



Universidad Nacional de Río Cuarto

Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales

Tesis para acceder al título de Doctor en Ciencias Biológicas

***Fusarium* Y SUS MICOTOXINAS EN PASTOS NATURALES  
DESTINADOS A LA ALIMENTACIÓN BOVINA**

Mic. María Julia Nichea

DIRECTOR: Dra. María Laura Ramirez

CO-DIRECTOR: Dra. Adriana Mabel Torres

Río Cuarto, Marzo 2019

COMISIÓN ASESORA y JURADO

Dra. María Alejandra Passone, Universidad Nacional de Río Cuarto

Firma.....

Dra. María Victoria Novas, Universidad de Buenos Aires

Firma.....

Dr. Mario Hugo Urbani, Universidad Nacional del Nordeste

Firma.....

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Universidad Nacional de Río Cuarto, 22 de Marzo de 2019

Calificación.....

**A CONICET por otorgarme un beca y brindarme los recursos necesarios para llevar a cabo esta tesis.**  
**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 y por las facilidades proporcionadas.**

## RESUMEN

La cadena agroalimentaria de la carne vacuna tiene una gran importancia en la economía nacional, siendo la exportación la clave del crecimiento de este sector. Los sistemas de producción de carne en nuestro país, se basan en la utilización directa, a través del pastoreo, del forraje proveniente de pasturas cultivadas, pastizales naturales y verdes estacionales. En Argentina, el uso de promotores de crecimiento para mejorar la producción, como es el uso de anabólicos está prohibido. Sin embargo, la presencia de la toxina fúngica zearalenona (ZEA) como contaminante natural en pastos destinadas al consumo animal, puede generar resultados falsos positivos en el control de anabólicos, por la aparición en orina de zeranól ( $\alpha$ -ZAL), un derivado del metabolismo de la toxina. En el presente trabajo de tesis, durante un primer estudio se muestrearon en julio de 2011 pastos naturales, pertenecientes a la familia Poaceae (106 muestras) de dos establecimientos ganaderos ubicados en los humedales de Chaco, en los cuales durante una inspección rutinaria del SENASA, en el año 2010, se había detectado zeranól en orina de bovinos que pastaban en los mismos, con dos objetivos: 1) evaluar la incidencia natural de micotoxinas de *Fusarium* mediante LC-MS/MS y 2) aislar e identificar las especies de *Fusarium* presentes. El análisis reveló la presencia de ZEA en el 90% de las muestras analizadas (concentración media 84,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), también se detectó  $\alpha$  y  $\beta$ -zearalenol. Además, se detectaron algunos metabolitos con probada toxicidad en ruminantes como son los tricotecenos tipo A, tales como toxina T-2 y toxina HT-2 los cuales estaban presentes en alta frecuencia, 63 y 50% respectivamente y en concentraciones superiores a 5000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en algunas muestras. Se encontraron también otros metabolitos producidos por *Fusarium* en muy alta frecuencia como beauvericina (BEA), equisetina y aurofusarina (AUF). El estudio micológico reveló que todas las muestras presentaban entre un 60 y 100% de contaminación con especies de *Fusarium*, y que la especie más frecuente encontrada fue *F. armeniacum*. Otras especies que se aislaron en menor frecuencia fueron: *F. semitectum*, *F. chlamyosporum*, *F. proliferatum*, *F. sporotrichioides*, y *F. equiseti*. Con el fin de dar respuesta a ciertos interrogantes, tales como, verificar si la presencia de ZEA y otros metabolitos en pastos naturales (no cultivados) es un evento frecuente o esporádico y dilucidar si existe variación temporal en las especies y micotoxinas de *Fusarium*, se amplió el estudio a distintas épocas del año. En el 2014 se muestrearon un total de 70 plantas que pertenecían a 13 géneros diferentes dentro de la familia Poaceae en dos periodos diferentes del año: febrero y septiembre. El análisis micológico reveló que todas las muestras estaban contaminadas con especies de *Fusarium* en niveles que variaron entre 60-100% independiente de la clasificación taxonómica de la planta y de la época de muestreo. *Fusarium armeniacum* resultó ser la especie encontrada con mayor frecuencia (50-100%). Otras especies encontradas con menor frecuencia fueron: *F. semitectum*, *F. verticillioides*, *F. chlamyosporum*, *F. sporotrichioides* entre otras. La mayoría de las muestras (98%) presentaron contaminación con micotoxinas, siendo las más prevalentes ZEA, T-2, BEA, HT-2 y AUF. También se encontraron con baja frecuencia otras micotoxinas producidas por *Fusarium* como: neosolaniol (NEO) y diacetoxiscirpenol (DAS). No se observaron diferencias significativas entre el tipo y los niveles de micotoxinas detectados entre los distintos géneros de Poaceae estudiados, ni con respecto a la época de muestreo. Estos resultados nos llevaron a concluir que tanto *Fusarium* como sus micotoxinas están presentes durante todo el año en los pastos estudiados. Los estudios de clasificación taxonómica de *Fusarium* se basaron en características morfológicas debido a la predominancia de una especie de la que sólo existen escasos reportes, decidimos estudiarla en mayor profundidad. En un primer momento se confirmó la identificación morfológica de 70 aislados (que incluían aislados del año 2011 como 2014) mediante el secuenciamiento de una porción del factor de elongación 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ). La comparación de las secuencias mediante BLAST con dos bases de datos (NCBI y Fusarium ID) reveló porcentajes de similitud entre 96 al 99% con *F. armeniacum*. Pero los resultados moleculares mostraron que los aislamientos no se agrupaban con cepas de referencia de *F. armeniacum* ni con otras emparentadas. Posteriormente, se re examinaron los cultivos y se encontró, corroborando los datos moleculares, que los aislados tenían una diferencia importante con *F. armeniacum*, la producción de microconidios. Para elucidar la identidad de estos aislados se realizó un análisis filogenético multilocus. Este análisis tanto por separado o combinando las secuencias de EF-1 $\alpha$  y RPB2 de nuestras cepas (antes denominadas *F. armeniacum*) formaron un único clado monofilético muy bien soportado por valores de bootstrap de 100% completamente separado de las cepas de *F. armeniacum*. Todos estos estudios nos permitieron inferir que estamos ante una nueva especie de *Fusarium* que hemos denominado como *F. chaquense* (Mycobank 821675). Como parte de la caracterización de esta nueva especie hemos determinado su perfil toxicogénico y el efecto de algunos parámetros abióticos importantes ( $a_w$  y temperatura) sobre el crecimiento y producción de micotoxinas a fin de aportar datos sobre su ecofisiología. Observamos que esta nueva especie puede producir principalmente tricotecenos tipo A y un bajo porcentaje de cepas también producen ZEA. El estudio ecofisiológico demostró que *F. chaquense* es un hongo muy ubicuo dado que fue capaz de crecer y producir micotoxinas en un amplio rango de  $a_w$  (0,91-0,995) y temperaturas (15-30 °C), lo que explicaría su alta prevalencia en los pastos que crecen en los humedales de Chaco.

## ABSTRACT

Extensive beef production is a distinctive feature of Argentina. Beef production is generally based on grazing native grasses and cultivated pastures. Nearly all the cattle are raised through grazing, with only 1.2% finished in corrals. Of particular concern to the Argentinean livestock industry is that zearalenone (ZEA) is chemically similar to the growth promoting  $\alpha$ -zearalanol (zeranol), which is banned in Argentina as well as in the EU. In the last 10 years, zeranol has been detected in bovine urine during the routine analysis of beef cattle farms (enrolled as EU exporter) as part of a national residue control plan by the central governing authority, the National Service for Health and Food Quality (SENASA). It is important to remark that on those cattle farms, the cattle were raised through grazing of natural grasses, without any external inputs beef cattle farms located at a Ramsar Wetland site (27°20'S 58°50'W, Ramsar site No. 1366) in Chaco province, in which a positive urine sample for zeranol from cattle had been previously found. The results showed that 90% were contaminated with ZEA (mean concentration: 84.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ),  $\alpha$  y  $\beta$ -zearalenol. Also, we were able to detect others important metabolites (toxic to ruminants) such as type A trichothecenes, mainly T-2 toxin and HT-2 toxin both at very high frequencies and levels. Other *Fusarium* metabolites that were found at very high frequencies were beauvericin (BEA), equisetin and aurofusarin (AUF). In a second study performed during 2014, the grasses samples were taken at to different periods: February and September, in order to probe that our first findings were not a sporadic event, and to probe that it is normal to find ZEA and other mycotoxins on natural grasses. We observed the same profile of common metabolites during both months of sampling and also the profile was shared during both years of sampling. The results showed that the occurrence of important metabolites is not a sporadic event. The mycological analysis of the grasses revealed that all the samples were contaminated with *Fusarium* species in levels ranging from 60 to 100% regardless the grass genera analyzed. Most of the isolates showed morphological features similar to *F. acuminatum*/*F. armeniacum*, but with some inconsistency. Most of the characteristics match *F. armeniacum*, but all our isolates produce microconidia, that, according to the description of this species did not produced. In order to solve this incongruence, we performed a chemical determination of the toxigenic profile in a small subset of isolates, because according to the literature, *F. armeniacum* is highly toxigenic and can produce trichothecenes type A. All isolates were able to produce type A trichothecenes mainly T-2, HT-2 and neosolaniol (NEO). Species identity for the 15 selected isolates was confirmed by elongation factor gene (EF-1 $\alpha$ ) and BLAST analysis with the NCBI database revealed 96 to 99% sequence identity to *F. armeniacum* reference strain. But the result of the BLAST analyses was not mirrored in the phylogenies because all the isolates formed part of a group that did not include *F. armeniacum* type strains or any other type strain. In order to clarify the identity of these isolates a strong phylogenetic analyses of a 2-gene dataset were performed. The results strongly supported the genealogical exclusivity of a new species: *F. chaquense* sp nov. with a strong monophyletic bootstrap support in the individual analysis of each gene and combined, being its closest relative *F. armeniacum*. The study also demonstrates that this new species could be a potent producer not only of T-2 and HT-2 but also of other trichothecenes A of concern, such as NEO, DAS, MAS and low levels of ZEA. The ecophysiological study performed with 2 strains of *F. chaquense* showed that this species has the ability to growth and produce mycotoxins over a broad range of water activities (0.91-0.99) and temperatures. These results could explain the high prevalence of this new species on natural grasses growing in a wetland ecosystem such as Chaco.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE TABLAS	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
ABREVIATURAS	XVI
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	
<b>I.1. La carne vacuna en Argentina</b>	1
<b>I.1.1. Producción y exportación</b>	1
<b>I.1.2. Uso de promotores de crecimiento en la alimentación bovina</b>	2
<b>I.1.3. Controles y las regulaciones del uso de anabólicos</b>	4
<b>I.2. Importancia de los pastizales naturales en Argentina</b>	5
<b>I.2.1. Importancia y generalidades de las gramíneas</b>	5
<b>I.2.2. El Chaco y sus ambientes</b>	6
<b>I.2.3. El Chaco Oriental</b>	7
<b>I.3. Género <i>Fusarium</i></b>	8
<b>I.3.1. Generalidades</b>	8
<b>I.3.2. Taxonomía y concepto de especie en <i>Fusarium</i></b>	9
<b>I.4. Identificación de las especies de <i>Fusarium</i></b>	13
<b>I.4.1. Identificación mediante criterios morfológicos</b>	13
<b>I.4.2. Identificación mediante técnicas moleculares</b>	16
<b>I.4.2.1. Técnicas moleculares de valor taxonómico</b>	16
<b>I.4.2.2. Genes utilizados en taxonomía molecular de <i>Fusarium</i></b>	18
<b>I.4.2.3. Importancia del factor de elongación 1-<math>\alpha</math> en <i>Fusarium</i></b>	20
<b>I.4.2.4. Importancia de la segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II en <i>Fusarium</i></b>	21
<b>I.5. Análisis filogenético</b>	22
<b>I.6. Micotoxinas</b>	23
<b>I.6.1. Generalidades</b>	23
<b>I.6.2. Factores que determinan el desarrollo fúngico y la producción de micotoxinas</b>	26
<b>I.7. Toxinas producidas por <i>Fusarium</i></b>	28
<b>I.7.1. Tricotecenos</b>	28
<b>I.7.1.1. Toxicidad de los tricotecenos en rumiantes</b>	30
<b>I.7.2. Fumonisinias</b>	30

I.7.2.1. Toxicidad de la fumonisina B <sub>1</sub> en rumiantes	34
I.7.3. Zearalenona	34
I.7.3.1. Toxicidad de la zearalenona en rumiantes	35
I.7.4. Micotoxinas emergentes producidas por <i>Fusarium</i>	36
<b>CAPÍTULO II. INCIDENCIA NATURAL DE MICOTOXINAS DE <i>Fusarium</i> EN PASTOS NATURALES DESTINADOS A LA ALIMENTACIÓN BOVINA</b>	
II. INTRODUCCIÓN	39
II. HIPÓTESIS	40
II. OBJETIVO GENERAL	40
II. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
II. MATERIALES Y MÉTODOS	40
II.1. Incidencia natural y variación estacional de micotoxinas del género <i>Fusarium</i> presentes en pastos naturales	40
II.1.1. Sitio de Muestreo	40
II.1.1.1. Muestreo realizado en establecimientos San Francisco y La Adela en el año 2011	41
II.1.1.2. Muestreo realizado en establecimiento San Francisco en el año 2014	41
II.1.2. Extracción de micotoxinas	42
II.1.3. Análisis de micotoxinas mediante LC-MS/MS	42
II.1.4. Análisis estadístico	44
II. RESULTADOS	46
II.1. Incidencia natural de micotoxinas del género <i>Fusarium</i> presentes en pastos naturales	46
II.2. Variación estacional de las micotoxinas del género <i>Fusarium</i> presentes en pastos naturales	48
II.3. Comparación entre las micotoxinas de <i>Fusarium</i> detectadas durante los dos años muestreados	50
II. DISCUSIÓN	52
<b>CAPÍTULO III. INCIDENCIA DE ESPECIES DE <i>Fusarium</i> PRESENTES EN PASTOS NATURALES</b>	
III. INTRODUCCIÓN	59
III. HIPÓTESIS	60
III. OBJETIVO GENERAL	60
III. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	60
III. MATERIALES Y MÉTODOS	60

III.1. Determinación de la incidencia de especies de <i>Fusarium</i> presentes en pastos naturales	60
III.1.1. Muestreo	60
III.1.2. Medios de cultivo y soluciones	61
III.1.3. Aislamiento de las especies de <i>Fusarium</i>	62
III.2. Identificación de las especies de <i>Fusarium</i> mediante marcadores morfológicos	62
III.3. Perfil toxicogénico de la especie de <i>Fusarium</i> predominante en pastos	63
III.3.1. Cepas	63
III.3.2. Producción de micotoxinas	63
III.3.3. Extracción de micotoxinas	63
III.3.4. Análisis de micotoxinas mediante LC-MS/MS	63
III.4. Identificación de la especie de <i>Fusarium</i> predominante mediante amplificación y secuenciamiento del factor de elongación	64
III.4.1. Producción de la biomasa fúngica	64
III.4.2. Extracción, purificación y cuantificación del ADN genómico	64
III.4.3. Amplificación y secuenciamiento del factor de elongación	64
III.5. Correlación entre las especies de <i>Fusarium</i> y la presencia de micotoxinas en pastos	65
III.6. Análisis de diversidad de especies del genero <i>Fusarium</i> en pastos	65
III.6.1. Índices de diversidad	65
III.6.2. Análisis estadístico	66
III. RESULTADOS	67
III.1. Aislamiento e identificación morfológica de las especies de <i>Fusarium</i> en pastos	67
III.2. Perfil toxicogénico de la especie de <i>Fusarium</i> predominante en pastos	70
III.3. Identificación molecular de la especie de <i>Fusarium</i> predominante en pastos	73
III.4. Correlación entre las especies del género <i>Fusarium</i> y la presencia de micotoxinas en pastos	73
III.5. Análisis de diversidad de especies del género <i>Fusarium</i> presentes en pastos	74
III. DISCUSIÓN	74
<b>CAPÍTULO IV. DESCRIPCIÓN DE UNA NUEVA ESPECIE PREDOMINANTE EN PASTOS</b>	
IV. INTRODUCCIÓN	78
IV. HIPÓTESIS	79
IV. OBJETIVO GENERAL	79
IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	79

<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>80</b>
<b>IV.1. Cepas utilizadas en el estudio</b>	<b>80</b>
<b>IV.2. Identificación molecular y análisis filogenético</b>	<b>80</b>
<b>IV.2.1. Producción de la biomasa fúngica</b>	<b>80</b>
<b>IV.2.2. Extracción, purificación y cuantificación del ADN genómico</b>	<b>80</b>
<b>IV.2.3. Amplificación y secuenciamiento del factor de elongación</b>	<b>80</b>
<b>IV.2.4. Amplificación y secuenciamiento de la subunidad beta de la ARN polimerasa II</b>	<b>84</b>
<b>IV.2.5. Análisis filogenético</b>	<b>85</b>
<b>IV.3. Perfil toxicogénico de cepas de <i>Fusarium chaquense</i></b>	<b>87</b>
<b>IV.3.1. Producción de micotoxinas</b>	<b>87</b>
<b>IV.3.2. Extracción de micotoxinas</b>	<b>87</b>
<b>IV.3.3. Análisis de micotoxinas mediante LC MS/MS</b>	<b>87</b>
<b>IV.4. Caracterización morfológica de la especie <i>Fusarium chaquense</i></b>	<b>87</b>
<b>IV.4.1. Descripción morfológica</b>	<b>87</b>
<b>IV.4.2. Herbario</b>	<b>88</b>
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>89</b>
<b>IV.1. Identificación molecular y análisis filogenético de cepas de <i>Fusarium</i> predominantes en pastos</b>	<b>89</b>
<b>IV.2. Perfil toxicogénico de las cepas de <i>Fusarium chaquense</i></b>	<b>94</b>
<b>IV.3. Taxonomía</b>	<b>97</b>
<b>IV. DISCUSIÓN</b>	<b>100</b>
<b>CAPÍTULO V. ECOFISIOLOGÍA DE <i>Fusarium chaquense</i> EN UN MEDIO DE CULTIVO A BASE DE PASTO</b>	
<b>V. INTRODUCCIÓN</b>	<b>103</b>
<b>V. HIPÓTESIS</b>	<b>104</b>
<b>V. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>104</b>
<b>V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>104</b>
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>104</b>
<b>V.1. Influencia de factores abióticos (actividad acuosa y temperatura) sobre el crecimiento de dos cepas de <i>Fusarium chaquense</i>, en un medio de cultivo a base de pasto</b>	<b>104</b>
<b>V.1.1. Cepas</b>	<b>104</b>
<b>V.1.2. Medio de cultivo</b>	<b>104</b>

<b>V.1.3.</b> Inoculación e incubación	105
<b>V.1.4.</b> Evaluación del crecimiento	105
<b>V.1.5.</b> Análisis estadístico	105
<b>V.2.</b> Influencia de factores abióticos (actividad acuosa y temperatura) sobre la producción de micotoxinas por dos cepas de <i>Fusarium chaquense</i> , en un medio de cultivo a base de pasto	106
<b>V.2.1.</b> Extracción de micotoxinas	106
<b>V.2.2.</b> Detección y cuantificación de las micotoxinas	106
<b>V.2.3.</b> Análisis estadístico	108
<b>V. RESULTADOS</b>	109
<b>V.1.</b> Influencia de factores abióticos (actividad acuosa y temperatura) sobre el crecimiento de dos cepas de <i>Fusarium chaquense</i> , en un medio de cultivo a base de pasto	109
<b>V.2.</b> Influencia de factores abióticos (actividad acuosa y temperatura) sobre la producción de micotoxinas por dos cepas de <i>Fusarium chaquense</i> , en un medio de cultivo a base de pasto	114
<b>V. DISCUSIÓN</b>	130
<b>CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	
<b>VI. Conclusiones</b>	134
<b>VI. Perspectivas Futuras</b>	136
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	137
<b>PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS</b>	160

## ÍNDICE DE TABLAS

### CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

<b>Tabla 1.</b>	Agentes anabólicos clasificados según su origen	3
<b>Tabla 2.</b>	Perfil de producción de micotoxinas por especies de <i>Fusarium</i>	32

### CAPÍTULO II. INCIDENCIA NATURAL DE MICOTOXINAS DE *Fusarium* EN PASTOS NATURALES DESTINADOS A LA ALIMENTACIÓN BOVINA

<b>Tabla 1.</b>	Parámetros utilizados para analizar las micotoxinas de <i>Fusarium</i> mediante LC-MS/MS	45
<b>Tabla 2.</b>	Concentraciones ( $\mu\text{g/ml}$ ) de metabolitos en la solución patrón utilizada en el ensayo de recuperación	46
<b>Tabla 3.</b>	Rendimiento del método incluyendo solo las micotoxinas detectadas	47
<b>Tabla 4.</b>	Niveles de contaminación con micotoxinas de <i>Fusarium</i> detectadas en muestras de pasto natural correspondientes al muestreo del año 2011	48
<b>Tabla 5.</b>	Niveles de contaminación con micotoxinas de <i>Fusarium</i> en pastos naturales durante ambos períodos de muestreo analizados	49

### CAPÍTULO III. INCIDENCIA DE ESPECIES DE *Fusarium* PRESENTES EN PASTOS NATURALES

<b>Tabla 1.</b>	Secuencia de los cebadores utilizados	65
<b>Tabla 2.</b>	Perfil de producción de micotoxinas de cepas de <i>Fusarium</i> predominantes	71
<b>Tabla 3.</b>	Identificación molecular a nivel de especie de las cepas de <i>Fusarium</i>	73
<b>Tabla 4.</b>	Índices de Simpson (1-D) y de Shannon ( $H'$ ) obtenidos en los Establecimientos San Francisco y La Adela	74

### CAPÍTULO IV. DESCRIPCIÓN DE UNA NUEVA ESPECIE PREDOMINANTE EN PASTOS

<b>Tabla 1.</b>	Características de las cepas utilizadas	81
<b>Tabla 2.</b>	Secuencia de los cebadores utilizados	84
<b>Tabla 3.</b>	Número de acceso del GenBank, hospedero y origen geográfico de las cepas de <i>Fusarium</i> utilizadas en el análisis filogenético	86
<b>Tabla 4.</b>	Perfil de producción de micotoxinas de cepas de <i>Fusarium chaquense</i>	95

### CAPÍTULO V. ECOFISIOLOGÍA DE *Fusarium chaquense* EN UN MEDIO DE CULTIVO A BASE DE PASTO

<b>Tabla 1.</b>	Análisis de la varianza del efecto de la actividad acuosa ( $a_w$ ), temperatura (T), cepas diferentes (C) y sus interacciones sobre la fase de latencia y velocidad de crecimiento de cepas de <i>Fusarium chaquense</i> en un medio a base de pasto	111
<b>Tabla 2.</b>	Influencia de la actividad acuosa ( $a_w$ ), temperatura (T) y cepas diferentes (C), sobre la fase de latencia y la velocidad de crecimiento por cepas de <i>Fusarium chaquense</i> sobre un medio a base de pasto	111
<b>Tabla 3.</b>	Análisis de varianza del efecto de la actividad de agua ( $a_w$ ), temperatura (T), días de incubación (D) y sus interacciones sobre la producción de toxina T-2 por <i>Fusarium chaquense</i> RC-J174 y RC-J283 en un medio de cultivo a base de pasto	117
<b>Tabla 4.</b>	Influencia de la actividad acuosa ( $a_w$ ), temperatura (T) y días de incubación (D) sobre la producción de toxina T-2 por <i>Fusarium chaquense</i> RC-J174 y RC-J283 en un medio de cultivo a base de pasto	117
<b>Tabla 5.</b>	Análisis de varianza del efecto de la actividad de agua ( $a_w$ ), temperatura (T), días de incubación (D) y sus interacciones sobre la producción de toxina HT-2 por <i>Fusarium chaquense</i> RC-J174 y RC-J283 en un medio de cultivo a base de pasto	121
<b>Tabla 6.</b>	Influencia de la actividad acuosa ( $a_w$ ), temperatura (T) y días de incubación (D) sobre la producción de toxina HT-2 por <i>Fusarium chaquense</i> RC-J174 y RC-J283 en un medio de cultivo a base de pasto	121
<b>Tabla 7.</b>	Análisis de varianza del efecto de la actividad de agua ( $a_w$ ), temperatura (T), días de incubación (D) y sus interacciones sobre la producción de zearalenona por <i>Fusarium chaquense</i> RC-J174 y RC-J283 en un medio de cultivo a base de pasto	125
<b>Tabla 8.</b>	Influencia de la actividad acuosa ( $a_w$ ), temperatura (T) y días de incubación (D) sobre la producción de zearalenona por <i>Fusarium chaquense</i> RC-J174 y RC-J283 en un medio de cultivo a base de pasto	125
<b>Tabla 9.</b>	Análisis de varianza del efecto de la actividad de agua ( $a_w$ ), temperatura (T), días de incubación (D) y sus interacciones sobre la producción de beauvericina por <i>Fusarium chaquense</i> RC-J174 y RC-J283 en un medio de cultivo a base de pasto	129
<b>Tabla 10.</b>	Influencia de la actividad acuosa ( $a_w$ ), temperatura (T) y días de incubación (D) sobre la producción de beauvericina por <i>Fusarium chaquense</i> RC-J174 y RC-J283 en un medio de cultivo a base de pasto	129

## ÍNDICE DE FIGURAS

### CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

- Figura 1.** Esquema de la espiguilla e inflorescencia de gramíneas. **A.** dibujo esquemático de una espiguilla típica y uniflora de gramíneas. GL1: gluma inferior, GL2: gluma superior, L: lemma, Pa: pálea, Lo: lodícula, E: estambre, C: carpelo. **B.** inflorescencia constituida por numerosas espiguillas. 6
- Figura 2.** Humedales de Chaco (SAyDS, 2006). 8
- Figura 3.** Relación entre los distintos sistemas taxonómicos (Nelson et al., 1983). 10
- Figura 4.** Características morfológicas utilizadas en la identificación de especies de *Fusarium*. **A-D.** formas típicas de macroconidios. **E-H.** formas de la célula apical del macroconidio. **I-L.** formas de la célula basal del macroconidio (Leslie y Summerell, 2006). 14
- Figura 5.** Formas de microconidios de diferentes especies de *Fusarium* **a)** fusiforme, **b)** ovalada, **c)** ovoide, **d)** ovoide con una base aplanada, lo que indica que los microconidios se formaron en cadena, **e)** alantoides, **f)** napiforme, **g)** piriforme, **h)** cornetes (Nelson et al., 1994). 15
- Figura 6.** Células conidiógenas y organización de los microconidios en relación a la célula conidiógena **A-B.** monofiálides, **C.** polifiálides, **D.** solitario (mesoconidios), **E.** falsas cabezas, **F.** cadenas (Nelson et al., 1983; Leslie y Summerell, 2006). 15
- Figura 7.** Clamidosporas de *Fusarium* sp. en aumento 400x **A-B.** solitaria terminal, **C.** agrupadas intercalar, **D.** en pares terminal, **E.** en cadena intercalar, **F.** en pares intercalar de textura lisa, **G.** solitaria intercalar de textura lisa, **H.** en pares intercalar de textura rugosa (Leslie y Summerell, 2006). 16
- Figura 8.** Estructura del gen del factor de elongación (*EF-1 $\alpha$* ) en *Fusarium*, con la localización de los cebadores (Geiser et al., 2004). 21
- Figura 9.** Mapa de la región RPB2, las cajas negras y los números anteriores representan los 12 motivos de aminoácidos que se conservan en todos los eucariotas. Las posiciones de los cebadores se representan mediante flechas. 22
- Figura 10.** Estructura química general de los tricotecenos tipo A (izquierda) y tipo B (derecha). Entre los del tipo A se incluyen: las toxinas T-2, HT-2, el DAS y el NEO; entre los del tipo B se incluyen el NIV, el 4-ANIV y el DON. 29

- Figura 11.** Estructura química de las principales fumonisinas. R1 y R2 indican los diferentes radicales que pueden ocupar los carbonos 5 y 10 en los tres tipos de fumonisinas de la serie B. 31
- Figura 12.** Estructura química de zearalenona y sus derivados. Posible relación entre las rutas que llevan a encontrar zeranol en orina de animales (Kennedy y col., 1998). 36
- Figura 13.** **A.** Estructura química del núcleo de las eniantinas y bauvericina. Con los diferentes radicales que ocupan diferentes residuos ácido N-metilamino libres. **B.** Estructura química de la moniliformina. 37

## **CAPÍTULO II. INCIDENCIA NATURAL DE MICOTOXINAS DE *Fusarium* EN PASTOS NATURALES DESTINADOS A LA ALIMENTACIÓN BOVINA**

- Figura 1.** Mapa indicando la localización de los establecimientos a partir de los cuales se obtuvieron las muestras de pasto. **1.** Establecimiento La Adela **2.** Establecimiento San Francisco. 42
- Figura 2.** Box-plots de las concentraciones de las toxinas de *Fusarium* en muestras de pastos naturales en los años 2011 y 2014. 51

## **CAPÍTULO III. INCIDENCIA DE ESPECIES DE *Fusarium* PRESENTES EN PASTOS NATURALES**

- Figura 1.** Porcentaje de infección con especies del género *Fusarium*, en muestras de pastos naturales destinadas al consumo animal, provenientes de los campos de la provincia de Chaco. **(A)** Establecimiento San Francisco **(B)** Establecimiento La Adela, analizadas en el año 2011. 68
- Figura 2.** Porcentaje de infección con especies del género *Fusarium*, en muestras de pastos naturales destinadas al consumo animal, provenientes del establecimiento San Francisco en los meses de **(A)** Febrero y **(B)** Septiembre en el año 2014. 69

## **CAPÍTULO IV. DESCRIPCIÓN DE UNA NUEVA ESPECIE PREDOMINANTE EN PASTOS**

- Figura 1.** Árbol más parsimonioso generado a partir de las secuencias del gen EF-1 $\alpha$ . La cepa *F. proliferatum* ITEM 2287 se usó como grupo externo. Los valores de *bootstrap* mayores al 50% se muestran en la parte superior de las ramas. 91
- Figura 2.** Uno de 2 árboles más parsimonioso generados a partir de las secuencias del gen RPB2. La cepa *Fusarium proliferatum* ITEM 2287 se usó como grupo externo. Los valores de *bootstrap* mayores al 50% se muestran en la parte superior de las ramas. 92

- Figura 3.** Árbol más parsimonioso generado a partir de los datos combinados de las secuencias del gen EF-1 $\alpha$  y del gen RPB2. La cepa *Fusarium proliferatum* ITEM 2287 se usó como grupo externo. Los valores de *bootstrap* mayores al 50% se muestran en la parte superior de las ramas. 93
- Figura 4.** Box-plot del perfil de micotoxinas producidas por *Fusarium chaquense* (n=número de cepas). 97
- Figura 5.** Características macroscópicas de *Fusarium chaquense* RC-J293 **A, B.** Colonia sobre agar hojas de clavel. **A.** Superficie de la colonia. Esporodoquio producido en hoja de clavel. **B.** Reverso de la colonia. **C, D.** Colonia sobre SNA. **C.** Superficie de la colonia. **D.** Reverso de la colonia. **E, F.** Color de la colonia en PDA. **E.** Superficie de la colonia. **F.** Reverso de la colonia. 98
- Figura 6.** Velocidad de crecimiento (mm/día) de *Fusarium chaquense* RC-J293 cultivado en PDA en oscuridad a diferentes temperaturas (5°C–35°C). Los puntos y barras de error representan las medias y desviaciones estándar de los valores. La línea gris es una tendencia ajustada a los datos. 99
- Figura 7.** Características morfológicas de *Fusarium chaquense* RC-J293. **A.** Falsas cabezas de microconidios en monofialides **B.** Clamidosporas **C.** Macroconidios multiseptados de esporodoquio (la flecha indica la forma de pie) **D.** Microconidios con 0 y 1 septo **E.** Monofialides cortas. 99

## CAPÍTULO V. ECOFISIOLOGÍA DE *Fusarium chaquense* EN UN MEDIO DE CULTIVO A BASE DE PASTO

- Figura 1.** Efecto de la actividad acuosa y la temperatura sobre la fase de latencia (valores medios) de *Fusarium chaquense* RC-J174 (**A**) y RC-J283 (**B**), crecidas en un medio a base de pasto. Las barras de error representan el desvío estándar para los triplicados. 110
- Figura 2.** Efecto de la actividad acuosa y la temperatura sobre la velocidad de crecimiento (valores medios) de *Fusarium chaquense* RC-J174 (**A**) y RC-J283 (**B**), crecidas en un medio a base de pasto. Las barras de error representan el desvío estándar para los triplicados. 112
- Figura 3.** Mapas de contorno de *Fusarium chaquense* RC-J174(**A**) y RC-J283 (**B**), en relación a la actividad de agua y a la temperatura. Los números en la escala se refieren a la velocidad de crecimiento (mm/día). 113
- Figura 4.** Niveles medios de toxina T-2 ( $\mu\text{g/g}$ ) producidos por *Fusarium chaquense* RC-J174 y RC-J283, en un medio de cultivo a base de pasto ajustado a diferentes niveles de actividad de agua y temperatura, a diferentes tiempos de incubación (5 días  $\square$ , 15 días  $\blacksquare$ , 25 días  $\blacksquare$ ). 115

- Figura 5.** Mapas de contorno de *Fusarium chaquense* RC-J174 (A) y RC-J238 (B), en relación a la actividad de agua y a la temperatura. Los números en la escala se refieren a los niveles medios de toxina T-2 ( $\mu\text{g/g}$ ). 116
- Figura 6.** Niveles medios de toxina HT-2 ( $\mu\text{g/g}$ ) producidos por *Fusarium chaquense* RC-J174 y RC-J283, en un medio de cultivo a base de pasto ajustado a diferentes niveles de actividad de agua y temperatura, a diferentes tiempos de incubación (5 días , 15 días , 25 días ). 119
- Figura 7.** Mapas de contorno de *Fusarium chaquense* RC-J174 (A) y RC-J238 (B), en relación a la actividad de agua y a la temperatura. Los números en la escala se refieren a los niveles medios de toxina HT-2 ( $\mu\text{g/g}$ ). 120
- Figura 8.** Niveles medios de zearalenona ( $\mu\text{g/kg}$ ) producidos por *Fusarium chaquense* RC-J174 y RC-J283, en un medio de cultivo a base de pasto ajustado a diferentes niveles de actividad de agua y temperatura, a diferentes tiempos de incubación (5 días , 15 días , 25 días ). 123
- Figura 9.** Mapas de contorno de *Fusarium chaquense* RC-J174 (A) y RC-J238 (B), en relación a la actividad de agua y a la temperatura. Los números en la escala se refieren a los niveles medios de zearalenona ( $\mu\text{g/kg}$ ). 124
- Figura 10.** Niveles medios de beauvericina ( $\mu\text{g/g}$ ) producidos por *Fusarium chaquense* RC-J174 y RC-J283, en un medio de cultivo a base de pasto ajustado a diferentes niveles de actividad de agua y temperatura, a diferentes tiempos de incubación (5 días , 15 días , 25 días ). 127
- Figura 11.** Mapas de contorno de *Fusarium chaquense*, RC-J174 (A) y RC-J238 (B), en relación a la actividad de agua y a la temperatura. Los números en la escala se refieren a los niveles medios de beauvericina ( $\mu\text{g/g}$ ). 128

## ABREVIATURAS

°C	Grado centígrado
15-ADON	15-acetildeoxinivalenol
3-ADON	3-acetildeoxinivalenol
4-ANIV	4-acetilnivalenol
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFB <sub>1</sub>	Aflatoxina B <sub>1</sub>
AFs	Aflatoxinas
ANOVA	Análisis de la Varianza
APG	Agar papa glucosado
ARN	Ácido Ribonucléico
ARNm	ARN mensajero
AUF	Aurofusarina
a <sub>w</sub>	Actividad de agua
BEA	Beauvericina
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CAL	Calmodulina
CE	Energía de colisión
CLA	Agar Hojas de Clavel
CM	Cuadrado medio
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CODEX	Codex Alimentarius
CV	Voltaje de cono
d.i	Diámetro interno
DAS	Diacetoxiscirpenol
dNTP	Deoxinucleótido Trifosfato
DOM-1	dieno 12,13-de-epoxideoxinivalenol
DON	Deoxinivalenol
DON-3-G	Deoxinivalenol -3- glucosido
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetracético
<i>EF-1α</i>	Gen codificador del Factor de Elongación 1α
ENN A	Enniatina A
ENN A1	Enniatina A1
ENN B	Enniatina B
ENN B1	Enniatina B1
ENN B2	Enniatina B2
ENN B3	Enniatina B3
ENNs	Enniatinas
F	F-Snedecor
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> . Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FB <sub>1</sub>	Fumonisina B <sub>1</sub>

FB <sub>2</sub>	Fumonisina B <sub>2</sub>
FB <sub>3</sub>	Fumonisina B <sub>3</sub>
FB <sub>4</sub>	Fumonisina B <sub>4</sub>
FB <sub>6</sub>	Fumonisina B <sub>6</sub>
FBs	Fumonisinas
FCSC	Complejo de especies de <i>F. chlamydosporum</i>
FFSC	Complejo de especies de <i>F. fujikuroi</i>
FIESC	Complejo de especies de <i>F. incarnatum-equiseti</i>
FOSC	Complejo de especies de <i>F. oxysporum</i>
FSAMSC	Complejo de especies de <i>F. sambucinum</i>
FSSC	Complejo de especies de <i>F. solani</i>
FTSC	Complejo de especies de <i>F. tricinctum</i>
FV	Fuente de variación
g	Gramo
GC-MS	Cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas
GenBank	<i>International Nucleotide Sequence Database</i>
gl	Grados de libertad
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
HPLC-MS/MS	Cromatografía líquida de Alta Eficacia acoplada a un espectrómetro de masa
HT-2	Toxina HT-2
HT-2-G	Toxina HT-2 glucosido
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
ITS	Regiones espaciadoras internas
Kg	Kilogramo
L	Litro
LD	Límite de detección
MAS	Monoacetoxiscirpenol
MERCOSUR	Mercado Común del Sur
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
Mm	Milímetro
MON	Moniliformina
N <sub>2</sub>	Nitrogeno gaseoso
ND	No detectado
NEO	Neosolaniol
ng	Nanogramo
NIV	Nivalenol
nm	Nanómetro
O <sub>2</sub>	Oxígeno
OTA	Ocratoxina A
Pb	Pares de Bases

PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PM	Peso molecular
RPB2	Segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II
rpm	Revoluciones por minuto
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
SNA	Agar Spezieller Nährstoffarmer
<i>sp.</i>	Especie
<i>spp.</i>	Especies
T-2	Toxina T-2
T2-TE	T-2 Tetraol
T2-TR	T-2 Triol
TAE	Tampón Tris-Acetato y EDTA
$t_R$	Tiempo de retención
TUB	$\beta$ -tubulina
UE	Unión Europea
UV	Ultravioleta
WHO	<i>World Health Organization</i> . Organización Mundial de la Salud
ZAN	Zearalanona
ZEA	Zearalenona
ZEA-4-G	Zearalenona-4-glucosido
ZEA-4S	Zearalenona-4-sulfato
$\alpha$ -ZAL	$\alpha$ -zearalanol
$\alpha$ -ZAL-G	$\alpha$ -zearalanol glucosido
$\alpha$ -ZEA	$\alpha$ -zearalenol
$\beta$ -ZAL	$\beta$ -zearalanol
$\beta$ -ZEA	$\beta$ -zearalenol
$\beta$ -ZEA-G	$\beta$ -zearalenol glucosido
$\mu$ g	Microgramo
$\mu$ l	Microlitro
Mm	Micrómetro

# **CAPÍTULO I**

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

### I.1. La carne vacuna en Argentina

#### I.1.1. Producción y exportación

La producción de carne en Argentina se ha basado en el aprovechamiento de las condiciones naturales que le dan ventajas comparativas a nivel mundial, con una ganadería tradicionalmente extensiva y pastoril. Sólo se utilizan alimentos procesados o concentrados en forma estratégica, cuando las necesidades nutricionales de los animales lo exigen. El fundamento de dicho sistema es utilizar un alimento de bajo costo como lo es el pastoreo directo de pastizales naturales, pasturas perennes y verdeos estacionales en lugar de suministrar forrajes procesados o concentrados (Santini et al., 1995).

Se conoce que la composición de la carne depende, entre otros factores como raza y edad, del régimen de alimentación al que son sometidos los animales (Marmer et al., 1984). Se ha demostrado que la carne que produce Argentina en sus sistemas pastoriles tiene menor contenido de grasa intramuscular y colesterol que la producida en los sistemas intensivos con alimentación en base a granos (Rearte, 1994; Rearte y Pieroni, 2001). En la actividad de cría, la base de la alimentación la constituyen pastizales naturales y en menor escala pasturas con mezclas de gramíneas y leguminosas (Gómez et al., 1991). Existen productores que suelen recurrir al final del ciclo a la suplementación con concentrados, básicamente granos de maíz, sorgo, cebada o avena en menor escala, para acelerar el engorde y asegurar la deposición de grasa de cobertura mínima requerida por el mercado. Los niveles de suplementación son variables, pero en promedio no superan el 30% del total de materia seca consumida (García y Santini, 1996).

Según la Cámara de la Industria Cárnica Argentina (CICCRA) la producción de carne vacuna durante el año 2018 se ubicó en aproximadamente 3,05 millones de toneladas equivalente res con hueso de carne vacuna, es decir 7,3 % más que el año 2017, destinándose 555 mil toneladas res con hueso a los mercados de exportación. A su vez, el mercado interno absorbió un total de 2,49 millones de toneladas, 1,4% menos que en igual período del año anterior. Como contrapartida, el consumo per cápita de carne vacuna bajó 2,4% ubicándose en 56,1 kg/año, por debajo del promedio de 2017 (Solo Campo, 2019).

Los principales países importadores de carne Argentina en estos últimos años han sido China, Rusia, Chile y los países de la Unión Europea (UE) como Alemania, Italia y Holanda, entre otros (IPCVA, 2018). Es importante remarcar la apertura de Japón para

cortes procedentes de la Patagonia argentina y la reapertura de los Estados Unidos luego de casi 18 años de registrarse los últimos embarques a ese destino (Infocampo, 2018).

La UE otorga a países productores y exportadores de carnes un cupo de exportación de carne vacuna sin hueso de alta calidad y valor, denominado Cuota Hilton. El origen de la Cuota Hilton proviene de un acuerdo comercial dado en el marco de las Negociaciones Multilaterales Comerciales del GATT (Acuerdo General de Aranceles y Comercio) en la llamada Rueda de Tokio, en el año 1979. En esa rueda la Unión Europea acordó asignar un cupo para realizar exportaciones a su mercado de cortes vacunos de alta calidad. La cuota se cubre con cortes de carne de vacuno procedentes de novillos, novillitos o vaquillonas que han sido alimentados exclusivamente con pasturas desde su destete. Estos animales no tienen que haber recibido anabólicos, ni haber sido alimentados con harinas o alimentos industrializados ni haberse encontrado en confinamiento. Los cortes Hilton que integran la cuota son cortes enfriados y deshuesados de bife angosto, bife ancho, cuadril, lomo, nalga, bola de lomo, cuadrada y peceto. La distribución de la cuota Hilton en Argentina está bajo el control de la Oficina Nacional de Control del Comercio Agropecuario (ONCCA 2010).

### **I.1.2. Uso de promotores de crecimiento en la alimentación bovina**

Numerosos países con sistemas intensivos de producción de carne utilizan anabólicos para mejorar la producción, especialmente la velocidad de crecimiento y la conversión alimenticia. El objetivo de su utilización es acortar el período de producción y así disminuir el insumo más caro que es el tiempo (Larrea y Chirinos, 2007)

El uso de agentes anabólicos con actividad no hormonal es uno de los métodos no genéticos para modificar el potencial de crecimiento de los animales. Los estimuladores del crecimiento ejercen una acción sobre el anabolismo proteico produciendo una mayor cantidad de músculo o carne en proporción apreciable, con un contenido menor de grasa (Larrea y Chirinos, 2007) Se define como anabólico esteroide cualquier compuesto o mezcla de compuestos que afectan la función metabólica del animal para incrementar la cantidad de proteína corporal. Estos compuestos pueden ser de origen endógeno (naturales) o sintéticos (Tabla 1).

Entre los agentes anabólicos más conocidos y empleados en la cría vacuna se encuentra el zeranol (Ralgro), un compuesto de origen sintético no estilbénico (Bavera et al., 2002). Los análisis de residuos de zeranol en orina se realizan a través de cromatografía gaseosa asociada a espectrometría de masa (GC-MS) (SENASA, 2007). Esta es una de las técnicas más utilizadas en la detección de residuos de

medicamentos veterinarios, ya que los límites de detección para algunas sustancias son realmente bajos (Huertos Hidalgo, 2004). Una de las muestras utilizadas para la detección de anabólicos en animales es la orina, las muestras de orina se congelan después de su toma y se mantienen así hasta el momento de su análisis. La orina es un fluido biológico que no necesita homogenización, pero sí centrifugación para eliminar partículas en suspensión. Después de centrifugar se toma una alícuota, se diluye con buffer y se ajusta el pH (Reig Riera, 2010).

**Tabla 1.** Agentes anabólicos clasificados según su origen

ORIGEN	CLASIFICACIÓN	SUSTANCIAS QUIMICAS
<b>Naturales</b>	Agonistas $\beta$ adrenérgicos	Epinefrina Nor-epinefrina
	Hormonas	17- $\beta$ estradiol 17- $\alpha$ estradiol Testosterona Progesterona Somatotrofina Factores liberadores de la somatotrofina
<b>Sintéticos</b>	No estilbénicos	Melengestrol Zeranol Trembolona
	Estilbénicos	Dietilestilbestrol Dienestrol
	Betadrenérgicos	Clembuterol Cimaterol Fenoterol

(Bavera et al., 2002)

La UE prohíbe la utilización de anabólicos y hormonas como promotores de crecimiento del ganado en su territorio (Bavera et al., 2002). Por lo tanto, este tema debe ser analizado no sólo desde el punto de vista técnico, sino también por sus implicancias comerciales y políticas. Estas restricciones han desarrollado una polémica internacional debido a que las hormonas, como todas las sustancias medicamentosas y químicas, dejan en general residuos en las carnes que pueden ser detectados por sofisticados métodos aún en concentraciones muy bajas. Sin embargo, existen dudas sobre si estos residuos pueden significar un riesgo para el consumidor. En el ámbito de la UE la prohibición del uso de las hormonas y anabólicos como engordadores de ganado se remonta a 1985. Esta medida permite, sin embargo, bajo vigilancia veterinaria, el uso de las hormonas como terapéuticos, excepto en la forma de implantes, como así mismo la fabricación de la misma en territorio de la Comunidad. La UE exige a aquellos países exportadores de carne los mismos controles o garantías equivalentes a sus normas sanitarias. Esto implica que las

carnes producidas en nuestro país deben provenir de animales que nunca hayan sido tratados con hormonas. Esta prohibición del uso de hormonas va acompañada de normas que controlan sus residuos en las carnes por medio de metodologías que se basan en técnicas de cromatografía y de radioinmunoanálisis, con las cuales se pueden determinar metabolitos en el orden de partes por trillón (Bavera et al., 2002, Larrea y Chirinos, 2007).

