995	33,5 \pm 1,4	14,1 \pm 1,4	16,7 \pm 1,1
	0,98	30 \pm 3,2	10,6 \pm 1	19,8 \pm 1,1
	0,96	39,7 \pm 0,8	14,2 \pm 2,6	17,3 \pm 2,5
	0,945	59,1 \pm 9,5	24,2 \pm 2,5	30,3 \pm 3,9
	0,92	84 \pm 5	37 \pm 8,6	45,8 \pm 3,6
	0,88	>672 \pm 0	>672 \pm 0	>672 \pm 0

D.E, Desvío estándar.

Tabla 10. Análisis de la varianza del efecto de la actividad de agua (a_w), temperatura (T), cepas diferentes (C), y sus interacciones sobre la fase de latencia de cepas *Fusarium proliferatum* en granos de trigo irradiados

Fuentes de variación	Grados de libertad	Cuadrado medio	F-Snedecor
a_w	4	7731,8	262,3*
T	2	7819,8	265,3*
C	2	135,9	4,61
$a_w \times T$	8	827	28,1*
$a_w \times C$	8	200,3	6,8*
T \times C	4	87,9	3
$a_w \times T \times C$	16	245,7	8,3*

* Significativo $p < 0,01$.

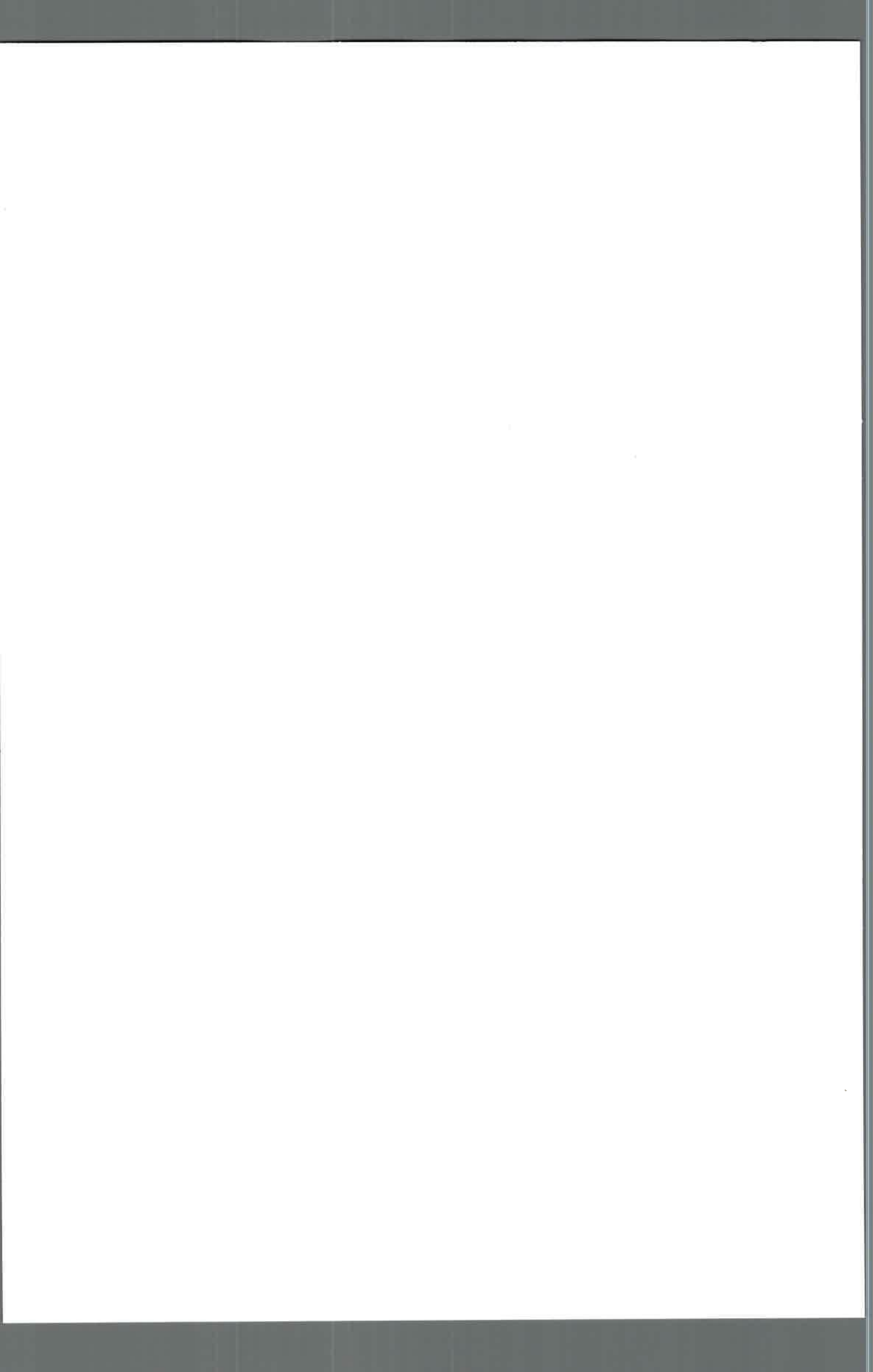


Tabla 11. Influencia de la actividad acuosa (a_w) y de la temperatura (T) sobre la fase de latencia, la velocidad de crecimiento y la producción de fumonisinas totales por cepas de *Fusarium proliferatum* sobre granos de trigo irradiados

Tratamientos	Fase de latencia (hs)	Velocidad de crecimiento (mm/día)	Producción de FB _t (ng/g)		
			Media ± D.E		
Actividad acuosa (a_w)			ITEM 15661	ITEM 15664	ITEM 15654
0,995	25,7 ± 15 ^a	4,1 ± 1,5 ^a	15258 ± 3258 ^a	5305 ± 4342 ^a	4933 ± 6424 ^a
0,98	19 ± 8,9 ^a	3,9 ± 1,5 ^b	7679 ± 12925 ^b	3278 ± 3503 ^{ab}	2890 ± 1424 ^{ab}
0,96	24,1 ± 8,4 ^b	3,6 ± 1,4 ^c	7502 ± 4694 ^{bc}	2652 ± 3835 ^{bc}	2208 ± 3685 ^{bc}
0,94	37,3 ± 13 ^c	2,3 ± 0,8 ^d	318 ± 466 ^c	44 ± 48 ^c	59 ± 32 ^c
0,92	61,3 ± 25 ^d	1,0 ± 0,3 ^e	16 ± 11 ^c	9 ± 6 ^c	29 ± 23 ^c
Temperatura					
15 °C	48,3 ± 27 ^a	1,6 ± 0,7 ^a	15261 ± 19013 ^a	4181 ± 4056 ^a	881 ± 873 ^a
25 °C	23 ± 10 ^b	3,9 ± 1,6 ^b	604 ± 551 ^b	2574 ± 3665 ^a	4277 ± 5759 ^b
30 °C	29,2 ± 15 ^c	3,6 ± 1,6 ^c	53 ± 97 ^b	17 ± 19 ^b	913 ± 1185 ^a

D.E, Desvío estándar. Para cada columna y tratamiento valores con letras iguales no son significativamente diferentes (LSD-Fisher $p > 0,01$).

En cuanto a las velocidades de crecimiento de las 3 cepas de *F. proliferatum* desarrolladas en placas con granos de trigo irradiados bajo diferentes condiciones de temperatura y de actividad de agua, el análisis de la varianza del efecto de un único factor (cepa, a_w y temperatura), dos y tres vías de interacción mostró que todos los factores por sí solos y todas las interacciones fueron estadísticamente significativas sobre la velocidad de crecimiento (Tabla 12). Sin embargo, el principal efecto fue dado por la temperatura, seguido de la a_w (aunque entre estos dos factores no hubo mayores diferencias, es decir que ambos fueron prácticamente igualmente significativos, en comparación con el resto de los factores e interacciones), y luego por el efecto de la interacción entre estos dos factores, de la misma manera que ocurrió con los valores de fase de latencia. Los análisis a posteriori (LSD-Fisher, $p > 0,01$) para los factores temperatura y a_w , mostraron que todas las condiciones fueron significativamente diferentes entre sí.

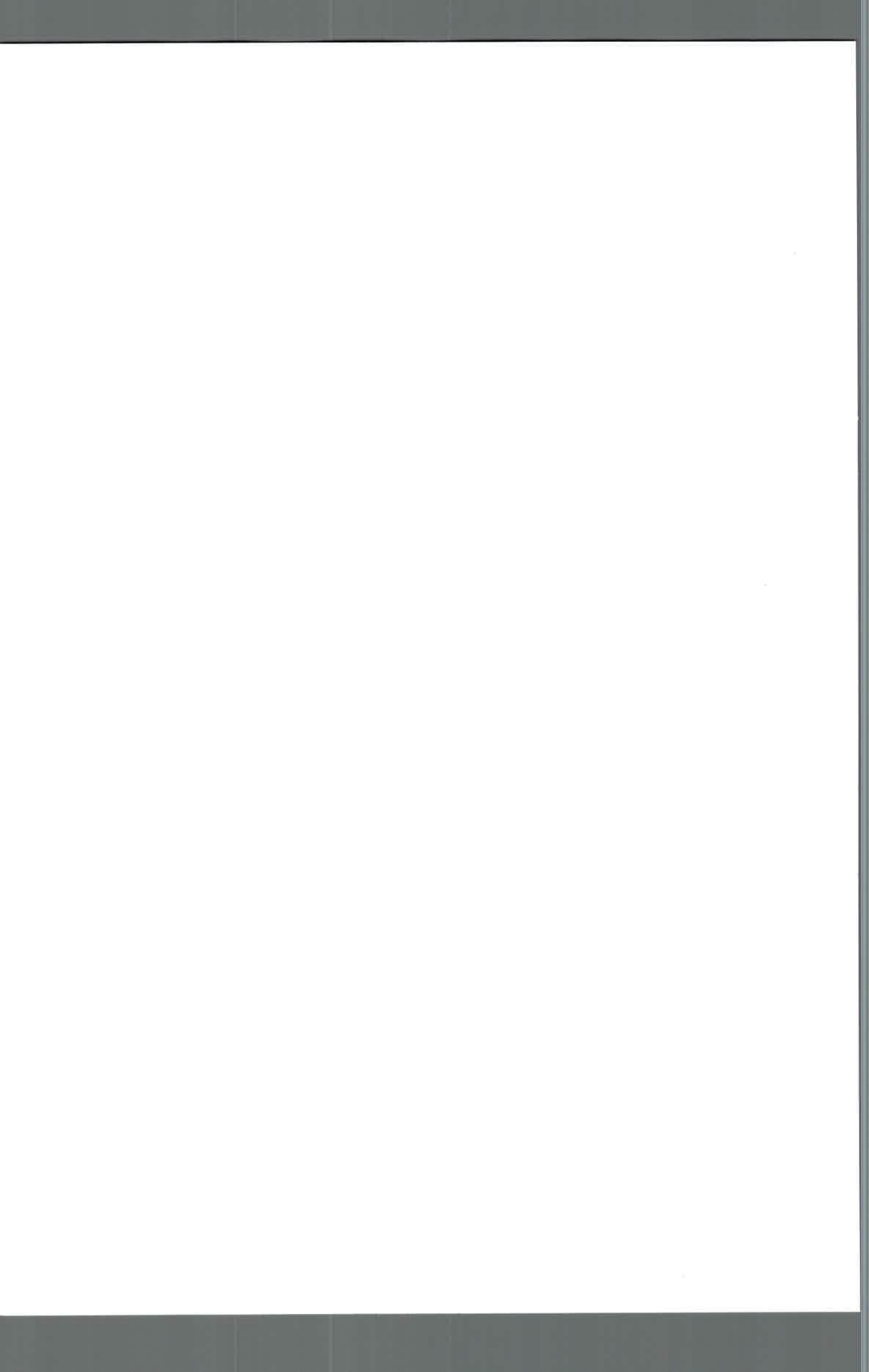


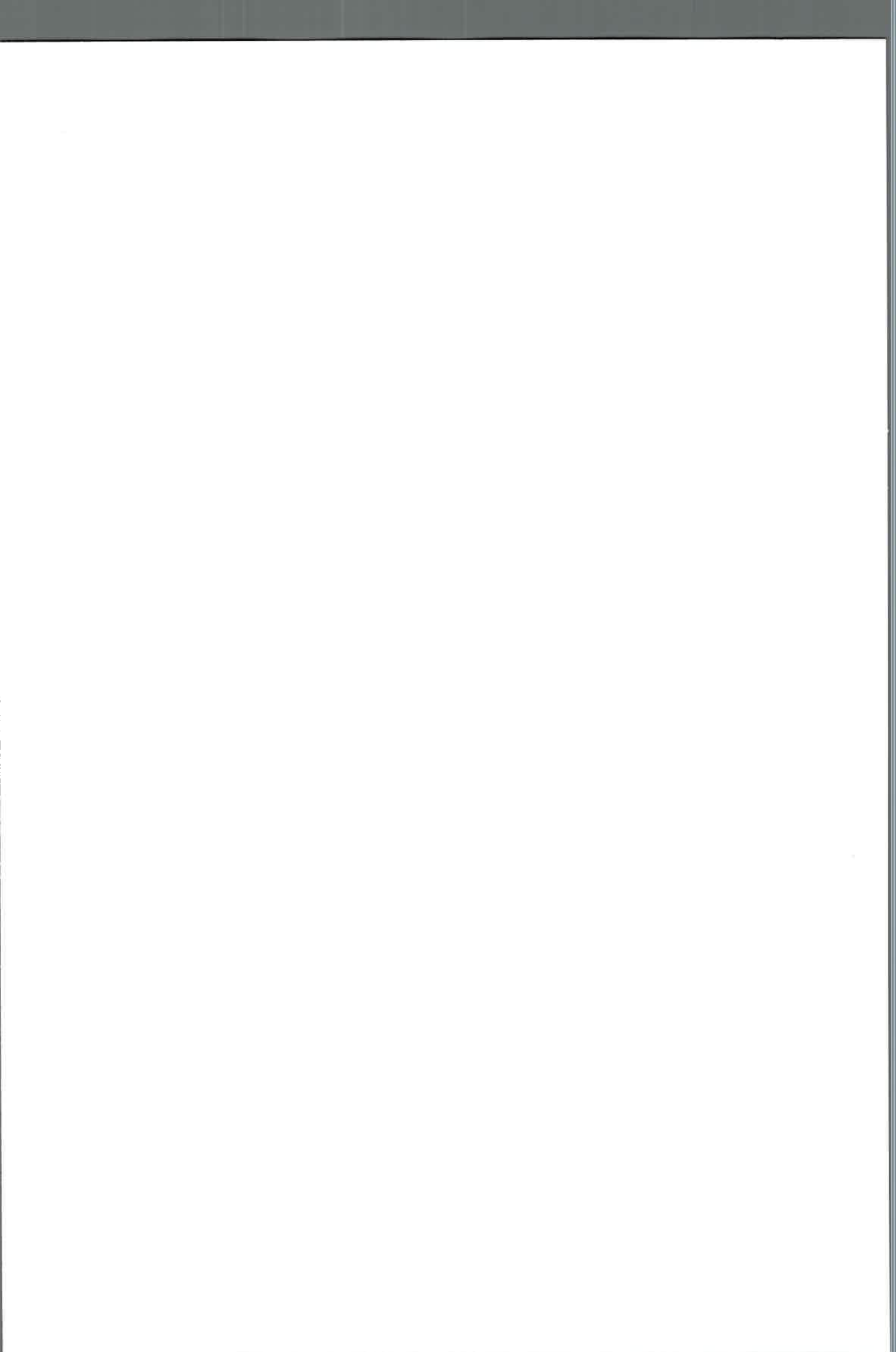
Tabla 12. Análisis de la varianza del efecto de la actividad de agua (a_w), temperatura (T), cepas diferentes (C), y sus interacciones sobre el crecimiento de cepas de *Fusarium proliferatum* en granos de trigo irradiados

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrado medio	F-Snedecor
C	2	3,117	213,748*
T	2	69,69	4779,686*
a_w	4	47,61	3265,318*
C x T	4	1,058	72,567*
C x a_w	8	0,178	12,192*
T x a_w	8	4,625	317,207*
C x T x a_w	16	0,182	12,508*

* Significativo $p < 0,01$.

Con los datos obtenidos de la evaluación del efecto de los factores abióticos (a_w y temperatura) sobre el crecimiento de las 3 cepas de *F. proliferatum* en granos de trigo irradiados, se graficaron mapas de contorno a los fines de identificar las velocidades de crecimiento óptimas y marginales, y al igual que en los resultados del ensayo realizado en medio de cultivo, sólo se muestra un gráfico de contorno a modo ilustrativo, ya que los gráficos para las 3 cepas fueron similares (Figura 7). De este figura se concluye que los niveles óptimos de a_w para el crecimiento variaron en un rango de 0,995 a 0,96 a una temperatura óptima de entre 25 - 30 °C, con disminución de la velocidad de crecimiento cuando la disponibilidad de agua de los granos fue reducida y cuando la temperatura también disminuyó, de la misma manera que había sido observado previamente para las cepas crecidas en el medio de cultivo a base de trigo.

La figura 8 muestra como variaron las velocidades de crecimiento para cada una de las cepas bajo las diferentes condiciones ensayadas. Las condiciones en las que se observó la máxima velocidad de crecimiento en todas las cepas analizadas fueron a la máxima a_w (0,995) y a 25 °C, mientras que ninguna de las tres cepas fueron capaces de crecer a la menor a_w ensayada (0,88) a ninguna de las 3 temperaturas de incubación evaluadas. Sin embargo, a 30 °C las tres cepas mostraron su mayor velocidad de crecimiento a una a_w de 0,98 decreciendo en el siguiente orden: 0,995; 0,96; 0,94 y 0,92. A 15 °C todas las velocidades de crecimiento fueron menores comparadas con las de las otras temperaturas ensayadas. En líneas generales todas las cepas de *F. proliferatum* evaluadas mostraron comportamientos de crecimiento similares a todas las a_w y temperaturas ensayadas.



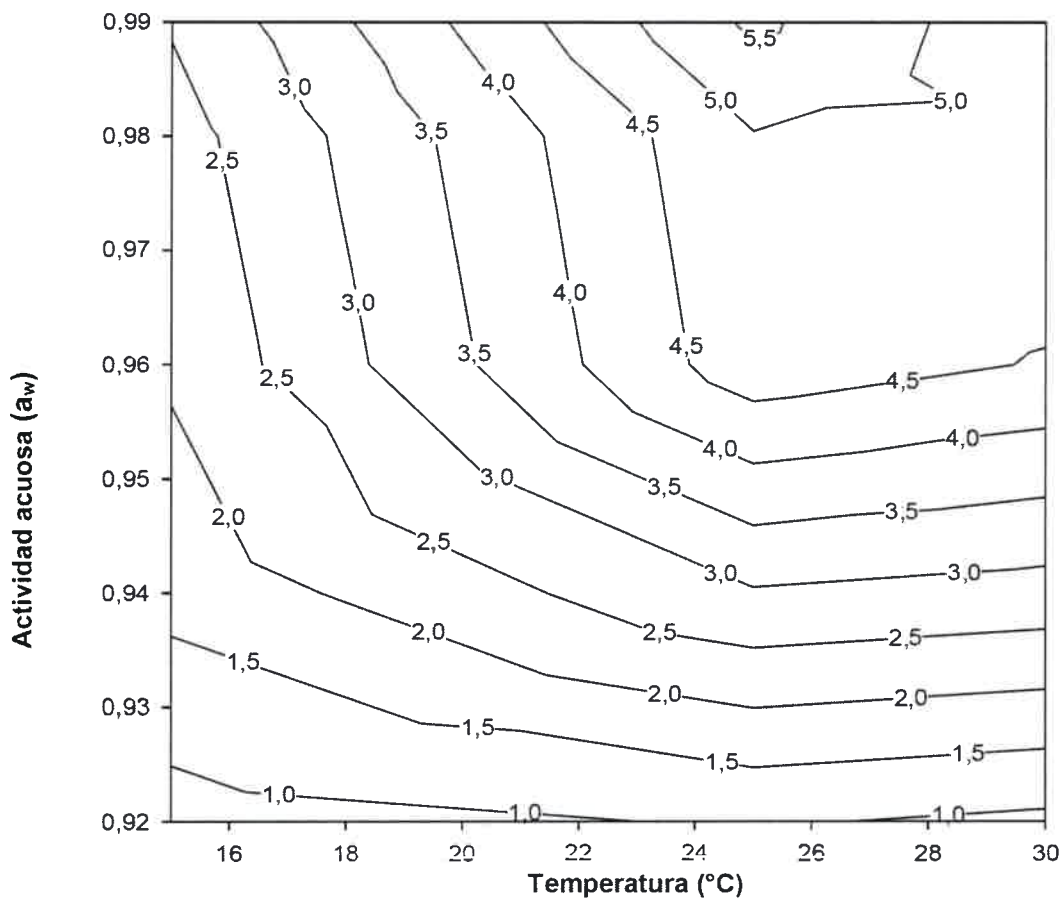
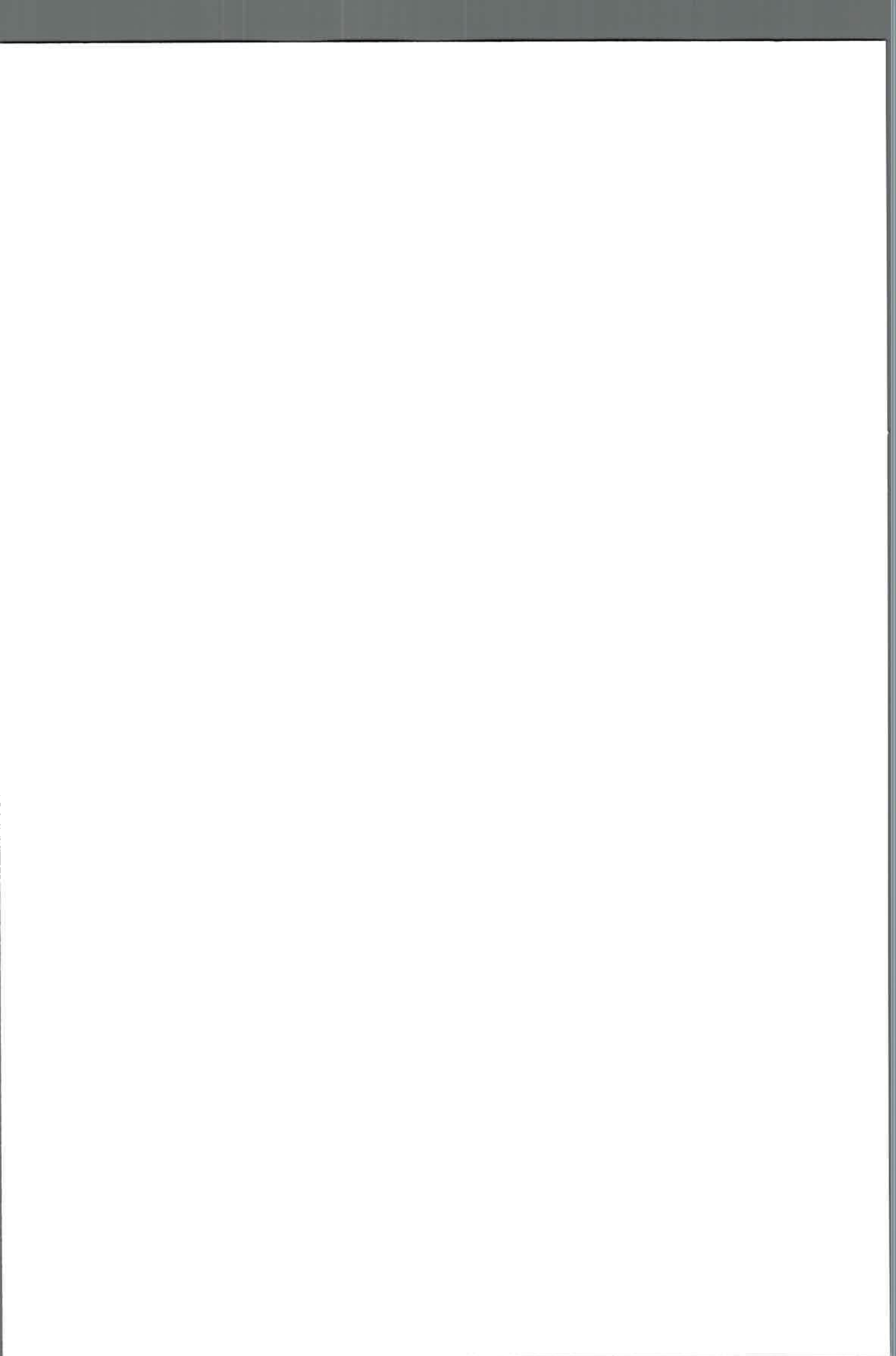


Figura 7. Mapa de contorno de *Fusarium proliferatum* ITEM 15654, en relación a la actividad de agua y a la temperatura. Los números en las líneas de contorno se refieren a la velocidad de crecimiento (mm/día).



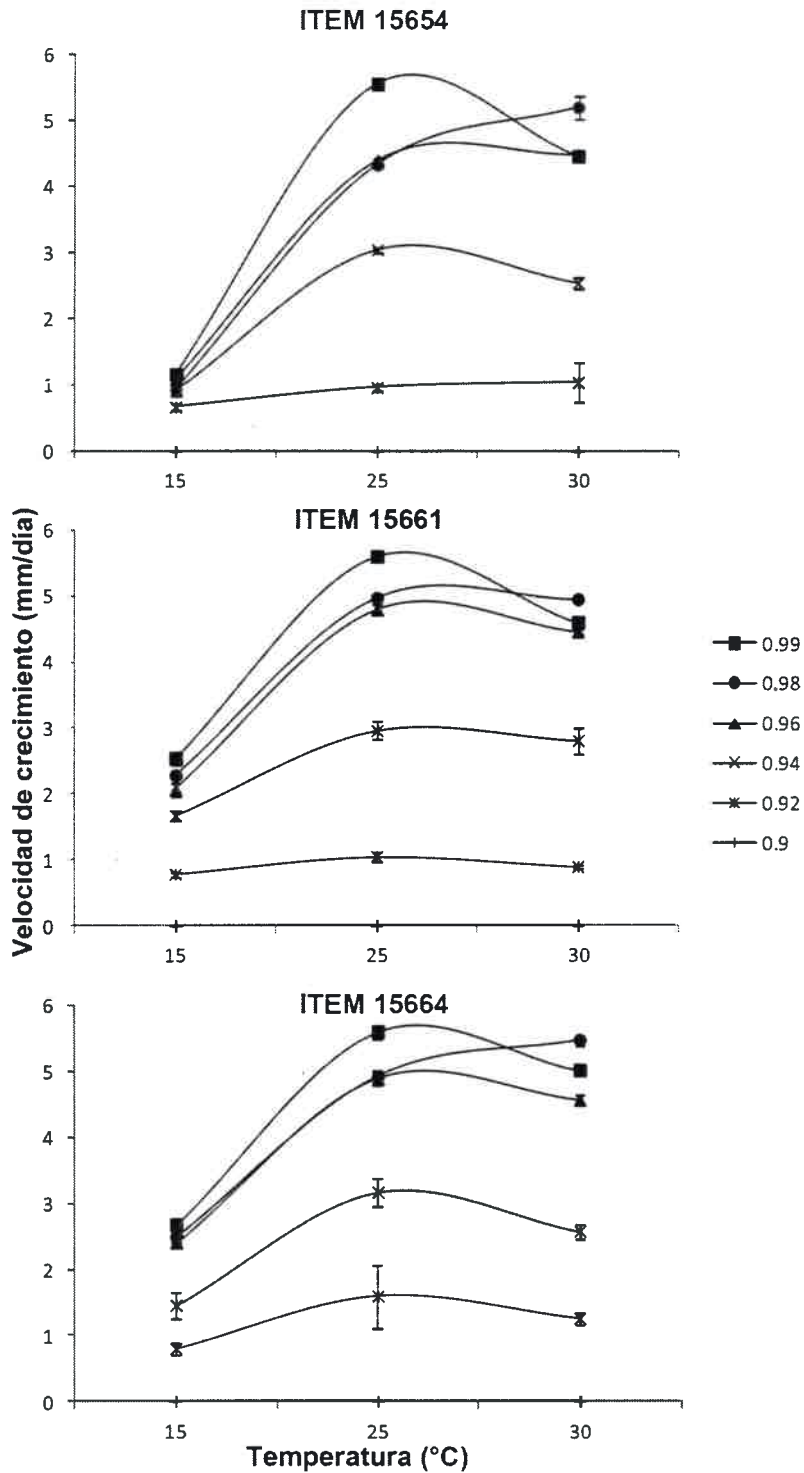
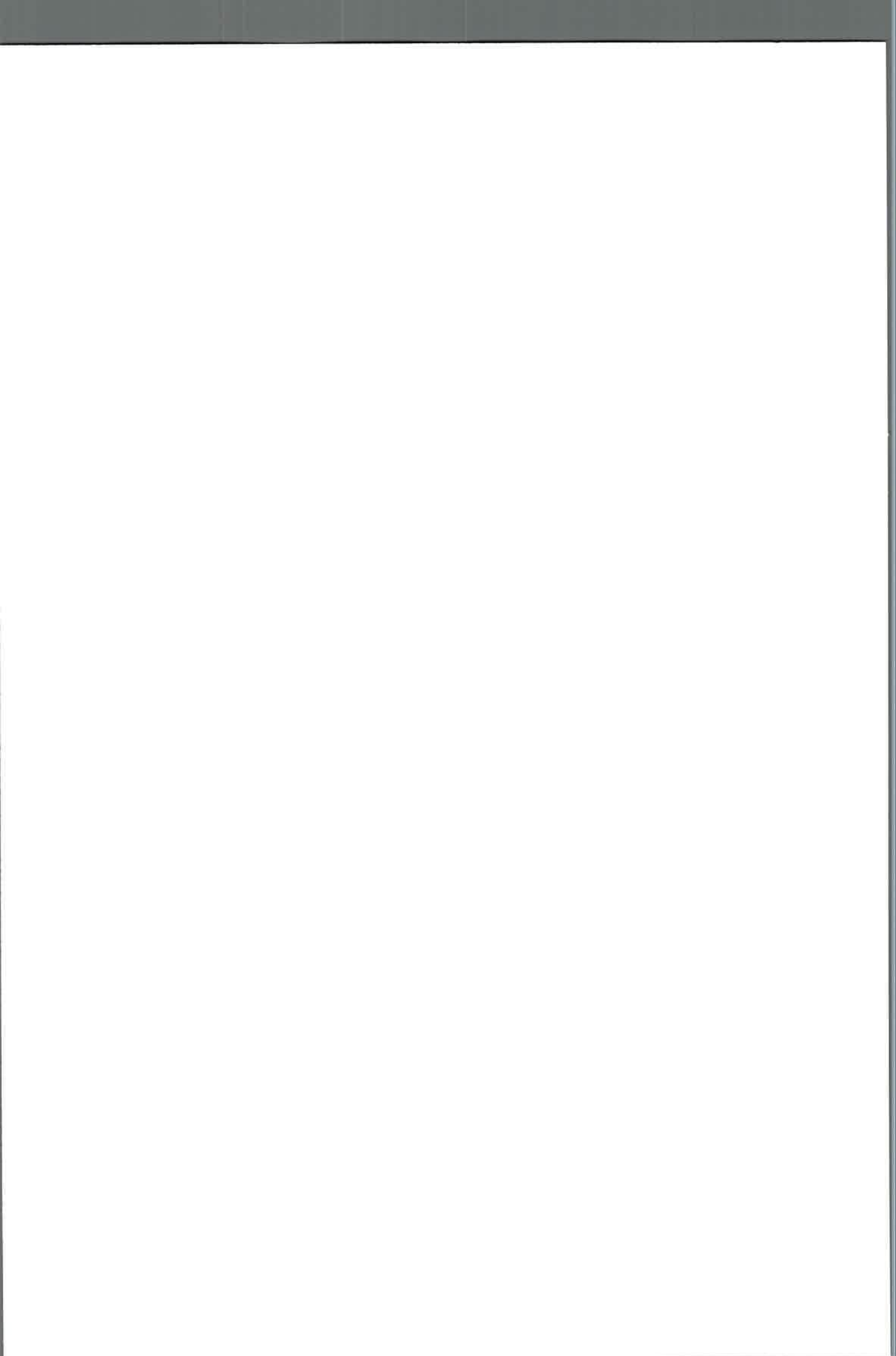


Figura 8. Efecto de la actividad acuosa y la temperatura sobre la velocidad de crecimiento (valores medios) de tres cepas de *Fusarium proliferatum*, crecidas en granos de trigo irradiados. Las barras de error representan el desvío estándar de cada triplicado.



En el estudio sobre la influencia de la a_w , y la temperatura sobre la producción de fumonisinas por 3 cepas de *F. proliferatum* en granos de trigo irradiados el análisis de varianza de los datos de fumonisinas totales indicó que ambos factores individuales (a_w y temperatura) así como su interacción influenciaron significativamente la producción de FB_t para las 3 cepas de *F. proliferatum* (Tabla 13). El factor más influyente para la producción de FB_t fue la temperatura, independientemente de la cepa estudiada. Los test a posteriori LSD-Fisher ($p > 0,01$) realizados para el factor temperatura para cada cepa individualmente mostraron que: para la cepa ITEM 15654 15 y 30 °C no fueron significativamente diferentes entre sí, mientras que si lo fue 25 °C; en el caso de la cepa ITEM 15661 25 y 30 °C no mostraron ser significativamente diferentes; por último para la cepa ITEM 15664, 15 y 25 °C no fueron significativamente diferentes entre sí. En cuanto a este mismo análisis a posteriori realizado para el factor a_w para las tres cepas, los mínimos niveles de a_w (0,88; 0,92; 0,94 y 0,96) no fueron significativamente diferentes entre sí, aunque 0,96 tampoco mostró diferencia significativas con respecto a 0,98 a_w . En cuanto a la a_w máxima (0,995) fue significativamente diferente al resto de los valores de a_w de todas las cepas, salvo para la cepa ITEM 15664 e ITEM 15654 que no mostró ser estadísticamente significativa a 0,98.

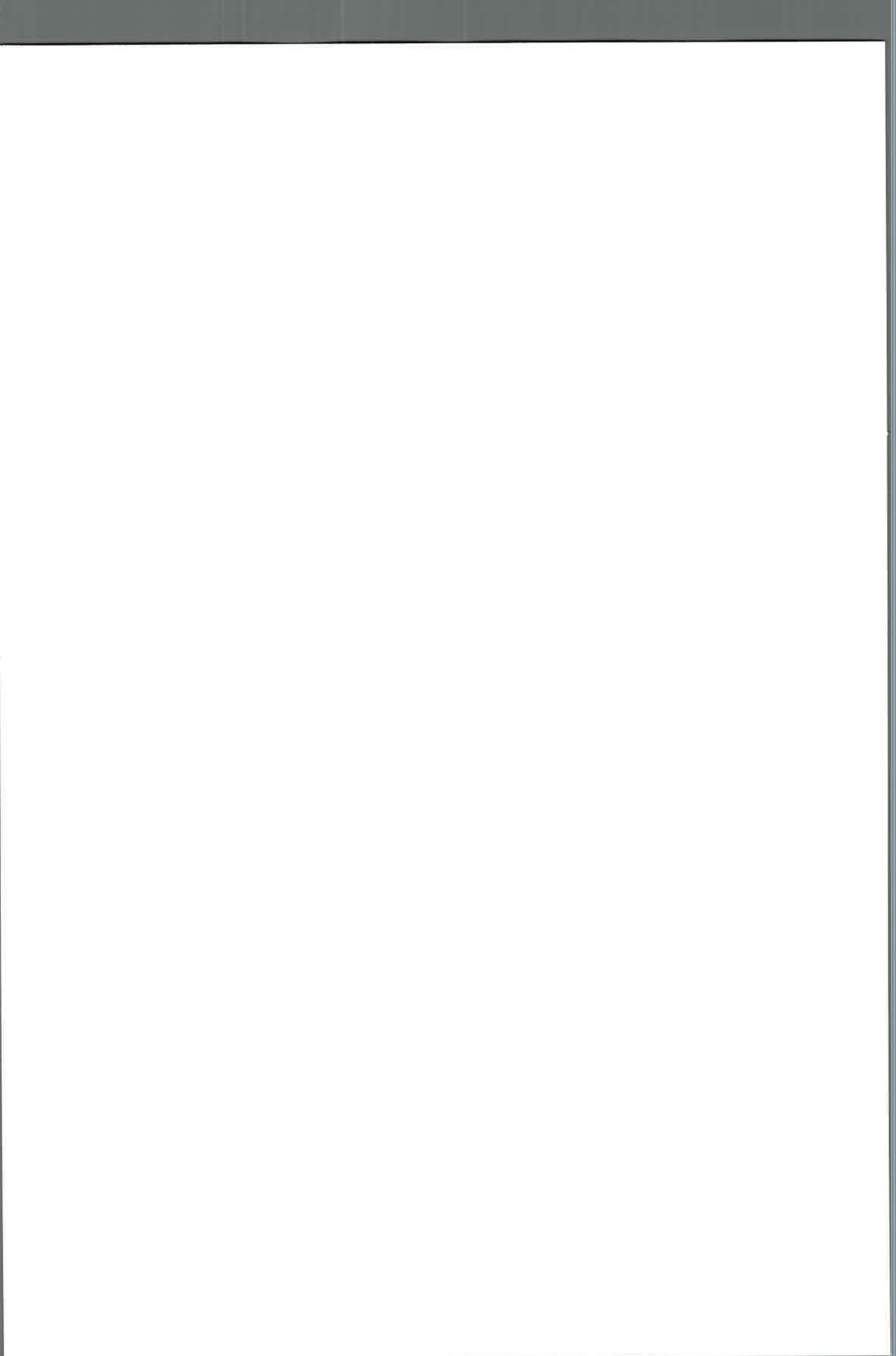
Tabla 13. Análisis de la varianza del efecto de la actividad de agua (a_w), de la temperatura (T), y su interacción sobre la producción de fumonisinas por 3 cepas de *Fusarium proliferatum* en granos de trigo irradiados

FV	ITEM 15661			ITEM 15664			ITEM 15654		
	gl	CM	F	gl	CM	F	gl	CM	F
a_w	5	333252160	13*	5	44420108	17*	5	36875283	8*
T	2	929975181	38*	2	55150215	21*	2	47631010	11*
T x a_w	10	309409971	12*	10	16317863	6*	10	20013617	4*

FV, fuente de variación; gl, Grados de libertad; CM, Cuadrado medio; F, F-Snedecor;

*Significativo $p < 0,01$.

Con los datos obtenidos de fumonisinas totales para cada una de las cepas evaluadas se graficaron mapas de contorno, a fin de identificar las condiciones óptimas de a_w y temperatura para la producción de fumonisinas (Figura 9). De este gráfico pueden leerse dos situaciones diferentes (es por eso que se muestran sólo dos gráficos de contorno): en un caso, la máxima producción de fumonisinas ocurre a 25 °C y a 0,995

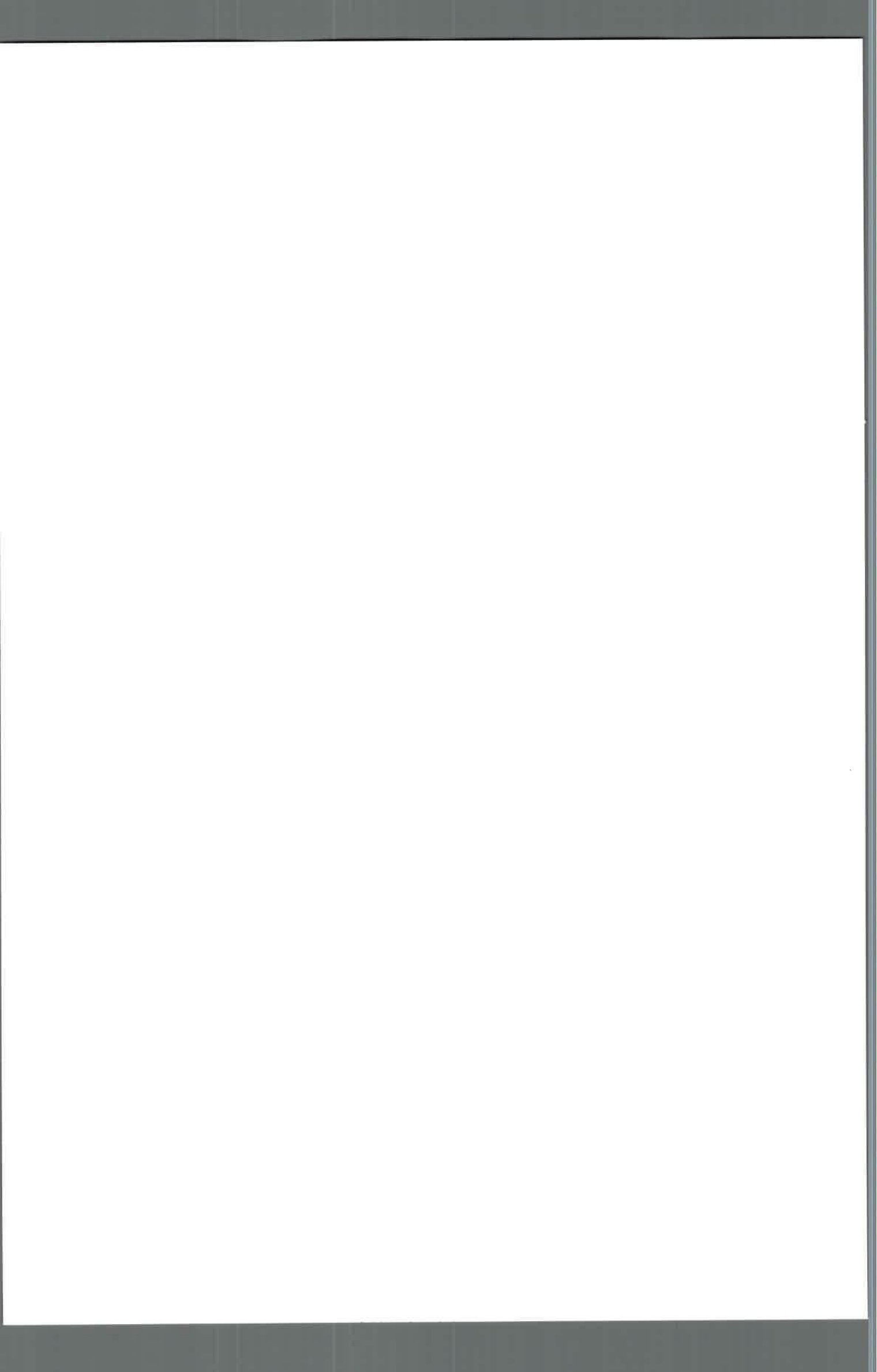


de a_w (Figura 9 A), mientras que en la otra situación los niveles máximos de fumonisinas totales se observan a 15 °C y a 0,995 de a_w (Figura 9 B). En ambas figuras se observa que tanto el efecto de la temperatura, como el de a_w es muy claro, y puede observarse que a medida que nos alejamos de las condiciones óptimas para cada una de las cepas, (disminución de la a_w , y modificación de la temperatura) se ve disminuida la producción de fumonisinas.

La figura 10 muestra los niveles de producción de fumonisinas (FB_1 , FB_2 , FB_3 y FB_t) para las 3 cepas de *F. proliferatum* evaluadas bajo las diferentes condiciones de incubación previamente descritas. En todos los casos puede observarse que no hubo producción de fumonisinas a 0,88 de a_w para todas las temperaturas evaluadas durante los 28 días de incubación. Mientras que la producción máxima de FB_t se observó a 25 °C y a 0,995 de a_w para la cepa ITEM 15654, y a 15 °C y a una a_w de 0,995 para las cepas ITEM 15664 y 15661. En general, se observó que los niveles de toxinas producidas por la cepa ITEM 15661 fueron superiores a los producidos por las otras cepas evaluadas a 15 °C (mayores niveles detectados en este ensayo), mientras que a 25 °C la cepa ITEM 15654 fue la productora de mayores niveles de FB_t . A 30 °C ninguna de las cepas fue capaz de producir niveles elevados de fumonisinas.

Teniendo en cuenta la temperatura de incubación, al igual que en el ensayo realizado sobre medio de cultivo, se encontraron dos comportamientos diferentes entre las cepas evaluadas. La producción de FB_t fue mayor a 15 °C, decreciendo en el siguiente orden: 25 y 30 °C para las cepas ITEM 15664 y 15661, respectivamente. Mientras que para la cepa ITEM 15654 la producción de FB_t fue mayor a 25 °C, decreciendo en el siguiente orden: 15 y 30 °C.

De la misma manera que se observó en el ensayo realizado en medio de cultivo a base de trigo, las cepas bajo estudio mostraron tener diferentes perfiles de producción de fumonisinas: las cepas ITEM 15661 y 15664 fueron capaces de producir FB_1 y FB_2 , mientras que la cepa ITEM 15654 mostró capacidad de producir FB_1 , FB_2 y FB_3 . Es importante destacar que el perfil de producción de cada tipo de fumonisina para la cepa ITEM 15664 estuvo sujeto a la temperatura de incubación (Figura 10): a 25 °C produjo casi exclusivamente FB_2 , sin embargo, a 15 °C produjo principalmente FB_1 .



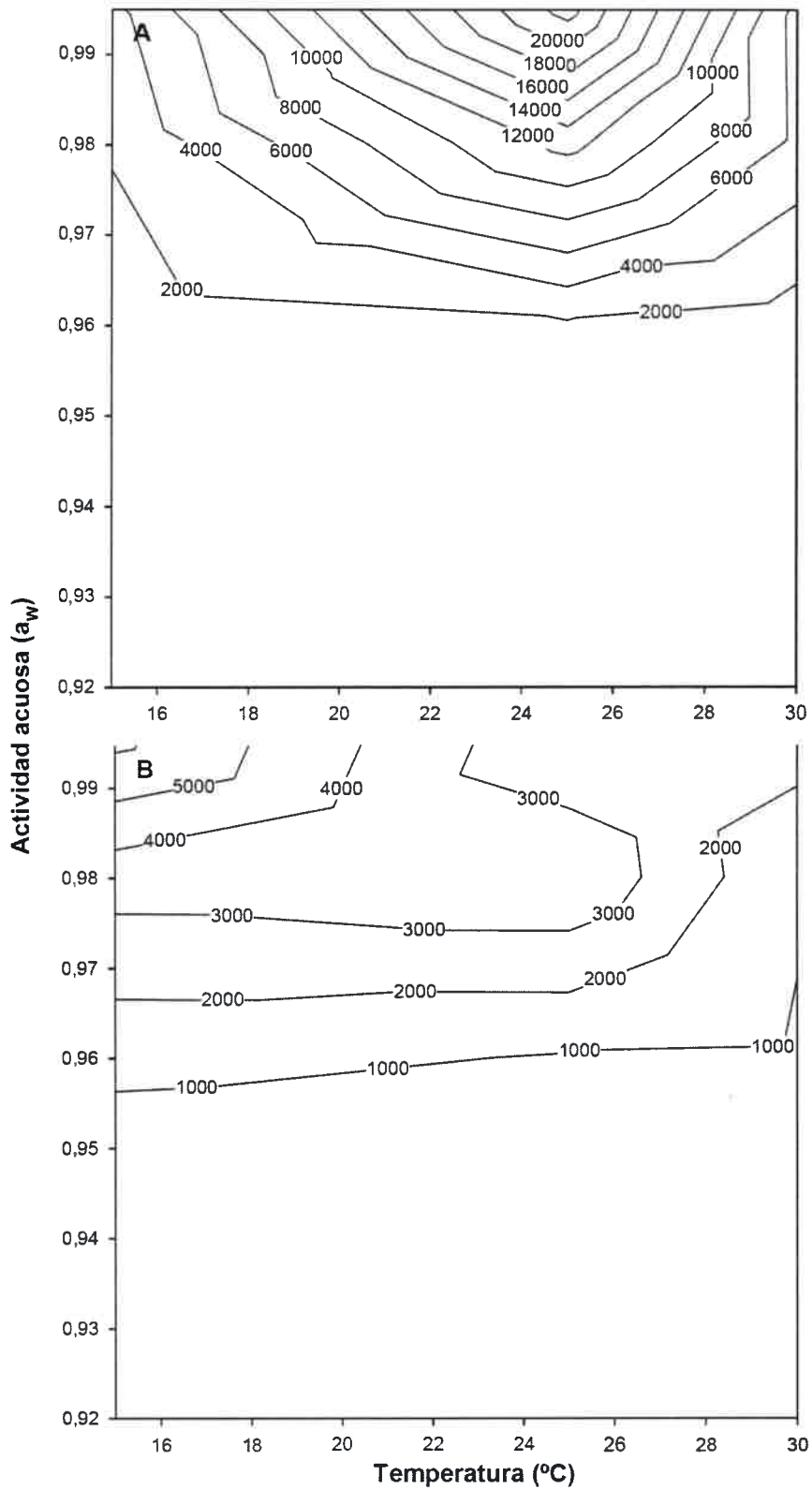
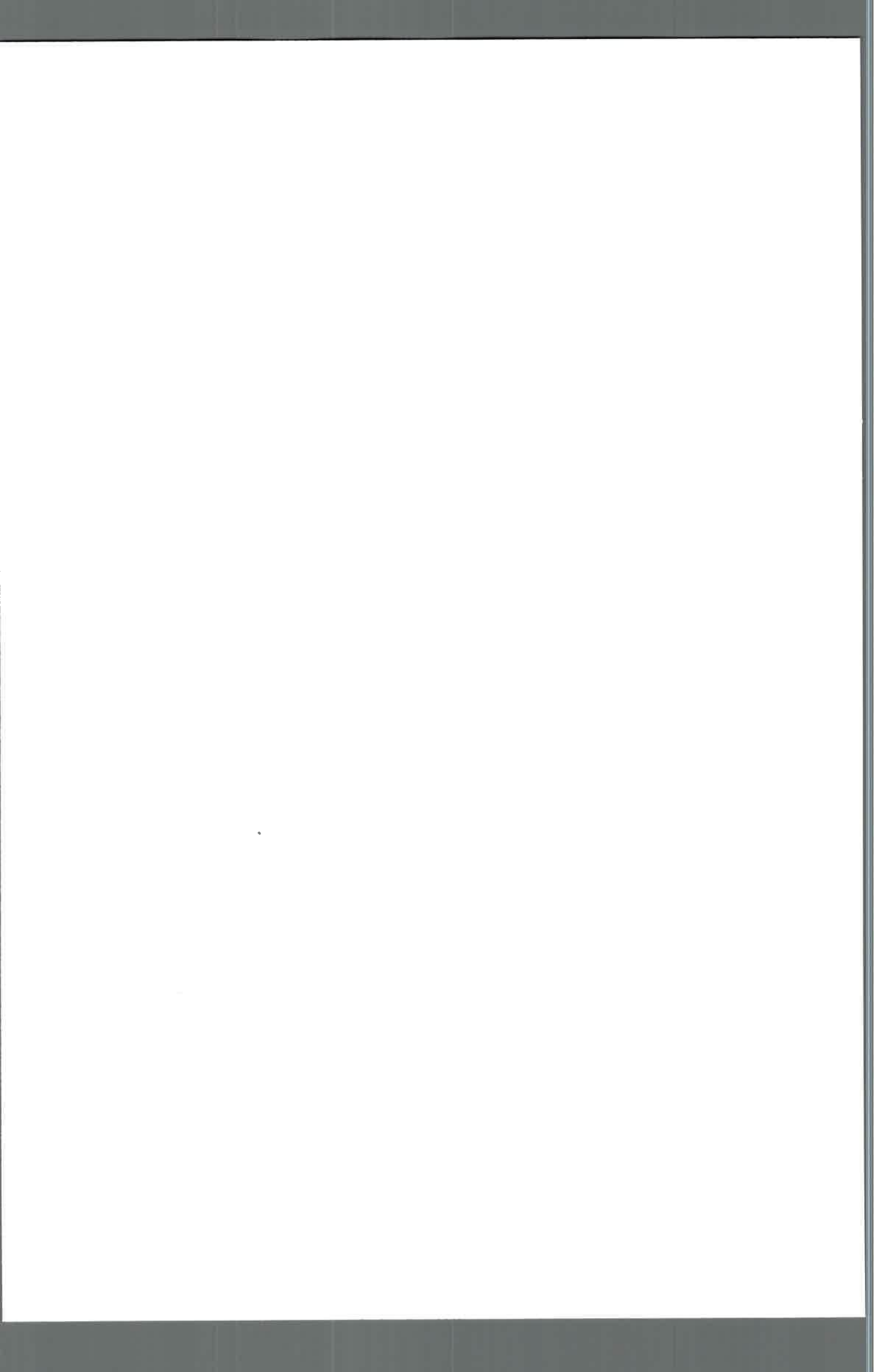


Figura 9. Mapas de contorno de *Fusarium proliferatum* ITEM 15654 (A), y 15661 (B) en relación a la actividad de agua y a la temperatura. Los números en las líneas de contorno se refieren a las concentraciones medias de fumonisinas totales (ng/g).