### **I.1.3. Controles y las regulaciones del uso de anabólicos**

En Argentina, el uso de compuestos anabólicos para la producción de carne bovina está regulada por el Codex Alimentarius, el SENASA y por normativas internacionales (Aráoz, 2004). A nivel internacional, la primera referencia es el Codex Alimentarius, por ser actualmente el marco legal que rige el comercio internacional de acuerdo a lo resuelto por la Organización Mundial del Comercio (OMC) en 1994 y, subsidiariamente se deberán cumplir las normas de los países importadores en particular, siempre que sus exigencias no contravengan las normas del Codex y supongan simples barreras para-arancelarias. Las legislaciones del Mercado Común del Sur (MERCOSUR) y del Código Alimentario Argentina (CAA) siguen las directrices del Codex y en aquellos aspectos, que lo consideren oportuno, adoptan criterios propios o aún de las legislaciones de la Unión Europea, de Canadá, de los Estados Unidos u otros países; que por la relevancia de sus estudios científicos sobre drogas y sustancias objeto de análisis, contribuyen al esclarecimiento sobre el comportamiento y seguridad de las sustancias en cuestión. Las resoluciones del MERCOSUR, a partir de la armonización legislativa para sus países miembros, produjo un avance sustancial en este terreno, actualizando y complementando la legislación bromatológica en general. En el caso de nuestro país, la legislación contiene alrededor de 30 resoluciones específicas para residuos de medicamentos, anabólicos y otras sustancias promotoras del crecimiento, siendo uno de los primeros países en prohibir el uso de hormonas sexuales femeninas con fines anabolizantes en animales de carnicería, incluyendo toda sustancia de actividad estrogénica, sean naturales o sintéticas, aplicadas por cualquier vía (implantación, inyección, ingestión, etc.) tal como lo dice el Decreto N° 4224 del 26 de mayo 1961. Esta preocupación temprana está fundada en la importancia que tiene para el país, la exportación de productos agrícolas y ganaderos, base de nuestra economía. El no cumplimiento de parámetros de inocuidad podría dar lugar a sanciones comerciales y pérdidas de mercados que serían de difícil recuperación (Davicino, 2012).

La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación a partir del año 1997 (Resolución N° 515/97 SAGPYA 4/8/97) restringe el uso veterinario de zeranol, trembolona, nandrolona y otras sustancias con actividad anabolizante, en animales destinados para consumo humano en la UE y otros países donde se prohíba el uso de sustancias anabolizantes (Alvarado, 2011).

## **I.2. Importancia de los pastizales naturales en Argentina**

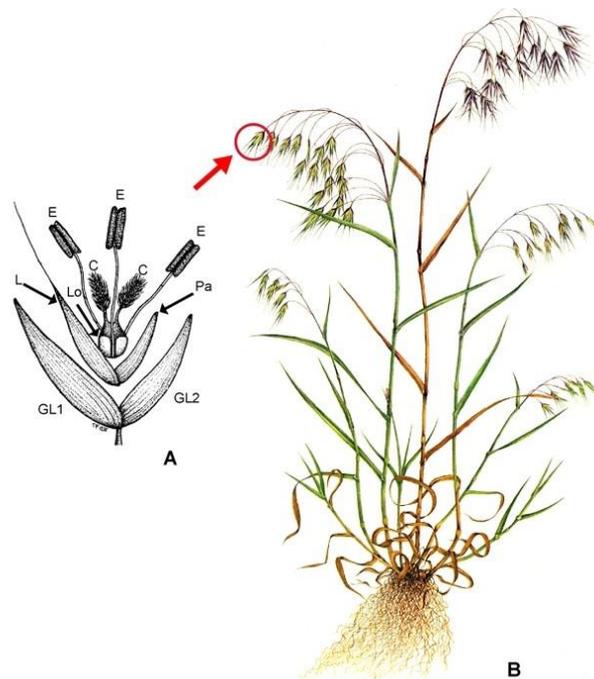
### **I.2.1. Importancia y generalidades de las gramíneas**

El 70 % de la superficie continental Argentina está cubierta por pastizales naturales. En casi toda esa superficie, la existencia de este recurso forrajero obedece a limitaciones de suelo o clima que hacen imposible la introducción de especies cultivadas; de este modo, el tapiz natural es el único recurso disponible para la ganadería. La naturaleza preservó durante miles de años estos pastizales, que seguramente se mantuvieron en su situación clímax hasta que el hombre intervino de distintas maneras. Y es el hombre, con manejos equivocados, quien puede degradar en pocos años lo que la naturaleza vino preservando a través de milenios. La expansión irreversible de la frontera agrícola hacia zonas antes marginales para esta actividad, hizo que la invernada ocupara zonas antes de cría y que esta última se fuera concentrando en áreas donde es la única actividad con posibilidades económicas de realizarse, a excepción de algunas otras como la cría caprina, por ejemplo (Beguet, 2002).

La familia Poaceae (Gramíneas) constituye una de las cinco familias más ricas en especies dentro del reino vegetal y es, taxonómica y ecológicamente, uno de los grupos más importantes en el mundo. Es importante mencionar también que muchas de las especies de la familia Poaceae son el componente principal de los pastizales naturales. Las gramíneas además de su valor como cereales para el hombre y animales, tienen una gran importancia económica por la cantidad de especies que se usan como forrajeras (de inmenso valor para la ganadería local) (GPWG, 2001).

Las gramíneas se distinguen del resto de las Angiospermas por características del fruto, embrión, polen y estructura de sus flores e inflorescencias (GPWG, 2001). El fruto es una cariopsis que se caracteriza por ser uniseminado con el tegumento externo que se desarrolla fusionado a la pared interna del ovario. El embrión es lateral, pero a diferencia del resto de los embriones de las Monocotiledóneas, está altamente especializado dado que los meristemas del tallo y la raíz, las hojas y el sistema vascular están claramente diferenciados en esta etapa del desarrollo. El polen de las gramíneas se distingue por poseer un único poro. Uno de los aspectos más novedosos

e interesantes de esta familia es la morfología de sus flores y con ello la aparición de las estructuras conocidas como espiguillas: la espiguilla típica de las gramíneas consta de un eje o raquilla que sostiene a una serie de brácteas de disposición alterna dística y a los verticilos florales (Figura 1A). Las dos brácteas basales son estériles y se las conoce con el nombre de glumas (gluma inferior y gluma superior, GL1 y GL2). Por arriba de las glumas se inserta una bráctea llamada lemma (L) y un órgano similar a un profilo conocido como pálea (Pa), homologos a los sépalos. Por encima de estos órganos se desarrollan dos o tres estructuras llamadas lodículas (homólogos a pétalos) (Lo), las que intervienen en la antesis floral, tres o, menos frecuentemente, seis estambres (E) y los carpelos (C). En cuanto a la disposición de las espiguillas, éstas se ubican sobre un amplio espectro de sistemas de ramificación de inflorescencias, las que han sido definidas clásicamente como “espigas de espiguillas”, “racimos de espiguillas” o “panojas de espiguillas” (Figura 1B). Cabe destacar que se puede encontrar un extenso rango de variación dentro de cada uno de estos tipos generales de inflorescencias (Ambrose et al., 2000; Bommert et al., 2005).



**Figura 1.** Esquema de la espiguilla e inflorescencia de gramíneas. **A.** dibujo esquemático de una espiguilla típica y uniflora de gramíneas. GL1: gluma inferior, GL2: gluma superior, L: lemma, Pa: pálea, Lo: lodícula, E: estambre, C: carpelo. **B.** inflorescencia constituida por numerosas espiguillas.

### **I.2.2. El Chaco y sus ambientes**

El área chaqueña abarca una inmensa planicie que se extiende desde los Esteros del Iberá y Río Paraguay hasta las Sierras Subandinas y Pampeanas en el Oeste (Molina y Rógulo de Agrasar, 2006). Teniendo en cuenta sus características climáticas y ecológicas el Chaco puede dividirse, en líneas generales, en tres grandes ambientes o regiones naturales: el Chaco Oriental o Húmedo, el Chaco Central o de Transición y el Chaco Occidental o Seco. Esto está especialmente vinculado con la disminución hacia el oeste de las precipitaciones y por ende de la humedad ambiente, factor que incide en la distribución, acumulación y escurrimientos de las aguas, asociado esto a la topografía de escasa pendiente y pequeñas variaciones locales, que determinan un mosaico de paisajes que reflejan diferentes fisonomías vegetales (Alberto, 2018).

Una gran cantidad de gramíneas nativas conforman las pasturas naturales de la flora chaqueña, tales como especies de *Bromus* L., *Festuca* L., *Hordeum* L., *Poa* L., *Agrostis* L., *Elymus* L. y *Stipa* L. entre las invernales y especies de *Paspalum* L., *Setaria* P. Beauv., *Eragrostis* Wolf, *Andropogon* L., *Bothriochloa* Kuntze, entre otras, son valiosas forrajeras estivales (Molina y Rógulo de Agrasar, 2006).

### **I.2.3. Chaco Oriental**

El Chaco Oriental está marcado por una mayor pluviosidad, con registros que oscilan entre 1.000 mm y 1.200 mm, al año, lo que determina una riqueza de ambientes acuáticos que se alternan con otros más secos (Alberto, 2018). La vegetación predominante es el bosque xerófilo caducifolio, pero también hay palmares, sabanas, estepas halófitas, etc. (Molina y Rógulo de Agrasar, 2006). Las Sabanas, por su parte, conforman un paisaje dominado por hierbas medias y altas, imperando las Gramíneas (*Elyonurus*, *Andropogon*, *Spartina*, *Paspalum*, *Aristida*, etc) acompañadas por otras herbáceas y sufrútices, siendo comunes varias especies de las familias compuestas, leguminosas, euforbiáceas, malváceas y rubiáceas. El componente leñoso, hacia el eje fluvial Paraguay – Paraná, está constituido principalmente en suelos alcalinos por palmares de Caranday (*Copernicia alba*), mezcladas con ejemplares de árboles bajos y arbustos, aislados o formando isletas boscosas, como algarrobos (*Prosopis*), Chañares (*Geoffroea decorticans*), entre otros (Alberto et al., 2018).

A partir del año 2004 parte del Chaco Oriental fue designado e inscripto como sitio Humedales del Chaco en el listado de la Convención sobre los Humedales o Convención de Ramsar; éste comprende un área de 508.000 ha, localizada en la franja oriental de los departamentos San Fernando, 1º de Mayo y Bermejo sobre el eje fluvial Paraguay-Paraná. Se extiende por el Este del Chaco abarcando la confluencia

del río Paraná con el Paraguay y todo el sistema de afluentes locales con su planicie de inundación. Esta rica red hidrográfica otorga al paisaje fisonomías distintivas, tanto en su composición (alta biodiversidad) como en su dinámica dentro del ecosistema (Figura 2) (SAyDS, 2006).

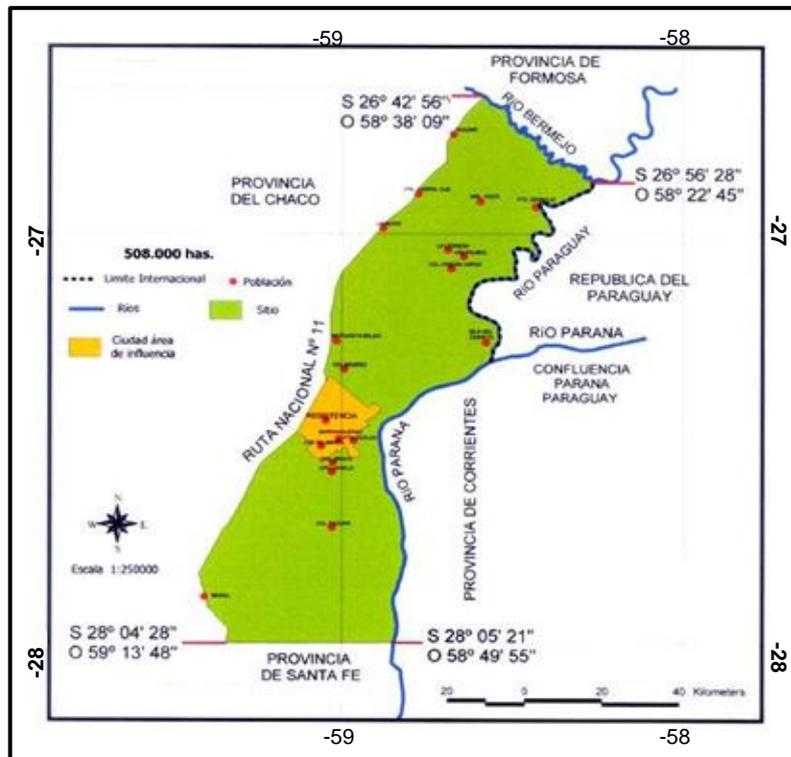


Figura 2. Humedales de Chaco (SAyDS, 2006).

### I.3. Genero *Fusarium*

#### I.3.1. Generalidades

El género *Fusarium* se encuentra dentro de la división Ascomycota, clase Euascomyctes, orden Hypocreales y familia Hypocreaceae. La fase sexual o perfecta (también llamada teleomorfo) se encuentra en los géneros *Albonectria*, *Gibberella* y *Haematonectria* (Leslie y Summerell, 2006). Debido a los cambios producidos en el nuevo Código Internacional de Nomenclatura para algas, hongos y plantas (ICNafp, 2018), a partir del año 2013 sólo se permite la asignación de un único nombre científico para nuevos hongos holomorfos que producen teleomorfo (fase sexual), como es *Fusarium*, y además se apuesta por la unificación de esta doble nomenclatura preexistente y solamente utilizar el nombre del estado anamorfo. Esta propuesta ha sido ampliamente aceptada por la comunidad científica, que apoya el

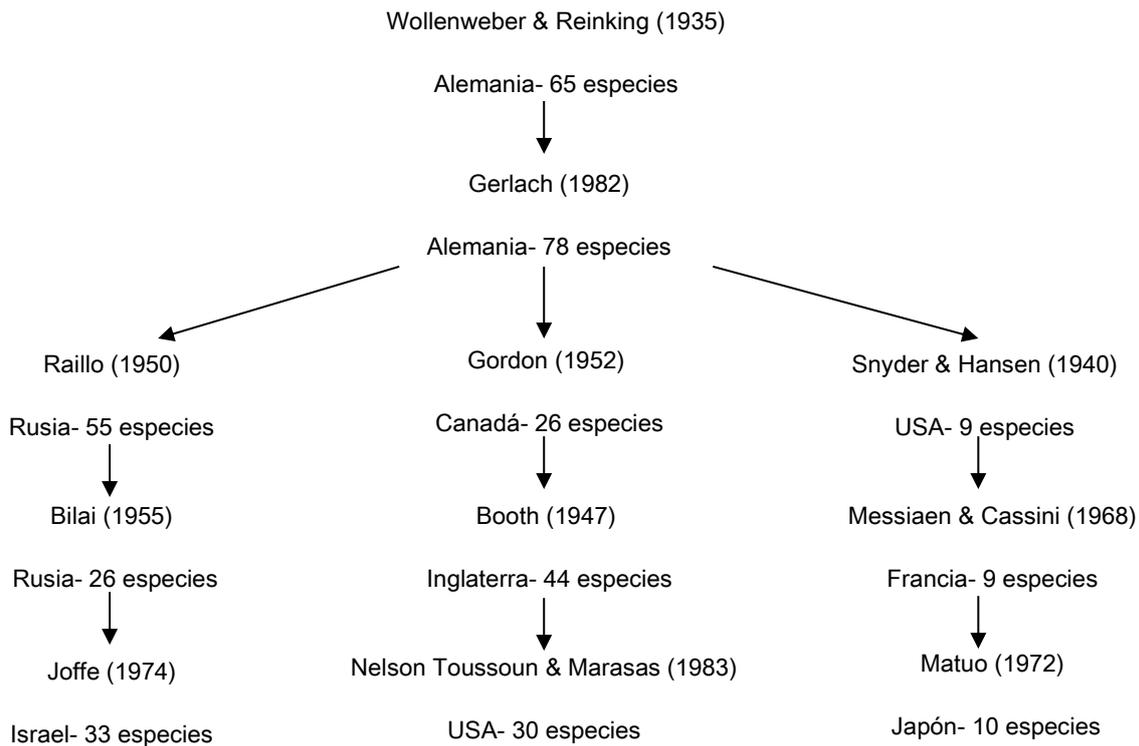
uso del término unitario *Fusarium*, descartando así los diferentes nombres de los teleomorfos (Geiser et al., 2013).

Las especies pertenecientes a este género están distribuidas mundialmente y es común encontrarlas en regiones tropicales y templadas, aunque también es posible aislarlas en el desierto, en regiones alpinas y áreas árticas donde prevalecen condiciones adversas. Esta amplia distribución puede atribuirse a dos factores claves, su capacidad para colonizar un amplio rango de sustratos y a un mecanismo eficiente para dispersarse en el tiempo y en el espacio. Estas características hacen que estas especies se adapten rápidamente a nuevos nichos ecológicos creados por el hombre. Se encuentran como saprófitos en el suelo y en vegetales en descomposición de toda clase. Además juegan un papel importante en el reciclado de la materia orgánica (Rep et al., 2005; Karim et al., 2016). Algunos son patógenos de insectos y otros son agentes de enfermedades en humanos y animales vertebrados, causando micosis y posiblemente alergias (Chang et al., 2006; Sutton y Brandt, 2011). Muchas de las especies que conforman este género son consideradas patógenos destructivos de plantas de importancia económica (causa marchitamientos, podredumbres y chancros en una gran variedad de cultivos como soja, maíz y trigo), causando así graves pérdidas económicas en el sector agrícola. Sumado a esto, miembros de este género tienen la capacidad de producir micotoxinas, metabolitos secundarios tóxicos que contaminan alimentos y al ser ingeridos, causan enfermedades agudas y crónicas que resultan una amenaza para la sanidad vegetal, animal y humana (Logrieco et al., 2003).

### **I.3.2. Taxonomía y concepto de especie en *Fusarium***

El género *Fusarium* exhibe un amplio grado de diversidad con respecto a sus características morfológicas, fisiológicas y ecológicas. Esto no es sorprendente dado que representantes de dicho género ocupan un amplio rango de nichos ecológicos y muchas de las especies tienen distribución mundial. El alto nivel de biodiversidad o variaciones, sin embargo, trajo como consecuencia considerables dificultades en el desarrollo de un sistema taxonómico estable y aceptable (Burgess et al., 1996).

El sistema taxonómico ideal debía reflejar las relaciones genéticas del taxón. La historia de la sistemática de *Fusarium* ha mostrado una marcada diferencia, desde un concepto de especie extremadamente estrecho a otro demasiado amplio, que tenían en cuenta aspectos sobre la patogenicidad y toxicidad; estos sistemas han sido dejados de lado (Figura 3).



**Figura 3.** Relación entre los distintos sistemas taxonómicos (Nelson et al., 1983).

El género *Fusarium* fue descrito por primera vez en 1809 por Link. Los estudios taxonómicos se basaron exclusivamente en características fenotípicas del hospedero, existiendo diversas clasificaciones basadas en ellos. Por tal motivo en esa época existía una gran cantidad de especies (<1000) (Leslie y Summerell 2006). En 1930, Wollenweber y Reinking, estudiaron el género y redujeron drásticamente el número de especies: hicieron un sistema basado en 16 secciones entre las cuales se distribuían 65 especies. Las características empleadas por los autores para separar las secciones fueron: presencia o ausencia de microconidios, presencia o ausencia de clamidosporas y su localización (terminal, intercalar), forma del macroconidio y forma de la célula pie del mismo. Sin embargo, la identificación se dificultaba al considerar que las características morfológicas dependían de las condiciones ambientales y de los medios de cultivo utilizados para la identificación. Otros aspectos que aportaban a la complejidad del sistema fueron no considerar las variaciones culturales o mutaciones y no utilizar como inicio del cultivo una sola espora (cultivo monosporico) para obtener homogeneidad genética (Nelson et al., 1994). Posteriormente, Nelson et al. (1983) propusieron la existencia de 30 especies comunes y otras 15 menos comunes. Estas clasificaciones se han centrado en el estudio de la morfología y la ausencia o presencia de los tres tipos de esporas asexuales que las especies de este

género pueden producir: macroconidios, microconidios y clamidosporas. Otras de las características utilizadas y que complementan las anteriores son la morfología de la colonia, la presencia o ausencia de clamidosporas, la presencia o ausencia de esporodoquios, la pigmentación y la velocidad de crecimiento así como la presencia de peritecios. Basándose en dichas características dividieron al género en 12 secciones: *Eupionnotes*, *Spicarioides*, *Arachnites*, *Sporotrichiella*, *Roseum*, *Arthrosporiella*, *Gibbosum*, *Discolor*, *Lateritium*, *Liseola*, *Elegans* y *Martiella-Ventricosum*.

Las especies del género *Fusarium* pueden mostrar mucha variación cultural debido a su constitución genética y también por la influencia de factores ambientales. Dichas variaciones pueden causar problemas para una identificación correcta en caso de no seguir procedimientos estandarizados para el cultivo y la conservación de las cepas, ya que se producen cultivos mutantes que son difíciles de identificar porque generalmente pierden sus características culturales (Marasas et al., 1987).

Los criterios a tener en cuenta para asegurar una identificación correcta de las especies son:

- a) los cultivos deben iniciarse por transferencia de un ápice hifal o a partir de cultivos monospóricos, así, cada conidio tendrá un único núcleo y la colonia que desarrolle estará libre de mutaciones. Dicho cultivo será un clon con las características particulares de la cepa a identificar y los clones pueden ser mantenidos indefinidamente en los subcultivos sucesivos (Nelson et al., 1983),
- b) se debe evitar el uso de medios de cultivos ricos en hidratos de carbono,
- c) se debe minimizar el subcultivo de las cepas,
- d) los cultivos deben ser mantenidos liofilizados o congelados en nitrógeno líquido para su almacenamiento a largo plazo.

La característica principal usada en la identificación de las especies de *Fusarium* es la morfología de los macroconidios. No obstante, en ciertas especies, como las pertenecientes a las Secciones *Elegans* y *Liseola*, este criterio no permite la separación de las especies y debe considerarse la morfología y modo de formación de los microconidios, morfología de la célula conidiógena y presencia o ausencia de clamidosporas.

El trabajo de revisión del género más reciente, publicado por Leslie y Summerell en 2006 "The *Fusarium* Laboratory Manual", incluye 70 especies, y no tiene en cuenta las secciones consideradas anteriormente. Esta publicación incorpora los conceptos de especie morfológica, biológica y filogenética. Además, incluye de forma detallada

técnicas y métodos para el aislamiento, crecimiento e identificación de especies de *Fusarium*, seguido por una detallada descripción de cada una de las 70 especies.

En los años noventa, con el incremento del uso y aceptación de los métodos basados en el ADN, se comenzó a esclarecer aquellas clasificaciones basadas exclusivamente en morfología que desestimaban la verdadera diversidad de este género (Gräfenhan et al., 2011). Las secuencias de ADN de varios locus como el factor de elongación de la traducción 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ), segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II (RPB2),  $\beta$ -tubulina (TUB), calmodulina (CAL) y regiones ribosomales, han permitido establecer varios complejos de especies de interés, como: complejo de especies de *F. solani* (FSSC), complejo de especies de *F. oxysporum* (FOSC), complejo de especies de *F. incarnatum-equiseti* (FIESC), complejo de especies de *F. chlamydosporum* (FCSC), complejo de especies de *F. tricinctum* (FTSC), complejo de especies de *F. sambucinum* (FSAMSC), complejo de especies de *F. fujikuroi* (FFSC), entre otros, pero además existen otros complejos que incluyen especies no patógenas (O'Donnell et al., 2010; Park et al., 2010, Munkvold, 2017). Actualmente es aceptado que los taxones que anteriormente se pensaba que representaban especies, actualmente son complejos de especies (Kvas et al., 2009).

En la actualidad se utilizan tres conceptos básicos para definir las especies dentro del género *Fusarium*: concepto morfológico, biológico y filogenético. Desde los inicios las primeras definiciones fueron en base a la morfología de las especies: concepto de "especie morfológica". Este concepto se basa en la idea de que la morfología de un "tipo" o individuo puede representar la variación dentro de una especie completa. Definir una especie según este concepto, depende de las diferencias en la morfología entre especies, es decir que las especies se vean diferentes (Leslie y Summerell, 2006; Summerell et al., 2010). Este fue uno de los conceptos más usados por los taxónomos fúngicos y todavía sigue siendo una herramienta útil para la identificación ya que es algo rutinario y práctico (Summerell et al., 2010). Desafortunadamente las características morfológicas son limitadas en número, están sujetas a la selección y su expresión es sensible a las condiciones ambientales, además de que son fácilmente malinterpretadas. Con la introducción de la biología molecular los conceptos de "especie biológica" y de "especie filogenética" han tomado mayor importancia y dan una visión acerca de la taxonomía del género *Fusarium* (Leslie, 1991; O'Donnell et al., 1998, 2000; Summerell et al., 2010).

El concepto de "especie biológica" considera a las especies como un grupo de poblaciones que de hecho o potencialmente se cruzan entre sí; es decir que hay un intercambio de genes en la reproducción sexual o parasexual dentro de la especie. Sin embargo, este concepto tendría una aplicación limitada a aquellas especies con

estados teleomorfos y, por tanto, no sería de utilidad para la identificación de las especies que únicamente se reproducen asexualmente. Por ejemplo, en el FFSC se ha utilizado este concepto ya que muchas de las especies que lo conforman presentan fase sexual, lo que ha permitido identificar mediante cruzamientos sexuales que ciertas cepas pertenecían a la misma especie biológica (Leslie y Summerell, 2006; Summerell et al., 2010).

Por último, con la introducción a la filogenética de las nuevas técnicas de biología molecular, como lo es el análisis del ADN, surge el concepto de “especie filogenética”. Según este concepto, los límites de una especie estarían determinados por la congruencia entre las filogenias derivadas de diferentes genes en un grupo de organismos, es decir, utilizando un análisis multilocus (Taylor et al., 2000). Para esto se utilizan múltiples marcadores donde generalmente se determina la diferencia entre las secuencias de ADN de los genes seleccionados y también pueden dar una medida cuantitativa de la relación genética de las especies. Además, estos estudios de concordancia genealógica, han sido usados para determinar el carácter monofilético de algunas de las especies de *Fusarium* y la existencia de diferentes linajes en una misma especie de este género, o incluso para discernir entre especies muy próximas entre sí y por tanto casi idénticas. Este concepto de especie ha resultado útil para identificar aquellas especies que no presentan fase sexual (Leslie y Summerell, 2006; Summerell et al., 2010).

La cantidad de especies reconocidas dentro de este género ha variado a lo largo del tiempo, en la actualidad, 300 especies son aceptadas usando el concepto de especie filogenética y se encuentran distribuidas en 20 complejos de especies (Leslie y Summerell, 2006; O'Donnell et al., 2015).

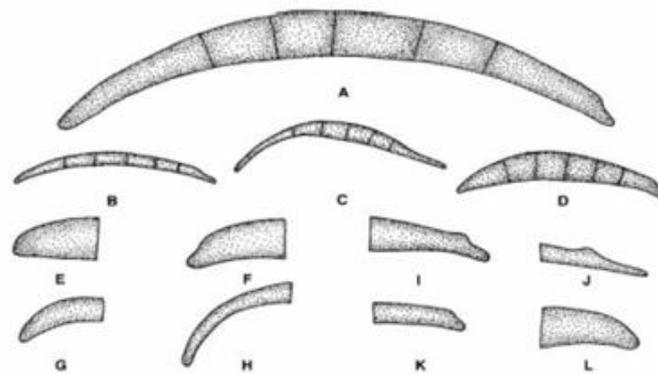
#### **I.4. Identificación de las especies de *Fusarium***

##### **I.4.1. Identificación mediante criterios morfológicos**

La taxonomía de *Fusarium* se ha basado generalmente en las características morfológicas y de crecimiento del hongo en el medio de cultivo. Debido a la gran variabilidad de especies que conforman el género *Fusarium*, las siguientes características morfológicas a nivel microscópico son esenciales para la identificación de las diferentes especies. Para esto, se debe contar con cultivos obtenidos a partir de una única espora (monospóricos), medios de cultivo apropiados y condiciones de crecimiento favorables (Leslie y Summerell, 2006).

Entre los criterios morfológicos microscópicos utilizados para la identificación se tienen en cuenta diferentes estructuras como las esporas. Las especies de *Fusarium* pueden

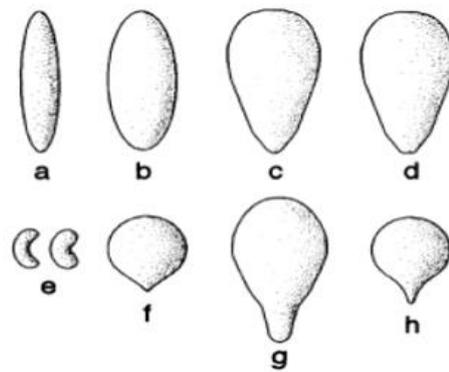
producir tres tipos diferentes de esporas: macroconidios, microconidios y clamidosporas. Algunas especies producen los tres tipos de esporas. Los macroconidios constituyen una de las características primarias para la identificación, ya que no solamente permiten identificar a nivel de especie, sino también a nivel de género. Su forma y tamaño varía según las especies. Para algunas especies es una característica constante, pero debe utilizarse cautelosamente como criterio taxonómico ya que su tamaño puede variar dentro de una misma especie (Nelson et al., 1994; Leslie y Summerell, 2006). Los macroconidios son un tipo de conidio multicelular, con forma de hoz, además los extremos de estas esporas se denominan células apicales y células basales (Figura 4). El número de septos y la forma de las células tanto apicales como basales, son rasgos muy importantes para caracterizar las especies de este género.



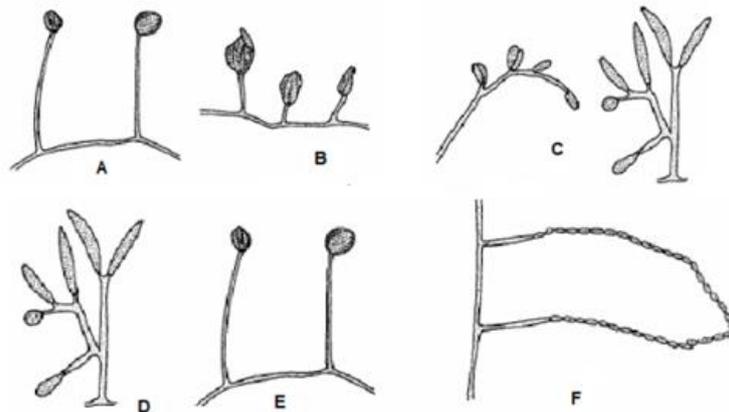
**Figura 4.** Características morfológicas utilizadas en la identificación de especies de *Fusarium*. **A-D.** formas típicas de macroconidios. **E-H.** formas de la célula apical del macroconidio. **I-L.** formas de la célula basal del macroconidio (Leslie y Summerell, 2006).

Otra característica primaria que se tiene en cuenta en la identificación morfológica, son los microconidios, que pueden estar presentes o ausentes, por lo que su sola presencia es un factor indicativo. Un carácter importante es la forma; las formas más comunes son: ovalada, reniforme (en forma de riñón), ovoide, con una base truncada, piriforme (en forma de pera), napiforme (forma similar a un nabo), globosa o esférica y fusiforme (forma de huso) (Figura 5).

Otro carácter importante además de la forma, es la ontogenia de los mismos. Las células conidiógenas de *Fusarium* pueden ser de dos tipos básicos: monofialides y polifialides. La diferencia se debe al número de locus, conidiógenos por célula. Las monofialides solo tienen un locus conidiógeno por célula, mientras que las polifialides pueden tener más de uno. Los microconidios se pueden disponer sobre las fiálides ya sea, solitarios, en falsas cabezas, y en cadenas (Figura 6).



**Figura 5.** Formas de microconidios de diferentes especies de *Fusarium* a. fusiforme, b. ovalada, c. ovoide, d. ovoide con una base aplanada, lo que indica que los microconidios se formaron en cadena, e. alantoides, f. napiforme, g. piriforme, h. cornetes (Nelson et al., 1994).

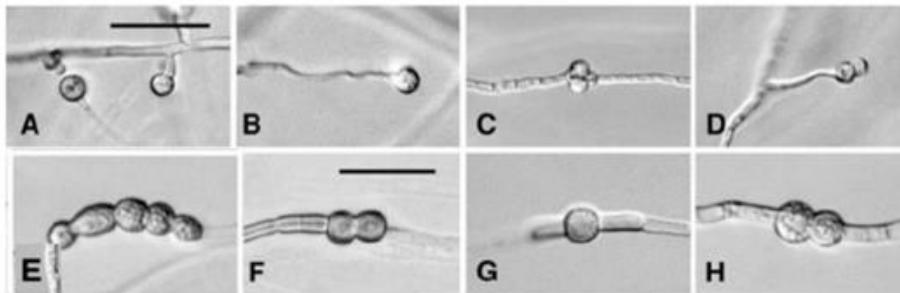


**Figura 6.** Células conidiógenas y organización de los microconidios en relación a la célula conidiógena A-B. monofiálides, C. polifiálides, D. solitario (mesoconidios), E. falsas cabezas, F. cadenas (Nelson et al., 1983; Leslie y Summerell, 2006).

Las clamidiosporas son también otra característica morfológica primaria para la clasificación taxonómica de *Fusarium*, se definen como esporas latentes, de paredes gruesas, producidas por hifas (Gilchrist et al., 2005), son estructuras de resistencia mediante las cuales el hongo puede sobrevivir en condiciones ambientales desfavorables. Se observa su presencia o ausencia, y si se encuentran presentes pueden estar solitarias, de a pares, en grupos o en cadenas, y pueden poseer paredes rugosas o lisas (Figura 7) (Nelson et al., 1994; Leslie y Summerell, 2006).

Existen otros tipos de estructuras que por lo general no son observadas, pero sirven para delimitar ciertas especies. Las hifas helicoidales por ejemplo son importantes para identificar algunas especies dentro del FFSC como *F. circinatum*. También

encontramos los mesoconidios que son un tipo de conidios producidos por algunas especies de *Fusarium*. Estos se forman a partir de polifialides y se denominan así ya que no son considerados ni micro ni macroconidios. Por lo general se encuentran en el micelio aéreo dando una apariencia de “orejas de conejo” cuando se observan en el microscopio (Figura 6 D) (Leslie y Summerrell, 2006).



**Figura 7.** Clamidosporas de *Fusarium* sp. en aumento 400x **A-B.** solitaria terminal, **C.** agrupadas intercalar, **D.** en pares terminal, **E.** en cadena intercalar, **F.** en pares intercalar de textura lisa, **G.** solitaria intercalar de textura lisa, **H.** en pares intercalar de textura rugosa (Leslie y Summerrell, 2006).

También encontramos características secundarias utilizadas para describir a una especie, cuando se cultivan en condiciones adecuadas de sustratos, luz y temperatura, pero estas no deben ser tomadas como criterio taxonómico para diferenciar entre especies. Entre estas características se incluyen: la morfología y pigmentación de la colonia, la ausencia o presencia de esporodoquios, esclerocios o estromas y la velocidad de crecimiento (Nelson et al., 1994; Leslie y Summerrell, 2006).

## **I.4.2. Identificación mediante técnicas moleculares**

### **I.4.2.1. Técnicas moleculares de valor taxonómico**

La taxonomía del género *Fusarium* inicialmente se basaba solamente en el estudio de los caracteres morfológicos. Sin embargo, presentaba algunas limitaciones tales como la dificultad de diferenciar hongos estrechamente relacionados y delimitar eficientemente algunos taxones. En las últimas décadas, se han incorporado técnicas de biología molecular, como lo es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a modo de apoyo a la taxonomía clásica para resolver estas limitaciones. Estos análisis tienen diferentes objetivos y las técnicas empleadas pueden ser: análisis filogenéticos, estudios taxonómicos a nivel de género y especies, y también para el diagnóstico (Kvas et al., 2009).

El uso de secuencias moleculares con un relativo grado de conservación permite la definición y diagnóstico de unidades moleculares taxonómicas operacionales (MOTU's: Molecular Operational Taxonomic Units). El uso de MOTU's permite la rápida y efectiva identificación de muchos taxones, incluso aquellos que no han sido descritos anteriormente. Esta metodología tuvo sus inicios en un contexto no molecular, OTU (Operational Taxonomic Units; Unidades Taxonómicas Operacionales) propuesta por Sokal y Sneath (1963), en donde se utilizaba tantos caracteres como fuese posible, sin conocer el verdadero valor taxonómico de cada carácter. En este mismo contexto las secuencias de ADN pueden ser usadas para definir OTU's debido a que cada secuencia puede ser considerada como un grupo de caracteres sin un valor a priori. Basado en lo anterior Floyd et al. (2002) introdujeron el concepto MOTU el cual define aquellas entidades identificadas en un contexto molecular; esta metodología revela el grado de variación de secuencias entre taxones estrechamente relacionadas con base en cortas regiones genómicas específicas.

En el caso de los hongos, esta metodología ha permitido establecer la diversidad de muestras ambientales y su posterior clasificación formal dentro de los modelos actuales de clasificación (Hibbett et al., 2011). Incluso ha permitido la revisión y establecimiento de la tipificación, taxonomía y filogenia de géneros anamorfos de hongos ascomicetos como son *Acremonium*, *Cosmospora*, *Fusarium*, *Stilbella* y *Volutella* (Gräfenhan et al., 2011). En el caso específico de su aplicación a la taxonomía en *Fusarium*, éste ha sido aplicado de manera individual tanto a grupos de especies con interés agrícola, como es el caso de *F. dimerum* (Schroers et al., 2009), y reconocimiento de *F. chlamydosporum* como endófito de orquídeas en Malasia. A nivel clínico ha permitido el refinamiento de la taxonomía de las especies más representativas de este género (Nelson et al., 1994) y al igual que en la taxonomía a nivel intra e inter complejos de especie y filogenia del genero *Fusarium* (Watanabe et al., 2011). Estos estudios demuestran que este método puede diferenciar especies aparentemente indistinguibles por criterios de especie biológica y morfológica (Kasson et al., 2013).

El establecimiento de estas unidades taxonómicas puede representarse gráficamente mediante dendrogramas que actúan como modelos de la identidad y descripción de la jerarquía obtenida para un grupo determinado de organismos. Para la taxonomía a partir de datos moleculares se utilizan diferentes métodos. Entre estos métodos se encuentran aquellos basados en distancias genéticas y métodos basados en caracteres conservados. Entre los métodos basados en distancias genéticas se encuentran: Neighbor-Joining (Agrupamiento de Vecinos Cercanos) y UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean; Método de Pares Agrupados

usando Promedio Aritmético sin Ponderación), los cuales se basan en el establecimiento de que tan diferente es un taxón con relación a otro, basado en la estimación de la similitud total entre los diferentes caracteres, establecido esto por un análisis estadístico que permite la construcción de dichas distancias entre cada par de taxones. Los métodos basados en caracteres conservados, los cuales son de gran aplicación en estudios taxonómicos y filogenéticos, métodos Bayesianos y métodos estadísticos de inferencia como Verosimilitud y Parsimonia, se basan inicialmente en la definición de un criterio de optimalidad o función objetiva, con el fin de evaluar un árbol dado, es decir la asignación de un puntaje y usado en la comparación de los arboles obtenidos posteriormente; seguido del uso de un algoritmo con el fin de medir el criterio de optimalidad asignado y en la búsqueda de los árboles que alcanzan los mejores valores de acuerdo a este criterio (Hillis et al., 1996).

La fiabilidad de las agrupaciones taxonómicas obtenidas, una vez se han alcanzado los dendrogramas y/o árboles; por uno u otro método, es reflejada por un método estadístico que estima los niveles de confianza de los agrupamientos obtenidos, de éstos el más utilizado es el análisis de *bootstrap* que determina la frecuencia en que un determinado grupo fue hallado a partir de un número de réplicas (generalmente 1000) en el análisis (Felsenstein, 1985; Hillis y Bull, 1993). Se considera que un valor superior al 75% indica un buen soporte estadístico para las ramas constituyentes de dendrograma, al igual que el de las distancias genéticas entre MOTU's (Felsenstein, 1985).

#### **I.4.2.2. Genes utilizados en taxonomía molecular de *Fusarium***

Entre las secuencias utilizadas comúnmente para el estudio taxonómico de hongos se encuentran los genes que codifican para los ARN ribosómicos (ARNr) y sus regiones espaciadoras internas (ITS). Sin embargo, en la mayoría de análisis se ha observado una marcada tendencia a secuenciar más de un gen con el fin de realizar análisis multigénicos para incrementar la fiabilidad de los resultados obtenidos. Para el género *Fusarium*, los genes utilizados, además de los anteriores, suelen ser genes estructurales que codifican proteínas como TUB, EF-1 $\alpha$ , CAL y RPB2 (Taylor y Fisher, 2003; O'Donnell et al., 2007). Al utilizar la metodología de MOTU's se obtiene mayor consistencia de los diferentes taxones y grupos taxonómicos, ya que éstos pueden corroborarse de manera individual, ya sea por uno o varios genes diferentes y también en análisis concatenados de las secuencias (Floyd et al., 2002). De los genes de *Fusarium* mencionados anteriormente, la región ARNr e ITS han demostrado ser ineficaces para la diferenciación de especies dentro de este género ya que se encuentran dos copias divergentes y no-ortólogas de la región ITS2 en muchas de las

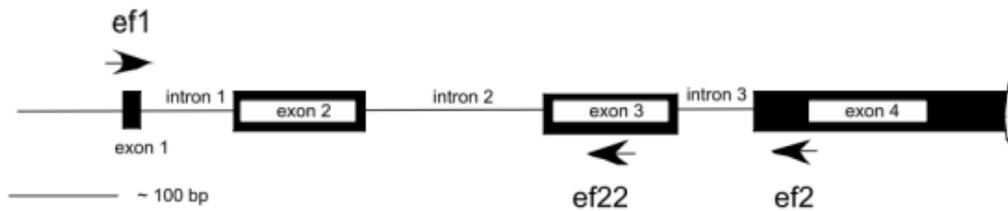
especies de este género examinadas (O'Donnell y Ciglenik, 1997; O'Donnell et al., 1998; Kvas et al., 2009). Razón por lo cual, ninguna de estas dos ha reflejado un adecuado poder de resolución a nivel de especie, incluso han llegado a ser problemáticos en el momento de ser usados en conjunto con otros genes; actualmente su uso se limita a la identificación de especímenes a nivel de género (Balajee et al., 2009). De los genes estructurales mencionados solo el EF-1 $\alpha$  y el RPB2 se convirtieron en marcadores de elección por las siguientes razones: son aplicables a la amplia gama filogenética de *Fusarium*, son informativos hasta o cerca de nivel de especie y son ortólogos a lo largo del género (Geiser et al., 2004, O'Donnell et al., 2008). En contraste con EF-1 $\alpha$ , cuyos intrones altamente variables solo pueden ser alineados de manera fiable entre miembros de un complejo de especies, o varios estrechamente relacionados, las porciones de RPB1 y RPB2 pueden fácilmente ser alineadas a lo largo de todos los miembros del género *Fusarium* (O'Donnell et al., 2013). El dato de las secuencias de uno solo de estos locus es necesario para obtener la ubicación razonablemente exacta de un hongo desconocido dentro de un complejo de especies mediante la realización de un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), consultando bases de datos como FUSARIUM-ID y/o *Fusarium* MLST, que albergan un número considerable de secuencias de ambos genes y además secuencias de otros genes complementarios como TUB, ITS 1 y ITS2, RPB1; que pueden ser usados como referencia para una identificación, tipificación, taxonomía y filogenia más precisa de aislamientos de *Fusarium* (Geiser et al., 2004; Balajee et al., 2009). También puede realizarse un BLAST consultando el GenBank, pero esto requiere de un examen cuidadoso del máximo *hit*. La ventaja de realizar un BLAST de nucleótidos utilizando FUSARIUM-ID o *Fusarium* MLST, en vez de NCBI GenBank, es que estas bases de datos incluyen secuencias informativas de aislados que han sido ampliamente muestreados, bien caracterizados filogenéticamente que pueden ser obtenidos de FRC (<http://plantpath.psu.edu/facilities/Fusarium-research-center>), la ARS Culture Collection (NRRL, <http://nrnl.ncaur.usda.gov/cgi-bin/usda>) o el centro de Biodiversidad CBS-KNAW (<http://www.cbs.knaw.nl/Fusarium/>). Es importante contar con una guía actualizada de las 3 fuentes de bases de datos de secuencias de ADN de *Fusarium*: FUSARIUM-ID (<http://isolate.fusariumdb.org/>; Geiser et al., 2004; Park et al., 2010), *Fusarium* MLST (<http://www.cbs.knaw.nl/fusarium/>; O'Donnell et al., 2010), y NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### **I.4.2.3. Importancia del factor de elongación 1- $\alpha$ en *Fusarium***

La síntesis proteica puede ser dividida en tres etapas fundamentales: iniciación, elongación y terminación, la elongación de la traducción requiere de varios y diferentes proteínas solubles denominadas factores de elongación. El paso final de la expresión génica tiene lugar en los ribosomas en donde el ARNm se traduce en proteína. El EF-1 $\alpha$  es una proteína G clásica que actúa como un “activador molecular” para los estados activos e inactivos basados en la presencia y unión de GTP o GDP (Bourne et al., 1991). En el momento en que se da la unión del codón y el anticodón, el ribosoma actúa como un activador de la actividad GTP-asa en el estímulo de la hidrólisis de GTP, dando como resultado la liberación del GDP unido a EF-1 $\alpha$  del ribosoma. En organismos eucariotas este factor también actúa en la unión de actina y en la construcción de proteínas (Pittman et al., 2006). La interacción EF-1 $\alpha$ -actina está plenamente conservada desde las levaduras a mamíferos, sugiriendo la importancia del EF-1 $\alpha$  en la integridad del citoesqueleto (Kinzy et al., 1994, Pittman et al., 2009).

Actualmente el EF-1 $\alpha$  es considerado como el gen esencial en análisis multigénicos por las siguientes razones: 1) La presencia de una única copia en el genoma de *Fusarium*, 2) la no detección de copias ortólogas, 3) su riqueza de regiones intrónicas y alto nivel de polimorfismo entre especies estrechamente cercanas y 4) la posibilidad de generar cebadores universales; que permiten estudios a través de los límites filogenéticos del género (Geiser et al., 2004; O'Donnell et al., 2004). Además, la gran utilidad de la secuencia del EF-1 $\alpha$  es debida principalmente a que de los 656 nucleótidos que lo componen en promedio 39 de ellos son considerados cladísticamente significativos, los que a su vez se encuentran en un 95 % en regiones exónicas, con algunas pequeñas excepciones donde se han observado fenómenos de transición de bases, lo que conlleva a un 50 % más de información que el gen que codifica para la pequeña subunidad ribosomal de la mitocondria del ARNr (mtSSU) (Figura 8). Al parecer el gen EF-1 $\alpha$  ha estado bajo pocas restricciones evolutivas como se deduce de los patrones de mutación que incluyen deleciones de bases (O'Donnell et al., 1998). El EF-1 $\alpha$  ha mostrado mejores resultados que el uso de secuencias que codifican para proteínas como la  $\beta$ -tubulina, Calmodulina e Histona H3 que también tienen porciones ricas en intrones, y siguen siendo útiles como marcadores genéticos en estudios de filogenia y taxonomía específicamente de *Fusarium* (Nitschke et al., 2009; Sampietro et al., 2010). Por todo lo anterior, el gen codificante para el factor de elongación de la traducción ha comenzado a ser el marcador de elección no sólo como único gen utilizado para la identificación de *Fusarium* (Kvas et al., 2009; Nitschke et al., 2009; Park et al., 2010; Sampietro et al., 2010), sino también para análisis en

conjunto con varios marcadores moleculares (multilocus) (O'Donnell et al., 2008; Park et al., 2010; Sampietro et al., 2010).



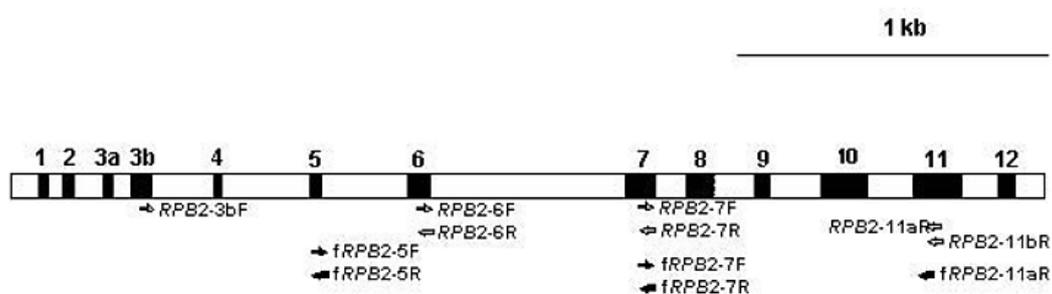
**Figura 8.** Estructura del gen del factor de elongación (*EF-1 $\alpha$* ) en *Fusarium*, con la localización de los cebadores (Geiser et al., 2004).

#### **I.4.2.4. Importancia de la segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II en *Fusarium***

Los genes nucleares codificantes de proteínas implicadas en la replicación, transcripción y traducción de la información genética se han considerado apropiados para estudios taxonómicos y filogenéticos debido en gran medida a que no sufren procesos de transferencia horizontal de genes en eucariotas (Liu y Hall, 2004). Las ARN polimerasas nucleares eucariotas I, II y III son las responsables de la síntesis de los ARN ribosomales mayores, pre-ARN mensajero (no maduro o transcripto primario) y de pequeños ARN ribosomales (SSU) y del ARN de transferencia, respectivamente (ARNt). La similitud en la estructura de la segunda subunidad mayor de estas ARN polimerasas entre los organismos eucariotas indica que son muy conservadas, cada una de las tres polimerasas contiene de 9 a 14 péptidos con actividad transcripcional; algunas de las subunidades son compartidas entre las ARN polimerasas, mientras que otras son exclusivas de la enzima de cada grupo de organismos (Sweetser et al., 1987). Los genes que codifican para las subunidades de las ARN polimerasas I, II y III coexisten desde su ancestro eucariota inicial el cual ha sido predicho por análisis de homología en secuencias intrónicas de *Arabidopsis* sp. (Liu y Hall, 2004). Uno de estos genes, el RPB2, codifica para la segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II, tiene como función transcribir el ARN mensajero (Figura 9). Su importancia radica en que se encuentra en una sola copia dentro del genoma de los ascomicetes y posee una tasa evolutiva relativamente baja, quizás debido a que desempeña una función básica para la célula, aunque suficiente para ser usada en taxonomía. El papel que posee esta ARN polimerasa en las características estructurales y evolutivas de la célula es tan general que es poco afectada por las principales fuerzas de adaptación evolutiva (Liu y Hall, 2004).

La ARN polimerasa II, que transcribe el pre-ARNm; está formada de complejos agregados cuyas subunidades estructurales están bien definidas (Sweetser et al., 1987; Liu et al., 1999). El gen que codifica para la segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II tiene una longitud aproximada de 1,8 kb (O'Donnell et al., 2007). Las secuencias de la RPB2 por lo general tienden a generar alineamientos poco conflictivos y con más sitios informativos que las secuencias ribosomales (Wang et al., 2004). La región de la RPB2 cuenta con el mayor número de caracteres informativos potencialmente parsimoniosos (58,6 %), en comparación con el segmento del LSU ADNr (22,6%) y de la TUB (18,5 %), es decir es 1,48 veces mayor señal filogenética (Hansen et al., 2005). Estudios revelan que el gen RPB2 contiene aproximadamente 608 caracteres informativos en el género *Fusarium* (O'Donnell et al., 2007).

Partiendo de lo anterior y teniendo en cuenta que la identificación morfológica es compleja y su criterio aún genera preguntas taxonómicas no ofrece una garantía en la identificación de especies de *Fusarium* y dada la importancia económica de este género, se hace necesario el uso de metodologías complementarias, pero nunca suplementarias como la aplicación de técnicas moleculares para su identificación. Es indispensable el uso de múltiples locus para aumentar la precisión en las técnicas de identificación molecular de especies del género *Fusarium*.



**Figura 9.** Mapa de la región RPB2, las cajas negras y los números anteriores representan los 12 motivos de aminoácidos que se conservan en todos los eucariotas. Las posiciones de los cebadores se representan mediante flechas.

### I.5. Análisis filogenético

La teoría de la evolución indica que todas las especies provienen de un ancestro común, además indica que la información genética de una especie se transmite de una generación a otra paulatinamente, permitiendo así que los individuos de una misma especie no sean idénticos (Starr y Taggart, 2006).

Estas variaciones están condicionadas por diversos mecanismos evolutivos (aislamiento reproductivo, selección natural y competencia, migración genética).

Dichos cambios con el paso del tiempo se acumulan y se fijan, lo cual permite la diferenciación de las especies, este proceso da origen a nuevas poblaciones. Para conocer qué tan diferentes entre sí son las especies de una misma población, así como para comparar dos poblaciones (Nayaka et al., 2011), es necesario realizar un análisis filogenético.

Por lo tanto, se puede definir que un análisis filogenético es una representación gráfica, en la cual se definen los principales clados (grupo de individuos que comparten un ancestro en común) y la similitud genética de los individuos con base en la comparación de la información molecular (secuencias de genes específicos) mediante metodologías matemáticas.

## **I.6. Micotoxinas**

### **I.6.1. Generalidades**

Los hongos filamentosos han evolucionado para lograr una utilización más eficiente de los sustratos sólidos, por medio del crecimiento en la superficie y la penetración en la matriz sólida. Estos organismos son capaces de secretar enzimas que desdoblan macromoléculas complejas en compuestos menores los cuales son utilizados para el crecimiento y el metabolismo. Pueden absorber nutrientes de bajo peso molecular y también secretar metabolitos secundarios. Estos últimos son compuestos de peso molecular bajo, que no están asociados al proceso de crecimiento. En un cultivo continuo en condiciones de laboratorio, dichos compuestos son generalmente producidos en niveles altos durante la fase estacionaria del crecimiento y su formación está asociada con un proceso de diferenciación morfológica (Magan y Aldred, 2007a).

Los hongos tienen un papel activo en el reciclaje de la materia orgánica en la biosfera, y el crecimiento de los mismos viene acompañado con cambios en las características organolépticas de los sustratos, debido a la acción de enzimas fúngicas proteolíticas y lipolíticas. Este proceso causa deterioro químico sobre el sustrato, el cual puede ser: asimilativo, cuando los hongos utilizan el sustrato como fuente de nutriente, y no asimilativo, cuando los hongos producen metabolitos como las micotoxinas, antibióticos, alcaloides, pigmentos, entre otros, que han sido definidos en conjunto como metabolitos secundarios (Magan y Aldred, 2007a; Wu, 2014).

Actualmente el debate continúa sobre la naturaleza del metabolismo secundario y el rol que dichos metabolitos tienen en la biología de los organismos que los producen. Muchos de estos metabolitos tienen actividad biológica y pueden ser tóxicos para los microorganismos (antibióticos), las plantas (fitoxinas) o los animales (micotoxinas) (Fox y Howlett, 2008).

Por definición, las micotoxinas son compuestos orgánicos biológicamente activos que pueden causar problemas de intoxicaciones agudas, subagudas o crónicas con efectos carcinogénicos, teratogénicos, mutagénicos, neurotóxicos e inmunosupresores (Bennet y Klich, 2003; Richard, 2007; Marroquín-Cardona et al., 2014). La producción de las mismas, es el resultado de la interacción entre el hospedero, el ambiente y la especie toxicogénica; la interacción entre estas partes interactuantes puede resultar en mayor o menor producción de las toxinas (Magan y Aldred, 2007a). La mayoría de las especies productoras de micotoxinas son saprófitas y unas pocas son patógenas facultativas de plantas (Bennet y Klinch, 2003). Las principales micotoxinas han sido reconocidas como productos metabólicos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria* (Sidhu, 2002, Reddy et al., 2010).

Se han identificado aproximadamente 400 micotoxinas diferentes, producidas por alrededor de 350 especies fúngicas y son consideradas como contaminantes naturales relevantes en los productos agrícolas (Pal et al., 2015). 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) en raciones y productos de origen animal (derivados lácteos, cárnicos y huevos, etc.) (FAO, 2004; Schollenberger et al., 2008; Rodríguez-Carrasco et al., 2015).

Es difícil clasificar a las micotoxinas dentro de una única categoría química, ya que no poseen características moleculares comunes. Son producidas por grupos taxonómicos restringidos, no son esenciales para el organismo que las produce y son sintetizadas por diferentes vías a partir de uno o más metabolitos claves (del metabolismo primario). 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).

Las micotoxinas han sido categorizadas en base a su origen biosintético. Dicha clasificación pone énfasis en el hecho que los metabolitos fúngicos, a pesar de su enorme diversidad de estructuras y actividades, derivan de unas pocas vías biosintéticas, tales como: acetil-CoA, ácido mevalónico, aminoácidos y ácido shikímico. El intermediario más importante entre el metabolismo primario y el secundario es el acetil-CoA. La condensación de acetil-CoA con malonil-CoA lleva a la formación de policétidos o de ácidos grasos (Steyn, 1998).

Cuando las toxinas fúngicas son ingeridas o inhaladas en determinadas concentraciones por los animales o por el hombre producen un cuadro clínico-patológico conocido como micotoxicosis. Éstas pueden ser clasificadas como primarias o secundarias; agudas o crónicas; teniendo en cuenta el origen de la

intoxicación y la concentración de la micotoxina ingerida en el tiempo. 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. Otro aspecto importante es la morbimortalidad de los animales de producción (Bräse et al., 2009). 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). Un nivel alto de micotoxinas en un producto determinado representa un riesgo para la salud. Sin embargo, las micotoxicosis agudas se dan en raras ocasiones, excepto en algunos países en vías de desarrollo (Wagacha y Muthomi, 2008). De hecho, 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) considera que, tras evaluar los efectos tóxicos de diversas micotoxinas, el riesgo de intoxicación aguda es moderado-bajo. Sin embargo, como admite dicho organismo, es mucho más preocupante una ingesta en bajas dosis, pero extendida en el tiempo, en especial tratándose de alimentos que se consumen diariamente (Reyes Velasquez, 2011). Las intoxicaciones de los animales y el hombre asociadas con los alimentos han sido reconocidas o sospechadas durante siglos. No obstante, establecer que una toxina específica es la causante de una micotoxicosis es una tarea bastante difícil. La identificación de los hongos contaminantes por sí sola, tiene un valor limitado en el diagnóstico de las micotoxicosis, ya que las conclusiones finales sólo pueden ser obtenidas una vez detectadas e identificadas las toxinas. Esto se debe a que ciertas situaciones se pueden presentar como: la presencia de una especie toxicogénica no asegura que haya producido la toxina en el sustrato; una toxina determinada puede persistir en un producto aunque la especie toxicogénica no esté presente; una especie toxicogénica puede ser capaz de producir más de una toxina; la producción de una micotoxina particular depende de factores biológicos, químicos y físicos; y una determinada micotoxina puede ser producida por más de un género fúngico (Bennet y Klinch, 2003).

La Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) estima que cada año hasta un 25% de los productos agrícolas del mundo están contaminados con micotoxinas (Wilson y Otsuki, 2001; Stepien et al., 2007). La presencia de micotoxinas en los productos vegetales causan una disminución en la producción 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 los riesgos para la salud humana y animal. Además, se deben considerar las pérdidas económicas indirectas, las cuales, si bien son difíciles de cuantificar, son las de mayor magnitud. Los productores reciben baja rentabilidad por que sus productos son rechazados en los mercados internos y externos; debido a que no cumplen con las reglamentaciones sanitarias establecidas (FAO, 2004).

### **1.6.2. 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., 2006). 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, b; Magan y Aldred, 2007b; 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, 2006). 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, sustrato 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., 2004b; Marín et al., 2004; Mateo et al., 2004; Ramírez et al., 2006; Schmidt-Heydt et al., 2008; Cendoya et al., 2017). 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 y para la síntesis de las toxinas (Lacey, 1989). 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 sustratos (Magan y Aldred, 2007b). 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 (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  $O_2$  y  $CO_2$  (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 sustratos. 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. 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 sustrato pueden tener un profundo efecto en el crecimiento y en la capacidad de las especies fúngicas para producir toxinas debido a la competitividad que se establece especialmente por los nutrientes disponibles del medio (Wicklow et al., 1980; Marín et al., 1998; Velluti et al., 2000).

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).

## **I.7. Toxinas producidas por *Fusarium***

El perfil micotoxígeno de las principales especies de *Fusarium* incluye un amplio rango de micotoxinas, dentro de ellas, los tricotecenos y las fumonisinas son las micotoxinas más frecuentes y tóxicas producidas por *Fusarium*, aunque son capaces de producir otras importantes como son la zearalenona (ZEA), las eniانتinas (ENN), la moniliformina (MON) y la aurofusarina (AUF) (Munkvold, 2017) (Tabla 2).

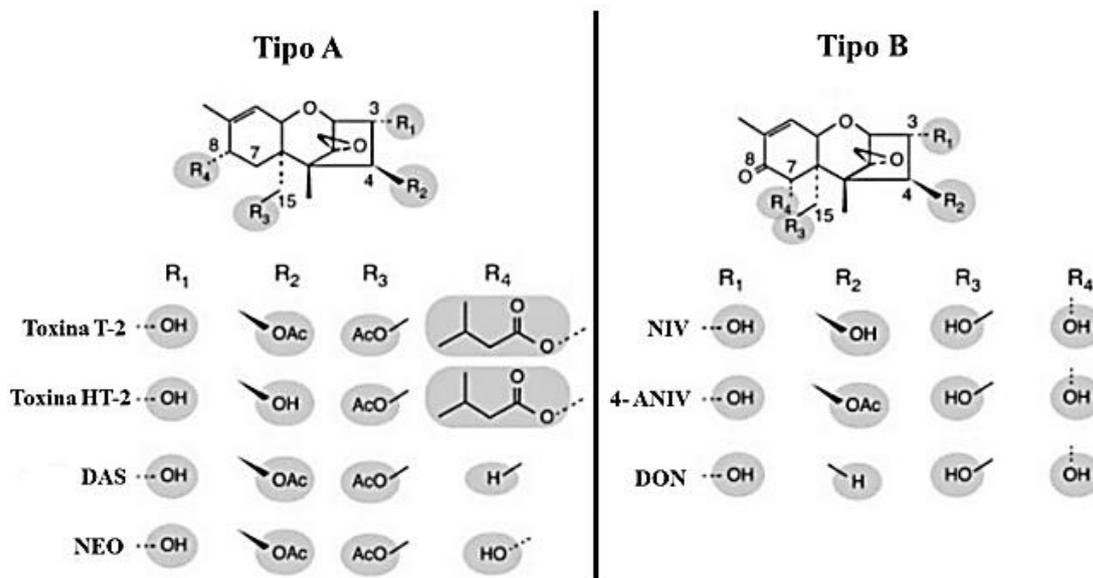
### **I.7.1. Tricotecenos**

Los tricotecenos son las micotoxinas de mayor importancia económica producidas por las especies de *Fusarium*. Este grupo de micotoxinas se ha asociado con mayor frecuencia a toxicosis humanas y problemas de salud generalizados en el ganado (McCormick et al., 2011). Todas las especies de animales de interés zootécnico que han sido sometidos a test de sensibilidad a tricotecenos han dado resultados positivos, a pesar de que la sintomatología varía según la especie animal y el tipo de tricoteceno. Los cerdos son los animales más sensibles seguidos de las aves y por último los rumiantes (Eriksen y Pettersson, 2004).

Todos los tricotecenos comparten un núcleo tricíclico llamado tricodieno, caracterizado por un doble enlace en la posición 9,10 y un grupo epóxido entre los carbonos 12 y 13 (Desjardins y Proctor, 2007). En el tricodieno existen cinco posiciones que pueden albergar grupos hidroxilo o acetilo, y esto otorga una gran diversidad estructural a la molécula (Figura 10) (Foroud y Eudes, 2009).

En base a sus grupos funcionales, existen cuatro tipos de tricotecenos: A, B, C y D. *Fusarium* solamente produce tricotecenos pertenecientes a los grupos A y B. Los del tipo A son considerados más tóxicos que los del tipo B (McCormick et al., 2011). Los primeros se caracterizan por la ausencia de un grupo ceto en el carbono 8 (Figura 10), son producidos principalmente por *F. armeniacum* (a menudo descrito como *F. acuminatum*), *F. langsethiae*, *F. poae*, *F. sambucinum*, *F. sporotrichioides*, aunque también pueden ser sintetizados por otras especies de *Fusarium* (Tabla 2). Entre los tricotecenos tipo A se incluyen a las toxinas T-2 (T-2) y HT-2 (HT-2), diacetoxiscirpenol (DAS) y neosolaniol (NEO), siendo la toxina T-2 el tricoteceno más tóxico para animales (EFSA, 2011a).

Los tricotecenos tipo B presentan un grupo ceto en el carbono 8 (Figura 10). Las micotoxinas más importantes de este grupo son Deoxinivalenol (DON) y nivalenol (NIV) y los derivados de ambos. Las principales especies de *Fusarium* productoras de tricotecenos tipo B se encuentran dentro del complejo de especies *F. graminearum*, que incluye *F. graminearum sensu lato*, *F. culmorum*, *F. crookwellense* y *F. pseudograminearum*. Los tricotecenos tipo B también son producidos por otras especies de *Fusarium* del cual generalmente están excluidos los miembros de los complejos de especies de *F. fujikuroi*, *F. oxysporum* y *F. solani* (Tabla 2).



**Figura 10.** Estructura química general de los tricotecenos tipo A (izquierda) y tipo B (derecha). Entre los del tipo A se incluyen: las toxinas T-2, HT-2, el DAS y el NEO; entre los del tipo B se incluyen el NIV, el 4-ANIV y el DON.

La toxicidad de este grupo de micotoxinas se debe a que son potentes inhibidores de la síntesis proteica en eucariotas, al unirse al ribosoma e inhibir la actividad peptidil-transferasa (Rocha et al., 2005; Gerez et al., 2015). Los síntomas relacionados con una micotoxicosis producida por la toxina T-2 serían gastrointestinales, dermatológicos y neurológicos, mientras que los producidos por DON serían náuseas, vómitos y diarrea que causan la pérdida de la masa corporal (Bennet y Klich, 2003; Eriksen y Pettersson, 2004; Rocha et al., 2005; Flannery et al., 2012). La exposición humana a los tricotecenos se encuentra asociado a náuseas, diarrea, dolor abdominal y fiebre (Pestka, 2010). Además, los tricotecenos están considerados como factores de virulencia, dependiendo del hospedador, favoreciendo la infección de la planta por *Fusarium* (Kang y Buchenauer, 2002; Proctor et al., 2002).

### **I.7.1.1. Toxicidad de los tricotecenos en rumiantes**

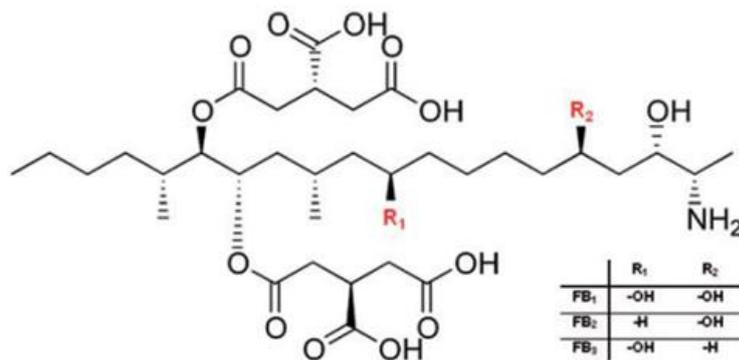
Los rumiantes se consideran menos sensibles a los efectos de la toxina T-2, en comparación con los mamíferos monogástricos, debido a la función que desempeña el rumen en la desintoxicación (Pestka, 2010). En este sentido, los animales jóvenes, con un rumen no completamente funcional, pueden mostrar una mayor susceptibilidad a esta toxina. Se ha demostrado que la exposición de terneras a 0,3 mg de T-2/kg de peso corporal por día provocan lesiones gastrointestinales, modificaciones de las proteínas séricas y alteraciones hematológicas. Mientras que, en adultos, la intoxicación es poco común, aunque, en un estudio llevado a cabo por Hsu et al. (1972), se informó que siete vacas murieron por hemorragias masivas de las vías gastrointestinales, relacionado este episodio con la intoxicación por toxina T-2. Además, estudios llevados a cabo por Huszenicza et al. (2000) demostraron que este tricoteceno produce una reducción en los niveles de progesterona plasmática y retraso de la ovulación, indicando que esta micotoxina es capaz de disminuir el rendimiento reproductivo en rumiantes. Con respecto al DON, la susceptibilidad de los rumiantes a esta micotoxina es relativamente baja, ya que es convertido por la biota ruminal casi completamente a un compuesto denominado dieno 12,13-de-epoxideoxinivalenol (DOM-1). La forma epóxida del núcleo del tricoteceno explica la citotoxicidad y el vómito, por lo que la bioconversión del grupo dieno reduce la toxicidad en rumiantes (Bertero et al., 2018). Sin embargo, debe considerarse que, mientras que, en rumiantes sanos, el DON se convierte en DOM-1, en rumiantes con acidosis o en animales jóvenes, en los que el sistema ruminal no es totalmente eficiente, la toxicocinética del DON podría ser diferente y estos animales podrían ser más susceptibles a los efectos tóxicos de esta micotoxina. A pesar de la resistencia general mostrada por parte de los rumiantes al DON, estudios *in vitro* llevados a cabo por Pizzo et al. (2015, 2016) demostraron que el sistema reproductivo puede verse afectado de manera apreciable por esta micotoxina.

### **I.7.2. Fumonisinias**

Diferentes especies de *Fusarium* son capaces de sintetizar fumonisinias (Tabla 2), siendo especialmente importantes *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, considerados los principales productores (Logrieco et al., 2002; Glenn, 2007). Las fumonisinias pertenecen a una familia de micotoxinas tóxicas y carcinógenas causantes de diversas enfermedades severas, agudas y crónicas que afectan tanto a los animales como al ser humano (Marasas et al., 2004). Esto es debido a su similitud estructural con la esfinganina y la esfingosina, dos esfingolípidos intermediarios derivados del

metabolismo de los ácidos grasos (Wang et al., 1991; Voss et al., 2007). La toxicidad de las fumonisinas se atribuye a la interrupción de la ruta de síntesis de los esfingolípidos, mediada por la inhibición de la enzima ceramida sintasa (Marasas et al., 2004; Smith, 2012).

Las fumonisinas son aminopoliolés con una cadena lineal de 20 átomos de carbono que presenta un amino en el carbono 2, junto con grupos metilo, hidroxilo y ácido tricarbóxico en diferentes posiciones a lo largo del esqueleto carbonado (Proctor et al., 2003) (Figura 11). Según los grupos químicos presentes a lo largo de la cadena lineal, las fumonisinas se clasifican en cuatro series: A, B, C y P (Humpf y Voss, 2004). Las de la serie B son las más abundantes en la naturaleza y se clasifican en fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), fumonisina B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>), fumonisina B<sub>3</sub> (FB<sub>3</sub>) y fumonisina B<sub>4</sub> (FB<sub>4</sub>) según la presencia o ausencia de grupos hidroxilo en los carbonos 5 y 10 (Proctor et al., 2003) (Figura 11).



**Figura 11.** Estructura química de las principales fumonisinas. R1 y R2 indican los diferentes radicales que pueden ocupar los carbonos 5 y 10 en los tres tipos de fumonisinas de la serie B.

De ellas, la FB<sub>1</sub> es la más importante ya que es la más tóxica y prevalente, llegando a constituir hasta un 70% de todas las fumonisinas presentes en los alimentos, mientras que las otras aparecen a niveles más bajos (10% y 20% del contenido total de fumonisinas para FB<sub>2</sub> y FB<sub>3</sub> respectivamente) (EFSA, 2005). En 2002, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) clasificó a la FB<sub>1</sub> como un posible carcinógeno para humanos (grupo 2B) (IARC, 2002). Numerosos estudios han encontrado una asociación entre FB<sub>1</sub> y un aumento en la prevalencia del cáncer esofágico y hepático en humanos (Van Der Westhuizen et al., 2010; Hove et al., 2016). Además, se ha encontrado que esta micotoxina ejerce una acción tóxica contra numerosos órganos y aparatos (sistema cardiovasculares y nerviosos, hígado pulmones riñones) en animales (Voss et al., 2001, 2007; Broomhead et al., 2002; Wangikar et al., 2005).

**Tabla 2.** Perfil de producción de micotoxinas por especies de *Fusarium*

	AUR	BEA	ENNs	FB	MON	TRICOTECENOS						
						Tricotecenos <sup>a</sup>	DAS	DON	NIV	HT- 2	T-2	ZEA
<i>Fusarium acuminatum</i>	X	X	X		X	X	X			X	X	?
<i>Fusarium acaciae-mearnsii</i>						X		X	X			
<i>Fusarium acutatum</i>		X	X	?	X							
<i>Fusarium andiyazic</i>				X								
<i>Fusarium anthophilum</i>		X	?	X	X							
<i>Fusarium armeniacum</i>		X				X				X	X	
<i>Fusarium asiaticum</i>						X		X	X			
<i>Fusarium austroamericanum</i>						X		X	X			
<i>Fusarium avenaceum</i>	X	X	X		X							
<i>Fusarium begoniae</i>				?	X							
<i>Fusarium beomiforme</i>		X			X							
<i>Fusarium boothii</i>						X		X				
<i>Fusarium brasiliicum</i>						X						
<i>Fusarium chlamydosporum</i>			X		X							
<i>Fusarium circinatum</i>		X										
<i>Fusarium compactum</i>			X			X						
<i>Fusarium concentricum</i>		X	X		X							
<i>Fusarium cortaderiae</i>						X			X			
<i>Fusarium crookwellense</i>	X					X	?		X			X
<i>Fusarium culmorum</i>	X		X		X	X		X	X			X
<i>Fusarium denticulatum</i>		X	X		X	?						
<i>Fusarium dlamini</i>		X		X	X							
<i>Fusarium equiseti</i>		X			X	X	X		X		X	X
<i>Fusarium fujikuroi</i>		X		X	X							
<i>Fusarium globosum</i>		X		X								
<i>Fusarium graminearum</i>	X					X	?	X	X		?	X

(Continuación tabla 2)

<i>Fusarium guttiforme</i>		X							
<i>Fusarium konzum</i>		X		X					
<i>Fusarium kyushuense</i>			X			X		X	X
<i>Fusarium lactis</i>					X				
<i>Fusarium langsethiae</i>		X	X			X	X		X X
<i>Fusarium lateritium</i>			X						
<i>Fusarium meridionale</i>						X		X	
<i>Fusarium mesoamericanum</i>						X		X X	
<i>Fusarium musaec</i>					X				
<i>Fusarium napiforme</i>				X	X				
<i>Fusarium nygamai</i>		X		X	X				
<i>Fusarium oxysporum</i>		X	X	X	X				
<i>Fusarium phyllophilum</i>		X		X	X				
<i>Fusarium poae</i>	X	X	X			X	X		X
<i>Fusarium proliferatum</i>		X	X	X	X				
<i>Fusarium pseudograminearum</i>						X		X	
<i>Fusarium sacchari</i>		X			X				
<i>Fusarium sambucinum</i>	X	X	X			X	X		X X
<i>Fusarium semitectum</i>		X			X	X	X		? X
<i>Fusarium solani</i>						?			
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	X	X	X		X	X	X		X X
<i>Fusarium subglutinans</i>		?		X	X				
<i>Fusarium temperatum</i>		X		X	X				
<i>Fusarium thapsinum</i>				X	X				
<i>Fusarium torulosum</i>			X		X				
<i>Fusarium tricinctum</i>	X		X		X				
<i>Fusarium venenatum</i>	X		X			X	X		
<i>Fusarium verticillioides</i>		X		X					

<sup>a</sup> Incluye DAS, DON, NIV, HT-2, T-2 y otros tricotecenos conocidos.<sup>7</sup> Informes cuestionables. Tabla adaptada de Munkvold, 2017.

Las respuestas inducidas por FB<sub>1</sub> son específicas de especie y género: por ejemplo, FB<sub>1</sub> puede inducir hepatocarcinoma (Gelderblom et al., 1991) y nefrocarcinoma en ratas (Voss et al., 1993; Howard et al., 2001), pero no se la ha relacionado con cáncer de esófago en animales (Myburg et al., 2002).

#### **I.7.2.1. Toxicidad de la fumonisina B<sub>1</sub> en rumiantes**

Los rumiantes son considerados menos sensibles a la FB<sub>1</sub>, en comparación a otros mamíferos monogástricos como los caballos y cerdos, aunque en aquellos casos en donde el alimento se encuentra altamente contaminado, algunos rumiantes pueden presentar alteraciones bioquímicas leves, lesiones hepáticas y/o renales (Kriek et al., 1981; Osweiler et al., 1993). Caloni et al. (2000) estudiaron el metabolismo *in vitro* de esta micotoxina por parte de la flora microbiana presente en el rumen, en base a los resultados obtenidos, estos investigadores informaron que la FB<sub>1</sub> es pobremente metabolizada y además, no afecta la producción de ácidos grasos de cadena corta, por lo cual no presenta efectos tóxicos en la microbiota ruminal. Por su parte, Albonico et al. (2017) indicaron que esta fumonisina puede afectar la función reproductiva del ganado vacuno. Otros investigadores concluyeron que los efectos reproductivos *in vitro* generados en el ganado vacuno dependen en gran medida del grado de exposición y a las distintas dosis probadas de esta micotoxina (Albonico et al., 2016; Pizzo et al., 2016).

#### **I.7.3. Zearalenona**

La ZEA es una lactona fenólica del ácido resorcílico, cuya estructura química es estable y no se degrada durante el almacenamiento, procesamiento con altas temperaturas o durante la molienda húmeda. La preocupación por la presencia de ZEA en los cultivos está relacionada principalmente con la contaminación de los granos de maíz y subproductos. Aunque la ZEA también puede contaminar otros cultivos de importancia agroalimentaria, como trigo, arroz, etc. En mamíferos, el grupo 6-cetona de la ZEA puede ser reducido a estero isómeros llamados zearalenol ( $\alpha$  y  $\beta$  isómeros) (Figura 12), estos productos de reducción son también sintetizados por hongos, pero en concentraciones mucho menores que la ZEA (Gajecki et al., 2010). Existen diferencias entre la ZEA y sus formas modificadas en términos de acción estrogénica: un estudio realizado en ratas evaluó el siguiente rango:  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZEA) >  $\alpha$ -zearalanol ( $\alpha$ -ZAL) > ZEA > zearalanona (ZAN) >  $\beta$ -zearalanol ( $\beta$ -ZAL) >  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZEA). Dado que la ZEA y sus metabolitos se unen a los receptores de estrógeno como agonistas/antagonistas mixtos, pueden inducir un síndrome descrito como hiperestrogenismo caracterizado por algunos signos típicos, como edema de la vulva

y glándula mamaria, vulvovaginitis, agrandamiento del útero, quistes ovaricos, y alteración de la maduración de ovocitos (Minervini y Dell'Aquila, 2001).

La toxicidad de la ZEA se debe a su actividad estrogénica debido a su similitud estructural con el 17- $\beta$ -estradiol y otros estrógenos, pudiendo causar alteraciones en el tracto reproductivo (Bennett y Klich, 2003, Malekinejad et al., 2007; Denli et al., 2017). No existen reportes de micotoxicosis graves asociados a la ingesta de alimentos contaminados con ZEA en humanos, solo a altas concentraciones y a muy pequeña escala, pueden producir efectos inmunosupresores (Berek et al., 2001), o hiperplasia endometrial y adenocarcinomas (Creppy, 2002). Las micotoxicosis que se producen en animales tienen mayor gravedad, sobre todo en cerdos, aunque también afecta a rumiantes y aves. Producen una disminución de la fertilidad, abortos por reabsorción fetal, reducción del tamaño de la camada y disminución de la respuesta inmune (Böhm y Razzazi-Fazeli, 2005; Malekinejad et al., 2007; Minervini et al., 2008). El efecto de la ZEA depende de varios factores, como el estado reproductivo (prepuberal, preñez) del animal afectado y el tiempo y la dosis de administración (Tiemann y Dänicke, 2007; Döll y Dänicke, 2011; Holda y Glogowski, 2014).

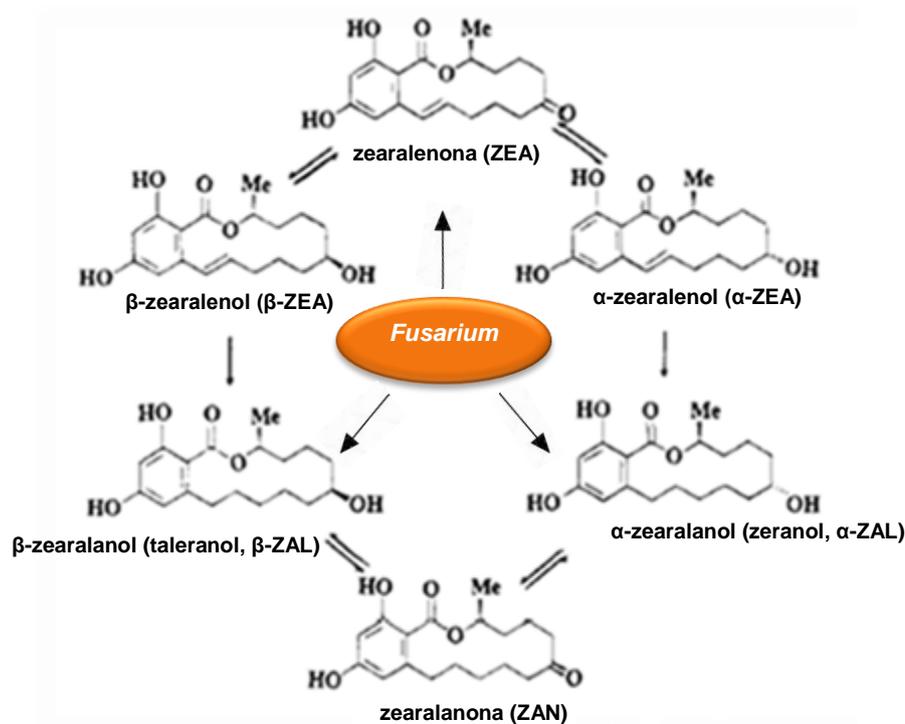
#### **I.7.3.1. Toxicidad de la zearalenona en rumiantes**

En comparación con los animales monogástricos, los rumiantes parecen ser menos susceptibles a la toxicidad de ZEA (Upadhaya et al., 2010; Pizzo et al., 2016). Aunque se considera que los cerdos es la especie más sensible, se han descrito síntomas similares en terneros y vaquillonas (Kallela y Ettala, 1984), animales en los que el sistema ruminal no es completamente funcional. La ZEA es convertida por la flora ruminal al metabolito  $\alpha$ -ZEA (aproximadamente 90%) y en menor proporción a  $\beta$ -ZEA (Figura 12), incluso también si la ZEA sufre biotransformación hepática (Seeling et al., 2006).

El zeranol ( $\alpha$ -ZAL) es también formado por la hidrogenación del  $\alpha$ -ZEA en el rumen y es detectado en la bilis bovina después de la administración oral de ZEA. La ZEA, el zeranol y el estradiol compiten por los mismos receptores citosólicos (Kennedy et al., 1998). La fracción protozoaria del ecosistema microbiano del rumen parece ser más efectiva en el metabolismo de la ZEA que la fracción bacteriana. Los signos clínicos debidos a la ingesta de ZEA (hiperestrogenismo) son muy raros en las vacas, se producen solo en casos de alimentos extremadamente contaminados o después de una exposición prolongada debido a la baja tasa de absorción de los metabolitos de la ZEA (Fink-Gremmels, 2008a).

El consumo de ZEA en rumiantes puede llevar a la aparición de zeranol en la bilis y en la orina de los animales, pudiendo dar resultados falsos positivos en el control de

anabólicos, confundiendo el consumo de la toxina con la administración de promotores de crecimiento que contienen zeranól. En el ganado bovino, el  $\alpha$ -ZAL o zeranól, se usa en algunos países como agente promotor del crecimiento (Thevis et al., 2011).

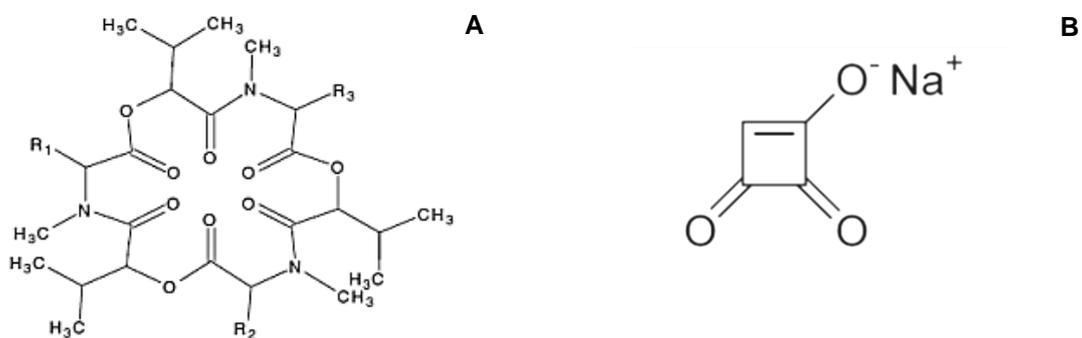


**Figura 12.** Estructura química de zearalenona y sus derivados. Posible relación entre las rutas que llevan a encontrar zeranól en orina de animales (Kennedy et al., 1998).

#### I.7.4. Micotoxinas emergentes producidas por *Fusarium*

Muchas especies pertenecientes al género *Fusarium* son capaces de producir micotoxinas emergentes, como son la BEA, ENNs y MON. La BEA y las ENNs son hexadepsipéptidos cíclicos estrechamente relacionados (Figura 13). Se han encontrado al menos siete análogos de ENNs (A, A1, B, B1, B2, B3 y B4) producidos por *Fusarium*; las más comunes son las ENNs A, A1, B y B1, pero, entre ellas, la más importante en términos de incidencia y la más estudiada es la ENN B. A pesar del creciente interés en esta toxina, así como en BEA, sus efectos tóxicos todavía son casi desconocidos. Las ENNs son producidas por diversas especies del género *Fusarium*, entre las que destacan *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. poae*, *F. oxysporum*, *F. avenaceum*, *F. sambucinum* y *F. tricinctum* (Bottalico y Perrone, 2002; Logrieco et al., 2002; Nicholson et al., 2004) (Tabla 2). Dado que estas especies son capaces de colonizar cereales, estas toxinas pueden acumularse en el grano. Sin embargo, aún no

se las ha asociado con ninguna micotoxicosis aguda tanto en humanos como en animales (Jestoi, 2008). Su toxicidad es leve o moderada y se debe a que producen un aumento de la permeabilidad de las membranas a los iones. Además, funcionan como desacopladores de la fosforilación oxidativa (Hornbogen et al., 2002). Muchos miembros del complejo de especies de *F. fujikuroi* pueden producir BEA, pero *F. verticillioides* generalmente no produce este compuesto (Holda y Glogowski, 2014). Otras especies productoras de BEA, son *F. acuminatum*, *F. armeniacum*, *F. langsethiae*, *F. poae*, *F. sambucinum* y *F. sporotrichioides* (Tabla 2). La BEA posee para los investigadores un interés creciente debido a su potencial toxicidad para los seres humanos y animales; y alta frecuencia de contaminación en alimentos y productos alimenticios en coexistencia con otras micotoxinas de *Fusarium*. Concretamente, BEA es altamente tóxica en células de mamíferos, y se ha demostrado que es capaz de inducir la apoptosis en líneas celulares humanas y de ratón (Macchia et al., 1995). Además, se ha observado que inhibe la contractibilidad del músculo liso en cerdos (Figura 13) (Krska et al., 1997). A pesar de ello, no existe ningún tipo de legislación que establezca límites máximos permitidos para esta toxina.



**Figura 13. A.** Estructura química del núcleo de las eniantinas y bauvericina. Con los diferentes radicales que ocupan diferentes residuos ácido N-metilamino libres. **B.** Estructura química de la moniliformina.

Por último, la MON es una sal sódica o potásica cuya fórmula química es 1-hidroxiciclobut-1-en-3,4-diona (Figura 13) (Fotso et al., 2002). Es producida exclusivamente por especies del género *Fusarium* y aunque se ha demostrado su toxicidad para aves de corral, no se ha asociado a ninguna enfermedad crónica o aguda en otros animales o seres humanos (Leslie et al., 2005). No obstante, en estudios recientes llevados a cabo por Jonsson et al. (2015) se ha demostrado una elevada toxicidad en ratas. Esta micotoxina es producida por las especies *F. proliferatum*, *F. avenaceum*, *F. fujikuroi*, *F. nygamai*, *F. pseudonygamai*, *F.*

*subglutinans* y *F. thapsinum* en cantidades elevadas (Munkvold, 2017) (Tabla 2). Los datos existentes sobre la actividad biológica de las denominadas micotoxinas emergentes se limitan principalmente a ensayos *in vitro* con pocos aportes sobre su toxicidad *in vivo*. Un aspecto relevante a tener en cuenta es la posible interacción, entre ellas y con otras micotoxinas ya conocidas que poseen una actividad tóxica comprobada. Se necesitan más estudios sobre la incidencia natural y sus niveles en diferentes sustratos y la toxicidad de estas micotoxinas emergentes con el fin de poder evaluar el efecto de estos compuestos en las cadenas alimenticias humanas y animales (Jestoi, 2008, EFSA, 2014).

## **CAPÍTULO II**

## CAPÍTULO II. INCIDENCIA NATURAL DE MICOTOXINAS DE *Fusarium* EN PASTOS NATURALES DESTINADOS A LA ALIMENTACIÓN BOVINA

### II. INTRODUCCIÓN

La utilización de implantes anabólicos en producción de carne bovina es una práctica zotécnica a través de la cual se promueve el desarrollo del crecimiento y la eficiencia alimenticia. Los anabólicos pueden ser de origen endógenos (naturales) o sintéticos. Entre los anabólicos esteroides sintéticos del grupo no estilbénicos se ubica el zeranol (Bavera et al., 2002). En nuestro país el zeranol es una sustancia hormonal cuyo uso está prohibido para animales destinados al consumo humano en establecimientos inscriptos como proveedores para la UE y otros países. Kennedy et al. (1998) demostraron que el zeranol ( $\alpha$ -ZAL) puede ser formado *in vivo* en el rumen de bovinos a partir de los metabolitos producidos por *Fusarium*. Existe, entonces, una fuente natural de zeranol que es la presencia de ZEA y sus derivados, como contaminante natural de pasturas y/o pastos naturales como ha sido demostrado en Australia y Nueva Zelandia (Reed y Moore, 2009).

En los últimos 10 años en numerosos establecimientos ganaderos, se ha detectado zeranol en orina de bovinos durante inspecciones rutinarias en el marco del Programa Nacional de Control de Residuos, Contaminantes e Higiene en Alimentos de Origen Animal (CREHA ANIMAL) del SENASA. Como resultado de este hallazgo no se les permitió exportar (principal destino UE) con las consecuentes pérdidas económicas para los productores. La presencia de zeranol en orina es utilizada como indicador de su administración ilegal a los animales, pero los productores afectados declaraban no haber administrado este anabólico. Existen evidencias sobre la presencia de zeranol en orina de ciervos, cabras, ovejas, bovinos y caballos que solo recibieron alimentación a base de pastos, situación estrechamente relacionada con la presencia natural de ZEA (Erasmuson et al.1994, Miles et al.1996, Launay et al., 2004). De este modo el hallazgo de zeranol en orina de un animal por sí sólo no es prueba suficiente de que ha ocurrido un abuso de esta sustancia por parte del productor.

Por todo lo expuesto se consideró de interés analizar la presencia natural de micotoxinas producidas por el género *Fusarium*, incluida la ZEA y sus derivados, en pastos naturales destinados a la alimentación bovina, en dos establecimientos ganaderos del este de Chaco, donde SENASA había detectado zeranol en orina de ganado bovino.

## II. HIPÓTESIS

Los pastos naturales que se utilizan para la alimentación bovina se encuentran contaminados con micotoxinas producidas por especies pertenecientes al género *Fusarium*.

Existe una variación estacional (verano-invierno) en el contenido de micotoxinas de *Fusarium* tanto cualitativa como cuantitativa (tipo de micotoxinas y cantidad) en pastos naturales destinados a la alimentación de ganado bovino. Además, hay una asociación entre el tipo de micotoxinas presentes naturalmente y el género/especie de los pastos.

## II. OBJETIVO GENERAL

Analizar la incidencia natural de micotoxinas en pastos naturales.