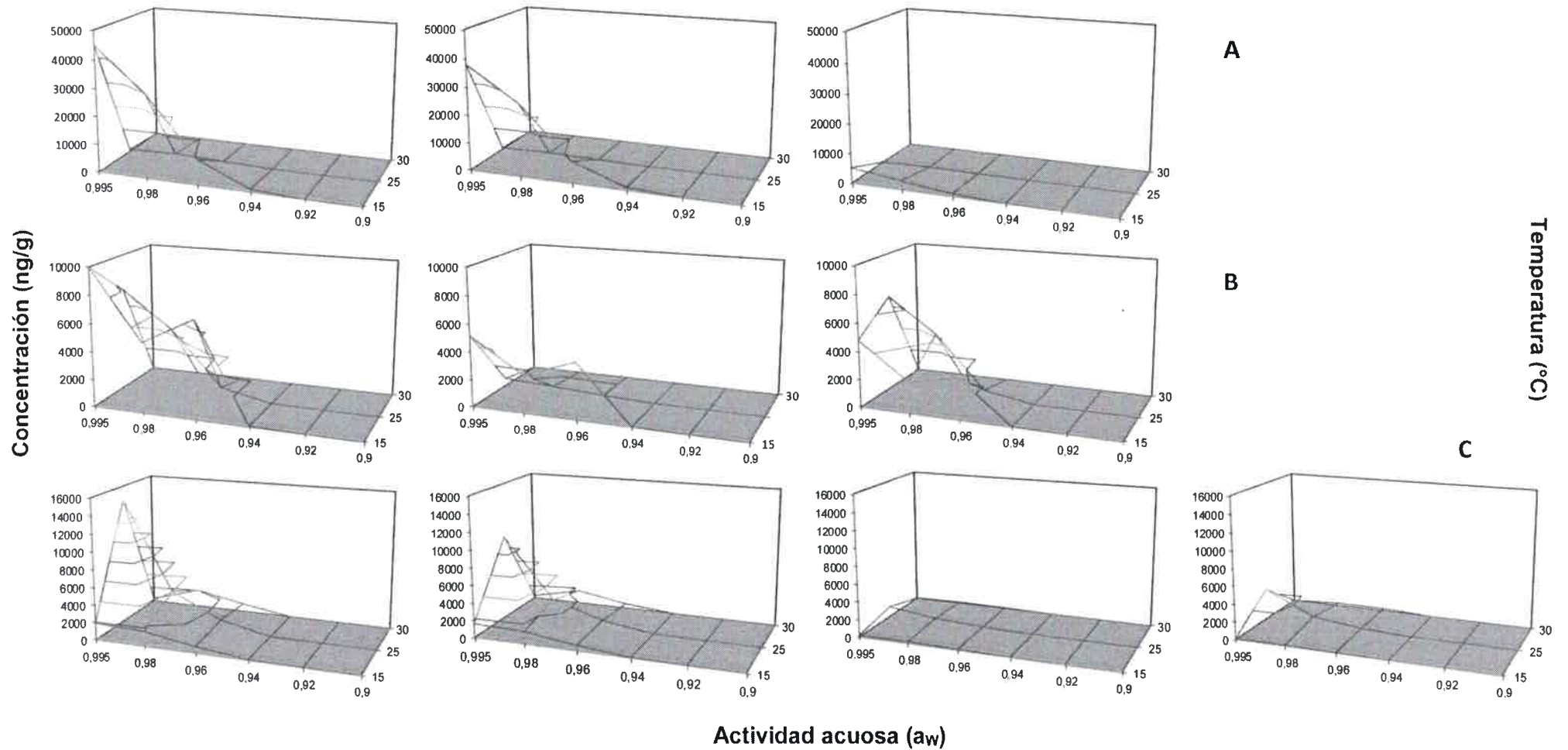
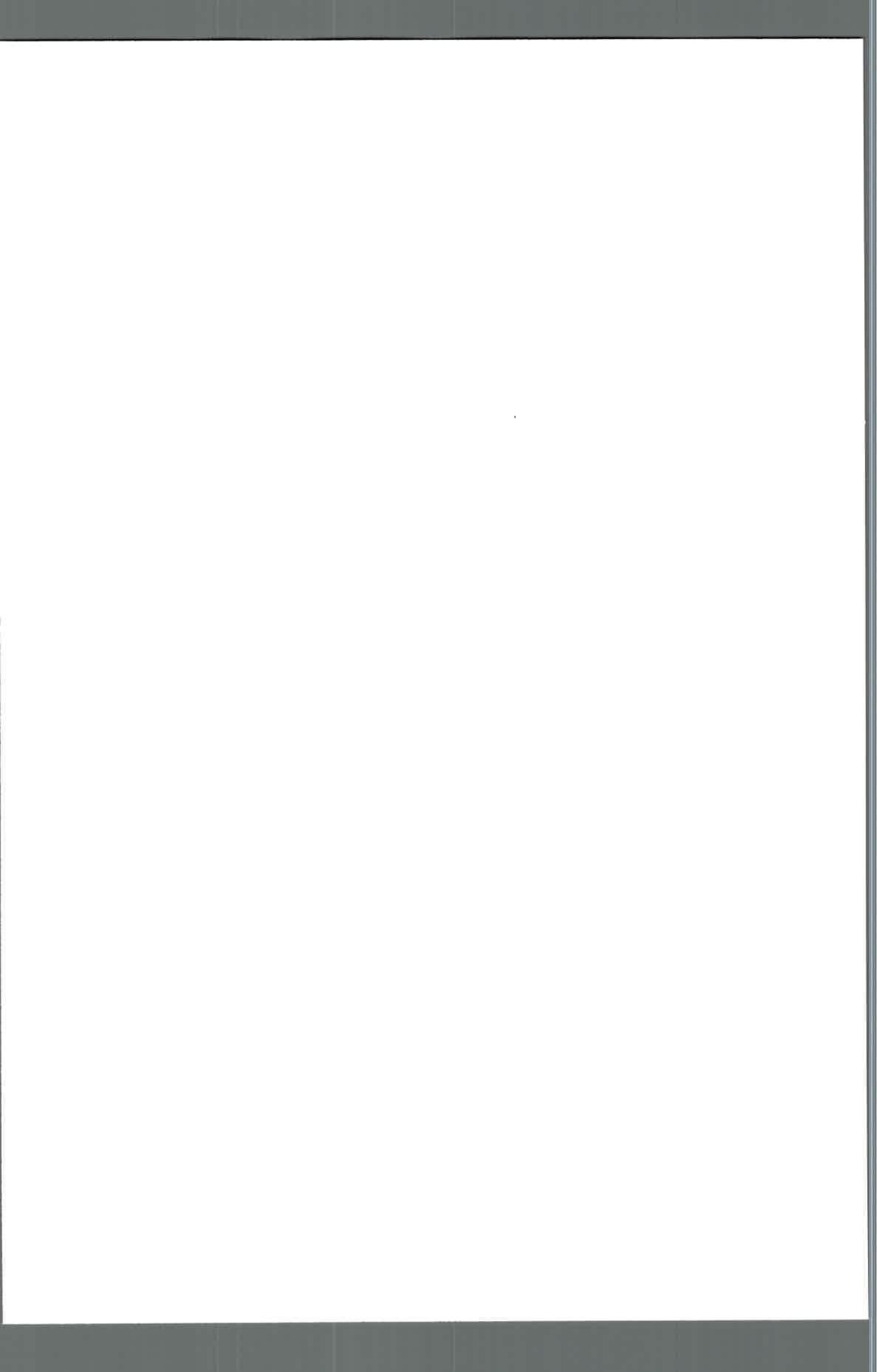


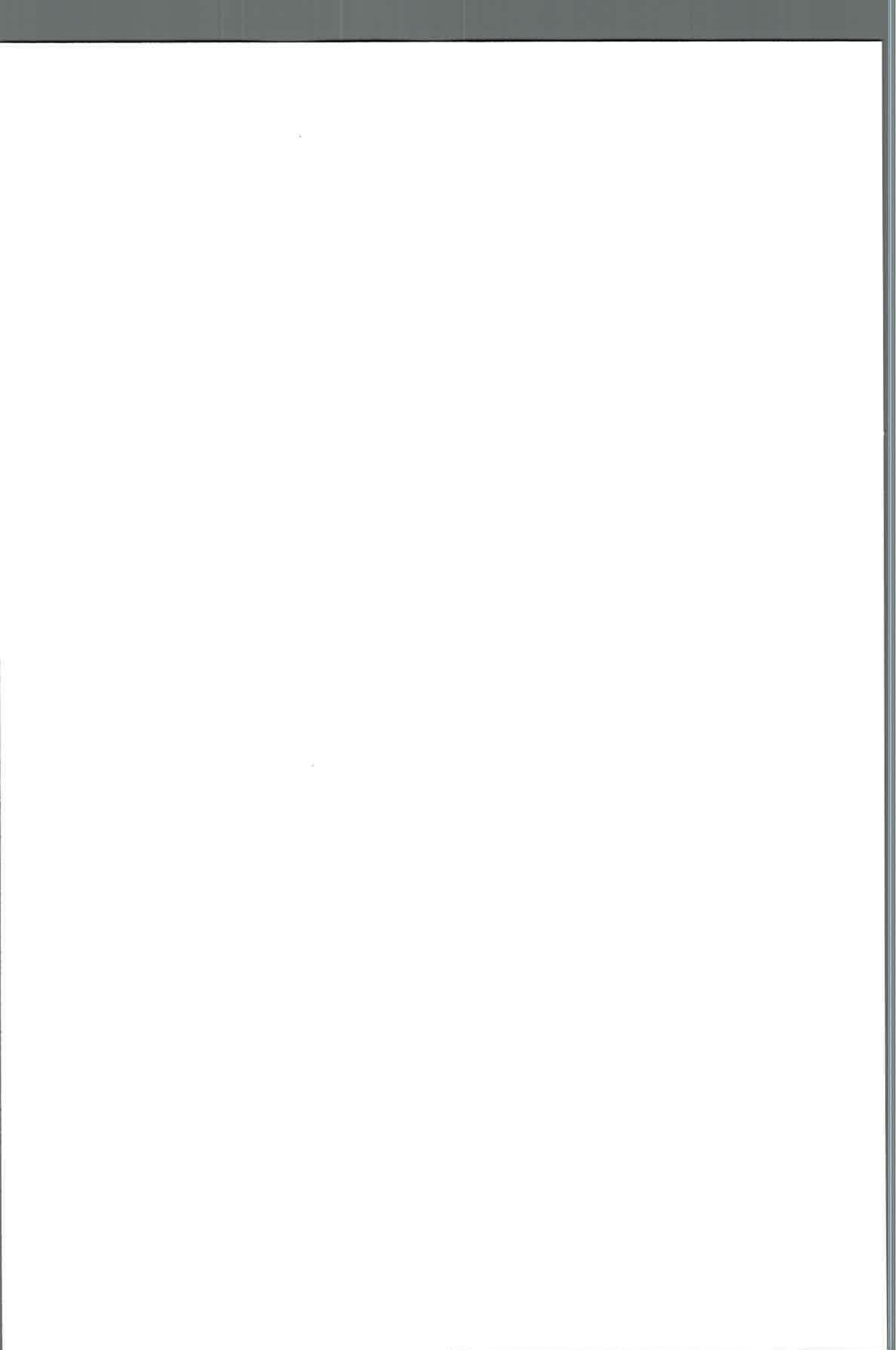
Figura 10: Niveles medios de fumonisinas producidos por cepas de *Fusarium proliferatum* en granos de trigo irradiados ajustados a diferentes niveles de actividad acuosa e incubadas diferentes temperaturas 15, 25 y 30 °C. A: ITEM 15661; B: ITEM 15664; C: ITEM 15654.



III. Discusión

Existen en la literatura numerosos estudios que han analizado el efecto combinado de la a_w y la temperatura en la producción de fumonisinas (principalmente FB_1) tanto en medios de cultivo a base de maíz como en granos de maíz (Marín *et al.*, 2004). Sin embargo, nuestros estudios realizados tanto en medio de cultivo a base de trigo como en granos de trigo irradiados (utilizando cepas aisladas de granos de trigo), proporcionarían los primeros resultados que detallan cómo el crecimiento de cepas de *F. proliferatum* y la consecuente producción de fumonisinas es afectada por la a_w y la temperatura. Durante la presente tesis hemos evaluado los efectos de una amplia gama de a_w (desde 0,995 hasta 0,88) y temperaturas (15, 25 y 30 °C) sobre el crecimiento y la producción de fumonisinas por 3 cepas de *F. proliferatum* aisladas de granos de trigo cultivado en Argentina en un medio de cultivo a base de trigo y en granos de trigo irradiados. Es importante destacar que todas las condiciones evaluadas se corresponden con aquellas que ocurren durante el desarrollo del trigo (principalmente en los estadios lechoso y pastoso) en el campo. Como puede observarse en los resultados detallados arriba en el texto, ambas variables (a_w y temperatura) afectan significativamente el crecimiento de las tres cepas de *F. proliferatum* evaluadas, siendo la a_w el factor con mayor influencia para el caso del ensayo realizado en medio de cultivo y la temperatura para el ensayo realizado sobre granos irradiados, respectivamente. Los niveles óptimos de a_w para el crecimiento variaron de 0,995 a 0,96 a 25 - 30 °C en ambos estudios, mientras que en ambos ensayos no se observó crecimiento a las a_w más bajas a 15 °C. Sin embargo, a 25 y 30 °C a 0,90 en el medio de cultivo a base de trigo las cepas crecieron lentamente, y con una a_w de 0,88 en granos de trigo irradiados, ninguna de las cepas fue capaz de crecer a ninguna de las temperaturas evaluadas.

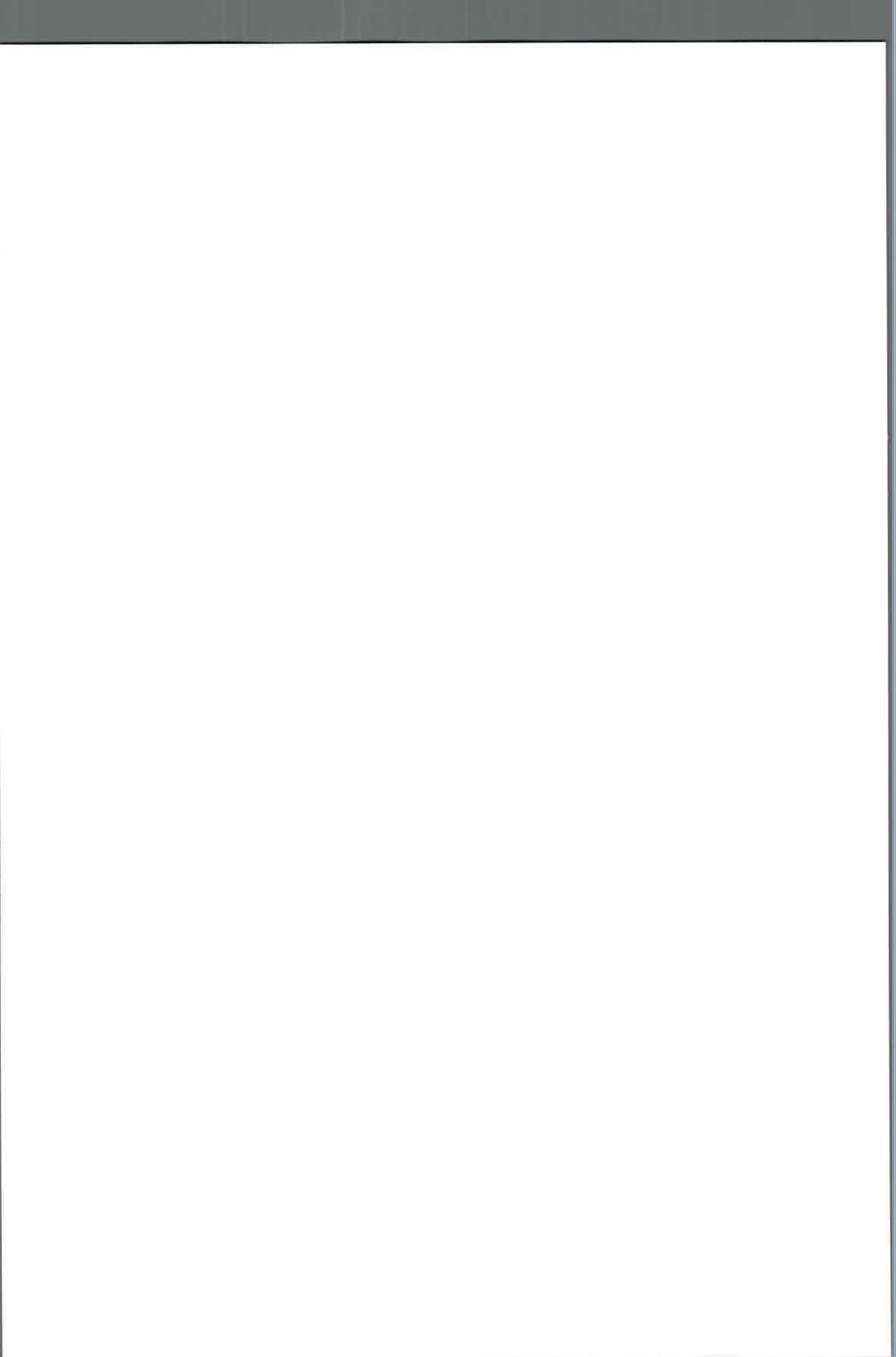
Estudios previos referidos a los requerimientos de agua y temperatura para el crecimiento de *F. proliferatum* indicaron que este hongo tiene un requerimiento mínimo de a_w de 0,90 y que el rango de temperatura a la cual puede crecer abarca desde los 4 hasta los 37 °C en un medio de cultivo a base de maíz, con un crecimiento máximo a la mayor a_w utilizada en ese estudio (0,994) (Marín *et al.*, 2004). Si comparamos nuestros resultados obtenidos del ensayo realizado sobre los granos de trigo irradiados con aquellos obtenidos analizando la velocidad de crecimiento de estas tres cepas crecidas en un medio de cultivo a base de trigo, vemos que ambos son semejantes, en ambos ensayos las tres cepas mostraron tener un comportamiento similar a todas las



condiciones de a_w y temperatura evaluadas, sin embargo, los niveles máximos de crecimiento hallados en los granos de trigo fueron a la máxima a_w (0,995) y a 25 °C mientras que en medio de cultivo el máximo crecimiento se observó a la misma a_w , pero a 30 °C. También puede observarse que la velocidad de crecimiento de las cepas se vio disminuida a medida que la a_w de los granos disminuyó, y que en todos los casos estos valores fueron menores cuando la temperatura de incubación fue de 15 °C. Por otro lado, Magan y Lacey (1984a,b) encontraron que algunas especies de *Fusarium* son capaces de crecer en medio de cultivo a base de trigo a niveles de a_w de 0,89 siendo la a_w óptima a 0,995, independientemente de la temperatura, sin embargo, *F. proliferatum* no fue incluido en ese estudio. Marín *et al.* (1999) analizaron las respuestas de diferentes especies de *Fusarium* a distintas condiciones de a_w y temperatura, en medios de cultivo distintos (a base de trigo, a base de maíz y a base de cebada) y encontraron que las velocidades de crecimiento de las cepas de *F. verticillioides* y *F. proliferatum* eran mayores a 7 mm/día, y que la tendencia era similar para los distintos extractos de cereales utilizados. Estos autores observaron que el crecimiento fue ligeramente más rápido en el agar a base de trigo cuando la temperatura era de 5 a 10 °C, mientras que a 25-30 °C fue un poco mayor en agar extracto de cebada, por último a 37 °C resultó ligeramente superior en agar extracto de maíz. Estos resultados son similares a los obtenidos en este estudio. Cabe destacar que las cepas de *F. proliferatum* utilizadas en el trabajo de Marín *et al.* (1999) fueron aisladas de granos de maíz, mientras que las utilizadas en el presente trabajo fueron aisladas de granos de trigo. En líneas generales, los resultados del presente trabajo se asemejan a lo expuesto por estos autores.

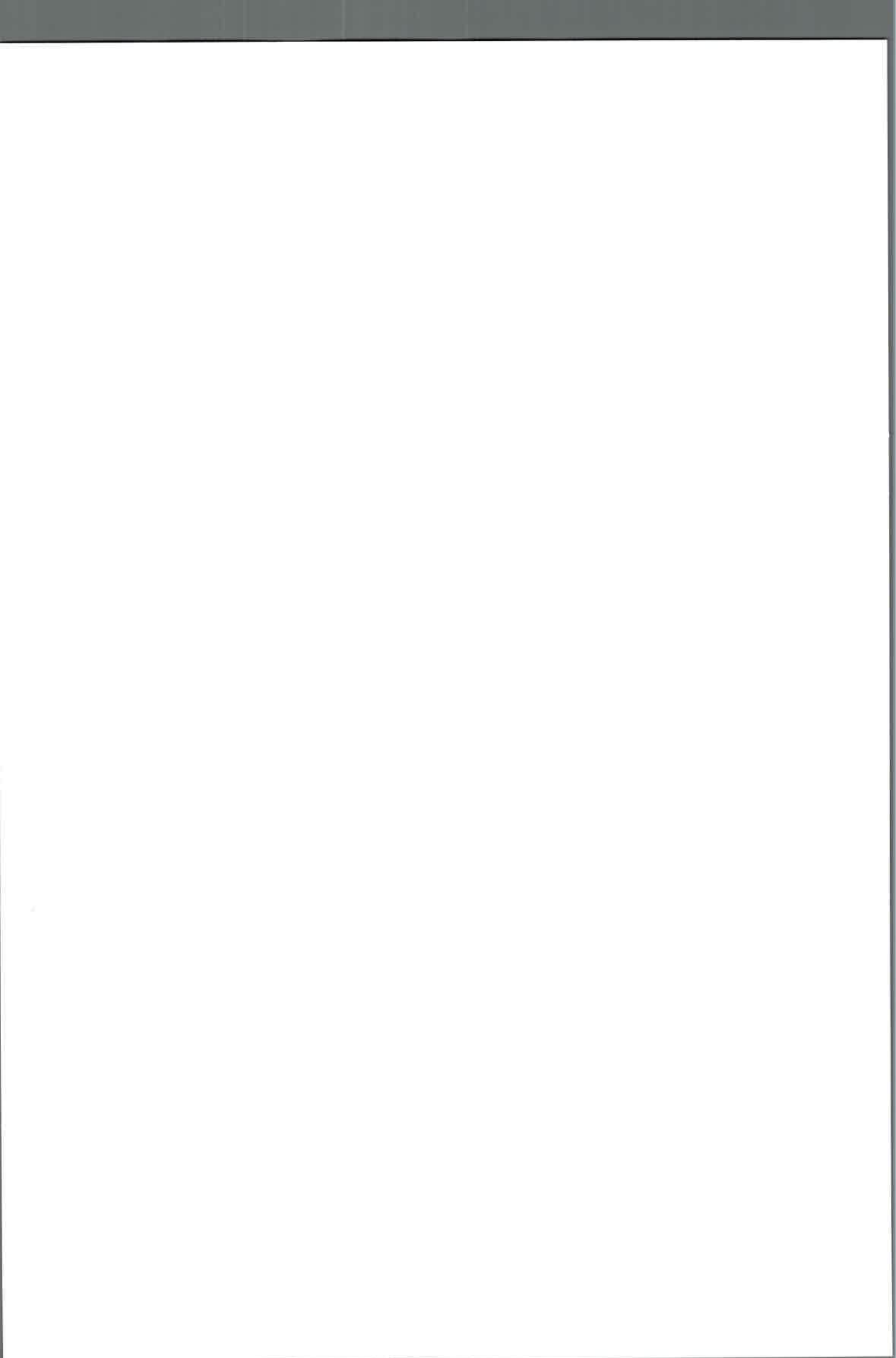
Puede observarse que las mayores velocidades de crecimiento y, como se desarrollará a continuación, los niveles máximos de producción de fumonisinas se observaron sobre el medio de cultivo a base de trigo. Los resultados podrían deberse a que, si bien los granos irradiados intactos contienen nutricionalmente los elementos necesarios para el desarrollo del hongo, también ofrecerían una barrera natural en la penetración de *F. proliferatum*, restringiendo así el crecimiento de las cepas analizadas.

Como las especies de *Fusarium* pueden estar presentes en un sustrato por largos períodos de tiempo durante los cuales la a_w podría cambiar, resulta importante conocer el rango de a_w óptimo para el crecimiento fúngico y también aquellas condiciones que permiten el crecimiento sub-óptimo, ya que bajo las condiciones a campo, las fluctuaciones de temperatura, los cambios en la humedad relativa, y las precipitaciones, todas influyen la colonización de los granos de trigo en desarrollo por *F. proliferatum*.



En cuanto a la capacidad de las cepas de producir fumonisinas, en el ensayo realizado en medio de cultivo las mayores cantidades de fumonisinas totales se produjeron a 25 °C y 0,99 de a_w luego de 21 y 28 días de incubación para dos de las cepas (ITEM 15664 e ITEM 15661), mientras que para la cepa ITEM 15654, los máximos niveles se produjeron a 15 °C y 0,98 a_w luego de 28 días de incubación. Para el caso del ensayo en granos irradiados, las máximas cantidades producidas fueron a 25 °C y 0,995 de a_w para una de las cepas (ITEM 15654), mientras que para las otras dos los máximos valores se encontraron a la misma a_w (0,995) pero a 15 °C. Al igual que lo observado para el ensayo en medio de cultivo, la a_w limitante para la detección de toxina para las 3 cepas de *F. proliferatum* fue apenas más estrecha que aquella necesaria para el crecimiento, es decir que no hubo producción de toxina de manera detectable cuando la a_w fue menor a 0,92. Nuestros resultados concuerdan con aquellos descritos por Marín *et al.* (1999) quienes encontraron que el rango de temperaturas bajo las cuales podía producirse FB₁ en granos de maíz era más estrecha que aquellas bajo las cuales las especies productoras de fumonisinas (*F. verticillioides* y *F. proliferatum*) eran capaces de germinar y crecer.

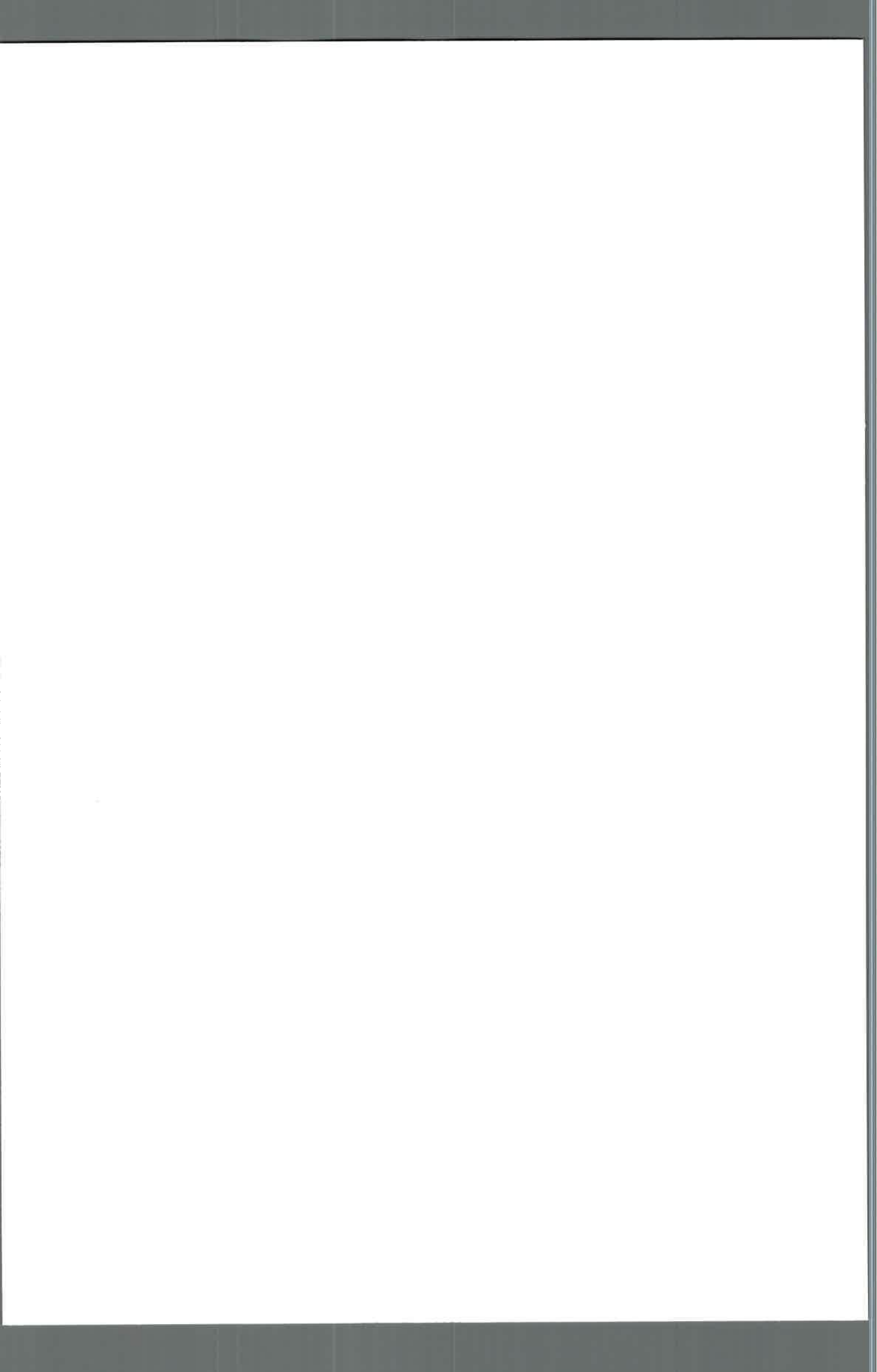
Resulta interesante que tanto en el ensayo realizado sobre medio de cultivo, como en el ensayo realizado sobre granos irradiados, en algunos casos los máximos niveles de fumonisinas totales fueron obtenidos cuando la temperatura de incubación fue de 15 °C, mientras que por otro lado a 30 °C ninguna de las cepas utilizadas fue capaz de producir grandes cantidades de estas toxinas. Con respecto a esto, Ryu *et al.* (1999) establecieron que *F. proliferatum* parecería estar mejor adaptado a las bajas temperaturas, y que a éstas temperaturas podría producir mayores cantidades de fumonisina B₁ que *F. verticillioides*. Esto resulta interesante ya que el trigo es un cultivo de invierno y la temperatura óptima para el cultivo de este cereal varía en un rango de 10 y 24 °C. Por otro lado, se conoce que a diferencia de *F. verticillioides*, *F. proliferatum* es capaz de colonizar un rango de plantas huéspedes más amplio que el maíz, como pueden ser el trigo y la cebada entre otros, sin ninguna preferencia de huésped. Como se mencionó en la introducción de este capítulo, *F. proliferatum* posee una alta variabilidad genética y la habilidad de producir fumonisinas se encuentra extensamente distribuida en esta especie según ciertos estudios filogenéticos realizados en los que se incluyeron un gran número de cepas de *F. proliferatum* aisladas de distintos huéspedes, de los cuales se concluye que esta especie podría representar un riesgo a la salud, de manera similar a *F. verticillioides* (Jurado *et al.*, 2010; Palacios *et al.*, 2015). En el capítulo 2 de esta tesis



también se citaron varios trabajos que insinúan que *F. proliferatum* podría ser el responsable de la presencia de fumonisinas en el trigo. Estos trabajos analizan la presencia de especies de *Fusarium* en granos de trigo, junto con la presencia de fumonisinas, y por otro lado analizan la capacidad toxicogénica de las cepas aisladas. En líneas generales observan que si bien las cepas de *F. verticillioides* tienden a ser productoras de mayor cantidad de fumonisinas que aquellas de *F. proliferatum*, esta última especie es aislada con más frecuencia de muestras de granos de trigo contaminadas con fumonisinas, incluso en algunos casos no se logra aislar cepas de *F. verticillioides*. Otro dato interesante es que en general se encuentra mayor proporción de cepas productoras de fumonisinas de *F. proliferatum* que de *F. verticillioides* (Sanchis *et al.*, 1995, Amato *et al.*, 2015, Mohammadi *et al.*, 2016).

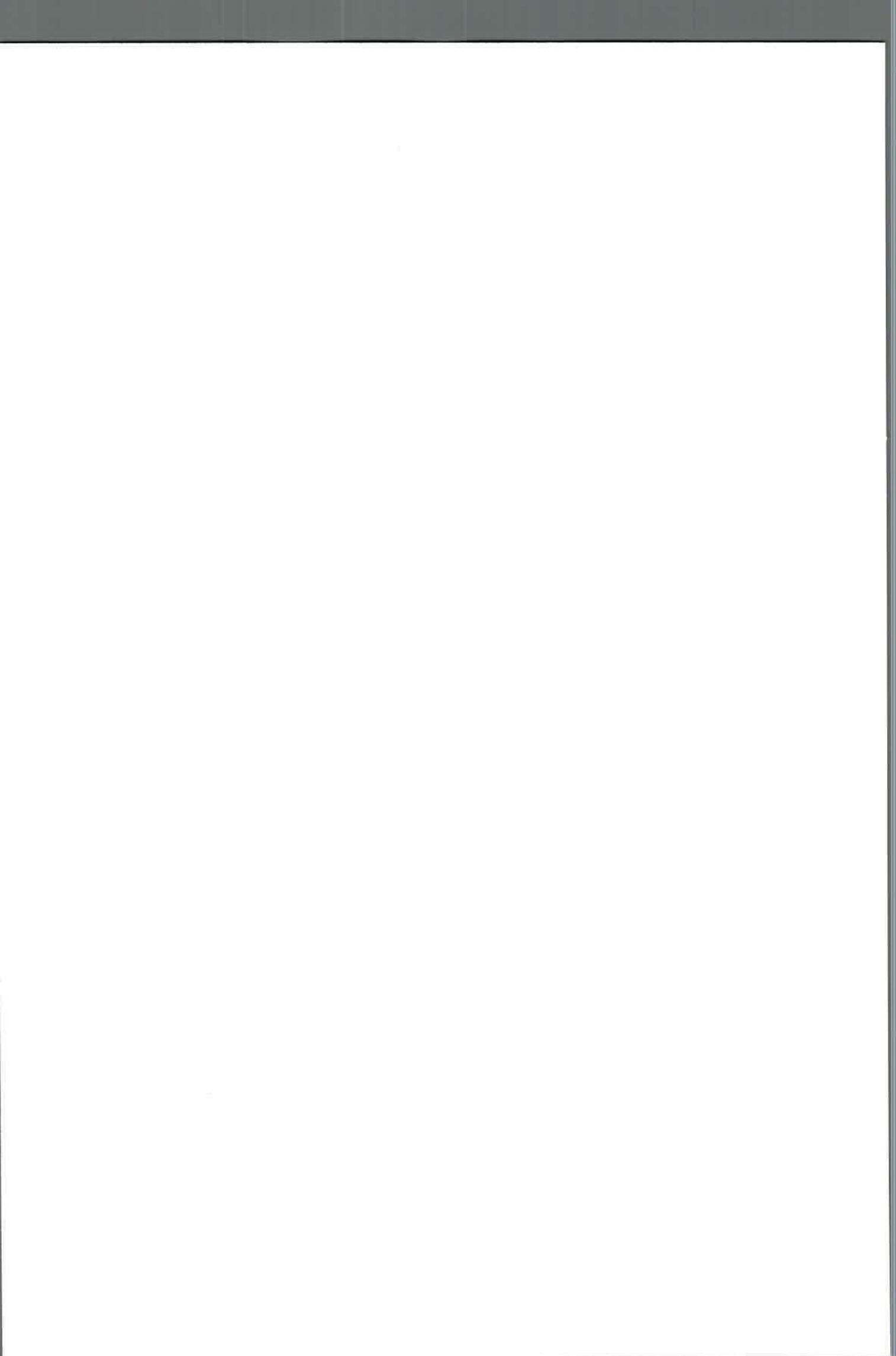
Entre los resultados de ambos ensayos también se encontraron diferentes perfiles de producción de fumonisinas (FB₁, FB₂ y FB₃) entre las diferentes cepas analizadas, y estos perfiles para cada cepa estuvieron relacionados a la temperatura de incubación. Medina *et al.* (2013) estudiaron la relación entre la expresión de 9 genes pertenecientes a la vía biosintética del *cluster FUM*, el crecimiento y la producción de FB₁ y FB₂ en una cepa de *F. verticillioides* y concluyeron que la temperatura y la *a_w* tienen un profundo efecto tanto en la expresión de genes biosintéticos claves como en el crecimiento y en la producción de metabolitos secundarios tóxicos. También en este estudio los autores observaron que la temperatura óptima para la producción de FB₁ y FB₂ no fue la misma. Estos resultados indican que la producción de diferentes tipos de fumonisinas por *F. proliferatum* podría estar favorecida por las diferentes temperaturas.

Existe un estudio comparable a los ensayos descritos en este trabajo que fue realizado por Marín *et al.* (1999), en el cual los autores muestran el efecto de diferentes sustratos (maíz, trigo y cebada) y niveles de *a_w* (0,93; 0,95 y 0,98) sobre el crecimiento y la producción de FB₁ a 25 °C por cepas de *F. verticillioides* y *F. proliferatum*. Ellos demostraron que si bien ambas especies productoras de fumonisinas son capaces de colonizar la cebada y el trigo más rápidamente que el maíz, éstas no fueron capaces de producir FB₁ en estos cereales. Sin embargo hay muchos puntos a tener en cuenta en este trabajo: en primer lugar la experiencia se realizó solo a 25 °C (la cual es una buena temperatura para la síntesis de fumonisinas en maíz), en segundo lugar el estudio solo se limitó a la producción de FB₁, y en tercer y último lugar las cepas que se utilizaron habían sido aisladas de maíz. Los autores sugieren que podría ser posible que las fumonisinas puedan ser producidas en los otros cereales bajo temperaturas diferentes, pero no lo



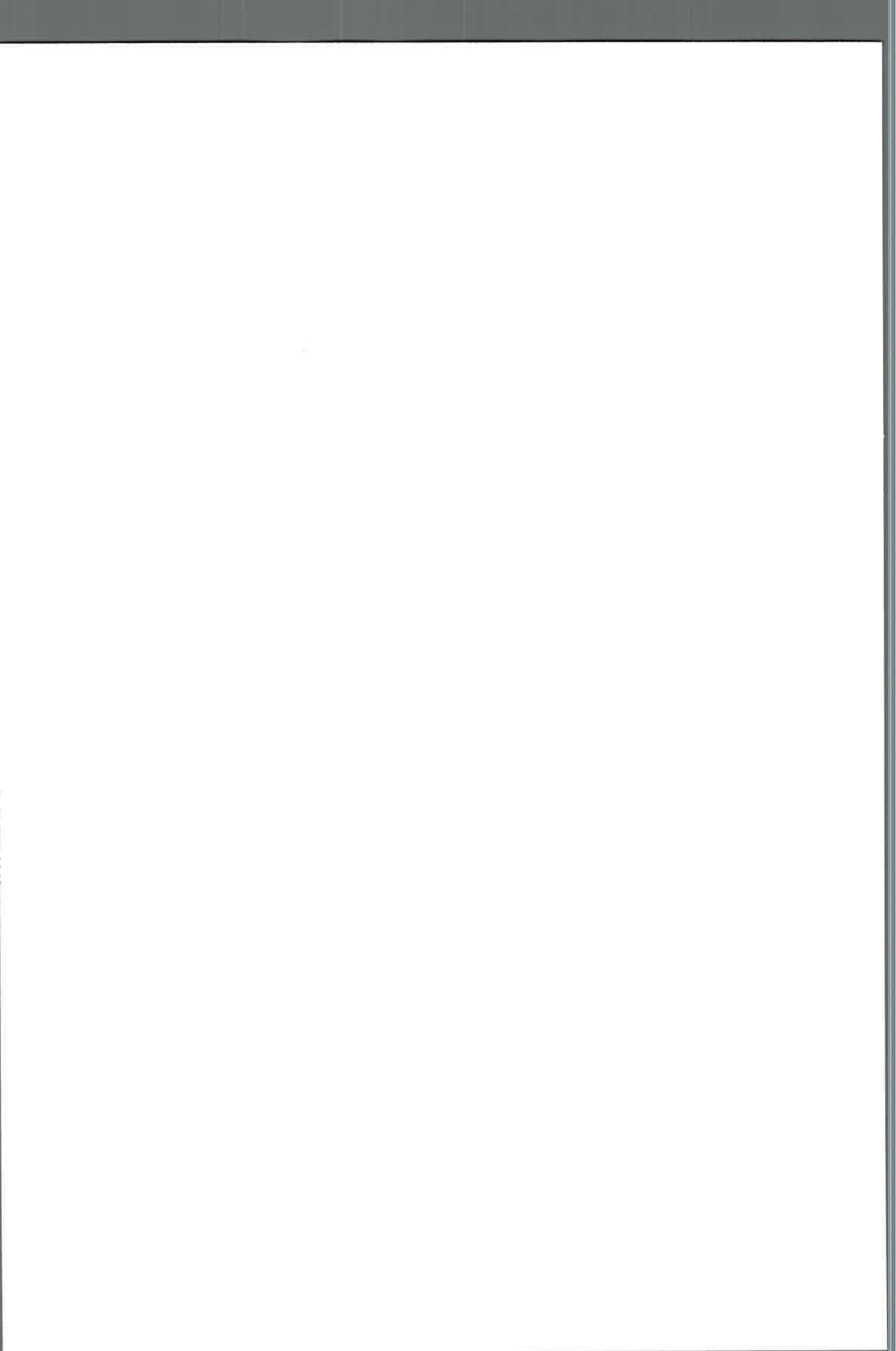
prueban. Nuestros resultados pueden explicar los resultados encontrados por Marín *et al.* (1999) acerca de la ausencia de producción de fumonisinas en trigo a 25 °C ya que dos de las 3 cepas de *F. proliferatum* utilizadas en nuestro estudio produjeron casi exclusivamente FB₂ y valores bajos de FB₁ a esta temperatura. Mientras que la cepa restante mostró un perfil de producción de fumonisinas convencional (FB₁ > FB₂ > FB₃), pero los niveles máximos de producción se obtuvieron a 15 °C en el ensayo realizado en el medio de cultivo. Por otro lado, en el ensayo realizado en granos de trigo la cepa que mostró mayores niveles de producción de FBs tuvo su máximo de producción a 15 °C, y de las otras dos cepas una produjo a 25 °C mayores cantidades de FB₂ que de FB₁, incluso este tipo de perfil (mayores niveles de FB₂ que de FB₁) ha sido observado en granos de trigo naturalmente contaminados con fumonisinas en Argentina (Palacios *et al.*, 2011). Otro punto a tener en cuenta es que el estudio realizado por Marín *et al.* (1999) incluyó cepas aisladas de granos de maíz, mientras que las cepas utilizadas en este trabajo, como se mencionó anteriormente, fueron aisladas de granos de trigo. Para concluir, Marín *et al.* (1999) establece que *F. proliferatum* no es capaz de producir fumonisinas en granos de trigo analizando sólo el contenido de FB₁ y utilizando una temperatura de 25 °C, cuando nuestros resultados demuestran que si este análisis se realiza utilizando un mayor rango de temperaturas, como por ejemplo 15 °C, y a su vez si el análisis no se orienta exclusivamente a la producción de FB₁, entonces nos encontramos con cepas de *F. proliferatum* capaces de producir fumonisinas en granos de trigo, con la consecuente acumulación de esta toxina en los granos.

Por lo tanto, las condiciones a campo durante las cuales el trigo es cultivado, pueden ser conductivas para el desarrollo de *F. proliferatum* y la producción de toxinas, incluso como se detalló en el capítulo 2, se ha reportado contaminación con fumonisinas en ambos tipos de granos trigo (trigo pan y trigo duro) y en sub- productos en varios países incluyendo Argentina (Castoria *et al.*, 2005; Roscoe *et al.*, 2008; Kushiro *et al.*, 2009; Chehri *et al.*, 2010; Khosrow *et al.*, 2010; Palacios *et al.*, 2011; Busman *et al.*, 2012; Jakšić *et al.*, 2012; Serrano *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Cendoya *et al.*, 2014b). Como *F. proliferatum* es aislado en alta frecuencia de trigo en todo el mundo, los gráficos de contorno de velocidad de crecimiento y de producción de fumonisinas generados en este trabajo pueden resultar una herramienta útil para facilitar el manejo efectivo en la predicción de riesgos para el crecimiento y la producción de micotoxinas durante la maduración, la cosecha y el almacenamiento de los granos de trigo.

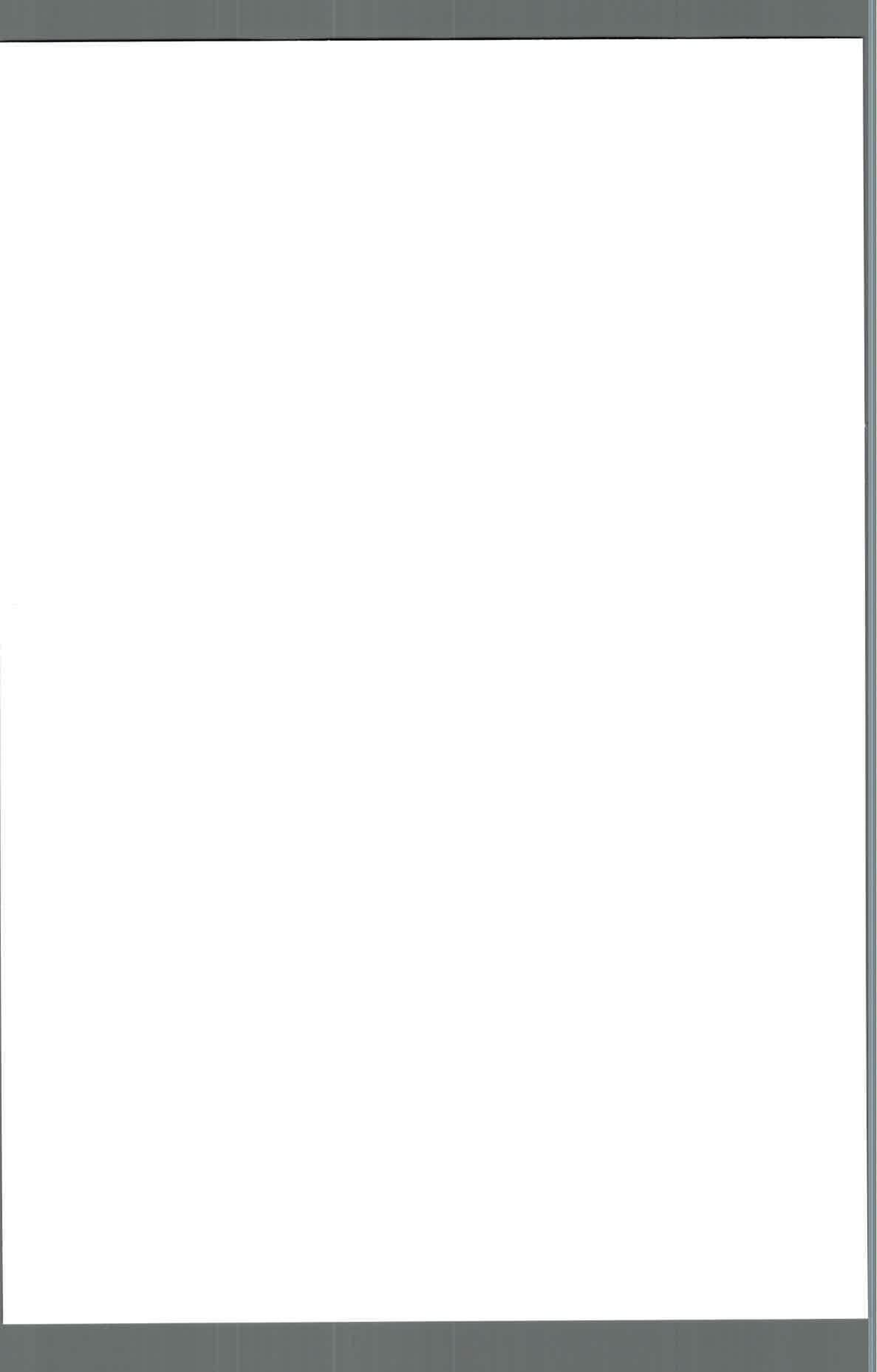


III. Conclusiones

- Los niveles óptimos de a_w para el crecimiento variaron en un rango de 0,995 a 0,96 a una temperatura óptima de 25 - 30 °C, y por otro lado, no se observó producción de fumonisinas a la a_w mas baja en cada ensayo (0,90 y 0,88).
- La producción máxima de fumonisinas totales se observó a 25 °C (0,99 de a_w) para 2 de las cepas, mientras que para la otra cepa la máxima producción fue a 15 °C (a_w de 0,98) en el ensayo realizado en medio de cultivo, mientras que para el ensayo realizado sobre granos 2 cepas produjeron máximas cantidades a 15 °C, mientras que la otra cepa lo hizo a 25 °C, en todos los casos a la máxima a_w (0,995).
- Los perfiles de producción de fumonisinas fueron diferentes entre las cepas estudiadas (dos de ellas fueron capaces de producir FB_1 y FB_2 , y la tercera FB_1 , FB_2 y FB_3), y estuvieron sujetos a las temperaturas de incubación ensayadas.



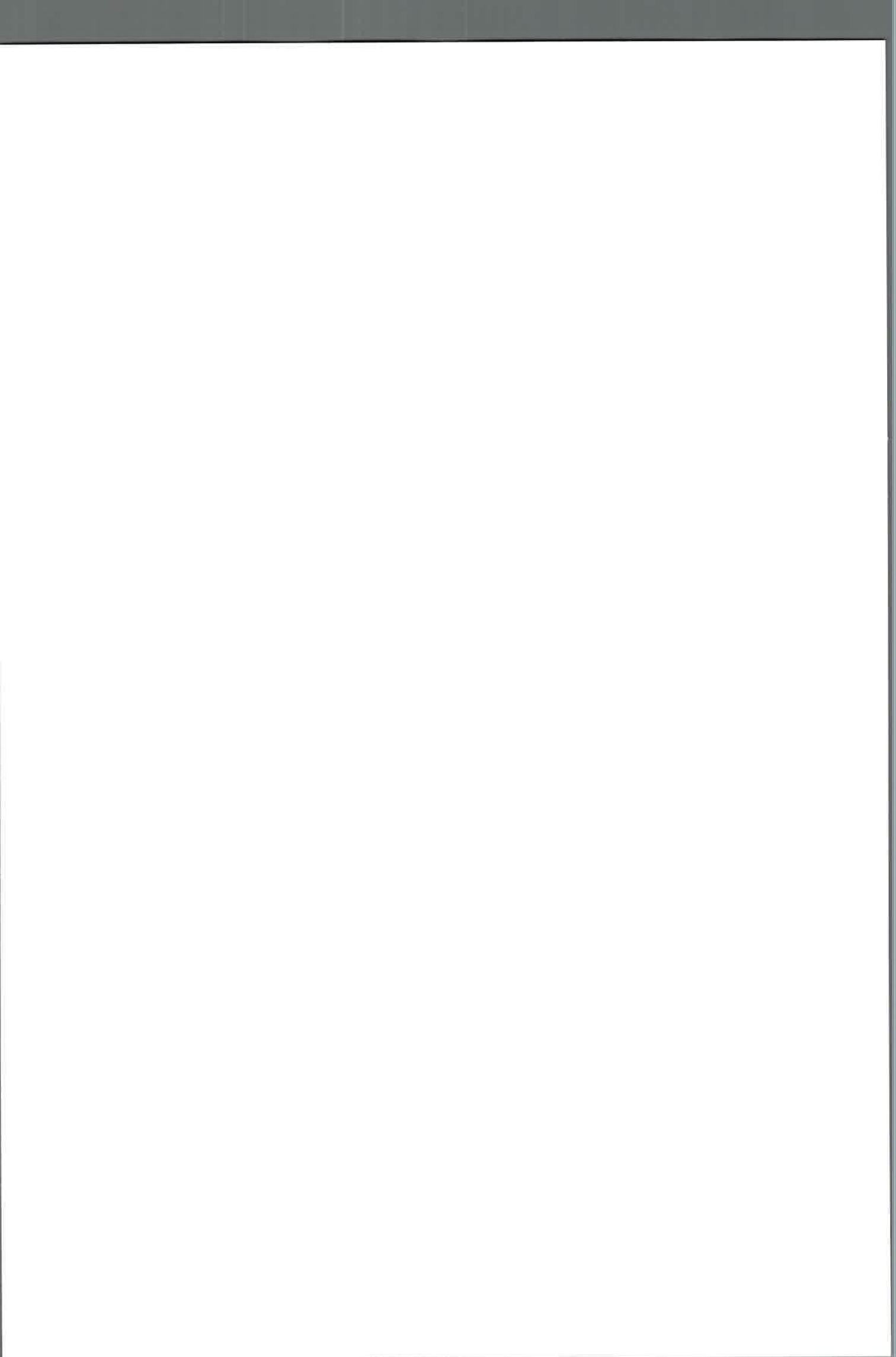
CAPÍTULO IV.



CAPÍTULO IV. INFLUENCIA DE FACTORES ABIÓTICOS EN LA EXPRESIÓN DE GENES *FUM* POR CEPAS DE *Fusarium proliferatum* EN MEDIO DE CULTIVO A BASE DE TRIGO

IV. Introducción

Como se demostró en el capítulo III, el crecimiento y la producción de fumonisinas por *F. proliferatum* es el resultado de la compleja interacción de ciertos factores bióticos y/o abióticos en donde el estrés osmótico y la temperatura resultan ser de gran relevancia. Dependiendo de la combinación de estos factores la vía biosintética de las FBs podría ser activada o reprimida. Se conoce que los genes de la vía biosintética de las fumonisinas (*FUM*) está organizada en *clusters*, al igual que ocurre con otras toxinas producidas por hongos filamentosos. Al menos 17 genes *clustereados* codifican las actividades enzimáticas responsables de la síntesis de las FBs, y la expresión de estos genes parecería estar co-regulada (Desjardins y Proctor, 2007; Proctor *et al.*, 1999, 2003). Así la producción de fumonisinas está directamente relacionada con la expresión de los genes *FUM*, lo cual está influenciado por las condiciones ecológicas. El gen *FUM1*, codifica para una enzima policétido-sintetasa requerida para la producción de fumonisinas (Proctor *et al.*, 1999), la cual cataliza el paso inicial en la biosíntesis de esta toxina (Bojja *et al.*, 2004). Se ha observado una correlación positiva (significativa) entre las cantidades relativas de transcriptos del gen *FUM1* cuantificados mediante RT-PCR en tiempo real y cantidades de fumonisinas producidas tanto por *F. verticillioides* como por *F. proliferatum* (López-Errasquín *et al.*, 2007). Otro de los genes implicados en la biosíntesis de las fumonisinas el gen *FUM8*, el cual codifica para una aminotransferasa requerida para la síntesis de la molécula de FB₁ madura y biológicamente activa (Seo *et al.*, 2001). Por otra parte, el gen *FUM19* se localiza aproximadamente 35 kb corriente abajo del gen *FUM1* y codifica para un transportador ABC (ATP-binding cassette) involucrado en el proceso de exportación extracelular de la toxina (Proctor *et al.*, 2003). Hasta la fecha, son pocos los trabajos que han intentado relacionar factores medioambientales claves para el desarrollo fúngico con la expresión de genes involucrados en la producción de fumonisinas por *F. proliferatum*. Además, estos escasos estudios, están mayoritariamente restringidos al maíz como principal cereal infectado por este patógeno (Kohut *et al.*, 2009; Marín *et al.*, 2010; Fanelli *et al.*, 2013).