## II. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la incidencia natural de micotoxinas del género *Fusarium* presentes en pastos naturales destinados a la alimentación bovina.
2. Estudiar la variación estacional de las micotoxinas presentes en pastos naturales destinados a la alimentación bovina.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### II.1. Incidencia natural y variación estacional de micotoxinas del género *Fusarium* presentes en pastos naturales

#### II.1.1. Sitio de muestreo

La zona de muestreo se localizó en el humedal de la región del Chaco (Sitio Ramsar 1366), Argentina. Esta región abarca la totalidad de la llanura aluvial de los ríos Paraná y Paraguay en el territorio chaqueño. Los regímenes hidrológicos de cada río dan lugar a diferentes pulsos de inundación y sequía en estos humedales. El paisaje está compuesto de vegetación acuática, pastizales y bosques de galería. La temperatura anual oscila entre 20 y 24 °C. Las temperaturas máximas absolutas pueden alcanzar su punto máximo de 46,5 °C. La precipitación media anual es de 1300 mm, concentradas en primavera y verano (Molina y Rúngulo de Agrasar, 2006).

### **II.1.1.1. Muestreo realizado en establecimientos San Francisco y La Adela en el año 2011**

Los muestreos se realizaron en 2 establecimientos ganaderos ubicados al sud-este de la Pcia. de Chaco en el mes de julio de 2011 (Figura 1). Se muestrearon dos potreros (1 en cada establecimiento) donde habían pastado los animales a los que se les había detectado zeranol en orina durante la inspección rutinaria del SENASA en el año 2010. Durante el muestreo se delimitaron 5 zonas de muestreos, cuatro en los extremos del lote y uno en la zona central. Para el muestreo de cada zona se determinó un área de 25 m x 25 m, en la misma se trazaron dos diagonales que se extendían a partir de ambas esquinas y de cada diagonal se tomaron 5 puntos equidistantes (se distribuyeron 5 muestras en la diagonal). Una vez determinados los puntos de muestreo se procedió a cortar cada planta 10 mm por encima del nivel del suelo (1 planta de cada sitio de muestreo). Cada planta se colocó en bolsa de papel debidamente marcadas y se transportaron al laboratorio. Las partes aéreas de las plantas, incluyendo hojas y tallos, fueron inmediatamente secadas en estufa de aire forzado a 60 °C por 48 horas, o hasta peso constante.

Para el presente estudio se recolectaron, entre los dos establecimientos, un total de 106 muestras de pastos. Debido a que el muestro se realizó durante el invierno (julio), no fue posible identificar las plantas recolectadas hasta el nivel de género y/o especie, ya que no presentaban inflorescencias, entonces sólo nos referiremos a la familia Poaceae. Se conoce que en la zona evaluada los géneros más comúnmente encontrados (pertenecientes a la familia Poaceae) son *Leersia hexandra*, *Luziola peruviana*, *Sorghastrum setosum*, *Spartina argentinensis*, *Cynodon dactylon*, entre otras (Molina y Rúgolo de Agrasar, 2006).

### **II.1.1.2. Muestreo realizado en establecimiento San Francisco en el año 2014**

Para evaluar la variación estacional del contenido de micotoxinas en pastos naturales, se llevaron a cabo dos muestreos correspondientes a los meses de febrero y septiembre de 2014. Para la realización del mismo se procedió de la misma manera explicada en punto anterior pero solo se delimitaron 3 zonas. Las plantas fueron identificadas a nivel de género y cuando fue posible a nivel de especie. Para el presente estudio se recolectaron, entre los dos períodos del año, un total de 67 muestras de pastos pertenecientes a 13 géneros diferentes (*Chloris*, *Cynodon*, *Dichanthium*, *Diplachna*, *Elionurus*, *Eragrostis*, *Eriochloa*, *Hymenachme*, *Leersia*, *Panicum*, *Paspalum*, *Sorghastrum*, *Spartina*) todos incluidos dentro de la familia Poaceae. Además de las muestras para el análisis, se recolectaron individuos para su conservación en herbario.

Es importante señalar que todas las muestras de pastos recolectadas tanto en el año 2011 como en el año 2014 no presentaban signos de enfermedad y se utilizó como criterio de selección aquellos pastos, todos pertenecientes a la Flia Poaceae, que eran más palatables para el ganado bovino. Todas las plantas fueron georreferenciadas.



**Figura 1.** Mapa indicando la localización de los establecimientos a partir de los cuales se obtuvieron las muestras de pasto. **1.** Establecimiento La Adela **2.** Establecimiento San Francisco.

### II.1.2. Extracción de micotoxinas

Previo a realizar la extracción las muestras fueron pulverizadas a un tamaño de partícula de 1 mm<sup>2</sup> usando un molinillo (Cyclotech, Foss Tecator). Para la extracción de micotoxinas se siguió la metodología propuesta por Sulyok et al. (2006). A partir 3 g de cada muestra de pasto previamente molida, se extrajeron las toxinas con 24 ml del solvente de extracción (acetonitrilo:agua:ácido acético 79:20:1, v/v/v). Posteriormente la mezcla se agitó durante 90 minutos utilizando un agitador rotatorio GFL 3017 (GFL, Burgwedel, Alemania) y luego se dejó decantar por gravedad. A continuación cada mezcla se diluyó 1:1 con el solvente de dilución (acetonitrilo:agua:ácido acético 20:79:1 v/v/v). Después de una mezcla adecuada, 5 µl del extracto diluido se inyectaron en el sistema LC-MS/MS sin más tratamiento.

### II.1.3. Análisis de micotoxinas mediante LC-MS/MS

La detección y cuantificación de las micotoxinas se realizó siguiendo la metodología propuesta por Malachova et al. (2014). Se utilizó un equipo QTRAP 5500 MS/MS (Applied Biosystems, Foster City, CA) equipado con una fuente de ionización por electrospray TurbolonSpray (ESI) y un sistema de LC serie 1290 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). La separación cromatográfica se realizó a 25 °C en una columna Gemini® C18 (150 x 4,6 mm d.i., 5 µ), equipada con una pre-columna

C<sub>18</sub> (4x3 mm d.i., Phenomenex, Torrance, CA, EEUU). La elución se llevó a cabo en el modo de gradiente binario. Ambas fases móviles contenían 5 mM de acetato amónico compuestas por metanol:agua:ácido acético en las siguientes proporciones 10:89:1 y 97:2:1 v/v/v para los solventes A y B, respectivamente. Después de un tiempo inicial de 2 min a 100% de A, la proporción de B se incrementó linealmente hasta alcanzar el 50% a los 3 minutos. El porcentaje de B se llevó linealmente al 100% a los 9 minutos, se mantuvo por 4 minutos y 2,5 min columna de re-equilibrado a 100% el solvente A. La velocidad de flujo fue de 1 ml/min. Se utilizó el modo de monitoreo de reacciones múltiples (MRMs). Se llevaron a cabo dos corridas separadas en los modos de polaridad positivos y negativos, respectivamente. La ventana de detección sMRM de cada analito se estableció en el  $t_R \pm 27$  y 42s para los modos positivo y negativo, respectivamente. El tiempo de exploración se estableció en 0,1s. Los ajustes de la fuente de ESI-fueron los siguientes: temperatura de la fuente 550 °C, gas cortina 30 psi (206,8 kPa de nitrógeno de 99,5% de pureza), los gases de las fuentes de iones 1 y 2 (gas del capilar) se fijaron en 80 psi (551,6 kPa de nitrógeno) y 80 psi (551,6 kPa de nitrógeno), respectivamente. Los voltajes de la fuente utilizados fueron según el modo de corrida -4,5 y 5,5 V, respectivamente. Se utilizó una presión del gas de colisión media (nitrógeno). La optimización de MS/MS para los analitos se realizó mediante la infusión directa de los estándares (diluido en una mezcla de 1 + 1 eluyente A y B) en la fuente MS. Se utilizó una bomba de infusión a un caudal de 10 µl/min. Los parámetros utilizados se muestran en la tabla 1. La identificación positiva de los analitos se llevó a cabo mediante la adquisición de dos sMRMs por analito (Tabla 1). Se utilizaron estándares de micotoxinas, Sigma-Aldrich (Viena, Austria). Las soluciones madre de cada analito se prepararon mediante la disolución de la sustancia sólida en acetonitrilo (preferentemente), acetonitrilo:agua 1:1 (v/v), metanol, metanol:agua 1:1 (v/v) o agua, teniendo en cuenta la solubilidad y estabilidad de los diferentes analitos. Con el objeto de facilitar el manejo se prepararon varias soluciones de trabajo combinadas mezclando las soluciones madre de los analitos correspondientes y se almacenaron a -20 °C. La solución de trabajo final se preparó mediante la mezcla de las soluciones de trabajo combinadas inmediatamente antes de la determinación por LC-MS/MS. Se utilizó el software Analistas® versión 1.5.2 (AB Sciex, Foster City, CA, EE.UU.) para controlar el instrumento LC-MS/MS, así como para la integración manual y automática de los picos. Se realizó una evaluación adicional de los datos en Microsoft Excel 2007. La cuantificación se realizó usando calibración externa basada en la dilución en serie de una solución madre que contenía múltiples analitos.

Se llevaron a cabo ensayos de recuperación a dos niveles de toxina, que corresponden a la adición de 100 y 150  $\mu\text{l}$  del patrón mezcla de metabolitos (Tabla 2), a 120 mg de la muestra (mezcla de cinco muestras de pasto que resultaron seleccionadas por su menor nivel de contaminación a partir de los estudios de incidencia de toxinas). Cada ensayo se llevó a cabo por duplicado. Las muestras fueron almacenadas durante tres días destapadas a temperatura ambiente y en la oscuridad para permitir la evaporación del disolvente y permitir que se establezca el equilibrio entre los analitos y la matriz. Después de este período, las muestras se extrajeron con 1 ml de disolvente de extracción (acetonitrilo/agua/ácido acético 79:20:1, v/v/v). Las muestras se extrajeron durante 90 minutos utilizando un agitador rotatorio GFL 3017 (GFL, Burgwedel, Alemania) y posteriormente se dejaron decantar por gravedad. Alicuotas de 50  $\mu\text{l}$  del sobrenadante se diluyeron 1:20 con el solvente de dilución de manera que la proporción final de solvente fuera acetonitrilo/agua/ácido acético 49,5:49,5:1 (v/v/v). Después de una mezcla adecuada, 5  $\mu\text{l}$  del extracto diluido se inyectó en el sistema LC-MS/MS sin más tratamiento. La relación de peso de la muestra/volumen de disolvente de extracción se mantuvo aproximadamente constante para todas las muestras.

#### **II.1.4. Análisis estadístico**

Para determinar si existía alguna diferencia en cuanto a la concentración de cada metabolito en particular entre ambos años de muestreo y entre ambos períodos de muestreo, se realizó un análisis de varianza (ANOVA). Los datos fueron transformados a  $\log_{10}$  para crear una distribución normal. Todos los análisis fueron realizados usando el programa InfoStat versión 2018 (Di Rienzo et al., 2018). El nivel estadístico de significancia fue determinado con un  $p < 0,01$ .

**Tabla 1.** Parámetros utilizados para analizar las micotoxinas de *Fusarium* mediante LC-MS/MS

Analito	t <sub>R</sub> (min)	Ion precursor		Iones producto		
		Q1 (m/z)	DP (V)	Q3 (m/z)	CE (V)	CXP (V)
15-ADON	7,2	339,1	91	321,2/137,2	13/17	18/8
15-Hidroxiculmorin	10,2	272,2	71	237,2/193,2	17/25	16/12
15-Hidroxiculmoron	9,2	270,2	66	235,2/135,2	25/39	16/8
3-ADON	7,3	397,3	-70	59,2/307,1	-38/-20	-8/-7
5-Hidroxiculmorin	7,6	272,2	71	237,1/201,2	17/25	14/12
Ácido fusárico	7,4	180,2	80	152/92	23/35	12/10
Apicidina	12,8	622,4	-135	462,2/209	-32/-68	-11/-9
AUF	12,1	571,2	146	556,2/485,2	35/53	16/12
Avenaceina Y	10,3	319,2	66	287,2/175,1	27/49	16/10
BEA	14,4	801.5/806.5	116/191	244,2/384,4	47/73	12/10
Clamidosporol	6,9	227,1	71	167,1/149,1	23/33	10/8
Culmorin	12,2	256,2	71	221,3/203,2	17/21	14/12
DAS	8,5	384,2	81	307,2/105,1	17/61	9/7
Decalonectrina	8,9	326,2	71	249,2/231,2	13/17	14/14
DOM-1	6,5	339,1	-70	59,1/249	-20/-18	-9/-17
DON	5,8	355,1	-70	265,2/59,2	-22/-40	-13/-8
DON-3-G	5,6	517,3	-80	427,1/59,1	-30/-85	-11/-7
ENN A	14,9	699,4	106	210,1/228	43/47	12/18
ENN A1	14,6	685,4	96	210,1/228,2	41/49	8/20
ENN B	14	657,5	81	196,3/214,1	45/47	18/18
ENN B1	14,3	671,4	111	196/210	43/41	12/12
ENN B2	13,7	643,5	96	214,3/196,3	43/41	12/12
ENN B3	13,2	629,4	76	196,3/214,3	41/41	10/12
Equisetina	15,1	372,2	-110	342,2/124	-34/-66	-7/-7
FB <sub>1</sub>	9,4	722,5	121	334,4/352,3	57/55	4/12
FB <sub>1</sub> Hidrolizada	8,2	406,3	116	370,3/388,3	29/27	10/20
FB <sub>2</sub>	11,3	706,5	126	336,4/318,4	59/51	8/2
FB <sub>3</sub>	10,3	706,5	126	336,3/318,5	59/51	8/2
FB <sub>4</sub>	11,5	690,5	121	338,3/320,4	55/55	10/10
FB <sub>6</sub>	10,8	722,4	96	370,3/546,3	49/41	10/10
Fusaproliferina	13,3	445,2	96	368,1/350,1	25/29	10
Fusarenon-X	6,4	413,2	-70	59,1/263	-44/-22	-9/-16
Fusarielina A	13,5	385,2	61	253,2/109	21/29	16/18
HT-2	9,7	442.2/447.4	76/131	263,1/345,1	21/27	19/20
MAS	7,7	342,2	71	265,1/307,2	13/13	26/8
MON	3,2	96,9	-100	41,2	-24	-5
Monocerina	10,3	309,2	61	223,1/181,1	27/41	14/10
NEO	6,6	400,2	76	215/185	25/29	12/14
NIV	4,8	371,1	-75	281,1/59,1	-22/-42	-15/-7
T2	10,7	484,3	56	215,2/185,1	29/31	18/11
T2-TE	5	316,2	61	215,2/281,2	13/13	16/8
T2-TR	8,9	400,2	71	281.3/215.2	13/17	16/12
ZEA	11,9	317,1	-110	131,1/175	-42/-34	-8/-13
ZEA-4-G	9,4	479,2	-95	317,1/175	-24/-56	-17/-9
ZEA-4S	11,5	397,1	-105	317,1/175	-32/-48	-15/-13
α-ZAL-G	9,2	541,3	-58	319/481	-32/-14	-15/-11
α-ZEA	11,8	319,2	-115	160,1/130,1	-44/-50	-13/-20
β-ZEA	10,8	319,2	-115	160/130	-44/-50	-13/-20
β-ZEA-G	8	541,3	-58	319,1/481,1	-32/-14	-15/-11

t<sub>R</sub>, tiempo de retención; Productos, (m/z); CE, energía de colisión; DP, Potencial de desintegración; CXP (V) Potencial de la celda

**Tabla 2.** Concentraciones ( $\mu\text{g/ml}$ ) de metabolitos en la solución patrón utilizada en el ensayo de recuperación

TOXINAS	Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )
T-2	19,21
HT-2	19,40
Monocerina	9,12
DAS	19,40
NEO	39,87
NIV	17,86
ZEA	17,86
ZEA-4S	0,38
$\alpha$ -ZEA	14,49
$\beta$ -ZEA	14,49
BEA	0,55
AUF	0,65
FB <sub>1</sub>	70,68
MON	9,12
ENN B	0,22
Equisetina	9,15
DON	19,20
HT-2-G	28,90

## II. RESULTADOS

### II.1. Incidencia natural de micotoxinas del género *Fusarium* presentes en pastos naturales

Los datos de rendimiento del método analítico utilizado para la detección de micotoxinas de *Fusarium* en pastos naturales son mostrados en la tabla 3. Los límites de detección (LD) variaron entre 0,01 y 4  $\mu\text{g/kg}$ . El ensayo de recuperación de la metodología analítica reveló que los porcentajes de recuperación fueron en general menores a aquellos obtenidos en otras matrices (cereales) (Sulyok et al., 2006, Malachova et al., 2014).

En el estudio de la incidencia natural de micotoxinas de *Fusarium* en pastos naturales muestreados en el año 2011, se detectaron un total de 17 metabolitos diferentes de un total de 50 analizados. Debido a que no se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre ambos establecimientos, se presentan los resultados combinados.

**Tabla 3.** Rendimiento del método incluyendo solo las micotoxinas detectadas

TOXINAS	Recupero (%)	LD <sup>a</sup> (µg/kg)
T-2	64,1 ± 3,6	0,8
HT-2	68,3 ± 1,0	4,0
Monocerina	73,8 ± 3,0	0,4
DAS	61,0 ± 9,8	0,25
NEO	79,2 ± 3,5	0,5
NIV	41,3 ± 12	0,8
ZEA	124,6 ± 10,9	0,3
ZEA-4S	143,1 ± 16,1	0,4
α-ZEA	120,6 ± 17,2	0,8
β-ZEA	109,3 ± 15,6	0,8
BEA	41,8 ± 6,0	0,04
AUF	75,3 ± 4,7	4,0
FB <sub>1</sub>	59,8 ± 8,1	3,0
MON	113,7 ± 6,7	1,0
ENN B	77,7 ± 42,9	0,01
Equisetina	215 ± 38,7	0,08
DON	70,7 ± 2,4	1,5
HT-2-G	69,2 ± 10,8	1,5

<sup>a</sup>LD, límite de detección.

De un total de 106 muestras de pastos naturales, se detectó la co-ocurrencia de 4 o más micotoxinas en la totalidad de las muestras analizadas. Entre las micotoxinas detectadas, metabolitos tales como BEA, equisetina y monocerina estaban presentes en todas las muestras, mientras que ZEA y AUF en más del 90% de las mismas. Otras micotoxinas de *Fusarium* detectadas como HT-2, α-ZEA, ZEA-4-sulfato (ZEA-4S), T-2 y ENN B presentaron una prevalencia entre el 40-70%. Las micotoxinas NEO, β-ZEA, NIV, MON y FB<sub>1</sub> se detectaron en frecuencias de 36, 28, 15, 12 y 11%, respectivamente. Mientras que DAS y DON se detectaron en frecuencias menores al 10% (Tabla 4).

**Tabla 4.** Niveles de contaminación con micotoxinas de *Fusarium* detectadas en muestras de pasto natural correspondientes al muestreo del año 2011

TOXINAS	N° positivas	Media <sup>a</sup> ± DE <sup>c</sup> (µg/kg)	Mediana <sup>a</sup> (µg/kg)	Rango <sup>a</sup> (µg/kg)
BEA	106/106	37,3 ± 75,3	13,5	1,1 - 624
Equisetina	106/106	982,5 ± 2633	119	0,4 - 17264
Monocerina	106/106	553 ± 1274	66,7	2 - 6745
AUF	96/106	343 ± 1364	71,4	4 - 13238
ZEA	95/106	84,5 ± 260,6	7,20	0,7 - 2120
ENN B	74/106	1,1 ± 5,7	0,09	0,1 - 43,2
T-2	67/106	439,2 ± 989,2	37,8	1,7 - 5439
ZEA-4S	67/106	23,2 ± 58,1	3,10	0,4 - 303
α-ZEA	53/106	50,1 ± 96,5	10,7	1,2 - 464,3
HT-2	52/106	451,5 ± 934,4	110	4,8 - 5652
NEO	36/106	32 ± 46,6	10,4	0,8 - 187
β-ZEA	28/106	29,5 ± 50,7	10,9	3,1 - 245
NIV	15/106	28,1 ± 21	21,0	5,4 - 67
MON	12/106	49,8 ± 87	13,5	3 - 312,6
FB <sub>1</sub>	11/106	131,5 ± 171,6	57,2	29,6 - 566,6
DON	9/106	200,7 ± 178,5	120	38,4 - 560,5
DAS	2/106	13,7 ± 11,1	13,7	5,8 - 21,5

<sup>a</sup>Media/Mediana/Rango de muestras positivas, <sup>b</sup> Desvío estándar

## II.2. Variación estacional de las micotoxinas del género *Fusarium* presentes en pastos naturales

En el estudio de la variación estacional de micotoxinas en pastos naturales muestreados en el año 2014, durante febrero y septiembre, se pudo observar que, de un total de 67 muestras de pastos analizadas, un 98% de las mismas presentaron contaminación con micotoxinas (Tabla 5). Un total de 17 metabolitos de *Fusarium* fueron detectados, siendo ZEA, T-2, BEA, HT-2, AUF, equisetina y monocerina las micotoxinas que presentaron mayor prevalencia en ambos períodos de muestreo con un porcentaje mayor al 30%. En general, se observó que la monocerina y la equisetina estaban presentes en más del 90% de las muestras, mientras que la ZEA estaba presente en el 85% de las mismas. Otras micotoxinas de *Fusarium* detectadas como T-2, HT-2 y BEA presentaron una prevalencia del 40-70%. Las micotoxinas AUF, ZEA-4S, α-ZEA y NEO se detectaron en frecuencias de 36, 25, 17 y 16%, respectivamente. Por último, β-ZEA, ENN B, MON, DAS, NIV y FB<sub>1</sub> se detectaron en frecuencias menores al 10%.

**Tabla 5.** Niveles de contaminación con micotoxinas de *Fusarium* en pastos naturales durante ambos períodos de muestreo analizados

TOXINAS	FEBRERO				SEPTIEMBRE			
	N° positivas	Media <sup>a</sup> ± DE <sup>b</sup> (µg/kg)	Mediana <sup>a</sup> (µg/kg)	Rango <sup>a</sup> (µg/kg)	N° positivas	Media <sup>a</sup> ± DE <sup>b</sup> (µg/kg)	Mediana <sup>a</sup> (µg/kg)	Rango <sup>a</sup> (µg/kg)
Equisetina	31/34	18,16 ± 38,7	1,89	0,08 – 171,59	32/33	23,62 ± 60	2,35	0,08 – 297,41
Monocerina	32/34	39,37 ± 78	11,77	0,92 – 379,40	33/33	694,19 ± 1716	34,23	1,61 – 7288,78
ZEA	30/34	17,40 ± 56,10	2,16	0,30 – 274,29	28/33	61,25 ± 167,83	3,83	0,35 – 711,78
T-2	21/34	170,9 ± 283,7	36,03	0,82 – 959	18/33	178,27 ± 292,60	52,41	4,80 – 1095,54
HT-2	16/34	167,7 ± 240,6	80,27	4,3 – 783,13	13/33	74,35 ± 61,74	57,14	12,10 – 194,74
BEA	24/34	7,03 ± 13,97	2,19	0,29 – 63,43	19/33	9,28 ± 13,34	3,58	0,15 – 53,70
AUF	14/34	159,38 ± 152,45	94,94	17,15 – 408,82	11/33	126,42 ± 99,79	80,72	18,51 – 328,92
ZEA-4S	3/34	27,30 ± 16,93	30,66	8,94 – 42,29	15/33	24,13 ± 36,09	4,37	1,46 – 111,22
α-ZEA	2/34	19,66 ± 13,71	19,66	9,97 – 29,36	10/33	52,41 ± 110,80	8,25	1,19 – 360,07
NEO	5/34	26,3 ± 10,17	23,74	17,72 – 39,94	6/33	22,11 ± 13,90	17,12	7,04 – 39,45
β-ZEA	3/34	22,32 ± 5,30	22,32	18,58 – 26,07	4/33	18,10 ± 23,19	7,07	0,85 – 52,83
ENN B	4/34	0,07 ± 0,02	0,05	0,03 – 0,14	0	ND	----	-----
MON	0	ND <sup>c</sup>	----	-----	3/33	4,45 ± 1,15	4,38	3,34 – 5,64
DAS	1/34	2,5 ± --	2,47	2,47 – 2,47	1/33	10,51 ± --	10,51	10,51 – 10,51
NIV	2/34	422,61 ± 578,63	422,61	13,46 – 831,77	0	ND	----	-----
FB <sub>1</sub>	0	ND	----	-----	2/33	64,01 ± 49,06	64,01	29,32 – 98,70
HT-2-G	4/34	52,4 ± 59,4	18,8	17,42 – 120,97	2/33	25,02 ± 2,40	25,02	23,33 – 26,71

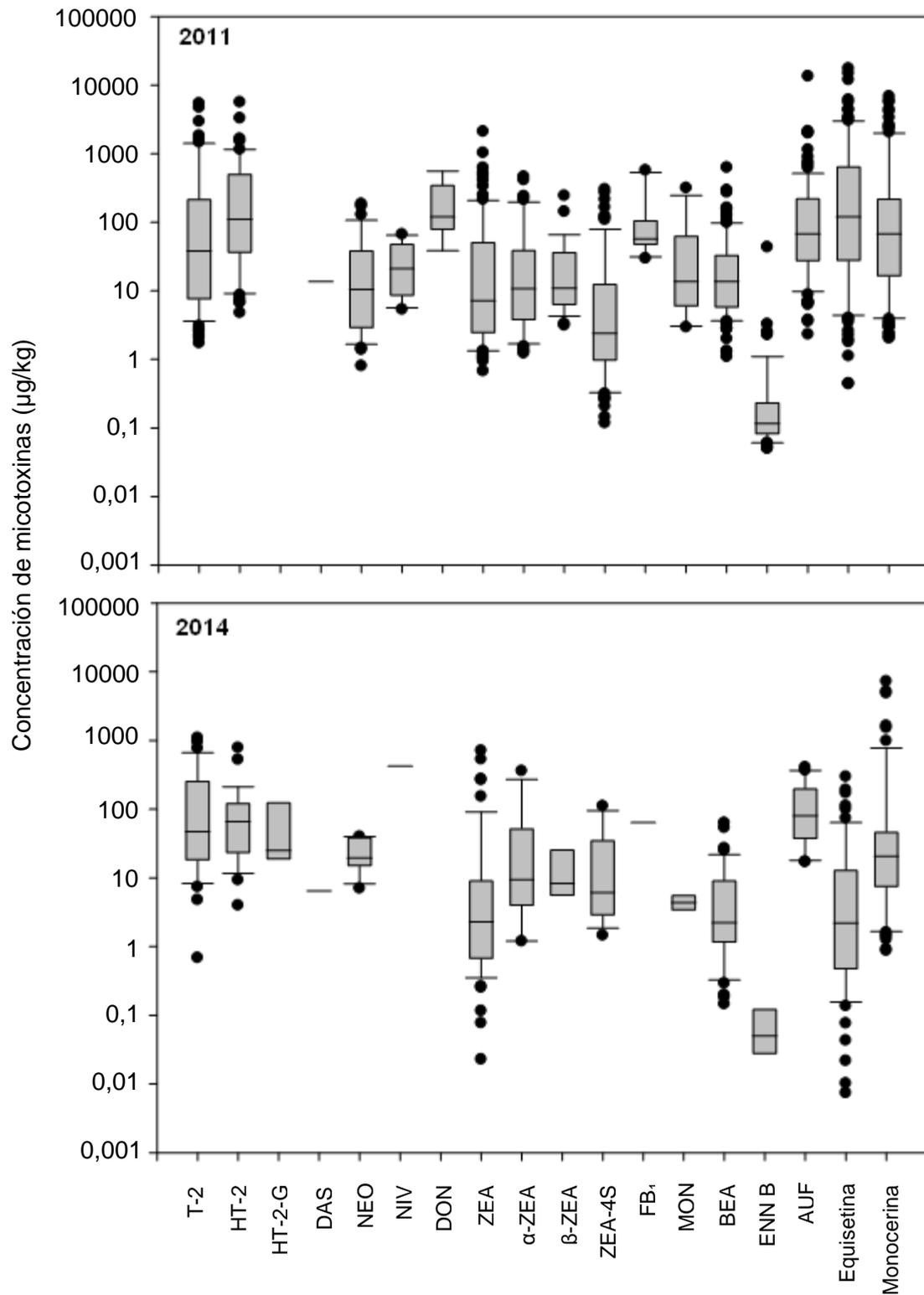
<sup>a</sup> Media/Mediana/Rango de muestras positivas, <sup>b</sup> desvío estándar, <sup>c</sup> no detectado < LD

En el primer período de muestreo, las micotoxinas detectadas en menor frecuencia fueron NEO, DAS, NIV, ENN B y derivados de micotoxinas como HT-2 glucosido (HT-2-G),  $\alpha$ -ZEA,  $\beta$ -ZEA, entre otras. Mientras que en el segundo período fueron NEO, FB<sub>1</sub>, MON, DAS y derivados como HT-2-G y  $\beta$ -ZEA. Las micotoxinas FB<sub>1</sub> y MON no fueron detectadas en el primer período de muestreo mientras que NIV y ENN B no fueron detectadas en el segundo período (Tabla 5), si bien en el periodo que se detectaron presentaron muy baja frecuencia y concentraciones. No se observaron diferencias significativas entre los tipos y los niveles de micotoxinas obtenidas en los diferentes tiempos de muestreos analizados teniendo en cuenta las toxinas presentes en más del 10% de las muestras.

### **II.3. Comparación entre las micotoxinas de *Fusarium* detectadas durante los dos años muestreados**

En los años de estudio, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) en los niveles de DON, BEA, ENN B y equisetina, las cuales fueron detectadas en niveles menores en el año 2014 en comparación con el año 2011 (Figura 2).

De un total de 18 metabolitos diferentes detectados en las muestras de pasto recolectadas durante los años 2011 y 2014, 16 metabolitos se compartieron en ambos años evaluados. La lista de los metabolitos más frecuentes fue similar entre ambos años, a pesar de esto, hubo una menor prevalencia y/o menor concentración en las muestras de pasto correspondientes al año 2014.



**Figura 2.** Box-plots de las concentraciones de las toxinas de *Fusarium* en muestras de pastos naturales en los años 2011 y 2014.

## II. DISCUSIÓN

El presente estudio representa el primer reporte sobre la contaminación de pastos naturales utilizados para la producción animal con múltiples micotoxinas producidas por especies de *Fusarium*. Se analizaron mediante LC-MS/MS un total de 173 muestras de pastos naturales, donde el 99% de las mismas mostró contaminación. Es importante remarcar que el ganado vacuno que pastoreaba en ambos establecimientos evaluados durante los años 2011 y 2014, no mostró ningún síntoma de micotoxicosis. Nuestro principal objetivo fue demostrar que los pastos naturales están contaminados con micotoxinas de *Fusarium* y que esta contaminación podría ser la causante de los niveles de zeranól encontrados en los establecimientos por SENASA y que por lo tanto los productores ganaderos no utilizaron el zeranól como anabólico. Es por este motivo que recibimos muestras en el año 2011, un año después de que se les detectara zeranól en la orina al ganado que se encontraba pastando en los potreros de ambos establecimientos. Se decidió realizar otro muestreo durante el año 2014 con el fin de demostrar que nuestros primeros hallazgos no fueron eventos esporádicos, indicando que es común encontrar ZEA y otras micotoxinas producidas por especies del género *Fusarium* en pastos naturales.

Numerosas micotoxinas pueden ser producidas en pastos, sin embargo, sólo unas pocas han sido reconocidas como tóxicas para los rumiantes. Las toxinas detectadas en el presente estudio incluyen las principales micotoxinas de importancia para la salud animal como son la ZEA y los tricotecenos (Mostrom y Jacobsen, 2011).

Datos experimentales sugieren que los rumiantes son los animales menos susceptibles a los efectos tóxicos de la exposición a las micotoxinas, debido a la microbiota ruminal que actúa como primera línea de defensa contra estos metabolitos (Fink-Gremmels, 2008b). Numerosos protozoos y/o bacterias que conforman el rumen tienen la capacidad de biotransformar algunas micotoxinas en metabolitos menos potentes o inactivos biológicamente, sin embargo, algunos metabolitos son transformados en compuestos con igual o mayor toxicidad que el original. Este último es el caso de las aflatoxinas (AFs) que son parcialmente degradadas por la flora ruminal, formando un metabolito secundario denominado aflatoxicol (Auerbach et al., 1998). Puesto que la degradación ruminal de la AFB<sub>1</sub> es mínima y la toxicidad del metabolito aflatoxicol es similar a la toxina original, se puede concluir que el paso de las AFs por el rumen no disminuye su toxicidad. En el caso de los tricotecenos, se ha observado degradación de hasta un 90% para T-2 y DAS y la misma ha sido atribuida a la fracción de protozoarios del rumen (Hussein y Brasel, 2001), esta degradación hace que los rumiantes sean resistentes a los efectos tóxicos de este grupo de micotoxinas. En cuanto al DON (tricoteceno tipo B), el mismo es convertido por la biota

ruminal casi completamente al compuesto denominado DOM-1, esta bioconversión del grupo epoxi a dieno reduce la toxicidad de este metabolito en rumiantes (Coté et al., 1986).

La estructura química de la ZEA corresponde a una lactona fenólica del ácido resorcílico, estrechamente relacionada con los metabolitos estrogénicos. Esto se correlaciona con la actividad anabolizante de la ZEA y su uso en la alimentación como un promotor del crecimiento animal. Los derivados de la ZEA son el  $\alpha$ -ZEA,  $\beta$ -ZEA,  $\alpha$ -ZAL o zeranol,  $\beta$ -ZAL, ZAN. La ZEA es convertida por la flora ruminal al metabolito hidroxilado  $\alpha$ -zearalenol (aprox. 90%) y en menor proporción a  $\beta$ -ZEA. El zeranol (o  $\alpha$ -ZAL) es también formado por la hidrogenación del  $\alpha$ -ZEA en el rumen y es detectado en la bilis bovina después de la administración oral de ZEA. La ZEA, el zeranol y el estradiol compiten por los mismos receptores citosólicos. Las posibles rutas que llevan a encontrar zeranol en orina de animales son a través de un implante o ingerido con los alimentos como un metabolito producido por especies del género *Fusarium* o producido por el mismo animal a partir de otros metabolitos (Kennedy et al., 1998). La presente investigación se realizó para determinar la contaminación natural con ZEA y sus derivados en pastos naturales muestreados en 2 establecimientos dedicados a la cría de ganado bovino donde el SENASA había detectado zeranol ( $\alpha$ -ZAL) en orina durante una inspección rutinaria. Todo esto tenía como fin respaldar la afirmación de los productores ganaderos de que no habían incurrido en el ilícito de usar implantes de este anabólico prohibido en nuestro país. Estudios llevados a cabo en Nueva Zelanda e Irlanda del Norte han demostrado que el zeranol puede estar presente naturalmente tanto en la orina como en la bilis del ganado ovino y bovino, como producto del metabolismo de ZEA y  $\alpha$ -ZEA las cuales son contaminantes comunes de los alimentos del ganado (Kennedy et al., 1998; Smith, 2006). En el presente estudio se pudo observar que de un total de 106 muestras de pasto (año 2011), 95 estaban contaminadas con ZEA en niveles que varían desde 0,7 a 2120  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (media: 84,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). También se observó que 52 muestras de pasto presentaban co-contaminación con ZEA y  $\alpha$ -ZEA, ambos precursores del zeranol, y que 22 muestras mostraron co-ocurrencia de ZEA,  $\alpha$ -ZEA y  $\beta$ -ZEA. Si consideramos que, por ejemplo, un animal de 400 kg consume unos 40 kg de pasto por día, teniendo en cuenta nuestros resultados, 40 kg de pasto resultaría en una ingesta diaria promedio de 3,38 mg de ZEA y 2,0 mg de  $\alpha$ -ZEA por animal. Kleinova et al. (2002), alimentaron un grupo de vaquillas con avena contaminada con ZEA a razón de 2,6 mg por animal por día (similar a los niveles calculados en el presente estudio), otro grupo de animales fueron alimentados con avena sin ZEA (como control) y a un tercer grupo de animales se les colocó implantes de zeranol. Posteriormente a los 84 días de alimentación se determinaron

los niveles de ZEA, sus derivados ( $\alpha$ -ZEA y  $\beta$ -ZEA) y zeranol en orina y en tejidos. Es de destacar que los niveles de zeranol ( $\alpha$ -ZAL) y talarenol ( $\beta$ -ZAL) encontrados en los animales alimentados con ZEA y los implantados fueron similares entre sí. Aunque en los animales alimentados con ZEA también se detectaron ZEA,  $\alpha$ -ZEA y  $\beta$ -ZEA. El presente estudio demostró que la presencia de zeranol en orina de ganado vacuno podría no ser una consecuencia del uso ilegal de sustancias prohibidas, pero si podría ser producto de la presencia natural de ZEA y  $\alpha$ -ZEA en pastos naturales destinados a la alimentación del ganado. Parte de los resultados de este trabajo sirvieron como sustento para una modificación en la reglamentación (norma SENASA, resol. N° 447/2004) por la disposición N° 3/2012 en donde se contempla la aparición de zeranol en orina debido al metabolismo de la micotoxina ZEA. Básicamente, a través de esta nueva disposición se deben diferenciar los metabolitos en orina, ya que la ingesta de ZEA en los alimentos hace que se encuentre en la orina, ZEA,  $\alpha$ -ZEA,  $\beta$ -ZEA,  $\alpha$ -ZAL y  $\beta$ -ZAL en cambio el uso de implante de zeranol produce en orina principalmente  $\beta$ -ZAL (talarenol).

Para verificar que nuestros hallazgos de contaminación natural con ZEA y sus derivados en pastos pertenecientes a la flia. Poaceae no era un hecho fortuito de un año en particular, estudiamos muestras recolectadas en uno de los establecimientos durante el año 2014 en dos fechas de muestreos (febrero y septiembre). Considerando el total de muestras analizadas en el año 2014, 58 (87%) mostraron contaminación con ZEA en niveles que variaron de 0,30-711,78  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (media= 39,96  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). También se observó que 7 muestras de pasto presentaban co-contaminación con ZEA y  $\alpha$ -ZEA, ambos precursores del zeranol, y que 5 muestras mostraron co-ocurrencia de ZEA,  $\alpha$ -ZEA y  $\beta$ -ZEA.

Contemporáneamente a nuestro trabajo, un grupo de investigadores del INTA realizó un estudio similar en otras localidades de la provincia de Chaco, para ello recolectaron 11 muestras pastos (*Choris* spp, *Setaria* spp., *Cynodon* spp, *Leersia* sp.) durante el mes de julio de los años 2012 y 2013. Sólo determinaron la presencia de ZEA por HPLC. Durante el año 2012 un 45% de las muestras mostraron contaminación con ZEA en niveles que variaron de 2 a 1280  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , mientras que en el año 2013 un 54% de las muestras resultaron positivas con niveles que variaban entre 2 y 296  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Salvat et al., 2016). Estos resultados son comparables con los obtenidos durante la presente tesis en cuanto a los niveles detectados, si bien la metodología utilizada es menos sensible (HPLC vs LC-MS/MS) lo que hace que los porcentajes de muestras positivas sean menores. Además, complementan y refuerzan nuestros hallazgos ya que ponen en evidencia la incidencia de ZEA en años intermedios a nuestros estudios (2012 y 2013).

Las micotoxinas pueden ser modificadas principalmente por enzimas vegetales y ser conjugadas con compuestos polares como la glucosa, el azufre, el ácido malónico y el glutatión (Berthiller et al., 2013; Rychlik et al., 2014). Estas micotoxinas modificadas se producen a través de transformaciones enzimáticas involucradas con procesos de detoxificación de plantas y se han relacionado con un mecanismo de resistencia para contrarrestar la invasión de patógenos (Berthiller et al., 2005; Dall'Asta et al., 2012; Berthiller et al., 2013; Nagl et al., 2014). En base a esto, es importante destacar la presencia de 2 toxinas modificadas ZEA-4S (presente en ambos años muestreados) y HT-2-G (presente sólo en el año 2014) en las muestras de pasto analizadas. Hasta ahora, se desconoce acerca de la biodisponibilidad de las formas modificadas de las micotoxinas (EFSA, 2011a, b). Ciertos estudios sugieren que pueden hidrolizarse y absorberse en el tracto gastrointestinal de los animales. Además, se ha demostrado que las plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con ZEA, produjeron ZEA-4S, a través de un proceso de sulfo-conjugación (Berthiller et al. 2006). La formación de éste metabolito parece ser un mecanismo de autoprotección, a pesar de su alteración química, hay evidencia de que el mismo presenta un potencial tóxico, similar al de sus precursores cuando se ingiere con el alimento (Plasencia y Mirocha 1991). En base a los escasos datos actualmente disponibles, las formas modificadas de una micotoxina probablemente ejerzan la misma toxicidad que el compuesto original (EFSA, 2011a, b).

Dentro de los tricotecenos tipo A: T-2, HT-2, NEO y DAS fueron detectadas en los años 2011 y 2014, y no se encontraron diferencias significativas en este grupo de micotoxinas entre ambos años analizados. Es importante destacar que tanto T-2 como HT-2 fueron detectadas en altas concentraciones en algunas muestras (5000 µg/kg), pero en general las concentraciones fueron bajas. Ambas toxinas a menudo se encuentran juntas en las plantas y además son algunos de los tricotecenos más tóxicos detectados en el alimento para el ganado (Zhou et al., 2008). Los efectos adversos debidos a la ingesta de una dieta contaminada por toxinas T-2 y HT-2 han sido ampliamente estudiados (EFSA, 2011a). Sin embargo, es difícil distinguir los efectos de T-2 y de HT-2 *in vivo*. Los síntomas clínicos causados por estas micotoxinas son irritación severa del tracto digestivo superior, debido a los efectos citotóxicos de la toxina T-2. También se cree que la toxina T-2 es capaz de inducir inmunosupresión en ganado debido a la disminución de las concentraciones séricas de IgM, IgG e IgA, de las funciones de los neutrófilos y de la blastogénesis de linfocitos. También se ha observado infertilidad bovina y aborto en el último trimestre de la gestación a partir del consumo de alimentos contaminados con T-2 (Zain, 2011). Con la excepción de T-2 el ganado bovino no se ve afectado por otros tricotecenos. El

hecho de haber encontrado altos niveles de tricotecenos tipo A (especialmente T-2 y HT-2) en el presente estudio, puede deberse a la contaminación de los pastos con especies de *Fusarium* con habilidad de producir estas micotoxinas. Dentro de los tricotecenos tipo B, NIV y DON fueron las únicas micotoxinas encontradas en las muestras de pastos naturales, con muy bajas frecuencias y niveles durante el año 2011. Deoxinivalenol no estuvo presente en el 2014, mientras que NIV fue encontrado en muy baja frecuencia, pero en concentraciones superiores a las detectadas en 2011. El DON es el tricoteceno tipo B más importante en términos de incidencia a nivel mundial presente en alimentos destinados a ganado bovino. Esta micotoxina es considerada como una causa importante de pérdidas económicas debido a la disminución del rendimiento. Los signos clínicos asociados al consumo de esta micotoxina, incluyen problemas gastrointestinales, deposiciones blandas, diarrea y aumento de la susceptibilidad a otras enfermedades. El ganado bovino es resistente a los efectos eméticos del DON, pero en rumiantes se reduce el consumo de alimento cuando se encuentra en concentraciones de 10-20 mg/Kg (Osweiler, 2000). Durante el presente trabajo, DON se detectó en pocas muestras (n = 9) y en concentraciones más bajas que el nivel recomendado por la Comisión Europea para la alimentación bovina (500 µg/kg). Por otra parte, se encontró contaminación con NIV en las muestras analizadas, con baja prevalencia (22% y 3%) y en niveles inferiores a 831,80 µg/kg. Los niveles encontrados son comparables con otros reportados a nivel mundial (Schollenberger et al., 2006; Sulyok et al., 2007; Eckard et al., 2011; Streit et al., 2012, Van Asselt et al., 2012). El riesgo asociado con la exposición crónica a bajos niveles del NIV en la alimentación animal es difícil de evaluar debido a la escasez de datos disponibles en animales de granja.

Las micotoxinas ENNs y BEA son hexadepsipéptidos cíclicos citotóxicos producidas por varias especies de *Fusarium* (Wang y Xu, 2012). Eniantina B fue la única eniantina detectada en ambos años de estudio, si bien se encontró con mayor frecuencia (70%) durante el año 2011. Mientras que la BEA estuvo presente en todas las muestras analizadas en el año 2011 y en 43 muestras del año 2014, en niveles dentro del rango de concentración reportados por otros estudios (Sulyok et al., 2010, Warth et al., 2012). No hay datos que indiquen que la BEA posea potencial toxicidad para el ganado bovino.

Existe limitada información acerca de la presencia de equisetina y monocerina en alimentos destinados a animales (Shimshoni et al., 2013). Ambos metabolitos fueron encontrados en altas frecuencias en ambos años (>90%) y en altas concentraciones en algunas muestras analizadas. La equisetina ha sido informada como un metabolito producido por *F. equiseti* y *F. semitectum* con débil actividad frente a bacterias gram-

positivas y otras actividades citotóxicas (Desjardins, 2006, Munkvold, 2017). Existen datos sobre la presencia de equisetina como contaminante natural en maíz, ensilaje de trigo y ensilaje de maíz, pero en concentraciones más bajas que las obtenidas en el presente estudio (Mogensen et al., 2011; Shimshoni et al., 2013). La monocerina es un metabolito (policétido) que puede ser producido por varias especies fúngicas, entre ellas *Fusarium* (Axford et al., 2004). Se encontró monocerina en todas las muestras de pasto analizadas en el presente estudio, en concentraciones relativamente altas comparables con los encontrados por Shimshoni et al. (2013), en maíz ensilado. El efecto tóxico de este metabolito en rumiantes es aún desconocido.

Fumonisina B<sub>1</sub> fue la única fumonisina detectada y sólo estuvo presente en 13 muestras del total analizado (173) y en niveles inferiores a 500 µg/kg. En general las fumonisinas no son degradadas en el rumen y son muy poco absorbidas. La mayor parte de las fumonisinas consumidas en los alimentos por rumiantes son eliminadas en las heces. Sin embargo, si las concentraciones en los alimentos son altas (≥ 30000 µg/kg), puede reducir la palatabilidad y disminuir la ingesta de los mismos. En terneros en los cuales el rumen no está totalmente desarrollado y en animales en situaciones de estrés como destete o transporte, aumenta la sensibilidad a estas micotoxinas debido a la reducción de la fermentación en el rumen y debilitamiento de las funciones inmunológicas (Flores-Flores et al., 2015). Debido a la baja frecuencia y niveles de FB<sub>1</sub> encontrados en el presente estudio, esta micotoxina no reviste peligro para el ganado bovino que sólo consume pastos naturales, diferente es la situación en el caso de animales a los cuales se le da suplementación con cereales, principalmente maíz y sorgo, sustratos normalmente contaminados con niveles superiores a 1000 µg/kg (Reyes Velasquez, 2011).