IV. Hipótesis

Los factores abióticos (actividad de agua y temperatura) tienen efecto sobre la velocidad de crecimiento, la producción de fumonisinas y la expresión de genes *FUM* en cepas de *F. proliferatum*.

IV. Objetivo general

Evaluar la influencia de factores abióticos (actividad acuosa y temperatura) sobre la expresión de genes *FUM* por cepas de *F. proliferatum* aisladas de trigo en un medio de cultivo a base de trigo, investigando la relación entre la expresión de los genes *FUM* y la producción de fumonisinas.

IV. Objetivos específicos

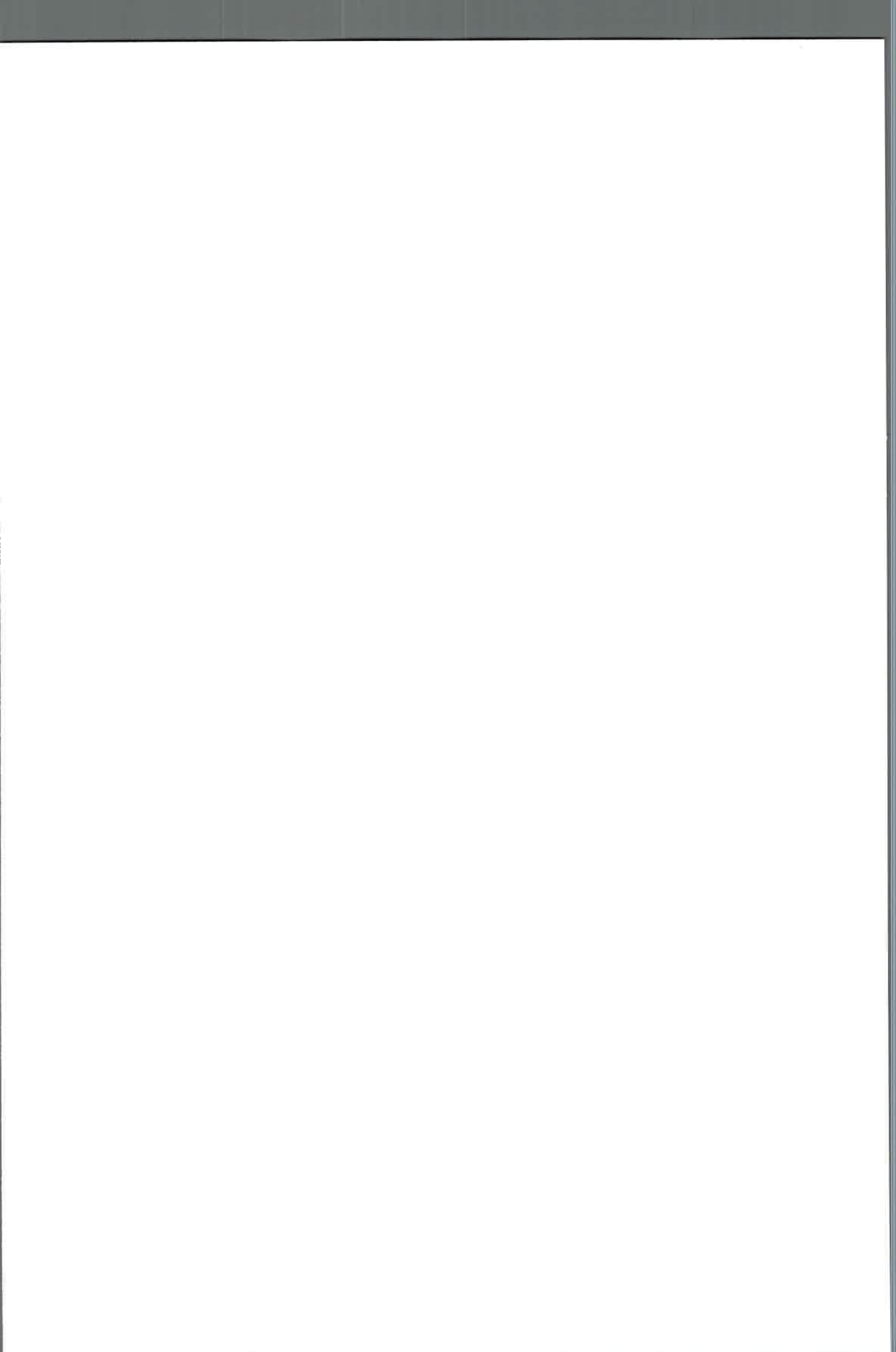
1. Comparar la producción de fumonisinas por cepas de *F. proliferatum* aisladas de granos de trigo y de maíz, utilizando medios de cultivo con dichos sustratos.
2. Realizar un ensayo cinético de expresión de genes *FUM* y de producción de fumonisinas a distintos tiempos de incubación de cepas de *F. proliferatum*.
3. Comparar los efectos de la temperatura y el estrés osmótico en el crecimiento, la producción de fumonisinas y la expresión de los genes *FUM8* y *FUM19* en tres cepas de *F. proliferatum* aisladas de granos de trigo, utilizando un medio de cultivo a base de trigo.

IV. Materiales y métodos

IV.1. Capacidad toxicogénica y análisis de expresión de genes *FUM* en medio de cultivo a base de trigo y maíz

IV.1.1. Cepas

Se utilizaron cepas de *F. proliferatum* ITEM 15654, ITEM 15664 e ITEM 15661, descritas en el punto III.1.1. A modo de comparación se incluyeron también en esta fase del estudio otras dos cepas de *F. proliferatum* pertenecientes a la colección de cepas del Mycologie & Sécurité des Aliments (MycSA), Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)-Bordeaux Aquitaine (Francia), una fue *F. proliferatum* 381, aislada de granos de maíz en Francia con capacidad toxicogénica (FBs) demostrada. La otra cepa fue *F. proliferatum* 58, la cual es una cepa de origen brasilero, aislada de granos de maíz y que también mostró capacidad de producir fumonisinas.



Los cultivos se mantuvieron en medio PDA (Scharlau Chemie, Francia) a 4 °C y se conservaron como suspensión de esporas en glicerol al 15% a -80 °C en el MycSA, INRA-Bordeaux Aquitaine (Francia).

IV.1.2. Medios de cultivo

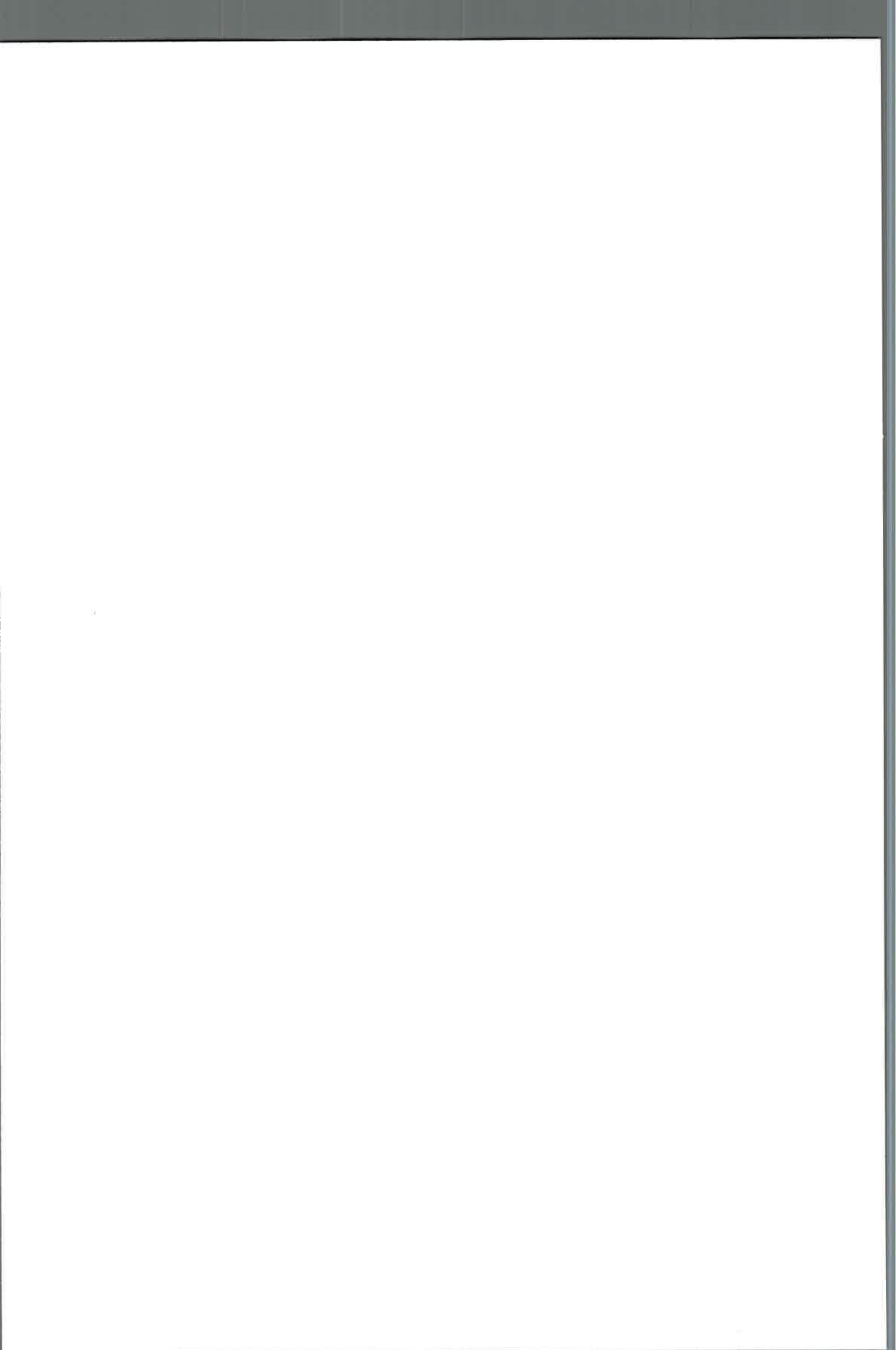
- Agar trigo 2%: Trigo molido 30 g (BioInta 3004); agar 20 g; agua destilada 1000 mL. El medio se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121 °C, los frascos con medio de cultivo estéril fueron mezclados enérgicamente antes de verter su contenido en placas de Petri de 9 cm de diámetro (15 mL por placa). Se utilizó la misma partida de trigo con la que se realizó el ensayo *in vitro* y en granos irradiados.
- Agar maíz 2%: Maíz molido 30 g; agar 20 g; agua destilada 1000 mL. El medio se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121 °C, los frascos con medio de cultivo estéril fueron mezclados enérgicamente antes de verter a placas de Petri de 9 cm de diámetro (15 mL por placa).

Sobre la superficie del medio de cultivo (agar trigo y agar maíz) se colocaron membranas de celofán que fueron previamente esterilizadas mediante autoclave en un recipiente conteniendo agua destilada utilizando un programa de 105 °C durante 20 minutos. A otro grupo de placas se les colocó sobre la superficie del agar membranas Amersham Hybond N⁺ (membranas de nitrocelulosa con carga eléctrica positiva que se utilizan para Southern Blot) (Amersham, Alemania). La utilización de membranas sobre la superficie del agar tuvo como objetivo la fácil remoción de la biomasa fúngica para la posterior extracción de ARN, previniendo el arrastrado de medio de cultivo. A su vez, la calidad de la membrana se relaciona con la capacidad tanto de los nutrientes como de los metabolitos fúngicos de difundir en uno u otro sentido a través de la misma. De acuerdo a los resultados obtenidos en este primer ensayo, se decidió utilizar en los estudios posteriores las membranas Amersham Hybond N⁺ (Amersham, Alemania) que mostraron mejores resultados.

- Agar papa glucosado (APG): De tipo comercial, se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante (Difco, Francia).

IV.1.3. Preparación del inóculo

Para la preparación de los inóculos, las cepas fueron crecidas en tubos de APG a 25 °C en oscuridad durante 7 días, luego a partir de los cultivos se prepararon suspensiones de esporas adicionando 5 mL de agua destilada a los tubos con posterior



agitación. El recuento de esporas en las suspensiones se realizó utilizando una Cámara de Neubauer, cuando fue necesario las concentraciones se ajustaron para obtener soluciones de 10^6 esporas/ mL.

IV.1.4. Inoculación e incubación

Las placas de Petri conteniendo los medios de cultivo (agar trigo 2% y agar maíz 2%) con las membranas fueron inoculados con 0,1 mL de suspensiones de esporas de las 5 cepas de *F. proliferatum*. Las placas inoculadas se incubaron a 25 °C durante un período de 3 días. Se inocularon 6 placas de cada uno de los medios para cada cepa.

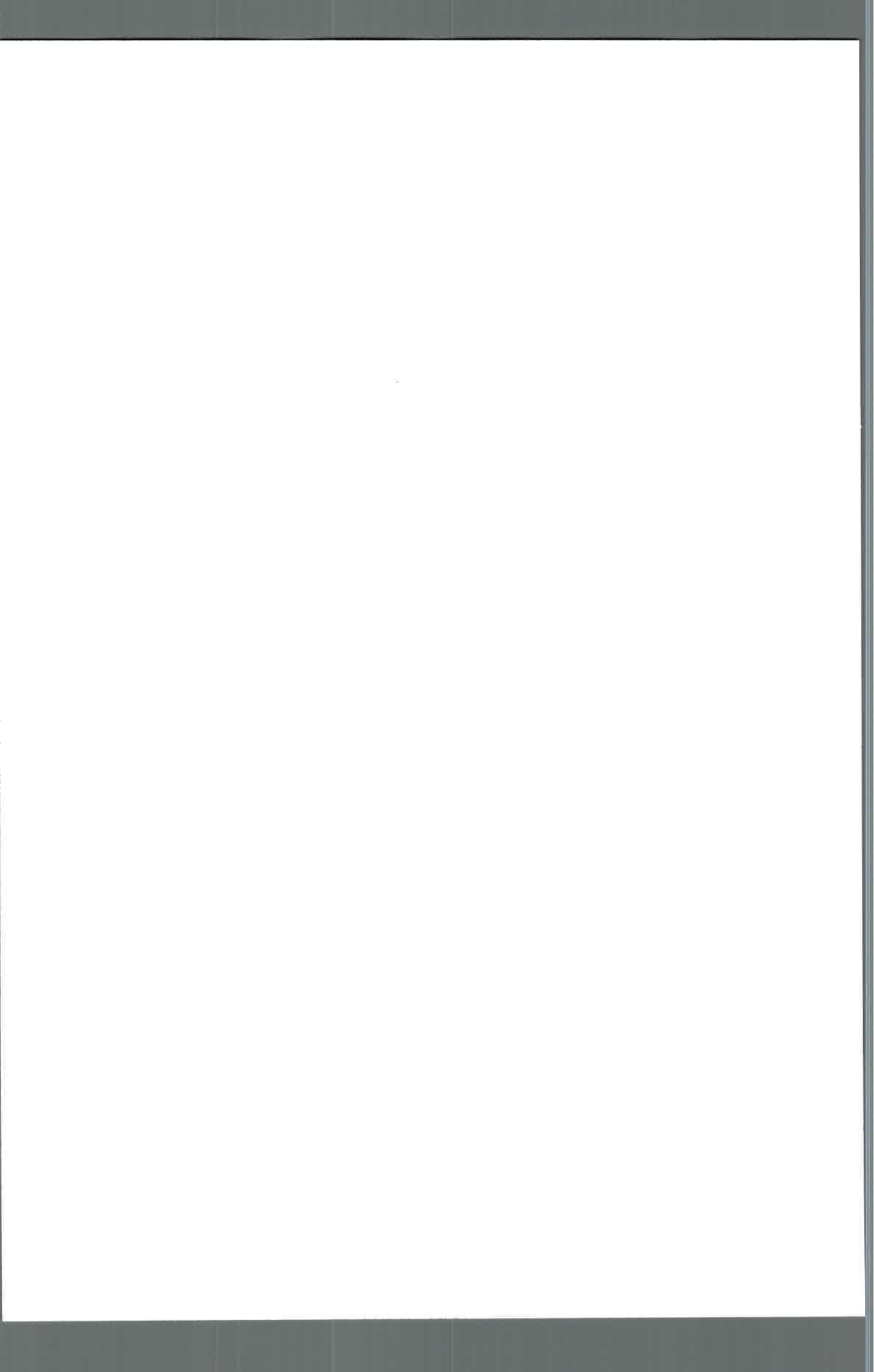
IV.1.5. Expresión de genes *FUM*

IV.1.5.1. Extracción de ARN total

Transcurridos los 3 días de incubación de las cepas de *F. proliferatum* en las placas con medio de cultivo, se obtuvo el micelio mediante barrido de la superficie de las mismas con espátulas estériles, se colocó el mismo en microtubos estériles e inmediatamente se congeló en nitrógeno líquido. Posteriormente el micelio de cada cepa fue congelado a -80 °C hasta la correspondiente extracción de ARN (se juntó micelio de dos placas para hacer una repetición biológica). Previo a la extracción de ARN, los micelios fueron liofilizados durante 3 días, una vez que los mismos se encontraron completamente secos, fueron molidos utilizando un TissueLyser (Qiagen, Francia) durante 1 minuto a 30 Hz. A partir de 100 mg de micelio se procedió a la extracción de ARN, para la cual se utilizó el kit comercial QIAGEN® siguiendo las instrucciones del fabricante.

IV.1.5.2. Tratamiento con ADNasa, determinación de concentración, pureza y calidad del ARN total

Una vez obtenidos los correspondientes ARNs, se procedió a un tratamiento de los mismos con ADNasa, para eliminar la posible contaminación con ADN genómico, para esto se utilizaron productos Ambion®. La mezcla de reacción por tubo estaba compuesta por 30 µL de la solución del ARN extraído, 3 µL de *buffer* DNase I 10X y 1 µL de enzima rDNasa I. Esta mezcla bien homogeneizada fue incubada a 37 °C durante 20 minutos. A continuación, la reacción fue detenida con el agregado de 2 µL de DNase Inactivation Reagent y posteriormente incubada durante 2 minutos a temperatura ambiente. Para finalizar los tubos fueron centrifugados durante 90 segundos a 1000 g, y el sobrenadante fue trasvasado a nuevos tubos con la precaución de no tocar el precipitado.



Las soluciones de ARN fueron colocadas inmediatamente en hielo para proseguir con el análisis de calidad del mismo. En primer lugar, para verificar si el tratamiento con la ADNasa se realizó correctamente se utilizaron los ARN como molde para una reacción de qPCR utilizando los cebadores para amplificar el gen de la β -tubulina (ver programa y cebadores en tabla 1). El paso siguiente fue la determinación de la concentración del ARN extraído utilizando un espectrofotómetro NanoDrop-ND. La pureza del ARN se estimó a partir de la relación de absorbancia A260/A280 y A260/A230; y el análisis de la calidad (de esos ARN) se llevó a cabo mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%.

IV.1.5.3. Síntesis de ADNc

Para sintetizar el ADN copia (ADNc), se utilizó SuperScript_ II First-StrandSynthesis System para RT-PCR (Invitrogen, Francia), la mezcla de reacción en los microtubos tenía un volumen final de 10 μ L, y estaba compuesta por Mix dNTP (10 mM) 1 μ L, oligo (dT)₂₀ 50 mM 1 μ L, y 1 μ g ARN (hasta 8 μ L, dependiendo de la concentración de cada tubo) y agua libre de ARNasas para completar el volumen en los casos en que fuera necesario. La mix RT se calculó para un volumen de 20 μ L por tubo, y estaba compuesta por: RT buffer (10X) 2 μ L, MgCl₂ (25 mM) 4 μ L, DTT (0,1 M) 2 μ L, RNasa OUTTM (40U/ μ L) 1 μ L, SSIIRT (200U/ μ L) 1 μ L.

La reacción de transcripción inversa se llevó a cabo utilizando un equipo iCycler_ (Bio-Rad, Francia). El programa utilizado se representa en la figura 1.

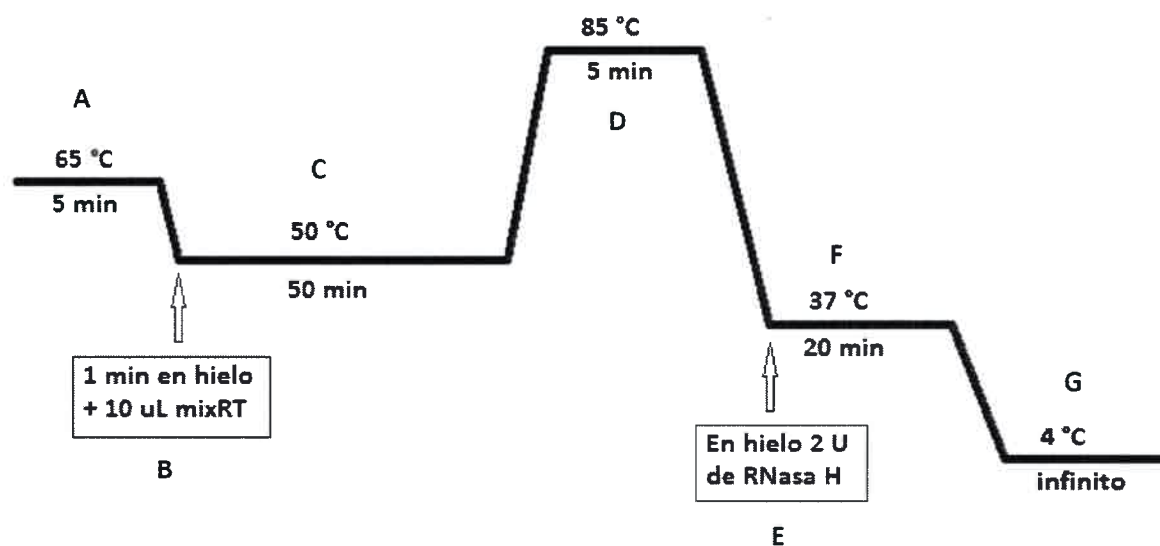
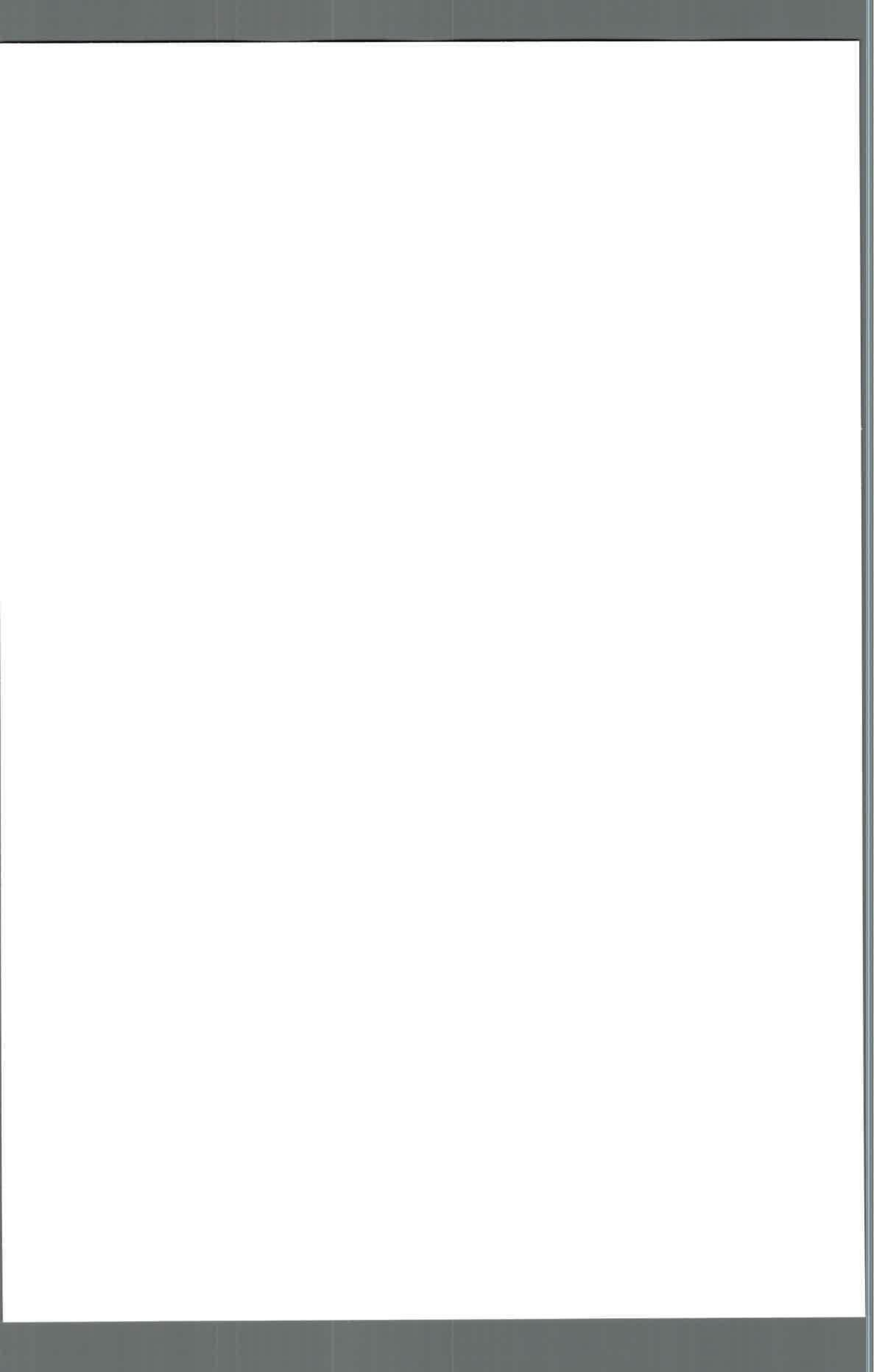


Figura 1. Programa de transcripción inversa. **A:** Incubación de mix dNTP/ARN/Oligo dT. **B:** Detención del programa, incubación en frío y agregado de RT mix en cada microtubo. **C:** incubación. **D:** Modificación de temperatura de incubación. **E:** Detención del programa, incubación en frío y agregado de RNasa H a cada tubo. **F:** Incubación. **G:** Finalización.



Una vez obtenidos los ADNc fueron conservados a 4 °C hasta el momento de su utilización.

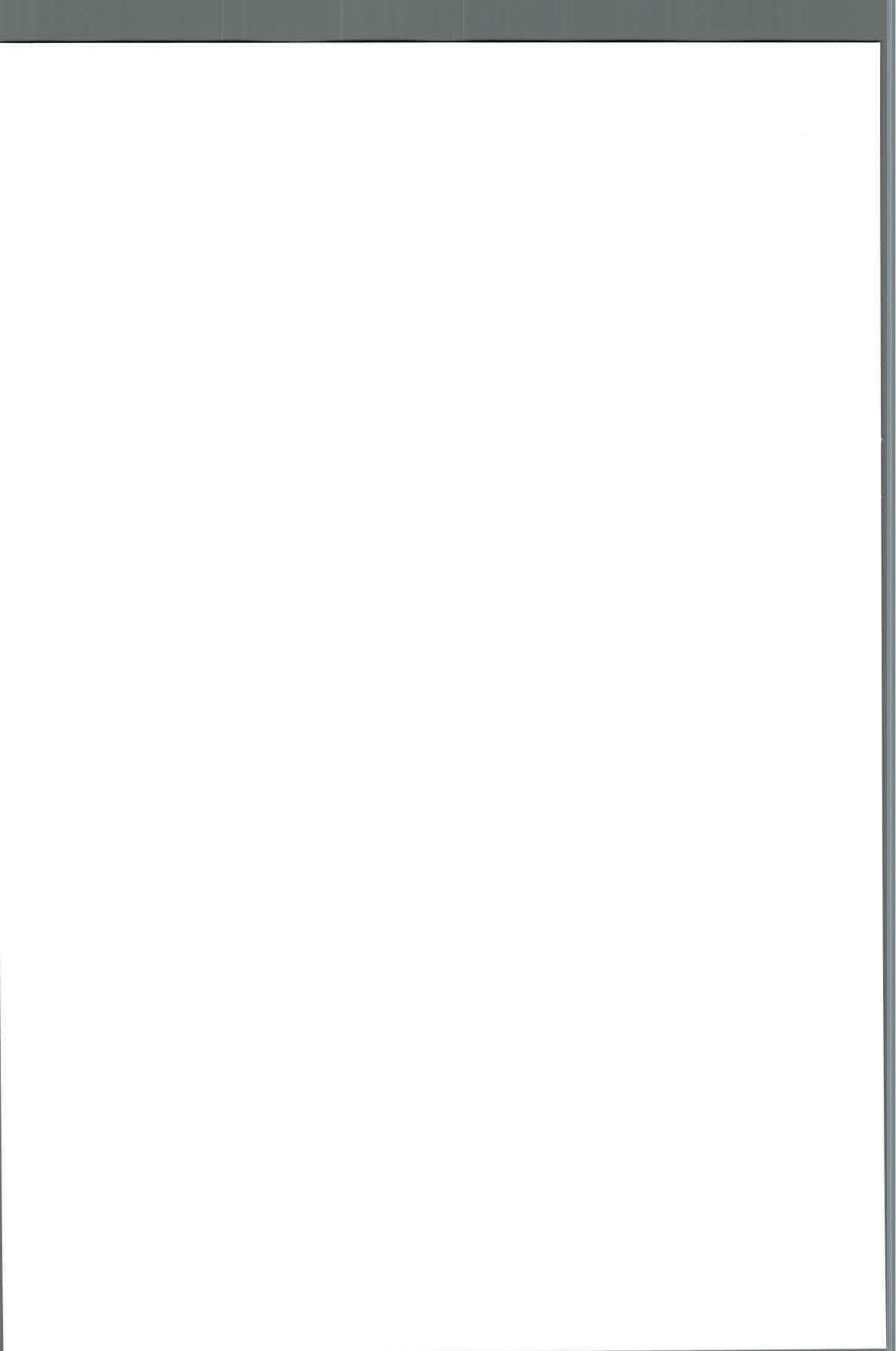
IV.1.5.4. Preparación de las soluciones de trabajo de ADNc

Los ADNc obtenidos fueron diluidos hasta alcanzar soluciones de los mismos equivalentes a 10 ng/ μ L y 20 ng/ μ L de ARN inicial para obtener las soluciones de trabajo y soluciones para la elaboración de curvas de determinación de eficiencia, respectivamente.

IV.1.5.5. RT-PCR en tiempo real

El análisis de RT-PCR en tiempo real fue realizado con un equipo LightCycler_2.0 y con el Software LightCycler 3.5.3 (Roche, Francia). Se evaluó la abundancia de los transcritos de los genes *FUM1*, *FUM9* y *β -tub* (gen de la β -tubulina, de expresión constitutiva), en 1 μ L de cada una de las muestras de ADNc (concentración 10 ng/ μ L) en un volumen final de reacción de 10 μ L, utilizando el kit QuantiTect_ SYBR_ Green PCR (Qiagen, Francia). Este colorante detecta ADN de doble hélice, intercalándose en esta molécula y generando una señal fluorescente cuando la muestra es excitada por una fuente de luz. Los cebadores se utilizaron a una concentración final de 1 mM cada uno (Tabla 1). Las condiciones térmicas de amplificación para cada uno de los genes se realizaron en función de lo detallado en la tabla 1. Las amplificaciones se realizaron por triplicado para cada una de las repeticiones biológicas. Para todas las muestras, se incluyeron controles negativos (mix de reacción sin ADNc), para comprobar posibles contaminaciones, y también controles positivos que consistían en soluciones de ADN genómico (ADNg) de las cepas de *F. proliferatum*. Para la extracción del ADNg de las cepas de *F. proliferatum* ITEM 15654, ITEM 15661 e ITEM 15664, éstas fueron crecidas en PDA a 25 °C durante 5 días, y transcurrido el período de incubación se obtuvo el micelio mediante barrido de la superficie de las placas con espátulas estériles, se lo colocó en microtubos y fue congelado a - 80 °C. A continuación estos micelios fueron liofilizados durante 3 días, y una vez que se encontraron completamente secos, fueron molidos utilizando un TissueLyser (Qiagen, Francia) durante 1 minuto a 30 Hz. A partir de 100 mg de micelio se procedió a la extracción de ADN, para la cual se utilizó el kit comercial DNeasy Plant Mini Kit QIAGEN® siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para determinar la eficiencia de la PCR, se utilizó una mezcla de ADNc que fue preparada mezclando fracciones de los ADNc de cada una de las muestras. A continuación, se prepararon diluciones seriadas de la mezcla de ADNc (20; 2; 0,2; 0,02 y



0,002 ng/ μ L equivalentes de ARN). Luego, para cada gen la eficiencia de la PCR (E) fue determinada con las diluciones seriadas como describe Ponts *et al.* (2007).

La ausencia de productos de amplificación de PCR no-específicos y la formación de dímeros de cebadores fue corroborada mediante la corrida de curvas de *melting*.

Cabe aclarar en este punto que para todos los ensayos en los que se analizó la expresión génica, los cebadores utilizados fueron primero probados con ADN genómico tanto de cepas de *F. proliferatum* como de *F. verticillioides*, y sólo se muestran en este trabajo aquellos con los que se observaron buenos resultados, ya que además de los aquí presentados se analizaron una gran cantidad de cebadores para la amplificación de diferentes genes *FUM*.

Tabla 1. Secuencias de los cebadores y programas utilizados para la amplificación de los genes *FUM1*, *FUM9* y β -*tubulina*

Cebador	Secuencia	Amplificación	Pb	Cita- Acceso
<i>FUM1</i>	F520:5'-GGATTGGCTGGATCTTCACAG-3'	95 °C-5min 40 ciclos 10 seg a 95 °C y 40 seg a 60 °C	356	AF155773
	R872:5'-GAAGATGGCATTGATTGCCTC-3'			
<i>FUM9</i>	F: 5'-ATGAGCAAGCAACTCCAGC- 3'	95 °C-5 min 40 ciclos 10 seg a 95 °C y 40 seg a 62 °C	386	AF155773
	R:5'-GGTGACCTCACCAACAACCAG- 3'			
β - <i>tub</i>	261F:5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTT- 3'295	95 °C-5 min 40 ciclos 10 seg a 95 °C y 40 seg a 62 °C	295	Glass y Donaldson (1995)
	536R:5'-GATTGACCGAAACGAAGTTG-3'			

pb, Pares de bases.

IV.1.5.6. Análisis cuantitativo de los datos obtenidos por RT-PCR en tiempo real

En el análisis de RT-PCR en tiempo real la cuantificación se basa en *threshold cycle (Ct)*, que se define como el primer ciclo de amplificación en el cual la señal de fluorescencia es mayor que el mínimo nivel de detección, indicando que los productos de PCR se vuelven detectables. En este primer ensayo de capacidad toxicogénica y análisis de expresión sólo se analizaran los valores de *Ct*.

IV.1.6. Fumonisinias

IV.1.6.1. Extracción de fumonisinias

El agar de las placas utilizadas para la obtención de micelio, fue colocado en recipientes, y su peso fue determinado, luego el agar cortado en trozos fue agitado con 30 mL de acetonitrilo puro durante 30 minutos en agitador rotatorio a 200 rpm. A continuación, los extractos fueron filtrados utilizando filtros de 0,45 μm (Millipore, Francia) y 5 mL de cada filtrado fueron evaporados a 60 °C utilizando nitrógeno gaseoso. Los viales con los extractos evaporados se conservaron a 4 °C hasta su posterior análisis por HPLC-MS-MS.

IV.1.6.2. Análisis de fumonisinias

Para el análisis de las fumonisinias extraídas, los extractos secos fueron resuspendidos en 250 μL de acetonitrilo:agua (7:3 v/v), luego estos fueron filtrados utilizando filtros de 0,2 μm (Millipore, Francia) y colocados en viales para su posterior análisis por HPLC-MS-MS.

Los análisis fueron realizados en HPLC- MS-MS (Agilent 1100 series) equipado con una bomba Agilent G1311, un auto-inyector Agilent G1313, un detector de arreglo de diodos Agilent G1315 PDA acoplado a un espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolos en tándem (Q-Trap 2000 ABSciex) con fuente de electro spray ionización (ESI). La columna utilizada fue una Kinetex C18 2,6 μm (4,6 x150 mm) con precolumna. La interfase se trabajó en modo de ionización electrospray positiva. Como gas de nebulización y de desolvatación se utilizó nitrógeno calentado a 420 °C. El voltaje del capilar fue de 4,5 kV. El flujo de nitrógeno se ajustó a 40 y 60 (unidades arbitrarias) para los gases de cono y desolvatación, respectivamente. Para la determinación de fumonisinias se utilizó el método de monitoreo de reacciones múltiples (MRM). Se obtuvieron los cromatogramas correspondientes a las trazas de las transiciones del ión precursor de FB $[\text{M}+\text{H}]^+$ a dos iones productos o hijas para dar cumplimiento a criterios cualitativos y cuantitativos. La adquisición de los datos y el procesamiento de los mismos se realizaron mediante un software Analyst V. 1.5.2, ABCciex. Se desarrolló un procedimiento cromatográfico en gradiente con fase móvil A: metanol:acetonitrilo (50/50 v/v) con ácido fórmico 0,1%, y fase móvil B: 0,1% ácido fórmico. El flujo fue de 0,7 mL/minuto. La temperatura de la columna se mantuvo a 45 °C. Se analizaron extractos blanco de matriz de modo tal de confirmar que no había interferencias espectrométricas que provenían de la misma. Se inyectaron alícuotas de 5 μL de los extractos de las muestras en la unidad HPLC. Se tuvieron en cuenta cuatro puntos para la identificación de las fumonisinias: el tiempo de retención, el ion precursor $[\text{M} + \text{H}]^+$ y los dos iones

productos. Se realizó una curva de calibración inyectando 5 μ L de diferentes soluciones estándar con mezclas de FB₁ y FB₂ (10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 y 5000 ng/mL), las cuales fueron preparadas a partir de stock de testigos de fumonisinas, que fueron preparadas disolviendo FB₁ y FB₂ (SigmaAldrich) puras en acetonitrilo:agua (1:1, v/v) a una concentración de 50 μ g/mL, obteniéndose buena linealidad con un coeficiente de correlación mayor a 0,994 para el rango de calibración. El límite de detección (LD) basado en una relación señal-ruido (3:1) y de cuantificación (LC) basado en una relación señal-ruido (5:1) del instrumental fue de 2,5 ng/mL y 5 ng/mL, para FB₁ y FB₂ respectivamente. Para la cuantificación de FB₁ se utilizó la traza m/z 722 > 352, mientras que para la identificación de FB₂ y FB₃ se utilizó la traza 706 > 336. El pico precursor [M + H]⁺, los dos picos productos, los tiempos de retención y la configuración del detector, se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Parámetros utilizados para analizar fumonisinas mediante HPLC-MS/MS

Compuesto	[M + H] ⁺	t _R /min	Productos (m/z)	CV (V)	CE (V)
FB ₁	722	5,4	334	91	57
			352		55
FB ₂	336,3	17,6	706,3	96	59
			318,5		51
FB ₃	336,3	9,3	706,3	96	59
			318,5		51

[M + H]⁺, ion precursor; t_R, tiempo de retención; iones producto (m/z), iones hijos; CV (V), voltaje de cono; CE (V), energía de colisión.

IV.2. Ensayo cinético de expresión de genes *FUM* y de producción de fumonisinas a distintos tiempos de incubación de cepas de *Fusarium proliferatum*

IV.2.1. Cepas

Para este ensayo se utilizaron las cepas de *F. proliferatum* ITEM 15661, ITEM 15664, e ITEM 15654, descritas en el punto III.1.1.

IV.2.2. Medio de cultivo

Se utilizó el medio de cultivo agar trigo 2%, descrito en el punto IV.1.2. A todas las placas se les colocó en la superficie del agar membranas Amersham Hybond N⁺

(Amersham, Alemania), ya que cómo se mencionó anteriormente con su utilización se observaron mejores resultados.

IV.2.3. Inoculación e incubación

Todas las placas de Petri conteniendo el medio agar trigo 2% y las membranas fueron inoculadas con las 3 cepas de *F. proliferatum* de la misma manera en que fue descrito en el punto IV.1.4. Las placas fueron luego incubadas a 25 °C durante 3, 5, 7 y 15 días, y se inocularon 2 placas por cepa para cada uno de los tiempos de incubación.

IV.2.4. Expresión de genes *FUM*

Para realizar el correspondiente análisis de expresión de los genes *FUM*, los cultivos de las diferentes cepas fueron detenidos a los tiempos de incubación anteriormente descritos, y se procedió a la extracción de ARN, tratamiento con ADNasa, síntesis del ADNc, y preparación de las soluciones de la misma manera en que fue explicado en los puntos IV.1.5.1, IV.1.5.2., IV.1.5.3., y IV.1.5.4., respectivamente.

IV.2.4.1. RT-PCR en tiempo real

Los cebadores utilizados en el ensayo del punto IV.1.5.5 (*FUM1* y *FUM9*), no mostraron buenos niveles de eficiencia en este ensayo, por lo que para llevar a cabo las qPCR se diseñaron cebadores para amplificar los genes *FUM8* y *FUM19* utilizando el programa Primer3 (Koressaar y Remm, 2007; Untergasser *et al.*, 2012) a partir de secuencias de *F. proliferatum* almacenadas en el *genBank*: los cebadores para amplificar el gen *FUM8* se basaron en la secuencia del gen *FUM8* (NCBI *GenBank* N° de acceso KF415158.1) y los cebadores para amplificar el gen *FUM19* se basaron en la secuencia del gen *FUM19* (NCBI *GenBank* N° de acceso KF415190.1). Se probaron también otros cebadores, pero sólo fueron seleccionados aquellos con los que se obtuvieron buenas eficiencias (Tabla 3).

Tabla 3. Secuencias de los cebadores y programas utilizados para la amplificación de los genes *FUM8*, *FUM19*, β -*tubulina* (β -*tub*) e *Histona 3* (*H3*)

Cebadores	Secuencia	Amplificación	Pb	Cita
<i>FUM8</i>	F:5'TCCAGATCAAAGGCGTACT-3' R:5'CCCCAGGGTACTTCTTGGAC-3'	95 °C 5 min 40 ciclos 10 seg a 95 °C y 40 seg a 60 °C	149	¹
<i>FUM19</i>	F:5'TGGCGTTATTGACCGTTGTG-3' R:5'CCTTCTGCACACTCACGTG-3'	95 °C-5min 40 ciclos 10 seg a 95°C y 40 seg a 62 °C	202	¹
β - <i>tub</i>	261F:5'GGTAACCAAATCGGTGCTGCT TT-3' 536R:5'GATTGACCGAAACGAAGTTG- 3'	95 °C-5 min 40 ciclos 10 seg a 95 °C y 40 seg a 58 °C	295	Glass y Donaldso n (1995)
<i>H3</i>	F:5'ACTAAGCAGACCGCCCGCAGG-3' R:5'GCGGGCGAGCTGGATGTCCTT-3'	95 °C 5 min 40 ciclos 10 seg a 95°C y 40 seg a 62 °C	377	Kohut et al. (2009)

¹ Cebadores diseñados para este trabajo; Pb, Pares de bases.

IV.2.4.2. Análisis cuantitativo de los datos obtenidos por RT- PCR en tiempo real

La cuantificación relativa de los niveles de ARNm se realizó mediante el método comparativo $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$ (Livak y Schmittgen, 2001). La expresión de los valores se normalizó mediante la utilización del gen constitutivo β -*tub*, que mostró la expresión más estable bajo las diferentes condiciones de trabajo. En el método $\Delta\Delta Ct$, o método de cuantificación relativa de los niveles de expresión del gen problema (en este caso serían los genes *FUM8* y *FUM19*) respecto del gen de control endógeno o constitutivo ("housekeeping", en este caso serían β -*tub* y *H3*) se utilizó el gen β -*tub* para normalizar las cantidades de ARNm de los genes problema (*FUM8* y *FUM19*) por diferencias en la cantidad total de ADNc en cada reacción.

En este método el valor de ΔCt se determina restando la media de los valores *Ct* obtenidos para el gen endógeno, de la media de los valores *Ct* del gen problema. El cálculo del valor $\Delta\Delta Ct$ implica restar a cada ΔCt el valor del ΔCt de un calibrador, que es

la muestra utilizada como base o referencia para obtener el valor relativo de las demás muestras, es decir la situación control. Una vez obtenidos estos valores, la cantidad de un gen problema, normalizado a una referencia endógena y relativa a un calibrador, se obtiene mediante la fórmula: $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$.

IV.2.5. Fumonisinas

En cuanto a la extracción y análisis de las toxinas se procedió de la misma manera en que fue descrito previamente en los puntos IV.1.5.1 y IV.1.5.2.

IV.2.6. Análisis estadístico

Para determinar diferencias entre los niveles de producción de FB₁, FB₂ y FB₃ en relación al tiempo de incubación, y para cada una de las cepas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de un test de Tukey. Idéntico tratamiento se realizó para analizar la expresión relativa de los genes *FUM8* y *FUM19* para cada una de las cepas a los distintos tiempos de incubación utilizando los valores de $\Delta\Delta Ct$. El nivel estadístico de significancia fue determinado con un $p < 0,05$. También fue evaluada la consistencia de los valores de *Ct* de *β -tub* y *H3* haciendo un ANOVA de una vía, y los resultados indicaron que la expresión de estos genes fue estable y consistente en todos los tiempos de incubación, no hubo diferencias significativas entre los valores de *Ct* a los diferentes tiempos de incubación ($p < 0,01$). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa InfoStat para Windows versión 2.03 (SPSS Inc.).

IV.3. Efecto de la actividad acuosa y la temperatura sobre la producción de fumonisinas, la expresión de los genes *FUM8* y *FUM19*, y el crecimiento de 3 cepas de *Fusarium proliferatum* aisladas de trigo en un medio de cultivo a base de trigo

IV.3.1. Cepas

Se utilizaron las cepas de *F. proliferatum* ITEM 15661, ITEM 15664, e ITEM 15654, descritas en el punto IV.1.

IV.3.2. Medio de cultivo

Se adicionaron 15 mL de agar trigo 2% por placa de Petri, en algunos casos suplementado con glicerol (Dallyn y Fox, 1980) para alcanzar distintos niveles de a_w : 0,97 y 0,95, y en otros casos sin el agregado de glicerol (Control: $a_w \sim 1$). El medio se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121 °C. La a_w final de las placas con el medio de

cultivo fue verificada usando un medidor de a_w Aqualab Series 3 (Decágon Devices, Inc, WA, EE.UU). Las superficies del agar de las placas fueron cubiertas con membranas Amersham Hybond N⁺ (Amersham, Alemania).

IV.3.3. Inoculación e incubación

Las placas con el medio de cultivo agar trigo 2% ajustados a las diferentes a_w , y cubiertas con las membranas, fueron inoculadas en el centro con 0,1 mL de una suspensión de 10^6 esporas/mL, de las 3 cepas de *F. proliferatum*. Una vez inoculadas, las placas fueron incubadas a 15 y 25 °C durante un periodo de 5 días. Para cada condición se sembraron placas por triplicado para cada una de las cepas.

IV.3.4. Evaluación del crecimiento

La evaluación del crecimiento se realizó diariamente, midiendo el diámetro de las colonias en dos direcciones durante el período de incubación. Se representó el incremento del radio de la colonia en función del tiempo para cada una de las cepas de *F. proliferatum* utilizadas y en cada una de las condiciones de a_w y temperatura ensayadas. Los datos se ajustaron a una recta correspondiente a la fase de crecimiento lineal, calculándose a partir de allí, la velocidad de crecimiento en mm/día (pendiente de la recta).

IV.3.5. Expresión de genes *FUM*

En cuanto al análisis de expresión de los genes *FUM*, los cultivos de las diferentes cepas fueron detenidos a los 5 días de incubación, y se procedió a la extracción de ARN, el tratamiento con ADNasa, síntesis de ADNc, y preparación de las soluciones de la misma manera en que fue explicado en los puntos anteriores (IV.1.5.1, IV.1.5.2., IV.1.5.3., y IV.1.5.4.).

IV.3.5.1. RT-PCR en tiempo real

Con los resultados de los cebadores ensayados en los puntos anteriores, para esta experiencia se decidió analizar la expresión del gen *FUM8*, y *FUM19*, utilizando como genes de referencia a los genes β -*tub* y *H3*. Los valores de *Ct* obtenidos experimentalmente (valores promedio de las 3 réplicas) para los genes de referencia (*H3* y β -*tub*) fueron comparados a lo largo de los tratamientos a los fines de verificar su estabilidad. Los valores de *Ct* obtenidos experimentalmente para los genes *FUM* analizados, fueron comparados en condiciones control y de tratamiento y normalizados en función de los valores de *Ct* obtenidos para los genes de referencia utilizando REST^a

software REST-384 (Relative Expression Software Tool). El modelo matemático utilizado cuenta las diferencias en la eficiencia para el gen de referencia y el gen problema y para la desviación del *crossing point* ($C_p=C_t$) entre la situación control y las condiciones de tratamiento (Pfaffl, 2001; Pfaffl *et al.*, 2002).

Los niveles de expresión de los genes problema, normalizados en función de la expresión de los genes de referencia, se expresan como un factor de regulación en la condición tratada relativa a la condición control, con una relación: $(E_{\text{problema}})^{\Delta C_t\text{-problema (control-tratamiento)}} / (E_{\text{referencia}})^{\Delta C_t\text{-referencia (control-tratamiento)}}$. La significancia de los resultados de esta relación de expresión fueron analizados utilizando Pair Wise Reallocation Randomisation Test^a con un valor de p de 0,005 utilizando un programa REST^a software REST-384 (Pfaffl, 2001; Pfaffl *et al.*, 2002). En este ensayo pudo utilizarse este programa para realizar el análisis de los valores de C_t debido a la forma en que fueron realizados los diferentes *pool* de ADNc para determinar las eficiencias. Este programa, no asume que las eficiencias son altas, como lo hace uno al hacer el análisis de $\Delta\Delta C_t$, sino que exige cargar los datos de las curvas para recalcularlos. Así, al ingresar todos los datos de las corridas de RT-PCR no sólo determina los niveles de expresión relativos, sino también las eficiencias, y a su vez a diferencia del ensayo anterior, el hecho de utilizar este software permite la utilización de más de un gen endógeno en simultáneo, en este caso particular se utilizaron 2.

La eficiencia de cada uno de los cebadores utilizados en este ensayo se muestra en la tabla 4 que figura a continuación.

Tabla 4. Eficiencias de RT-PCR en tiempo real obtenidas para cepas de *Fusarium proliferatum*

Cebador	Cepas de <i>F. proliferatum</i>		
	ITEM 15661	ITEM 15664	ITEM 15654
β - <i>tub</i>	2,012	2,011	1,930
<i>H3</i>	2,006	2,011	1,991
<i>FUM8</i>	2,001	2,016	2,011
<i>FUM19</i>	2,004	2,016	2,014

IV.3.6. Fumonisinias

En cuanto a la extracción y análisis de las toxinas se procedió de la misma manera que fue descrita previamente en el punto IV.1.5.1., con la excepción de que para la extracción se utilizaron 20 mL de una mezcla de acetonitrilo:agua (1:1), y luego estos mismos extractos fueron los que se inyectaron en HPLC-MS. Los extractos no fueron evaporados hasta sequedad y luego resuspendidos, ya que al haber medios suplementados con glicerol (para alcanzar los niveles de a_w correspondientes) no fue posible realizar la operación.

IV. Resultados y discusión

Como fue detallado en los objetivos, con la finalidad de conocer cómo la expresión de los genes *FUM* es influenciada por factores abióticos tales como la a_w y la temperatura, éste capítulo se planificó en 3 etapas. En una primera instancia se contrastó la capacidad de producción de fumonisinas de las cepas de *F. proliferatum* bajo estudio tanto en un medio de cultivo a base de trigo como en uno a base de maíz, como así también se incluyeron en este punto dos cepas aisladas de maíz, sólo con fines comparativos. En una segunda instancia nos propusimos conocer cuál sería el tiempo de incubación más apropiado para poder realizar un análisis correcto de la expresión de genes *FUM* y de la síntesis de fumonisinas. Una vez optimizadas las condiciones de trabajo, es decir una vez que se logró definir el tiempo de incubación apropiado y los cebadores a utilizar para la amplificación de los genes *FUM* (aquellos que mostraron buenas eficiencias) entonces se procedió al ensayo final para cumplir con el tercer objetivo de este capítulo.

A continuación, se muestra la tabla 5 que resume los resultados obtenidos del análisis de la capacidad de producir fumonisinas luego de 3 días de incubación de cepas de *F. proliferatum*.

En esta tabla puede observarse que para las 3 cepas de *F. proliferatum* aisladas de trigo cultivado en Argentina los niveles medios de fumonisinas producidos en los medios de cultivo a base de maíz fueron muy bajos o no se detectó fumonisinas. Las mismas cepas crecidas en medio de cultivo a base de trigo presentaron mayores niveles de fumonisinas en comparación a los niveles obtenidos en el medio a base de maíz. Cabe destacar que se obtuvieron los mismos patrones de producción ya antes observados para cada cepa en los ensayos realizados tanto en medio de cultivo a base de trigo, como en granos de trigo irradiados (Capítulo III); salvo la cepa ITEM 15661 que

no produjo niveles detectables de fumonisinas, indistintamente del medio utilizado durante el presente estudio.