Existen escasas evidencias científicas con respecto a los efectos negativos de la ingestión de micotoxinas sobre el estado de salud y el rendimiento del ganado bovino. La evaluación del impacto económico real de las micotoxinas en la producción del ganado bovino sigue siendo un inconveniente que merece mayor investigación (Zinedine et al., 2007; Fink-Gremmels, 2008b; Whitlow y Hagler, 2010; Dunière et al., 2013; Santos et al., 2013; Pulina et al., 2014). En general, se supone que dentro del rumen la población protozoaria tiene la capacidad para detoxificar las micotoxinas que se ingieren, pero esto puede variar entre las diferentes clases de micotoxinas. La contribución de las bacterias y otros organismos del rumen ha sido subestimada (Streit et al., 2012). Varias micotoxinas son, sin embargo, capaces de modificar la microbiota del rumen, ya que ejercen actividad antimicrobiana, antiprotozoaria y antifúngica, ejemplos típicos son la patulina, ácido fusárico, BEA y ENNs. Hallazgos clínicos demuestran que las micotoxinas deterioran la microbiota ruminal. Después de un

período de alimentar a vacas lecheras con ensilaje contaminado se observó una reducción del llenado del rumen, mala conversión alimentaria y diarrea leve (Hadley et al., 2006, Wenz et al., 2007). La co-ocurrencia de micotoxinas observada en el presente estudio es relevante teniendo en cuenta sus posibles efectos sobre la microbiota ruminal.

En base a la revisión bibliográfica, se puede afirmar que, aunque la mayoría de las micotoxinas detectadas durante el presente estudio se encuentren en concentraciones individuales bajas, tal co-ocurrencia puede provocar efectos sinérgicos, antagónicos o aditivos en animales. Esto debería generar preocupación ya que las contaminaciones múltiples pueden representar un riesgo para la producción y la salud del ganado (Njobech et al., 2012; Changwa et al., 2018).

El presente estudio aporta datos nuevos y originales en cuanto a la presencia de múltiples metabolitos de *Fusarium* en pastos naturales (no cultivadas) usados para alimentación bovina. Si bien en la bibliografía pueden encontrarse estudios que han investigado la presencia de micotoxinas, en pastos usados como forrajes (principalmente ensilados) para la alimentación del ganado, esas pasturas analizadas generalmente eran cultivadas, y asimismo la mayoría de los estudios se encuentran centrados en pocas micotoxinas tales como DON, ZEA, FB y AF (Driehuis et al., 2008, Reed y Moore, 2009; Skládanka et al., 2011).

Además, está demostrado que la exposición crónica a bajas dosis de algunas de estas micotoxinas puede tener efectos en los parámetros productivos, causando pérdidas económicas que pueden ser directas e indirectas, estas últimas si bien son difíciles de cuantificar, son las mayores. Las pérdidas directas son causadas por la muerte de los animales, la disminución de los índices reproductivos (abortos, infertilidad, malformaciones), reducción de la productividad en los animales sobrevivientes y otras alteraciones debidas a enfermedades transitorias, enfermedades sub-clínicas con disminución de la producción de leche, carne o lana y aumento de la susceptibilidad a otras enfermedades debido a depresión inmunológica. Las pérdidas indirectas incluyen compra de ganado para sustituir a los animales muertos y los gastos asociados al diagnóstico de las intoxicaciones y al tratamiento de los animales afectados. La incidencia real de las micotoxinas en salud animal y en salud pública permanece incierta, debido a que a menudo estos metabolitos se encuentran en muy bajas concentraciones que son difíciles de detectar, que los síntomas no siempre son bien definidos, por ejemplo la falta de apetito (anorexia), desmejoramiento general o reducción de peso, los que pueden fácilmente ser confundidos con otras muchas enfermedades y que muchas veces los técnicos y los productores no están suficientemente alertas a los problemas de micotoxicosis (Reyes Velásquez, 2011).

## **CAPÍTULO III**

## CAPITULO III. INCIDENCIA DE ESPECIES DE *Fusarium* PRESENTES EN PASTOS NATURALES

### III. INTRODUCCIÓN

El género *Fusarium* comprende un grupo muy diverso de hongos filamentosos que presentan 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; Burgess y Bryden, 2012). 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 capítulo anterior se indicó que un total de 173 muestras de pastos naturales destinados a la alimentación bovina fueron recolectadas durante los años 2011 y 2014 de potreros de dos establecimientos ganaderos ubicados en la provincia de Chaco. El pastoreo de pastos naturales nativos y cultivados son la base de la producción de la carne vacuna en Argentina (Arelovich et al., 2011). Las muestras fueron analizadas usando un UHPLC MS/MS que permitió la detección y cuantificación de 18 metabolitos producidos por especies del género *Fusarium*. El análisis reveló la presencia de ZEA en 153 de las 173 muestras analizadas, también se detectó  $\alpha$  y  $\beta$ -ZEA (65 y 35 respectivamente). Los niveles de ZEA y sus derivados ( $\alpha$  y  $\beta$  ZEA) encontrados en los pastos naturales analizados serían suficientes para que una vez consumidos por el ganado bovino puedan biotransformarse en el rumen e hígado y por lo tanto encontrarse en orina tanto zeranól ( $\alpha$ -ZAL), como ZEA y sus derivados. Es importante destacar que también se detectaron algunos metabolitos con probada toxicidad en ruminantes como son los tricotecenos tipo A, específicamente T-2 y HT-2 que fueron detectados en alta frecuencia y niveles. Se encontraron también otros metabolitos en muy alta frecuencia como son BEA, equisetina, AUF. La contaminación con micotoxinas de *Fusarium* en pastos naturales, consumidos por ganado bovino, parece no ser un fenómeno esporádico, sino que ocurre a lo largo de todo el año y en diferentes años como pudo observarse durante el presente estudio. Sobre la base de

la diversidad de micotoxinas de *Fusarium* detectadas en los pastos, consideramos de sumo interés evaluar la incidencia y distribución de especies de éste género en los diferentes pastos, para lo cual se utilizaron las mismas muestras evaluadas en el capítulo anterior. En el presente capítulo se describe la diversidad fúngica y el perfil toxicogénico de la especie de *Fusarium* predominante en un ecosistema natural con mínima actividad antropogénica como son los humedales de Chaco.

### **III. HIPÓTESIS**

Los pastos naturales que se utilizan para la alimentación bovina presentan contaminación con especies de *Fusarium* potencialmente toxicogénicas. Además hay una asociación entre el género de los pastos y las especies de *Fusarium*, así como también con las micotoxinas presentes.

### **III. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la incidencia de especies del género *Fusarium* en pastos naturales (no cultivables) utilizados para la alimentación bovina en los humedales de Chaco y determinar el perfil toxicogénico de aquellas cepas aisladas con mayor prevalencia.

### **III. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar la incidencia de especies de *Fusarium* en pastos naturales.
2. Estudiar la variación estacional de las especies de *Fusarium* presentes en pastos naturales.
3. Identificar las especies de *Fusarium* presentes mediante marcadores morfológicos y moleculares
4. Evaluar el perfil toxicogénico de las cepas de *Fusarium* aisladas en mayor prevalencia de muestras de pasto.

### **III. MATERIALES Y METODOS**

#### **III.1. Determinación de la incidencia de especies de *Fusarium* presentes en pastos naturales**

##### **III.1.1. Muestreo**

Las muestras utilizadas fueron obtenidas en el muestreo detallado en el capítulo II.1.1.

### III.1.2. Medios de cultivo y soluciones

- Nash y Snyder: peptona 15 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g;  $\text{MgSO}_4 (7\text{H}_2\text{O})$  0,5 g; pentacloronitrobenzeno 1 g; agar 20 g; agua destilada 1000 ml; sulfato de neomicina (solución stock) 12 ml y sulfato de estreptomina (solución stock) 20 ml. Se ajustó el pH a un valor entre 5,5 - 6,5 y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121 °C. Se dejó enfriar el medio a 50 °C y se agregaron 20 ml de sulfato de estreptomina (solución stock) y 12 ml de sulfato de neomicina (solución stock) por litro.
- Solución stock de sulfato de estreptomina: 5 g de sulfato de estreptomina en 1000 ml de agua destilada.
- Solución stock de sulfato de neomicina: 1 g de sulfato de neomicina en 1000 ml de agua destilada.
- Agar Agua (AA): agar 15 g y agua destilada 1000 ml. Se esterilizó durante 15 minutos a 121 °C en autoclave.
- Agar Hojas de Clavel (AHC): hojas de clavel (1 - 5) hojas; agar 15 g y agua destilada 1000 ml. Se preparó el medio colocando 1 a 5 hojas de clavel estériles en placa de Petri de 6 cm por 15 mm y se agregó agar agua al 1,5% enfriado a 45 °C. Se almacenó tres o cuatro días previo a su uso para determinar posibles contaminantes provenientes de las hojas.
- Agar Papa Glucosado (APG): papa 250 g; glucosa 20 g; agar 20 g y agua destilada 1000 ml. Se cortaron en trozos papas lavadas sin pelar, se hidrataron con 500 ml de agua y se cocinaron a vapor fluente durante 45 min. Por otro lado, se esterilizó el agar en 500 ml de agua destilada. Se filtró el caldo con las papas a través de gasa y se adicionó al agar disuelto. La pulpa de la papa restante se homogeneizó para obtener un puré y la mitad de éste se adicionó al agar junto con la glucosa, luego se llevó a volumen con agua destilada (1000 ml). Se fraccionó el medio en tubos de ensayo y se esterilizó en autoclave a 115 °C durante 20 minutos y se dejó solidificar inclinado.
- Agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA): sacarosa 0,2 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g;  $\text{MgSO}_4 (7\text{H}_2\text{O})$  0,5 g;  $\text{KNO}_3$  1 g; KCl 0,5 g; agar 20 g y agua destilada 1000 ml. Se esterilizó durante 15 minutos a 121 °C en autoclave.
- Medio completo:  $\text{NO}_2\text{Na}$  2 g; caseína 2,5 g; extracto de levadura 1 g; sacarosa 30 g;  $\text{PO}_4\text{KH}_2$  1 g;  $\text{SO}_4\text{Mg} (7\text{H}_2\text{O})$  0,5 g; ClK 0,5 g; agar (Bacto-Difco) 20 g; solución stock de vitaminas 10 ml; solución de elementos trazas 0,2 ml; agua destilada 1.000 ml. Se esterilizó durante 15 minutos a 121 °C en autoclave.

- Solución stock de vitaminas: tiamina (B1) 100 mg; riboflavina (B2) 30 mg; piridoxina (B6) 75 mg; pantotenato de Ca (B3) 200 mg; nicotinamida (B5) 75 mg; ácido ascórbico (C) 50 mg; ácido p-amino benzoico 5 mg; colina 200 mg; ácido fólico 5 mg; biotina 5 mg; inositol 4 mg; etanol al 50% 1 l.
- Solución de elementos trazas: (para 100 ml) ácido cítrico 5 g;  $\text{SO}_4\text{Zn} (6\text{H}_2\text{O})$  5 g;  $(\text{SO}_4)_2\text{Fe}(\text{HN}_4)_2 6\text{H}_2\text{O}$  1 g;  $\text{SO}_4\text{Cu} 5\text{H}_2\text{O}$  250 mg;  $\text{SO}_4\text{Mn}$  50 mg; ácido bórico 50 mg;  $\text{MoO}_4\text{Na}_2 2\text{H}_2\text{O}$  50 mg; agua destilada 95 ml.

### III.1.3. Aislamiento de las especies de *Fusarium*

De cada muestra analizada se cortaron segmentos de tallos y hojas de aproximadamente 5 mm, luego fueron desinfectados superficialmente sumergiéndolos en una solución de etanol al 95% por 2 min, y posteriormente lavados con agua destilada estéril (este último paso se repitió 5 veces). Las piezas lavadas se colocaron a razón de 10 pedazos por cada placa de Petri (10 placas, 100 piezas en total) conteniendo el medio Nash y Snyder para lograr el aislamiento selectivo de especies de *Fusarium* (Leslie y Summerell, 2006). Las placas se incubaron a 25 °C durante 7 días bajo ciclos alternativos de 12h/12h de luz blanca y negra, respectivamente. Las colonias que presentaron características correspondientes al género *Fusarium* fueron transferidas al medio SNA e incubadas bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente, para su posterior identificación.

### III.2. Identificación de las especies de *Fusarium* mediante marcadores morfológicos

Para la identificación morfológica de todos los aislados obtenidos en este estudio, se realizaron cultivos monospóricos a partir del medio SNA, para lo cual se tomó una pequeña cantidad de propágulos fúngicos y se realizó una suspensión en 10 ml de agua destilada estéril. Luego de homogeneizar dicha suspensión se transfirió a una placa de Petri con AA, se diseminó por rotación y se descartó el excedente. Las placas se incubaron inclinadas durante 16 a 18 hs a 24 °C para permitir la germinación de los conidios. Posteriormente se procedió a la observación y obtención de conidios germinados bajo lupa estereoscópica (40x) mediante aguja histológica. Un conidio se transfirió a AHC en placas de Petri de 6 cm y, otro a un tubo de APG. Los cultivos se incubaron durante dos semanas con ciclos alternativos de luz blanca/luz negra de 12 hs. a 24 °C. La identificación de las cepas se realizó siguiendo la metodología propuesta por Leslie y Summerell (2006).

### III.3. Perfil toxicogénico de la especie de *Fusarium* predominante en pastos

#### III.3.1. Cepas

Se determinó el perfil toxicogénico de un total de 50 cepas de *Fusarium* identificadas mediante caracteres morfológicos y que presentaban características similares a *F. acuminatum*/*F. armeniacum*.

#### III.3.2. Producción de micotoxinas

Para evaluar la capacidad de producir micotoxinas se colocaron 100 gr de arroz en frascos Erlenmeyer de 250 ml, se hidrataron con 40 ml de agua destilada y se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 30 min (dos días consecutivos). Posteriormente cada frasco Erlenmeyer fue inoculado con un disco de agar proveniente del margen de una colonia de cultivo, desarrollada durante 7 días en el medio ASN bajo ciclos alternativos de luz blanca/luz negra (12/12h) a 25 °C. Las muestras se incubaron a 25°C durante 28 días en oscuridad y agitados manualmente durante la primera semana de incubación. Luego del período de incubación cada muestra se secó en estufa de aire forzado durante 24h a 60 °C, se molieron utilizando un molinillo (marca molino) y se almacenaron a - 20°C hasta el análisis.

#### III.3.3. Extracción de micotoxinas

A 5 g de cada muestra de arroz molida, se le agregaron 20 ml del disolvente de extracción (acetonitrilo/agua/ácido acético 79:20:1, v/v/v). Posteriormente la mezcla se agitó durante 90 minutos utilizando un agitador rotatorio GFL 3017 (GFL, Burgwedel, Alemania) y luego se dejó decantar por gravedad. A continuación cada mezcla se diluyó 1:20 con el solvente de dilución (acetonitrilo/agua/ácido acético 49,5:49,5:1 v/v/v). Después de una mezcla adecuada, 5 µl del extracto diluido se inyectó en el sistema LC-MS/MS sin más tratamiento (Sulyok et al., 2006).

#### III.3.4. Análisis de micotoxinas mediante LC-MS/MS

La detección y cuantificación de micotoxinas de *F. chaquense*, se realizó siguiendo la metodología descrita en el capítulo II.1.3.

### **III.4. Identificación de la especie de *Fusarium* predominante mediante amplificación y secuenciamiento del factor de elongación**

#### **III.4.1. Producción de la biomasa fúngica**

Para este estudio, se seleccionaron al azar 14 cepas de un total de 50 utilizadas para determinar el perfil toxicogénico en el punto III.3.1. Se realizó una suspensión de esporas en Tween 20 de cada cepa, desarrolladas en medio SNA. La suspensión se transfirió a frascos Erlenmeyer de 250 ml, que contenían 50 ml de medio completo. Estos frascos se incubaron a 28 °C durante 2 a 3 días en un agitador rotatorio (150 rpm) y se cosechó el micelio por filtración, lavándolo con agua destilada estéril y secándolo entre papel absorbente. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta el momento de realizar la extracción del ADN.

#### **III.4.2. Extracción, purificación y cuantificación del ADN genómico**

El micelio congelado se pulverizó con nitrógeno líquido en morteros y se distribuyó en microtubos. El ADN fue extraído con buffer CTAB (bromuro de cetiltrimetil amonio) siguiendo la metodología propuesta por Leslie y Summerell (2006). El ADN genómico fúngico se cuantificó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop-ND. El análisis de la calidad del ADN se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8–1%.

#### **III.4.3. Amplificación y secuenciamiento del factor de elongación**

Se amplificó un fragmento del gen EF-1 $\alpha$  utilizando los cebadores EF-1 y EF-2 (Tabla 1) a las condiciones de reacción descritas en O'Donnell et al. (1998). La reacción de PCR se realizó en una mezcla de 50  $\mu$ l que contenía 5  $\mu$ l (0,2 mM) de cada dNTPs; 5  $\mu$ l de 1x Buffer PCR, 1,5  $\mu$ l de Mg<sub>2</sub>Cl (50 mM), 1,5  $\mu$ l (10  $\mu$ M) de cada cebador, 5  $\mu$ l de ADN genómico (10-20 ng/ $\mu$ l) y 0,2  $\mu$ l de Taq ADN polimerasa (5 U, Invitrogen). Un control negativo que no contenía el ADN templado se incluyó en cada experimento a fin de probar posibles contaminaciones de los reactivos. La amplificación se realizó en un termociclador MJ Research PTC-200 (MJ Research Inc., Watertown, MA) con las siguientes condiciones: 1 ciclo a 94 °C por 1 min, seguido por 34 ciclos a 94 °C por 30 seg, 56 °C por 45 seg, 72 °C por 1 min. Se realizó una extensión final de 5 min a 72 °C después de los 35 ciclos. Los productos de amplificación se examinaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% tiñendo con bromuro de etidio y fueron visualizados con un analizador de imágenes para determinar tanto la integridad y estimar el tamaño de los fragmentos. El tamaño de los fragmentos obtenidos se estimó por comparación con ADN testigo de 100 pb (New England Biolabs) con bandas de referencia que oscilan entre 1000–100 pb.

Los productos de PCR obtenidos de la amplificación del gen EF-1 $\alpha$ , fueron enviados a Macrogen, Corea, en donde previo a su secuenciamiento los mismos fueron purificados. Se secuenciaron ambas cadenas de ADN utilizando los cebadores de amplificación. Las secuencias amplificadas, fueron editadas manualmente con el programa BioEdit versión 4.7.8 (Hall, 1999) mediante examinación de los cromatogramas. Una vez editadas las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos en el GenBank (NCBI o National Center for Biotechnology Information) y FUSARIUM-ID para determinar su homología con otras especies.

**Tabla 1.** Secuencia de los cebadores utilizados

CEBADORES	SECUENCIAS
EF1	ATGGGTAAGGAAGACAAGAC
EF2	GGAAGTACCAGTGATCATGTT

### III.5. Correlación entre las especies de *Fusarium* y la presencia de micotoxinas en pastos

A fin de estudiar la existencia de una correlación lineal entre la contaminación con micotoxinas presentes en los pastos naturales y la especie predominante aislada de los mismos, se calculó el Índice de Pearson. Dicho análisis se realizó utilizando el programa SigmaStat para Windows versión 2.03 (SPSS Inc.).

### III.6. Análisis de diversidad de especies del genero *Fusarium* en pastos

#### III.6.1. Índices de diversidad

El estudio de la biodiversidad nos indica las distintas especies que se encuentran en un área determinada, la cual puede ir incrementándose o decayendo según las condiciones naturales y acciones antrópicas. Los índices de diversidad están formados por la riqueza y la abundancia de especies (Ludwig y Reynolds, 1988; Gove et al., 1994; Krebs, 1989). Existen varios índices que se emplean para determinar la biodiversidad en los diferentes ecosistemas, pero los más usados son los de Shannon y Simpson.

El índice de diversidad de Shannon (Shannon y Weaver, 1949) asume que todas las especies están representadas en las muestras y que todos los individuos fueron muestreados al azar. Puede adquirir valores entre 0 y 5, y verse fuertemente influenciado por las especies más abundantes. A mayor valor del índice indica una mayor biodiversidad del ecosistema. De esta forma, el índice contempla la cantidad de

especies presentes en el área de estudio (riqueza de especies), y la cantidad relativa de individuos de cada una de esas especies (abundancia). Su fórmula es:

$$H' = - \sum_{i=1}^s p_i \ln p_i$$

Dónde: S es el número de especies de *Fusarium*;  $p_i$  es la proporción de individuos de la especie  $i$  respecto al total de individuos ( $n_i/N$ );  $n_i$  es el número de individuos de la especie  $i$ ; N es el número de todos los individuos del género *Fusarium*.

El índice de Simpson (Simpson, 1949) permite medir la riqueza de los organismos de un hábitat. Parte de la base de que un sistema es más diverso cuanto menos dominancia de especies hay, y la distribución es más equitativa. Asume valores entre 0 y 1, un índice cercano a 1 significa que la muestra es muy diversa. Su fórmula es:

$$\lambda = \sum_{i=1}^s p_i^2$$

Dónde: S es el número de especies de *Fusarium*;  $p_i$  es la proporción de individuos de la especie  $i$  respecto al total de individuos ( $n_i/N$ );  $n_i$  es el número de individuos de la especie  $i$ ; N es el número de todos los individuos del género *Fusarium*.

Para el cálculo de los índices de diversidad de Shannon-Weaver y de Simpson, se utilizó el programa PAST versión 2.17b (Hammer et al., 2001).

### II.6.2. Análisis estadístico

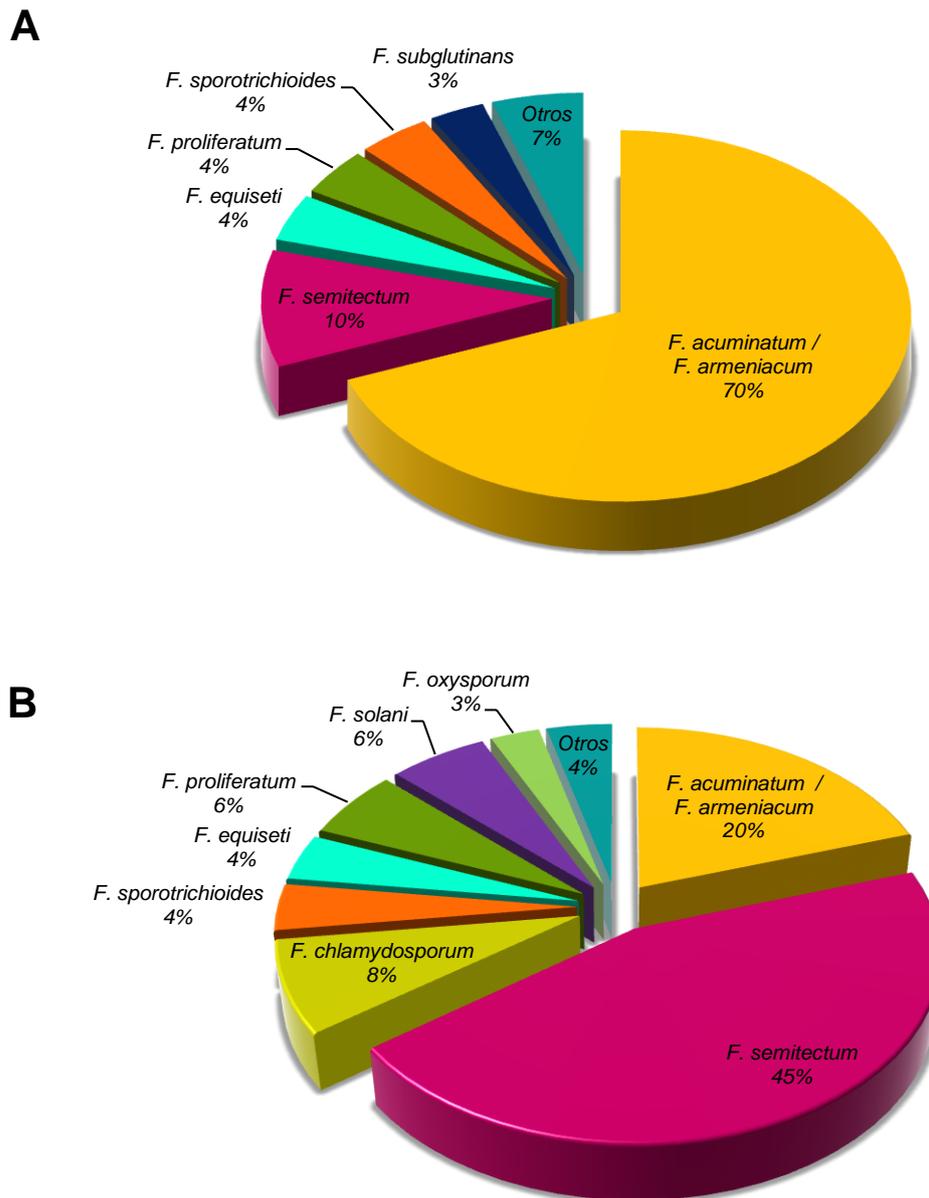
Para determinar si existía alguna diferencia en cuanto a los índices de diversidad (Simpson y Shannon) entre ambos establecimientos y entre ambos períodos de muestreo, se realizó un análisis de varianza (ANOVA). Cuando el análisis resultó estadísticamente significativo, se realizó un test a posteriori LSD-Fisher para la separación de las medias. Todos los análisis fueron realizados usando el programa InfoStat versión 2018 (Di Rienzo et al., 2018). El nivel estadístico de significancia fue determinado con un  $p < 0,05$ .

### III. RESULTADOS

#### III.1. Aislamiento e identificación morfológica de las especies de *Fusarium* en pastos

En el primer muestreo realizado (2011) se determinaron los porcentajes de infección con especies de *Fusarium* en 106 muestras de pastos naturales destinadas a la alimentación bovina, provenientes de dos establecimientos ganaderos ubicados en la provincia de Chaco. Se observó entre un 50 y 100% de contaminación con especies del género *Fusarium* en todas las muestras analizadas. De cada muestra se seleccionaron al azar entre 5 y 10 aislados con características del género *Fusarium*, obteniendo un total de 773 aislados. Posteriormente se procedió a su identificación morfológica, teniendo en cuenta las características macroscópicas en APG y las características microscópicas en el medio AHC. Como resultado, se observó que en el establecimiento San Francisco la especie predominante presentó características morfológicas similares a *F. acuminatum*/*F. armeniacum* (70%) seguido de *F. semitectum* (10%), mientras que en el establecimiento La Adela la especie predominante fue *F. semitectum* (45%) seguido por aislamientos con características morfológicas similares a *F. acuminatum*/*F. armeniacum* (20%). Además, se encontraron otras especies presentes en los pastos analizados provenientes de ambos establecimientos; en San Francisco se aislaron las especies: *F. equiseti*, *F. proliferatum*, *F. sporotrichioides*, *F. subglutinans*, en porcentajes mayores al 3%, y otras especies como *F. verticillioides*, *F. beomiforme*, *F. chlamydosporum*, *F. tricinctum*, *F. oxysporum*, *F. solani* en porcentajes inferiores al 3%. Mientras que en el establecimiento La Adela se aislaron a las especies: *F. chlamydosporum*, *F. proliferatum*, *F. solani*, *F. equiseti*, *F. sporotrichioides* y *F. oxysporum* en porcentajes mayores al 3% y otras especies en porcentajes inferiores como *F. subglutinans* y *F. verticillioides* (Figura 2).

Para el estudio de la variación estacional, se recolectaron, entre los dos períodos del año 2014, un total de 67 muestras de pastos pertenecientes a 13 géneros diferentes (*Chloris*, *Cynodon*, *Dichantium*, *Diplachna*, *Elionurus*, *Eragrostis*, *Eriochloa*, *Hymenachme*, *Leersia*, *Panicum*, *Paspalum*, *Sorgastrum*, *Spartina*) todos incluidos dentro de la familia Poaceae. Con estas muestras se procedió de la misma manera que en el muestreo del año 2011, obteniendo un total de 550 aislados, luego se procedió a la identificación morfológica del total de aislamientos. Como resultado se observó que, en las muestras de pasto analizadas del primer y segundo período, la especie predominante presentó características morfológicas similares a *F. acuminatum*/*F. armeniacum* (71 y 55%) seguido de *F. semitectum* (11 y 26%).

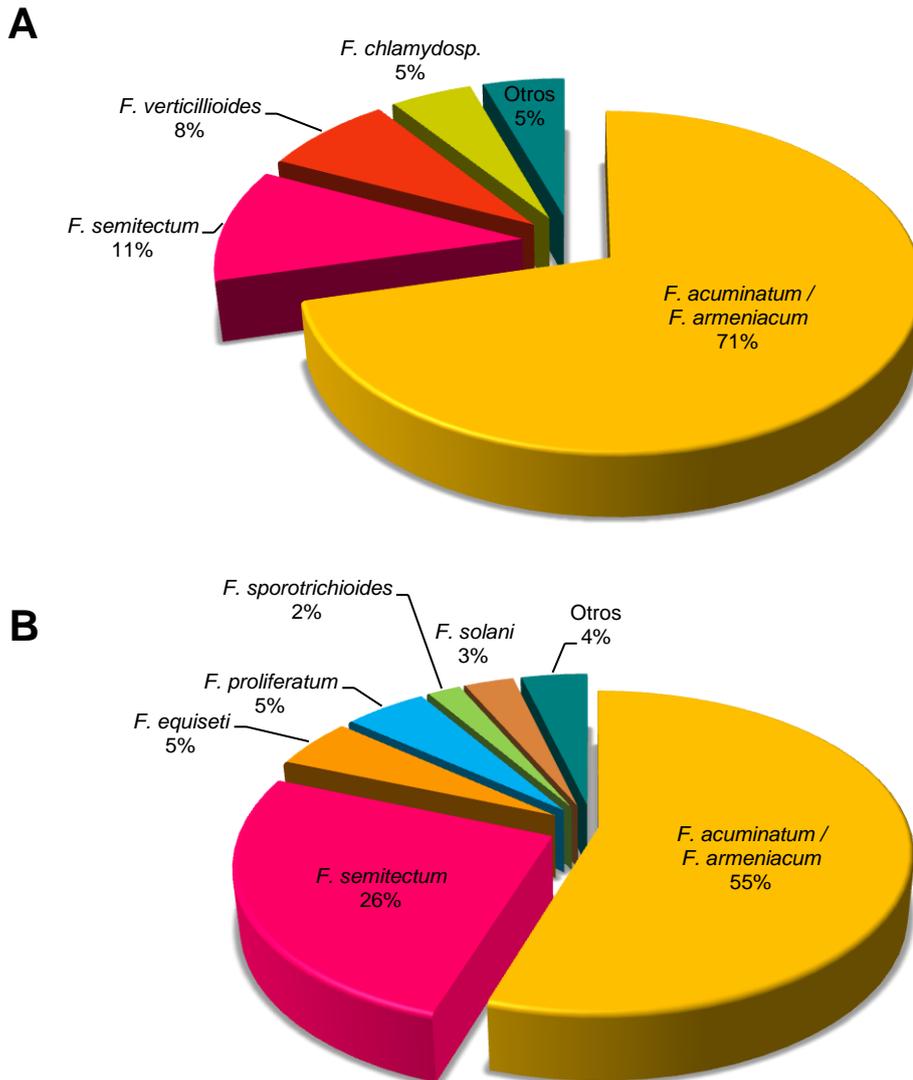


**Figura 1.** Porcentaje de infección con especies del género *Fusarium*, en muestras de pastos naturales destinadas al consumo animal, provenientes de los campos de la provincia de Chaco. **(A)** Establecimiento San Francisco **(B)** Establecimiento La Adela, analizadas en el año 2011.

Además, se encontraron otras especies pertenecientes al género *Fusarium* en los pastos analizados; en el primer período (Febrero) se aislaron las especies *F. verticillioides* y *F. chlamydosporum* en porcentajes mayores al 5% y otras especies como *F. subglutinans*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. longipes* y *F. beomiforme* en porcentajes inferiores. Mientras que, en el segundo período (Septiembre), se aislaron a las especies *F. equiseti*, *F. proliferatum*, *F. solani* y *F.*

*sporotrichoides* en porcentajes mayores al 2% y otras en porcentajes inferiores como *F. verticillioides*, *F. subglutinans*, *F. oxysporum*, *F. tricinctum* y *F. poae* (Figura 3).

La especie aislada, en el presente estudio, con características morfológicas similares a *F. acuminatum* y *F. armeniacum*, como es la pigmentación en APG, producción de macroconidios de esporodoquios y formación de clamidospodas en CLA; además fueron capaces de producir microconidios, característica no atribuida a ninguna de estas dos especies (Leslie y Summerell, 2006).



**Figura 2.** Porcentaje de infección con especies del género *Fusarium*, en muestras de pastos naturales destinadas al consumo animal, provenientes del establecimiento San Francisco en los meses de **(A)** Febrero y **(B)** Septiembre en el año 2014.

### III.2. Perfil toxicogénico de la especie de *Fusarium* predominante en pastos

En este estudio se determinó el perfil toxicogénico de 50 cepas de *Fusarium*, aisladas y seleccionadas al azar durante el muestreo del año 2011. En base a los resultados obtenidos se observó la producción de un total de 10 metabolitos mediante el análisis por LC-MS/MS (Tabla 2). Sólo dos cepas fueron capaces de producir las 10 micotoxinas: T-2, T-2TR, T-2TE, HT-2, DAS, MAS, NEO, AUF, BEA y ZEA. Los perfiles de producción de toxinas más frecuentes encontradas fueron la co-producción de T-2, T-2TR, HT-2, DAS, MAS, AUF y BEA producidos por 9 aislamientos seguido de T-2, T-2TR, T-2TE, HT-2, DAS, MAS, NEO, AUF y BEA producidos por 8 aislamientos. Los tricotecenos tipo A fue el grupo de micotoxinas producido con mayor frecuencia, también se detectaron algunas micotoxinas producidas por *Fusarium* consideradas emergentes como son BEA y AUF. Además, algunas cepas fueron capaces de producir ZEA. Entre los tricotecenos tipo A, HT-2, T-2 y NEO fueron sintetizados en mayores niveles y frecuencia, seguido por DAS y MAS. Se detectó la producción de HT-2, T-2, NEO y DAS en 48 (96%), 47 (94%), 47 (94%) y 38 (76%) de las cepas respectivamente. Los niveles de T-2 oscilaron entre 0,58 y 547 mg/kg (media= 101,17 mg/kg), los niveles de NEO variaron entre 1,20 y 542 mg/kg (media= 141 mg/kg). Los niveles de producción de HT-2 variaron entre 0,12 y 147 mg/kg (media= 20,55 mg/kg), mientras que los niveles de DAS variaron entre 0,04 y 3,45 mg/kg (media= 0,76 mg/kg). Otro tricotecenos tipo A producido en menor frecuencia fue MAS (20 aislados). Los derivados de T-2, T-2TR y T-2TE, también fueron detectados, T-2TR fue producido por 46 aislamientos (92%) en niveles que van desde 1,0 a 54,62 mg/kg mientras que T-2TE fue producido por 23 aislamientos (46%) en niveles que variaron desde 2,79 a 973 mg/kg. La BEA fue producida por 48 aislamientos (96%) con niveles que variaron desde 0,03 a 29,7 mg/kg con una concentración media de 4,44 mg/kg. La mayoría de las cepas (47) fueron capaces de producir AUF en niveles que variaron desde 3,09 a 1,797 mg/kg con una concentración media de 471 mg/kg. Mientras que la ZEA fue producida en menor frecuencia (20%) en niveles que variaron desde 4,03 a 1,173.60 µg/kg.

**Tabla 2.** Perfil de producción de micotoxinas de cepas de *Fusarium* predominantes

CEPA	T2 mg/kg	T2-TE mg/kg	T2-TR mg/kg	HT-2 mg/kg	DAS mg/kg	MAS mg/kg	NEO mg/kg	AUF mg/kg	BEA mg/kg	ZEA µg/kg
RC-J1	168,8	ND	14,26	96,32	0,91	0,45	173,68	163,6	ND	ND
RC-J3	ND	ND	1,09	3,41	ND	ND	ND	ND	0,8	ND
RC-J11	34,98	ND	3,86	30,03	0,99	0,5	8,1	67,08	0,84	ND
RC-J13	70,07	54,86	7,34	29,79	0,28	ND	160,16	110	15,02	ND
RC-J18*	31,82	ND	1,26	4,63	0,24	0,08	49,78	106,08	0,19	ND
RC-J27	134,88	310,88	8,54	18,26	1,14	0,27	419,84	1095,2	0,27	ND
RC-J33	90,56	ND	4,83	11,03	0,53	0,17	282,48	829,6	3,64	ND
RC-J37	48,05	ND	2,1	3,68	0,42	ND	148,24	479,68	11,29	ND
RC-J39	ND	ND	ND	0,51	ND	ND	ND	ND	0,5	ND
RC-J45	ND	ND	5,11	11,46	ND	ND	ND	ND	1,61	ND
RC-J57	19,18	ND	1,95	2,04	0,36	ND	200,16	509,6	29,69	ND
RC-J66	17,98	3,63	ND	5,54	0,08	ND	8,46	5,18	0,36	ND
RC-J71	101,28	ND	11,35	14,79	0,08	ND	27,02	1192,8	0,46	ND
RC-J77	11,03	ND	1,72	3,5	ND	ND	1,75	41,97	0,48	ND
RC-J80*	16,51	34,8	3,18	7,38	0,04	0,08	4,68	118,56	0,85	ND
RC-J106	25,55	189,92	3,8	5,54	ND	ND	3,14	977,6	0,84	ND
RC-J109	23,02	146,08	2,59	6,1	ND	ND	2,69	375,2	0,81	ND
RC-J108	28,91	ND	3,14	6,22	0,04	ND	6,87	1034,4	1,2	ND
RC-J110	14,11	42,62	1,87	4,84	ND	ND	3,43	159,36	0,51	ND
RC-J120	23,88	ND	1,31	3,24	0,85	ND	54,15	9,17	25,04	ND
RC-J121	23,1	92,48	4,28	9,77	ND	ND	2,56	286,48	0,5	ND
RC-J126	15,3	25,43	2,41	6,2	ND	ND	2,61	20,1	0,43	ND
RC-J134*	39,18	177,92	6,22	10,91	0,06	0,09	14,36	442,08	0,19	ND
RC-J139*	115,2	81,28	10,52	16,88	0,15	ND	48,83	143,92	0,08	ND
RC-J161	15,05	ND	0,60	2,66	0,12	ND	50,24	247,84	2,22	ND
RC-J171	24,25	499,6	9,36	50,86	0,17	ND	52,24	1105,6	0,78	ND
RC-J173*	1,22	5,48	ND	0,16	ND	ND	9,88	3,49	0,91	ND

(Continuación tabla 2)

RC-J174*	329,12	98,08	5,3	31,38	1,9	0,32	112,8	65,94	1,64	ND
RC-J182*	547,44	ND	15,18	56,13	3,45	0,74	574,8	1276	0,24	46,3
RC-J185	91,2	124	9,87	11,66	0,41	ND	229,52	1208,8	0,57	ND
RC-J195	23,75	ND	1,92	7,94	0,11	ND	5,71	16,53	0,46	ND
RC-J197	191,28	314,16	14,35	24,64	0,79	0,11	382,88	1264	1,04	ND
RC-J208	464,4	972,8	36,1	73,13	1,77	0,43	541,6	1796,8	1,63	ND
RC-J214	120,4	59,34	3,27	10,26	0,3	0,08	58,34	345,52	0,03	ND
RC-J223*	0,61	ND	ND	ND	ND	ND	1,2	3,09	ND	78,74
RC-J226	47,25	ND	2,43	3,52	0,41	ND	143,92	490,32	11,34	ND
RC-J230	292,72	ND	14,09	31,18	0,89	ND	307,76	950,4	0,95	ND
RC-J236	77,73	164,32	22,06	ND	0,55	0,49	239,84	272,48	0,35	ND
RC-J241	53,06	13,21	5,54	9,63	0,22	ND	38,68	6,64	7,39	ND
RC-J243	57,42	314,4	3,72	4,22	0,68	ND	295,92	976	1,29	ND
RC-J258	142,24	163,68	11,18	102,48	0,78	1,06	149,44	360	14,26	ND
RC-J261*	89,6	123,6	7,83	42,79	0,67	0,74	94,32	34,86	0,99	80,48
RC-J265	192,16	ND	1	10,1	1,73	0,21	194,24	322,24	0,85	ND
RC-J283*	119,28	ND	54,62	146,8	0,1	ND	184,88	220	25,76	24,21
RC-J286	115,92	150,8	2,44	8,38	0,97	0,12	179,2	255,52	19,94	4,03
RC-J288*	250,8	ND	5,24	16,1	2,36	0,34	344,08	520	0,69	13,95
RC-J290	39,91	ND	3,65	4,73	0,56	0,13	184,88	318,24	1,95	51,46
RC-J292*	346,96	ND	9,66	21,81	2,42	0,27	374,64	1035,2	0,64	210,64
RC-J293*	0,58	2,79	ND	0,49	ND	ND	14,74	20,19	20,82	1173,6
RC-J295*	67,34	ND	2,66	3,1	1,17	ND	231,04	862,4	0,58	167,92

ND: no detectado, menor al LD. (\*) Cepas analizadas mediante secuenciación de una porción del gen que codifica para el factor de elongación (EF-1 $\alpha$ ).

### III.3. Identificación molecular de la especie de *Fusarium* predominante en pastos

A fin de conocer la identidad de las cepas de *Fusarium* aisladas en mayor prevalencia, con características morfológicas similares a *F. acuminatum*/*F. armeniacum*, se realizó la amplificación parcial y secuenciamiento del gen correspondiente al factor de elongación (EF-1 $\alpha$ ) de un pequeño subconjunto de cepas de *Fusarium* (14), seleccionadas al azar del total de 50 cepas utilizadas en el punto III.2.

En base a los resultados obtenidos mediante la realización de un análisis BLAST, con la base de datos en el GenBank (NCBI o National Center for Biotechnology Information), se observó una identidad molecular del 96-99% con *F. armeniacum* (Tabla 3).

**Tabla 3.** Identificación molecular a nivel de especie de las cepas de *Fusarium*

CEPAS	Identidad molecular asignada (%) BLAST NCBI EF-1 $\alpha$
RC - J18	<i>Fusarium armeniacum</i> NRRL 29133 (99%)
RC - J80	<i>Fusarium armeniacum</i> NRRL 29133 (99%)
RC - J134	<i>Fusarium armeniacum</i> NRRL 29133 (99%)
RC - J139	<i>Fusarium armeniacum</i> NRRL 29133 (99%)
RC - J173	<i>Fusarium armeniacum</i> NRRL 29133 (99%)
RC - J174	<i>Fusarium armeniacum</i> FRC R-09335 (99%)
RC - J182	<i>Fusarium armeniacum</i> NRRL 29133 (98%)
RC - J223	<i>Fusarium armeniacum</i> FRC R-09335 (99%)
RC - J261	<i>Fusarium armeniacum</i> NRRL 29133 (99%)
RC - J283	<i>Fusarium armeniacum</i> NRRL 29133 (99%)
RC - J288	<i>Fusarium armeniacum</i> NRRL 29133 (98%)
RC - J292	<i>Fusarium armeniacum</i> NRRL 29133 (99%)
RC - J293	<i>Fusarium armeniacum</i> NRRL 29133 (96%)
RC - J295	<i>Fusarium armeniacum</i> NRRL 29133 (98%)

### III.4. Correlación entre las especies del género *Fusarium* y la presencia de micotoxinas en pastos

En base a los resultados obtenidos, no se observaron relaciones significativas entre ningún par de variables en el análisis de correlación de Pearson ( $p > 0,05$ ).

### III.5. Análisis de diversidad de especies del género *Fusarium* presentes en pastos

Los índices de diversidad de especies del género *Fusarium* aisladas de las muestras de pasto de los dos establecimientos y períodos de muestreo realizados se presentan en la tabla 4.

En cuanto al estudio de la frecuencia y diversidad de las especies del género *Fusarium* identificadas en el establecimiento San Francisco en el año 2011, se pudo observar que el índice de diversidad de Simpson fue de 0,41. Mientras que el índice de Shannon en dicho establecimiento fue 0,71. En el establecimiento La Adela, en el mismo año, se pudo observar que el índice de diversidad de Simpson fue de 0,43. Mientras que el índice de Shannon fue de 0,77. El análisis de varianza demostró que no existen diferencias en cuanto a la riqueza y abundancia de especies de *Fusarium* entre ambos establecimientos muestreados ( $p > 0,05$ ).

Con respecto a los 2 períodos de muestreo realizados en el establecimiento San Francisco en el año 2014, se puede observar que ambos índices de diversidad, Simpson y Shannon (0,51 y 0,95), fueron mayores en el muestreo realizado en el mes de septiembre en comparación con los obtenidos en febrero. El análisis de varianza demostró que existen diferencias en cuanto a la riqueza y abundancia de especies de *Fusarium* entre ambos meses en los que se llevaron a cabo los muestreos ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 4.** Índices de Simpson (1-D) y de Shannon ( $H'$ ) obtenidos en los Establecimientos San Francisco y La Adela.

ESTABLECIMIENTOS	Índice de Simpson	Índice de Shannon
	Media $\pm$ D.E.	
San Francisco FILA	0,41 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>	0,71 $\pm$ 0,43 <sup>a</sup>
La Adela	0,43 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>	0,77 $\pm$ 0,46 <sup>a</sup>
<b>ESTACIONES</b>		
Febrero	0,35 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	0,59 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup>
Septiembre	0,51 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>	0,95 $\pm$ 0,45 <sup>b</sup>

D.E, Desvío estándar. Para cada columna y tratamiento valores con letras iguales no son significativamente diferentes (LSD-Fisher  $p > 0,05$ ).

### III. DISCUSIÓN

En el estudio de la incidencia de especies del género *Fusarium*, las muestras de pasto analizadas, provenientes de dos establecimientos ganaderos en los años 2011 y 2014, mostraron entre un 50 y 100% de contaminación. Las especies predominantes aisladas en la mayoría de las muestras analizadas fueron *F. acuminatum*/*F. armeniacum* (61%) y *F. semitectum* (26%), seguido de otras especies en muy baja

frecuencia como fueron *F. equiseti*, *F. proliferatum*, *F. sporotrichioides*, *F. subglutinans*, *F. chlamydosporum*, *F. verticillioides*, entre otras. Nuestros resultados son comparables con aquellos encontrados por otros autores en otros países del hemisferio sur como Nueva Zelanda y Sudáfrica, los cuales han informado una alta incidencia de especies del género *Fusarium* en pastos (Bosch et al., 1989), raíces (Lamprecht et al., 1988) y vainas de leguminosas destinadas al pastoreo (Lamprecht et al., 1986). En particular, Lamprecht et al. (1986, 1988, 1990), demostraron que *F. acuminatum* y *F. oxysporum* eran las especies predominantes en los pastos de Sudáfrica, mientras que *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. crookwellense* y *F. sambucinum* predominaban en pastos en Nueva Zelanda (Bosch et al., 1989; Lauren et al., 1988, 1992). Por otro lado, en un estudio llevado a cabo en el este de Australia, se observó que las especies que se encontraban con mayor frecuencia en pastos eran *F. acuminatum*, seguido de *F. equiseti* y *F. semitectum*, entre otras (Burgess et al., 1988). Igualmente, en Australia Occidental, se demostró que las especies de *Fusarium* están comúnmente asociadas con raíces (Wong et al., 1984), follaje (Barbetti, 1985, 1986) y semillas (Barbetti, 1990) de varias especies de pastos, en especial del tipo leguminosas. En particular, *F. acuminatum*, *F. avenaceum* y *F. equiseti* han sido aislados con una alta incidencia en pastos anuales del oeste de Australia (Barbetti y Allen, 2005). Además, en Croacia se determinó la diversidad de especies de *Fusarium* en malezas y desechos vegetales, siendo *F. graminearum*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. subglutinans* y *F. proliferatum* aisladas con porcentajes mayores al 10%. Mientras que *F. acuminatum*, *F. avenaceum*, *F. crookwellense*, *F. equiseti*, *F. semitectum*, *F. solani*, *F. sporotrichioide*, *F. venenatum*, entre otros, con porcentajes menores al 8% (Postic et al., 2012). Por otro lado, en China, Elmer et al. (2016) determinaron la incidencia de especies de *Fusarium* en raíces y tallos de *Spartina alterniflora* (Poacea), informando la presencia de *F. semitectum* seguido de *F. palustre*, *F. chlamydosporum* y por último, *F. proliferatum*, siendo *F. palustre* más frecuente en tallos mientras que *F. semitectum* se encontraba en las raíces. Recientemente, Moussa et al. (2017) informaron la presencia de dos nuevas especies de *Fusarium* pertenecientes al complejo FFSC, denominadas *F. sudanense* y *F. terrícola*, halladas en muestras de suelo y restos de plantas en Sudán y Australia. A pesar de la importancia de este género (Poaceae), son escasos los estudios en ecosistemas naturales con mínima perturbación antropogénica y se han llevado a cabo principalmente en Australia (Summerell et al., 2010). Además, *F. armeniacum* se ha encontrado en raíz y tallo de maíz en EEUU (Kommedahl et al., 1979), en pasturas y suelo de Australia (Burges et al., 1988) y en avena y sorgo en Sudáfrica (Marasas et

al, 1988; Rabie et al., 1986). *Fusarium armeniacum* es considerado saprófito, pero recientemente se lo ha descrito como patógeno de soja (Ellis et al., 2012).

Por revisión bibliográfica *F. acuminatum* y *F. armeniacum* son especies muy similares morfológicamente entre sí (Leslie y Summerell, 2006), aunque las cepas aisladas con mayor predominancia en el presente estudio además, presentan microconidios, característica no atribuidas a las especies *F. acuminatum* y *F. armeniacum* (Burgess y Summerell, 2000). Anteriormente, Burgess et al. (1993) informó que *F. armeniacum* era conocido como *F. acuminatum*, sin embargo, debido a las similitudes en la morfología macroconidial, fue descrito como una subespecie de *F. acuminatum*. Estudios posteriores, (Altomare et al., 1997; Benyon y Burgess, 1997; Benyon et al., 2000), mostraron que este taxón era una especie distinta y fue elevado a rango especie por Burgess y Summerell (2000). En base a su cariotipo, *F. armeniacum* está más estrechamente relacionado con *F. sporotrichioides* que con *F. acuminatum* (Nagy y Hornok, 1994). *Fusarium acuminatum* y *F. armeniacum* pueden diferenciarse en base de la pigmentación en APG, la velocidad de producción de clamidosporas y la velocidad de crecimiento. Ambas especies, en PDA, producen micelio aéreo blanco con pigmentación de color rojo en el agar con producción de esporodoquios anaranjado pálido en el centro del cultivo, en el caso de *F. acuminatum*, mientras que en *F. armeniacum*, los esporodoquios son anaranjado brillante. En CLA, ambas especies, producen macroconidios en esporodoquios anaranjados sobre las hojas de clavel y formación de clamidosporas, siendo la formación de estas últimas mucho más lenta y escasa en *F. acuminatum*. Además, la velocidad de crecimiento de *F. acuminatum* es mucho más lenta a 25 y 30 °C en comparación con *F. armeniacum* (Leslie y Summerell, 2006).

Si bien *F. armeniacum* es una especie muy emparentada con *F. acuminatum*, estas se diferencian principalmente porque *F. armeniacum* es un gran productor de tricotecenos tipo A (T2, HT-2, NEO, DAS) mientras que *F. acuminatum* no (Desjardins, 2006, Logrieco et al., 1992; Moss y Thrane, 2004, Munkvold, 2017). Las cepas de *Fusarium* aisladas y utilizadas para determinar el perfil toxicogénico durante el presente estudio, fueron capaces de producir T-2, T-2 TR, T-2 TE, HT-2, DAS, MAS, NEO, AUF, BEA y ZEA, ésta última en baja frecuencia y concentración. Los datos obtenidos confirman que este hongo podría ser un importante productor de T-2 y HT-2 y además de otros tricotecenos. Según Desjardins (2006) *F. armeniacum* es productor de T-2 y tricotecenos relacionados, también produce BEA y fusarina C, sin embargo los perfiles de producción de micotoxinas de esta especie son escasos e incompletos. En el año 2006, Zitomer demostró que 3 cepas de *F. armeniacum* tenían la capacidad de producir tricotecenos tipo A y B pero eran incapaces de producir ZEA. En el

presente estudio nuestras cepas fueron incapaces de producir tricotecenos tipo B y fusarina C. *Fusarium armeniacum* se encuentra estrechamente relacionada a otras especies de *Fusarium* productoras de tricotecenos tipo A como *F. palustre*, *F. goolgardi*, *F. langsethiae*, *F. sibiricum* y *F. sporotrichioides* (Laurence et al., 2015). Es importante destacar que la mayoría de las cepas utilizadas en el presente estudio, fueron capaces de producir AUF mientras que la producción de ZEA fue bastante poco común.

En cuanto a la identificación molecular, la comparación de las secuencias parciales de EF-1 $\alpha$  con las secuencias disponibles en las bases de datos FUSARIUM ID y NCBI, reveló una homología de todas las cepas del 96% al 99,24% con *F. armeniacum*. Por lo tanto, los criterios tanto morfológicos como moleculares y el perfil toxicogénico apoyan la identificación de los aislamientos como *F. armeniacum*, no obstante en el presente estudio se observó la presencia de microconidios en todas las cepas de *Fusarium* identificadas morfológicamente. Por lo tanto, un estudio filogenético multilocus sería de gran utilidad para confirmar su identificación mediante caracteres moleculares.

Dado que *F. semitectum* también fue una especie aislada con una alta prevalencia en el presente estudio, y siendo capaz de producir algunos tricotecenos tipo A como DAS, además de equisetina, MON, BEA y ZEA (Munkvold, 2017), estudios futuros podrían ser necesarios para determinar si esta especie es la responsable de los niveles de ZEA encontrados en las distintas muestras de pasto analizadas.

El estudio de los índices de Simpson y de Shannon, calculados para determinar la frecuencia y diversidad de las especies del género *Fusarium* en pastos, arrojó valores menores a 1 para ambos establecimientos ganaderos y períodos de muestreo. Estos resultados muestran una biodiversidad relativamente baja de especies del género *Fusarium* presentes en los pastos naturales de los humedales de Chaco; siendo esto esperable debido a la alta prevalencia (dominancia) de aislados identificados hasta el momento como *F. armeniacum* (61%), los cuáles serán sometidos a análisis filogenéticos para determinar su verdadera identidad. Este resultado discrepa con lo que normalmente ocurre en ambientes naturales con mínima o nula actividad antropogénica, dado que estos ambientes generalmente presentan mayor biodiversidad de especies en comparación con ambientes agrícolas (Laurence et al., 2012).

## **CAPÍTULO IV**

## CAPÍTULO IV. DESCRIPCIÓN DE UNA NUEVA ESPECIE PREDOMINANTE EN PASTOS

### IV. INTRODUCCIÓN

*Fusarium* es considerado un género fúngico de importancia económica, comúnmente aislado de la mayoría de las regiones bioclimáticas. Muchas especies pertenecientes a éste género pueden causar una amplia variedad de enfermedades en plantas, producir micotoxinas y afectar negativamente a la salud humana y animal (Leslie y Summerell, 2006).

En los capítulos anteriores se describieron los resultados obtenidos de la evaluación de la biodiversidad de especies de *Fusarium* y la contaminación natural con sus micotoxinas en pastos naturales recolectados de los humedales de la provincia de Chaco (27° 20'S 058° 50'O, sitio Ramsar N° 1366). Este pastizal templado se utiliza para pastorear ganado durante todo el año debido a la riqueza en pastos palatables (Poaceae). Un total de 173 muestras de pastos asintomáticos que pertenecían a unos 13 diferentes géneros de Poaceas, fueron recolectadas en 2011 y 2014. En un primer estudio pudimos detectar contaminación natural con importantes micotoxinas (tóxicas para los rumiantes) como los tricotecenos de tipo A, principalmente T-2 y HT-2 y ZEA, todas halladas en altas frecuencias y concentraciones. Además, también estuvieron presentes otros metabolitos producidos por *Fusarium* como BEA, equisetina y AUF (Nichea et al., 2015b). El análisis micológico de los pastos reveló que todas las muestras estaban contaminadas con especies de *Fusarium* en niveles que variaron desde el 50 al 100% independientemente del género de pasto analizado. La mayoría de los aislamientos mostraron características morfológicas similares entre sí y similares a aquellas descritas para las especies *F. acuminatum* y *F. armeniacum*, pero con algunas inconsistencias. La mayoría de las características de nuestros aislados concordaban con *F. armeniacum*, pero eran capaces de producir microconidios, los cuales según la descripción realizada por Burgess y Summerell (2000) no están presentes en esta especie. *Fusarium acuminatum* y *F. armeniacum* son especies filogenéticas distintas y pueden diferenciarse en cuanto a su perfil toxicogénico, ya que *F. armeniacum* es altamente toxigénico y productor de tricotecenos (Wing et al., 1993,1994) mientras que *F. acuminatum* no (Fekete et al., 1997). Para resolver esta incongruencia, se determinó el perfil toxicogénico de un pequeño subconjunto de aislados (50). Como resultado se observó que los mismos fueron capaces de producir tricotecenos tipo A, principalmente T-2, HT-2, NEO y algunas micotoxinas consideradas menores como BEA y AUF. Algunos aislados fueron capaces también de producir ZEA (Nichea et al., 2015a). De acuerdo a

nuestros resultados, hasta ese momento, podíamos concluir que nuestros aislados pertenecían a la especie *F. armeniacum*. Para que nuestros hallazgos fueran más consistentes decidimos confirmar la identidad de un sub-set de aislados (14) a través de la secuenciación parcial del gen del factor de elongación (EF-1 $\alpha$ ). El análisis de BLAST, de cada secuencia, en la base de datos NCBI y FUSARIUM-ID reveló una identidad de secuencia de 96 a 99% con las cepas *F. armeniacum*. Inicialmente se generó con estas mismas secuencias un árbol filogenético, y se observó que la filogenia no reflejaba lo obtenido mediante el BLAST, ya que todas nuestras secuencias, que mostraron una alta similitud con las secuencias de *F. armeniacum*, no se agruparon con ningún representante de esta especie y además formaron un grupo que no incluía ninguna de las otras especies de *Fusarium* conocidas que también fueron incluidas en el análisis. Esta falta general de coherencia entre los resultados de BLAST y los análisis filogenéticos, destacan las limitaciones asociadas con el uso de similitud de secuencias solo para el diagnóstico de nuevas especies.

Ante los resultados obtenidos y pensando que podíamos estar ante una nueva especie de *Fusarium*, se decidió llevar a cabo una examinación morfológica más profunda y un análisis filogenético multilocus.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Los pastos naturales (Flia. Poaceae) presentes en ecosistemas con mínima actividad antropogénica, contienen especies pertenecientes al género *Fusarium* nunca antes descritas, razón por lo cual el número de especies totales de este género es muy superior al conocido en la actualidad.

#### **IV. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la presencia de especies pertenecientes al género *Fusarium* no descritas hasta el momento, en pastos naturales presentes en ecosistemas con mínima actividad antropogénica.

#### **IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Caracterizar los aislamientos mediante marcadores moleculares y un análisis filogenético multilocus.
2. Evaluar el perfil toxicogénico de las cepas de *F. chaquense*.
3. Describir formalmente la especie *F. chaquense*.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **IV.1. Cepas utilizadas en el estudio**

Se analizaron un total de 70 cepas (Tabla 1), 14 de las cuales habían sido aisladas en 2011 y las mismas habían sido caracterizadas morfológicamente y molecularmente a través de la secuenciación parcial del EF-1 $\alpha$ , además se le había determinado el perfil toxicogénico (Capítulo III). En el presente capítulo se adicionaron 56 cepas, aisladas en el muestreo de 2014 (Capítulo III) que presentaban idénticas características morfológicas que las cepas antes mencionadas, las mismas fueron seleccionadas utilizando como criterio el género de la planta (Poaceas) del cual habían sido aisladas de manera que todos estuvieran representados. A estas últimas cepas, en principio, se le realizó la identificación molecular mediante la secuenciación parcial del gen EF-1 $\alpha$  y determinación del perfil toxicogénico.

Finalmente, para el análisis filogenético multilocus, de las 14 cepas del año 2011 se seleccionaron al azar 5 y 20 correspondientes al año 2014, con las mismas se procedió a la amplificación parcial del gen RPB2 y posterior secuenciación.

Las cepas empleadas fueron aisladas de las muestras de pasto provenientes del muestreo realizado en el Establecimiento San Francisco en los años 2011 y 2014. Todas las cepas se conservaron a -80°C en glicerol al 15 %, en la colección de cultivos de la UNRC. La cepa tipo (NRRL66749, RC-J293) y 3 cepas adicionales NRRL66748, RC-J174; NRRL66750, RC-J1301 y NRRL66751, RC-J1802 fueron depositadas en Agricultural Research Service Culture Collection, Peoria, Illinois EEUU.

### **IV.2. Identificación molecular y análisis filogenético**

#### **IV.2.1. Producción de la biomasa fúngica**

La producción de biomasa fúngica se realizó de una manera similar a lo explicado en el capítulo III.4.1.

#### **IV.2.2. Extracción, purificación y cuantificación del ADN genómico**

La extracción, purificación y cuantificación del ADN genómico se realizó de una manera similar a lo explicado en el capítulo III.4.2.

#### **IV.2.3. Amplificación y secuenciamiento del factor de elongación**

Se realizó la amplificación del gen EF-1 $\alpha$  a los 56 aisladas provenientes del muestreo del año 2014, siguiendo el protocolo descrito por O'Donnell et al. (1998), en el capítulo III.4.3.

Tabla 1. Características de las cepas utilizadas

CEPAS	MES/AÑO	HOSPEDERO	COORDENADAS	NRRL	N° GenBank	
					EF-1α	RPB2
RC-J18	Julio 2011	Poaceae	S 27° 31' 10.6'' W 59° 04' 38.4''			
RC-J80	Julio 2011	Poaceae	S 27° 31' 09.2'' W 59° 04' 36.8''		MF795074	MK033028
RC-J134	Julio 2011	Poaceae	S 27° 31' 10.7'' W 59° 04' 36.3''			
RC-J139	Julio 2011	Poaceae	S 27° 31' 10.7'' W 59° 04' 36.3''		MF795076	MK033029
RC-J173	Julio 2011	Poaceae	S 27° 31' 10.2'' W 59° 04' 36.7''		MF795075	MK033030
RC-J174	Julio 2011	Poaceae	S 27° 31' 10.2'' W 59° 04' 36.7''	<b>66748</b>	MF795083	MK033031
RC-J182	Julio 2011	Poaceae	S 27° 31' 09.7'' W 59° 04' 37.2''			
RC-J223	Julio 2011	Poaceae	S 27° 31' 09.1'' W 59° 04' 37.4''			
RC-J261	Julio 2011	Poaceae	S 27° 31' 05.6'' W 59° 05' 20.3''			
RC-J283	Julio 2011	Poaceae	S 27° 30' 57.5'' W 59° 05' 21.9''		MF795077	MK033032
RC-J288	Julio 2011	Poaceae	S 27° 30' 57.1'' W 59° 05' 22.4''			
RC-J292	Julio 2011	Poaceae	S 27° 30' 56.8'' W 59° 05' 22.9''			
RC-J293	Julio 2011	Poaceae	S 27° 30' 56.8'' W 59° 05' 22.9''	<b>66749</b>	MF795061	MK033033
RC-J295	Julio 2011	Poaceae	S 27° 30' 56.8'' W 59° 05' 22.9''			
RC-J1001	Febrero 2014	<i>Dichantium</i>	S 27° 30' 38,4'' W 59° 04' 59,6''		MF795059	MK033034
RC-J1014	Febrero 2014	<i>Paspalum sp.</i>	S 27° 30' 01,7'' W 59° 05' 51,5''		MF795060	MK033035
RC-J1053	Febrero 2014	<i>Paspalum notatun</i>	S 27° 30' 38,4'' W 59° 04' 59,6''		MF795062	MK033036
RC-J1071	Febrero 2014	<i>Paspalum notatun</i>	S 27° 30' 38,4'' W 59° 04' 59,6''			
RC-J1077	Febrero 2014	<i>Paspalum notatun</i>	S 27° 30' 38,4'' W 59° 04' 59,6''			
RC-J1087	Febrero 2014	<i>Paspalum notatun</i>	S 27° 30' 38,4'' W 59° 04' 59,6''			
RC-J1093	Febrero 2014	<i>Hymenachme</i>	S 27° 30' 01,7'' W 59° 05' 51,5''		MF795063	MK033037
RC-J1099	Febrero 2014	<i>Hymenachme</i>	S 27° 30' 01,7'' W 59° 05' 51,5''			
RC-J1102	Febrero 2014	<i>Pasp. intermedium</i>	S 27° 30' 01,7'' W 59° 05' 51,5''		MF795064	MK033038
RC-J1114	Febrero 2014	<i>Pasp. intermedium</i>	S 27° 30' 01,7'' W 59° 05' 51,5''			
RC-J1125	Febrero 2014	<i>Pasp. intermedium</i>	S 27° 30' 01,7'' W 59° 05' 51,5''			
RC-J1145	Febrero 2014	<i>Paspalum sp</i>	S 27° 30' 01,7'' W 59° 05' 51,5''		MF795065	MK033039

(Continuación tabla 1)

RC-J1147	Febrero 2014	<i>Leersia luziola</i>	S 27° 30' 04,1'' W 59° 05' 05,6''		
RC-J1154	Febrero 2014	<i>Paspalum sp.</i>	S 27° 30' 04,1'' W 59° 05' 05,6''		
RC-J1179	Febrero 2014	<i>Pasp. plicatum</i>	S 27° 30' 04,1'' W 59° 05' 05,6''	MF795066	MK033040
RC-J1181	Febrero 2014	<i>Pasp. plicatum</i>	S 27° 30' 04,1'' W 59° 05' 05,6''		
RC-J1210	Febrero 2014	<i>Leersia luziola</i>	S 27° 30' 04,1'' W 59° 05' 05,6''	MF795067	MK033041
RC-J1214	Febrero 2014	<i>Leersia luziola</i>	S 27° 30' 04,1'' W 59° 05' 05,6''		
RC-J1242	Febrero 2014	<i>Panicum prionitis</i>	S 27° 30' 04,1'' W 59° 05' 05,6''	MF795068	MK033042
RC-J1244	Febrero 2014	<i>Panicum prionitis</i>	S 27° 30' 04,1'' W 59° 05' 05,6''		
RC-J1255	Febrero 2014	<i>Sorgastrum setosum</i>	S 27° 30' 04,1'' W 59° 05' 05,6''		
RC-J1283	Febrero 2014	<i>Sorgastrum setosum</i>	S 27° 30' 04,1'' W 59° 05' 05,6''	MF795069	MK033043
RC-J1301	Febrero 2014	<i>Diplachna</i>	S 27° 30' 50,3'' W 59° 05' 06,4''	<b>66750</b>	MF795070
RC-J1308	Febrero 2014	<i>Diplachna</i>	S 27° 30' 50,3'' W 59° 05' 06,4''		
RC-J1332	Febrero 2014	<i>Spartina sp.</i>	S 27° 30' 50,2'' W 59° 05' 06,1''	MF795071	MK033045
RC-J1349	Febrero 2014	<i>Spartina sp.</i>	S 27° 30' 50,2'' W 59° 05' 06,1''		
RC-J1367	Febrero 2014	<i>Spartina sp.</i>	S 27° 30' 50,2'' W 59° 05' 06,1''		
RC-J1396	Febrero 2014	<i>Eriochloa sp.</i>	S 27° 30' 50,1'' W 59° 05' 06,1''	MF795072	MK033046
RC-J1404	Febrero 2014	<i>Chloris sp.</i>	S 27° 30' 49,7'' W 59° 05' 06,3''		
RC-J1411	Febrero 2014	<i>Chloris sp.</i>	S 27° 30' 49,7'' W 59° 05' 06,3''	MF795073	MK033047
RC-J1507	Septiembre 2014	<i>Eriochloa sp.</i>	S 27° 30' 49,5'' W 59° 05' 06,1''		
RC-J1521	Septiembre 2014	<i>Eriochloa sp.</i>	S 27° 30' 49,5'' W 59° 05' 06,1''		
RC-J1525	Septiembre 2014	<i>Eriochloa sp.</i>	S 27° 30' 49,5'' W 59° 05' 06,1''		
RC-J1532	Septiembre 2014	<i>Eriochloa sp.</i>	S 27° 30' 49,5'' W 59° 05' 06,1''		
RC-J1551	Septiembre 2014	<i>Chloris sp.</i>	S 27° 30' 49,5'' W 59° 05' 06,1''		
RC-J1569	Septiembre 2014	<i>Spartina sp.</i>	S 27° 30' 49,5'' W 59° 05' 06,1''		
RC-J1581	Septiembre 2014	<i>Spartina sp.</i>	S 27° 30' 49,5'' W 59° 05' 06,1''	MF795078	MK033048
RC-J1599	Septiembre 2014	<i>Spartina sp.</i>	S 27° 30' 49,5'' W 59° 05' 06,1''		
RC-J1603	Septiembre 2014	<i>Panicum sp.</i>	S 27° 30' 49,5'' W 59° 05' 06,1''		
RC-J1621	Septiembre 2014	<i>Panicum sp.</i>	S 27° 30' 49,5'' W 59° 05' 06,1''		

(Continuación tabla 1)

RC-J1630	Septiembre 2014	<i>Panicum sp.</i>	S 27° 30' 49,5'' W 59° 05' 06,1''		
RC-J1634	Septiembre 2014	<i>Cynodon dactilon</i>	S 27° 30' 49,5'' W 59° 05' 06,1''	MF795079	MK033049
RC-J1647	Septiembre 2014	<i>Eragrostis sp.</i>	S 27° 31' 07,0'' W 59° 05' 00,9''		
RC-J1657	Septiembre 2014	<i>Eragrostis sp.</i>	S 27° 31' 07,0'' W 59° 05' 00,9''		
RC-J1671	Septiembre 2014	<i>Eragrostis sp.</i>	S 27° 31' 07,0'' W 59° 05' 00,9''	MF795080	MK033050
RC-J1678	Septiembre 2014	<i>Eragrostis sp.</i>	S 27° 31' 07,0'' W 59° 05' 00,9''		
RC-J1694	Septiembre 2014	<i>Elionurus sp.</i>	S 27° 31' 04,1'' W 59° 05' 05,6''		
RC-J1700	Septiembre 2014	<i>Sorghastrum setosum</i>	S 27° 31' 04,1'' W 59° 05' 05,6''		
RC-J1710	Septiembre 2014	<i>Panicum prionitis</i>	S 27° 31' 04,1'' W 59° 05' 05,6''		
RC-J1715	Septiembre 2014	<i>Leersia luziola</i>	S 27° 31' 06,9'' W 59° 05' 01,0''		
RC-J1739	Septiembre 2014	<i>Panicum sp.</i>	S 27° 31' 06,9'' W 59° 05' 01,0''		
RC-J1752	Septiembre 2014	<i>Paspalum distichum</i>	S 27° 30' 01,7'' W 59° 05' 51,5''	MF795081	MK033051
RC-J1761	Septiembre 2014	<i>Pasp. intermedium</i>	S 27° 30' 01,7'' W 59° 05' 51,5''		
RC-J1773	Septiembre 2014	<i>Hymenachme sp.</i>	S 27° 30' 39,0'' W 59° 04' 58,7''		
RC-J1777	Septiembre 2014	<i>Paspalum notatum</i>	S 27° 30' 39,0'' W 59° 04' 58,7''		
RC-J1802	Septiembre 2014	<i>Paspalum modestum</i>	S 27° 30' 39,0'' W 59° 04' 58,7''	<b>66751</b>	MF795082 MK033052

RC: Colección de la Universidad de Río Cuarto.

#### IV.2.4. Amplificación y secuenciamiento de la subunidad beta de la ARN polimerasa II

Se seleccionaron 25 de las 70 cepas previamente identificadas morfológicamente y a nivel molecular por amplificación del gen EF-1 $\alpha$  (Tabla 2).

La amplificación del gen RPB2, se realizó siguiendo el protocolo descrito por O'Donnell et al. (2010). Las regiones de la subunidad beta de la ARN polimerasa II que se amplificaron y secuenciaron fueron la RPB2 5-7 con los cebadores 5f2/7cr y la RPB2 7-11 con los cebadores 7cf/11ar (Tabla 2). La reacción de PCR para la amplificación de la región RPB2 5-7 se realizó en una mezcla de 25  $\mu$ l que contenía 2,5  $\mu$ l (0,2 mM) de cada dNTPs, 2,5  $\mu$ l de 10x buffer PCR, 0,75  $\mu$ l de Mg<sub>2</sub>Cl (50 mM), 1  $\mu$ l (10  $\mu$ M) de cada cebador, 1  $\mu$ l de ADN genómico (10 ng/ $\mu$ l) y 0,25  $\mu$ l de Taq ADN polimerasa (5 U, Invitrogen). Un control negativo que no contenía el ADN templado se incluyó en cada experimento a fin de probar posibles contaminaciones de los reactivos. La reacción de PCR para la amplificación de la región RPB2 7-11 se realizó en una mezcla de 50  $\mu$ l que contenía 5  $\mu$ l (0,2 mM) de cada dNTPs, 5  $\mu$ l de 10x buffer PCR, 1,5  $\mu$ l de Mg<sub>2</sub>Cl (50 mM), 1  $\mu$ l (10  $\mu$ M) de cada cebador, 2  $\mu$ l de ADN genómico (10 ng/ $\mu$ l) y 0,25  $\mu$ l de Taq ADN polimerasa (5 U, Invitrogen). Las amplificaciones de ambas regiones se realizaron en un termociclador MJ Research PTC-200 (MJ Research Inc., Watertown, MA) con las siguientes condiciones: 1 ciclo a 94 °C por 5 min, seguido por 34 ciclos a 94 °C por 50 seg, 58 °C por 50 seg, 72 °C por 1 min. Se realizó una extensión final de 7 min a 72 °C después de los 35 ciclos. Los productos de amplificación se examinaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio y fueron visualizados con un analizador de imágenes para determinar la integridad y estimar el tamaño de los fragmentos mediante comparación con ADN testigo de 100 pb (New England Biolabs) con bandas de referencia que oscilaban entre 1000–100 pb.

**Tabla 2.** Secuencia de los cebadores utilizados

CEBADORES	SECUENCIAS
<b>5f2</b>	GGGGWGAYCAGAAGAAGGC
<b>7cr</b>	CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT
<b>7cf</b>	ATGGGYAARCAAGCYATGGG
<b>11ar</b>	GCRTGGATCTTRTCRTCSACC

#### IV.2.5. Análisis filogenético

Los productos de PCR obtenidos de la amplificación los genes EF-1 $\alpha$  y RPB2, fueron enviados a Macrogen, Corea, donde fueron purificados previo a su secuenciación. Se secuenciaron ambas cadenas de ADN utilizando los cebadores de amplificación. Las secuencias amplificadas de ambos genes, fueron editadas manualmente con el programa BioEdit versión 4.7.8 (Hall, 1999) mediante examinación de los cromatogramas. Una vez editadas las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos en el GenBank (NCBI o National Center for Biotechnology Information) y FUSARIUM-ID para determinar su homología con otras especies.

Para la realización de un análisis filogenético, las secuencias previamente editadas, correspondientes a cada gen amplificado, fueron alineadas con secuencias de referencia obtenidas de bases de datos (Genbank, NCBI y Fusarium ID) de manera *on line* con el programa MAFFT versión 7 (Kato et al., 2017), luego aquellas regiones alineadas ambiguas fueron removidas utilizando Gblocks (Castresana, 2000, Talavera y Castresana, 2007). Las secuencias de referencias para cada análisis fueron seleccionadas en base a las relaciones filogenéticas dentro del género *Fusarium* previamente publicadas (O'Donnell et al., 1998, 2000, 2007; Schroers et al., 2004) (Tabla 3). El análisis filogenético se realizó bajo el principio de máxima parsimonia (MP), con pesos iguales, utilizando el programa TNT 1.1 (Goloboff et al., 2008). La estrategia de búsqueda se llevó a cabo utilizando 1000 RAS (Random Addition Sequences) y posterior re-arreglo de ramas por el algoritmo de TBR (Tree Bisection Reconnection), guardando 10 árboles por réplica, utilizando una memoria total de 10000 árboles. Además del número de pasos, en los análisis se obtuvo el índice de consistencia (grado de homoplasia) y el índice de retención (grado de sinapomorfía aparente) los cuales se calcularon para todos los árboles parsimoniosos a través del scrip del software TNT, STATS.RUN (Goloboff et al., 2008). Se realizó el consenso estricto para resumir la información no contradictoria de los grupos monofiléticos presentes. La medida de confianza o fiabilidad de los grupos obtenidos se valoró mediante un análisis de *bootstrap* de 1000 réplicas. En todos los casos *Fusarium proliferatum* ITEM 2287 fue utilizado como *outgroup* para la realización de este estudio. En la tabla 1 se pueden observar las secuencias de ADN utilizadas en este estudio y depositadas en el GenBank con los números de acceso correspondientes.

**Tabla 3.** Número de acceso del GenBank, hospedero y origen geográfico de las cepas de *Fusarium* utilizadas en el análisis filogenético

Cepas	Especies	N° GenBank		Hospedero	Origen
		EF-1 $\alpha$	RPB2		
NRRL 54218	<i>F. acuminatum</i>	HM068316	HM068336	Desconocido	Desconocido
NRRL 6227	<i>F. armeniacum</i>	HM744692	HQ154480	Festuca forraje	EEUU
NRRL 43641	<i>F. armeniacum</i>	GQ505430	GQ505494	Ojo de caballo	EEUU
NRRL 31970	<i>F. armeniacum</i>	HM744664	HQ154453	Suelo	Australia
NRRL 29133	<i>F. armeniacum</i>	HM744659	HQ154448	Desconocido	Desconocido
FRC-R-09335	<i>F. armeniacum</i>	GQ915501	GQ915485	Desconocido	EEUU
NRRL 66250	<i>F. goolgardi</i>	KP101123	KP083280	<i>Xanthorrhoea glauca</i>	Australia
NRRL 53412	<i>F. langsethiae</i>	HM744670	HQ154458	Trigo	Finlandia
NRRL 53437	<i>F. langsethiae</i>	HM744689	HQ154477	Avena	Rusia
NRRL 54050	<i>F. palustre</i>	GQ856968	KT597729	<i>Spartina alterniflora</i>	EEUU
NRRL 54058	<i>F. palustre</i>	GQ856942	KT597730	<i>Spartina alterniflora</i>	EEUU
ITEM 2287	<i>F. proliferatum</i>	KF466422	KF466411	Maíz	EEUU
NRRL 53429	<i>F. sibiricum</i>	HM744683	HQ154471	Avena	Far East, Vladivostok
NRRL 53430	<i>F. sibiricum</i>	HM744684	HQ154472	Avena	Far East, Chabarovsk
NRRL 25474	<i>F. sporotrichioides</i>	HM744651	HQ154440	Semillas de <i>Picea abies</i>	Alemania
NRRL 25479	<i>F. sporotrichioides</i>	HM744652	HQ154441	Semillas de <i>Pinus nigra</i>	Alemania

FRC: Fusarium Research Centre culture collection at Pennsylvania State University, State College, PA, EEUU; NRRL: Northern Regional Research Centre culture collection at the United States Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Peoria, IL, EEUU. ITEM: Agri-Food Toxigenic Fungi Culture Collection of the Institute of Sciences of Food Production, CNR, Bari, Italy.

### **IV.3. Perfil toxicogénico de cepas de *Fusarium chaquense***

#### **IV.3.1. Producción de micotoxinas**

La producción de micotoxinas de *F. chaquense*, se realizó siguiendo la metodología descrita en el capítulo III.3.2.

#### **IV.3.2. Extracción de micotoxinas**

La extracción de micotoxinas de *F. chaquense*, se realizó siguiendo la metodología descrita en el capítulo III.3.3.

#### **IV.3.3. Análisis de micotoxinas mediante LC-MS/MS**

La detección y cuantificación de micotoxinas de *F. chaquense*, se realizó siguiendo la metodología descrita en el capítulo II.1.3.

### **IV.4. Caracterización morfológica de la especie *Fusarium chaquense***

#### **IV.4.1. Descripción morfológica**

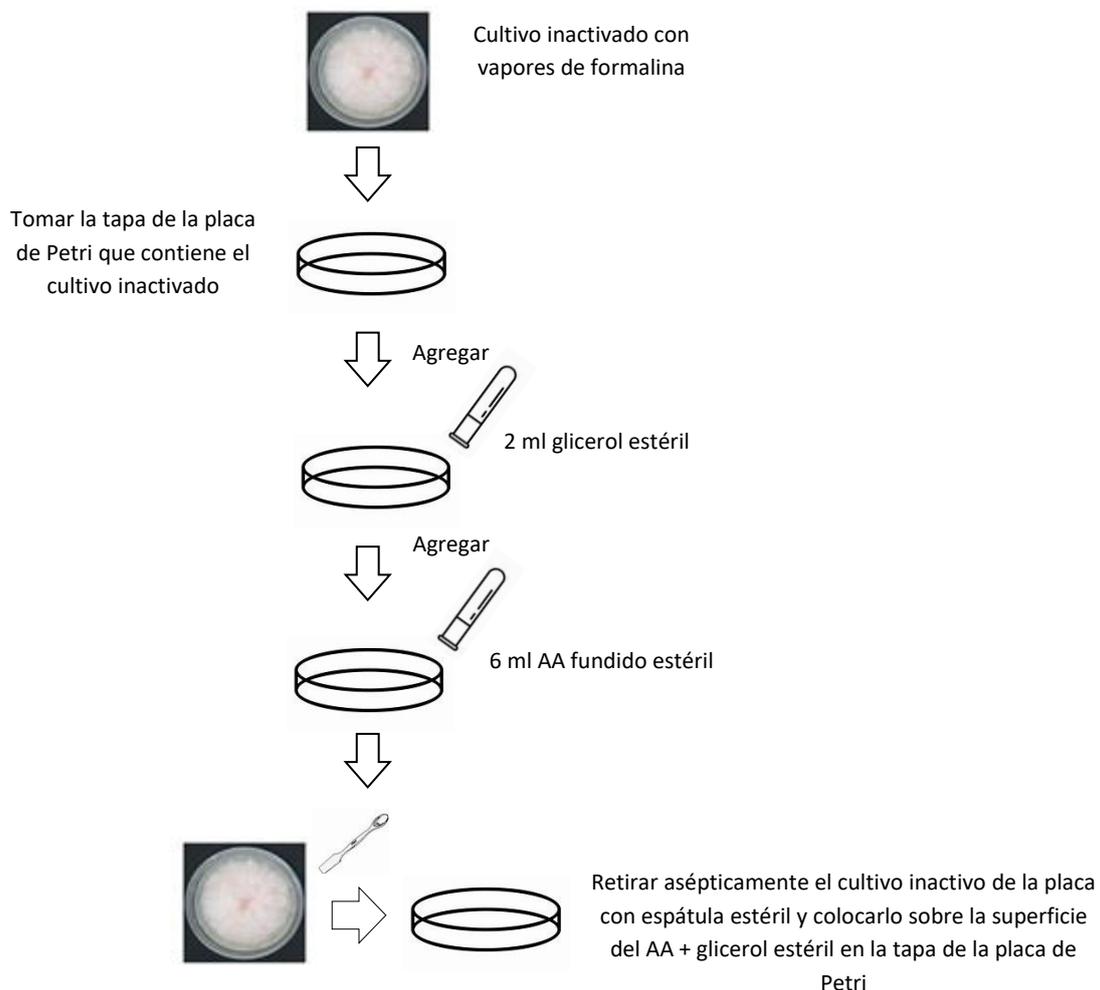
La caracterización morfológica de los aislados se llevó a cabo a través de la realización de un cultivo monospórico de cada cepa, obteniendo un único conidio germinado el cual fue inoculado en placas de Petri conteniendo el medio AHC. Las placas fueron incubadas bajo ciclos alternativos de luz blanca/luz negra (12/12 h) a 25 °C durante 15 días. Los cultivos fueron observados a través de un microscopio óptico a 20 y 40x con el propósito de observar la forma y el tamaño de los macroconidios producidos en esporoquio, la forma y la manera en la que se forman los microconidios incluyendo, además, el tipo de células conidiógenas y la producción de clamidosporas a los 7, 10 y 15 días de incubación. Una vez finalizado el periodo de incubación, se llevó a cabo la medición de macroconidios y microconidios, a partir de un mínimo de 30 conidios de cada tipo. Además, para observar la pigmentación y determinar la tasa de crecimiento de la colonia, se utilizaron placas con el medio de cultivo APG comercial, las cuales fueron inoculadas centralmente con una espora a partir de cada cepa crecida durante 7 días en el medio SNA a 25 °C bajo ciclos alternativos de 12h/12h de luz blanca y negra, respectivamente. Una vez inoculadas, las placas fueron incubadas a 20, 25 y 30 °C en oscuridad, durante 7 días. Este ensayo se realizó por triplicado a cada temperatura analizada (Leslie y Summerell, 2006). La evaluación del crecimiento se realizó diariamente, a partir de los 3 días de incubación, mediante la medición de los diámetros de las colonias en dos direcciones durante un período de incubación de 7 días. Se representó el incremento del radio de

la colonia en función del tiempo para cada cepa utilizada y en cada una de las temperaturas 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 (como la pendiente de la recta).

#### IV.4.2. Herbario

La descripción de una nueva especie de *Fusarium* requiere que un cultivo seco (herbario) sea depositado en un herbario reconocido. Las cepas utilizadas para este propósito fueron la RC-J1301 y la RC-J293, ambas depositadas en The Northern Regional Research Laboratory (NRRL, Peoria, IL, USA). Ambas cepas fueron inoculadas en un medio ASN (placas de Petri 90 mm) y posteriormente incubadas a 25°C durante 15 días bajo ciclos alternativos de 12h/12h de luz blanca y negra, respectivamente. Transcurrido el periodo de incubación los cultivos fueron expuestos a vapores de formalina durante 3 días en un desecador, con el fin de inactivar los cultivos.

Por otra parte, se prepararon 2 tubos de ensayo con 6 ml de agar agua al 2% y 2 tubos con 2 ml de glicerol los cuales se esterilizaron mediante autoclave a 121°C por 20 min. Se retiraron los cultivos del desecador y se procedió de la siguiente manera:



Luego, el cultivo se cubrió con papel para protegerlo del polvo, permitiendo a su vez la circulación de aire. Se almacenaron en un cajón durante varias semanas hasta que estuvieron completamente deshidratadas. Una vez seco, el cultivo poseía una apariencia/textura gomosa, se retiró de la tapa de la placa de Petri y se almacenó en un sobre (Leslie y Summerell, 2006).

## IV. RESULTADOS

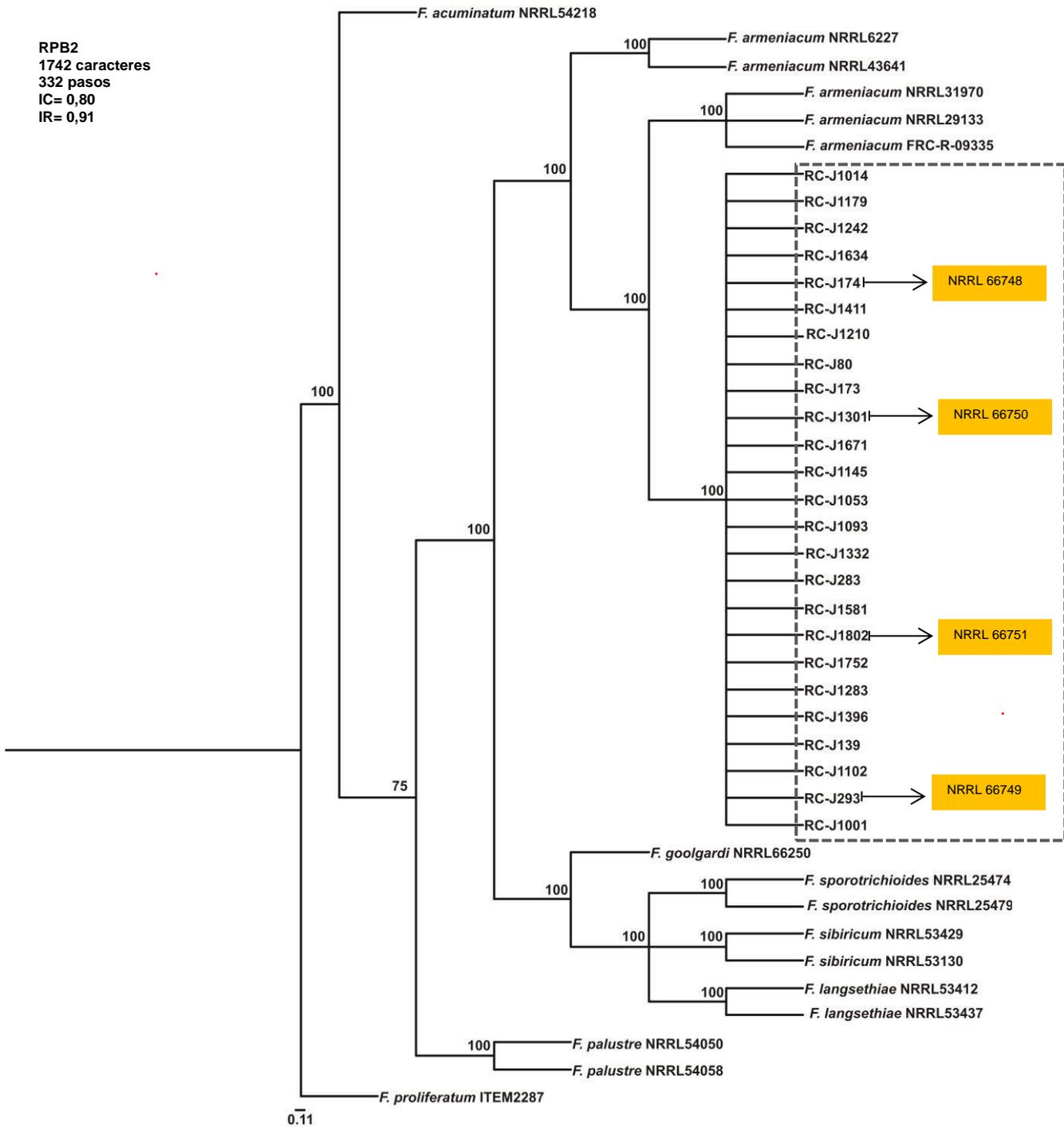
### IV.1. Identificación molecular y análisis filogenético de cepas de *Fusarium* predominantes en pastos

Es importante destacar que la identificación de las especies de *Fusarium* (presentados en el capítulo III) se basó en características morfológicas (macro y micro), y debido a que los aislamientos con mayor prevalencia resultaron ser una especie no descrita hasta el momento, decidimos estudiarla en mayor profundidad.