Tabla 5. Producción de fumonisinas y expresión de genes *FUM* por cepas de *Fusarium proliferatum* en medio de cultivo a base de trigo y maíz, luego de 3 días de incubación

Cepas	<i>FUM1</i>	<i>FUM9</i>	β - <i>tub</i>	Fumonisinias			
	<i>Ct</i>	<i>Ct</i>	<i>Ct</i>	(ng/g)			
	M \pm D.E	M \pm D.E	M \pm D.E	B ₁	B ₂	B ₃	
Trigo	ITEM 15654	32,5 \pm 2,8	30,5 \pm 2,6	20,6 \pm 0,2	72	7	5
	ITEM 15661	> 40	37,5 \pm 1,8	25 \pm 1,3	nd	Nd	nd
	ITEM15664	24 \pm 1,8	21,6 \pm 1,5	20,5 \pm 0,3	10	67	nd
	INRA58	34,1 \pm 1,9	34,2 \pm 1,8	21,3 \pm 0,7	30	2,7	nd
	INRA381	32,2 \pm 0,6	31,9 \pm 1,4	20,4 \pm 1,3	nd	Nd	nd
Maíz	ITEM 15654	> 40	37,8 \pm 1,2	26,7 \pm 1,1	2,7	0,9	1
	ITEM 15661	36,4 \pm 3,6	35,2 \pm 0,9	23,2 \pm 2,1	nd	Nd	nd
	ITEM15664	27,4 \pm 2,1	30,9 \pm 2,2	20,8 \pm 0,7	nd	2,8	nd
	INRA58	32,6 \pm 3,1	32,4 \pm 1,7	20,7 \pm 1,8	35	2,9	nd
	INRA381	36,3 \pm 3,3	35 \pm 0,4	19,8 \pm 0,7	nd	Nd	nd

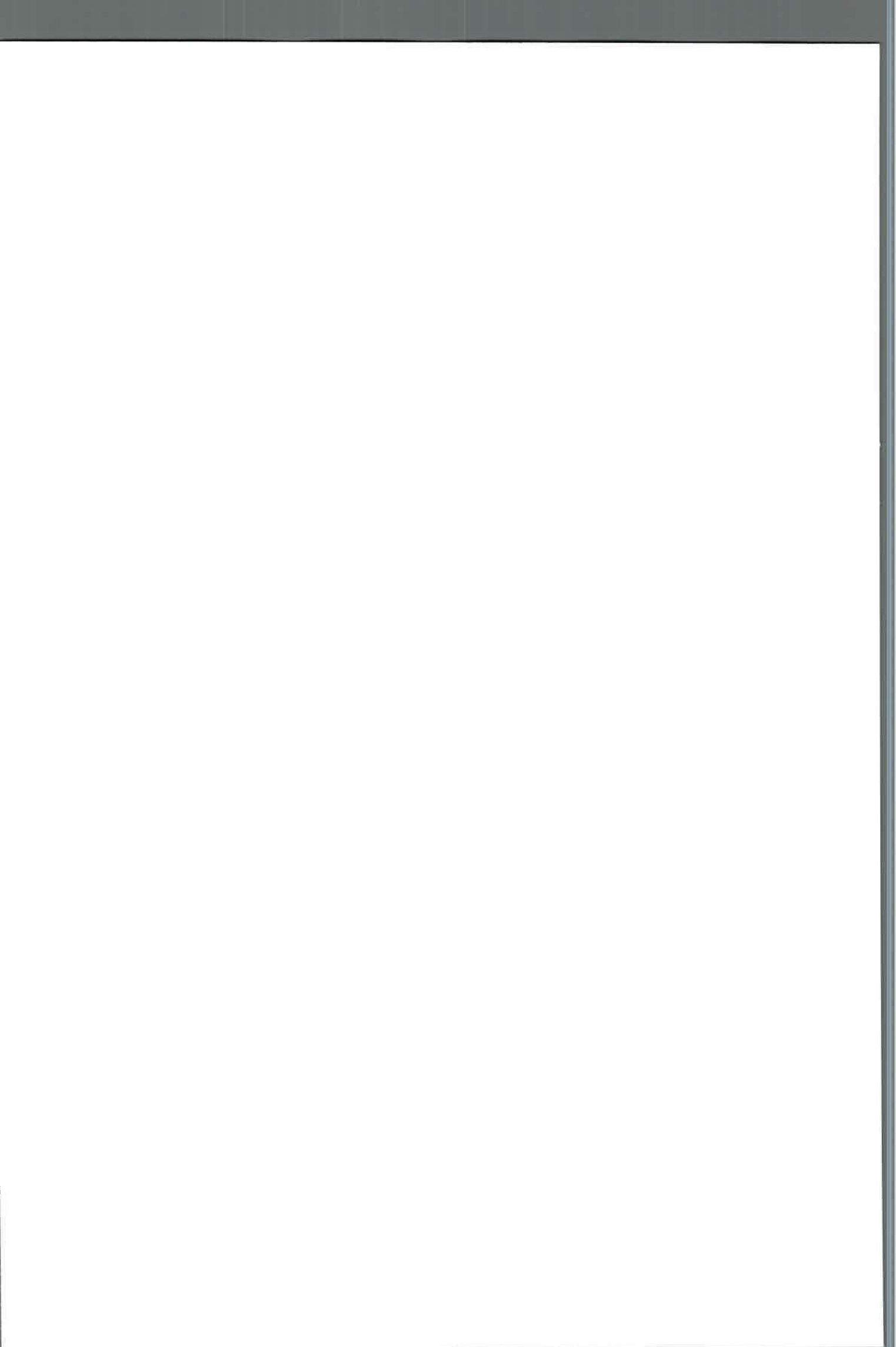
M, Valores medios; D.E, Desvío estándar; nd, No detectado < LC

En cuanto a los valores de *Ct* para los genes *FUM1* y *FUM9* vemos que solo podría pensarse en la existencia de una relación entre la expresión de los mismos y la producción de toxinas para la cepa ITEM 15664 en el medio de cultivo a base de trigo, donde estos valores de *Ct* se vieron disminuidos en comparación con aquellos observados en el medio de cultivo a base de maíz, cuando hubo producción de fumonisinas. Sin embargo, para la cepa ITEM 15654 que produjo fumonisinas, los valores de *Ct* no se modificaron en comparación con la ausencia de fumonisinas en el otro medio de cultivo. Para la cepa ITEM 15661 que no produjo niveles detectables de fumonisinas, los valores de *Ct* permanecieron altos (> 40). La cepa INRA 58 produjo fumonisinas en cantidades similares tanto en el medio de cultivo a base trigo, como en el medio de cultivo a base de maíz, y fue la cepa con mayores niveles de producción de fumonisinas de todas las analizadas en este ensayo en este tiempo de incubación. Sin embargo los niveles de *Ct* permanecieron altos sugiriendo que no habría relación entre la expresión de estos genes y la síntesis de fumonisinas. Por último, la cepa INRA 381 no produjo niveles detectables de fumonisinas en estos medios de cultivo al tiempo de incubación ensayado,

y los niveles de *Ct* fueron altos. Sin embargo, paralelo a este ensayo se probaron placas en donde no se utilizaron membranas de celofán, sino que se utilizaron membranas Amersham Hybond N⁺, en las cuales se observaron valores de *Ct* bajos para la misma cepa en ambos medios de cultivo (resultados no mostrados).

Debido a los resultados observados en la tabla 5 es que se decidió verificar si 3 días de incubación eran suficientes para detectar fumonisinas en los medios de cultivo y relacionarla con la expresión relativa de los genes *FUM* analizados (*FUM1* y *FUM9*). Se realizó para ello un ensayo cinético a diferentes tiempos de incubación, en el cual no se observaron buenos valores de eficiencias (datos no mostrados) con los cebadores utilizados, y como consecuencia se decidió diseñar cebadores para amplificar los genes *FUM8* y *FUM19* basados en secuencias disponibles en el GenBank de cepas de *F. proliferatum*. En la figura 2, se puede observar para cada cepa ensayada los niveles de fumonisinas y los niveles de expresión de los genes *FUM8* y *FUM19* a los distintos tiempos de incubación: 3, 5 y 7 días. Los resultados a los 15 días no se muestran ya que la calidad de los ARN obtenidos no permitió hacer un análisis correcto.

De esta figura se puede analizar qué: los niveles de producción de FB₁, FB₂ y FB₃ por la cepa ITEM 15654 aumentaron en el tiempo, mientras la expresión relativa de los genes *FUM8* y *FUM19* disminuyó a los 7 días. La cepa ITEM 15661 mostró que los niveles de FB₂ aumentaron significativamente en el tiempo, mientras los niveles de expresión relativa de los genes disminuyeron, pero no de manera significativa. Por último para la cepa ITEM 15664 los niveles de FB₁ y FB₂ aumentaron en el tiempo, y la expresión relativa de los genes disminuyó significativamente a los 7 días. Teniendo en cuenta estos resultados se decidió plantear el ensayo final analizando el efecto de diferentes factores abióticos en la expresión de genes *FUM* incubando las cepas durante 5 días, en donde los niveles de fumonisinas son cuantificables y salvo para el gen *FUM19* de la cepa ITEM15664 la expresión relativa de los genes no cambia significativamente.



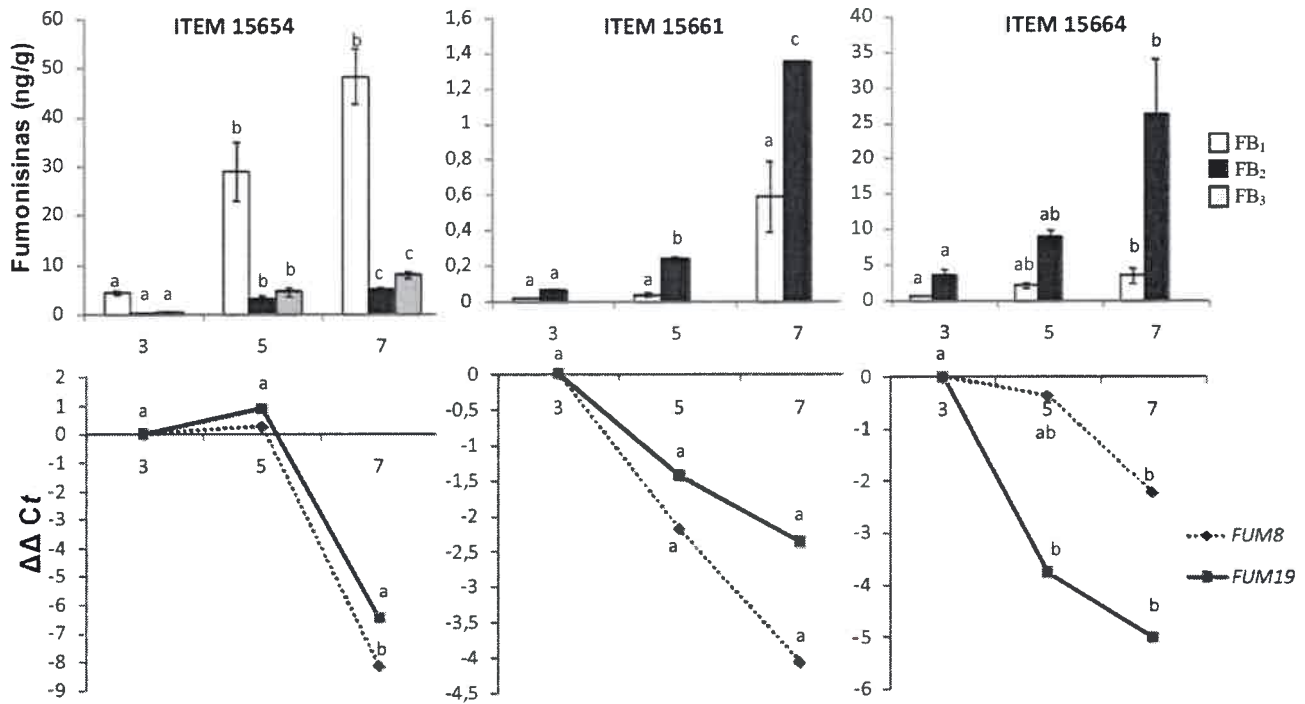
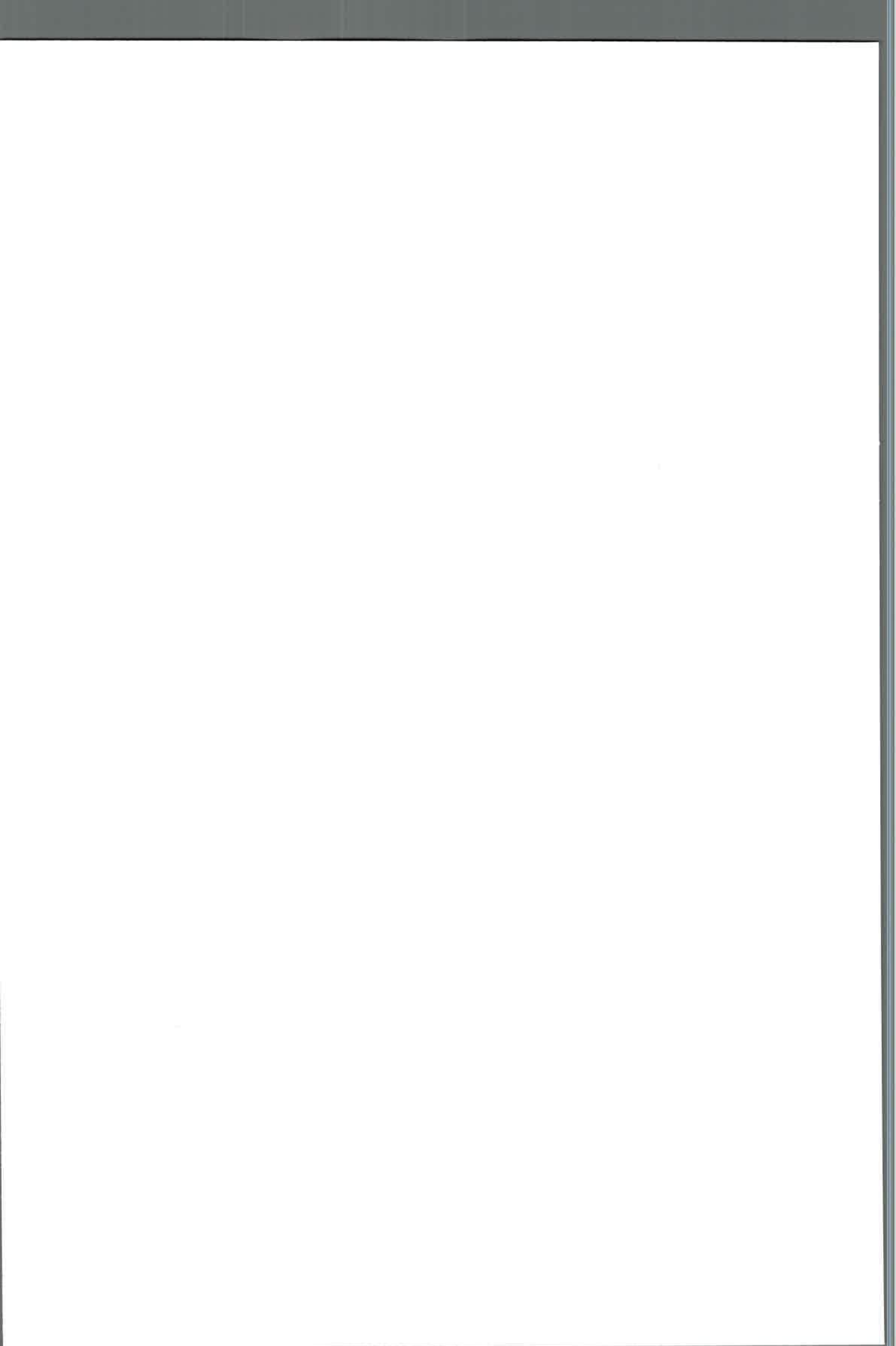


Figura 2. Concentración media de FB₁, FB₂ y FB₃, y expresión relativa de los genes *FUM8* y *FUM19*, a 3, 5 y 7 días de incubación, por 3 cepas de *Fusarium proliferatum*. Los valores de Ct fueron normalizados con los valores de Ct de las corridas de los ADNc del gen *β-tubulina*, y representan el nivel de expresión de los genes *FUM8* y *FUM19* de las cepas de *Fusarium proliferatum* a 5 y 7 días de incubación en comparación con las mismas cepas crecidas a 3 días de incubación. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). Análisis de varianza con prueba de Tukey para cada uno de los tipos de fumonisinas, y para la expresión relativa de los genes *FUM8* y *FUM19*.

En cuanto al análisis de producción de fumonisinas a distintos tiempos de incubación por cepas de *F. proliferatum*, observamos que el factor días de incubación influyó significativamente en la producción de los tres tipos de fumonisinas analizadas para la cepa ITEM 15654. También influyó significativamente en la producción de FB₁ y FB₂ para la cepa ITEM 15664, mientras que para la cepa ITEM 15661 solo influyó en la síntesis de FB₂. Por otro lado, este mismo factor influyó de manera significativa en la expresión relativa del gen *FUM8* para las cepas ITEM 15654 e ITEM 15664, y en la expresión relativa del gen *FUM19* solo en la cepa ITEM 15664 (Tabla 6).

En cuanto a los resultados obtenidos del ensayo realizado a distintas a_w y temperaturas, en líneas generales se observó que las máximas velocidades de



crecimiento se alcanzaron a la máxima a_w (condición control) y a 25 °C para las tres cepas. Además, todas las cepas de *F. proliferatum* fueron capaces de crecer a 15 °C a la máxima a_w ensayada. También se pudo observar que, para cada cepa y temperatura, las velocidades de crecimiento se redujeron significativamente a medida que disminuyó la a_w del medio de cultivo. A 25 °C, la disminución de la a_w de 1 a 0,95 llevó a una reducción de las velocidades de crecimiento en un factor cercano a 2 para todas las cepas evaluadas. En la figura 3 puede observarse que las cepas ITEM15654 e ITEM 15664, presentaron perfiles similares en cuanto a la velocidad de crecimiento en diferentes condiciones de a_w y temperatura: ambas cepas presentaron su máxima velocidad de crecimiento a 25 °C y sin estrés osmótico (situación control a 25 °C), luego la misma fue disminuyendo a medida que la a_w se redujo y que la temperatura disminuyó. Para la cepa ITEM 15664 la velocidad de crecimiento decreció en el siguiente orden: control 25 °C; 0,97 25 °C; control 15 °C; 0,95 25 °C y por último 0,97 15 °C. En el caso de la cepa ITEM 15654 la velocidad de crecimiento se comportó de manera similar, salvo que la condición control a 15 °C no se diferencia significativamente con la velocidad de crecimiento a 0,95 de a_w a 25 °C, y tampoco se diferencian significativamente de la velocidad a 0,97 de a_w y 15 °C con aquella a 0,95 y 25 °C. Para ambas cepas los valores de velocidad de crecimiento son los esperados para cepas de *F. proliferatum*, de hecho, coinciden con lo informado en el capítulo III correspondiente a los ensayos ecofisiológicos e incluso con valores reportados por otros autores (Marín *et al.*, 2010). En cuanto a la cepa ITEM 15661 (Figura 3), se puede observar el mismo efecto de la temperatura y de la a_w sobre la velocidad de crecimiento, encontrando la máxima velocidad a 25 °C y sin estrés osmótico, y luego esta decrece en el siguiente orden: 0,97 25 °C; 0,95 25 °C; control 15 °C y 0,97 15 °C. Sin embargo, los valores medios de velocidad de crecimiento para esta cepa, fueron menores a aquellos señalados como propios para esta especie, es decir que en condiciones óptimas de crecimiento fueron menores a 5-6 mm/día. Es interesante tener en cuenta que las mediciones utilizadas para obtener las velocidades de crecimiento de estas cepas solo se realizaron durante 5 días. Es notable, que a 15 °C y a 0,95 a_w no se observó crecimiento durante el período de incubación.

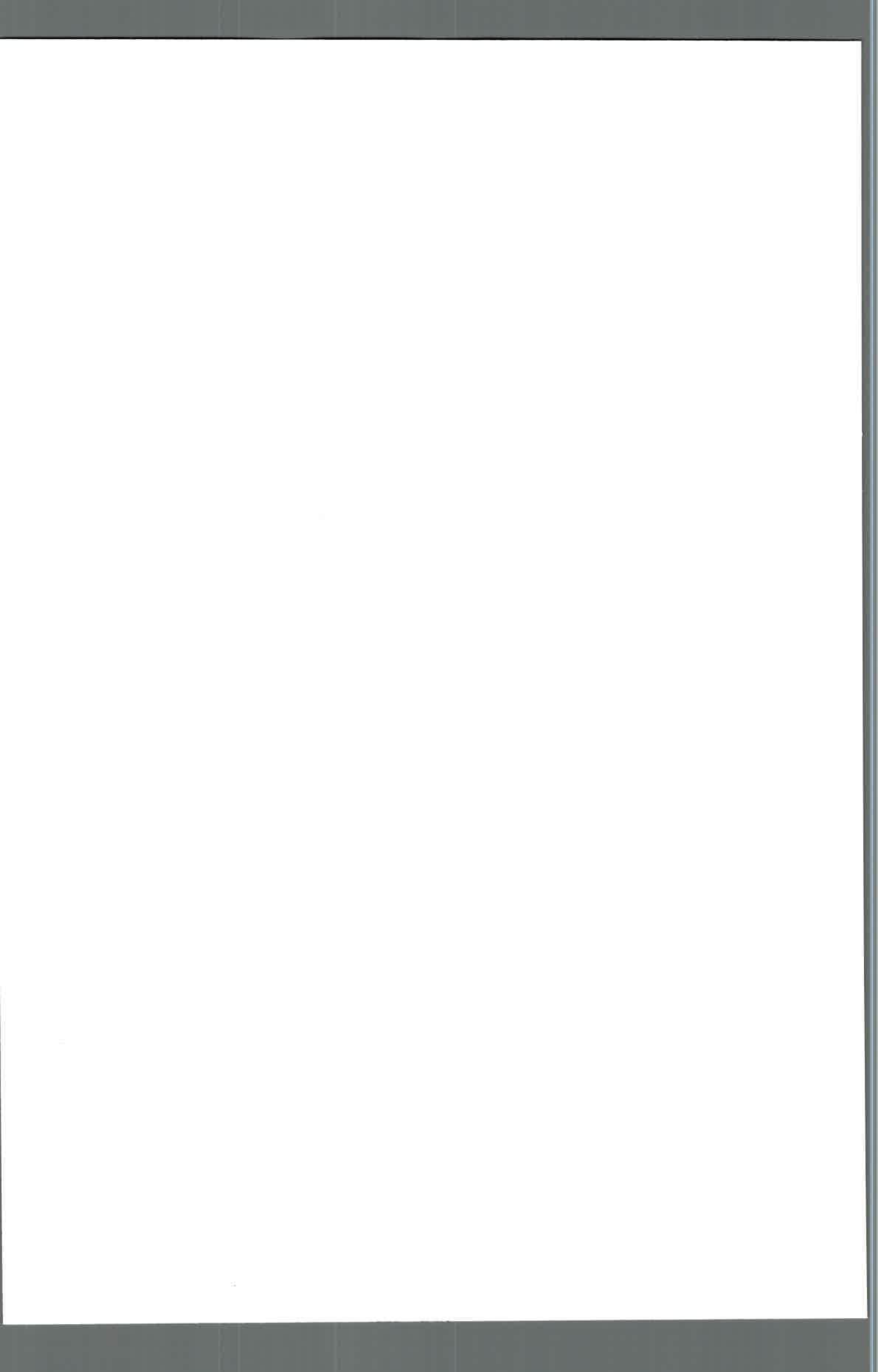


Tabla 6. Análisis de varianza (ANOVA) del factor días en la producción de fumonisinas (B₁, B₂ y B₃) y en la expresión relativa de los genes *FUM8* y *FUM19* de 3 cepas de *Fusarium proliferatum* (ITEM 15654, ITEM15661 e ITEM 15664) en un medio de cultivo agar trigo 2%

ITEM 15654

		FB ₁		FB ₂		FB ₃		<i>FUM8</i>		<i>FUM19</i>	
FV	gl	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Días	2	960	42,7*	12,3	57,3*	28,3	65,6*	45,1	296,6*	32,3	9,7

ITEM 15661

		FB ₁		FB ₂		<i>FUM8</i>		<i>FUM19</i>	
FV	gl	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Días	2	0,2	2,2	1	7046*	2,9	0,9	0,2	2,5

ITEM15664

		FB ₁		FB ₂		<i>FUM8</i>		<i>FUM19</i>	
FV	gl	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Días	2	4,0	9,6*	282	13,3*	8,3	26,4*	2,8	30*

FV, Fuente de variación; gl, Grados de libertad; CM, Cuadrados medios; F, Prueba F-Snedecor's; *Significativo $p < 0,05$.

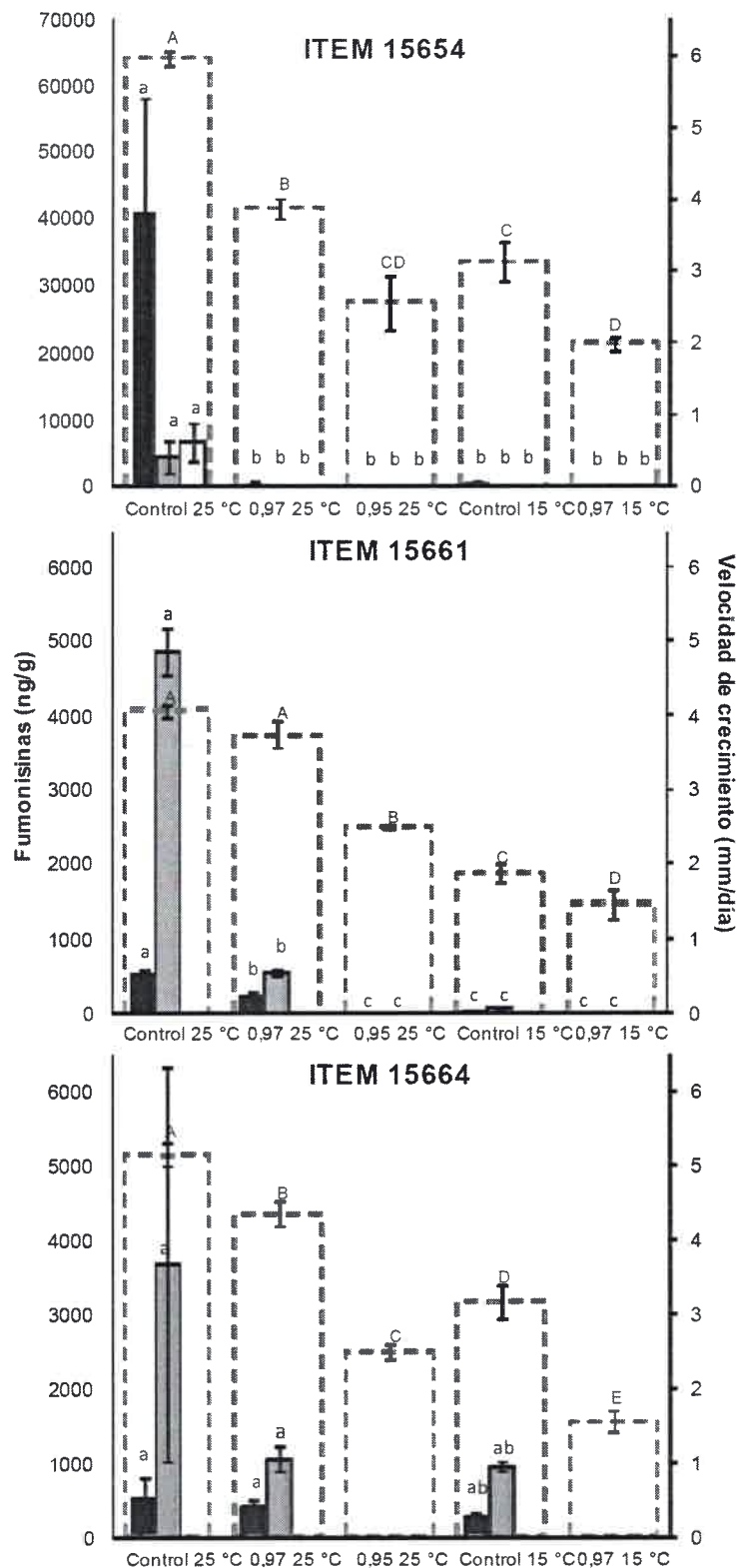


Figura 3. Efecto de la actividad acuosa (control ~1, 0,97 y 0,95) y temperatura (25 y 15 °C) sobre la velocidad de crecimiento (****) y la producción de fumonisinas (■ FB₁, ■ FB₂, □ FB₃) por 3 cepas de *Fusarium proliferatum* crecidas en un medio a base de trigo. Las barras de error representan el error estándar entre replicas independientes. Los valores medios de los datos triplicados con letras en común para cada tipo de fumonisinas (letras minúsculas) y para las velocidades de crecimiento

(letras mayúsculas) no son significativamente diferentes de acuerdo al test de Tukey HSD ($p \geq 0,05$).

Respecto a la producción de fumonisinas, los perfiles encontrados de producción de fumonisinas de cada una de las cepas fueron similares a los que se describieron en el capítulo III: ITEM 15654 tuvo la capacidad de producir FB₁, FB₂ y FB₃, y produjo FB₁ en mayor cantidad que las otras; mientras que ITEM 15661 y 15664, solo produjeron FB₁ y FB₂, y mayores niveles de FB₂ que de FB₁, estas últimas cepas mostraron niveles de FB₂ en el mismo rango que la cepa ITEM 15654 pero produjeron muy pequeñas cantidades de FB₁. Para todas las cepas, las máximas cantidades de fumonisinas se obtuvieron en la condición control ($a_w \sim 1$) a 25 °C. La cepa ITEM 15654 fue la mayor productora de fumonisinas a 25 °C, lo cual ya había sido observado en los ensayos previos descritos en el capítulo III. Por otro lado, la cepa ITEM 15664 que había sido la mayor productora de fumonisinas a 15 °C en los ensayos descritos en el capítulo III, en este ensayo puede observarse que a esa temperatura también produce niveles considerables de toxina en comparación con las otras cepas ensayadas. Nuestros datos también indican que la producción de FB₁ y FB₂ por esta cepa fue menos afectada por el estrés osmótico. La cepa ITEM 15654 solo produjo niveles de FB₁, FB₂ y FB₃ significativamente mayores en la condición control a 25 °C. Para las diferentes temperaturas de incubación y para cada cepa la disminución de la a_w de 1 a 0,97 tuvo un impacto significativo en las cantidades de toxina producida.

En la tabla 7 puede observarse que para la cepa ITEM15654 los factores que influyeron en la producción de FB₁ y FB₃ fueron a_w , T, y $a_w \times T$, mientras que para la producción de FB₂ fueron T y $a_w \times T$. En todos los casos la temperatura fue el factor más significativo. En cuanto a la velocidad de crecimiento para esta cepa tanto a_w , como T y sus interacciones fueron significativas, pero el factor más significativo fue la temperatura. Para la cepa ITEM 15661 los factores que influyeron significativamente en la producción de FB₁ fueron T, a_w y su interacción, para la producción de FB₂ fueron T y la interacción T x a_w , siendo en ambos casos más significativo el efecto de la temperatura. En cuanto a la velocidad de crecimiento para la misma cepa influyeron significativamente la temperatura y la a_w , pero no su interacción, siendo más importante el efecto de la temperatura. Por último, para la cepa ITEM 15664, en la producción de FB₁ y FB₂ influyeron solo T y a_w , siendo el mayor efecto de la T, y en cuanto a la velocidad de crecimiento los dos factores analizados y su interacción influyeron de manera significativa, pero la temperatura en mayor medida. En conjunto, estos resultados demostraron que el estrés abiótico (a_w y temperatura) y su combinación influenciaron significativamente la producción de fumonisinas y la velocidad de crecimiento de las 3 cepas de *F. proliferatum* cultivadas en

un medio a base de trigo durante 5 días, siendo la temperatura el factor con mayor impacto (Tabla 7).

Este estudio compara por primera vez el impacto de la a_w y la temperatura en el crecimiento, la producción de fumonisinas y la expresión de los genes *FUM8* y *FUM19* en un medio de cultivo a base de trigo, por tres cepas de *F. proliferatum* aisladas de granos de trigo en Argentina. Como se esperaba, ambas variables afectaron el crecimiento, y los patrones observados fueron similares entre las cepas. Considerando las condiciones ensayadas, las máximas velocidades de crecimiento se observaron a 25 °C en ausencia de estrés osmótico para las tres cepas. Estos resultados se asemejan a los descritos en el capítulo III, en donde fueron discutidos. En relación a la producción de fumonisinas, en las 3 cepas ensayadas en este estudio los máximos niveles de fumonisinas fueron producidos a 25 °C en la condición control en ausencia de estrés osmótico (máxima a_w). En el capítulo III se presentaron los resultados obtenidos con las mismas cepas de *F. proliferatum* pero después de 28 días de incubación también crecidas en un medio de cultivo a base de trigo. En este último el nivel máximo de FBt se observó a 25 °C y 0,99 de a_w para dos de las cepas (ITEM 15664 e ITEM 15661), y a 15 °C y 0,98 de a_w para la tercera (ITEM 15654). Al igual que en los resultados presentados en el capítulo III a todas las temperaturas ensayadas dos de las cepas produjeron casi exclusivamente FB₂ y muy bajas cantidades de FB₁, mientras que la otra cepa presentaba el perfil de producción habitual (FB₁ > FB₂ > FB₃). Estos resultados también fueron discutidos oportunamente en el capítulo III.

En cuanto a la expresión relativa de los genes *FUM8* y *FUM19* en las condiciones ensayadas en comparación con la condición control a 25 °C, en todos los casos vemos que ambos genes se comportaron de manera similar (Figura 4).

Para la cepa ITEM 15654 pudo observarse que a 25 °C a medida que la a_w disminuía respecto de la condición control (en donde la producción de fumonisinas fue máxima) la síntesis de fumonisinas también disminuyó, y en concordancia con estos resultados la expresión relativa de los genes *FUM8* y *FUM19* se vió significativamente reprimida. Estos últimos resultados se condicen con lo observado por otros autores que han establecido que la expresión relativa de estos genes se correlaciona con la síntesis de fumonisinas (López-Errasquín *et al.*, 2007). La misma cepa en condición control a 15 °C produjo cantidades de FB₁ significativamente menores que en la condición control a 25 °C, mientras esta cepa a 15 °C pero a una a_w de 0,97 ya no fue capaz de producir fumonisinas. Sin embargo, al analizar la expresión relativa de los genes *FUM8* y *FUM19* para la misma cepa a 15 °C, se pudo observar que en la condición de menor a_w , en donde no se detectaron fumonisinas, ambos genes se vieron significativamente

reprimidos. Luego si analizamos la expresión relativa de los genes a la misma temperatura, pero sin estrés osmótico (control 15 °C), vemos que, si bien se observó una leve represión de ambos genes, ésta no fue estadísticamente significativa. Esto último nos lleva a pensar que si los genes se están expresando de manera similar a la condición de control a 25 °C, entonces la fuerte disminución en la cantidad de fumonisinas encontrada entre una condición y otra puede deberse a una baja actividad metabólica de la cepa a causa de la baja temperatura, y que por lo tanto se podría pensar que 5 días de incubación fueron insuficientes para detectar producción de toxinas. En este punto podría ser interesante ensayar la expresión y la producción de toxina luego de más días de incubación para esta condición. La cepa ITEM 15661, produjo la máxima cantidad de fumonisinas en la condición control a 25 °C, a ésta temperatura a medida que la a_w del medio disminuyó, los niveles fumonisinas también disminuyeron, llegando a no ser detectables a 0,95 de a_w . En cuanto a la expresión relativa de los genes *FUM8* y *FUM19*, la represión de ambos fue significativa cuando no se detectaron fumonisinas, pero luego, a 0,97 de a_w , si bien la expresión relativa de ambos genes disminuyó, esta disminución solo fue significativa para *FUM19*. Esta cepa a 15 °C y a una a_w de 0,97 no produjo niveles detectables de fumonisinas, y los mismos fueron muy bajos a esta temperatura en la condición control sin estrés osmótico. En ambos casos en cuanto a la expresión relativa de ambos genes, vemos que si bien hubo represión respecto la condición control a 25 °C, esta no fue significativa en ninguna de las dos condiciones. Nuevamente al igual que para la cepa ITEM 15654, se podría pensar que el metabolismo de esta cepa se encuentra retardado y que por eso la detección de fumonisinas no reflejó el nivel de expresión de genes *FUM*.

Por último, la cepa ITEM 15664 produjo niveles máximos de FB_1 y FB_2 en la condición control a 25 °C, pero estos niveles no fueron significativamente diferentes a aquellos producidos en la condición control a 15 °C y a 0,97 de a_w y 25 °C. En cuanto a la expresión relativa de los genes *FUM8* y *FUM19* en la figura 13 puede verse que a 0,97 de a_w y 25 °C, y en la condición control a 15 °C la expresión de ambos genes aumentó en relación a la condición control a 25 °C, sin embargo, éste incremento en la expresión no fue estadísticamente significativo. En las condiciones restantes: 0,97 de a_w 15 °C y 0,95 de a_w 25 °C, la expresión de ambos genes se vio reprimida respecto de la condición control a 25 °C, aunque esta represión solo fue significativa en el caso del gen *FUM8* a 0,95 de a_w y 25 °C.

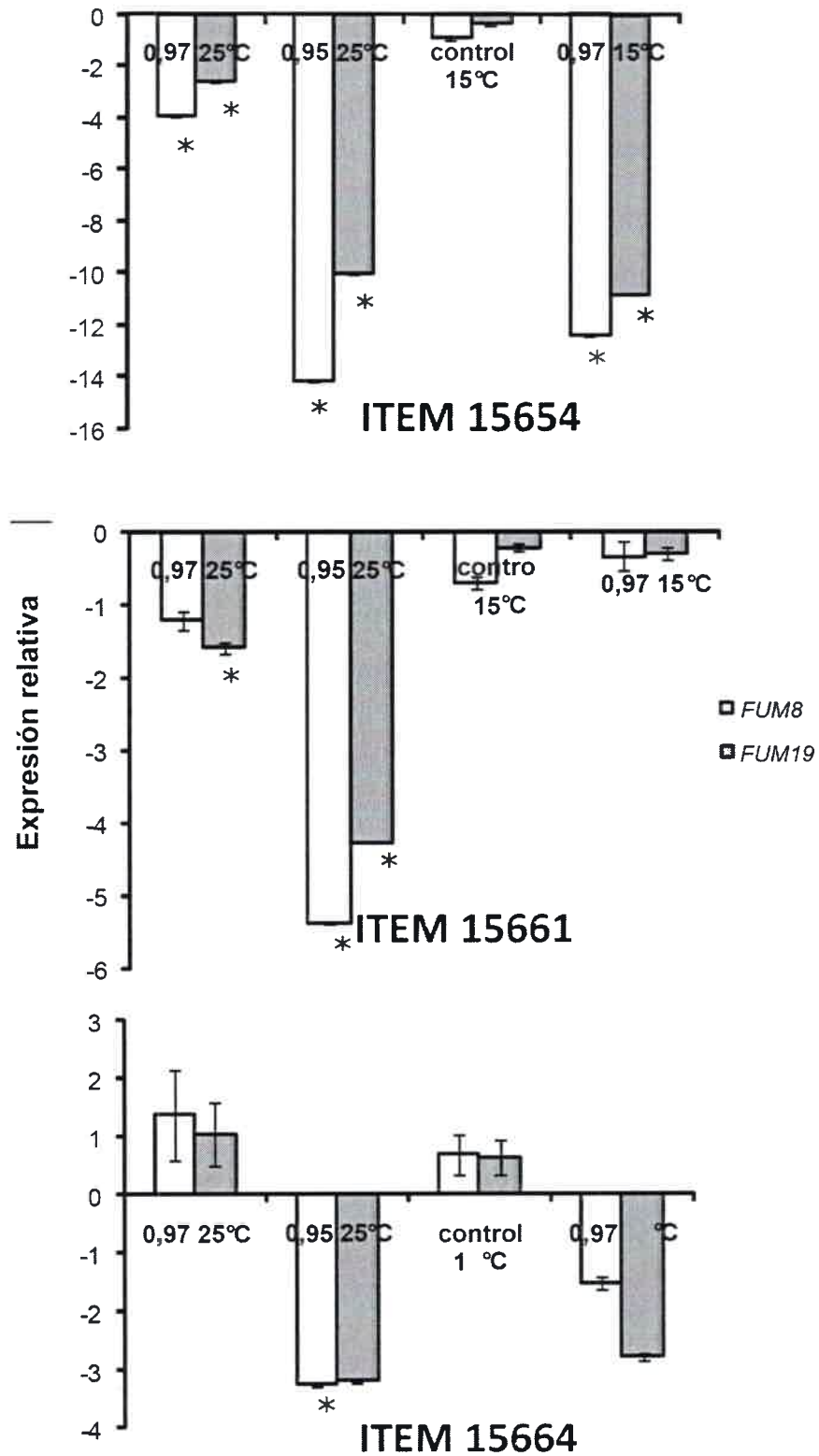


Figura 4: Expresión relativa de los genes *FUM8* y *FUM19* bajo las diferentes condiciones de cultivo (0,97 a_w 25 °C, 0,95 a_w 25 °C, control 15 °C, y 0,97 a_w 15 °C) en relación a la condición de cultivo control a 25 °C, para las cepas de *Fusarium proliferatum* ITEM 15654,

ITEM 15661, e ITEM 15664. Los valores fueron calculados utilizando el programa REST (Pfaffl, 2001; Pfaffl *et al.*, 2002). * Significativo ($p < 0,001$).

En conjunto, estos resultados, muestran que las respuestas a las modificaciones de a_w o temperatura varían de acuerdo a la cepa de *F. proliferatum* considerada. De todas maneras, cuando la temperatura disminuye de 25 a 15 °C se observa una disminución significativa en la producción de fumonisinas, mientras que sorpresivamente, la disminución de la temperatura no afectó significativamente la expresión de los genes *FUM*, aunque se observen tendencias de disminución en la expresión no significativas, en particular para la cepa *F. proliferatum* ITEM 15654 (principal productora de FB₁).

Tabla 7. Análisis de la varianza del efecto de la temperatura (T) y la actividad de agua (a_w) sobre la producción de fumonisinas (B₁, B₂ y B₃) y la velocidad de crecimiento de cepas *Fusarium proliferatum* (ITEM 15654, ITEM 15661 e ITEM 15664) en un medio de cultivo agar trigo 2%

ITEM 15654

FV	FB ₁			FB ₂		FB ₃		Veloc. Crec.	
	g	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
a_w	2	77 x 10 ⁷	13,1*	9 x 10 ⁶	7,2	20 x 10 ⁶	12,6*	5,51	109,1*
T	1	12 x 10 ⁸	21,2*	15 x 10 ⁶	12,0*	34 x 10 ⁶	20,8*	16,6	329,5*
$a_w \times T$	1	12 x 10 ⁸	20,2*	14 x 10 ⁶	11,6*	33 x 10 ⁶	20,4*	0,7	13,6*

ITEM 15661

FV	gl	FB ₁		FB ₂		Veloc. Crec	
		CM	F	CM	F	CM	F
a_w	2	8 x 10 ⁴	55,1*	9,4 x 10 ⁶	495*	0,3	16,4*
T	1	4 x 10 ⁵	259,4*	2,1 x 10 ⁷	1125*	15	815*
$a_w \times T$	1	5 x 10 ⁴	34,2*	1,3 x 10 ⁷	710,1*	5E-3	0,3

ITEM 15664

FV	gl	FB ₁		FB ₂		Veloc. Crec	
		CM	F	CM	F	CM	F
a_w	2	2 x 10 ⁵	9,37*	7 x 10 ⁶	5,07*	3,58	155,64*
T	1	3 x 10 ⁵	18,38*	1 x 10 ⁷	7,6*	17,2	746,11*
$a_w \times T$	1	2 x 10 ⁴	1,22	2 x 10 ⁶	1,47	0,48	21,05*

FV, Fuente de variación; gl, Grados de libertad; CM, Cuadrados medios; F, Prueba F-Snedecor's, *Significativo $p < 0,05$

En un trabajo realizado por Medina *et al.* (2013) estos autores resaltaron el profundo efecto que tenían la temperatura y la a_w sobre el crecimiento, la producción de FB₁ y FB₂, y la expresión de 9 genes de la vía biosintética del *cluster FUM* usando una cepa de *F. verticillioides* como modelo. Estos autores encontraron correlación entre la expresión de los genes *FUM1*, *FUM11*, *FUM13*, *FUM14* y *FUM19* y la producción de FB₁ y FB₂. Además, asociaron una alta expresión del gen *FUM19* con un incremento en la producción de ambos tipos de fumonisinas. De manera similar, López-Errasquín *et al.* (2007) sugirieron una relación lineal entre los transcritos de *FUM1* y *FUM19* y la producción de fumonisinas para una cepa de *F. verticillioides* incubada a 20 °C durante 14 días. Los resultados obtenidos durante la presente tesis soportan estas conclusiones presentadas en ambos estudios: cuando no hubo niveles detectables de fumonisinas, la expresión del gen *FUM19* fue reprimida. Con respecto a la expresión del gen *FUM8*, nuestros resultados coinciden con los descritos por Kohut *et al.* (2009) quienes observaron una correlación positiva entre la expresión del gen *FUM8* y la producción de fumonisinas en *F. proliferatum*. Considerando que los genes *FUM* se regulan a nivel transcripcional, el hallazgo más sorprendente de los resultados presentados durante el presente estudio fue que si bien no se detectaron fumonisinas luego de 5 días de incubación a 15 °C en ausencia de estrés osmótico, no se observó inhibición en la expresión de los genes *FUM8* y *FUM19* en comparación con la condición control a 25 °C ($a_w \sim 1$). Una posible explicación para estos resultados podría ser que el proceso bioquímico para la síntesis de fumonisinas sea más lento a esa temperatura, llevando a una demora en la acumulación de toxinas en el medio de cultivo a base de trigo, y como consecuencia no es posible detectar niveles de toxina luego de 5 días de incubación. De hecho, como se describió en el capítulo III, hemos encontrado, utilizando las mismas cepas, niveles significativos de producción de fumonisinas en el medio de cultivo a base de trigo luego de 28 días de incubación a 15 °C, lo cual refuerza la idea de que *F. proliferatum* es capaz de producir mayores cantidades de FB₁ a bajas temperaturas en comparación con *F. verticillioides*. Todo esto, refuerza la hipótesis propuesta por Ryu *et al.* (1999) de que *F. proliferatum* podría adaptarse mejor a las bajas temperaturas. En relación a esto, Marín *et al.* (2010) estudiaron los efectos de la temperatura y el potencial acuoso sobre el crecimiento y el control transcripcional del gen *FUM1* en *F. verticillioides* y *F. proliferatum*. Estos autores concluyeron que la contribución relativa de estas dos especies a la producción de fumonisinas en maíz podrían diferir durante la colonización, dependiendo de las condiciones medioambientales: la contaminación de maíz con fumonisinas podría estar atribuida principalmente a *F. proliferatum*, durante los estadios tempranos del desarrollo del grano, cuando la temperatura todavía sigue siendo

templada, mientras la contribución de *F. verticillioides* podría incrementarse durante los estadios tardíos, cuando el estrés por agua aumenta progresivamente.

Se encuentran disponibles numerosos trabajos científicos en los que se estudia principalmente los cambios en el nivel de expresión de genes *FUM* debido a la influencia de factores abióticos en *F. verticillioides* (López-Errasquín *et al.*, 2007; Jurado *et al.*, 2008; Medina *et al.*, 2013), aunque en menor medida, también hay trabajos sobre *F. proliferatum* (Marín *et al.*, 2010; Marín *et al.*, 2013). Sin embargo, no existen trabajos en los que se analicen los cambios del nivel de expresión de los genes *FUM* utilizando un medio de cultivo a base de trigo como lo realizado durante el presente estudio. Existe un solo trabajo comparable realizado por González-Jaen *et al.* (comunicación personal) en el que se aborda el efecto del sustrato (medios en base a extractos de cebada, maíz y trigo) considerando también el potencial hídrico y la temperatura, sobre el crecimiento de *F. verticillioides* y *F. proliferatum* y la expresión del gen *FUM1*. Estos autores observaron que el patrón de crecimiento fue similar para ambas especies (mejor en cebada, luego maíz y finalmente trigo), pero el patrón de expresión de *FUM1* mostró diferencias de acuerdo al sustrato y claras diferencias entre ambas especies. Con *F. verticillioides* los mejores resultados se observaron en maíz, trigo y cebada (en ese orden), mientras que con *F. proliferatum* solo se observó inducción de la expresión del gen *FUM1* en trigo y cebada a 25 °C y -2,8 MPa (0,98 a_w). Concluyendo así, que para la estimación del riesgo de contaminación con fumonisinas debe considerarse no sólo el crecimiento fúngico; ya que incluso para la misma toxina y especies próximas, la biosíntesis de ésta puede diferir notablemente. Hay que tener en cuenta que estos no son los únicos factores que pueden afectar la producción de fumonisinas. Kohut *et al.* (2009) estableció que la expresión de *FUM1* y *FUM8*, junto con la producción de fumonisinas se inducían por falta de nitrógeno en *F. proliferatum*, por lo tanto, existen muchos otros factores que también podrían estar influyendo en la producción de fumonisinas por esta especie. Sin embargo, los datos proporcionados durante el presente estudio pueden contribuir al conocimiento de manera de poder predecir y prevenir la contaminación de los granos de trigo con fumonisinas. El hecho de incluir la expresión de genes en este tipo de análisis podría ayudar en el desarrollo de estrategias puntuales para la prevención de la contaminación con fumonisinas (Medina *et al.*, 2013).

Descifrar el efecto de las bajas temperaturas en la producción de fumonisinas por *F. proliferatum* es esencial cuando se analiza la contaminación natural de trigo con estas micotoxinas, el cual es un cultivo de invierno que requiere para su desarrollo una temperatura óptima que varía desde los 10 y 24 °C. Considerando que las condiciones a campo son propicias para el desarrollo de *F. proliferatum* y la producción de toxinas en

granos de trigo, y que de hecho, se ha reportado contaminación de grano de trigo y de productos a base de trigo con fumonisinas en muchos países incluido Argentina (Castoria *et al.*, 2005; Roscoe *et al.*, 2008; Kushiro *et al.*, 2009; Chehri *et al.*, 2010; Palacios *et al.*, 2011; Busman *et al.*, 2012; Jakšić *et al.*, 2012; Serrano *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Cendoya *et al.*, 2014a; Amato *et al.*, 2015; Mendes *et al.*, 2015), estudiar cómo este hongo puede crecer y contaminar este cereal, como así también conocer de que manera la expresión de los genes de la vía biosintética de las fumonisinas contribuyen en este proceso es de gran importancia.

IV. Conclusiones

- La temperatura fue el factor que más influyó en la producción de fumonisinas y en la velocidad de crecimiento, para las 3 cepas de *F. proliferatum* ensayadas.
- La máxima velocidad de crecimiento se observó en la condición control a 25 °C, con disminución de la misma cuando la disponibilidad de agua del medio o la temperatura de incubación fueron reducidas.
- La producción máxima de fumonisinas para todas las cepas ensayadas se observó en la condición control a 25 °C.
- La cepa con mayor producción de fumonisinas en los 5 días de incubación fue la cepa ITEM 15654, que produjo principalmente FB₁. Las otras dos cepas produjeron principalmente FB₂.
- En todas las condiciones ensayadas para todas las cepas, la expresión relativa de los genes *FUM8* y *FUM19* tuvo un comportamiento similar.
- La expresión de genes *FUM* a 25 °C se correlacionó con la cantidad de fumonisinas, a cualquier a_w.
- La producción de FBs fue menor a 15 °C, pero los genes *FUM* se expresaron tanto como a 25 °C.

CAPÍTULO V.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

V. 1. CONCLUSIONES FINALES

- La incidencia natural de fumonisinas en granos de trigo común y subproductos constituyen el primer reporte a nivel nacional.
- Tanto muestras de granos de trigo común y trigo duro, como muestras de subproductos son susceptibles a la contaminación con fumonisinas. Se encontró, que aunque en bajos niveles, la incidencia fue alta en los 3 sustratos analizados.
- Los ensayos ecofisiológicos realizados proporcionan información útil para la prevención del desarrollo de este hongo y la consecuente producción de fumonisinas en este sustrato.
- Los estudios ecofisiológicos reflejan que tanto en medio de cultivo como en granos irradiados, los niveles óptimos de a_w y temperatura para el crecimiento y la producción de fumonisinas de cepas de *F. proliferatum*, coinciden aquellas condiciones presentes durante el desarrollo del grano de trigo a campo (estado lechoso y pastoso).
- El hallazgo más significativo del ensayo de expresión génica, es que en ausencia de estrés osmótico a 15 °C si bien no hubo producción de fumonisinas, no se observó inhibición en la expresión de los genes evaluados en comparación con la situación control a 25 °C.

V. 2. PERSPECTIVAS FUTURAS

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis se propone:

- Extender el estudio de incidencia natural de las fumonisinas en un amplio rango de productos a base de trigo destinados al consumo humano en Argentina, en donde se incluyan pastas secas, pastas frescas, pan y productos de panadería, entre otros, listos para el consumo humano.
- Planificar un estudio para el análisis de la ingesta de fumonisinas a través de la ingesta de trigo y subproductos.
- Evaluar la presencia de fumonisinas adheridas a la matriz (fumonisinas enmascaradas en trigo), a los fines de conocer la exposición real de la población a esas micotoxinas.
- Analizar la co-ocurrencia de fumonisinas y otras micotoxinas como deoxinivalenol, zearalenola, nivalenol, y beauvericina en trigo y subproductos debido al posible efecto sinérgico entre micotoxinas.