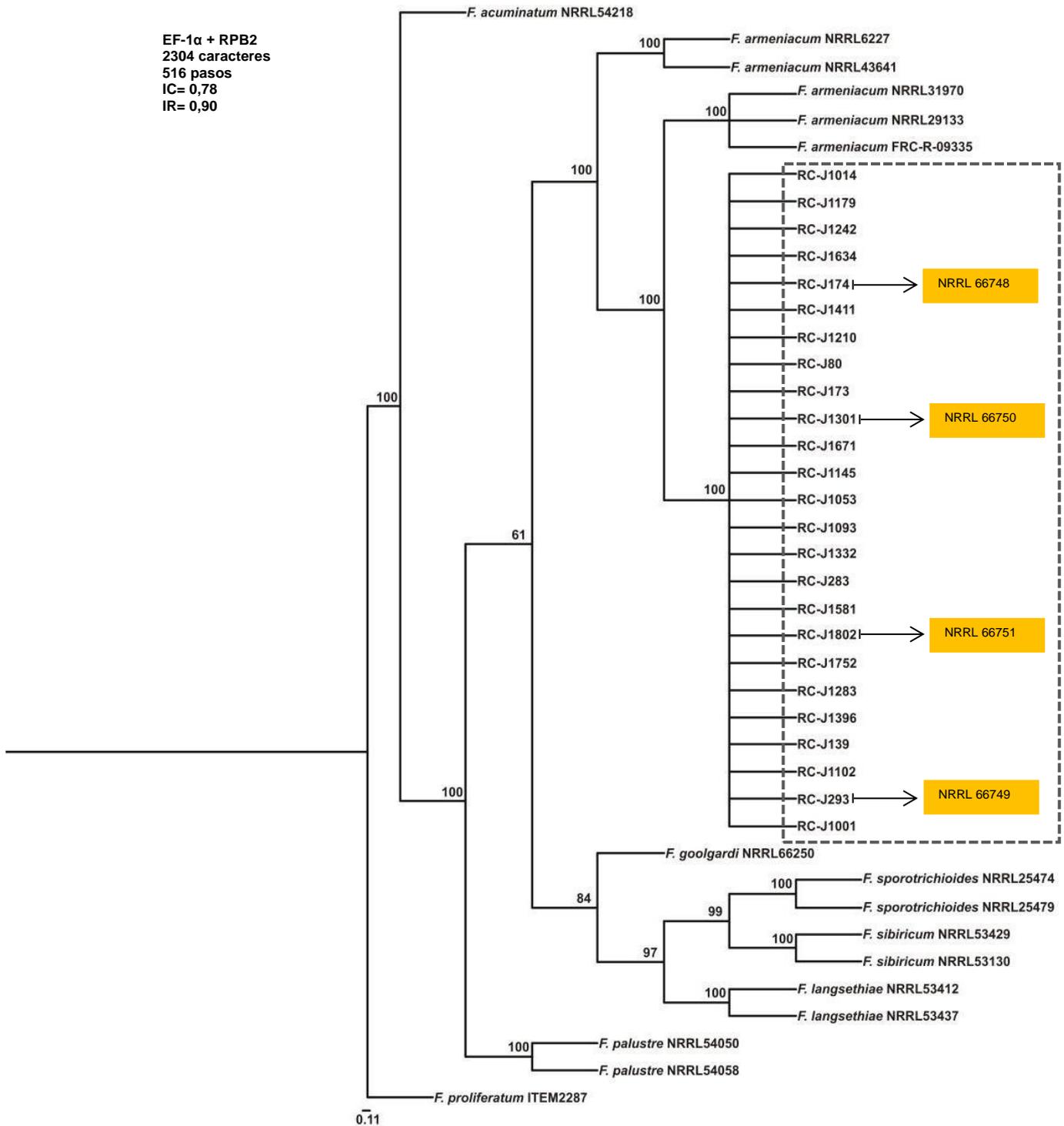
Inicialmente se generó un árbol filogenético a partir de las secuencias de EF-1 $\alpha$  (n=70), y se observó que la filogenia no reflejaba lo obtenido mediante el BLAST, ya que todas las secuencias, que mostraron una similitud > al 96% con las secuencias de *F. armeniacum* de referencia no se agruparon con ningún representante de esta especie y además formaron un grupo que no incluía ninguna de las otras especies de *Fusarium* conocidas, que también fueron incluidas en el análisis (dato no mostrado). Esta falta general de coherencia entre los resultados de BLAST y los análisis filogenéticos, destacan las limitaciones asociadas con el uso de similitud de secuencias solo para el diagnóstico de nuevas especies. Ante los resultados obtenidos y pensando que podíamos estar ante una especie de *Fusarium* no descrita hasta el momento, decidimos secuenciar una porción del gen de la ARN polimerasa II (RPB2). Se realizó el mismo análisis usando ambas secuencias por separado. El alineamiento de las 25 secuencias del gen EF-1 $\alpha$  pertenecientes a las cepas seleccionadas junto con las 16 secuencias disponibles en el GenBank (Tabla 3) contenía 562 caracteres, de los cuales 114 fueron informativos de parsimonia. El análisis de máxima parsimonia (MP) usando los caracteres informativos construyó 1 árbol de 181 pasos de longitud (IC = 0,77; IR = 0,90) en el cual 11 nodos presentaron valores de *bootstrap* >90% (Figura 1). El análisis filogenético de las 25 secuencias del gen de la RPB2 pertenecientes a las cepas seleccionadas en presencia de las 16 secuencias disponibles en el GenBank (Tabla 3) contenía 1742 caracteres, de los cuales 224 fueron informativos de parsimonia. El análisis de MP usando los caracteres informativos construyó 2 árboles igualmente parsimoniosos de 332 pasos de longitud

(IC = 0,80, IR = 0,91) en el cual 13 nodos presentaron valores de *bootstrap* >90% (Figura 2). El análisis de MP de los datos combinados de los alineamientos de ambos genes incluyendo las 16 secuencias disponibles en el GenBank (2304 caracteres) construyó un sólo árbol parsimonioso de 516 pasos de longitud (IC = 0,78; IR = 0,90) basados en 329 caracteres informativos de parsimonia. Además, se realizó el análisis de *bootstrap* con 1000 pseudoréplicas para determinar el grado de soporte que brindan los datos a cada uno de los clados que surgen del análisis de MP (Figura 3). El análisis filogenético por separado y combinado de las secuencias de EF-1 $\alpha$  y RPB2 de nuestras cepas (antes denominadas *F. armeniacum*) formaron un único clado monofilético muy bien soportado por valores de bootstrap de 100% completamente separado de las cepas de *F. armeniacum* de referencia (Figuras 1,2 y 3). Todos estos estudios nos permitieron inferir que estamos ante una especie de *Fusarium* no descrita hasta el momento, la cual fue denominada *Fusarium chaquense*.





**Figura 2.** Uno de 2 árboles más parsimonioso generados a partir de las secuencias del gen RPB2. La cepa *Fusarium proliferatum* ITEM 2287 se usó como grupo externo. Los valores de *bootstrap* mayores al 50% se muestran en la parte superior de las ramas.



**Figura 3.** Árbol más parsimonioso generado a partir de los datos combinados de las secuencias del gen EF-1 $\alpha$  y del gen RPB2. La cepa *Fusarium proliferatum* ITEM 2287 se usó como grupo externo. Los valores de *bootstrap* mayores al 50% se muestran en la parte superior de las ramas.

#### **IV.2. Perfil toxicogénico de las cepas de *Fusarium chaquense***

Se detectó la producción de un total de 10 metabolitos mediante el análisis por LC-MS/MS (Tabla 4). Sólo cuatro cepas fueron capaces de producir las 10 micotoxinas: T-2, T-2 Triol (T-2TR), T-2 Tetraol (T-2TE), HT-2, DAS, MAS, NEO, AUF, BEA y ZEA. El perfil más frecuente de producción de toxinas encontrado fue la coproducción de T-2, T-2TR, T-2TE, HT-2, DAS, MAS, AUF y BEA encontrado en 44 cepas. El grupo de micotoxinas producido con mayor frecuencia, fueron los tricotecenos tipo A, también se detectaron algunas micotoxinas menores producidas por *Fusarium* como son BEA y AUF. Además, algunas cepas fueron capaces de producir ZEA (Figura 4). Entre los tricotecenos tipo A, T-2, NEO y HT-2 fueron sintetizados en mayores niveles y frecuencia, seguido por DAS y MAS. Se detectó la producción de T-2, NEO, HT-2, y DAS en 70 (100%), 70 (100%), 69 (99%) y 66 (94%) de las cepas respectivamente. Los niveles de T-2 oscilaron entre 0,58 a 1696,80 mg/kg (media = 507 mg/kg), los niveles de NEO variaron entre 1,20 a 1620 mg/kg (media = 638 mg/kg). Los niveles de producción de HT-2 variaron entre 0,12 y 491 mg/kg (media = 91 mg/kg) mientras que los niveles de DAS variaron entre 0,04 y 10,80 mg/kg (media = 2,57 mg/kg). Otro tricotecenos tipo A producido en menor frecuencia fue MAS (54 cepas). Los derivados de T-2, también fueron detectados, T-2TR fue producido por 64 cepas (91%) en niveles que van desde 0,91 hasta 126 mg/kg mientras que T-2TE fue producido por 63 cepas (90%) en niveles que varían desde 0,90 a 1304 mg/kg. Beauvericina fue producida por 69 cepas (99%) con niveles que varían desde 0,03 a 25,7 mg/kg con una concentración media de 1,90 mg/kg. Todas las cepas fueron capaces de producir AUF en niveles que varían desde 3,09 a 1776,8 mg/kg con una concentración media de 714 mg/kg. Mientras que ZEA fue producida en menor frecuencia (16%) en niveles que varían desde 14 a 1174 µg/kg.

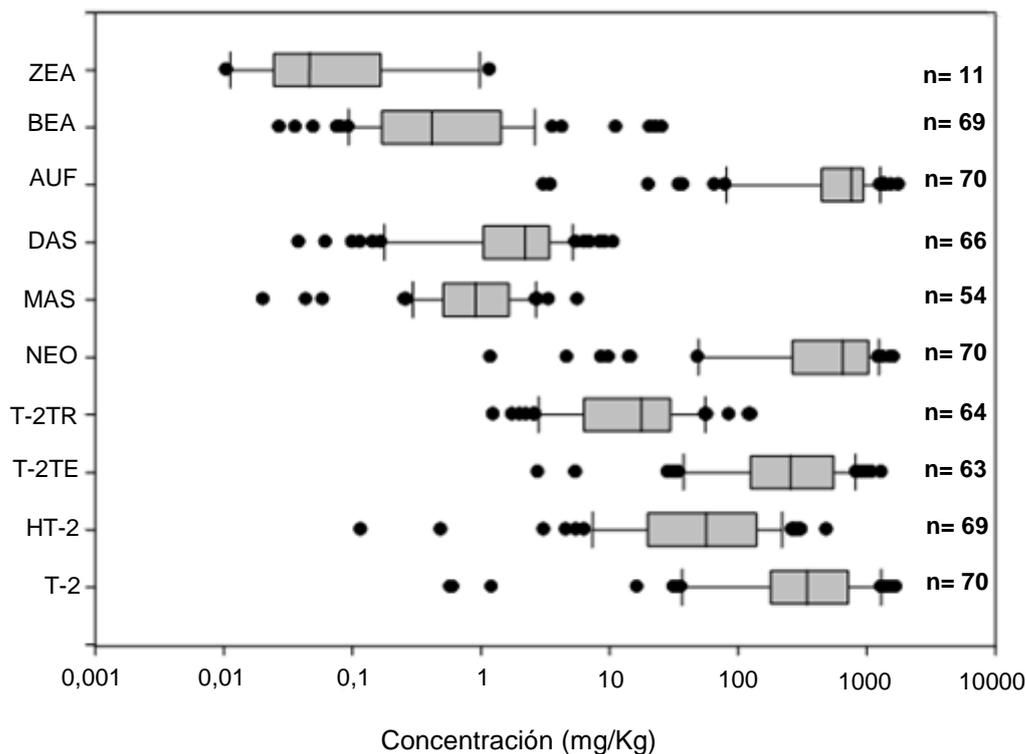
**Tabla 4.** Perfil de producción de micotoxinas de cepas de *Fusarium chaquense*

CEPA	Año	T2 mg/kg	T2-TE mg/kg	T2-TR mg/kg	HT-2 mg/kg	DAS mg/kg	MAS mg/kg	NEO mg/kg	AUF mg/kg	BEA mg/kg	ZEA µg/kg
RC-J18	2011	31,82	ND	1,26	4,63	0,24	0,08	49,78	106,08	0,19	ND
RC-J80	2011	16,51	34,8	3,18	7,38	0,04	0,08	4,68	118,56	0,85	ND
RC-J134	2011	39,18	177,92	6,22	10,91	0,06	0,08	14,36	442,08	0,19	ND
RC-J139	2011	115,2	81,28	10,52	16,88	0,15	ND	48,83	143,92	0,08	ND
RC-J173	2011	1,22	5,48	ND	0,16	ND	ND	9,88	3,49	0,91	ND
RC-J174	2011	329,12	98,08	5,30	31,4	1,90	0,32	112,80	65,94	1,64	ND
RC-J182	2011	547,44	ND	15,18	56,13	3,45	0,74	574,8	1276	0,24	46,3
RC-J223	2011	0,61	ND	ND	ND	ND	ND	1,2	3,09	ND	78,74
RC-J261	2011	89,6	123,6	7,83	42,79	0,67	0,74	94,32	34,86	0,99	80,48
RC-J283	2011	119,28	ND	54,62	146,8	0,1	ND	184,88	220	25,76	24,21
RC-J288	2011	250,8	ND	5,24	16,1	2,36	0,34	344,08	520	0,69	13,95
RC-J292	2011	346,96	ND	9,66	21,81	2,42	0,27	374,64	1035,2	0,64	210,64
RC-J293	2011	0,58	2,79	ND	0,49	ND	ND	14,74	20,19	20,82	1173,6
RC-J295	2011	67,34	ND	2,66	3,1	1,17	ND	231,04	862,4	0,58	167,92
RC-J1001	2014	191,56	253,52	6,78	30,28	1,74	1,07	792,4	670	0,09	ND
RC-J1014	2014	640,4	436,4	13,91	57,24	1,35	0,59	885,6	715,6	0,33	ND
RC-J1053	2014	289,32	590,4	17,9	37,78	1	0,57	507,2	935,6	2,51	ND
RC-J1071	2014	36,25	28,6	ND	5,55	0,3	ND	165,92	131,48	23,04	ND
RC-J1077	2014	58,12	41,76	ND	6,41	0,79	ND	179,76	37,5	1,3	ND
RC-J1087	2014	385,84	126,6	6,43	30,71	2,43	0,61	606,4	883,2	0,35	ND
RC-J1093	2014	1696,8	829,2	126,28	301,48	10,8	5,69	1619,6	1217,6	2,37	ND
RC-J1099	2014	196,44	253,6	6,26	58,52	3,23	1,66	1272	1385,2	0,15	41,72
RC-J1102	2014	233,56	650,4	20,16	86,6	0,17	ND	685,2	228,16	1,7	ND
RC-J1114	2014	612	108,04	15,1	92,88	5,09	2	679,2	754,8	0,13	ND
RC-J1125	2014	1406	318,8	31,18	182	2,38	1,42	708,8	742,4	0,11	ND
RC-J1145	2014	345,32	539,6	18,39	56,16	4,15	1,33	722,4	940,8	0,16	ND
RC-J1147	2014	307,24	405,2	6,74	19,49	0,89	ND	662,8	507,2	0,18	ND
RC-J1154	2014	926	1102,8	41,44	148,48	6,4	2,78	1215,2	930	4,31	ND
RC-J1179	2014	996,8	209,44	28,2	202,72	5,02	2,69	1145,6	745,2	0,18	ND
RC-J1181	2014	296,4	317,88	9,36	28,59	2,2	0,61	634	716,8	0,65	ND
RC-J1210	2014	33,66	624,4	54,32	199,56	ND	0,49	8,71	1042,4	0,94	ND
RC-J1214	2014	1346,8	356,12	30,55	135,08	9,28	3,39	1302,8	988,4	0,79	ND
RC-J1242	2014	1416,8	634	57,56	177,6	4,08	1,96	1315,6	1776,8	1,16	ND
RC-J1244	2014	1171,2	545,2	56,32	265	2,86	2,12	1124	752	0,21	ND
RC-J1255	2014	287,6	90,04	9,44	34,74	1,5	0,38	413,6	98,92	0,16	ND

(Continuación tabla 4)

RC-J1283	2014	814,8	242,76	40,76	283,24	2,99	2,07	898,8	817,2	0,03	ND
RC-J1301	2014	680,8	854,4	29,01	93,8	2,62	1,29	899,2	1060	0,57	28,28
RC-J1308	2014	142	789,6	14,86	30,89	0,38	ND	279,32	96,48	1,62	ND
RC-J1332	2014	628	258,36	33,14	119,84	0,38	ND	395,68	920,8	11,32	ND
RC-J1349	2014	200,68	85,04	ND	8,22	2,06	0,47	308,76	760,8	0,53	ND
RC-J1367	2014	90,32	62,88	2,26	8,56	1,04	ND	299,36	488	0,64	ND
RC-J1396	2014	53,12	32,96	2,96	15,74	0,32	ND	105,04	435,6	0,09	ND
RC-J1404	2014	700,4	255,68	26,72	108,64	3,03	1,45	1098	844	1,14	ND
RC-J1411	2014	681,2	996,8	20,72	103,88	3,9	1,25	1529,6	940	0,41	ND
RC-J1507	2014	537,2	767,2	122,04	490,8	1,07	1,71	875,6	1042	2,09	ND
RC-J1521	2014	227,16	221,56	3,62	31,65	1,63	0,62	588,8	770	0,11	ND
RC-J1525	2014	499,2	280,16	10,59	40,88	1,84	0,66	758,8	825,2	0,24	ND
RC-J1532	2014	998	364,56	25,98	103,96	2,76	0,91	1053,6	742	0,2	ND
RC-J1551	2014	1096,4	197,76	34,36	272,96	7,07	2,64	1202,8	1556,4	0,18	ND
RC-J1569	2014	200,64	184,12	1,77	14,18	3,69	0,51	416,8	632,4	0,15	ND
RC-J1581	2014	339,6	87,76	20,9	86,64	0,18	ND	149,32	351,2	0,04	ND
RC-J1599	2014	847,2	915,6	22,5	83,44	1,66	0,65	996,8	844,8	0,29	ND
RC-J1603	2014	56	31,05	5,83	19,6	0,12	ND	56,36	502,8	0,05	ND
RC-J1621	2014	478,8	323,8	28,1	110,16	3,26	1,21	1226,4	1343,2	1,86	ND
RC-J1630	2014	244,08	139,64	2,59	12,26	1,87	0,37	351,56	728,4	0,15	ND
RC-J1634	2014	526	535,6	28,22	79	3,95	1,06	714,8	736	2,63	ND
RC-J1647	2014	601,6	138,68	27,06	154,44	2,29	0,9	696	850,8	0,08	ND
RC-J1657	2014	1111,2	239,84	17,5	149,12	8,5	2,06	1209,2	1016,4	1,99	ND
RC-J1671	2014	641,2	771,6	23,12	99,72	4,33	1,33	1240,4	79,6	0,29	ND
RC-J1678	2014	913,2	726,8	42,68	112,24	2,98	0,72	1234	770,8	3,63	10,54
RC-J1694	2014	1421,2	242,6	18,36	218,96	5,49	2,77	1200,4	1408	1,8	ND
RC-J1700	2014	1098	244,68	55,92	203,28	2,2	1,13	852	526	0,19	ND
RC-J1710	2014	1301,2	672,4	29,01	153,48	2,27	1,16	1044,8	830	0,23	ND
RC-J1715	2014	1564,8	1304,4	85,52	311,72	3,98	2,24	1328,4	1080	0,21	ND
RC-J1739	2014	497,2	558,4	39,07	115,12	1,9	1,13	774,8	806,4	0,1	ND
RC-J1752	2014	188,92	196,88	7,55	23,43	3,48	0,64	332,16	768	0,33	ND
RC-J1761	2014	317,48	63,88	2,02	18,75	2,99	0,42	270,24	1384,8	0,12	ND
RC-J1773	2014	330,88	134,48	5,64	24,33	1,87	0,42	444,4	1121,6	2	ND
RC-J1777	2014	414	257,04	5,18	39,64	1,17	0,26	701,2	671,6	0,6	ND
RC-J1802	2014	213,52	235,28	4,87	24,65	2,1	0,83	432,8	1189,2	0,9	ND

ND: no detectado, menor al LD.



**Figura 4.** Box-plot del perfil de micotoxinas producidas por *Fusarium chaquense* (n=número de cepas).

### IV.3. Taxonomía

*Fusarium chaquense* M. J. Nichea, E. Cendoya, S.A. Palacios & M.L. Ramirez sp. nov.  
Mycobank: 821675

**Etimología:** el epíteto se refiere a la provincia de Chaco (Argentina), lugar donde esta especie fue aislada.

**Descripción:** Colonias en agar papa glucosado (APG), bajo ciclos alternativos de luz blanca/luz negra (12/12 h), de aspecto pulverulento y flocoso con abundante micelio de color blanco a rosa pálido (Figura 5 E-F). Reverso del cultivo con pigmento rojo carmín. Colonias en agar papa glucosado (APG), bajo oscuridad continua, velocidad de crecimiento óptima a 30 °C, seguido de 25 °C (Figura 6).

**Esporodocios:** Abundantes, después de 10 días de cultivo en agar hojas de clavel (AHC). Se forman sobre las hojas de clavel y en la superficie del agar, de color anaranjado brillante (Figura 5 A).

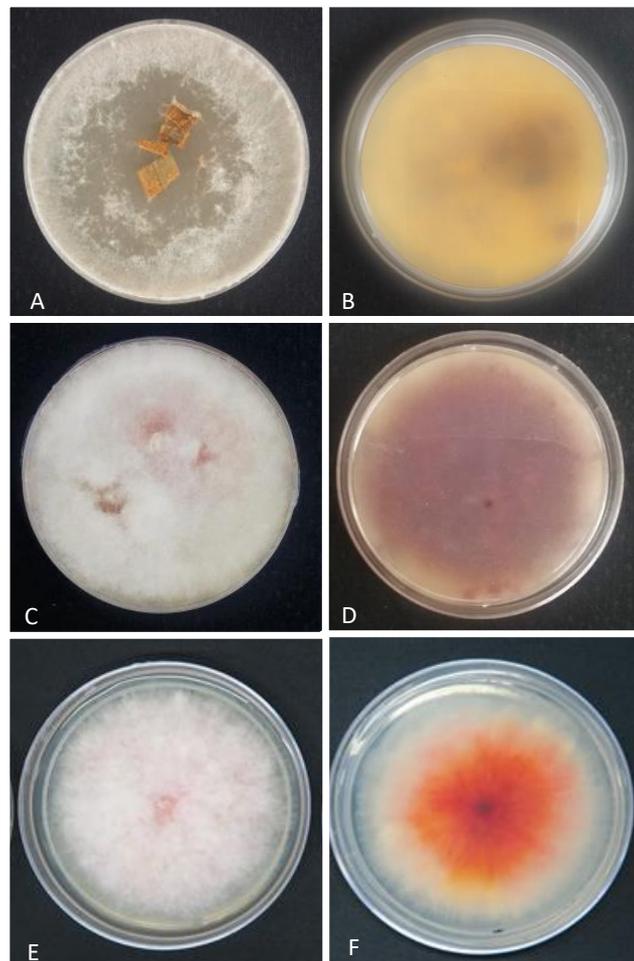
**Macroconidios:** abundantes, largos, delgados, con una prominente curvatura dorsiventral. Poseen una célula apical cónica y una célula basal elongada con forma

de pie y usualmente presentan 5 septos. Tamaño: 72 - 84  $\mu\text{m}$  ( $\bar{x}$  = 76.8  $\mu\text{m}$ ) largo x 3.8 - 4.8  $\mu\text{m}$  ( $\bar{x}$  = 4) ancho (Figura 7 C).

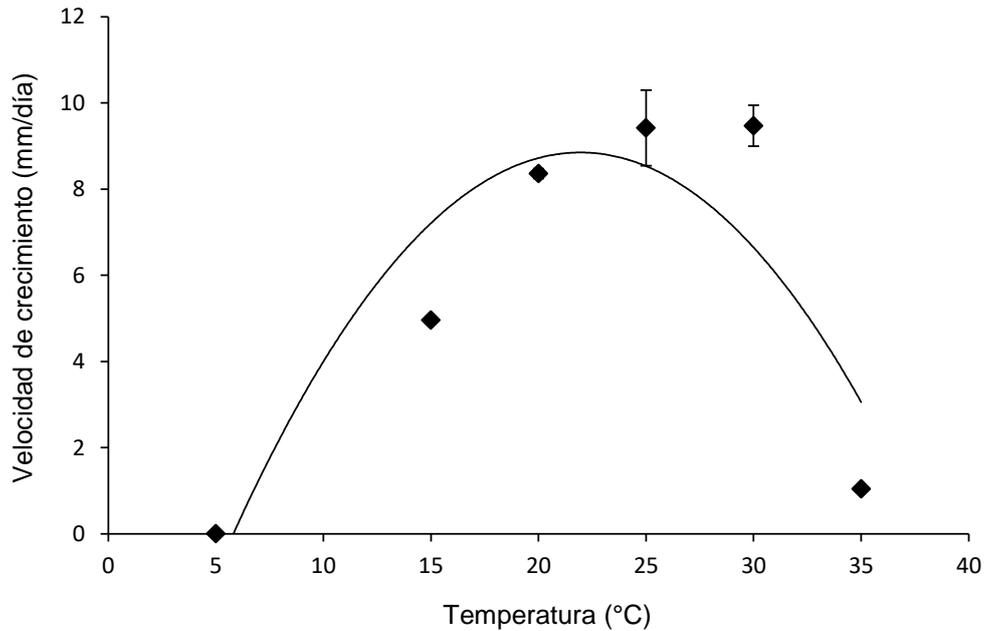
*Microconidios*: Se forman solitarios o en falsas cabezas a partir de monofialides cortas. La mayoría son ovales de 0-1 septo. Tamaño: 7,7-16,8  $\mu\text{m}$  ( $\bar{x}$  = 12,5  $\mu\text{m}$ ) largo x 2-4  $\mu\text{m}$  ( $\bar{x}$  = 2,5) ancho (Figura 7 E-F).

*Clamidosporas*: Abundantes en el micelio aéreo después de 15 días de incubación. Poseen forma globosa, intercalares, la mayoría se presenta de a pares o en cadenas cortas (Figura 7 B).

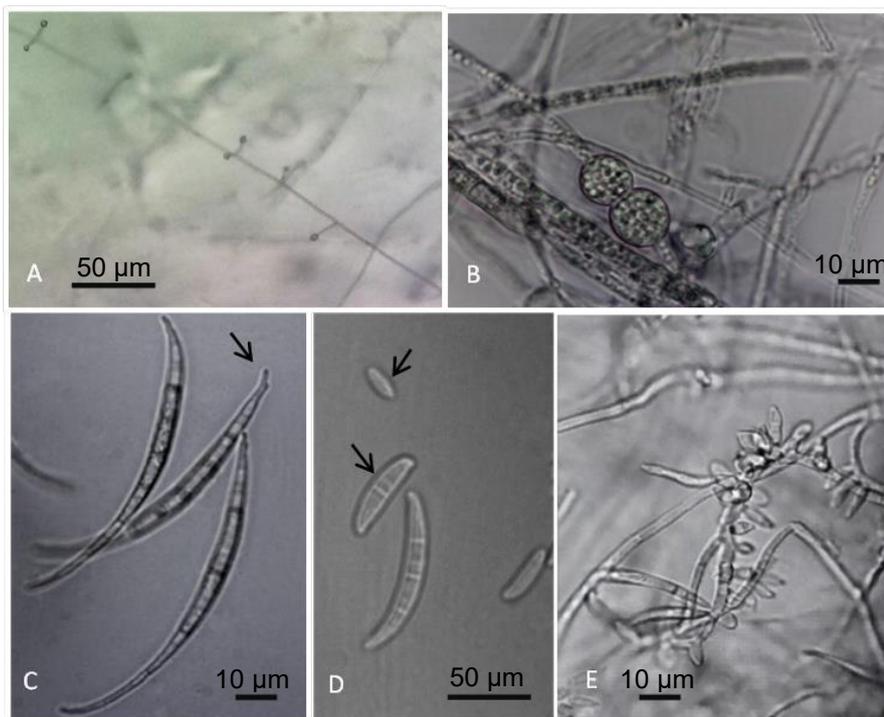
Especímenes examinados: Especie tipo (herbario y cultivo de colección) RC-J293 aislada de *Sorgastrum setosum*, Chaco Argentina (S 27° 30' W 059° 05') recolectada por M.J. Nichea en Julio 2011.



**Figura 5.** Características macroscópicas de *Fusarium chaquense* RC-J293 **A, B.** Colonia sobre agar hojas de clavel. **A.** Superficie de la colonia. Esporodocios producidos en hoja de clavel. **B.** Reverso de la colonia. **C, D.** Colonia sobre SNA. **C.** Superficie de la colonia. **D.** Reverso de la colonia. **E, F.** Color de la colonia en PDA. **E.** Superficie de la colonia. **F.** Reverso de la colonia.



**Figura 6.** Velocidad de crecimiento (mm/día) de *Fusarium chaquense* RC-J293 cultivado en PDA en oscuridad a diferentes temperaturas (5°C – 35°C). Los puntos y barras de error representan las medias y desviaciones estándar de los valores. La línea gris es una tendencia ajustada a los datos.



**Figura 7.** Características morfológicas de *Fusarium chaquense* RC-J293. **A.** Falsas cabezas de microconidios en monofialides. **B.** Clamidosporas. **C.** Macroconidios multiseptados de esporodocio (la flecha indica la forma de pie). **D.** Microconidios con 0 y 1 septo. **E.** Monofialides cortas.

#### IV. DISCUSIÓN

*Fusarium chaquense* constituye la primera especie de *Fusarium* aislada y formalmente descrita en Argentina a partir de plantas pertenecientes a la familia Poaceae (no cultivadas) presentes en un ecosistema natural como son los humedales de Chaco.

Morfológicamente, *F. chaquense* es similar a *F. armeniacum* pero con cierta inconsistencia. Tanto *F. chaquense* como *F. armeniacum* son capaces de producir esporodoquios de color anaranjado brillante sobre las hojas de clavel, ambos tienen un crecimiento rápido, además la forma de los macroconidios producidos en esporodoquios por parte de ambas especies son indistintas. La mayoría de las características coinciden con *F. armenicum*, aunque la principal diferencia entre ellas es que todas las cepas de *F. chaquense* producen microconidios, y según la descripción realizada por Burgess y Summerell (2000) *F. armeniacum* no es productor de este tipo de conidios.

*Fusarium chaquense* se describe como una nueva especie en base a caracteres morfológicos distintivos y al análisis de las secuencias de ADN. El análisis de las dos regiones génicas (EF-1 $\alpha$  y RPB2) nos permiten inferir que *F. chaquense* es diferente a las demás especies de este género incluidas en el presente estudio, demostrando que las cepas de *F. chaquense* representan un único clado. En este estudio, las secuencias EF-1 $\alpha$  y RPB2 se evaluaron por separado y en combinación por su capacidad para resolver las relaciones filogenéticas de *F. chaquense*, *F. armeniacum* y *F. acuminatum*. En conclusión, los resultados indican que *F. chaquense* es filogenéticamente distinta pero estrechamente relacionada con *F. armeniacum*.

El presente estudio demostró, además, que esta especie es un potente productor no sólo de T-2 y HT-2 sino también de otros tricotecenos tipo A de interés, como son NEO, DAS y MAS. Ninguna de las cepas estudiadas fue capaz de producir tricotecenos tipo B. De todas las micotoxinas de *Fusarium* descritas hasta la fecha, los tricotecenos son las que más se han asociado con toxicosis crónicas y fatales en animales y seres humanos (McCormick et al., 2011). Siendo los tricotecenos tipo A altamente tóxicos para los animales capaces de ocasionar trastornos inmunitarios, retraso del crecimiento, pérdida de peso, cambios patológicos en las células hepáticas y muerte. Es importante destacar, además, que la mayoría de las cepas utilizadas en el presente estudio, fueron capaces de producir BEA, considerada como una micotoxina menor de *Fusarium*, mientras que la producción de ZEA fue bastante poco común. La AUF es otro metabolito producido en alta frecuencia, aunque aún no se conoce con exactitud su potencial toxicológico.

De acuerdo a los resultados obtenidos, *F. chaquense* pertenece al complejo de especies *Fusarium sambucinum* (FSAMSC), un linaje de *Fusarium* que tienen la

habilidad de producir tricotecenos. Este complejo incluye especies tales como: *F. armeniacum*, *F. langsethiae*, *F. sibiricum*, *F. sporotrichioides*, *F. palustre* y *F. goolgardii*, las cuales se encuentran entre las pocas especies que producen un tipo particular de tricotecenos: los tricotecenos tipo A (Laurence et al., 2015; Rocha et al., 2015). Es importante señalar que tanto *F. goolgardii*, como *F. chaquense*, se han recuperado de plantas asintomáticas, a partir de un ecosistema con mínima perturbación antropogénica (Laurence et al., 2015), indicando que serían especies saprófitas.

En la mayoría de los casos las investigaciones sobre *Fusarium*, tanto a nivel mundial como nacional, se han focalizado en especies patógenas y productoras de micotoxinas presentes en plantas de interés económico: principalmente cereales y oleaginosas, en detrimento del estudio de aquellas especies presentes en ecosistemas naturales. En los últimos 20 años, dichos ecosistemas (la gran mayoría en Australia y EEUU) han sido una fuente importante de nuevas especies de *Fusarium* tales como *F. armeniacum* (Burgess y Summerell, 2000; Burgess et al., 1993), *F. aywerte* (Benyon et al., 2000), *F. babinda* (Summerell et al., 1995), *F. burgessii* (Laurence et al., 2011), *F. coicis* (Laurence et al., 2015), *F. convolutans* (Sandoval-Denis et al., 2018), *F. dactylidis* (Aoki et al., 2015), *F. fredkrugeri* (Sandoval-Denis et al., 2018), *F. gaditjirrii* (Phan et al., 2004), *F. goolgardii* (Laurence et al., 2015), *F. konzum* (Zeller et al., 2003), *F. lyarnte* (Walsh et al., 2010), *F. mundagurra* (Laurence et al., 2015), *F. newnesense* (Laurence et al., 2015), *F. nurragi* (Benyon et al., 2000), *F. tjaetaba* (Laurence et al., 2015), *F. tranvaalense* (Sandoval-Denis et al., 2018) y *F. werrikimbee* (Walsh et al., 2010). Diversas investigaciones realizadas en Australia, EEUU y Polonia, sugieren que las especies de *Fusarium* comúnmente se encuentran en pastizales naturales (no cultivados) de la Flia. Poaceae y que en general estas especies presentan baja frecuencia de aislamiento o, ninguna o escasa importancia agrícola o económica (Leslie et al., 2004; Phan, 2004; Sánchez Márquez et al., 2008; Walsh et al., 2010; Szecsi et al., 2013). La presencia de especies de *Fusarium* en ecosistemas naturales se informa con frecuencia, pero su papel en la ecología microbiana de estos ecosistemas está mucho menos documentado (Walsh et al., 2010, Laurence et al., 2015, Moussa et al., 2017). Estudios futuros son necesarios para aclarar la relación de *F. chaquense* con las gramíneas, de manera tal de poder demostrar si las coloniza como un endófito o un patógeno vegetal latente. En el presente estudio *F. chaquense* se aisló comúnmente de la parte aérea de las gramíneas pertenecientes a la Flia Poaceae del sudeste de la prov. de Chaco, representando el 70% del total de aislados de *Fusarium* recuperados en este estudio.

Basados en estudios de biodiversidad se estima que existen aproximadamente unas 100.000 especies fúngicas aceptadas y descritas, y que esto solo comprende de una décima (Hawksworth, 2001) o una quincuagésima parte (Blackwell, 2011) de las especies presentes en la naturaleza. Todo esto junto con el hecho de que la mayoría de especies de *Fusarium* estudiadas hasta la fecha se han aislado de plantas de importancia agronómica cultivadas en una fracción de la superficie de nuestro planeta (es decir, < 1% de todas las plantas vasculares existentes), hace razonable sugerir que el número de especies nuevas de *Fusarium* en la naturaleza podría superar en un orden de magnitud la estimación actual de 300. El número de especies de *Fusarium* descritas de ecosistemas naturales hasta la fecha son pocas en el mundo e inexistentes en nuestro país. Leslie y Summerell (2011) sugieren que los pastizales naturales serían un ecosistema particularmente productivo para la evaluación de nuevas especies. Los humedales de Chaco constituyen unos de los 3 biomas de Argentina que presentan mayor biodiversidad, esto hace suponer que muchas especies de *Fusarium* podrían ser identificadas y descritas a partir de este ecosistema natural (y también de otros) con escasa actividad antropogénica.

La descripción e investigación de esta nueva especie aporta datos importantes al conocimiento existente sobre la filogenia, taxonomía, filogeografía, ecología y evolución de las especies en el género *Fusarium*. También representan un punto de partida para el estudio de especies del género *Fusarium* en entornos naturales con mínima actividad antropogénica en Argentina, dado que existe una falta de información en un país caracterizado por una amplia combinación de regiones ecológicas y una alta diversidad biológica.

Este estudio demuestra cómo nuevas especies de *Fusarium* se puede encontrar cuando los estudios micológicos están dirigidos a ecosistemas naturales con mínima alteración antropogénica (Phan et al., 2004; Leslie y Summerell, 2011; Summerell et al., 2011; Burgess, 2014, Laurence et al., 2015). Aunque es irrelevante para algunos investigadores, encontrar y describir adecuadamente nuevas especies, independientemente de que tengan poco o ningún potencial patógeno o micotoxicogénico, es de suma importancia para mejorar nuestra comprensión sobre la diversidad y los patrones biogeográficos y filogeográficos de un género tan complejo y heterogéneo como es el género *Fusarium*. Además, este estudio destaca la importancia y la necesidad de estimular aún más la exploración de entornos naturales conservados, no manipulados y su impacto en la biodiversidad de este género fúngico.

## **CAPÍTULO V**

## CAPÍTULO V. ECOFISIOLOGÍA DE *Fusarium chaquense* EN UN MEDIO DE CULTIVO A BASE DE PASTO

### V. INTRODUCCIÓN

*Fusarium chaquense* es una nueva especie de *Fusarium* recientemente descrita, aislada de pastos naturales (familia Poaceae) que crecen en los humedales de Chaco y que se destinan a la alimentación bovina. A través de estudios filogenéticos hemos demostrado que pertenece al complejo de especies de *F. sambucinum*, y está estrechamente relacionado al selecto grupo de especies, dentro de este complejo, que son capaces de producir tricotecenos tipo A como son: *F. armeniacum*, *F. langsethiae*, *F. sibiricum*, *F. sporotrichioides*, *F. palustre* y *F. goolgardi* (Laurence et al., 2015; Rocha et al., 2015). Además de tricotecenos tipo A (especialmente T-2 y HT-2), *F. chaquense* posee la capacidad de producir BEA y ZEA. *Fusarium chaquense*, al igual que *F. goldardi*, ha sido aislado de plantas asintomáticas a partir de un ecosistema con mínima perturbación antropogénica, lo cual indicaría que es un saprofito.

En el presente estudio *F. chaquense* se aisló con alta frecuencia de la región superior de las gramíneas pertenecientes a la Flia Poaceae del sudeste de la prov. de Chaco (173 plantas muestreadas durante 2011 y 2014), representando el 61% del total de aislados de *Fusarium* recuperados. Además, durante la presente tesis también detectamos la incidencia natural, en las mismas plantas, de tricotecenos tipo A (especialmente T-2 y HT-2), ZEA y sus derivados, BEA, AUF entre otras. De acuerdo a estos resultados *F. chaquense* parecería ser la especie responsable de la presencia de tricotecenos tipo A, BEA y ZEA en los pastos estudiados.

Se sabe que el crecimiento y la producción de micotoxinas por distintas especies de *Fusarium* son el resultado de la compleja interacción de factores bióticos y abióticos, entre estos últimos la actividad de agua y la temperatura son de particular importancia. Descifrar este complejo proceso es esencial para poder predecir y prevenir la presencia de *Fusarium* en las plantas y la posible contaminación con sus micotoxinas (Sanchis y Magan, 2004).

Las especies toxicogénicas pueden crecer y producir toxinas sobre una amplia gama de sustratos. Sin embargo, algunos de los sustratos son más adecuados para la síntesis de las micotoxinas que otros, el tipo de sustrato puede determinar la producción o no de las toxinas. Se ha demostrado que algunas cepas de hongos productores de toxinas en medios de cultivo sintéticos, no lo fueron cuando desarrollaron sobre un sustrato natural, o que sólo se producía un determinado grupo químico de toxinas (Betina, 1989). Aún si los requerimientos nutricionales para la síntesis de las micotoxinas son cubiertos, otros parámetros físicos importantes, tales como la temperatura y la disponibilidad de agua, pueden afectar la producción de las mismas. Numerosos trabajos han estudiado el efecto

combinando de la temperatura y  $a_w$  sobre el crecimiento la producción de micotoxinas producidas por *Fusarium* tanto en medios de cultivo como en sustratos naturales (Marín et al., 2004; Mateo et al., 2002; Lattanzio et al., 2009; Kokkonen et al., 2010, 2012).

Como parte de la caracterización de *F. chaquense*, consideramos importante estudiar como 2 factores abióticos ( $a_w$  y temperatura) influyen tanto el crecimiento como la producción de micotoxinas.

## V. HIPÓTESIS

*Fusarium chaquense* puede crecer y sintetizar micotoxinas en un amplio rango de  $a_w$  y temperaturas.

## V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la  $a_w$  y la temperatura sobre el crecimiento y la producción de micotoxinas por dos cepas de *F. chaquense*

## V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar el efecto de la  $a_w$  y la temperatura sobre el crecimiento de *F. chaquense* en un medio de cultivo a base de pasto.
2. Estudiar el efecto de la  $a_w$  y la temperatura sobre la producción de micotoxinas por *F. chaquense* en un medio de cultivo a base de pasto.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### V.1. Influencia de factores abióticos (actividad acuosa y temperatura) sobre el crecimiento de dos cepas de *Fusarium chaquense*, en un medio de cultivo a base de pasto

#### V.1.1. Cepas

Se utilizaron dos cepas de *F. chaquense*, RC-J174 (NRRL 66748) y RC-J283, ambas seleccionadas por ser productoras de niveles elevados de T-2, HT-2 y BEA y, mientras que la última cepa además era productora de ZEA (Capítulo IV, tabla 4). Todas las cepas se conservaron como suspensiones de esporas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en glicerol al 15 %, en la colección de cultivos del laboratorio de Micología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la UNRC.

#### V.1.2. Medio de cultivo

- Agar pasto molido al 2%: pasto molido (perteneciente a la Flia. Poaceae) (20 g, agar 20 g y agua destilada 1000 ml). Se ajustó la  $a_w$  del medio a 0,995; 0,98; 0,95; 0,93 y 0,91

mediante el agregado de diferentes cantidades de glicerol (Dallyn y Fox, 1980). El medio se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121 °C, los frascos con medio de cultivo estéril fueron mezclados enérgicamente antes de verter su contenido en a placas de Petri de 9 cm. La  $a_w$  final de las placas con el medio de cultivo fue verificada usando un medidor de  $a_w$  (Aqualab Series 3 decágono dispositivos, Inc, WA, EE.UU.).

### V.1.3. Inoculación e incubación

Las placas con el medio de cultivo agar pasto 2% ajustados 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 2 cepas de *F. chaquense* crecidas durante 7 días en el medio ANS a 25 /20 °C bajo ciclos alternativos de 12h/12h de luz blanca y negra, respectivamente. Una vez inoculadas, las placas con igual  $a_w$  fueron colocadas en bolsas de polietileno e incubadas a 15, 25 y 30 °C durante un periodo de 28 días.

Se aplicó un diseño factorial completo con 3 réplicas. Los factores estudiados fueron cepas (2) x niveles de  $a_w$  (5) x temperatura (3), y como respuesta se analizó, fase de latencia y velocidad de crecimiento.

### V.1.4. Evaluación del crecimiento

La evaluación del crecimiento se realizó diariamente, midiendo el diámetro de las colonias en dos direcciones durante el período de incubación o hasta que las colonias alcanzaron los bordes de la placa de Petri utilizando una lupa binocular (10X). Se representó el incremento del radio de la colonia en función del tiempo para cada una de las cepas de *F. chaquense* 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 (como la pendiente de la recta). La fase de latencia para cada tratamiento se definió como el valor del eje X para un Y determinado, siendo éste valor, el radio de la colonia igual a 4 mm (momento en el cual la cepa comenzó a crecer).

### V.1.5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos (fase de latencia y velocidad de crecimiento) fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) de tres 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 cada parámetro. En todos los casos cuando se observaron diferencias significativas se realizó un test a posteriori LSD-Fisher. El nivel de

significancia usado en todos los análisis fue de  $p < 0,01$ . Para todos los análisis se utilizó el programa InfoStat Versión 2018 (Di Rienzo et al., 2018).

## **V.2. Influencia de factores abióticos (actividad acuosa y temperatura) sobre la producción de micotoxinas por dos cepas de *Fusarium chaquense*, en un medio de cultivo a base de pasto**

### **V.2.1. Extracción de micotoxinas**

A diferentes períodos de incubación (5, 15 y 25 días) se tomaron placas correspondientes a los cultivos de cada cepa para cada  $a_w$  y temperatura ensayada por triplicado. De cada placa, se tomaron aproximadamente 10 g de medio de cultivo que se cortaron en pequeñas porciones y se colocaron 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 micotoxinas, a cada Erlenmeyer se le agregó 50 ml de una mezcla de metanol: agua (90:10 v/v) y se lo agitó durante 60 minutos en agitador rotatorio (120 rpm). Luego se filtró y se tomó 1 ml del filtrado que se colocó en un vial color ámbar. Posteriormente, los filtrados fueron evaporados hasta la sequedad utilizando un flujo de nitrógeno gaseoso a 50 °C y conservados hasta su posterior análisis por HPLC.

### **V.2.2. Detección y cuantificación de las micotoxinas**

Previo al análisis de las micotoxinas, los extractos secos se disolvieron mediante el agregado de 1 ml de acetonitrilo:agua (50:50 v/v) y se conservaron a -20 °C hasta su análisis.

- **Tricotecenos tipo A**

El método de detección de T-2 y HT-2 se basó en la metodología previamente descrita por Pascale et al. (2012). El sistema usado fue un UHPLC (Agilent UHPLC system, 1290 Series). Tanto la adquisición de datos como el control del instrumento fue llevado a cabo utilizando el LC Openlab software (Agilent). Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo utilizando una columna de fase reversa de  $C_{18}$  (50 mm x 2.1 mm i.d., 1.8  $\mu$ m, ZORBAX Eclipse Plus). La fase móvil consistió en un gradiente binario aplicado de la siguiente manera: la composición inicial fue de 70% de (A) agua/ 30% de (B) acetonitrilo la cual se mantuvo constante por 1,5 min, luego el solvente B se incrementó linealmente a 35% en 0,5 min, y se mantuvo constante por 2 min. El flujo de la fase móvil fue de 0,5 ml/min y el volumen de inyección fue de 10  $\mu$ l. La temperatura de la columna fue mantenida a 50 °C y la

detección de ambas toxinas se realizó a 202 nm, con tiempos de retención de 1,97 y 4,9 min para HT-2 y T-2, respectivamente.

A partir de soluciones madres de 1 mg/ml en acetonitrilo de cada una de las toxinas (HT-2 y T-2) se preparó una solución de trabajo combinada de ambas micotoxinas de 20 µg/ml en acetonitrilo. A partir de esta solución se tomaron alícuotas necesarias las cuales se secaron bajo flujo de N<sub>2</sub> y se resuspendieron en 1 ml acetonitrilo:agua (20:80 v/v) para obtener concentraciones de 0,05, 0,10, 0,20, 0,40, 1,00, 2,00, 4,00 µg/ml que fueron utilizadas para construir las curvas de calibraciones. La cuantificación de ambas micotoxinas se basó en las medidas de las áreas de los picos y posterior comparación con la curva de calibración. El límite de detección de la técnica fue de 0,24 µg/g basado en una relación señal-ruido de 3:1.

- **Zearalenona**

El método de detección de ZEA se basó en la metodología previamente descrita por Visconti y Pascale (1998). El sistema usado fue un HPLC (Agilent 1260 Series, Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA). Tanto la adquisición de datos como el control del instrumento fue llevado a cabo utilizando el LC Openlab software (Agilent). Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo utilizando una columna de fase reversa de C<sub>18</sub> (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 acetonitrilo:agua (50:50 v/v) y el flujo de la misma fue de 1,0 ml/min. El rango de excitación y emisión usados fueron 274 y 440 nm, respectivamente. El volumen de inyección fue de 100 µl y la ZEA tuvo un tiempo de retención de 7,3 min.

A partir de una solución madre de ZEA (1 mg/ml en metanol) se preparó una solución de trabajo de 10 µg/ml en metanol. A partir de esta solución se tomaron alícuotas necesarias las cuales se secaron bajo flujo de N<sub>2</sub> y se resuspendieron en 1 ml de acetonitrilo:agua (50:50 v/v) para obtener concentraciones de 0,01, 0,10, 0,20 y 0,30 µg/ml que fueron utilizadas para construir la curva de calibración. La cuantificación de la ZEA se basó en las medidas de las áreas de los picos y posterior comparación con la curva de calibración. El límite de detección de la técnica fue de 30 µg/kg basado en una relación señal-ruido de 3:1.