- Evaluar si el uso de los fungicidas que se utilizan para el manejo del cultivo del trigo tienen algún efecto en el crecimiento y la producción de fumonisinas de cepas de *F. proliferatum* aisladas de trigo.

CAPÍTULO VI.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castellá, G., Accensi, F., Cabañes, F.J. (2000). Hongos productores de micotoxinas Emergentes. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17, S63-S68.
- Abbas, H.K., Williams, W.P., Windham, G.L., Pringle, H.C., Xie, W.P., Shier, W.T. (2002). Aflatoxin and fumonisin contamination of commercial corn (*Zea mays*) hybrids in Mississippi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5246-5254.
- Abdalla, M.Y., Al-Rokibah, A., Moretti, A., Mulè, G. (2000). Pathogenicity of toxigenic *Fusarium proliferatum* from date palm in Saudi Arabia. *Plant Disease*, 84, 321-324.
- Aldred, D., Magan, N. (2004). Prevention strategies for trichothecenes. *Toxicology Letters*, 153, 165-171.
- Aliakbari, F., Mirabolfathy, M., Emami, M., Mazhar, S.F., Karami-Osboo, R.K. (2007). Natural occurrence of *Fusarium* species in maize kernels at Gholestan province in northern Iran. *Asian Journal of Plant Science*, 8, 1276-1281.
- Alimentos Argentinos, (2016): <http://www.alimentosargentinos.gov.ar>. Acceso diciembre de 2016.
- Alkadri, D., Rubert, J., Prodi, A., Pisi, A., Manes, J., Soler, C. (2014). Natural co-occurrence of mycotoxins in wheat grains from Italy and Syria. *Food Chemistry*, 157, 111-118.
- Amato, B., Pfohl, K., Tonti, S., Nipoti, P., Dastjerdi, R., Pisi, A. (2015). *Fusarium proliferatum* and fumonisin B₁ co-occur with *Fusarium* species causing *Fusarium* Head Blight in durum wheat in Italy. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 88, 228-233.
- ANVISA, (2011). file:///C:/Users/pc/Downloads/U_RS-MS-ANVISA-RDC-7-REP_180211.pdf
- AOAC. (1995). Sections 975.35, 976.22 in Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD.
- Aoki, T., O'Donnell, K., Geiser, D.M. (2014). Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *Journal of General Plant Pathology*, 80, 189-201.
- Armengol, J., Moretti, A., Perrone, G., Vicent, A., Bengoechea, J.A., García-Jiménez, J. (2005). Identification, incidence and characterization of *Fusarium proliferatum* on ornamental palms from Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 112, 123-131.
- Arrese, J.E., Piérard-Franchimont, C., Piérard, G.E. (1996). Fatal hyalohyphomycosis following *Fusarium* onychomycosis in an immunocompromised patient. *The American Journal of Dermatopathology*, 18, 196-198.
- Bacon, C.W., Yates, I.E., Hinton, D.M., Meredith, F. (2001). Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. *Environmental Health Perspectives*, 109, 325-332.
- Bakker, M.I., Speijers, G.J.A., Paulsch, W.E. (2003). Risk assessment of fumonisin B₁ in the Netherlands. Laboratory for Food and Residue Analysis, National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), P.O. Box 1, 3720 BA Bilthoven, the Netherlands RIVM report 310301001/2003.
- Bartók, T., Szécsi, A., Szekeres, A., Mesterházy, A., Bartók, M. (2006). Detection of new fumonisin mycotoxins and fumonisin-like compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20, 2447-2462.
- Bartók, T., Tölgyesi, L., Szekeres, A., Varga, M., Bartha, R., Szécsi, A., Bartók, M., Mesterházy, A. (2010). Detection and characterization of twenty-eight isomers of fumonisin B₁ (FB₁) mycotoxin in a solid rice culture infected with *Fusarium verticillioides* by reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight and ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24, 35-42.
- Berthiller, F., Crews, C., Dall'asta, C., Saeger, S.D., Haesaert, G., Karlovsky, P., Oswald, I.P., Seefelder, W., Speijers, G., Stroka, J. (2013). Masked mycotoxins: A review. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57, 165-86.

- Berthiller, F., Dall'Asta, C., Schuhmacher, R., Lemmens, M., Adam, G., Krska, R. (2005). Masked mycotoxins: determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3421-3425.
- Bezuidenhout, S.C., Gelderblom, W.C.A., Gorst-Allman, C.P., Horak, R.M., Marasas, W.F.O., Spiteller, G., Vleggaar, R. (1988). Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communication*, 11, 743-745.
- Bluhm, B.H., Woloshuk, C.P. (2005). Amylopectin induces fumonisin B₁ production by *Fusarium verticillioides* during colonization of maize kernels. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*. 18, 1333-1339.
- Bojja, R.S., Cerny, R.L., Proctor, R.H., Du, L. (2004). Determining the biosynthetic sequence in the early steps of the fumonisin pathway by use of three gene disruption of *F. verticillioides*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2855-2860.
- Boonzaaijer, G., van Osenbruggen, W.A., Kleinnijenhuis, A.J., van Dongen, W.D. (2008). An exploratory investigation of several mycotoxins and their natural occurrence in flavour ingredients and spices, using a multi-mycotoxin LC-MS/MS method. *World Mycotoxin Journal*, 1, 167-174.
- Boutati, E.I., Anaissie, E.J. (1997). *Fusarium*, a significant emerging pathogen in patients with haematological malignancies: ten years experience at a cancer centre and implications for management. *Blood*, 90, 999-1008.
- Britz, H., Coutinho, T.A., Wingfield, M.J., Marasas, W.F.O., Gordon, T.R., Leslie, J.F. (1999). *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* represents a distinct mating population in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1198-1201.
- Brown, D.W., Butchko, R.A.E., Proctor, R.H. (2006). *Fusarium* genomic resources: Tools to limit crop diseases and mycotoxin contamination. *Mycopathologia*, 162, 191-199.
- Brul, S., Schuren, F., Montijn, R., Keijsers, B.J.F., Van der Spek, H., Oomes, S.J.C.M. (2006). The impact of functional genomics on microbiological food quality and safety. *International Journal of Food Microbiology*, 112, 195-199.
- Bryden, W.L. (2007). Mycotoxins in the food chain: human health implications. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 1, 95-101.
- Burgess, L.W., Bryden, W.L. (2012). *Fusarium*: a ubiquitous fungus of global significance. *Mycobiology Australia*, 33, 22-25.
- Busman, M., Desjardins, A.E., Proctor, R.H. (2012). Analysis of fumonisin contamination and the presence of *Fusarium* in wheat with kernel black point disease in the United States. *Food Additives and Contaminants Part A*, 29, 1092-1100.
- CAST, (2003). Council for Agricultural Science and Technology Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems, Task Force Report N°139, Ames, Iowa, USA.
- Castegnaro, M., Garren, L., Galendo, D., Gelderblom, W.C.A., Chelule, P., Dutton, M.F., Wild, C.P. (1998). Analytical method for the determination of sphinganine and sphingosine in serum as a potential biomarker for fumonisin exposure. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 720, 15-24.
- Castellá, G., Bragulat, M.R., Cabanes, F.J. (1999). Surveillance of fumonisins in maize-based feeds and cereals from Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4707-4710.
- Castoria, R., Lima, G., Ferracane, R., Ritieni, A. (2005). Occurrence of mycotoxin in farro samples from southern Italy. *Journal of Food Protection*, 68, 416-420.
- Cendoya, E., Farnochi, M.C., Chulze, S.N., Ramirez, M.L. (2014a). Two-dimensional environmental profiles of growth and fumonisin production by *Fusarium proliferatum* on a wheat-based substrate. *International Journal of Food Microbiology*, 182-183, 9-17.
- Cendoya, E., Monge, M.P., Palacios, S., Chiacchiera, S., Torres, A., Farnochi, M.C., Ramirez, M.L. (2014b). Fumonisin occurrence in naturally contaminated wheat grain harvested in Argentina. *Food Control*, 37, 56-61.

- Charmley, L.L., Rosenber, A., Trenholm, H.L. (1994). Factors responsible for economic losses due to *Fusarium* mycotoxin contamination of grains, foods and feedstuffs. En: Miller, J.D., Trenholm, H.L. (Eds.), *Mycotoxins in Grain Compounds Other Than Aflatoxin*. Eagan Press, St Paul, MN, pp. 471-486.
- Chehri, K., Jahromi, S.T., Reddy, K., Abbasi, S., Salleh, B. (2010). Occurrence of *Fusarium spp.* and fumonisins in stored wheat grains marketed in Iran. *Toxins*, 2, 2816-2823.
- Chen, J., Mirocha, C.J., Xie, I.W., Hogge, L., Olson, D. (1992). Production of the Mycotoxin Fumonisin B₁ by *Alternaria alternata f. sp. Lycopersici*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 3928-3931.
- Chiotta, M.L., Susca, A., Stea, G., Mulè, G., Perrone, G., Logrieco, A., (2011). Phylogenetic characterization and ochratoxin A-Fumonisin profile of black *Aspergillus* isolated from grapes in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 149, 171-176.
- Chulze, S.N., Ramirez, M.L., Farnochi, M.C., Pascale, M., Visconti, A., March, G. (1996). *Fusarium* and fumonisins occurrence in Argentina corn at different ear maturity stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2797-2801.
- Cirillo, T., Ritieni, A., Galvano, F., Amodio Cocchieri, R. (2003a). Natural co-occurrence of deoxynivalenol and fumonisins B₁ and B₂ in Italian marketed foodstuff. *Food Additive and Contaminants*, 20, 566-571.
- Cirillo, T., Ritieni, A., Visone, M., Amodio Cocchieri, R. (2003b). Evaluation of conventional and organic Italian foodstuffs for deoxynivalenol and fumonisins B₁ and B₂. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 8128-8131.
- Cirlini, M., Hahn, I., Varga, E., Dall'Asta, M., Falavigna, C., Calani, L. (2015). Hydrolysed fumonisin B₁ and N-(deoxy-D-fructos-1-yl)-fumonisin B₁: stability and catabolic fate under simulated human gastrointestinal conditions. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 66, 98-103.
- CODEX, (2003). Código de prácticas para prevenir y reducir la contaminación de los cereales por micotoxinas CAC/RCP 51-2003 - Adoptado en 2003.- Enmiendas 2014.
- Conner, R.L., Hwang, S.F., Stevens, R.R. (1996). *Fusarium proliferatum*: a new causal agent of black point in wheat. *Canadian Journal Plant Pathology*, 18, 419-423.
- Cuero, R.G., Smith, J.E., Lacey, J. (1987). Stimulation by *Hyphopichia burtonii* and *Bacillus amyloliquefaciens* of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in irradiated maize and rice grains. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 1142-1146.
- D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C., Postel, D., Dijkema, W.T.P., Dujardin, A., Placinta, C. M. (1998). Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 104, 741-751.
- Dall'Asta, C., Battilani, P. (2016). Fumonisin and their modified forms, a matter of concern in future scenario? *World Mycotoxin Journal*, 9, 727-739.
- Dallyn, H., Fox, A. (1980). Spoilage of material of reduced water activity by xerophilic fungi. En: Corry, J.E., Gould, G. H. (Eds.), *Microbial Growth and Survival in Extreme Environments*. Academic Press, London / New York, pp. 129-139.
- De la Torre-Hernández, M.E., Sánchez-Rangel, D., Galeana-Sánchez, E., Plasencia-de la Parra, J. (2014). Fumonisin en la interacción *Fusarium*-maíz. D.R. © TIP *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 17, 77-91.
- Delongchamp, R.R., Young, J.F. (2001). Tissue sphinganine as a biomarker of fumonisin-induced apoptosis. *Food Additive and Contaminants*, 18, 255-61.
- Demirel, G., Alpertunga, B., Ozden, S. (2015). Role of fumonisin B₁ on DNA methylation changes in rat kidney and liver cells. *Pharmaceutical Biology*, 53, 1302-1310.

- Desai, K., Sullards, M.C., Allegood, J., Wang, E., Schmelz, E.M., Hartl, M., Humpf, H.U., Liotta, D.C., Peng, Q., Merrill, A.H.Jr. (2002). Fumonisin and fumonisin analogs as inhibitors of ceramide synthase and inducers of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1585,188-192.
- Desjardins, A. (2006). *Fusarium* Mycotoxins: Chemistry, Genetics and Biology. APS Press, St. Paul, MN, pp. 79-108.
- Desjardins, A., Manandhar, G., Plattner, R., Maragos, C., Shrestha, K., McCormick, S. (2000). Occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in Nepalese maize and wheat and the effect of traditional processing methods on mycotoxin levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1377-1383.
- Desjardins, A.E. (2003). *Gibberella* from A (venaceae) to Z (eae). *Annual Review of Phytopathology*, 41, 177-198.
- Desjardins, A.E., Proctor, R.H. (2007). Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 47-50.
- Di Mavungu, J., Monbaliu, S., Scippo, M.L., Maghuin-Rogister, G., Schneider, Y.J., Larondelle, Y., Callebaut, A., Robbens, J., Van Peteghem, C., De Saeger, S. (2009). LC-MS/MS multi-analyte method for mycotoxin determination in food supplements. *Food Additives and Contaminants Part A*, 26, 885-95.
- Díaz de Castro, F.J., Restrepo, M.A., Rojas, W. (2007). Microbiología de las infecciones humanas. Primera Edición. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín. Colombia.
- Dignani, M.C., Anaissie, E. (2004). Human fusariosis. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 67-75.
- Doko, M.B., Rapior, S., Visconti, A., Schjoth, J.E. (1995). Incidence and levels of fumonisin contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 429-434.
- Doohan, F.M., Brennan, J., Cooke, B.M. (2003). Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 755-768.
- Dunkel, F.V. (1988). The relationship of insects to the deterioration of stored grain by fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 7, 227-244.
- Dursun, D., Fernandez, V., Miller, D. (2003). Advanced *Fusarium* keratitis progressing to endophthalmitis. *Cornea*, 22, 300-303.
- Edelstein, S.L., Akduman, L., Durham, B.H., Fothergill, A.W., Hsu, H.Y. (2012). Resistant *Fusarium* keratitis progressing to endophthalmitis. *Ophthalmol Contact Lens*, 38, 331-335.
- Ediage, E.N., Van Poucke, C., De Saeger, S. (2015) A multi-analyte LC-MS/MS method for the analysis of 23 mycotoxins in different sorghum varieties: The forgotten sample matrix. *Food Chemistry*, 177, 397-404.
- Elmer, W.H. (1995). A single mating population of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium proliferatum*) predominates in asparagus fields in Connecticut, Massachusetts, and Michigan. *Mycologia*, 87, 68-71.
- FAIM, (2017). Federación Argentina de la Industria Molinera. <http://www.faim.org.ar/Exportacion.aspx>
- Fanelli, F., Iversen, A., Logrieco, A.F., Mulè, G. (2013). Relationship between fumonisin production and *FUM* gene expression in *Fusarium verticillioides* under different environmental conditions. *Food Additives and Contaminants Part A*, 30,365-371.
- FAO, (2003). Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003. <http://www.fao.org/3/a-y5499s.pdf>.
- FAO, (2004). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food and Feeds in 2003. Food and Nutrition Paper 81. FAO Organization of the United Nations, Roma.
- FAO, (2016). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Crop prospects and food situation. N°. 3. September 2016. Acceso: <http://www.fao.org/3/a-i6100e.pdf>
- FAO, (2017). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Acceso marzo 2017: <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/es/>
- FAO/OMS, (2016). Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias comisión del CODEX ALIMENTARIUS 39° período de sesiones Roma, Italia, 27 de junio - 1 de julio de 2016.

- http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-735-10%252FReport%252FREP16_CFs.pdf.
- FDA, (2017). <https://www.fda.gov/food/guidanceregulation/guidancedocumentsregulatoryinformation/ucm109231.htm>
- Flaherty, J.E., Pirttilä, A.M., Bluhm, B.H., Woloshuck, C.P. (2003). *PAC1*, a pH- regulatory gene from *Fusarium verticillioides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 5222-5227.
- Food Balance Sheet. (2007). <http://www.faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx? PageID=346&SelTab=4>>. Acceso 4 Abril 2013.
- Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Samson, R.A., Larsen, T.O., Thrane, U. (2007). Fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9727-32.
- Gamanya, R., Sibanda, L. (2001). Survey of *Fusarium moniliforme* (*F. verticillioides*) and production of fumonisin B₁ in cereal grains and oilseeds in Zimbabwe. *International Journal of Food Microbiology*, 30, 145-149.
- García, M.O., Espeleta, J. (2004). Comercio de trigo pan: Características de la oferta y demanda mundial (con especial referencia a la situación argentina). Programa Nacional de calidad de trigo. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Subsecretaría de Política Agropecuaria y Alimentos. Dirección Nacional de Mercados. Ministerio de Agroindustria de la Nación. Recuperado el día 29 de abril de 2016 de: http://www.minagri.gob.ar/dimeagro/calidad_trigo/publicaciones/IDENTIFICACION_DE_LA_DEMANDA_EXTERNA_PDF.pdf
- Gazzotti, T., Lugoboni, B., Zironi, E., Barbarossa, A., Serraino, A., Pagliuca, G. (2009). Determination of fumonisin B₁ in bovine milk by LC-MS/MS. *Food Control*, 20, 1171-1174.
- Geiser, D.M., Del Mar Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T.J., Zhang, N., Kuldau, G.A., O'Donnell, K. (2004). FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 473-479.
- Ghianian, S.A., Maghsood, A.H., Yazdanpanah, H., Shephard, G., Van Der Westhuizen, L., Vismer, H., Rheeder, J.P., Marasas, W.F.O. (2006). Incidence of *Fusarium verticillioides* and levels of fumonisins in corn from main production areas in Iran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6118-6122.
- Girmenia, C., Pagano, L., Corvatta, L., Mele, L., Del, A., Favero, P. (2000). The epidemiology of fusarioses in patients with haematological diseases. *British Journal of Haematology*, 111, 272-276.
- Glass, N.L., Donaldson, G. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1323-1330.
- Glass, N.L., Metznerberg, R.L., Raju, N.B. (1990). Homothallic Sordariaceae from nature: the absence of strains containing only the a mating type sequence. *Experimental Mycology*, 14, 274-289.
- Glenn, A.E. (2007). Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, 137, 213-240.
- Gómez Pallares, M., León, A. E. y Rosell, C. M. (2007). Capítulo 1: trigo. En: León, A. E. y Rosell, C. M. (Eds.), De tales harinas tales panes: granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica. Córdoba, Argentina, pp. 17-72.
- Gong, Y.Y., Torres-Sanchez, L., Lopez-Carrillo, L., Peng, J.H., Sutcliffe, A.E., White, K.L. (2008). Association between tortilla consumption and human urinary fumonisin B₁ levels in a Mexican population. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 17, 688-694.
- Goswami, R.S., Kistler, H.C. (2004). Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*, 5, 515-525.
- Graham, R. (1913). Forage poison in horses, cattle and mules. *Kentucky Agricultural Experiment Station Bulletin*, 167, 369-383.

- Griffin, D.M. (1972). Ecology of soil fungi. Chapman and Hall, Londres.
- Gumprecht, L.A., Beasley, V.R., Weigel, R.M., Parker, H.M., Tumbleson, M.E., Bacon, C.W., Meredith, F.I., Haschek, W.M. (1998). Development of fumonisin-induced hepatotoxicity and pulmonary edema in orally dosed swine: morphological and biochemical alterations. *Toxicologic Pathology*, 26, 777-88.
- Guo, Z., Pfohl, K., Karlovsky, P., Dehne, H.W., Altincicek, B. (2015). Fumonisin B₁ and beauvericin accumulation in wheat kernels after seed-borne infection with *Fusarium proliferatum*. *Agricultural and Food Science*, 25, 138-145.
- Gurusidappa, S.B., Mamatha, H.S. (2011). Fusarial skin lesion in immunocompromised. *Indian Journal of Cancer*, 48, 116-117.
- Gutiérrez, S.A., Cabrera, M.G., Gómez, D.E. (2004). Microhongos asociados a semillas de soja procedentes de la provincia del Chaco, Argentina. *Boletín Microbiológico*, 19, 59-62.
- Harrison, L.R., Colvin, B.M., Greene, J.T., Newman, L.E., Cole, J.R.Jr. (1990). Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B₁, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2, 217-21.
- Haschek, W.M., Gumprecht, L.A., Smith, G., Tumbleson, M.E., Constable, P.D. (2001). Fumonisin toxicosis in swine: an overview of porcine pulmonary edema and current perspectives. *Environmental Health Perspectives*, 109, 251-7.
- Holmquist, G.U., Walter, H.W., Stahr, H.M. (1983). Influence of temperature, pH, water activity and antifungal agents on growth of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Food Science*, 48, 778-782.
- Homok, L., Waalwijk, C., Leslie, J.F. (2007). Genetic factors affecting sexual reproduction in toxigenic *Fusarium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 54-58.
- Huffman, J., Gerber, R., Du, L. (2010). Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins. *Biopolymers*, 93, 764-776.
- Humphreys, S.H., Carrington, C., Bolger, M. (2001). A quantitative risk assessment for fumonisins B₁ and B₂ in US corn. *Food Additives and Contaminants*, 18, 211-220.
- Hyun, J.W., Lee, S.C., Kim, D.H., Ko, S.W., Kim, K.S. (2000). *Fusarium* fruit rot of citrus in Jeju Island. *Mycobiology*, 28, 158-162.
- IARC (2002). Fumonisin B₁. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans: Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. World Health Organization, 82, 301-366.
- Infantino, A., Santori, A., Shah, D.A. (2012). Community structure of the *Fusarium* complex on wheat seed in Italy. *European Journal of Plant Pathology*, 132, 499-510.
- Jakšić, S., Abramović, B., Jajić, I., Baloš, M.Ž., Mihaljev, Ž., Despotović, V., Šojić, D. (2012). Co-occurrence of fumonisins and deoxynivalenol in wheat and maize harvested in Serbia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 89, 615-619.
- Javed, T., Bennett, G.A., Richard, J.L., Dombink-Kurtzman, M.A., Cote, L.M., Buck, W.B. (1993). Mortality in broiler chicks on feed amended with *Fusarium proliferatum* culture material or with purified fumonisin B₁ and moniliformin. *Mycopathologia*, 123, 171-184.
- Jensen, T.G., Gahrn-Hansen, B., Arendrup, M., Bruun, B. (2004). *Fusarium fungaemia* in immunocompromised patients. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 499-501.
- Jestoi, M. (2008). Emerging fusarium-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 21-49.
- Jiménez M., Logrieco, A., Botalico, A. (1993). Occurrence and pathogenicity of *Fusarium* species in banana fruits. *Journal of Phytopathology*, 137, 214-220.
- Jurado, M., Marín, P., Callejas, C., Moretti, A., Vázquez, C., González-Jaén, M.T. (2010). Genetic variability and fumonisin production by *Fusarium proliferatum*. *Food Microbiology*, 27, 50-57.

- Jurado, M., Marín, P., Magan, N., González-Jaén, M.T. (2008). Relationship between solute and matric potential stress, temperature, growth and *FUM1* gene expression in two *Fusarium verticillioides* strains from Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 2032-2036.
- Jurkunas, U., Behlau, I., Colby, K. (2009). Fungal keratitis: changing pathogens and risk factors. *Cornea*, 28, 638-643.
- Kang, Z., Buchenauer, H. (2002). Studies on the infection process of *Fusarium culmorum* in wheat spikes: Degradation of host cell wall components and localization of trichothecene toxins in infected tissue. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 653-660.
- Karbancioglu-Güler, F., Heperkan, D. (2009). Natural occurrence of fumonisin B₁ in dried figs as an unexpected hazard. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 289-92.
- Keller, N.P., Turner, G., Bennett, J.W. (2005). Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 937-947.
- Kellerman, T.S., Marasas, W.F., Thiel, P.G., Gelderblom, W.C., Cawood, M., Coetzer, J.A. (1990). Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B₁. *Journal of Veterinary Research*, 57, 269-75.
- Kenényi, Z., Mulé, G., Moretti, A., Waalwijk, C., Hornok, L. (2002). Fertility and mating type assessment within *Fusarium proliferatum* isolates from different host plants. *Journal of Applied Genetics*, 43, 55-68.
- Kerenyi, Z., Moretti, A., Waalwijk, C., Oláh, B., Hornok, L. (2004). Mating type sequences in asexually reproducing *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4419-4423.
- Keszthelyi, A., Jeney, A., Kerényi, Z., Mendes, O., Waalwijk, C., Hornok, L. (2007). Tagging target genes of the MAT1-2-1 transcription factor in *Fusarium verticillioides* (*Gibberella fujikuroi* MP-A). *Antonie Van Leeuwenhoek*, 91, 373-391.
- Khan, N.I., Schisler, D.A., Boehm, M.J., Lipps, P.E., Slininger, P.J. (2004). Field testing of antagonists of *Fusarium* head blight incited by *Gibberella zeae*. *Biological Control*, 29, 245-255.
- Kim, E.K., Scott, P.M., Lau, B.P. (2003). Hidden fumonisin in corn flakes. *Food Additives and Contaminants*, 20, 161-169.
- Kim, H., Smith, J.E., Ridenour, J.B., Woloshuk, C.P., Bluhm, B.H. (2011). *HXK1* regulates carbon catabolism, sporulation, fumonisin B₁ production and pathogenesis in *Fusarium verticillioides*. *Microbiology*, 157, 2658-2669.
- Kim, H., Woloshuk, C.P. (2008). Role of AREA, a regulator of nitrogen metabolism, during colonization of maize and fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics and Biology*, 45, 947-953.
- Kimanya, M.E., De Meulenaer, B., Roberfroid, D., Lachat, C., Kolsteren, P. (2010). Fumonisin exposure through maize in complementary foods is inversely associated with linear growth of infants in Tanzania. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54, 1659-1667.
- Klaasen, J.A., Nelson, P.E. (1996). Identification of a mating population, *Gibberella nygamai* sp. nov., within the *Fusarium nygamai* anamorph. *Mycologia*, 88, 965-969.
- Kodell, R.L., Young, J.F., DeLongchamp, R.R., Turturro, A., Chen, J.J., Gaylor, D.W., Howard, P.C., Zheng, Q. (2001). A mechanistic approach to modelling the risk of liver tumours in mice exposed to fumonisin B₁ in the diet. *Food Additives and Contaminants*, 18, 237-253.
- Koehler, P., Tacke, D., Cornely, O.A. (2014). Bone and joint infections by *Mucorales*, *Scedosporium*, *Fusarium* and even rarer fungi. *Critical Reviews in Microbiology*, 9, 1-14.
- Kohut, G., Adám, A.L., Fazekas, B., Hornok, L. (2009). N-starvation stress induced *FUM* gene expression and fumonisin production is mediated via the HOG-type MAPK pathway in *Fusarium proliferatum*. *International Journal of Food Microbiology*, 130, 65-69.

- Koressaar, T., Remm, M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, 23, 1289-1291.
- Kouadio, J.H., Mobio, T.A., Baudrimont, I., Moukha, S., Dano, S. D., Creppy, E.E. (2005). Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B₁ in human intestinal cell line Caco-2. *Toxicology*, 213, 56-65.
- Kriek, N.P., Kellerman, T.S., Marasas, W.F. (1981). A comparative study of the toxicity of *Fusarium verticillioides* (= *F. moniliforme*) to horses, primates, pigs, sheep and rats. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 48, 129-31.
- Kushiro, M., Zheng, Y., Nagata, R., Nakagawa, H., Nagashima, H. (2009). Limited surveillance of fumonisins in brown rice and wheat harvested in Japan. *Journal of Food Protection*, 72, 1327-1331.
- Lacey, J. (1989). Prevention of mold growth and mycotoxin production through control environmental factors. En: *Mycotoxins and Phytotoxins*. Natori, S., Hashimoto, K. y Ueno, Y. (Eds.). Elsevier, Amsterdam. Pp, 161-168.
- Lacey, J., Magan, N. (1991). Fungi in cereal grains: their occurrence and water and temperature relationship. En: *Cereal Grain. Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage*. Chelkowski, J. (Ed.). Elsevier, Amsterdam. Pp. 77-118.
- Latenser, B.A. (2003). *Fusarium* infections in burn patients: a case report and review of the literature. *Journal of Burn Care and Rehabilitation*, 24, 285-288.
- Le Bars, J. (1982). Toxigenesis as a function of the ecological conditions of the grain/microorganisms systems. En: *Preservation and storage of grains. Seeds and their byproducts*. Multon, J. L. (Ed.). Lavoisier Publishing, New York. Pp, 347-366.
- Lee, Y.J., Hagler, W.M. (1991). Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus flavus* isolated from contaminated maize. *Journal of Food Science*, 56, 871-873.
- Legislación de la Unión Europea sobre contenidos máximos de micotoxinas en productos alimenticios. MICOTOXINAS. Revisión Marzo 2017. <http://plaguicidas.comercio.es/Micotox.pdf>
- Leslie, J.F. (1995). *Gibberella fujikuroi*: available population and variable traits. *Canadian Journal of Botany*, 73, S282-S291.
- Leslie, J.F., Pearson, C.A., Nelson, P.E., Toussoun, T.A. (1990). *Fusarium* species from corn, sorghum and soybean fields in the central and eastern United States. *Phytopathology*, 88, 343-350.
- Leslie, J.F., Summerell, B.A. (2006). The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Professional, Ames, Iowa, USA.
- Leslie, J.F., Summerell, B.A. (2013). An overview of *Fusarium*. En: *Fusarium genomics, molecular and cellular biology*. Brown D., Proctor R.H. (Eds.), Caister Academic Press, Norfolk UK. Pp 1-9.
- Li, F., Jiang, D., Zheng, F., Chen, J., Li, W. (2015). Fumonisins B₁, B₂ and B₃ in corn products, wheat flour and corn oil marketed in Shandong province of China. *Food Additives and Contaminants, Part B*, 8, 169-174.
- Liu, Y.P., Yang, L.X., Yang, N.J., Dong, B., Cao, L.L., Wang, K., Yang, L.X. (2012). Occurrence of fumonisins and aflatoxins in cereals from markets of Hebei province of China. *Food Additives and Contaminants, Part B*, 5, 208-211.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods*, 25, 402-408.
- Llorens, A., Mateo, R., Hinojo, M.J., Valle-Algarra, F.M., Jiménez M. (2004). Influence of environmental factors on the biosynthesis of type B trichothecenes by isolates of *Fusarium* spp. from Spanish crops. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 43-54.
- Logrieco, A., Ferracane, R., Haidukowsky, M., Cozzi, G., Visconti, A., Ritieni, A. (2009). Fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger* from grapes and natural occurrence in must. *Food Additives and Contaminants, Part A*, 26, 1495-500.

- Logrieco, A., Moretti, A., Ritieni, A., Bottalico, A., Corda, P. (1995). Occurrence and toxigenicity of *Fusarium proliferatum* from preharvest maize ear rot, and associated mycotoxins, in Italy. *Plant Disease*, 79, 727-731.
- 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.
- López-Erasquín, E., Vázquez, C., Jiménez, M., González-Jaén, M.T. (2007). Real Time RT-PCR assay to quantify the expression of *FUM1* and *FUM19* genes from the 408 fumonisin producing *Fusarium verticillioides*. *Journal of Microbiological Methods*, 68, 312-317.
- Lori, G., Sisterna, M., Haidukowsky, M., Rizzo, I. (2003). *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol contamination in the durum wheat area of Argentina. *Microbiological Research*, 158, 1-7.
- Ma, L.-J., Geiser, D.M., Proctor, R.H., Rooney, A.P., O'Donnell, K., Trail, F., Gardiner, D.M., Manners, J.M., Kazan, K. (2013). *Fusarium* pathogenomics. *Annual Review of Microbiology*, 67, 399-416.
- Magan, N. (2006). Mycotoxin contamination of food in Europe: early detection and prevention strategies. *Mycopathologia*, 162, 245-253.
- Magan, N., Aldred, D. (2007). Environmental fluxes and fungal interactions: Maintaining a competitive edge. En: Stress in yeast and filamentous fungi. Van West, P., Avery, S. y Stratford, M. (Eds.). Elsevier Ltd., Amsterdam, Holland. Pp, 19-35.
- Magan, N., Lacey, J. (1984a). Effect of temperature and pH on water relations of field and storage fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 82, 71-81.
- Magan, N., Lacey, J. (1984b). Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 82, 83-93.
- MAGYP, (2013). Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Republica Argentina. 2013. <http://www.minagri.gob.ar>
- MAGYP, (2015). Ministerio de Agroindustria de la Nación, Sitio oficial, Subsecretaría de Mercados Agropecuarios, 2015. Recuperado el día 29 de Abril, 2016 de: <http://www.minagri.gob.ar/dimeagro/productos/granos.php>
- MAGYP, (2017). Ministerio de Agroindustria. <https://datos.magyp.gob.ar/reportes.php?reporte=Estimaciones> <http://www.caserosada.gob.ar/informacion/actividad-oficial/9-noticias/38764-record-historico-de-produccion-de-trigo-la-produccion-de-trigo-de-la-campana-2016-2017-se-convirtio-en-la-mas-grande-en-la-historia-del-pais-en-respuesta-a-las-medidas-que-adopto-el-gobierno-para-potenciar-el-sector-rural-y-fomentar-la-creacion-de-mayor-c>
- Mallmann, C.A., Santurio, J.M., Almeida, C.A.A., Dilkin, P. (2001). Fumonisin B₁ levels in cereals and feeds from southern Brazil. *Arquivos do Instituto Biologico (Sao Paulo)*, 68, 41-45.
- Manjula, K., Hell, K., Fandohan, P., Abass, A., Bandyopadhyay, R. (2009). Aflatoxin and fumonisin contamination of cassava products and maize grain from markets in Tanzania and republic of the Congo. *Toxin Reviews*, 28, 63-69.
- Månsson, M., Klejnstrup, M.L., Phipps, R.K., Nielsen, K.F., Frisvad, J.C., Gottfredsen, C.H., Larsen, T.O. (2010). Isolation and NMR characterization of fumonisin B₂ and a new fumonisin B₆ from *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 949-953.
- 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 Journal of Veterinary Research*, 55, 197-203.
- Marasas WFO, Nelson PE, and Toussoun TA. (1984). Toxigenic *Fusarium* Species: Identity and Mycotoxicology. Pennsylvania State University Press, University Park, PA.
- Marasas, W.F. (2001). Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. *Environmental Health Perspectives*, 109, 239-43.

- Marasas, W.F.O, Wehner, F.C, van Rensburg, S.J, van Schalkwyk, D.J. (1981). Mycoflora of corn produced in human esophageal cancer areas in Transkei, southern Africa. *Phytopathology*, 71, 792-796.
- Marasas, W.F.O., Riley, R., Hendricks, K., Stevens, W.L., Sadler, T.W., Gelineau vanWaes, J., Missmer, S.A., Cabrera, J., Torres, O., Gelderblom, W.C.A., Allegood, J., Martinez, C., Maddox, J., Miller, J.D., Starr, L., Sullards, M.C., Roman, A.V., Voss, K.A., Wang, E., Merrill Jr.A.H. (2004). Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *Journal of Nutrition*, 134, 711-716.
- 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 doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de microbiología III. Madrid, España.
- 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. *International Journal of Food Microbiology*, 165, 251-258.
- Marin, P., Magan, N., Vázquez, C., Gonzalez-Jaen, M.T. (2010). Differential effect of environmental conditions on the growth and regulation of the fumonisin biosynthetic gene *FUM1* in the maize pathogens and fumonisin producers *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*. *FEMS Microbiology Ecology*, 73, 303-311.
- Marín, S., Magan, N., Ramos, A.J., Sanchis, V. (2004). Fumonisin-producing strains of *Fusarium*: A review of their ecophysiology. *Journal of Food Protection*, 67: 1792-1805.
- Marín, S., Magan, N., Serra, J., Ramos, A. J., Canela, R., Sanchis, V. (1999). Fumonisin B₁ production and growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* on maize, wheat, and barley grain. *Journal of Food Science*, 64: 921- 924.
- Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A. (2011) Capítulo 4: Factores ecofisiológicos que condicionan el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas. En: Las micotoxinas y su efecto en la salud animal y humana. Ed: Ramos, A. (Ed.), Madrid Vicente Ediciones, España. Pp, 73-93.
- Marín, 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, 831-837.
- Martinez-Larranaga, M.R., Anadon, A., Diaz, M.J., Fernandez-Cruz, M.L., Martinez, M.A., Frejo, M.T. (1999). Toxicokinetics and oral bioavailability of fumonisin B₁. *Veterinary and Human Toxicology*, 41, 357-362.
- Martins, M.L., Martins, H.M., Bernardo, F. (2001). Fumonisin B₁ and B₂ in black tea and medicinal plants. *Journal of Food Protection*, 64, 1268-1270.
- Mary, V.S., Theumer, M.G., Arias, S.L., Rubinstein, H.R. (2012). Reactive oxygen species sources and biomolecular oxidative damage induced by aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ in rat spleen mononuclear cells. *Toxicology*, 302, 299-307.
- Mashinini, K., Dutton, M.F. (2006). The incidence of fungi and mycotoxins in South Africa wheat and wheat-based products. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 41, 285-296.
- Mateo, R., Medina, A., Gimeno-Adelantado, J.V., Jiménez, M. (2004). An overview on the status of toxigenic fungi and mycotoxins in Spain. En: *An overview on toxigenic fungi and micotoxins in Europe*. Logrieco, A. y Visconti, A. (Eds.). Kluwer Academic Publishers, the Netherlands. Pp, 219-235.
- Medina, A., Schmidt-Heydt, M., Cárdenas-Chávez, D., Parra, R., Geisen, R., Magan, N. (2013). Integrating toxin gene expression, growth and fumonisin B₁ and B₂ production by a strain of *Fusarium verticillioides* under different environmental factors. *Journal of the Royal Society Interface*, 10:20130320.
- Mendes, G. R. L., Reis, T.A., Corrêa, B., Badiale-Furlong, E. (2015). Mycobiota and occurrence of Fumonisin B₁ in wheat harvested in Southern Brazil. *Ciência Rural*, 45, 1050-1057.

- Merrill, A.H., Sullards, M.C., Wang, E., Voss, K.A., Riley, R.T. (2001). Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environmental Health Perspectives*, 109, 283-289.
- Miller, J.D. (2001). Factors that affect the occurrence of fumonisin. *Environmental Health Perspectives*, 109, 321-324.
- Milus, E.A., Parson, C.E. (1994). Evaluation of foliar fungicides for controlling *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Disease*, 78, 697-699.
- 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.W.A., Noordam, M.Y., Pisante, M., Piva, G., Prandini, A., Toti, L., Van Den Born, G.J., Vespermann, A. (2009). Climatic change and food safety: an emerging issue with special focus on Europe. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1009-1021.
- Missmer, S., Suaz, L., Felkner, M., Wang, E., Merrill, A., Rothman, K., Hendricks, K. (2006). Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas– Mexico border. *Environmental Health Perspectives*, 114, 237-241.
- Mogensen, J.M., Larsen, T.O., Nielsen, K.F. (2010). Widespread occurrence of the mycotoxin fumonisin B₂ in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4853-4857.
- Mohammadi, A., Shams-Ghahfarokhi, M., Nazarian-Firouzabadi, F., Kachuei, R., Gholami-Shabani, M., Razzaghi-Abyaneh, M. (2016). *Giberella fujikuroi* species complex isolated from maize and wheat in Iran: distribution, molecular identification and fumonisin B₁ in vitro biosynthesis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 1333-1340.
- Moretti, A., Ferracane, L., Somma, S., Ricci, V., Mulè, G., Susca, A., Ritieni, A., Logrieco, A.F. (2010). Identification, mycotoxin risk and pathogenicity of *Fusarium* species associated with fig endosepsis in Apulia, Italy. *Food Additives and Contaminants, Part A*, 27, 718-28.
- Moretti, A., Mulè, G., Perrone, G., Ritieni, A., Bottalico, A., D'Erchia, A.M., Logrieco, A. (1999). *Fusarium proliferatum* from various plants: fertility, toxigenicity, and characterization by RAPDs. *Bull. Inst. Compr. Agric. Sci. Kinki Univ.* 7, 27-36.
- Muehlbauer, G.J., Bushnell, W.R. (2003). Transgenic approaches to *Fusarium* head blight resistance. En: *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*. Leonard, K. J. y Bushnell, W. R. (Eds.). APS Press, St. Paul, Minnesota. Pp, 318–362.
- Munkvold, G.P. (2003). Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 705-713.
- Musa, H.O., Al Eisa, A., Halim, M., Sahovic, E., Gyger, M., Chaudhri, N. (2000). The spectrum of *Fusarium* infection in immunocompromised patients with haematological malignancies and in non-immunocompromised patients; A single institution experience over 10 years. *British Journal of Haematology*, 108, 544-548.
- Nayara, S.C., Wulff, E.G., Udayashankar, A.C., Nandini, B.P., Niranjana, S.R., Mortensen, C.N., Prakash, H.S. (2011). Prospects of molecular markers in *Fusarium* species diversity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90, 1625-1639.
- Nelson, P.E., Dignani, M.C., Anaissie, E.J. (1994). Taxonomy, biology and clinical aspect of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology Review*, 7, 479-504.
- Nielsen, K.F., Ngemela, A.F., Jensen, L.B., De Medeiros, L.S., Rasmussen, P.H. (2015). UHPLC-MS/MS determination of ochratoxin A and fumonisins in coffee using QuEChERS extraction combined with mixed-mode SPE purification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 1029-1034.
- Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K.F., Frisvad, J.C., Samson, R.A. (2009). Fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger* in Thai coffee beans. *Food Food Additives and Contaminants Part A*, 26, 94-100.
- Nucci, M., Anaissie, E. (2002). Cutaneous infection by *Fusarium* species in healthy and immunocompromised hosts: implications for diagnosis and management. *Clinical Infection Diseases*, 35, 909-920.

- Nucci, N., Anaissie, E. (2007). *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clinical Microbiology Reviews*, 20, 695-704.
- Ocamb, C., Juzwik, M.J., Martin, F.B. (2002). *Fusarium* spp. and *Pinus strobus* seedlings: Root disease pathogens and taxa associated with seed. *New Forests*, 24, 67-79.
- Omurtag, G.Z., Yazicioğlu, D. (2004). Determination of fumonisins B₁ and B₂ in herbal tea and medicinal plants in Turkey by high-performance liquid chromatography. *Journal of Food Protection*, 67, 1782-1786.
- Oswelder, G.D., Ross, P.F., Wilson, T.M., Nelson, P.E., Witte, S.T., Carson, T.L., Rice, L.G., Nelson, H.A. (1992). Characterization of an epizootic of pulmonary edema in swine associated with fumonisin in corn screenings. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 4, 53-9.
- Pacin, A., Ciancio Bovier, E., Canoa, G., Taglieri, D., Hernandez Pezzani, C. (2010). Effect of the bread making process on wheat flour contaminated by deoxynivalenol and exposure estimate. *Food Control*, 21, 492-495.
- Palacios, S.A., Ramirez, M.L., Cabrera Zalazar, M., Farnochi, M.C., Zappacosta, D., Chiacciera, S.M., Reynoso, M.M., Chulze, S.N., Torres, A.M. (2011). Occurrence of *Fusarium* spp. and fumonisin in durum wheat grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 12264-12269.
- Palacios, S.A., Susa, A., Haidukowski, M., Stea, G., Cendoya, E., Ramirez, M.L. (2015). Genetic variability and fumonisin production by *Fusarium proliferatum* isolated from durum wheat grains in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 201, 35-41.
- Palmero, D., González, M. de C., Iglesias, C., Ruíz, G., Tello, J. C. (2008). Effects of water potential on spore germination and viability of *Fusarium* species. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35, 1411-1418.
- Peraica, M., Radic, B., Lucic, A., Pavlovic, M. (1999). Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of World Health Organ*, 77, 754-766.
- Peters, A.T. (1904). A fungus disease in corn. *Agric. Exp. Stn. Nebr. Annu. Rep.* 17, 13-22.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. *Nucleic Acids Research*, 29, 2002-2007.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L., (2002). Relative expression software tool (REST^a) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30, 1-10.
- Piacentini, K.C., Savi, G.D., Pereira, M-E.V., Scussel, V.M. (2015). Fungi and the natural occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in malting barley (*Hordeum vulgare* L.). *Food Chemistry*, 187, 204-209.
- 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. *Critical Reviews in Microbiology*, 36, 221-231.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. (1985). *Fungi and spoilage*. Academic Press. Sydney, Australia.
- Ponts, N., Pinson-Gadais, L., Barreau, C., Richard-Forget, F., Ouellet, T. (2007). Exogenous H₂O₂ and catalase treatments interfere with Tri genes expression in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEBS Letters*, 581, 443-447.
- Preluski, D.B., Miller, J.D., Trenholm, H.L. (1996). Disposition of 14C-derived residues of pigs fed radiolabeled fumonisin B₁. *Food Additives and Contaminants*, 13, 155-162.
- Proctor, R., Desjardins, A.E., Moretti, A., (2010). The role of plant pathology in food safety and food security. *Biological and Chemical Complexity of Fusarium proliferatum*. Springer, Dordrecht (The Netherlands), 9, 97-111.
- Proctor, R.H., Brown, D.W., Plattner, R.D., Desjardins, A.E. (2003). Coexpression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. *Fungal Genetics and Biology*, 38, 237-249.

- Proctor, R.H., Busman, M., Seo, J.A., Lee, Y.W., Plattner, R.D. (2008). A fumonisin biosynthetic gene cluster in *Fusarium oxysporum* strain O-1890 and the genetic basis for B versus C fumonisin production. *Fungal Genetics and Biology*, 45, 1016-1026.
- Proctor, R.H., Desjardins, A.E., Plattner, R.D., Hohn, T.M., (1999). A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Fungal Genetics and Biology*, 27, 100-112.
- Ramírez, M.L., Chulze, S., Magan N. (2004a). Impact of environmental factors and fungicides on growth and deoxinivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentinian wheat. *Crop Protection*, 23, 117-125.
- Ramírez, M.L., Chulze, S., Magan, N. (2006c). Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxinivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grains. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 291-296.
- Ramírez, M.L., Chulze, S.N., Magan, N. (2004b). Impact of osmotic and matric water stress on germination, growth, mycelial water potentials and endogenous accumulation of sugars and sugar alcohols in *Fusarium graminearum*. *Mycologia*, 96, 470-478.
- Ramirez, M.L., Oviedo, M.S., Farnochi, M.C., Chulze, S.N. (2006b). Mycological and mycotoxin survey on wheat during a non epidemic FHB year in Argentina. Proceeding of 9th European *Fusarium* Seminar. September 12-22, Wageningen, The Netherlands.
- Ramirez, M.L., Reynoso, M.M., Farnochi, M.C., Chulze, S. (2006a). Vegetative compatibility and mycotoxin chemotypes among *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) isolates from wheat in Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, 115, 139-148.
- Ramirez, M.L., Reynoso, M.M., Farnochi, M.C., Torres, A., Leslie, J., Chulze, S. (2007). Population genetic structure of *Gibberella zeae* isolated from wheat in Argentina. *Food Additives and Contaminants*, 24, 1115-1120.
- Reynoso, M.M., Chulze, S.N., Zeller, K.A., Torres, A.M., Leslie, J.F. (2009). Genetic structure of *Fusarium verticillioides* populations isolated from maize in Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, 123, 207-215.
- Rheeder, J.P., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Sydenham, E.W., Shephard, G.S., van Schalkwyk, D.J. (1992). *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Trankei. *Phytopathology*. 82, 353-357.
- Richard, J.L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses an overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 3-10.
- Riley, R.T., Enongene, E., Voss, K.A., Norred, W.P., Meredith, F.I., Sharma, R.P., Spitsbergen, J., Williams, D.E., Carlson, D.B., Merrill, A.H.Jr. (2001). Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 109, 301-308.
- Riley, R.T., Showker, J.L., Lee, C.M., Zipperer, C.E., Mitchell, T.R., Voss, K.A., (2015). A blood spot method for detecting fumonisin-induced changes in putative sphingolipid biomarkers in LM/Bc mice and humans. *Food Additive and Contaminants, Part A*, 32, 934-949.
- Rodrigues, I., Naehrer, K. (2012). A three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feedstuffs and feed. *Toxins*, 4, 663-675.
- Roohi, S., Gholampour, A., Hashemi, M. (2012). Fumonisin contamination base on flour quality used in bakeries and confectioneries in Qaemshahr (city of the Norther Iran). *African Journal of Microbiology Research*, 6, 1815-1818.

- Roscoe, V., Lombaert, G. A., Huzel, V., Neumann, G., Melietio J., Kitchen, D., Kotello, S., Krakalovich, T., Trelka, R., Scott P. M. (2008). Mycotoxins in breakfast cereals from the Canadian retail market: A 3-year survey. *Food Additive and Contaminants, Part A*, 25, 347-355.
- Rubert, J., Soriano, J.M., Mañes, J., Soler C. (2013). Occurrence of fumonisins in organic and conventional cereal-based products commercialized in France, Germany and Spain. *Food and Chemical Toxicology*, 56, 387-391.
- Ryu, D., Munimbazi, C., Bullerman, L.B. (1999). Fumonisin B₁ production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* as affected by cycling temperatures. *Journal of Food Protection*, 62, 1456-1460.
- Sadler, T.W., Merrill, A.H., Stevens, V.L., Sullards, M.C., Wang, E., Wang, P. (2002). Prevention of fumonisin B₁ induced neural tube defects by folic acid. *Teratology*, 66, 169-76.
- Sagaram, U.S., Butchko, R.A.E., Shim, W.B. (2006). The putative monomeric G-protein GBP1 is negatively associated with fumonisin B₁ production in *Fusarium verticillioides*. *Molecular Plant Pathology*, 7, 381-389.
- Samapundo, S., De Meulenaer, B., Atukwase, A., Debevere, J., Devlieghere, F. (2007). The influence of modified atmospheres and their interaction with water activity on the radial growth and fumonisin B₁ production of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on corn. Part I: The effect of initial headspace carbon dioxide concentration. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 160-167.
- Sanchis, V., Abadias, M., Oncins, L., Sala, N., Viñas, I., Canela, R. (1995). Fumonisin B₁ and B₂ and toxigenic *Fusarium* strains in feeds from the Spanish market. *International Journal of Food Microbiology*, 27, 37-44.
- Sanchis, V., Marín, S., Magan, N., Ramos, A.J. (1996). Ecophysiology of fumonisin producers in *Fusarium* Section *Liseola*. *Advances in Food Microbiology*, 571, 115-122.
- Sanchis, V., Marín, S., Magan, N., Ramos, A.J. (2006). Ecophysiology of fumonisin producers in *Fusarium* section *Liseola*. En: *Advances in Experimental Medicine and Biology. Advances in Food Mycology*. Hocking, A. D., Samson, R. A., Pitt, J. I. y Thrane, U. (Eds.). Springer US. Pp, 115-122.
- Sangare-Tigori, B., Moukha, S., Kouadio, H.J., Betbeder, A.M., Dano, D.S., Creppy, E.E. (2006). Co-occurrence of aflatoxin B₁, fumonisin B₁, ochratoxin A and zearalenone in cereals and peanuts from Côte d'Ivoire. *Food Additives and Contaminants*, 23, 1000-1007.
- Santos, L., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J. (2009). Screening of mycotoxin multicontamination in medicinal and aromatic herbs sampled in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 1802-1807.
- Seo, J.A., Proctor, R.H., Plattner, R.D. (2001). Characterization of four clustered coregulated genes associated with fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics and Biology*, 34, 155-165.
- Schmidt-Heydt, M., Geisen, R. (2007a). A microarray for monitoring the production of mycotoxins in food. *International Journal of Food Microbiology*, 117, 131-140.
- Schmidt-Heydt, M., Geisen, R. (2007b). Gene expression as an indication for ochratoxin A biosynthesis in *Penicillium nordicum*. *Mycotoxin Research*, 23, 13-21.
- Schmidt-Heydt, M., Magan, N., Geisen, R. (2008). Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors. *FEMS Microbiology Letters*, 284, 142-149.
- Scott, P.M. (2012). Recent research on fumonisins: a review. *Food Additives and Contaminants, Part A*, 29, 242-248.
- Seefelder, W., Gossmann, M., Humpf, H.U. (2002). Analysis of fumonisin B(1) in *Fusarium proliferatum*-infected asparagus spears and garlic bulbs from Germany by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2778-2781.
- Seefelder, W., Hartl, M., Humpf, H.U. (2001). Determination of N-(carboxymethyl) fumonisin B(1) in corn products by liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2146-51.

- Seifert, K.A., Aoki, T., Baayen, R.P., Brayford, D., Burgess, L.W., Chulze, S., Gams, W., Geiser, D., deGruyter, J., Leslie, J.F., Logricco, A., Marasas, W.F.O., Nirenberg, H.I., O'Donnell, K., Rheeder, J., Samuels, G.J., Summerell, B.A., Thrane, U., Waalwijk, C. (2003). The name *Fusarium moniliforme* should no longer be used. *Mycological Research*, 107, 643-644.
- Seifert, K.A., Lévesque, C.A. (2004). Phylogeny and molecular diagnosis of mycotoxigenic fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 449-471.
- Sempere Ferre, F. (2016). Worldwide occurrence of mycotoxins in rice. *Food Control*, 62, 291-298.
- Serrano, A.B., Font, G., Ruiz, M.J., Ferrer, E. (2012). Co-occurrence and risk assessment of mycotoxins in food and diet from Mediterranean area. *Food Chemistry*, 135, 423-429.
- Sewram, V., Shephard, G.S., van der Merwe, L., Jacobs, T.V. (2006). Mycotoxin contamination of dietary and medicinal wild plants in the Eastern Cape Province of South Africa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5688-5693.
- Shephard, G.S., Sydenham, E.W., Thiel, P.G., Gelderblom, W.C.A. (1990). Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography*, 13, 2077-2080.
- Shephard, G.S., Thiel, P.G., Sydenham, E.W., Alberts, J.F. (1994a). Distribution and excretion of a single dose of the mycotoxin fumonisin B₁ in a non-human primate. *Toxicon*, 32, 735-741.
- Shephard, G.S., Thiel, P.G., Sydenham, E.W., Vleggaar, R., Alberts, J.F. (1994b). Determination of fumonisin B₁ and identification of its partially-hydrolysed metabolites in the feces of non-human primates. *Food and Chemical Toxicology*, 32, 23-29.
- Shephard, G.S., Van Der Westhuizen, L., Gatyeni, P.M., Katerere, D.R., Marasas, W.F.O. (2005). Do fumonisin mycotoxins occur in wheat? *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9293-9296.
- Shirima, C.P., Kimanya, M.E., Routledge, M.N., Srey, C., Kinabo, J.L., Humpf, H.U. (2015). A prospective study of growth and biomarkers of exposure to aflatoxin and fumonisin during early childhood in Tanzania. *Environmental Health Perspectives*, 123, 173-178.
- Sidhu, G.S. (2002). Mycotoxin genetics and genes clusters. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 705-711.
- Sinha, R.N., Wallace, H.A.H. (1966). Ecology of insect-induced hot spots in stored grain in western Canada. *Researches on Population Ecology*, 8, 107-132.
- Siro, V., Fremy, J.M., Leblanc, J.C. (2013). Dietary exposure to mycotoxins and health risk assessment in the second French total diet study. *Food and Chemical Toxicology*, 52, 1-11.
- Solfrizzo, M., Chulze, S.N., Mallmann, C., Visconti, A., De Girolamo, A., Rojo, F. (2004). Comparison of urinary sphingolipids in human populations with high and low maize consumption as a possible biomarker of fumonisin dietary exposure. *Food Additive and Contaminants*, 21, 1090-1095.
- Stanković, S., Lević J., Krnjaja, V. (2011). Fumonisin B₁ in maize, wheat and barley grain in Serbia. In Book of Proceedings of the 3rd International Congress "New Perspectives and Challenges of Sustainable Livestock Production", Belgrade, Serbia, October, 5-7, 2011, Biotechnol. *Animal Husbandry*, 27, 631-641.
- Stanković, S., Lević, J., Ivanović, D., Krnjaja, V., Stanković G., Tančić, S. (2012). Fumonisin B₁ and its co-occurrence with other fusariotoxins in naturally-contaminated wheat grain. *Food Control*, 23, 384-388.
- Stankovic, Z.S., Levic, J., Krnjaja, V.S., Bocarov-Stancic, A.S., Tancic, S.L., Kovacevic, T.M. (2007). Frequency of toxicogenic *Fusarium* species and fusariotoxins in wheat grain in Serbia. *Matica Srpska Proceedings for Nature Sciences*, 113, 93-102.
- Stępień, L., Koczyk, G., Waśkiewicz, A. (2011). Genetic and phenotypic variation of *Fusarium proliferatum* isolates from different host species. *Journal of Applied Genetics*, 52, 487-496.

- Stergiopoulos, I., Zwiars, L.H. De Waard, M.A. (2002). Secretion of natural and synthetic toxin compounds from filamentous fungi by membrane transporters of the ATP-binding cassette and major facilitator superfamily. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 719-734.
- Stevens, V.L., Tang, J. (1997). Fumonisin B₁-induced sphingolipid depletion inhibits vitamin uptake via the glycosylphosphatidylinositol-anchored folate receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 18020-18025.
- Suarez, L., Felkner, M., Brender, J.D., Canfield, M., Zhu, H., Hendricks, K.A. (2012). Neural tube defects on the Texas-Mexico border: what we've learned in the 20 years since the Brownsville cluster. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 94, 882-892.
- Sun, G., Wang, S., Hu, X., Su, J., Zhang, Y., Xie, Y., Zhang, H., Tang, L., Wang, J.S. (2011). Co-contamination of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ in food and human dietary exposure in three areas of China. *Food Additives and Contaminants*, 28, 461-470.
- Sydenham, E.W., Gelderblom, W.C.A., Thiel, P.G., Marasas, W.F.O. (1990). Evidence for the natural occurrence of fumonisin B₁, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*, in corn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 285-290.
- Szabó-Fodor, J., Dall'Asta, C., Falavigna, C., Kachleck, M., Szécsi, A., Szabó, A., Kovács, M. (2015). Determination of the amount of bioaccessible fumonisin B₁ in different matrices after *in vitro*. *World Mycotoxin Journal*, 8, 261-267.
- Tančinová, D., Labuda, R. (2009). Fungi on wheat bran and their toxinogenity. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 16, 325-331.
- Taylor, J.W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D.M., Hibbett, D.S., Fisher, M.C. (2000). Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 31, 21-32.
- Theumer, M.G., Cánepa, M.C., López, A.G., Mary, V.S., Dambolena, J.S., Rubinstein, H.R. (2010). Subchronic mycotoxicoses in Wistar rats: Assessment of the *in vivo* and *in vitro* genotoxicity induced by fumonisins and aflatoxin B₁, and oxidative stress biomarkers status. *Toxicology*, 268, 104-110.
- Torres, A., Ramirez, M.L., Chulze, S. (2010). *Fusarium* and fumonisins in maize in South America. En *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons*. Rai, M.; Varma, A. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Alemania. Pp, 179-200.
- Torres, O., Matute, J., Gelineau-van Waes, J., Maddox, J.R., Gregory, S.G., Ashley-Koch, A.E. (2014). Urinary fumonisin B₁ and estimated fumonisin intake in women from high-and low-exposure communities in Guatemala. *Molecular Nutrition and Food Research*, 58, 973-983.
- Trujillo Torres, H. J., (2015). Sustitución parcial de harina de trigo (*Triticum aestivum* L) por harina de papa china (*Colocasia esculenta*) para la elaboración de galletas de dulce. Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero en alimentos. Universidad Técnica de Machala, Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud, Carrera de Ingeniería en Alimentos. Machala, El Oro, Ecuador.
- Tsunoda, M., Dugyala, R.R., Sharma, R.P. (1998). Fumonisin B₁-induced increases in neurotransmitter metabolite levels in different brain regions of BALB/c mice. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 120, 457-65.
- Uhlig, S., Busman, M., Shane, D.S., Ronning, H., Rise, F., Proctor, R. (2012). Identification of early fumonisin biosynthetic intermediates by inactivation of the *FUM6* gene in *Fusarium verticillioides*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 10293-10301.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G. (2012). Primer3 — new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40, e115.
- Velluti, A., Marín, S., Bettucci, L., Ramos A.J., 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. *International Journal of Food Microbiology*, 59, 59-66.

- von Bargen, S., Martinez, O., Schadock, I., Eisold, A., Gossmann, M., Buttner, C. (2009). Genetic variability of phytopathogenic *Fusarium proliferatum* associated with crown rot in *Asparagus officinalis*. *Journal of Phytopathology*, 157, 446-456.
- Voss, K.A., Riley R.T., Gelineau-van Waes, J. (2011). Fumonisin. En: *Reproductive and Developmental Toxicology*, Gupta, R.C. (Ed.), Elsevier Academic Press: United States of America, pp.725-737.
- Voss, K.A., Riley, R.T., Norred, W.P., Bacon, C.W., Meredith, F.I., Howard, P.C., (2001). An overview of rodent toxicities: liver and kidney effects of fumonisins and *Fusarium moniliforme*. *Environmental Health Perspectives*, 109, 259-266.
- Waalwijk, C., Van der Lee, T., De Vries, I., Hesselink, T., Arts, J., Kema, G. (2004). Synteny in toxigenic *Fusarium* species: The fumonisin gene cluster and the mating type region as examples. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 533-544.
- Wagacha, J.M., Muthomi, J.W. (2008). Mycotoxin problem in Africa: current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 1-12.
- Wang, Y.K., Shi, Y.B., Zou, Q., Sun, J.H., Chen, Z.F., Wang, H., (2013). Development of a rapid and simultaneous immunochromatographic assay for the determination of zearalenone and fumonisin B₁ in corn, wheat and feedstuff samples. *Food Control*, 31, 180-188.
- Waskiewicz, A., Golinski, P., Karolewski, Z., Irzykowska, L., Bocianowski, J., Kostecki, M., Weber, Z. (2010). Formation of fumonisins and other secondary metabolites by *Fusarium oxysporum* and *F. proliferatum*: a comparative study. *Food Additives and Contaminants Part A*, 27, 608-615.
- Waskiewicz, A., Stępień, L., Wilman, K., Kachlicki, P. (2013). Diversity of pea-associated *F. proliferatum* and *F. verticillioides* populations revealed by *FUM1* sequence analysis and fumonisin biosynthesis. *Toxins*, 5, 488-503.
- WHO, (2002). Fifty-six report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series, 906. Organización Mundial de la Salud, Geneva.
- Wicklow, D.T., Hesseltine, C.W., Shotwell, O.L., Adams, G. L. (1980). Interference competition and aflatoxin levels in corn. *Phytopathology*, 70, 761-764.
- Xu, X. (2003). Effects of environmental conditions on the development of *Fusarium* ear blight. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 683-689.
- Xu, X.M., Nicholson, P., Thomsett, M.A., Simpson, D., Cooke, B.M., Doohan, F.M., Brennan, J., Monaghan, S., Moretti, A., Mulé, G., Hornok, L., Beki, E., Tatnell, J., Ritini, A., Edwards, S.G. (2008). Relationship between the fungal complex causing *Fusarium* head blight of wheat and environmental conditions. *Phytopathology*, 98, 69-78.
- Yoder, O.C., Valent, B., Chumley, F. (1986). Genetic nomenclature and practice for plant pathogenic fungi. *Phytopathology*, 76, 383-385.
- Zeller, K.A., Summerell, B.A., Bullock, S., Leslie, J.F. (2003). *Gibberella konza* (*Fusarium konzum*) sp. nov. from prairie grasses, a new species in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 95, 943-954.

**PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A
CONGRESOS**

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

Como resultado del presente trabajo de tesis se publicaron 3 trabajos en revistas internacionales y 4 presentaciones a congresos.

Las publicaciones en revistas internacionales fueron:

- Cendoya, E., Monge, M.P., Palacios, S.A., Chiacchiera, S., Torres, A.M., Farnochi, M.C., Ramirez, M.L. (2014). Fumonisin occurrence in naturally contaminated wheat grain harvested in Argentina. *Food Control* 37: 56-61.
- Cendoya, E., Farnochi, M.C., Chulze, S.N., Ramirez, M.L. (2014). Two-dimensional environmental profiles on growth, fumonisin production by *Fusarium proliferatum* on a wheat-based substrate. *International Journal of Food Microbiology* 182–183: 9–17.
- Cendoya, E., Pinson-Gadais, L., Farnochi, M.C., Ramirez, M.L., Chéreau, S., Marcheguay, G., Ducos, C., Barreau, C., Richard-Forget, F. (2017). Abiotic conditions leading to *FUM* gene expression and fumonisin accumulation by *Fusarium proliferatum* strains grown on a wheat-based substrate. *International Journal of Food Microbiology* 253: 12-19.

Las presentaciones a congresos fueron las siguientes:

- **Analysis of fumonisin contamination in durum and common wheat in Argentina.** Cendoya E., Monge M.P., Chiacchiera S.M., Farnochi M.C., Ramirez M.L. 7th Conference of The World Mycotoxin Forum y XIII the IUPAC International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, 5-9 de noviembre de 2012, Rotterdam, Holanda.
- **Efecto de la temperatura y actividad acuosa en el crecimiento y la producción de fumonisin de cepas de *Fusarium proliferatum* aisladas de trigo.** Cendoya E., Farnochi, M.C., Ramirez M.L. Presentado al VII Congreso Latinoamericano de Micotoxicología. Rio Cuarto, Córdoba, Argentina. 3 al 6 de diciembre de 2013.
- **Efecto de factores abióticos en el crecimiento de *Fusarium proliferatum* en granos de trigo irradiados.** Cendoya E., Farnochi M.C., Ramirez M.L.

Presentado al VIII Congreso Latinoamericano de Micología. Medellín, Colombia. 4 al 7 de noviembre de 2014.

- **Fumonisin biosynthesis and *FUM* gene expression by *Fusarium proliferatum* strains in a wheat-based media under different abiotic conditions.** Cendoya E., Barreau C., Pinson-Gadais L., Farnochi M.C., Ramirez M. L., Richard- Forget F. Workshop 2016 International Commission on Food Mycology, Current and Future Trends in Food Mycology- Methods, Taxonomy and Emerging Problems, Freising, Alemania. Junio 2016.



Fumonisin occurrence in naturally contaminated wheat grain harvested in Argentina



Eugenia Cendoya^a, Maria P. Monge^b, Sofia A. Palacios^a, Stella M. Chiacchiera^b,
Adriana M. Torres^a, Maria C. Farnochi^a, Maria L. Ramirez^{a, *}

^aDepartamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas Fco-Qcas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta 36 Km 601, 800 Río Cuarto, Córdoba, Argentina

^bDepartamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas Fco-Qcas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta 36 Km 601, 5800 Río Cuarto, Córdoba, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 July 2013
Received in revised form
September 2013
Accepted 14 September 2013

Keywords:

Fumonisin
Durum wheat
Common wheat
Deoxynivalenol

ABSTRACT

A survey was carried out to determine fumonisin contamination in 135 common and 40 durum wheat samples collected during 2011 harvest season (non-FHB epidemic year) in the main wheat production area of Argentina using LC–MS/MS. A 93% of total samples showed fumonisin contamination, with levels ranging from 0.16 to 680.44 ng/g in common and from 0.15 to 1304.39 ng/g in durum wheat samples, respectively. FB₁ was the fumonisin most frequently found during the evaluated year. Twenty five wheat samples (15 common and 10 durum) were selected for a deoxynivalenol (DON) analysis among all the samples analyzed for fumonisin content using different contamination levels as selection criteria. DON contamination was present in 24 out of 25 wheat samples, the levels ranging from 50.60 to 28650 ng/g. Nine out of 25 wheat samples reached values higher than 1000 ng/g. However there was no correlation between fumonisin and DON contamination. This is the first report of natural fumonisin presence in common wheat grains in Argentina, as well as of DON co-occurrence in both types of wheat.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Fumonisin are toxic fungal metabolites produced mainly by *Fusarium* species. Fumonisin B₁ (FB₁) is the most significant in terms of occurrence and toxicity. FB₁ can cause severe disorders in animals such as leukoencephalomalacia in horses (Marasas et al., 1988), as well as pulmonary edema syndrome and hydrothorax in pigs (Haschek et al., 1992); this toxin has also shown nephrotoxic, hepatotoxic and hepatocarcinogenic activities in rats (Wan Norhasima, Abdulamir, Abu Bakar, Son, & Norhafniza, 2009). Further, consumption of fumonisin-contaminated maize has been epidemiologically associated with esophageal cancer (Marasas, 2001) and neural tube defects in some human populations (Missmer et al., 2006). The International Agency for Research on Cancer (IARC) designated FB₁ in Group 2B as “a possible carcinogenic to humans” (IARC, 2002).

Several *Fusarium* species are able to produce fumonisins, but the two most important ones are *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*, which are common fungi associated with maize, but can also be isolated from other substrates such as wheat.

Fumonisin are geographically widely distributed and their natural occurrence has been reported mostly in maize, but also in other grains and grain-based products such as wheat, wheat based foods, semolina, farro, bread and others (Scott, 2012).

Wheat is the most important cereal consumed by the Argentine population. In this country human consumption of products manufactured with wheat, either semolina (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) or bread (*Triticum aestivum*), is much greater than for products made from other cereals (Food Balance Sheet, 2007; Pacin, Ciancio Bovier, Canoa, Taglieri, & Hernandez Pezzani, 2012). Durum wheat in Argentina is mainly used for pasta elaboration, with its production reaching 604,651 tons in 2011. Pasta national production reached almost 183,000 tons in 2011, and the consumption per capita was estimated at 7.9 kg/year. On the other hand, common wheat is mostly used for bread elaboration, breakfast cereals, cookies and cupcakes, its production was of 15,271,000 tons in 2011. It is remarkable that wheat flour consumption per capita in Argentina was estimated at 7.4 kg/habitant/month. Sixty three percent of the total wheat cultivation area is concentrated in Buenos Aires province (MAGyP, 2013).

The main pathogen associated with *Fusarium* Head Blight (FHB) wheat disease in common and durum wheat in Argentina is

* Corresponding author. Tel.: +54 358 4676429; fax: +54 358 4676231.
E-mail address: mr Ramirez@exa.unrc.edu.ar (M.L. Ramirez).

Table 1
Geographic locations and climatic conditions of the sampled grain storage companies and commercial fields.

Locations	Elevation (m)	Annual precipitation (mm)	Average annual temperature (°C)
Common wheat			
Junin	34° 31' S, 60° 52' W	81	953.52 ^a
Baigorrita	34° 45' S, 60° 59' W	80	16 ^a
Alberti	35° 1' S, 60° 15' W	38	
Bragado	35° 7' S, 60° 30' W	50	
9 de Julio	35° 27' S, 60° 52' W	78	
Casares	35° 37' S, 61° 22' W	72	
Durum wheat			
La Dulce	38° 20' S, 59° 0' W	72	685.4
Balcarce	37° 45' S, 58° 18' W	130	758.9
Miramar	38° 10' S, 58° 0' W	50	776.5
Barrow	38° 20' S, 60° 13' W	120	688.5
Bordenave	37° 50' S, 63° 1' W	212	711.4

^a Conditions for all the whole area between latitude 34°–37°S and longitude 58°–62°W.

Fusarium graminearum Schw, perfect stage *Gibberella zeae* (Schw) Petch (Lori, Sisterna, Haidukowsky, & Rizzo, 2003; Ramirez, Reynoso, Farnochi, & Chulze, 2006; Ramirez et al., 2007). Also deoxynivalenol (DON) has been reported in both types of wheat (Dalcero, Torres, Etcheverry, Chulze, & Varsavsky, 1997; González, Pacin, Resnik, & Martínez, 1997; Lori et al., 2003). However Ramirez, Oviedo, Farnochi, and Chulze (2006) carried out a mycological survey during a non-FHB epidemic year in common wheat, and found that the predominant *Fusarium* species were *F. proliferatum*, *Fusarium subglutinans* and *F. verticillioides*. Also, Palacios et al. (2011) found that the predominant *Fusarium* species isolated from durum wheat during a non-FHB epidemic year were *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. verticillioides* and *Fusarium equiseti*. Moreover, fumonisin contamination has been reported in both kinds of wheat and sub-products in many countries (Busman, Desjardins, & Proctor, 2012; Chehri, Jahromi, Reddy, Abbasi, & Salleh, 2010; Cirillo, Ritieni, Galvano, & Amodio Cocchieri, 2003; Jakšić et al., 2012; Roscoe et al., 2008) but not in Argentina, where fumonisins were reported only in durum wheat (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Palacios%20SA%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21999326 Palacios et al., 2011).

Due to the importance of wheat in Argentinean population diet, and because it has been proposed, in a study in the Netherlands, that fumonisin intake occurs mainly via the intake of wheat and wheat-products (Bakker, Speijers, & Paulsch, 2003), the aim of this work was to determine the natural occurrence of fumonisins in common and durum wheat during a non-FHB epidemic year, and its possible co-occurrence with DON.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection

One hundred thirty-five common wheat samples (harvest 2011) were obtained upon arrival from 6 local grain storage companies located in Junin, Bragado, Casares, Baigorrita, 9 de Julio and Alberti (Table 1), in Buenos Aires Province, the main wheat production area in Argentina. Wheat samples were taken from trucks, with a load capacity between 25 and 30 tons. Wheat was taken in six different truck positions using a vacuum sampling device in order to obtain an aggregate sample of 10 kg of randomized seeds. This sample was homogenized and sub-samples of 1 kg were taken, finely milled using a Romer mill (Romer, Union, MO, USA), thoroughly mixed and stored in bags in the dark at 4 °C until analysis. Also, forty durum

wheat samples (500 g) were randomly collected during the 2011 harvest season in 5 different commercial fields located in the major durum wheat production area in Argentina, south of Buenos Aires province (Table 1). Samples were collected from each field and pooled; from this pool, a subsample of 500 g was taken. These subsamples were immediately stored at 4 °C until mycotoxin analyses. All wheat samples (common and durum) were asymptomatic i.e. without evident kernel damage.

2.2. Analytical reagents

The standard of DON was purchased from Sigma–Aldrich (Buenos Aires, Argentina). FB₁ and FB₂ stock solutions in acetonitrile:water (1:1) were provided by Biopure (Tull, Austria). Analytical grade reagents, HPLC grade solvents and HPLC grade water were purchased from Panreac Quimica S.A.U. (Barcelona Spain). MycoSep[®]227 Trich+ cleanup columns were obtained from Romer (Romer Labs Inc., Union, MO). Bond-Elut strong anion-exchange (SAX) cartridges were obtained from Agilent Technologies Inc. (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA).

DON stock I solution of 500 µg/mL was prepared in methanol, a second stock was obtained diluting the stock I in methanol to achieve a final concentration of 100 µg/mL. They were stored in the darkness in glass-stoppered bottles under secure conditions at –20 °C. DON working standard solutions for HPLC calibration curve were prepared by dissolving diluting adequate amounts previously evaporated to dryness under nitrogen stream of the stock II solution in water:methanol (95:5), previously evaporated to dryness under nitrogen stream. Stock solution of FB₁ and FB₂ (50 µg/g) was diluted with acetonitrile:water (1:1) in order to obtain the appropriate working solutions, and were stored in darkness at –20 °C until LC–MS/MS analysis.

2.3. Wheat fumonisin extraction

The fumonisin analysis performed was based mainly on the method of Shephard, Sydenham, Thiel, and Gelderblom (1990) as described by Doko, Rapior, Visconti, and Schjoth (1995). Sub-samples of about 100 g were finely ground in a Buehler laboratory mill and thoroughly mixed. Aliquots of the ground subsamples (25 g) were shaken with 50 mL of methanol:water (3:1) for 30 min and filtered through Whatman N° 4 filter paper. While the flow rate was maintained below 2 mL/min, 10 mL of the filtered extract was applied to a Bond-Elut strong anion-exchange (SAX) cartridge (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) fitted to a Supelco solid-phase extraction (SPE) manifold (Supelco, Bellefonte, PA), previously conditioned by the successive passage of methanol (5 mL) and methanol:water (3:1, 5 mL). The cartridge was then washed with methanol:water (3:1, 8 mL) followed by methanol (3 mL), and fumonisins were eluted with 0.5% acetic acid in methanol (14 mL). The elute was evaporated to dryness at 40 °C, under a moderate stream of nitrogen, and stored dry at 4 °C until HPLC LC–MS/MS analysis.

2.4. Fumonisin LC–MS/MS analysis

Fumonisin detection was performed using a Waters 2695 Alliance HPLC (Waters Corporation, Milford, MA, USA) equipped with a Waters Alliance 2685 pump, a Waters Alliance 2695 autosampler, a diode array detector Waters 2996 PDA interfaced to a Quattro Ultima Platinum tandem quadrupole mass spectrometer with electrospray ionization (ESI) source. An XBridge™ C18 column (3.5 µm, 2.1 × 150 mm) with a guard column of the same material (Waters, Milford, MA) was used. An isocratic chromatographic procedure was performed with 5 mM ammonium acetate in

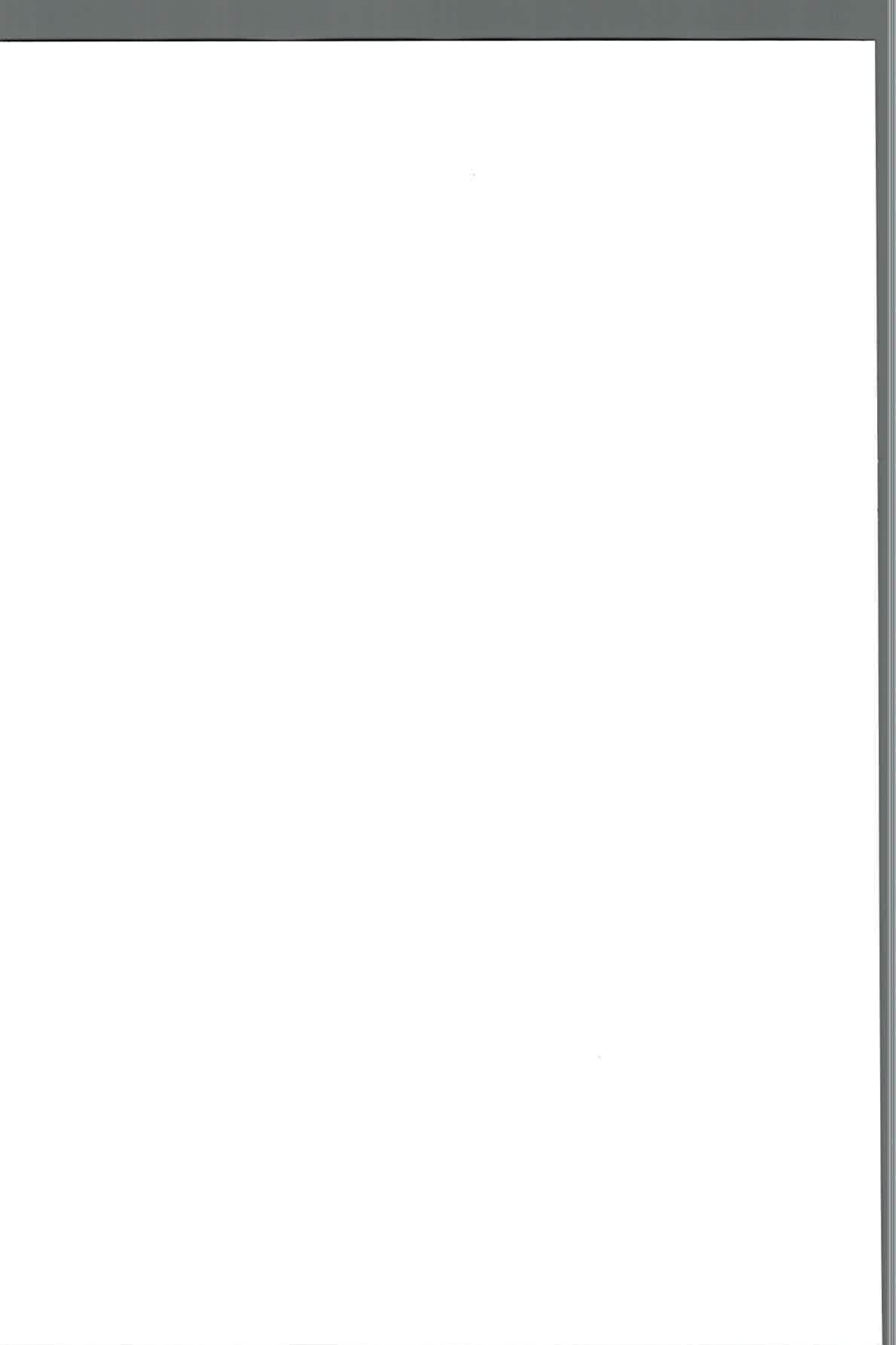


Table 2
Parameters used to investigate fumonisins by LC–MS/MS.

Compound	[M + H] ⁺	t _R /min	Product ions (m/z)	CV (V)	CE (V)
FB ₁	722	5.4	334	91	57
			352		55
FB ₂	706.3	17.6	318.5	96	51
			336.3		59
FB ₃	706.3	9.3	318.5	96	51
			336.3		59

[M + H]⁺, precursor ion; t_R, retention time; Product ions (m/z), daughter ions; CV (V), cone voltage; CE (V), collision energy.

methanol:water:acetic acid (39.5:59.5:1 v/v) as mobile phase. The flow rate was 0.18 mL/min. The column temperature was maintained at 35 °C. The nitrogen flow was adjusted to 109 and 726 L/h for cone and desolvation gases, respectively. Blank matrix extracts were investigated to confirm that no spectrometric interferences came from the matrix. Data acquisition and processing were performed using Mass Lynx V.4.1, Waters INC software. The interface was operated in a positive ion mode. Nebulization and desolvation temperatures were 150 and 200 °C, respectively. The capillary voltage was 3.00 kV. Multiple-reaction monitoring (MRM) was used for toxin determination. The precursor peak [M + H]⁺ and two product peaks, monitored to accomplish both quantification and qualification criteria, as well as the retention times and the detector settings, are collected in Table 2. Trace m/z 722 > 352 was used for the quantification of FB₁, while 706 > 336 was used for both FB₂ and FB₃, respectively. Aliquots of 45 µL of sample extracts were injected into the HPLC unit. Four points of identification were used to identify FB₁, i.e. retention time, the precursor ion [M + H]⁺ and two product ions (m/z 334 and 352). A calibration curve was obtained injecting 10 µL of a different mixed standard solution (FB₁ + FB₂) (0.25, 0.5, 1.0, and 2.0 µg/mL). Good linearity with a correlation coefficient higher than 0.996 was obtained for the calibration range. The calculated instrumental LOD (S/N = 3) for FB₁ and FB₂ was 0.01 ng/g and LOQ (S/N = 5) was 0.05 ng/g, and the relative within-day and between-day standard deviations (% RSD) were 6.5.

A recovery experiment was performed in triplicate by spiking 25 g of ground fumonisin-free wheat samples with FB₁ and FB₂ toxins at levels of 10, 100, and 200 ng/g. Spiked samples were left overnight at room temperature to allow solvent evaporation prior to proceed with the extraction step. Mean recoveries for FB₁ and FB₂ were 98.98% and 94.9%, respectively.

2.5. Deoxynivalenol analysis

Twenty five wheat samples (15 common and 10 durum) were selected among all the samples analyzed for fumonisin content, using different contamination levels as the selection criteria. DON analysis was performed based mainly on the method proposed by AOAC (1995). Subsamples of about 100 g were finely ground in a Buehler laboratory mill and thoroughly mixed. Aliquots of the ground subsamples (25 g) were shaken with 100 mL of acetonitrile:water (84:16) for 30 min and filtered through Whatman N° 4 filter paper. While the flow rate was maintained below 2 mL/min, 3 mL of the filtered extract were transferred to a glass tube and then pushed all through MycoSep®227 Trich+. After that, 4 mL were removed to evaporate to dryness at 40 °C, under a moderate stream of nitrogen, and stored dry at 4 °C until HPLC analysis.

The HPLC system consisted of a Hewlett–Packard 1100 pump (Palo Alto, CA, USA) connected to a Hewlett–Packard 1046A programmable fluorescence detector and a data module Hewlett–Packard Kayak XA (HP ChemStation Rev. A.06.01). Chromatographic separations were performed on a Luna™ C18 reversed phase column (100 × 4.6 mm, 5 µm particle size) connected to a guard

Table 3

Incidence rate and concentration of fumonisin in common and durum wheat grain from Argentina.

	Common wheat		Durum wheat	
	FB ₁	FB ₂	FB ₁	FB ₂
Sample size ^a	131/135	69/135	31/40	17/40
Incidence (%)	97	51	77.5	42.5
Range (ng/g)	0.16–680.44	0.25–23.67	0.15–1304.39	0.43–46.94
Mean ^b (ng/g)	30.07	1.47	65.69	4.45

^a Number of positive samples/Number of total samples.

^b Mean concentration in total samples.

column SecurityGuard™ (4 × 3.0 mm) filled with the same phase. The mobile phase consisted of methanol:water (12:88), at a flow rate of 1.5 mL/min. The detector was set at 220 nm with an attenuation of 0.01 AUFS. Injection volume was 50 µL and the retention time of DON was 800 s. Quantification was relative to external standards of 0.5–4 µg/mL in methanol:water (5:95). The LOQ was 50 ng/g.

A recovery experiment was performed in triplicate by spiking 25 g of ground DON-free wheat samples with DON toxin at levels of 500, 1000, and 1500 ng/g. Spiked samples were left overnight at room temperature to allow solvent evaporation before proceeding with the extraction step. Mean recoveries for DON was 88.5%.

2.6. Statistical analysis

To determine differences among fumonisins content in relation to the wheat type and location, the non-parametric test Kruskal–Wallis one-way analysis of variance was used. Pearson correlation coefficient between fumonisins and DON content was calculated. All the statistical analyses were performed using SigmaStat for Windows version 2.03 (SPSS Inc.). Statistical significance was determined at the level $p < 0.05$.

3. Results and discussion

In this study, natural fumonisin contamination was present in 93% of all the wheat samples (162/175) analyzed. Total fumonisin amounts (FB₁ + FB₂ + FB₃) ranged from 0.15 to 1304.39 ng/g, with a mean level of 42.11 ng/g. A total of 131 out of 135 common and 31 out of 40 durum wheat samples were contaminated with fumonisins. Fumonisin B₁ was present in all positives samples, being the most abundant fumonisin found (high ratio FB₁/FB₂). Most common and durum wheat samples had FB₁ and FB₂ presence, while 36% of common wheat samples only had FB₁, and 13% of common wheat samples had FB₁, FB₂ and FB₃. On the other hand 29% of durum wheat samples contained FB₁, FB₂ and FB₃, whereas 16% contained only FB₁.

Table 3 shows the FB₁ and FB₂ contamination differences between common and durum wheat samples. In all samples of both types of wheat FB₁ incidence percentage and amounts were higher than FB₂. FB₁ mean level was 10 and 8 folds higher than FB₂ mean level in common and durum wheat samples, respectively.

Considering that FB₁ is the most important fumonisin, from toxicity point of view, Table 4 was constructed in order to classify FB₁ amounts in wheat samples into three categories: FB₁ < LOQ; LOQ < FB₁ < 100 ng/g; and FB₁ > 100 ng/g. Fumonisin B₁ levels mostly ranged from LOQ to 100 ng/g in 88.5% of common and 70% durum wheat samples, respectively. Only four common and 9 durum wheat samples showed no detectable fumonisin levels. Nine percent of common wheat samples showed levels higher than 100 ng/g, reaching 680 ng/g; while 7.5% durum wheat samples reached levels higher than 100 ng/g, reaching 1304 ng/g, the highest level found in this study.

Table 4
Distribution of fumonisin B₁ concentration in common and durum wheat grain from Argentina.

Ranges	Common wheat	Durum wheat
FB ₁ < LOQ ^a	3%	22.5%
LOQ < FB ₁ < 100 ng/g	88%	70%
FB ₁ > 100 ng/g	9%	7.5%

^a LOQ = 0.05 ng/g.

There are several reports in the literature about natural fumonisin contamination in common and durum wheat all over the world. Busman et al. (2012) studied 43 wheat samples with kernel black point disease from different geographic regions in the United States and analyzed fumonisin presence by LC–MS. In most of the samples (34) the levels of the three fumonisins (FB₁, FB₂ and FB₃) were below the LOQ (1 ng/g). Four samples had low levels (<10 ng/g) of FB₁, two samples had moderate levels, while three samples had high levels (4500 ng/g). Khosrow, Saeed Tamadoni, Kasa, Saeed, and Baharuddin (2010) have analyzed fumonisin contamination in 82 wheat grain samples collected from different supermarkets in Iran, where the overall results demonstrate that 68.2%, 42.6% and 31.7% of wheat samples showed contamination with FB₁, FB₂ and FB₃, ranging from 15 to 155 ng/g, 12–86 ng/g and 13–64 ng/g, respectively. In Argentina, Palacios et al. (2011) studied 55 freshly harvested durum wheat samples during 2007 and 2008 harvest seasons and found that during 2007 harvest season, 29 out of 30 samples (97%) were positive for fumonisins (B₁ and B₂) by HPLC and LC–MS/MS with levels ranging from 10.5 to 1245.7 ng/g. During the second year (2008) none of the 25 samples analyzed showed fumonisin contamination by HPLC analysis, but further LC–MS/MS analysis demonstrated that 6 samples showed traces of fumonisin contamination. In another survey Castella, Bragulat, and Cabanes (1999) analyzed natural fumonisin occurrence in 17 wheat samples by HPLC analysis and confirmed these results by LC–MS, finding that 8 out of 17 wheat samples showed FB₁ contamination ranging from 200 to 8800 ng/g.

It is remarkable that in the present survey almost all wheat samples were contaminated with fumonisins at levels comparable to those found in the studies described above. The analytical method used in this study, LC–MS/MS, is also important because others techniques have been demonstrated that frequently produce false positive results in wheat (Shephard, van der Westhuizen, Gatyeni, Katerere, & Marasas, 2005).

There are also, other researches about fumonisin contamination in wheat and subproducts, but their results are slightly different from those mentioned in the present study, because the natural incidence percentage and/or the amounts of fumonisin found there are lower. Castoria, Lima, Ferracane, and Ritiene (2005) confirmed, by LC–MS, the presence of natural FB₁ and FB₂ contamination, in 5 out of 8 Farro samples (*Triticum monococcum* L., *Triticum dicoccon* Schrank and *Triticum spelta* L.) in low concentrations, up to 70 ng/g for FB₁, and below the LOQ (12 ng/g) for FB₂. Recently Kushiro, Zheng, Nagata, Nakagawa, and Nagashima (2009) have found natural FB₁ contamination in 1 out of 47 wheat samples collected in various areas of Japan, by LC–MS/MS, at trace level. Also in China Wang et al. (2013) have found that among 20 wheat samples analyzed, only 3 showed FB₁ contamination in levels ranging from 94.4 to 379.93 ng/g where the determination was done by IC-ELISA and the confirmation by LC–MS/MS. There is a report on wheat grains from Tunisia where the authors have found only FB₂ contamination in 2 samples out of 20 analyzed by LC–MS/MS (Serrano, Font, Ruiz, & Ferrer, 2012).

It could be possible a high health risks result from maize simultaneously contaminated with FB₁ and combinations with

Table 5
Co-occurrence of fumonisin and deoxynivalenol in 15 common wheat and 10 durum wheat samples.

Type of wheat	Sample	Total fumonisin (ng/g)	DON (ng/g)
Common	101	nd ^a	1113.1
	82	2.7	627.2
	41	4.7	249.2
	62	5.7	286.5
	22	9.2	387.1
	50	23.0	214.3
	23	24.5	216.1
	113	100.1	757.4
	40	105.7	209.4
	5	209.4	188.3
	100	236.7	150.6
	61	266.3	12468.3
	1	328.6	221.8
	81	661.5	913.9
	49	680.4	865.7
Durum	106-7	nd	194.4
	101-7	nd	15141.3
	104-4	0.41	1731.5
	102-5	0.71	4117.9
	103-4	2.83	1261.9
	101-6	11.8	2871.0
	102-7	96.0	2727.7
	106-8	508.4	nd
	103-3	531.2	1458.1
	104-3	1304.4	336.3

^a not detected, < LOQ.

other fusariotoxins, as reported along with DON, NIV and AFB₁ in Vietnam (Wang et al., 1995), with DON, NIV, ZEN and AFB₁ in Indonesia (Ali, Sardjono, Yamashita, & Yoshizawa, 1998), and with DON, NIV, other trichothecenes and ZEN in Korea (Sohn, Seo, & Lee, 1999). Little work has been done to study the co-occurrence of fumonisins and other mycotoxins in wheat grains all over the world (Mashinini & Dutton, 2006; Stankovic et al., 2012). Our co-occurrence results are summarized in Table 5, it shows that natural DON contamination was present in 24 out of 25 wheat samples and the levels ranged from 50.60 to 28650 ng/g. The average of positive samples was 3211 ng/g. Nine out of 25 wheat samples reached values higher than 1000 ng/g. However there was no correlation between fumonisin and DON contamination ($p > 0.05$). Samples containing high or even no natural fumonisin contamination had important DON levels. These results are comparable to others reported in the literature about natural co-occurrence of fumonisin and DON in bread and other varieties of wheat and wheat-based products. Stankovic et al. (2012) reported natural occurrence of FB₁ and its co-occurrence with DON and other mycotoxins on winter wheat. One hundred and three winter wheat samples were collected after four to six-month storage in family barns from different locations in Serbia and observed that all samples were mycotoxin positive, FB₁ was detected in 82.1% and 92.0% of all samples with ranges of 750–5400 ng/g and 750–4900 ng/g in 2005 and 2007, respectively. Moderate positive correlations were found between FB₁ and DON concentrations (r^2 0.56 in 2005 and r^2 0.54 in 2007). Recently Rodrigues and Naehrer (2012) studied the occurrence of DON, fumonisins and other toxins between January 2009 and December 2011 analyzing a total of 7049 corn, soybean/soybean meal, wheat, dried distillers grains with solubles (DDGS) and finished feed samples from the Americas, Europe and Asia. As a result no fumonisin was found in wheat and wheat bread samples in north America (7 samples) but DON average of positives samples was of 1029 ng/g (19 out of 25 samples). Something similar was found in northern Europe where no fumonisin was found, but they did find similar DON values. Two out of 40 samples had fumonisin in South America (positive average:

407 ng/g), and 9 out of 17 were contaminated with DON (positive average: 947 ng/g), and similar results were found in south and central Europe, north and south-east Asia, and Oceania.

Although there is no legislation for fumonisin levels content in wheat and wheat products, this legislation do exist in maize, where the maximum limits established for maize and sub-products for human consumption is 1000 ng/g in the European Union and from 1000 to 4000 ng/g in USA. It is remarkable that some reports about wheat fumonisin contamination exceeds (even one of the samples analyzed in this study) this limits. More surveys of fumonisin presence in wheat are necessary to establish, in the near future, regulation limits for this cereal devoted mainly to human consumption. Regarding DON legislation, the European Union sets limits of 1250 ng/g for unprocessed cereals, other than durum wheat, oats and maize, and 1750 ng/g for unprocessed durum wheat and oats, while USA and Canada legislation sets 2000 and 1000 ng/g respectively, in wheat and wheat subproducts for human consumption. Analyzing other reports it is noticeable that some wheat samples exceed these limits, although 9 out of 25 wheat samples analyzed in this study exceed 1000 ng/g.

During a non-FHB epidemic year, common and durum wheat can be contaminated not only with DON but also with fumonisins. Although in the present study fungi isolation was not done, the fact that the toxin was found in naturally contaminated samples demonstrates that fumonisins can be synthesized in common and durum wheat.

As a final conclusion wheat fumonisin contamination was found during non-FHB epidemic years and when conditions were appropriate. This is the first report of natural fumonisin occurrence in common wheat grains in Argentina, and its co-occurrence with DON during a non-FHB epidemic year. The co-occurrence is important because it is well known the toxic effect of each toxin separately, but is scarce the information related with the synergic effects of these toxins (Bracarense et al., 2012). Based on our results we consider that it is necessary to conduct further studies in order to determine the levels of fumonisin contamination on wheat sub-products such as flour, semolina and also on wheat manufactured food, such as pizza, noodles, pasta, cookies in order to determine the fumonisin intake in Argentina.

Acknowledgments

This work was supported by the Secretaría de Ciencia y Técnica, Universidad Nacional de Río Cuarto (SecYT-UNRC). Palacios, S.A. and Cendoya E are fellows of CONICET and Ramirez, M.L., Chiacchiera, S., and Torres, A.M, are members of the Research Career of CONICET. We thank Ing. Nicolas Apro for provide common wheat samples from grain storages companies.

References

Ali, N., Sardjono, T., Yamashita, A., & Yoshizawa, T. (1998). Natural co-occurrence of aflatoxins and *Fusarium* mycotoxins (fumonisins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone) in corn from Indonesia. *Food Additives and Contaminants*, 15, 377–384.

Association on Official Analytical Chemist (AOAC). (1995). *Official method of analysis* (16th ed.). Arlington, VA, USA.

Bakker, M. I., Speijers, G. J. A., & Paulsch, W. E. (2003). *Risk assessment of fumonisin B₁ in the Netherlands*. Laboratory for Food and Residue Analysis, National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), P.O. Box 1, 3720 BA Bilthoven, the Netherlands RIVM report 310301001/2003.

Bracarense, A. P., Lucio, J., Grenier, B., Drociunas Pacheco, G., Moll, W. D., Schatzmayr, G., et al. (2012). Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. *Brazilian Journal of Nutrition*, 107, 1776–1786.

Busman, M., Desjardins, A. E., & Proctor, R. H. (2012). Analysis of fumonisin contamination and the presence of *Fusarium* in wheat with kernel black point disease in the United States. *Food Additives and Contaminants*, 29, 1092–1100.

Castella, G., Bragulat, M. R., & Cabanes, F. J. (1999). Surveillance of fumonisins in maize-based feeds and cereals from Spain. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4707–4710.

Castoria, R., Lima, G., Ferracane, R., & Ritieni, A. (2005). Occurrence of mycotoxin in farro samples from southern Italy. *Journal of Food Protection*, 68, 416–420.

Chehri, K., Jahromi, S. T., Reddy, K. R., Abbasi, S., & Salleh, B. (2010). Occurrence of *Fusarium* spp. and fumonisins in stored wheat grains marketed in Iran. *Toxins*, 2, 2816–2823.

Cirillo, T., Ritieni, A., Galvano, F., & Amodio Cocchieri, R. (2003). Natural co-occurrence of deoxynivalenol and fumonisins B₁ and B₂ in Italian marketed foodstuffs. *Food Additives and Contaminants*, 20, 566–571.

Dalcerio, A., Torres, A., Etcheverry, M., Chulze, S., & Varsavsky, E. (1997). Occurrence of deoxynivalenol and *Fusarium graminearum* in Argentinian wheat. *Food Additive and Contaminants*, 14, 11–14.

Doko, M. B., Rapiori, S., Visconti, A., & Schjotz, J. E. (1995). Incidence and levels of fumonisin contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 43, 429–434.

Food Balance Sheet. (2007). Available at <http://www.faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=346&SelTab=4> Accessed 04.04.13.

González, H. H. L., Pacin, A., Resnik, S. L., & Martínez, E. (1997). Deoxynivalenol and contaminant mycoflora in freshly harvested Argentinian wheat in 1993. *Mycopathologia*, 135, 129–134.

Haschek, W. M., Motelin, G., Ness, D. K., Harlin, K. S., Hall, W. F., Vesonder, R. F., et al. (1992). Characterization of fumonisin toxicity in orally and intravenously dosed swine. *Mycopathologia*, 117, 83–96.

IARC. (2002). Fumonisin B₁. In IARC (Ed.), *IARC (international agency for research on cancer) monograph on the evaluation of carcinogenic risk to human, some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene* (Vol. 82; pp. 301–366). Geneva.

Jakšić, S., Abramović, B., Jajić, I., Baloš, M. Z., Mihaljev, Ž., Despotović, V., et al. (2012). Co-occurrence of fumonisins and deoxynivalenol in wheat and maize harvested in Serbia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 89, 615–619.

Khosrow, C., Saeed Tamadoni, J., Kasa, R. N. R., Saeed, A., & Baharuddin, S. (2010). Occurrence of *Fusarium* spp. and fumonisins in stored wheat grains marketed in Iran. *Toxins*, 2, 2816–2823.

Kushiro, M., Zheng, Y., Nagata, R., Nakagawa, H., & Nagashima, H. (2009). Limited surveillance of fumonisins in brown rice and wheat harvested in Japan. *Journal of Food Protection*, 72, 1327–1331.

Lori, G., Sisterna, M., Haidukowsky, M., & Rizzo, I. (2003). *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol contamination in the durum wheat area of Argentina. *Microbiological Research*, 158, 1–7.

Marasas, W. F. (2001). Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. *Environmental Health Perspective*, 2, 239–243.

Marasas, W. F., Kellerman, T. S., Gelderblom, W. C., Coetzer, J. A., Thiel, P. G., & Van der Lugt, J. J. (1988). Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 55, 197–203.

Mashimiri, K., & Dutton, M. F. (2006). The incidence of fungi and mycotoxins in South Africa wheat and wheat-based products. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 41, 285–296.

Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Republica Argentina. (2013). Available at <http://www.minagri.gob.ar> Accessed 04.04.13.

Missmer, S. A., Suarez, L., Felkner, M., Wang, E., Merrill, A. H., Rothman, K. J., et al. (2006). Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas–Mexico border. *Environmental Health Perspective*, 114, 237–241.

Pacin, A., Ciancio Bovier, E., Canoa, G., Taglieri, D., & Hernandez Pezzani, C. (2012). Effect of the bread making process on wheat flour contaminated by deoxynivalenol and exposure estimate. *Food Control*, 21, 492–495.

Palacios, S. A., Ramirez, M. L., Cabrera Zalazar, M., Farnochi, M. C., Zappacosta, D., Chiacchiera, S. M., et al. (2011). Occurrence of *Fusarium* spp. and fumonisin in durum wheat grains. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 59, 12264–12269.

Ramirez, M. L., Oviedo, M. S., Farnochi, M. C., & Chulze, S. N. (2006). Mycological and mycotoxin survey on wheat during a non epidemic FHB year in Argentina. In *Proceeding of 9th European Fusarium Seminar*. September 12–22. (pp. 34). Wageningen, The Netherlands.

Ramirez, M. L., Reynoso, M. M., Farnochi, M. C., & Chulze, S. (2006). Vegetative compatibility and mycotoxin chemotypes among *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) isolates from wheat in Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, 115, 139–148.

Ramirez, M. L., Reynoso, M. M., Farnochi, M. C., Torres, A., Leslie, J., & Chulze, S. (2007). Population genetic structure of *Gibberella zeae* isolated from wheat in Argentina. *Food Additive and Contaminants*, 24, 1115–1120.

Rodrigues, I., & Naehrer, K. (2012). A three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feedstuffs and feed. *Toxins*, 4, 663–675.

Roscoe, V., Lombaert, G. A., Huzel, V., Neumann, G., Melietio, J., Kitchen, D., et al. (2008). Mycotoxins in breakfast cereals from the Canadian retail market: a 3-year survey. *Food Additives and Contaminants*, 25, 347–355.

Scott, P. M. (2012). Recent research on fumonisins: a review. *Food Additives and Contaminants*, 29, 242–248.

Serrano, A. B., Font, G., Ruiz, M. J., & Ferrer, E. (2012). Co-occurrence and risk assessment of mycotoxins in food and diet from Mediterranean area. *Food Chemistry*, 135, 423–429.

Shephard, G. S., Sydenham, E. W., Thiel, P. G., & Gelderblom, W. C. A. (1990). Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography*, 13, 2077–2080.

- Shephard, G. S., van der Westhuizen, L., Gatyeni, P. M., Katerere, D. R., & Marasas, W. F. (2005). Do fumonisin mycotoxins occur in wheat? *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9293–9296.
- Sohn, H. B., Seo, J. A., & Lee, Y. W. (1999). Co-occurrence of *Fusarium* mycotoxins in mouldy and healthy corn from Korea. *Food Additives and Contaminants*, 16, 153–158.
- Stankovic, S., Levic, J., Ivanovic, D., Krijaja, V., Stankovic, G., & Tanci, S. (2012). Fumonisin B₁ and its co-occurrence with other fusariotoxins in naturally-contaminated wheat grain. *Food Control*, 23, 384–388.
- Wan Norhasima, W. M., Abdulmir, A. S., Abu Bakar, F., Son, R., & Norhafniza, A. (2009). The health and toxic adverse effects of *Fusarium* fungal mycotoxin, fumonisins, on human population. *American Journal of Infectious Diseases*, 4, 273–281.
- Wang, D. S., Liang, Y. X., Chau, N. T., Dien, L. D., Tanaka, T., & Ueno, Y. (1995). Natural co-occurrence of *Fusarium* toxins and aflatoxin B₁ in corn for feed in North Vietnam. *Natural Toxins*, 3, 445–449.
- Wang, Y.-K., Shi, Y.-B., Zou, Q., Sun, J.-H., Chen, Z.-F., Wang, H., et al. (2013). Development of a rapid and simultaneous immunochromatographic assay for the determination of zearalenone and fumonisin B₁ in corn, wheat and feed-stuff samples. *Food Control*, 31, 180–188.



CrossMark

Two-dimensional environmental profiles of growth and fumonisin production by *Fusarium proliferatum* on a wheat-based substrate

Eugenia Cendoya, María Cecilia Farnochi, Sofia Noemi Chulze, María Laura Ramirez *

Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas Fco-Qcas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta 36 Km 601, 5800 Río Cuarto, Córdoba, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:
Received 22 January 2014
Received in revised form 17 April 2014
Accepted 28 April 2014
Available online 6 May 2014

Keywords:
Wheat
Fumonisin
Fusarium proliferatum
Water activity
Ecology

ABSTRACT

The effect of water activity (a_w ; 0.995, 0.99, 0.98, 0.96, 0.94, 0.92, and 0.90), temperature (15, 25, and 30 °C), incubation time (7, 14, 21 and 28 days), and their interactions on mycelial growth and fumonisin production on wheat-based medium by three *Fusarium proliferatum* strains isolated from wheat in Argentina was evaluated. Maximum growth rates were obtained at the highest a_w (0.995) and 30 °C, with growth decreasing as the a_w of the medium was reduced. Maximum amounts of total fumonisins (FB₁, FB₂ and FB₃) were produced at 0.99 a_w and 25 °C after 21 and 28 days of incubation for 2 strains, and at 15 °C and 0.98 a_w after 28 days of incubation for the third strain. The fumonisin concentrations varied considerably depending on the a_w and temperature interactions assayed. The studied strains had different fumonisin production profiles. *F. proliferatum* ITEM 15661 and ITEM 15664 produced FB₁ and FB₂ whereas *F. proliferatum* ITEM 15654 was able to produce FB₁, FB₂ and FB₃. Interestingly, fumonisin production profiles for each particular strain were related to incubation temperatures. Fumonisin were produced from 15 to 30 °C and at a_w values of 0.92 to 0.995 after 21 to 28 days of incubation. However at 7 and 14 days of incubation small amounts of fumonisin were produced at a_w lower than 0.94. Two-dimensional profiles of a_w by temperature interactions were developed from these data to identify areas where conditions indicate a significant risk from fumonisin accumulation on wheat. Temperature and a_w conditions that resulted in fumonisin production are those found during wheat grain development (especially milk and dough stages) in the field. This study provides useful base line data on conditions representing a high and a low risk for contamination of wheat by fumonisins which is becoming of greater concern because this cereal is destined mainly for human consumption.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Wheat is the most important cereal consumed by the Argentinean population. In this country human consumption of wheat manufactured products, either semolina (*Triticum turgidum* L. var. durum) or bread (*Triticum aestivum*), is much greater than for products made from other cereals (Food Balance Sheet, 2007; Pacin et al., 2012). In Argentina durum wheat is mainly used for pasta manufacture, with production reaching 604,651 tons in 2011. Pasta production reached almost 183,000 tons in 2011, and the consumption per capita was estimated at 7.9 kg/year. Common wheat production was of 15,271,000 tons in 2012 (MAGyP, 2014). It is used mostly for manufacture of bread, breakfast cereals, cookies and cupcakes. It is remarkable that wheat flour consumption in Argentina was estimated at 7.4 kg/person/month.

Fusarium species can produce a range of mycotoxins which endanger the health of both humans and animals (Sumalan et al., 2013).

The main pathogen associated with *Fusarium* head blight (FHB) in common and durum wheat in Argentina is *Fusarium graminearum* sensu stricto (Lori et al., 2003; Ramirez et al., 2006b, 2007). Deoxynivalenol (DON) contamination has been reported in both wheat types (Dalcero et al., 1997; González et al., 1997; Lori et al., 2003). However Ramirez et al. (2006a) and Palacios et al. (2011) carried out two mycological surveys during non-FHB epidemic years in common wheat and durum wheat, and found that the predominant *Fusarium* species was *Fusarium proliferatum*. Natural fumonisin contamination (mainly fumonisin B₁) was reported for the first time on durum (Palacios et al., 2011) and common wheat (Cendoya et al., 2014) in Argentina during FHB non-epidemic years. The high frequency of fumonisin contamination found (more than 90%) in both kinds of wheat and also the fact that some samples evaluated in both studies exceeded the limits established for maize and sub-products for human consumption, which is 1000 ng/g in the European Union, are important to note. The occurrence of fumonisin on wheat is of concern, since the consumption of fumonisin-contaminated maize has been epidemiologically associated with esophageal cancer (Marasas, 2001) and neural tube defects in some human populations (Missmer et al., 2006). Consequently, the International

* Corresponding author. Tel.: +54 358 4676429; fax: +54 358 4676231.
E-mail address: mramirez@exa.unrc.edu.ar (M.L. Ramirez).

Agency for Research on Cancer (IARC) designated FB₁ in Group 2B as “a possible carcinogenic to humans” (IARC, 2002).

Due to the importance of wheat in the Argentinean diet, and because it has been proposed, in a study in the Netherlands, that fumonisin intake occurs mainly via the intake of wheat and wheat-products (Bakker et al., 2003), it is relevant to understand the ecology of this species on wheat.

It is well known that fungal growth and mycotoxin production result from the complex interaction of several factors and, therefore, an understanding of each factor involved is essential to understand the overall process and to predict and prevent mycotoxin development (Chamley et al., 1994). Temperature and water activity (a_w) are the primary environmental factors that influence growth and mycotoxin production by fungi, including *Fusarium* species (Marin et al., 2004). While information is available on the relationship between these factors and profiles for growth and DON production by *F. graminearum* on wheat (Ramirez et al., 2006b), there is no practical information for *F. proliferatum* on this substrate.

The aim of this work was to determine the impact of a_w , temperature, and incubation time on growth and fumonisin production on wheat extract agar by three strains of *F. proliferatum* isolated from wheat in Argentina.

2. Material and methods

2.1. Fungal strains

Three *F. proliferatum* strains ITEM 15654, ITEM 15661 and ITEM 15664 (ITEM: Agri-Food Toxicogenic Fungi Culture Collection of the Institute of Sciences of Food Production, CNR, Bari, Italy; <http://www.ispa.nr.it/Collection>) previously isolated from wheat grains in Argentina during 2007–2008 harvest season were used. These isolates have been characterized by molecular, biological and morphological criteria (Nelson et al., 1983; Leslie and Summerell, 2006). For the molecular characterization, sequences of elongation factor (*EF-1 α*), *calmodulin*, and *FUM 8* genes indicated that these isolates belong to the *Gibberella fujikuroi* species complex and were characterized as *F. proliferatum*. In order to determinate their *G. fujikuroi* mating population (MP) crossing experiments were performed (Klittich and Leslie, 1998) with standard testers as female parents and the uncharacterized field isolates as male parents. All these strains belong to *G. fujikuroi* mating population D and their mating types are MATD-1. Also, all isolates produce fumonisins (Palacios et al., 2011). Cultures were maintained in 15% glycerol at $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

2.2. Medium

Wheat, free of fumonisin contamination, was finely milled by using a Romer mill (Romer Labs Inc., Union, MO, USA). Mixtures of 2% (w/v) of milled wheat in water were prepared and 2% (w/v) agar (technical agar N° 2, Oxoid) added. The a_w of the basic medium was adjusted to 0.995, 0.99, 0.98, 0.96, 0.94, 0.92, and 0.90 by addition of different amounts of glycerol (Dallyn and Fox, 1980). The media were autoclaved at $120\text{ }^\circ\text{C}$ for 20 min. Flasks of molten media were thoroughly shaken, prior to pouring into 9 cm sterile Petri dishes. The water activity of representative samples (2 of each treatment) of media was checked with an Aqualab Series 3 (Decagon Devices, Inc., WA, USA). Additional, uninoculated control plates were prepared and measured at the end of the experiment in order to detect any significant deviation of the a_w .

2.3. Inoculation, incubation, and growth assessment

Petri plates were inoculated with a 4-mm-diameter agar disk that was taken from the margin of a 7-day-old colony of each isolate grown on synthetic nutrient agar (Gerlach, and Nirenberg, 1982) at $25\text{ }^\circ\text{C}$ and transferred face down to the center of each plate. Inoculated

plates of the same a_w were sealed in polyethylene bags and incubated at 15, 25, and $30\text{ }^\circ\text{C}$ for 28 days. A full factorial design was used where the factors were a_w , temperature and strain, and the response was growth (total number of plates: 7 a_w \times 3 temperatures \times 3 strains \times 3 replicates).

Assessment of growth was made every day during the incubation period, and two diameters of the growing colonies were measured at right angles to each other until the colony reached the edge of the plate. Colonies radii were plotted against time, and linear regression was applied in order to obtain the growth rate (mm/day) as the slope of the line. After the incubation period, uninoculated controls and treatments were frozen for later extraction and fumonisin determination.

2.4. Determination of fumonisins

For fumonisin extraction Petri plates of each strain at different incubation periods (7, 14, 21 and 28 days) and for every a_w and temperature condition were used. Toxins were extracted with acetonitrile: water (1 : 1 v/v) by shaking the whole culture media ($\sim 20\text{ g}$) and mycelia with the solvent for 30 min on an orbital shaker (150 rpm) and then filtering the extracts through filter paper (No. 4; Whatman International Ltd., Maidstone, Kent, UK). An aliquot of the extracts (1000 μL) was taken and diluted with acetonitrile: water (1 : 1 v/v) as necessary for high performance liquid chromatography (HPLC) analysis. An aliquot (50 μL) of this solution was derivatized with 200 μL of an o-phthalaldehyde (OPA) solution obtained by adding 5 mL of 0.1 M sodium tetraborate and 50 μL of 2-mercaptoethanol to 1 mL of methanol containing 40 mg of OPA (Shephard et al., 1990). The fumonisin OPA derivatives (50 μL solution) were analyzed by using reversed-phase HPLC/fluorescence detection system. The HPLC system consisted of a Hewlett-Packard 1100 pump (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) connected to a Hewlett-Packard 1046A programmable fluorescence detector and a data module Hewlett-Packard Kayak XA (HP ChemStation Rev. A.06.01). Chromatographic separations were performed on a stainless steel, C₁₈ reversed-phase column (150 \times 4.6 mm i.d., 5 μm particle size; Luna-Phenomenex, Torrance, CA, USA) connected to Security Guard cartridge (4 \times 3 mm i.d., 5 μm particle size; Phenomenex, Torrance, CA, USA) filled with the same phase. Methanol:0.1 M sodium dihydrogen phosphate (75:25, v/v) solution adjusted to pH 3.35 with orthophosphoric acid was used as the mobile phase, at a flow rate of 1.5 mL/min. Fluorescence of the fumonisin OPA derivatives was recorded at excitation and emission wavelengths of 335 and 440 nm, respectively. Fumonisin were measured as peak heights and compared with reference standard solutions of fumonisins B₁, B₂ and B₃ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). A mixed acetonitrile:water (1:1, v/v) stock solution of FB₁, FB₂ and FB₃ containing 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each toxin was prepared. Four mixed working calibrant solutions (0.25, 0.5, 1.0, and 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were prepared by diluting an aliquot of the stock solution with the appropriate volume of acetonitrile:water (1:1, v/v). The retention time of FB₁, FB₃ and FB₂ was 7.5, 16.7 and 18.5 min, respectively. Appropriate dilutions of standards and/or sample extracts were made with acetonitrile:water (1:1). The detection limit of the analytical method for the three fumonisins was 1 $\mu\text{g}/\text{g}$ based on the signal-to-noise ratio 3:1. Recovery experiment was performed on 2% milled maize agar spiked at levels of 1 to 10 $\mu\text{g}/\text{g}$ of each fumonisin (FB₁, FB₂ and FB₃). Mean recovery ranged from 95 to 98% and 94% for FB₁, FB₂ and FB₃, respectively.

2.5. Statistical analysis

The growth rates and mycotoxin concentration were evaluated by analysis of variance (ANOVA) to determine the effect of a_w , temperature and *F. proliferatum* strains and two- and three-way interactions. When the analysis was statistically significant, the post hoc Tukey's multiple comparison procedure was used for separation of the means. Statistical significance was judged at the level $P \leq 0.01$. Statistical analysis was done using SigmaStat for Windows Version 2.03 (SPSS Inc.).

Surface response and contour map graph were produced using Sigma Plot v.10.0 (Systat Software Inc., Hounslow, London, UK),

3. Results

3.1. Effect of a_w and temperature on growth

Fig. 1 gives a diagrammatic representation of the interaction of a_w and temperature on growth rate of all *F. proliferatum* strains studied on the wheat-based media. Optimal a_w levels for growth rate ranged from 0.995 to 0.96 at 25–30 °C, with maximum growth at the highest a_w (0.995) and at 30 °C. We defined as optimal those growth rates that were above 50% of the maximum growth rates obtained. Growth of all strains decreased as water availability of the media was reduced. The three strains were able to grow at the lowest a_w tested (0.90) at 25 and 30 °C, but no growth was observed at that a_w level at 15 °C. Two of the *F. proliferatum* strains tested (ITEM 15654 and ITEM 15661) showed similar behavior at all a_w and temperature conditions evaluated. However *F. proliferatum* ITEM 15664 showed differences at 25 °C where growth rate was higher at 0.99 than at 0.995 a_w (Fig. 1). The conditions under which equivalent growth rates occurred under different environmental conditions were joined to produce contour lines to map the relative optimum and marginal conditions for growth of the *F. proliferatum* strains examined (Fig. 2).

The ANOVA of the effect of single variables (isolate, a_w , and temperature) and two- and three-way interactions revealed that all variables alone and all interactions had a significant effect on growth rates (Table 1).

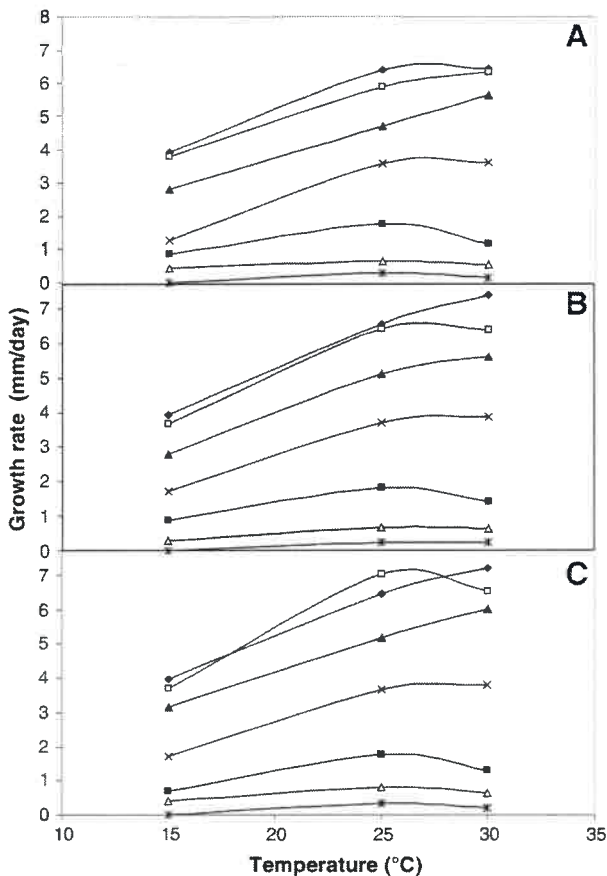


Fig. 1. Effect of water activity, 0.90 (x), 0.92 (Δ), 0.94 (■), 0.96 (X), 0.98 (▲), 0.99 (□), 0.995 (◆) and temperature on growth rate of three *Fusarium proliferatum* strains on wheat-based media (A: ITEM 15654; B: ITEM 15661 and C: ITEM 15664).

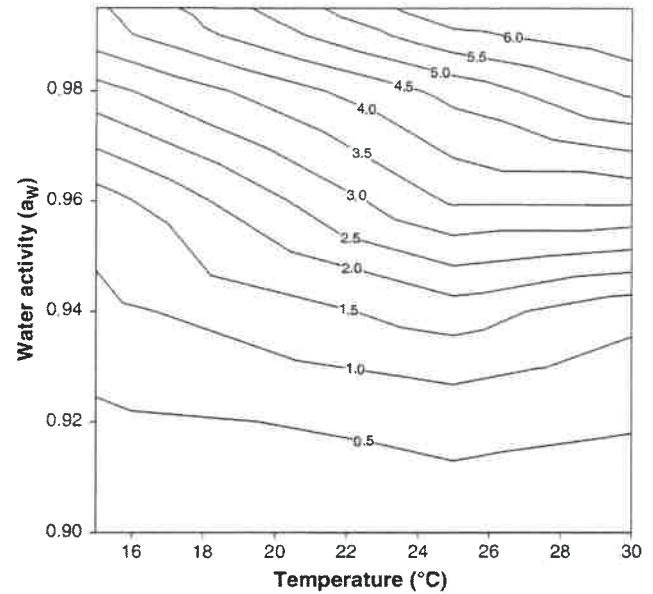


Fig. 2. Two-dimensional contour map of growth profile of *Fusarium proliferatum* in relation to temperature and water activity. The numbers on the isopleths refer to similar growth rates (mm/day).

3.2. Effect of a_w , temperature and incubation time on fumonisin production

The surface response curves of fumonisin B₁, B₂, B₃ and total fumonisin production at 15, 25, and 30 °C over 28 days of incubation are shown in Figs. 3, 4 and 5. All the abiotic factors under study (a_w , temperature and incubation time) influence fumonisin production by the three *F. proliferatum* strains in wheat based medium. No significant production of either toxin was observed at $a_w \leq 0.92$ for all strains at all temperatures assayed during the incubation period. The maximum amounts of total fumonisins (FB₁ + FB₂ + FB₃) were obtained at 25 °C and 0.99 a_w after 21 and 28 days of incubation for *F. proliferatum* ITEM 15664 and ITEM 15661, respectively, while for *F. proliferatum* ITEM 15654 maximum amounts of total fumonisins were obtained at 15 °C and 0.98 a_w after 28 days of incubation. In general, toxin levels produced by *F. proliferatum* ITEM 15664 were higher than those produced by the other strains under almost all temperatures tested.

Two different responses to temperature were observed among all evaluated strains. Total fumonisin production was higher at 25 °C, decreasing in the following order: 15 and 30 °C for *F. proliferatum* ITEM 15661 and ITEM 15664, respectively (Figs. 3 and 4). For *F. proliferatum* ITEM 15654 total fumonisin production was higher at

Table 1

Analysis of variance on the effects of water activity (a_w), temperature (T), and different strains (S) and their interactions on growth of *Fusarium proliferatum* on wheat-based media.

Source of variation	dF ^a	MS ^b	F ^c
a_w	5	130.57	22954.31*
T	2	61.539	10818.499*
S	2	0.921	161.884*
$a_w \times T$	10	3.932	691.196*
$a_w \times S$	10	0.105	18.372*
T \times S	4	0.0942	16.566*
$a_w \times T \times S$	20	0.111	19.535*

* $P < 0.001$.

^a Degrees of freedom.

^b Mean square.

^c Snedecor-F.

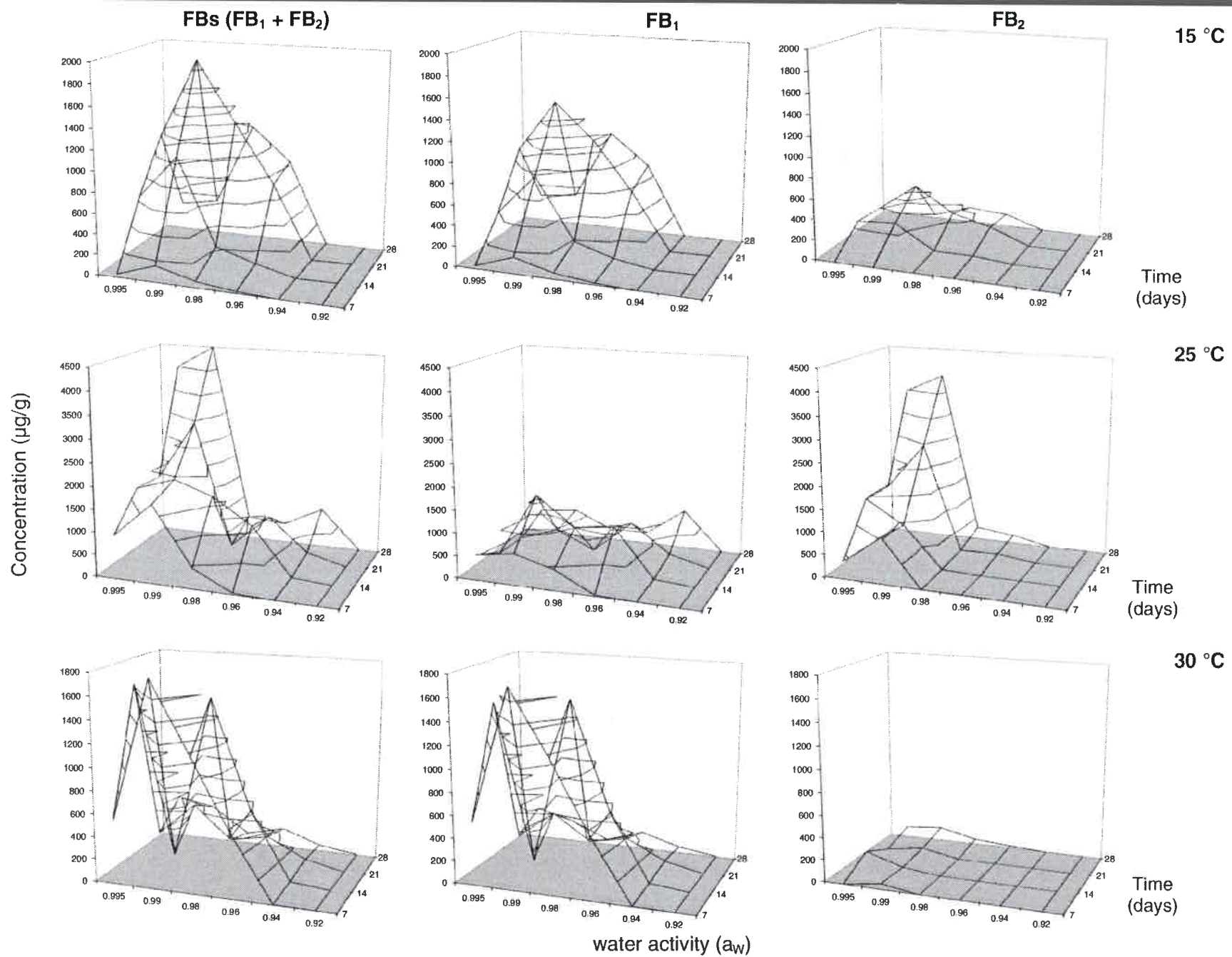


Fig. 3. Fumonisin concentrations ($\mu\text{g/g}$) produced by *Fusarium proliferatum* ITEM 15661 inoculated onto 2% wheat-base media adjusted to different a_w levels and incubated at 15, 25 and 30 °C for 28 days.

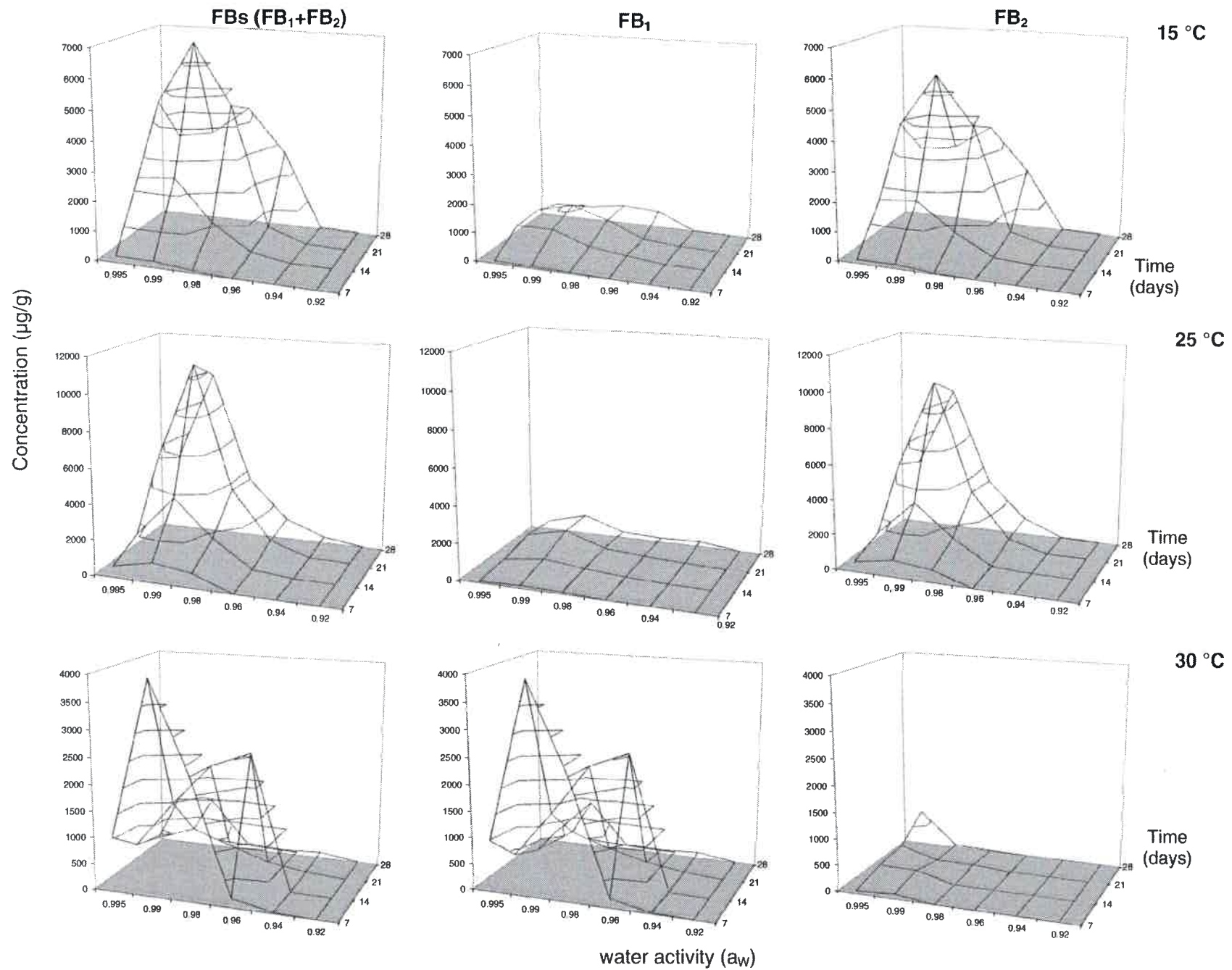


Fig. 4. Fumonisin concentrations (µg/g) produced by *Fusarium proliferatum* ITEM 15664 inoculated onto 2% wheat-base media adjusted to different a_w levels and incubated at 15, 25 and 30 °C for 28 days.

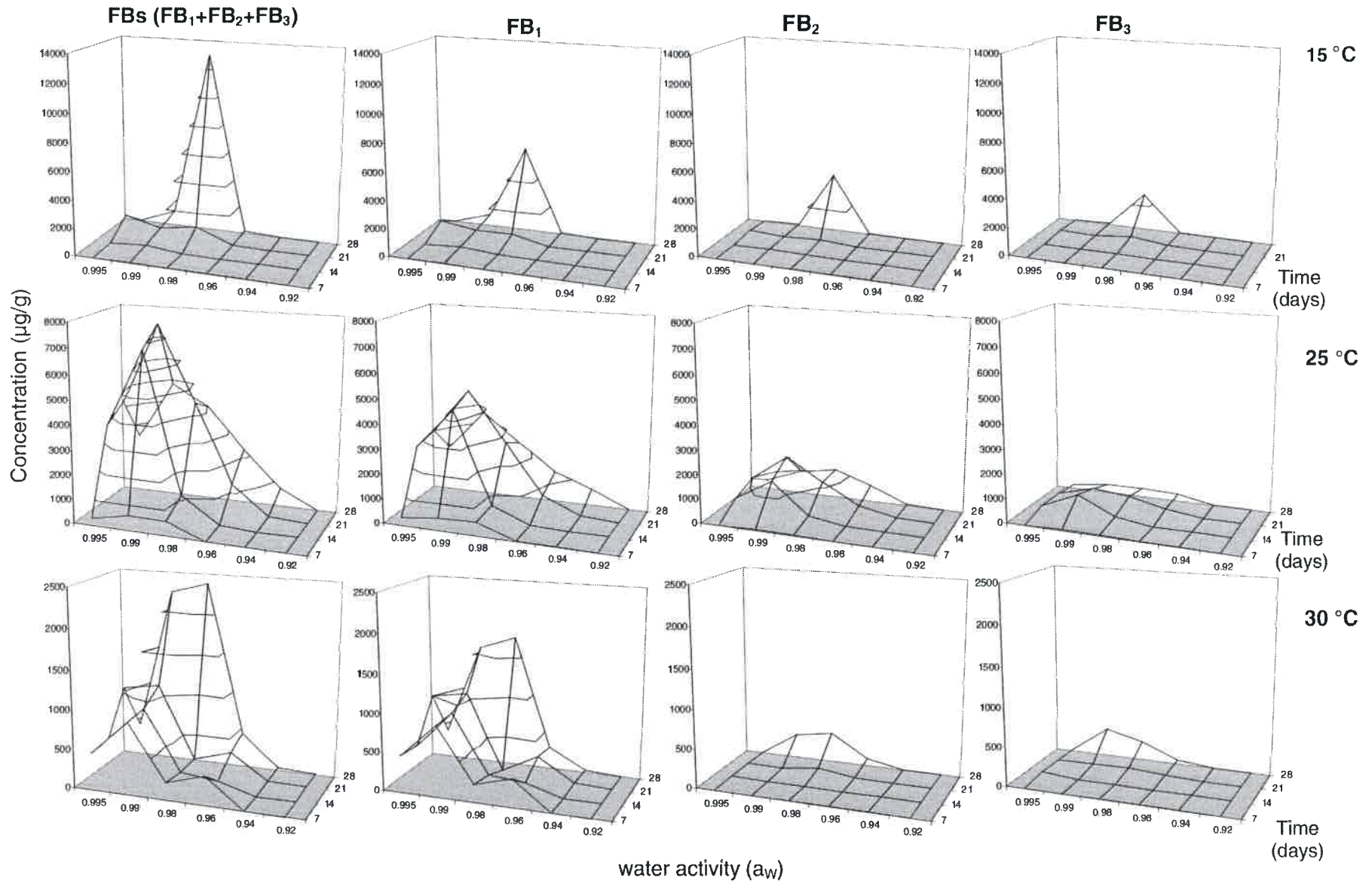


Fig. 5. Fumonisin concentrations (µg/g) produced by *Fusarium proliferatum* ITEM 15654 inoculated onto 2% wheat-base media adjusted to different a_w levels and incubated at 15, 25 and 30 °C for 28 days.

15 °C, decreasing in the following order: 25 and 30 °C, respectively (Fig. 5).

Studied strains had different fumonisin production profiles. *F. proliferatum* ITEM 15661 and ITEM 15664 produced FB₁ and FB₂ (Figs. 3 and 4), but *F. proliferatum* ITEM 15654 was able to produce FB₁, FB₂ and FB₃ (Fig. 5). It is notable that fumonisin production profiles for each particular strain were related to incubation temperatures (Figs. 3, 4 and 5). As an example, for *F. proliferatum* ITEM 15664 most of the fumonisin produced at 25 and 15 °C, around 90%, was FB₂, but at 30 °C the situation was reversed, with FB₁ representing almost the 90% of the total amount of fumonisin produced (Fig. 4).

All single variables (a_w , temperature, and days of incubation) and the two- and three-way interactions significantly influenced total fumonisin production for the three strains (Table 2). Data obtained were used to develop contour maps to identify the optimum conditions of a_w and temperature and the range of conditions for production of different quantities of fumonisins (Fig. 6).

4. Discussion

This study compared for the first time the impact of both a_w and temperature on growth and fumonisin production on wheat-based medium by three strains of *F. proliferatum* isolated from wheat in Argentina during a non-FHB epidemic year. Both variables affected growth, and the pattern obtained was independent of the strains evaluated. Optimal a_w levels for growth ranged from 0.995 to 0.96 at 25–30 °C. No growth was observed at 15 °C at 0.90 a_w , but all strains were able to grow slowly at that a_w level assayed at 25, and 30 °C. Previous studies of the water and temperature requirements for *F. proliferatum* growth reported that this fungus has a minimum of 0.90 a_w , and the temperatures at which growth was possible ranged from 4 to 37 °C in maize extract agar, with optimal growth at the highest a_w tested (0.994) (Marín et al., 2004). Magan and Lacey (1984) found that some *Fusarium* species were able to grow on wheat extract agar at 0.89 to 0.90 a_w and the optimum a_w was 0.995 regardless of temperature, but *F. proliferatum* was not included in that study. Later, Marín et al. (1999) analyzed responses of different *Fusarium* species to a_w and temperature, and found that growth rates of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* strains were up to 7 mm/day, and that the trend was very similar for the three different cereal extracts assayed: growth at 5 to 10 °C was slightly faster on wheat extract agar, faster at 25 to 30 °C on barley extract agar, and faster at 37 °C on maize extract agar. These results are similar to those presented above, even though the strains used in the studies cited before were isolated from maize grains.

As *Fusarium* species may be present on a substrate for long periods during which a_w may change, it is important to know both the optimal a_w range for growth and that permitting sub-optimal growth. Under field conditions, temperature fluctuations, changes in relative humidity, and rainfall all influence colonization of developing grain by *F. proliferatum*.

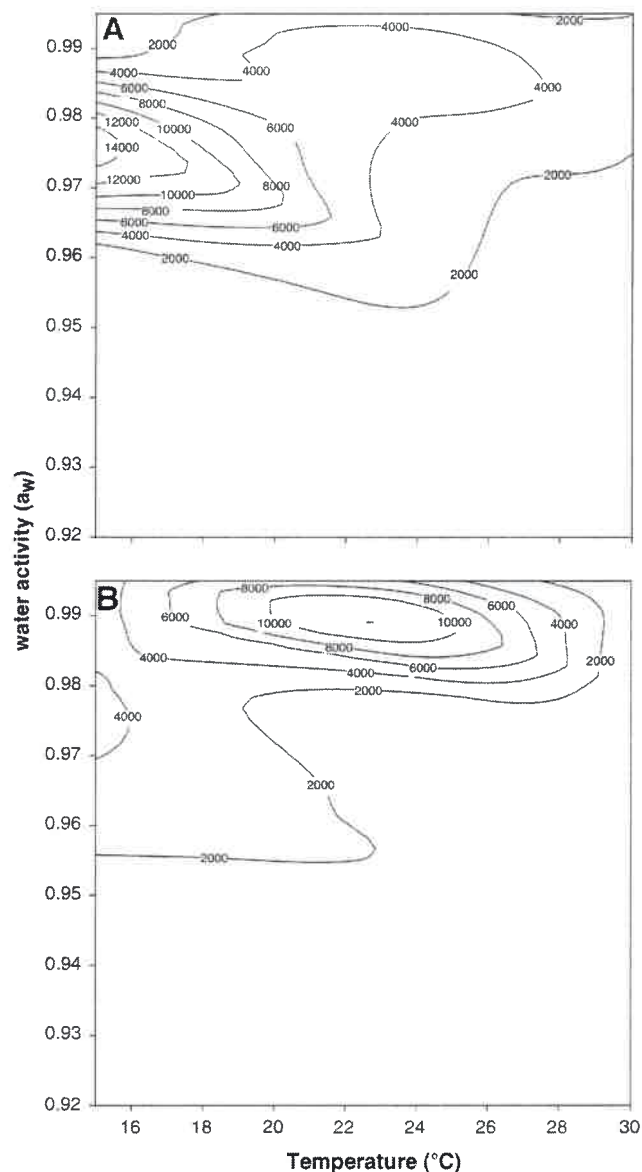


Fig. 6. Two-dimensional contour maps of fumonisin production profiles of *Fusarium proliferatum* (A: ITEM 15654 and B: ITEM 15664) in relation to temperature and water activity. The numbers on the isopleths refer to similar toxin concentrations ($\mu\text{g/g}$).

In the present study, maximum amounts of total fumonisins were produced at 25 °C and 0.99 a_w after 21 and 28 days of incubation for two of the strains, while for the third, maximum values were at 15 °C

Table 2

Analysis of variance on the effects of water activity (a_w), temperature (T), and incubation time (d) on fumonisin production by three *Fusarium proliferatum* strains on wheat-based media.

Source of variation	ITEM 15661			<i>Fusarium proliferatum</i> ITEM 15664			ITEM 15654		
	df ^a	MS ^b	F ^c	df	MS	F	df	MS	F
T	2	64.277	76.120*	2	6.567	15.642*	2	129.349	159.434*
a_w	4	124.081	146.941*	4	132.353	315.263*	4	215.319	265.4*
d	3	18.679	22.120*	3	57.742	137.540*	3	133.686	164.780*
T × a_w	8	10.936	12.951*	8	4.476	10.661*	8	8.000	9.861*
T × d	6	10.914	12.925*	6	29.130	69.388*	6	17.296	21.319*
a_w × d	12	4.213	4.989*	12	6.909	16.456*	12	11.375	14.021*
T × a_w × d	24	3.709	4.392*	24	1.730	4.120*	24	5.215	6.428*

* $P < 0.001$.

^a Degrees of freedom.

^b Mean square.

^c Snedecor-F.

and 0.98 a_w after 28 days of incubation. The limiting a_w for detectable mycotoxin production by *F. proliferatum* was slightly narrower than that for growth. Our results agree with those of Marín et al. (1999) who found that the range of temperatures over which FB_1 may be produced on maize grains is narrower than that under which the fumonisin-producing species (*F. verticillioides* and *F. proliferatum*) are able to germinate and grow.

Different fumonisin (FB_1 , FB_2 and FB_3) production profiles were found between the analyzed strains, and those profiles for each particular strain were related to temperature. Medina et al. (2013) studied the relationship between the expression of nine biosynthetic *FUM* cluster genes and growth and FB_1 and FB_2 production in a *F. verticillioides* strain and concluded that temperature and a_w have a profound effect on both gene expression of key biosynthetic genes as well as significantly affecting growth and the phenotypic production of the toxic secondary metabolites. Also in this study optimal temperature for FB_1 and FB_2 production was not the same. The results indicate that the production of different types of fumonisin by *F. proliferatum* is favored by different temperatures. Also it has been established that this species seems better adapted to low temperatures and may produce greater amounts of FB_1 than *F. verticillioides* at these temperatures (Ryu et al., 1999). This is important as wheat is a winter crop and the optimal temperature for cultivation of this cereal ranged between 10 and 24 °C. It is well known that unlike *F. verticillioides*, *F. proliferatum* colonizes a wide range of host plants other than maize, such as wheat and barley among others, with no host preference. A phylogenetic study of a large number of *F. proliferatum* strains from different hosts has revealed a high genetic variability and has also shown that the ability to produce fumonisins was widely distributed indicating that this species can represent a risk for health similar to *F. verticillioides* (Jurado et al., 2010).

Extensive work has been carried out previously on the combined effect of a_w and temperature on fumonisin (mainly FB_1) production on maize-based media and maize grains (Marín et al., 2004). However the work described here provides the first detailed study on fumonisin production as affected by a_w and temperature on wheat-based media. There is one comparable study done by Marín et al. (1999). In this study the authors showed the effect of different substrates (maize, wheat and barley) and a_w levels (0.93, 0.95 and 0.98) on growth and FB_1 production at 25 °C by *F. verticillioides* and *F. proliferatum*. They demonstrated that although fumonisin producers can colonize barley and wheat more rapidly than maize they were unable to produce FB_1 in these cereals. However, there are several points to take into account: firstly the experiment was carried out only at 25 °C which is a suitable temperature for fumonisin production on maize; secondly, the study was limited to FB_1 production and thirdly the isolates used originated from maize. The authors suggest that it is possible that fumonisin could be produced on the other cereals under different temperature regimens.

During the present work the effect of a broad range of a_w (0.995 to 0.90) and temperatures (15, 25 and 30 °C) on FB_1 , FB_2 , and FB_3 production by 3 strains of *F. proliferatum* isolated from wheat was evaluated. All the conditions evaluated are those which usually occurred during wheat grain development (especially at milk and dough stages) in the field. These results can explain Marín et al. (1999) conclusions about the absence of fumonisin production on wheat at 25 °C. Two out of three strains of *F. proliferatum* produced almost exclusively FB_2 and negligible amounts of FB_1 on wheat based-media at this temperature. Also this kind of profile (more FB_2 than FB_1) has been observed on naturally contaminated wheat grain in Argentina (Palacios et al., 2011). The other strain showed a normal fumonisin profile ($FB_1 > FB_2 > FB_3$) but the production was higher at 15 °C than at the other temperatures evaluated. Also, Marín et al. (1999) study did not include the 0.99 a_w level which was found to be the optimum for fumonisin production in most of the conditions evaluated during the present study.

Thus, field conditions during a non-FHB epidemic year are likely to be conducive to *F. proliferatum* growth and toxin production.

Recently, fumonisin contamination has been reported in both kinds of wheat and sub-products in several countries including Argentina (Busman et al., 2012; Castoria et al., 2005; Cendoya et al., 2014; Chehri et al., 2010; Jakšić et al., 2012; Khosrow et al., 2010; Kushiro et al., 2009; Palacios et al., 2011; Roscoe et al., 2008; Serrano et al., 2012; Wang et al., 2013). Although there is no legislation for fumonisin levels in wheat and wheat products, this legislation does exist for maize, where the maximum limits established for maize and sub-products for human consumption are 1000 ng/g in the European Union and from 2000 to 4000 ng/g in the USA. It is remarkable that some reports of fumonisin contamination of wheat exceed these limits. Due to the importance of wheat in Argentinean population diet and also in many countries around the world, and because it has been proposed, in a study in the Netherlands, that fumonisin intake occurs mainly via the intake of wheat and wheat-products (Bakker et al., 2003), the present results provide useful information for predicting the possible risk factors for fumonisin contamination of wheat. The a_w and temperature ranges evaluated in this study simulate those occurring during wheat grain development (especially milk and dough stages) in the field. The data indicate the contrasting impact of a_w , temperature, and incubation time on growth and production of FB_1 , FB_2 and FB_3 by the three *F. proliferatum* strains examined. The most important finding is that fumonisin production profiles for each strain were related to incubation temperatures.

Since *F. proliferatum* is isolated at a very high frequency from wheat around the world the contour maps of growth and fumonisin production generated by the present study may provide very useful guidelines for facilitating effective management of predicting risk for growth and mycotoxin production during ripening, harvesting and storage of wheat.

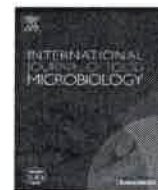
Acknowledgments

This work was supported by grants from SECyT-UNRC and ANPCyT (Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica) PICT-2012-1436. Cendoya E. is a fellow of CONICET and Ramirez, M.L. and Chulze, S.N. are members of the Research Career of CONICET.

References

- Bakker, M.I., Speijers, G.J.A., Paulsch, W.E., 2003. Risk assessment of fumonisin B₁ in the Netherlands. Laboratory for Food and Residue Analysis. National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), P.O. Box 1, 3720 BA Bilthoven, the Netherlands RIVM Report (310301001/2003).
- Busman, M., Desjardins, A.E., Proctor, R.H., 2012. Analysis of fumonisin contamination and the presence of *Fusarium* in wheat with kernel black point disease in the United States. *Food Addit. Contam.* 29, 1092–1100.
- Castoria, R., Lima, G., Ferracane, R., Riti, A., 2005. Occurrence of mycotoxin in farro samples from southern Italy. *J. Food Prot.* 68, 416–420.
- Cendoya, E., Monge, M.P., Palacios, S.A., Chiacchiera, S., Torres, A.M., Farnochi, M.C., Ramirez, M.L., 2014. Fumonisin occurrence in naturally contaminated wheat grain harvested in Argentina. *Food Control* 37, 56–61.
- Chamley, L.L., Rosenberg, A., Trenholm, H.L., 1994. Factors responsible for economics losses due to *Fusarium* mycotoxin contamination of grains, food and feedstuffs. In: Miller, J.D., Trenholm, H.L. (Eds.), *Mycotoxins in Grain Compounds Other Than Aflatoxin*. Egan Press, St. Paul, MN, pp. 471–486.
- Chehri, K., Jahromi, S.T., Reddy, K.R., Abbasi, S., Salleh, B., 2010. Occurrence of *Fusarium* spp. and fumonisins in stored wheat grains marketed in Iran. *Toxins* 2, 2816–2823.
- Dalcorso, A., Torres, A., Etcheverry, M., Chulze, S., Varsavsky, E., 1997. Occurrence of deoxynivalenol and *Fusarium graminearum* in Argentinian wheat. *Food Addit. Contam.* 14, 11–14.
- Dallyn, H., Fox, A., 1980. Spoilage of material of reduced water activity by xerophilic fungi. In: Corry, J.E.L., Gould, G.H. (Eds.), *Microbial Growth and Survival in Extreme Environments*. Academic Press, London / New York, pp. 129–139.
- Food Balance Sheet, 2007. Available at: <http://www.faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=346&SelTab=4> (Accessed 3 January 2014).
- Gerlach, W., Nirenberg, H., 1982. The genus *Fusarium*. A pictorial atlas. *Mitt. Biol. Bundesanst. 209*. Land-Forstw., Berlin-Dahlem, pp. 1–406.
- González, H.H.L., Pacin, A., Resnik, S.L., Martínez, E., 1997. Deoxynivalenol and contaminant mycoflora in freshly harvested Argentinian wheat in 1993. *Mycopathologia* 135, 129–134.
- IARC, 2002. Fumonisin B₁. In: IARC (Ed.), *IARC (International Agency for Research on Cancer) Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Human, Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene*, vol. 82, pp. 301–366 (Geneve).

- Jakšić, S., Abramović, B., Jajić, I., Baloš, M.Ž., Mihaljev, Ž., Despotović, V., Šojić, D., 2012. Co-occurrence of fumonisins and deoxynivalenol in wheat and maize harvested in Serbia. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 89, 615–619.
- Jurado, M., Marín, P., Callejas, C., Moretti, A., Vázquez, C., González-Jaén, M.T., 2010. Genetic variability and fumonisin production by *Fusarium proliferatum*. *Food Microbiol.* 27, 50–57.
- Khosrow, C., Saeed Tamadoni, J., Kasa, R.N.R., Saeed, A., Baharuddin, S., 2010. Occurrence of *Fusarium* spp. and fumonisins in stored wheat grains marketed in Iran. *Toxins* 2, 2816–2823.
- Klittich, C.J.R., Leslie, J.F., 1998. Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). *Genetics* 118, 417–423.
- Kushiro, M., Zheng, Y., Nagata, R., Nakagawa, H., Nagashima, H., 2009. Limited surveillance of fumonisins in brown rice and wheat harvested in Japan. *J. Food Prot.* 72, 1327–1331.
- Leslie, J.F., Summerell, B.A., 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing.
- Lori, G., Sisterna, M., Haidukowsky, M., Rizzo, I., 2003. *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol contamination in the durum wheat area of Argentina. *Microbiol. Res.* 158, 1–7.
- Magan, N., Lacey, J., 1984. Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field fungi and storage fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 82, 83–93.
- Marasas, W.F., 2001. Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. *Environmental Health Perspective* 2, 239–243.
- Marín, S., Magan, N., Ramos, A., Sanchis, V., 2004. Fumonisin-producing strains of *Fusarium*: a review of their ecophysiology. *J. Food Prot.* 67, 1792–1805.
- Marín, S., Magan, N., Serra, J., Ramos, A.J., Canela, R., Sanchis, V., 1999. Fumonisin B₁ production and growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* on maize, wheat, and barley grain. *J. Food Sci.* 64, 921–924.
- Medina, A., Schmidt-Heydt, M., Cárdenas-Chávez, D.L., Parra, R., Geisen, R., Magan, N., 2013. Integrating toxin gene expression, growth and fumonisin B₁ and B₂ production by a strain of *Fusarium verticillioides* under different environmental factors. *J. R. Soc. Interface* 10, 20130320. <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2013.0320>.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Republica, 2014. Available at: <http://www.minagri.gob.ar> (Accessed 4 January 2014).
- Missmer, S.A., Suarez, L., Felkner, M., Wang, E., Merrill, A.H., Rothman, K.J., Hendricks, K.A., 2006. Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas–Mexico border. *Environ. Health Perspect.* 114, 237–241.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Marasas, W.F.O., 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park.
- Pacin, A., Ciancio Bovier, E., Canoa, G., Taglieri, D., Hernandez Pezzani, C., 2012. Effect of the bread making process on wheat flour contaminated by deoxynivalenol and exposure estimate. *Food Control* 21, 492–495.
- Palacios, S.A., Ramirez, M.L., Cabrera Zalazar, M., Farnochi, M.C., Zappacosta, D., Chiacchiera, S.M., Reynoso, M.M., Chulze, S.N., Torres, A.M., 2011. Occurrence of *Fusarium* spp. and fumonisin in durum wheat grains. *J. Agric. Food Chem.* 59, 12264–12269.
- Ramirez, M.L., Oviedo, M.S., Farnochi, M.C., Chulze, S.N., 2006b. Mycological and mycotoxin survey on wheat during a non epidemic FHB year in Argentina. *Proceeding of 9th European Fusarium Seminar*. September 12–22, 2006. Wageningen, The Netherlands, p. 34.
- Ramirez, M.L., Reynoso, M.M., Farnochi, M.C., Chulze, S., 2006a. Vegetative compatibility and mycotoxin chemotypes among *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) isolates from wheat in Argentina. *Eur. J. Plant Pathol.* 115, 139–148.
- Ramirez, M.L., Reynoso, M.M., Farnochi, M.C., Torres, A., Leslie, J., Chulze, S., 2007. Population genetic structure of *Gibberella zeae* isolated from wheat in Argentina. *Food Addit. Contam.* 24, 1115–1120.
- Roscoe, V., Lombaert, G.A., Huzel, V., Neumann, G., Melietto, J., Kitchen, D., Kotello, S., Krakalovich, T., Trelka, R., Scott, P.M., 2008. Mycotoxins in breakfast cereals from the Canadian retail market: a 3-year survey. *Food Addit. Contam.* 25, 347–355.
- Ryu, D., Munimbazi, C., Bullerman, L.B., 1999. Fumonisin B₁ production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* as affected by cycling temperatures. *J. Food Prot.* 62, 1456–1460.
- Shephard, S., Sydenham, W., Thiel, G., Gelderblom, A., 1990. Quantitative determination of Fumonisin B1 and B2 by HPLC with fluorescence detection. *Journal Liquid Chromatography* 13, 2077–2087.
- Sumalan, R., Alexa, E., Antena, M., 2013. Assessment of inhibitory potential of essential oils on natural mycoflora and *Fusarium* mycotoxins production in wheat. *Chemistry Central Journal* 7, 32.
- Serrano, A.B., Font, G., Ruiz, M.J., Ferrer, E., 2012. Co-occurrence and risk assessment of mycotoxins in food and diet from Mediterranean area. *Food Chem.* 135, 423–429.
- Wang, Y.-K., Shi, Y.-B., Zou, Q., Sun, J.-H., Chen, Z.-F., Wang, H., Li, S.-Q., Yan, Y.-X., 2013. Development of a rapid and simultaneous immunochromatographic assay for the determination of zearalenone and fumonisin B₁ in corn, wheat and feedstuff samples. *Food Control* 31, 180–188.



Abiotic conditions leading to *FUM* gene expression and fumonisin accumulation by *Fusarium proliferatum* strains grown on a wheat-based substrate



Eugenia Cendoya^{a,c}, Laetitia Pinson-Gadais^b, María C. Farnochi^a, María L. Ramirez^{a,c,*}, Sylvain Chéreau^b, Giselè Marcheguy^b, Christine Ducos^b, Christian Barreau^b, Florence Richard-Forget^b

^a Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas Fco-Qcas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta 36 Km 601, 5800, Río Cuarto, Córdoba, Argentina

^b Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UR1264 MycSA, 71 avenue Edouard Bourlaux, cs20032, 33883 Villenave d'Ornon cedex, France

^c Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

ARTICLE INFO

Keywords:

Fumonisin
Fusarium proliferatum
Wheat
FUM gene
Gene expression
Abiotic stress

ABSTRACT

Fusarium proliferatum produces fumonisins B not only on maize but also on diverse crops including wheat. Using a wheat-based medium, the effects of abiotic factors, temperature and water activity (a_w), on growth, fumonisin biosynthesis, and expression of *FUM* genes were compared for three *F. proliferatum* strains isolated from durum wheat in Argentina. Although all isolates showed similar profiles of growth, the fumonisin production profiles were slightly different. Regarding *FUM* gene transcriptional control, both *FUM8* and *FUM19* expression showed similar behavior in all tested conditions. For both genes, expression at 25 °C correlated with fumonisin production, regardless of the a_w conditions. However, at 15 °C, these two genes were as highly expressed as at 25 °C although the amounts of toxin were very weak, suggesting that the kinetics of fumonisin production was slowed at 15 °C. This study provides useful baseline data on conditions representing a low or a high risk for contamination of wheat kernels with fumonisins.

1. Introduction

Fusarium proliferatum, which belongs to the *Fusarium fujikuroi* species complex (FFSC) is an important pathogen of maize that produces a number of mycotoxins. In addition to maize, this fungus is able to colonize a wide range of other plants as diverse as pine trees, asparagus, fig, garlic, pea, onion, tomato, pineapple or palm trees, as well as dietary crops such as wheat, barley and rice (Abdalla et al., 2000; Aliakbari et al., 2007; Kenényi et al., 2002; Stankovic et al., 2007; Stepien et al., 2011; von Barga et al., 2009; Waśkiewicz et al., 2013). This wide spectrum of hosts together with a worldwide geographical distribution provides evidence of the extraordinary adaptation ability of this species to enable it to colonize new environments in diverse climatic conditions.

F. proliferatum produces various mycotoxins, including fumonisins B, moniliformin, beauvericin, fusaric acid and fusaproliferin (Desjardins, 2006). Fumonisin B are of high concern as they can interfere with sphingolipid metabolism, leading to adverse effects on

human and animal health. Epidemiological studies have associated fumonisins with human esophageal cancer and neural tube defects (Marasas et al., 2004; Missmer et al., 2006). Fumonisin B₁ (FB₁), the most frequently occurring form, has been classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) in Group 2B as “a possible carcinogenic to humans” (IARC, 2002). Because of the health risk associated with the consumption of contaminated crops, occurrence of fumonisins is currently under regulation in many countries.

Phylogenetic studies of a large number of *F. proliferatum* strains isolated from different hosts has revealed a high genetic variability and showed that the ability to produce fumonisins was widely distributed suggesting that this species can represent a risk for health similar to that associated with *F. verticillioides* (Jurado et al., 2010; Palacios et al., 2015). Moreover, Jurado et al. (2010) concluded that although there is no evidence that fumonisins play a role in pathogenesis, the high proportion of *F. proliferatum* strains able to produce fumonisins indicates that fumonisin production can be considered a widely distributed feature within this species that might play some ecological

* Corresponding author at: Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas Fco-Qcas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta 36 Km 601, 5800, Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

E-mail address: mramirez@exa.unrc.edu.ar (M.L. Ramirez).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.04.017>

Received 30 November 2016; Received in revised form 20 March 2017; Accepted 24 April 2017

Available online 25 April 2017

0168-1605/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

role during colonization. Therefore, the occurrence of *F. proliferatum* on commodities may lead to the contamination of grains with fumonisins B as occurs with *F. verticillioides*, this being of particular relevance in crops that have not been considered so far as a potential source of dietary exposure to these mycotoxins. Several papers reported the contamination of wheat by *F. proliferatum* (Amato et al., 2015; Conner et al., 1996; Moretti et al., 1999; Palacios et al., 2011). In addition, some recent studies reported the occurrence of wheat harvests contaminated with fumonisins (Amato et al., 2015; Cendoya et al., 2014b; Mendes et al., 2015; Palacios et al., 2011; Stankovic et al., 2012). As wheat is an important crop in the human diet, its quality and safety is of major concern and presence of the potentially carcinogenic fumonisin must be avoided.

Fusarium growth and fumonisin production result from the complex interaction of several biotic and/or abiotic factors where water stress and temperature are the most relevant. Deciphering this complex process is essential to be able to predict and prevent plant diseases and mycotoxin production (Charmley et al., 1994). Thus, depending on the combination of abiotic factors, the biosynthetic pathway for fumonisin B will be activated or inhibited. Extensive work has been carried out on the combined effect of temperature and water stress (via the measure of a_w , which determines the amount of available water in a substrate) on fumonisin production on maize-based media and maize grains (Marín et al., 2004). In addition, we recently provided the first detailed study on fumonisin production as affected by a_w and temperature on a wheat-based media (Cendoya et al., 2014a).

The fumonisin biosynthetic genes (*FUM*) are organized in clusters as for other toxins produced by filamentous fungi so far described. At least 17 clustered genes encode enzymatic activities responsible for fumonisins. The expression of these genes seems to be co-regulated (Desjardins and Proctor, 2007; Proctor et al., 1999, 2003). Fumonisin production is directly linked to the expression of the *FUM* genes, which in turn is influenced by ecological conditions. *FUM1*, encodes a polyketide synthase required for fumonisin production (Proctor et al., 1999), which catalyzes the initial step in fumonisin biosynthesis (Bojja et al., 2004). Significant positive correlations have been observed between the relative amount of *FUM1* transcripts quantified by real-time RT-PCR and the amount of fumonisins produced by both *F. verticillioides* and *F. proliferatum* (López-Errasquín et al., 2007). *FUM19* is located about 35 kb downstream from the *FUM1* gene and encodes an ABC (ATP-binding cassette) transporter involved in extracellular export of fumonisins (Proctor et al., 2003), and *FUM8* encodes an aminotransferase required to set up the mature, biologically active FB₁ molecule (Seo et al., 2001). To date, there have been few attempts to relate key environmental factors to the expression of genes involved in fumonisin production by *F. proliferatum*, and these studies have been mainly restricted to maize as a major crop infected by the pathogen (Fanelli et al., 2012; Kohut et al., 2009; Marín et al., 2010).

The objectives of this study were to compare the effects of temperature and osmotic stress on growth, fumonisin production, and *FUM8* and *FUM19* gene expression in three *F. proliferatum* strains, in order to investigate the relationship between *FUM* gene expression and fumonisin production by this species cultivated in a wheat-based medium.

2. Materials and methods

2.1. *Fusarium* strains

Three *F. proliferatum* strains ITEM 15654, ITEM 15661 and ITEM 15664 (ITEM: Agri-Food Toxigenic Fungi Culture Collection of the Institute of Sciences of Food Production, CNR, Bari, Italy; <http://www.ispa.cnr.it/Collection>) previously isolated from wheat grains in Argentina during 2007–2008 harvest season were used. These isolates have been characterized by morphological, biological and molecular criteria (Leslie and Summerell, 2006; Nelson et al., 1983). For the

molecular characterization, sequences of elongation factor (EF-1 α), calmodulin, and *FUM8* genes indicated that these isolates belong to the *F. fujikuroi* species complex (FFSC) and allowed confirming the identity of the three strains as *F. proliferatum* (Palacios et al., 2015). In order to determine their mating population (MP) inside the FFSC, crossing experiments were performed with standard testers as female parents and the uncharacterized field isolates as male parents (Klittich and Leslie, 1998). In agreement with the previous identification, all these isolates belong to the mating population D. Also, all isolates produce fumonisins (Palacios et al., 2011). The three isolates were used as working strains and maintained in 15% glycerol at -80°C . When inocula were required, the strains were grown on PDA slants at 25°C in the dark for 7 days and spore suspensions were prepared by adding 5 mL of sterile distilled water to the PDA slant with gentle shaking. Spore suspension concentrations were adjusted to 10^6 spores/mL after counting using a Neubauer chamber.

2.2. Medium and culture conditions

Argentinean wheat grains (BioInta 3004) were finely milled. Mixtures of 3% (w/v) of milled wheat in water were prepared and 2% (w/v) agar added. The a_w of the basic medium was adjusted to 0.97, and 0.95 by addition of different amounts of glycerol (Dallyn and Fox, 1980). The control medium was not supplemented with glycerol (control condition, maximum free water availability, $a_w \sim 1$). The media were autoclaved at 120°C for 20 min. Flasks of molten media were thoroughly shaken, prior to be poured into 9 cm sterile Petri dishes (15 mL/Petri dish). The a_w of two representative samples of media for each treatment was checked. Additional, non-inoculated control plates were prepared and a_w were measured at the end of the experiment in order to detect any significant deviation. Petri plates were covered with Amersham Hybond N⁺ membranes just before inoculation in order to facilitate the fungal biomass removal for RNA extraction.

2.3. Inoculation, incubation and growth assessment

Petri plates were inoculated with 0.1 mL of a fresh spore suspension containing 10^6 spores/mL that was deposited in the center of the membrane. Fungal cultures of each strain were incubated at 25°C or 15°C in the dark for 5 days. A full factorial design was used where the factors were a_w , temperature and strain, and the response was growth (total numbers of plates: 3 $a_w \times 2$ temperatures $\times 3$ strains $\times 3$ replicates). Growth assessment was made every day during the incubation period, by measuring two perpendicular diameters of the growing colonies. Growth measurements were plotted against time, and linear regression was applied in order to obtain the growth rate (mm/day) as the slope of the line. At the end of the incubation period, the mycelium was removed and immediately frozen at -80°C , then lyophilized, and stored at -80°C until RNA extraction. Agar plates were frozen for later fumonisin extraction and quantification.

2.4. Fumonisin analysis

For fumonisin extraction, five day-old Petri plates of each strain at different incubation conditions (a_w and temperature) were used. Toxins were extracted with 20 mL of acetonitrile: water (1:1 v/v) by shaking the whole crushed culture media (~ 15 mL) with the solvent for 30 min on an orbital shaker (200 rpm). After filtration (0.45 μm), the extracts were stored at 4°C until HPLC-MS-MS analysis.

An aliquot of the extracts (1000 μL) was taken and filtered (0.2 μm) for high performance liquid chromatography (HPLC-MS-MS) analysis. Fumonisin analysis was performed using a HPLC MS-MS system, composed of an Agilent G1311 pump, an Agilent G1313 autosampler, an Agilent G1315 PDA diode array detector interfaced with a Q-Trap 2000 ABSciex with an electrospray ionization (ESI) source operating in

Table 1
Parameters used to investigate fumonisins by LC-MS/MS.

Compound	[M + H] ⁺	t _R (min)	Product ions (m/z)	CV (V)	CE (V)
FB ₁	722	5.4	334	91	57
			352 ^a		55
FB ₂	706.3	17.6	318.5	96	51
			336.3 ^a		59
FB ₃	706.3	9.3	318.5	96	51
			336.3 ^a		59

[M + H]⁺, precursor ion; t_R, retention time; Product ions (m/z), daughter ions; CV (V), cone voltage; CE (V), collision energy.

^a Transition used for quantification.

a positive mode.

For chromatographic separation, a Kinetex C18 2.6 μm column (4.6 × 150 mm) (Phenomenex) with a guard column of the same material was used. A gradient elution was performed with mobile phase A: 0.1% formic acid and methanol:acetonitrile (50:50 v/v), and mobile phase B: 0.1% formic acid. The flow rate was 0.7 mL/min with a split guiding 50% of the flow to the ionization source. The column temperature was maintained at 45 °C and injection volume was 5 μL. Regarding mass spectrometry, multiple-reaction monitoring (MRM) was used for toxin determination. The nitrogen flow was adjusted to 40 and 60 (arbitrary units) for cone and desolvation gases, respectively. The capillary voltage was 4.5 kV. For each compound, two transitions were monitored either for qualification or quantification. MRM parameters, as well as the retention times are collected in Table 1. Trace m/z 722 > 352 was used for the quantification of FB₁, while 706 > 336 was used for both FB₂ and FB₃. For quantification purposes, a calibration curve was obtained injecting different mixed standard solutions (10; 25; 50; 100; 250; 500; 1000 and 5000 ng/mL). Good linearity with a correlation coefficient higher than 0.996 was obtained within calibration range. The calculated instrumental LOD (lowest concentration presenting a signal with S/N = 3) for FB₁ and FB₂ was 2.5 ng/mL and LOQ (S/N = 10) was 10 ng/mL.

2.5. Statistical analysis

The growth rates and mycotoxin concentrations were evaluated by analysis of variance (ANOVA) to determine the effect of a_w and temperature for each *F. proliferatum* strain and two-way interaction.

When the analysis was statistically significant (*p* ≤ 0.01), the *post hoc* Tukey's multiple comparison procedure was used for separation of the means (*p* > 0.05). Statistical analysis was done using SigmaStat for Windows Version 2.03 (SPSS Inc.).

2.6. Total RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from 5-day-old mycelium of the three strains of *F. proliferatum* grown in wheat-based medium with or without glycerol. Three biological replications were prepared for each condi-

Table 3
PCR efficiencies obtained for *Fusarium proliferatum* strains.

Primer	<i>F. proliferatum</i> strains		
	ITEM 15661	ITEM 15664	ITEM 15654
<i>β-tubulin</i>	2.012	2.011	1.930
<i>histone3</i>	2.006	2.011	1.991
<i>FUM8</i>	2.001	2.016	2.011
<i>FUM19</i>	2.004	2.016	2.014

tion. The biomass was removed from the membrane at the end of the incubation period. Frozen mycelium (50 mg) was lyophilized and ground with a TissueLyser System® (Qiagen, France) for 1 min at 30 Hz. Total RNA was extracted following the RNeasy Mini Kit (Qiagen) manufacturer's instructions. DNase treatment (Ambion®, Life technologies SAS, France) was performed following manufacturer's instructions. A qPCR assay with *β-tubulin* primers (see conditions in Table 2) was performed to check the lack of genomic DNA contamination. Quality of the prepared RNA was assessed by agarose gel electrophoresis (2%), and by measuring absorbance ratios A260/A280 and A260/A230. RNA was quantified by absorbance measurements at 260 nm. RNA (1 μg) was reverse transcribed using the SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Life technologies SAS, France). Reverse transcription was performed with an iCycler® (Bio-Rad, France) programmed according to the thermal cycling conditions recommended by the manufacturer (Invitrogen, Life technologies SAS, France). cDNA samples were stored at –20 °C until used for PCR analysis.

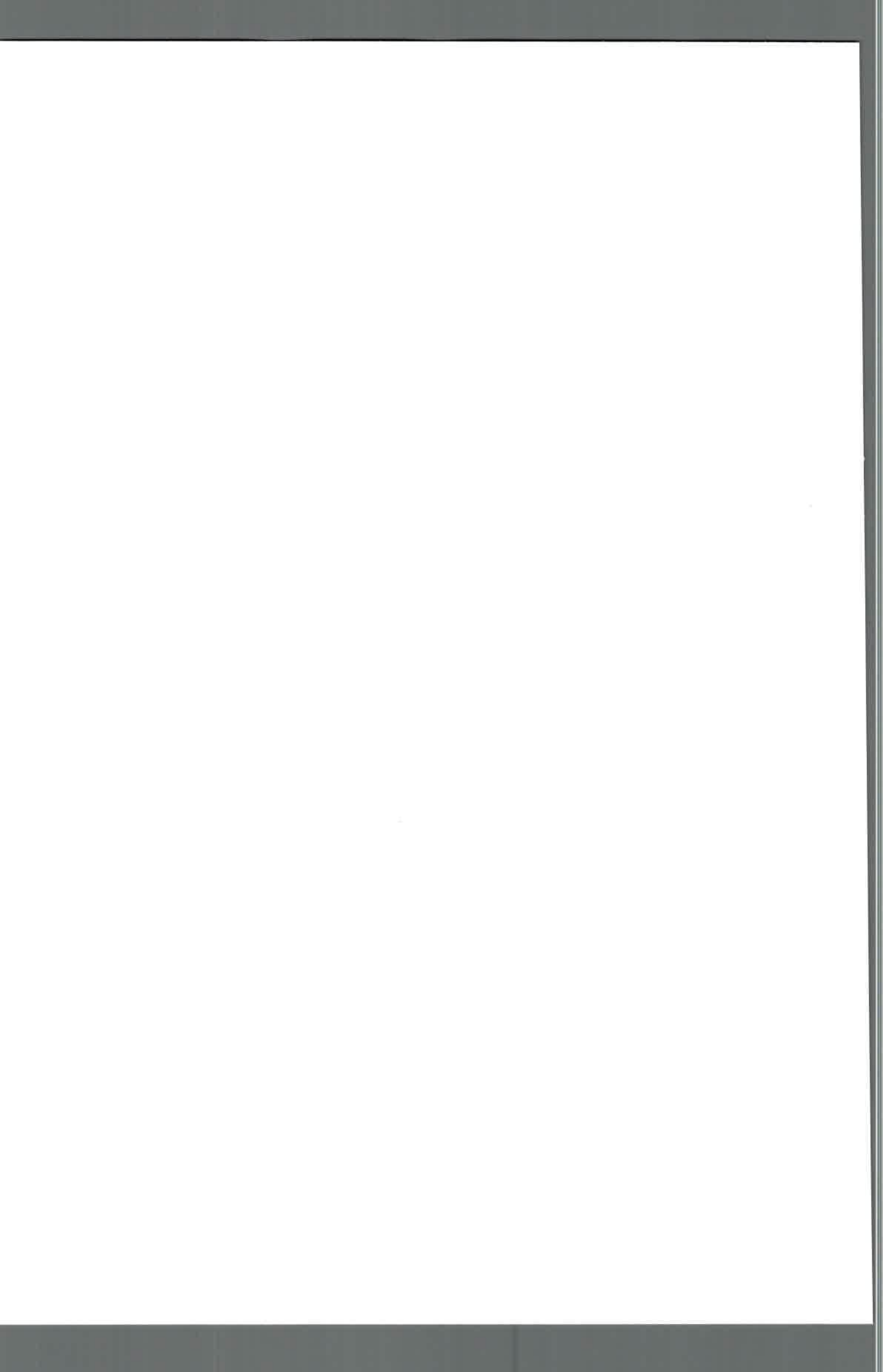
2.7. Real-time RT-PCR analysis

Real-time PCR was used to amplify *FUM8*, *FUM19*, *β-tubulin* and *histone3* genes using the primers listed in Table 2. *FUM8* primers were based on *FUM8* gene sequence (NCBI GenBank Accession No KF415158.1) and *FUM19* primers were based on *FUM19* gene sequence (NCBI GenBank Accession No KF415190.1). These primers were designed in our laboratory using the Primer3 software (Koressaar and Remm, 2007; Untergasser et al., 2012). Primers were used at a final concentration of 1 mM each. *β-tubulin* and *histone3* expression were used as endogenous references. Real-time RT-PCR analyses were performed with a LightCycler® 1.5 system and LightCycler Software 3.5.3 (Roche, France). Abundance of the transcripts of the genes *FUM8* and *FUM19* was evaluated in 1 μL of each cDNA sample (corresponding to 10 ng of RNA) in a final reaction volume of 10 μL, using the QuantiFast SYBR® Green PCR Kit (Qiagen, France). The expression of *β-tubulin* and *histone3* genes were stable under all tested conditions. Real-time RT-PCR amplifications were performed using 40 cycles according to the thermal cycling conditions recommended by the kit manufacturer (Qiagen, France). Amplifications were performed in triplicate for each of the three biological replications. Negative controls containing no template were performed in the same conditions. The

Table 2
Primer sequences and conditions used for amplification of *FUM8*, *FUM19*, *β-tubulin* and *histone3* genes.

Primer	Sequence	Amplification	Pb	Reference
<i>FUM8</i>	F: 5'-TCCAGATCAAAGGCGTGACT-3'	95 °C 5 min-40 cycles (10 s-95 °C and 40 s-60 °C)	149	^a
	R: 5'-CCCCAGGGTACTTCTTGGAC-3'			
<i>FUM19</i>	F: 5'-TGGCGTTATTGACCGTTGTG-3'	95 °C 5 min-40 cycles (10 s-95 °C and 40 s-62 °C)	202	^a
	R: 5'-CCTTCTGCACACTCAGCATG-3'			
<i>β-tubulin</i>	F: 5'-GGTAACCAAAATCGGTGCTGCTTTC-3'	95 °C 5 min-40 cycles (10 s-95 °C and 40 s-58 °C)	295	Glass and Donaldson (1995) (Forward) Pinson-Gadais et al. (2007) (Reverse)
	R: 5'-GATTGACCGAAACGAAGTTG-3'			
<i>histone3</i>	F: 5'-ACTAAGCAGACCGCCGCAGG-3'	95 °C 5 min-40 cycles (10 s-95 °C and 40 s-62 °C)	377	Kohut et al. (2009)
	R: 5'-GCGGGCGAGCTGGATGTCCTT-3'			

^a Primers designed using Primer3.



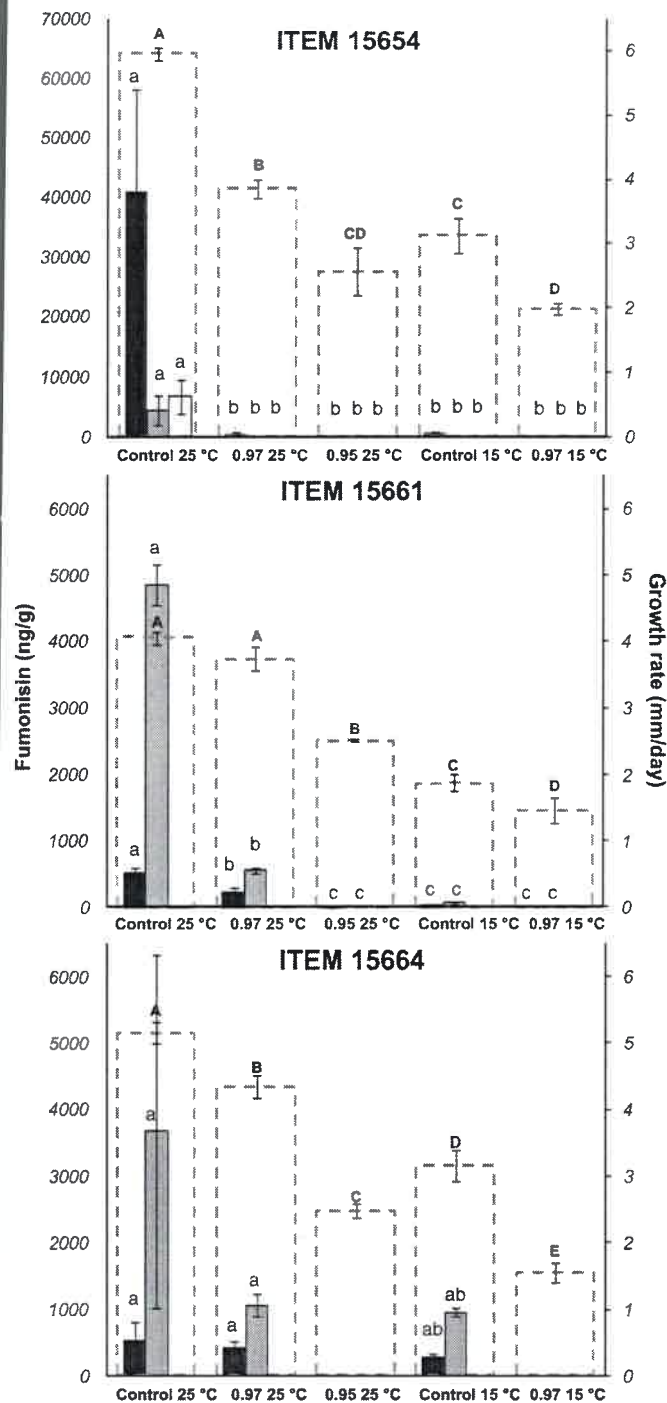


Fig. 1. Effect of water activity (1.0, 0.97 and 0.95) and temperature (25 and 15 °C) on the growth rate (○) and the production of fumonisins production (■FB₁, ▨FB₂ and □FB₃) by three *Fusarium proliferatum* strains cultivated on wheat-based media. Error bars represent the standard error measured between independent replicates. Means values based on triplicate data with letters in common for each type of fumonisins (lower case letters) or for growth rates (capital letters) are not significantly different according to Tukey HSD Test ($p \geq 0.05$).

absence of non-specific PCR amplification products and primer-dimer formation was checked by running melting curves.

In order to determine PCR efficiencies, a standard cDNA mixture was prepared by mixing a fraction of each cDNA sample. A range of four log dilutions was prepared from the standard mixture. For each gene, PCR efficiency (E) was determined using the serial dilutions as described by Ponts et al. (2007) (Table 3).

2.8. Real-time RT-PCR data analysis

Crossing points (Cp) values obtained experimentally for the target *FUM* genes were compared in control and treated conditions and normalized relative to the Cp values obtained for the reference genes β -tubulin and histone3 using the REST[®] software REST-384 (Relative Expression Software Tool). The mathematical model used accounts for differences in efficiencies for the reference gene and the target gene and for the mean crossing point deviation between control and treated conditions (Pfaffl, 2001; Pfaffl et al., 2002).

The expression levels of the target genes, normalized to reference gene expression, were reported as a regulation factor in the treated condition relative to the control, with the ratio = $(E_{\text{target}})^{\Delta \text{Cp}_{\text{target}}}$ (control-treated) / $(E_{\text{ref}})^{\Delta \text{Cp}_{\text{ref}}}$ (control-treated).

The expression ratio results were tested for significance by running Pair Wise Reallocation Randomisation Test[®] with a p value of 0.001 using the REST[®] software.

3. Results

3.1. Effect of a_w and temperature on growth and fumonisin production

The effect of the interaction of a_w and temperature on growth rate and fumonisin production by the three investigated *F. proliferatum* strains cultivated on a wheat-based medium is depicted in Fig. 1. Maximum growth rates were reached at the highest a_w (control condition) and at 25 °C for the three isolates, with, however some differences between the three isolates. The strain ITEM 15654 exhibited the highest growth rate (6 mm/day), 1.5 times higher than that determined for the strain ITEM 15661. The three *F. proliferatum* strains were able to grow at 15 °C for the highest a_w value. For each strain and each temperature, the growth was significantly reduced with the decrease in a_w in the media. At 25 °C, the decrease of a_w from 1 to 0.95 led to an inhibition of the growth rate by a factor close to 2. Similarly, at 15 °C, change in a_w from 1 to 0.97 had a significant repressing effect on growth; a 2-fold decrease in growth rate was highlighted for the ITEM 15654 and 15664 isolates. This decrease was less pronounced for ITEM 15661, which was also the strain characterized by the lowest growth rate in control conditions (25 °C, $a_w = 1$). It was noticeable that at 15 °C and 0.95 a_w no growth was observed during the incubation period for the tested strains.

With regard to fumonisin, the production profiles of each strain were the same as previously described by Palacios et al. (2011) and Cendoya et al. (2014a). The ITEM 15654 strain produced mainly FB₁ and low levels of FB₂ and FB₃, whereas the ITEM 15661 and ITEM 15664 strains only produced FB₁ and FB₂, with higher levels of FB₂ than FB₁. Actually, the two last strains showed levels of FB₂ in the same range as the strain ITEM 15654 but produced very low amounts of FB₁. For each strain, the maximum amounts of fumonisins were obtained in the control condition ($a_w = 1$) at 25 °C. Only traces of fumonisins were detected for the *F. proliferatum* strains cultivated at 15 °C, except for the ITEM 15664 strain that was shown to produce significant residual levels of both FB₁ and FB₂. Similarly, decrease in a_w from 1 to 0.97 had a drastic impact on the amounts of quantified toxins, regardless of the temperature of incubation and strain. When considering the ITEM 15654 strain cultivated at 25 °C, the concentration of toxins declined from 40 $\mu\text{g/g}$ in control conditions to < 1 $\mu\text{g/g}$ when the a_w was set at 0.97. Our data also indicated that the production of FB₁ and FB₂ by the ITEM 15664 strain was less affected by osmotic stress, with a reduction factor lower than 5.

Altogether, our results demonstrated that abiotic stresses (a_w and temperature) and their combination significantly influenced the production of fumonisins and the growth rates of the three *F. proliferatum* strains cultivated in wheat based media during 5 days, with temperature having the strongest impact (Table 4).

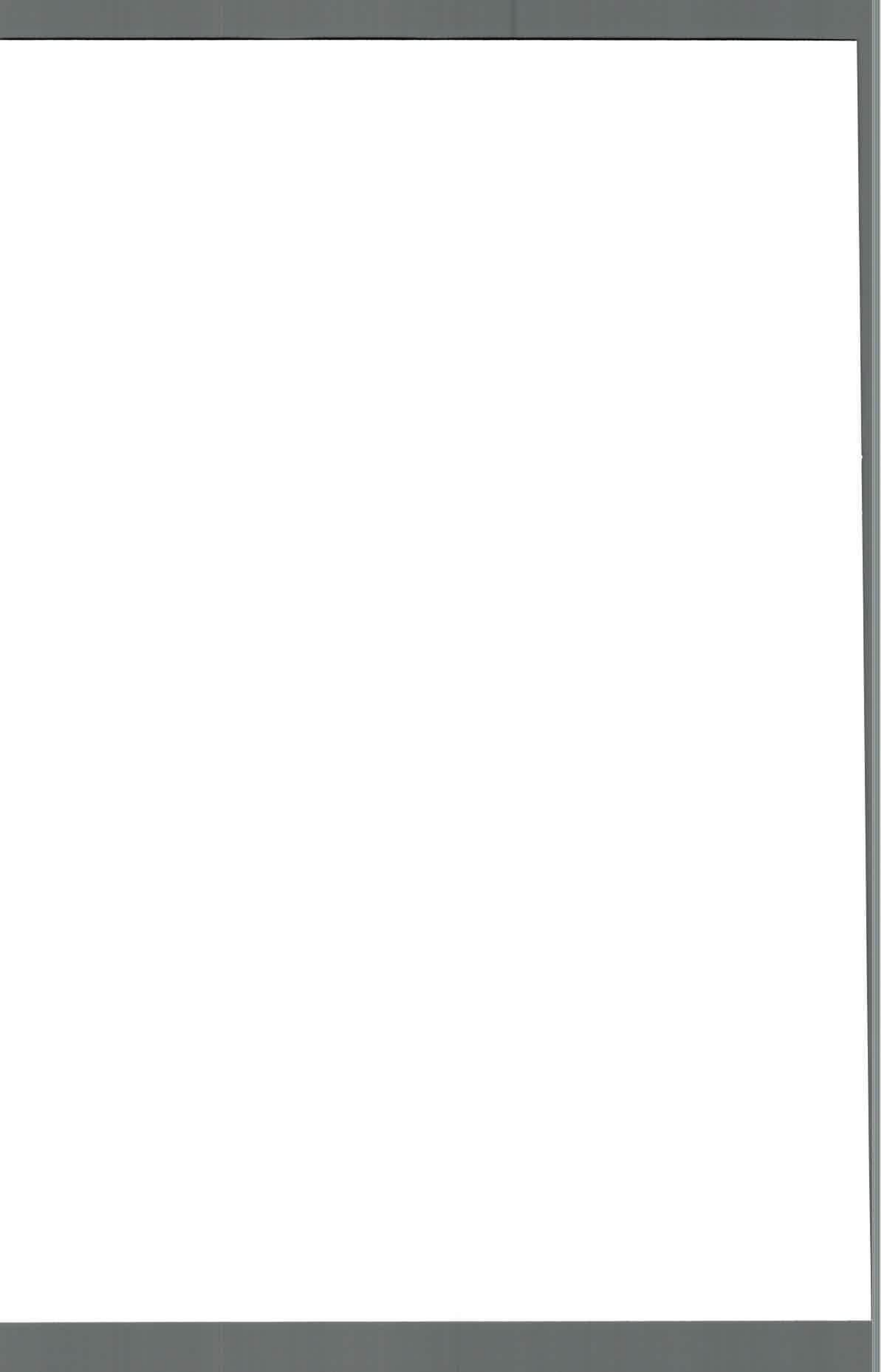


Table 4

Analysis of variance on the effects of water activity (a_w), and temperature (T) and their interaction on growth and fumonisin production of *Fusarium proliferatum* strains on wheat-based media.

ITEM 15654									
S.V ^a	df ^b	FB ₁		FB ₂		FB ₃		Growth rate	
		MS ^c	F ^d	MS ^c	F ^d	MS ^c	F ^d	MS ^c	F ^d
a_w	2	77 × 10 ⁷	13,1*	9 × 10 ⁶	7,2	20 × 10 ⁶	12,6*	5,51	109,1*
T	1	12 × 10 ⁸	21,2*	15 × 10 ⁶	12,0*	34 × 10 ⁶	20,8*	16,6	329,5*
$a_w \times T$	1	12 × 10 ⁸	20,2*	14 × 10 ⁶	11,6*	33 × 10 ⁶	20,4*	0,7	13,6*

ITEM 15661									
S.V ^a	df ^b	FB ₁		FB ₂		Growth rate			
		MS ^c	F ^d	MS ^c	F ^d	MS ^c	F ^d	MS ^c	F ^d
a_w	2	8 × 10 ⁴	55,1*	9,4 × 10 ⁶	495*	0,3	16,4*		
T	1	4 × 10 ⁵	259,4*	2,1 × 10 ⁷	1125*	15	815*		
$a_w \times T$	1	5 × 10 ⁴	34,2*	1,3 × 10 ⁷	710,1*	5E-3	0,3		

ITEM 15664									
S.V ^a	df ^b	FB ₁		FB ₂		Growth rate			
		MS ^c	F ^d	MS ^c	F ^d	MS ^c	F ^d	MS ^c	F ^d
a_w	2	2 × 10 ⁵	9,37*	7 × 10 ⁶	5,07*	3,58	155,64*		
T	1	3 × 10 ⁵	18,38*	1 × 10 ⁷	7,6*	17,2	746,11*		
$a_w \times T$	1	2 × 10 ⁴	1,22	2 × 10 ⁶	1,47	0,48	21,05*		

^a Source of variation.

^b Degrees of freedom.

^c Mean square.

^d Snedecor-F test.

* Significant at $p < 0.05$.

3.2. Effect of a_w and temperature on expression of *FUM8* and *FUM19* genes

The expression of *FUM8* and *FUM19* of *F. proliferatum* ITEM 15654, ITEM 15664 and ITEM 15661 was evaluated at two temperatures (15 °C and 25 °C) and three a_w (control, 0.97, and 0.95) and compared with the values determined at 25 °C in the control conditions ($a_w = 1$). Expression of *β -tubulin* and *histone3* served as reference genes in all conditions. Results are shown in Fig. 2.

For *F. proliferatum* ITEM 15654 strain cultivated at 25 °C, the decrease in a_w led to a significant reduction of the expressions of *FUM8* and *FUM19* compared to control conditions ($a_w = 1$). This was in agreement with the decrease in fumonisin production reported in Fig. 1. Surprisingly, at 15 °C, the expression of the two considered *FUM* genes was not significantly reduced, compared to the 25 °C condition. This observation was in contradiction with the significant decrease in FB₁ accumulation that was previously highlighted (Fig. 1). The expression of *FUM8* and *FUM19* became significantly repressed at 15 °C when the a_w was lowered to 0.97, in agreement with the very low fumonisin production.

When considering the results obtained for *F. proliferatum* ITEM 15661 strain, a significant inhibition of the expression of *FUM8* and *FUM19* was observed at 25 °C, as a result of the decrease of a_w to 0.95. It was also noted that the repression of *FUM19* at a_w 0.97 was not significant whereas there was major decrease in fumonisin production (Fig. 1). For the previous strain cultivated at 15 °C, either in the control condition ($a_w = 1$) or at a_w 0.97, again although fumonisin production was considerably affected, the expression of *FUM8* and *FUM19* was not significantly affected.

A similar complex situation was observed for *F. proliferatum* ITEM 15664 strain. The expression of *FUM8* and *FUM19* was not reduced by

decreasing the a_w to 0.97 or when the incubation temperature was 15 °C instead of 25 °C. This down regulation correlated with the fumonisin production levels that were only partially reduced in comparison with the levels obtained in the control conditions at 25 °C. Although it was only significant for *FUM8*, the expression of *FUM* genes was reduced at 25 °C/ $a_w = 0.95$ in agreement with the lower fumonisin production.

As a whole, our data showed that responses to a_w or temperature modifications varied according to the considered strain of *F. proliferatum*. Nonetheless, lowering the temperature from 25 °C to 15 °C led to a significant reduction in fumonisin production. Surprisingly, lowering the temperature did not affect significantly the expression of *FUM* genes although non-significant trends of lesser expression levels could be observed, in particular for the strong FB₁-producer strain *F. proliferatum* ITEM 15654. Our observations suggested also that an osmotic stress could down-regulate the expression of *FUM8* and *FUM19* genes.

4. Discussion

This study compared for the first time the impact of a_w and temperature on growth, fumonisin production, and *FUM8* and *FUM19* gene expression on a wheat-based medium, for three strains of *F. proliferatum* isolated from wheat in Argentina. As expected, both variables affected growth, and the observed modulation pattern was similar whatever the considered strain. Among tested conditions, the highest growth rates were observed at 25 °C in the absence of osmotic stress for all the evaluated strains. Previous studies related to a_w and temperature requirements for *F. proliferatum* have indicated that this fungus has a minimum a_w of 0.90, and temperature range from 4 to 37 °C for growth in maize extract agar media and that the optimal



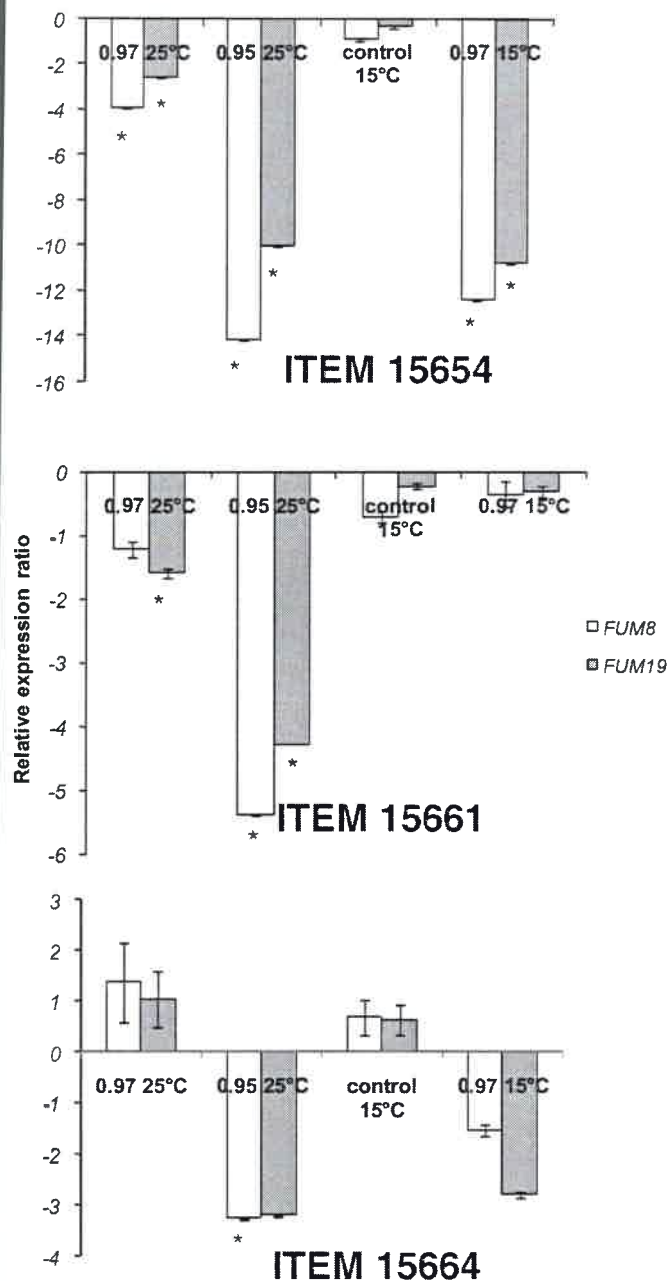


Fig. 2. Relative expression of *FUM8* and *FUM19* genes of three *Fusarium proliferatum* strains incubated for 5 days at 15 and 25 °C and three water activities (control, 0.97 and 0.95). The *FUM8* and *FUM19* cDNA amount was normalized in each experiment using the *Cp* values obtained for β -*tub* and *H3* cDNA amplifications. The values represent the regulation factor obtained for the target gene in the different culture conditions relative to the control culture (25 °C, $a_w = 1$). The data represent the means of three independent repetitions. Error bars represent the standard error measured between independent replicates. Values were calculated using the REST software (Pfaffl, 2001; Pfaffl et al., 2002). * significant $p \leq 0.001$.

condition for growth was at the highest a_w tested (0.994) (Marín et al., 2004). The results obtained in the present work were similar to those reported by Marín et al. (2010) for *F. verticillioides* and *F. proliferatum* strains (5–6 mm/day) and confirmed the values that we have assessed in a previous study (Cendoya et al., 2014a). Nevertheless, in the present study, growth was analyzed during only five days of incubation for each strain. In their environment, *Fusarium* species may be present on a substrate for very long periods during which a_w may change. For this reason, it is highly important to precisely know the optimal a_w range for growth and the range enabling only sub-optimal growth. Under field

conditions, temperature fluctuations, changes in relative humidity, and rainfall would strongly influence colonization of the developing grains by *F. proliferatum*.

For all the strains tested in the present study, the highest amounts of fumonisins were produced at 25 °C in the control condition in the absence of osmotic stress (maximum a_w). According to previous data (Cendoya et al., 2014a) obtained with the same set of *F. proliferatum* strains but for 28 days of incubation, maximum amounts of total fumonisins were observed at 25 °C and 0.99 a_w for two of the strains, and at 15 °C and 0.98 a_w for the third strain. Different fumonisin production profiles were found among the analyzed strains. At all tested temperatures, two of the three strains of *F. proliferatum* produced almost exclusively FB_2 and very low amounts of FB_1 on wheat based-media. These results support those previously reported by Palacios et al. (2011) for the same strains and are in agreement with the reported natural fumonisin contamination patterns of some wheat samples harvested in Argentina that were more contaminated with FB_2 than with FB_1 (Palacios et al., 2011).

In a recent study, Medina et al. (2013) have highlighted the profound effect of temperature and a_w on the growth, production of FB_1 and FB_2 , and expression of nine genes of the biosynthetic *FUM* cluster, using a *F. verticillioides* strain as model strain. The reported data showed the correlation of *FUM1*, *FUM11*, *FUM13*, *FUM14* and *FUM19* expression with FB_1 and FB_2 production and notably, the high expression of *FUM19* associated with the increased production of both fumonisins. Similarly, López-Erassquín et al. (2007) suggested a linear relationship between *FUM1* and *FUM19* transcripts and fumonisin production for a strain of *F. verticillioides* incubated at 20 °C for 14 days. Our results support the conclusions of the two studies mentioned above: when there were no detectable levels of fumonisins, the expression of the *FUM19* gene was repressed. Regarding *FUM8* gene expression, our results are in agreement with those reported by Kohut et al. (2009) who observed a positive correlation between *FUM8* gene expression and fumonisin production in *F. proliferatum*. Considering the transcriptional control of *FUM* genes, the most surprising finding of the present study was that although no fumonisin was detected after five days of incubation at 15 °C in the absence of osmotic stress, no inhibition of the expression of *FUM8* and *FUM19* genes compared to the conditions at 25 °C ($a_w = 1$) was highlighted. One possible explanation could be that the biochemical process of fumonisin biosynthesis is slower at this temperature, leading to a delay in the accumulation of fumonisins in wheat-based media and consequently to the lack of detectable levels of the toxin after five days of incubation. Indeed, in previous studies, significant amounts of fumonisins were quantified in wheat-based media inoculated by the same set of *F. proliferatum* strains and incubated for 28 days at 15 °C (Cendoya et al., 2014a). Accordingly, the results of Ryu et al. (1999) indicated that, compared to *F. verticillioides*, *F. proliferatum* was able to produce greater amounts of FB_1 at low temperatures, leading to the hypothesis that *F. proliferatum* could show a better adaptation to low temperatures. In addition, Marín et al. (2010) who have studied the effects of temperature and solute potential on growth and transcriptional control of *FUM1* gene in *F. verticillioides* and *F. proliferatum*, have concluded that the relative contribution of these two species to fumonisin production on maize might differ during the course of colonization, depending on the environmental conditions. The contamination of maize with fumonisins could be mainly ascribed to *F. proliferatum*, at the earliest stages of kernel development, when the temperature is still mild, whereas the relative contribution of *F. verticillioides* would increase during the later stages, when water stress progressively increases. Deciphering the effect of low temperatures on fumonisin production by *F. proliferatum* is essential when addressing natural fumonisin contamination of wheat, which is a winter crop and requires for cultivation an optimal temperature range between 10 and 24 °C.

Considering that field conditions are likely to be conducive to *F. proliferatum* growth and toxin production in wheat grains, and that



fumonisin contamination has been reported in wheat and sub-products in several countries (Amato et al., 2015; Busman et al., 2012; Castoria et al., 2005; Cendoya et al., 2014b; Chehri et al., 2010; Jakšić et al., 2012; Kushiro et al., 2009; Mendes et al., 2015; Palacios et al., 2011; Roscoe et al., 2008; Serrano et al., 2012; Wang et al., 2013); studying how this fungus can grow and contaminate this crop, as well as how expression of fumonisin biosynthetic genes are contributing in this process is of concern. Our results provide useful preliminary information for predicting the possible risk factors for fumonisin contamination of wheat.

Acknowledgements

E. Cendoya is grateful to BECAR for a short stay fellowship held in MycSA, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Bordeaux, France. This work was supported by (ANPCyT Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica) PICT-2012-1436. Cendoya E. is a fellow of CONICET and Ramirez, M.L. is members of the Research Career of CONICET.

References

- Abdalla, M.Y., Al-Rokibah, A., Moretti, A., Mulè, G., 2000. Pathogenicity of toxigenic *Fusarium proliferatum* from date palm in Saudi Arabia. *Plant Dis.* 84, 321–324.
- Aliakbari, F., Mirabolfathy, M., Emami, M., Mazhar, S.F., Karami-Osboo, R.K., 2007. Natural occurrence of *Fusarium* species in maize kernels at Gholeshtan province in northern Iran. *Asian J. Plant Sci.* 8, 1276–1281.
- Amato, E., Pfohl, K., Tonti, S., Nipoti, P., Dastjerdi, R., Pisi, A., Karlovsky, P., Prodi, A., 2015. *Fusarium proliferatum* and fumonisin B₁ co-occur with *Fusarium* species causing *Fusarium* head blight in durum wheat in Italy. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 88, 228–233.
- von Bargen, S., Martinez, O., Schadock, I., Eisold, A., Gossmann, M., Buttner, C., 2009. Genetic variability of phytopathogenic *Fusarium proliferatum* associated with crown rot in *Asparagus officinalis*. *J. Phytopathol.* 157, 446–456.
- Bojja, R.S., Cerny, R.L., Proctor, R.H., Du, L., 2004. Determining the biosynthetic sequence in the early steps of the fumonisin pathway by use of three gene disruption mutants of *F. verticillioides*. *J. Agric. Food Chem.* 52, 2855–2860.
- Busman, M., Desjardins, A.E., Proctor, R.H., 2012. Analysis of fumonisin contamination and the presence of *Fusarium* in wheat with kernel black point disease in the United States. *Food Addit. Contam. Part A* 29, 1092–1100.
- Castoria, R., Lima, G., Ferracane, R., Ritieni, A., 2005. Occurrence of mycotoxin in farro samples from southern Italy. *J. Food Prot.* 68, 416–420.
- Cendoya, E., Farnochi, M.C., Chulze, S.N., Ramirez, M.L., 2014a. Two-dimensional environmental profiles of growth and fumonisin production by *Fusarium proliferatum* on a wheat-based substrate. *Int. J. Food Microbiol.* 182–183, 9–17.
- Cendoya, E., Monge, M.P., Palacios, S., Chiachiera, S., Torres, A., Farnochi, M.C., Ramirez, M.L., 2014b. Fumonisin occurrence in naturally contaminated wheat grain harvested in Argentina. *Food Control* 37, 56–61.
- Charnley, L.L., Rosenber, A., Trenholm, H.L., 1994. Factors responsible for economic losses due to *Fusarium* mycotoxin contamination of grains, foods and feedstuffs. In: Miller, J.D., Trenholm, H.L. (Eds.), *Mycotoxins in Grain Compounds Other Than Aflatoxin*. Eagan Press, St Paul, MN, pp. 471–486.
- Chehri, K., Jahromi, S.T., Reddy, K., Abbasi, S., Salleh, B., 2010. Occurrence of *Fusarium* spp. and fumonisins in stored wheat grains marketed in Iran. *Toxins* 2, 2816–2823.
- Conner, R.L., Hwang, S.F., Stevens, R.R., 1996. *Fusarium proliferatum*: a new causal agent of black point in wheat. *Can. J. Plant Pathol.* 18, 419–423.
- Dallyn, H., Fox, A., 1980. Spoilage of material of reduced water activity by xerophilic fungi. In: Corry, J.E., Gould, G.H. (Eds.), *Microbial Growth and Survival in Extreme Environments*. Academic Press, London/New York, pp. 129–139.
- Desjardins, A., 2006. *Fusarium* Mycotoxins: Chemistry, Genetics and Biology. APS Press, St. Paul, MN, pp. 79–108.
- Desjardins, A.E., Proctor, R.H., 2007. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 47–50.
- Fanelli, F., Schmidt-Heydt, M., Haidukowski, M., Geisen, R., Logrieco, A., Mule, G., 2012. Influence of light on growth, fumonisin biosynthesis and *FUM1* gene expression by *Fusarium proliferatum*. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 148–153.
- Glass, N.L., Donaldson, G., 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *App. Environm. Microbiol.* 61, 1323–1330.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), 2002. Fumonisin B₁. IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. vol. 82. IARC, Lyon, France, pp. 301–366.
- Jakšić, S., Abramović, B., Jajić, I., Baloš, M.Ž., Mihajev, Ž., Despotović, V., Šojić, D., 2012. Co-occurrence of fumonisins and deoxynivalenol in wheat and maize harvested in Serbia. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 89, 615–619.
- Jurado, M., Marín, P., Callejas, C., Moretti, A., Vázquez, C., González-Jaén, M.T., 2010. Genetic variability and fumonisin production by *Fusarium proliferatum*. *Food Microbiol.* 27, 50–57.
- Kenényi, Z., Mulè, G., Moretti, A., Waalwijk, C., Hornok, L., 2002. Fertility and mating type assessment within *Fusarium proliferatum* isolates from different host plants. *J. Appl. Genet.* 43, 55–68.
- Klittich, C.J.R., Leslie, J.F., 1998. Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). *Genetics* 118, 417–423.
- Kohut, G., Adam, A.L., Fazekas, B., Hornok, L., 2009. N-starvation stress induced *FUM* gene expression and fumonisin production is mediated via the HOG-type MAPK pathway in *Fusarium proliferatum*. *Int. J. Food Microbiol.* 130, 65–69.
- Koressaar, T., Remm, M., 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23, 1289–1291.
- Kushiro, M., Zheng, Y., Nagata, R., Nakagawa, H., Nagashima, H., 2009. Limited surveillance of fumonisins in brown rice and wheat harvested in Japan. *J. Food Prot.* 72, 1327–1331.
- Leslie, J.F., Summerell, B.A., 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Professional, Ames, IA.
- López-Erassquin, E., Vázquez, C., Jiménez, M., González-Jaén, M.T., 2007. Real time RT-PCR assay to quantify the expression of *FUM1* and *FUM19* genes from the fumonisin-producing *Fusarium verticillioides*. *J. Microbiol. Methods* 68, 312–317.
- Marasas, W.F.O., Riley, R., Hendricks, K., Stevens, W.L., Sadler, T.W., Gelineau van Waes, J., Missmer, S.A., Cabrera, J., Torres, O., Gelderblom, W.C.A., Allegood, J., Martinez, C., Maddox, J., Miller, J.D., Starr, L., Sullards, M.C., Roman, A.V., Voss, K.A., Wang, E., Merrill Jr., A.H., 2004. Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *J. Nutr.* 134, 711–716.
- Marín, S., Magan, N., Ramos, A., Sanchis, V., 2004. Fumonisin-producing strains of *Fusarium*: a review of their ecophysiology. *J. Food Prot.* 67, 1792–1805.
- Marín, P., Magan, N., Vázquez, C., González-Jaén, M.T., 2010. Differential effect of environmental conditions on the growth and regulation of the fumonisin biosynthetic gene *FUM1* in the maize pathogens and fumonisin producers *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73, 303–311.
- Medina, A., Schmidt-Heydt, M., Cárdenas-Chávez, D., Parra, R., Geisen, R., Magan, N., 2013. Integrating toxin gene expression, growth and fumonisin B₁ and B₂ production by a strain of *Fusarium verticillioides* under different environmental conditions. *J. R. Soc. Interface* 10, 20130320.
- Mendes, R.L.G., Reis, A.T., Corrêa, B., Badiale-Furlong, E., 2015. Mycobiota and occurrence of fumonisin B₁ in wheat harvested in Southern Brazil. *Cienc. Rural*, 45, 1050–1057.
- Missmer, S., Suaz, L., Felkner, M., Wang, E., Merrill, A., Rothman, K., Hendricks, K., 2006. Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas–Mexico border. *Environ. Health Perspect.* 114, 237–241.
- Moretti, A., Mulè, G., Perrone, G., Ritieni, A., Botralico, A., D’Erchia, A.M., Logrieco, A., 1999. *Fusarium proliferatum* from various plants: fertility, toxigenicity, and characterization by RAPDs. *Bull. Inst. Comp. Agric. Sci. Kinki Univ.* 7, 27–36.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Marasas, W.F.O., 1983. *Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State Univ. Press, University Park, PA.
- Palacios, S.A., Ramirez, M.L., Cabrera Zalazar, M., Farnochi, M.C., Zappacosta, D., Chiachiera, S.M., Reynoso, M.M., Chulze, S.N., Torres, A.M., 2011. Occurrence of *Fusarium* spp. and fumonisin in durum wheat grains. *J. Agric. Food Chem.* 59, 12264–12269.
- Palacios, S.A., Susca, A., Haidukowski, M., Stea, G., Cendoya, E., Ramirez, M.L., Chulze, S.N., Farnochi, M.C., Moretti, A., Torres, A.M., 2015. Genetic variability and fumonisin production by *Fusarium proliferatum* isolated from durum wheat grains in Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* 201, 35–41.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, 2002–2007.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30, 1–10.
- Pinson-Gadais, L., Barreau, C., Chaurand, M., Gregoire, S., Monmarson, M., Richard-Forget, F., 2007. Distribution of toxigenic *Fusarium* spp. and mycotoxins production in milling fractions of durum wheat. *Food Addit. Contam.* 24, 53–62.
- Pons, N., Pinson-Gadais, L., Barreau, C., Richard-Forget, F., Ouellet, T., 2007. Exogenous H₂O₂ and catalase treatments interfere with Tri genes expression in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEBS Lett.* 581, 443–447.
- Proctor, R.H., Desjardins, A.E., Plattner, R.D., Hohn, T.M., 1999. A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Fungal Genet. Biol.* 27, 100–112.
- Proctor, R.H., Brown, D.W., Plattner, R.D., Desjardins, A.E., 2003. Coexpression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. *Fungal Genet. Biol.* 38, 237–249.
- Roscoe, V., Lombaert, G.A., Huel, V., Neumann, G., Melietto, J., Kitchen, D., Kotello, S., Krakalovich, T., Trella, R., Scott, P.M., 2008. Mycotoxins in breakfast cereals from the Canadian retail market: a 3-year survey. *Food Addit. Contam. A* 25, 347–355.
- Ryu, D., Munimbazi, C., Bullerman, L.B., 1999. Fumonisin B₁ production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* as affected by cycling temperatures. *J. Food Prot.* 62, 1456–1460.
- Seo, J.A., Proctor, R.H., Plattner, R.D., 2001. Characterization of four clustered coregulated genes associated with fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet. Biol.* 34, 155–165.
- Serrano, A.B., Font, G., Ruiz, M.J., Ferrer, E., 2012. Co-occurrence and risk assessment of mycotoxins in food and diet from Mediterranean area. *Food Chem.* 135, 423–429.
- Stankovic, Z.S., Levic, J., Krnjaja, V.S., Bocarov Stancic, A.S., Tancic, S.L., Kovacevic, T.M., 2007. Frequency of toxicogenic *Fusarium* species and fusariotoxins in wheat grain in Serbia. *Proc. Nat. Sci. Matrica Srpska Novi Sad* 113, 93–102.
- Stankovic, S., Levic, J., Ivanovic, D., Krnjaja, V., Stankovic, G., Tanci, S., 2012. Fumonisin B₁ and its co-occurrence with other fusariotoxins in naturally-contaminated wheat



- grain. Food Control 23, 384–388.
- Stepień, L., Koczyk, G., Waśkiewicz, A., 2011. Genetic and phenotypic variation of *Fusarium proliferatum* isolates from different host species. J. Appl. Genet. 52, 487–496.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G., 2012. Primer3 — new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Res. 40, e115.
- Wang, Y.-K., Shi, Y.-B., Zou, Q., Sun, J.-H., Chen, Z.-F., Wang, H., Li, S.-Q., Yan, Y.-X., 2013. Development of a rapid and simultaneous immunochromatographic assay for the determination of zearalenone and fumonisin B₁ in corn, wheat and feedstuff samples. Food Control 31, 180–188.
- Waśkiewicz, A., Stepień, L., Wilman, K., Kachlicki, P., 2013. Diversity of pea-associated *F. proliferatum* and *F. verticillioides* populations revealed by *FUM1* sequence analysis and fumonisin biosynthesis. Toxins 5, 488–503.

76139

95