- **Beauvericina**

El método de detección de BEA se basó en la metodología previamente descrita por Prosperini et al. (2012). El sistema usado fue un HPLC (Agilent 1260 Series, Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA) equipado con una bomba binaria y un detector de arreglo de diodos (DAD). Tanto la adquisición de datos como el control del instrumento fue llevado a cabo utilizando el LC Openlab software (Agilent). Las separaciones

cromatográficas se llevaron a cabo utilizando una columna de fase reversa de C<sub>18</sub> (150 x 4,6 mm d.i., 5 µm tamaño de partícula; Gemini-Phenomenex, Torrance, CA, USA), conectada a una precolumna SecurityGuard™ (4 x 3,0 mm) con el mismo empaquetamiento de la columna.

La fase móvil consistió en un gradiente binario aplicado de la siguiente manera: la composición inicial fue de 30% de (A) agua/ 70% de (B) acetonitrilo la cual se mantuvo constante por 5 min, luego el solvente B se incrementó linealmente a 90% en 10 min, y se mantuvo constante por 1 min, luego la se volvió a la condición inicial en 4 min. El flujo de la fase móvil fue de 1,0 ml/min y el volumen de inyección fue de 100 µl. La temperatura de la columna fue mantenida a 40 °C y la detección de BEA realizó a 205 nm, con un tiempo de retención de 11,4 min.

A partir de una solución madre de BEA (1 mg/ml en metanol) se preparó una solución de trabajo de 100 µg/ml en metanol. A partir de esta solución se tomaron alícuotas necesarias las cuales se secaron bajo flujo de N<sub>2</sub> y se resuspendieron en 1 ml de metanol:agua (70:30 v/v) para obtener concentraciones desde 0,02 a 40,00 µg/ml que fueron utilizadas para construir la curva de calibración. La cuantificación de la BEA se basó en las medidas de las áreas de los picos y posterior comparación con la curva de calibración. El límite de detección de la técnica fue de 0,04 µg/g basado en una relación señal-ruido de 3:1.

En una instancia previa a comenzar el estudio *in vitro* se realizó un ensayo de recuperación de las toxinas por triplicado enriqueciendo placas con el medio de cultivo agar pasto molido al 2%. Se colocó la cantidad necesaria de cada solución de trabajo de la correspondiente toxina para obtener niveles de 500 ng/ml de HT-2 y T-2, 500 ng/ml de BEA y 50 ng/ml de ZEA, en el medio de cultivo, previamente esterilizado y enfriado hasta 50 °C aproximadamente. Se homogenizó por agitación el medio y se distribuyó 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 las metodologías ya descriptas anteriormente.

### V.2.3. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de producción de micotoxinas (T-2, HT-2, ZEA y BEA) transformados (Ln) fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) de tres 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 la producción de micotoxinas por cada cepa evaluada. Tanto para  $a_w$ , como para temperatura y días de incubación se realizó un test a

posteriori LSD-Fisher. El nivel de significancia en todos los análisis fue de  $p < 0,01$ . Para todos los análisis se utilizó el programa InfoStat Versión 2018 (Di Rienzo et al., 2018).

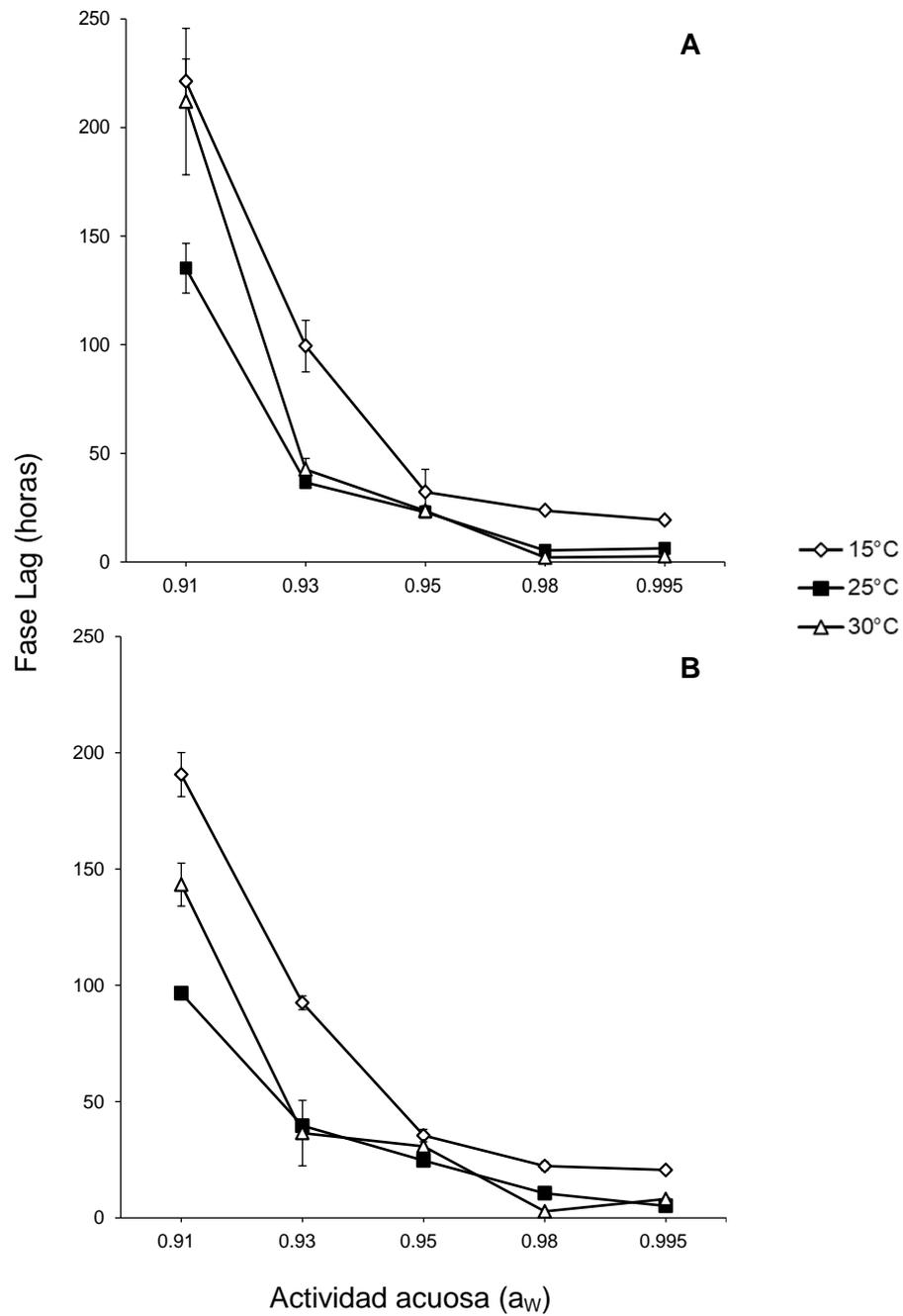
## V. RESULTADOS

### V.1. Influencia de factores abióticos (actividad acuosa y temperatura) sobre el crecimiento de dos cepas de *Fusarium chaquense*, en un medio de cultivo a base de pasto

Los resultados obtenidos de las fases de latencia de ambas cepas bajo las distintas condiciones de  $a_w$  y temperaturas se resumen en la figura 1. En general se observó que, a medida que disminuía la  $a_w$  y la temperatura, las fases de latencia fueron mayores. Fases de latencia menores a 24 hs se observaron a 0,995 y a 0,98 a todas las temperaturas ensayadas. Las mayores fases de latencia se observaron a la menor  $a_w$  y temperatura ensayadas. El análisis estadístico reveló que todos los factores individuales y sus interacciones resultaron estadísticamente significativos en el análisis de ANOVA. 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 1). El análisis a posteriori mostró que los niveles de  $a_w$  estudiados fueron significativamente diferentes entre sí (LSD-Fisher  $p < 0,01$ ), excepto las  $a_w$  0,98 y 0,95. Mientras que las distintas temperaturas analizadas, fueron significativamente diferentes entre sí (Tabla 2).

En cuanto a las velocidades de crecimiento se pudo observar que las máximas fueron obtenidas a la mayor  $a_w$  (0,995) utilizada y a 25 °C y las mismas fueron decreciendo a medida que la  $a_w$  de los medios se reducía. Teniendo en cuenta la temperatura de incubación, las mayores velocidades de crecimiento se obtuvieron a 25 °C, decreciendo en el siguiente orden 30 y 15 °C, independientemente de las  $a_w$ . Las dos cepas fueron capaces de crecer a la menor  $a_w$  ensayada (0,91) a las 3 temperaturas analizadas (Figura 2).

El análisis de la varianza del efecto de un único factor (cepa,  $a_w$  y temperatura) y las interacciones de dos y tres vías mostraron que todos los factores y sus interacciones influyeron significativamente sobre la velocidad de crecimiento. El principal efecto estuvo dado por la interacción cepa x  $a_w$  seguido del factor cepa (Tabla 1). Los test a posteriori para los factores temperatura y  $a_w$ , mostraron que todas las condiciones fueron significativamente diferentes entre sí (LSD-Fisher,  $p < 0,01$ ), excepto para las  $a_w$  0,95 y 0,93, y para las temperaturas 25 y 30 °C (Tabla 2).



**Figura 1.** Efecto de la actividad acuosa y la temperatura sobre la fase de latencia (valores medios) de *Fusarium chaquense* RC-J174 (**A**) y RC-J283 (**B**), crecidas en un medio a base de pasto. Las barras de error representan el desvío estándar para los triplicados.

**Tabla 1.** Análisis de la varianza del efecto de la actividad acuosa ( $a_w$ ), temperatura (T), cepas diferentes (C) y sus interacciones sobre la fase de latencia y velocidad de crecimiento de cepas de *Fusarium chaquense* en un medio a base de pasto

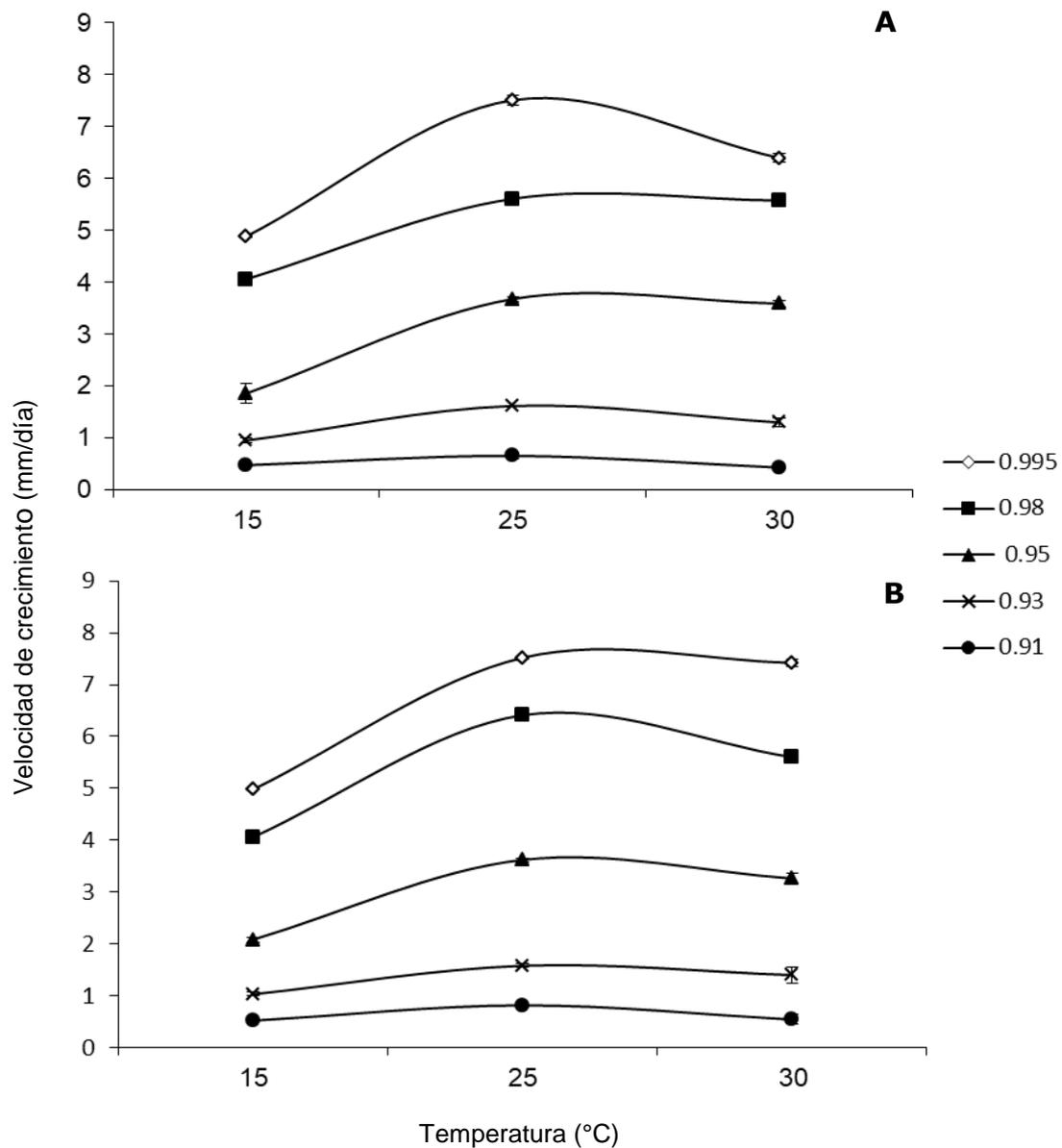
Fuente de Variación	Grados de libertad	Fase de latencia (hs)		Velocidad de crecimiento (mm/día)	
		Cuadrado medio	F-Snedecor	Cuadrado medio	F-Snedecor
<b>C</b>	1	0,01	31,85*	30,66	831,09*
<b>T</b>	2	0,11	241,97*	0,09	23,63*
<b><math>a_w</math></b>	4	0,14	307,61*	0,63	168,57*
<b>C x T</b>	2	0,01	19,79*	1,08	288,61*
<b>C x <math>a_w</math></b>	4	0,01	15,19*	13,41	3585,19*
<b>T x <math>a_w</math></b>	8	0,04	98,41*	0,03	7,42*
<b>C x T x <math>a_w</math></b>	8	0,01	17,38*	0,10	25,91*

\*Significancia  $p < 0,01$ .

**Tabla 2.** Influencia de la actividad acuosa ( $a_w$ ), temperatura (T) y cepas diferentes (C), sobre la fase de latencia y la velocidad de crecimiento de cepas de *Fusarium chaquense* sobre un medio a base de pasto

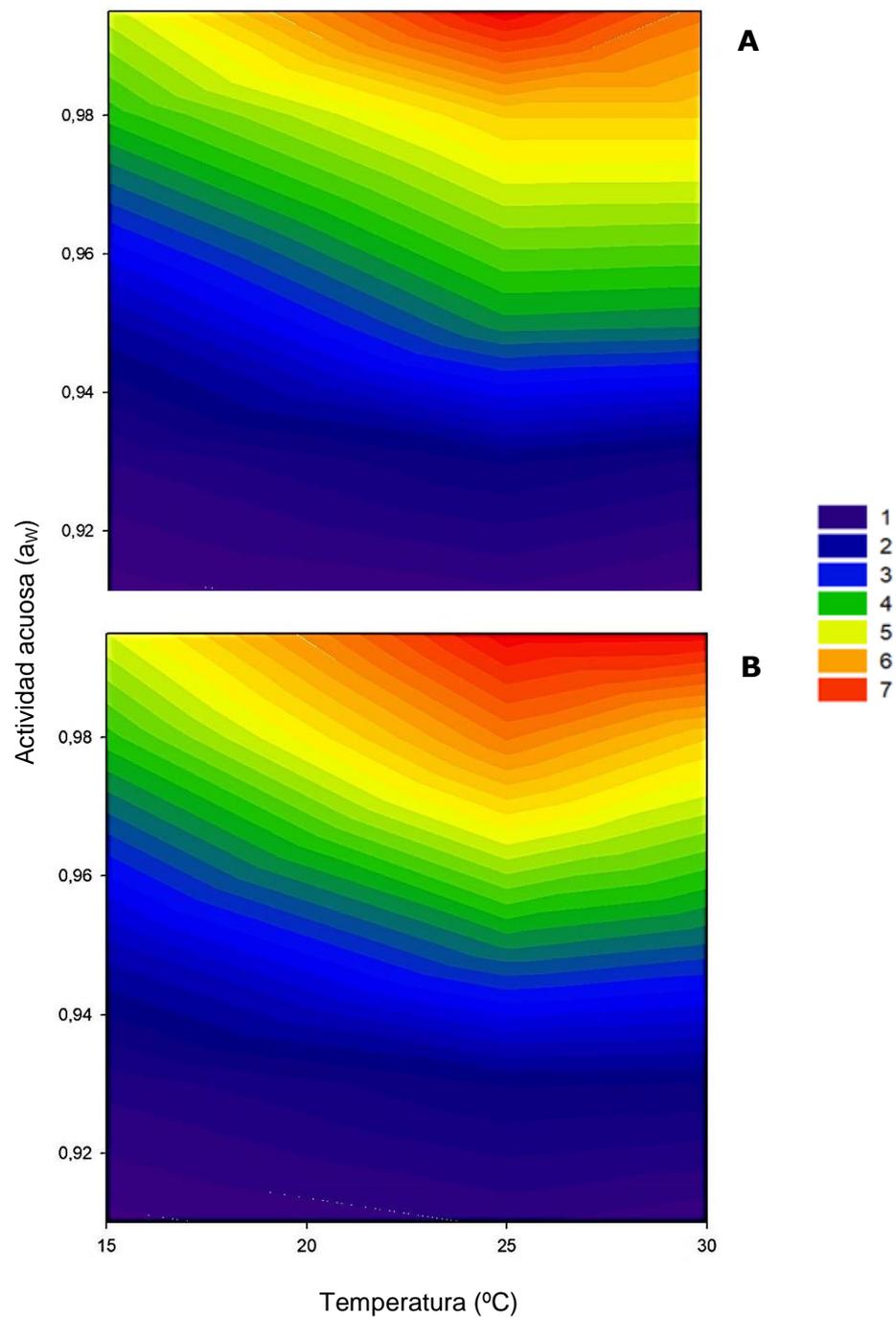
Actividad Acuosa	Fase de latencia (hs)		Velocidad de crecimiento (mm/día)	
	Media $\pm$ D.E			
0,995	10,26 $\pm$ 7,39 <sup>cd</sup>		6,45 $\pm$ 1,19 <sup>a</sup>	
0,98	11,21 $\pm$ 9,22 <sup>c</sup>		5,22 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	
0,95	27,94 $\pm$ 5,26 <sup>c</sup>		3,01 $\pm$ 0,79 <sup>c</sup>	
0,93	58,29 $\pm$ 31,14 <sup>b</sup>		1,31 $\pm$ 0,27 <sup>c</sup>	
0,91	165,19 $\pm$ 38,97 <sup>a</sup>		0,57 $\pm$ 0,13 <sup>d</sup>	
<b>Temperatura °C</b>				
15	76,09 $\pm$ 72,48 <sup>a</sup>		2,44 $\pm$ 1,79 <sup>b</sup>	
25	38,55 $\pm$ 42,72 <sup>c</sup>		3,82 $\pm$ 2,66 <sup>a</sup>	
30	49,09 $\pm$ 66,42 <sup>b</sup>		3,46 $\pm$ 2,53 <sup>a</sup>	
<b>Cepa</b>				
RC-J174	59,40 $\pm$ 72,20 <sup>a</sup>		3,24 $\pm$ 2,32 <sup>b</sup>	
RC-J283	49,75 $\pm$ 53,20 <sup>b</sup>		3,39 $\pm$ 2,44 <sup>a</sup>	

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



**Figura 2.** Efecto de la actividad acuosa y la temperatura sobre la velocidad de crecimiento (valores medios) de *Fusarium chaquense* RC-J174 (A) y RC-J283 (B), crecidas en un medio a base de pasto. Las barras de error representan el desvío estándar para los triplicados.

Con los datos obtenidos de las 2 cepas evaluadas se graficaron mapas de contorno a fin de identificar las condiciones óptimas y marginales de  $a_w$  y temperatura que permiten el crecimiento de *F. chaquense* (Figura 3). De esta figura se desprende que los niveles óptimos de  $a_w$  para el crecimiento se encuentran en un rango de 0,995 a 0,95 y a una temperatura óptima entre 25 y 30 °C.



**Figura 3.** Mapas de contorno de *Fusarium chaquense* RC-J174(A) y RC-J283 (B), en relación a la actividad de agua y a la temperatura. Los números en la escala se refieren a la velocidad de crecimiento (mm/día).

## V.2. Influencia de factores abióticos (actividad acuosa y temperatura) sobre la producción de micotoxinas por dos cepas de *Fusarium chaquense*, en un medio de cultivo a base de pasto

En una instancia previa a comenzar el estudio de la influencia de  $a_w$  y temperatura sobre la producción de micotoxinas por ambas cepas de *F. chaquense*, en un medio a base de pasto, se realizó un ensayo de recuperación de las toxinas en el medio de cultivo. Se observó una recuperación de 99% para T-2, 98% para HT-2, 97% para ZEA y 98% para BEA. El límite de detección (LD) para cada una de las toxinas analizadas, basado en la relación señal-ruido (3:1) y los límites de cuantificación (LC) fueron establecidos como 3 veces el límite de detección y fueron de 0,72  $\mu\text{g/g}$  para T-2 y H-T2, 120  $\mu\text{g/kg}$  para ZEA y 0,12  $\mu\text{g/g}$  para BEA, respectivamente. Debido a los buenos niveles de recuperación obtenidos se prosiguió con el estudio *in vitro*.

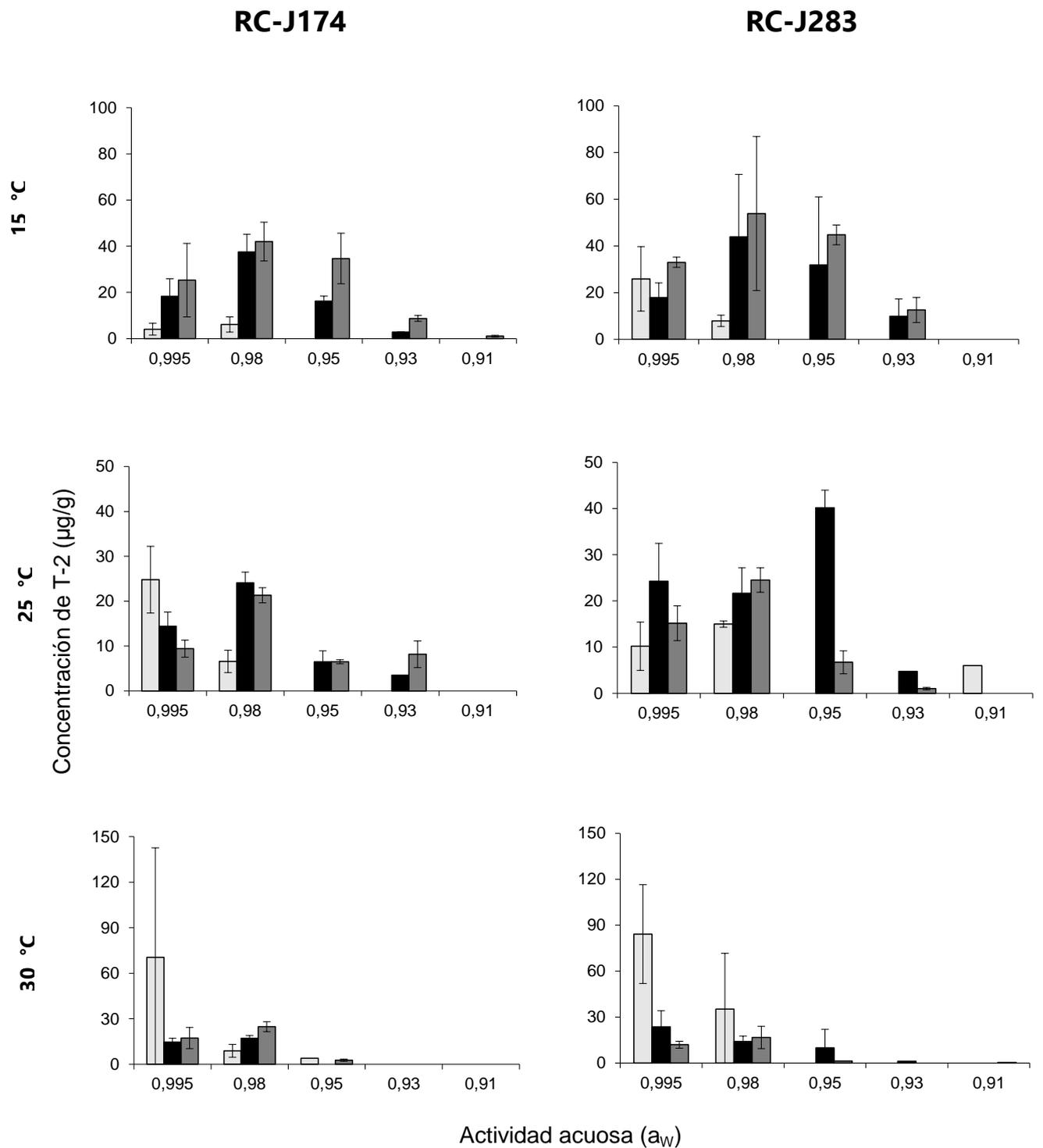
- **Tricotecenos tipo A:**

### Toxina T-2

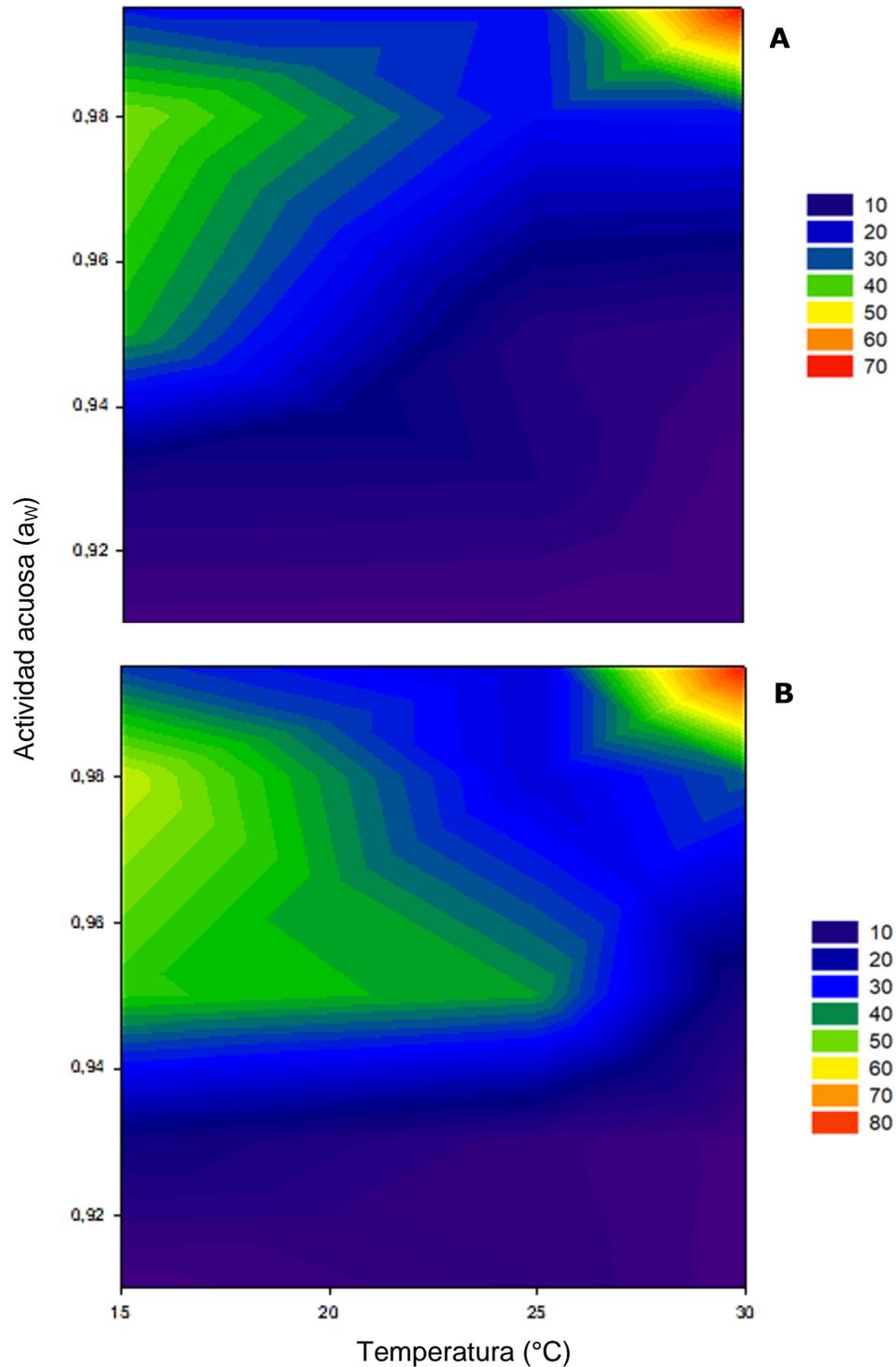
Se observó que los máximos niveles de producción de T-2, por parte de ambas cepas evaluadas, fueron obtenidos a 30 °C, al menor tiempo de incubación y a la máxima  $a_w$  (0,995), seguido de 15 °C, a una  $a_w$  de 0,98 a 25 días de incubación. En general, los niveles de T-2 producidos por la cepa RC-J283, fueron mayores a los producidos por la otra cepa estudiada (Figura 4).

Teniendo en cuenta la temperatura de incubación, la producción de T-2, para ambas cepas, fue mayor a 30 °C decreciendo en el siguiente orden: 15 y 25 °C. A 25 °C, la producción máxima se observó a una  $a_w$  de 0,995 a los 5 días de incubación, para la cepa RC-J174, mientras que para la cepa RC-J283, se observó a 0,95 a los 15 días de incubación. A 15 °C, la producción máxima, para ambas cepas, se observó a 0,98 a los 25 días de incubación.

Con los datos obtenidos de las dos cepas evaluadas se graficaron mapas de contorno, a fin de identificar las condiciones óptimas y marginales de  $a_w$  y temperatura, para la producción de T-2. De esta figura se desprende que el nivel óptimo de  $a_w$  para la producción de esta micotoxina se encuentra a 0,995-0,98 y a la máxima temperatura evaluada (30 °C). También se puede observar que ambas cepas son capaces de producir niveles considerables de toxina en un rango de 0,98-0,95 de  $a_w$ , a la menor temperatura ensayada 15 °C (Figura 5).



**Figura 4.** Niveles medios de toxina T-2 (µg/g) producidos por *Fusarium chaquense* RC-J174 y RC-J283, en un medio de cultivo a base de pasto ajustado a diferentes niveles de actividad de agua y temperatura, a diferentes tiempos de incubación (5 días □, 15 días ■, 25 días ▒).



**Figura 5.** Mapas de contorno de *Fusarium chaquense* RC-J174 (A) y RC-J238 (B), en relación a la actividad de agua y a la temperatura. Los números en la escala se refieren a los niveles medios de toxina T-2 ( $\mu\text{g/g}$ ).

El análisis de varianza de los datos de producción de toxina T-2, indicó que, para la cepa RC-J174, la  $a_w$  y las interacciones T x D y  $a_w$  x D influenciaron significativamente la producción de la toxina, mientras que para la cepa RC-J283, los factores  $a_w$ , D y la

interacción  $a_w$  x D influenciaron significativamente la producción, siendo, para ambas cepas, la  $a_w$  el factor más influyente (Tabla 3). Los test a posteriori demostraron que, para ambas cepas, no existieron diferencias significativas entre los niveles más altos de  $a_w$  (0,98 y 0,995) ni entre los más bajos (0,93 y 0,91) (LSD-Fisher,  $p > 0,01$ ). En cuanto a las demás condiciones, para la cepa RC-J283, se observaron diferencias significativas (LSD-Fisher,  $p < 0,01$ ) a las siguientes temperaturas ensayadas, 15 y 25 °C. Además, se observaron diferencias significativas a los 5 días de incubación con respecto a 15 y 25 días (Tabla 4).

**Tabla 3.** Análisis de varianza del efecto de la actividad de agua ( $a_w$ ), temperatura (T), días de incubación (D) y sus interacciones sobre la producción de toxina T-2 por *Fusarium chaquense* RC-J174 y RC-J283 en un medio de cultivo a base de pasto

Fuente de Variación	Grados de libertad	RC-J174		RC-J283	
		Cuadrado medio	F-Snedecor	Cuadrado medio	F-Snedecor
T	2	188,37	1,32	1,02	7,26
$a_w$	4	2938,12	20,64*	7,03	49,84*
D	2	220,05	1,55	1,21	8,54*
T x $a_w$	8	363,2	2,55	0,3	2,11
T x D	4	722,38	5,07*	0,4	2,82
$a_w$ x D	8	558,43	3,92*	0,71	5,05*
T x $a_w$ x D	16	228,5	1,61	0,12	0,88

\*Significativo  $p \leq 0,01$ .

**Tabla 4.** Influencia de la actividad acuosa ( $a_w$ ), temperatura (T) y días de incubación (D) sobre la producción de toxina T-2 por *Fusarium chaquense* RC-J174 y RC-J283 en un medio de cultivo a base de pasto

Actividad Acuosa	RC-J174		RC-J283	
	Media $\pm$ D.E		Media $\pm$ D.E	
0,995	21,89 $\pm$ 27,99 <sup>a</sup>		24,11 $\pm$ 25,91 <sup>a</sup>	
0,98	20,93 $\pm$ 12,97 <sup>a</sup>		22,20 $\pm$ 19,75 <sup>a</sup>	
0,95	6,02 $\pm$ 10,01 <sup>b</sup>		13,01 $\pm$ 19,56 <sup>b</sup>	
0,93	2,22 $\pm$ 3,64 <sup>b</sup>		2,46 $\pm$ 4,98 <sup>c</sup>	
0,91	0,12 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup>		0,24 $\pm$ 1,15 <sup>c</sup>	
<b>Temperatura °C</b>				
15	12,29 $\pm$ 15,31 <sup>a</sup>		16,56 $\pm$ 20,96 <sup>a</sup>	
25	8,05 $\pm$ 9,13 <sup>a</sup>		9,05 $\pm$ 11,50 <sup>b</sup>	
30	10,36 $\pm$ 23,86 <sup>a</sup>		11,60 $\pm$ 23,70 <sup>ab</sup>	
<b>Días incubación</b>				
5	8,56 $\pm$ 23,79 <sup>a</sup>		10,43 $\pm$ 23,91 <sup>b</sup>	
15	9,87 $\pm$ 11,49 <sup>a</sup>		13,16 $\pm$ 17,36 <sup>a</sup>	
25	12,70 $\pm$ 13,69 <sup>a</sup>		13,63 $\pm$ 16,84 <sup>a</sup>	

D.E., Desvío estándar. Valores con letras iguales no son significativamente diferente (LSD-Fisher  $p > 0,01$ ).

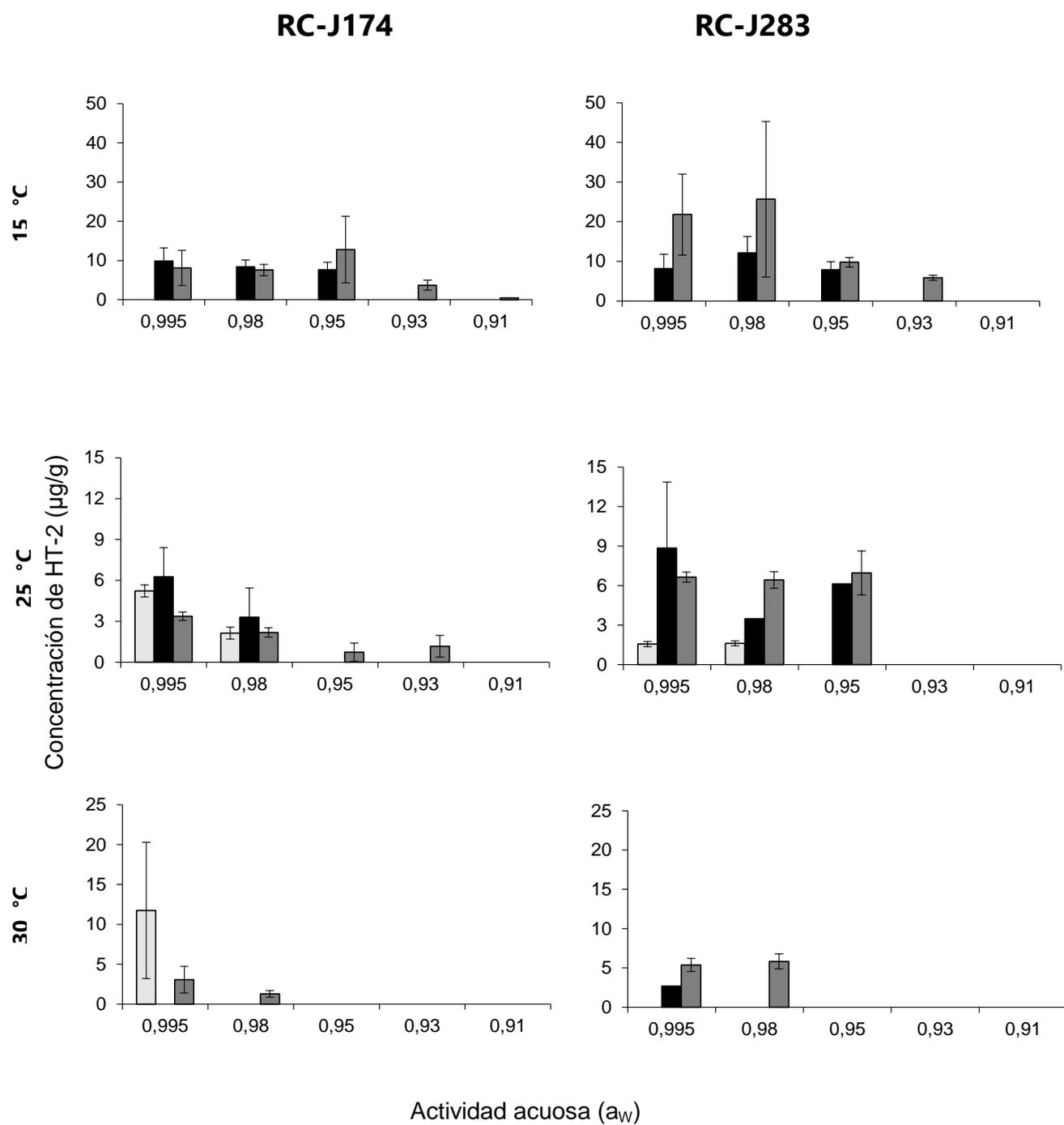
### Toxina HT-2

Se observó que la máxima producción de HT-2, para ambas cepas fue obtenida a 15 °C y a los 25 días de incubación, pero a diferentes  $a_w$ : 0,95 para la cepa RC-J174 y 0,98 para la cepa RC-J283. En general, se observó que los niveles de producción de HT-2 fueron mayores en la cepa RC-J283 (Figura 6).

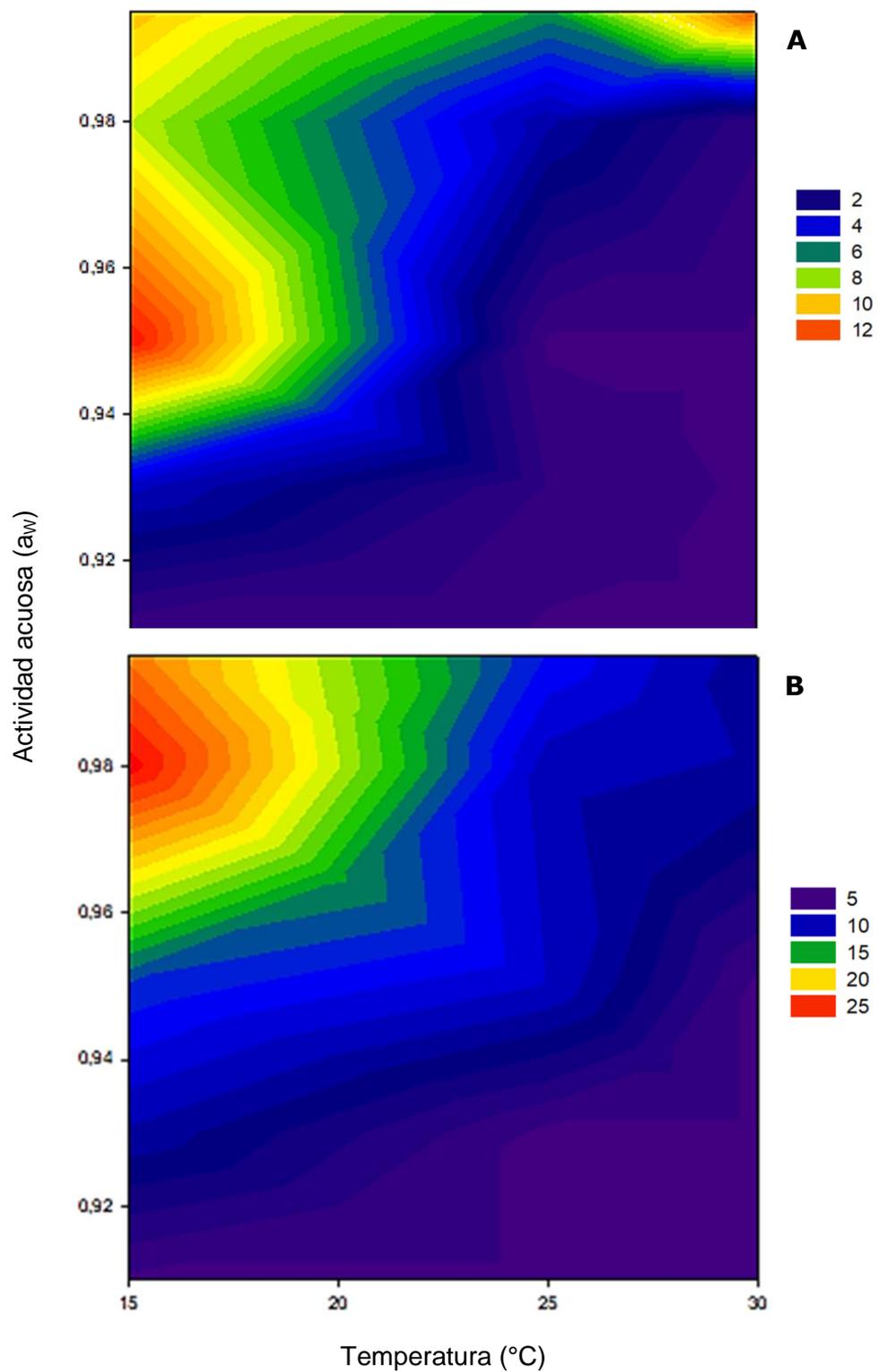
Teniendo en cuenta la temperatura de incubación, la producción de HT-2, para ambas cepas, fue mayor a 15 °C decreciendo en el siguiente orden: 25 y 30 °C. A la máxima temperatura ensayada (30 °C) prácticamente no se observó producción de la toxina por parte de ninguna de las cepas a  $a_w$  menores de 0,98. A 25 °C, la producción máxima se observó, para ambas cepas, a la  $a_w$  0,995 a los 15 días de incubación. Mientras que, a 15 °C, la producción máxima se observó a los 15 días de incubación, a 0,95 de  $a_w$  para la cepa RC-J174 y a 0,98 para la cepa RC-J283.

Con los datos obtenidos de las dos cepas evaluadas se graficaron mapas de contorno, a los fines de identificar las condiciones óptimas y marginales de  $a_w$  y temperatura, para la producción de HT-2. De esta figura se desprende que, la condición óptima para la producción de esta micotoxina, para ambas cepas, se encuentra a la menor temperatura evaluada (15°C) y en un rango de 0,98 a 0,95 de  $a_w$  (Figura 7).

El análisis de varianza de los datos de HT-2, demostró que, para ambas cepas todos los factores individuales y alguna/as interacciones influenciaron significativamente la producción de la toxina, siendo la  $a_w$  el factor más influyente para la cepa RC-J174, mientras que el tiempo de incubación lo fue para la cepa RC-J283 (Tabla 5). Los test a posteriori revelaron que existían diferencias significativas (LSD-Fisher,  $p < 0,01$ ) entre las  $a_w$  analizadas para la cepa RC-J174, excepto para las  $a_w$  0,98, 0,95 y 0,93, mientras que para la cepa RC-J283, no existieron diferencias entre las  $a_w$  ensayadas. De este mismo análisis podemos señalar que, para ambas cepas, no existieron diferencias significativas entre 25 y 30 °C. Con respecto a los días de incubación, para la cepa RC-J174, no existieron diferencias significativas entre 15 y 25 días de incubación, mientras que para la cepa RC-J283, se observaron diferencias significativas a 5 y 25 días de incubación (Tabla 6).



**Figura 6.** Niveles medios de toxina HT-2 ( $\mu\text{g/g}$ ) producidos por *Fusarium chaquense* RC-J174 y RC-J283, en un medio de cultivo a base de pasto ajustado a diferentes niveles de actividad de agua y temperatura, a diferentes tiempos de incubación (5 días  15 días  25 días ).



**Figura 7.** Mapas de contorno de *Fusarium chaquense* RC-J174 (A) y RC-J238 (B), en relación a la actividad de agua y a la temperatura. Los números en la escala se refieren a los niveles medios de toxina HT-2 ( $\mu\text{g/g}$ ).

**Tabla 5.** Análisis de varianza del efecto de la actividad de agua ( $a_w$ ), temperatura (T), días de incubación (D) y sus interacciones sobre la producción de toxina HT-2 por *Fusarium chaquense* RC-J174 y RC-J283 en un medio de cultivo a base de pasto

Fuente de Variación	Grados de libertad	RC-J174		RC-J283	
		Cuadrado medio	F-Snedecor	Cuadrado medio	F-Snedecor
T	2	59,04	14,62*	9,13	30,46*
$a_w$	4	72,81	18,03*	7,6	25,37
D	2	24,29	6,01*	14,96	49,91*
T x $a_w$	8	10,57	2,62*	0,86	2,87
T x D	4	41,1	10,18*	2,56	8,55
$a_w$ x D	8	6,38	1,58	1,97	6,59
T x $a_w$ x D	16	11,12	2,75*	0,57	1,9

\*Significativo  $p \leq 0,01$ .

**Tabla 6.** Influencia de la actividad acuosa ( $a_w$ ), temperatura (T) y días de incubación (D) sobre la producción de toxina HT-2 por *Fusarium chaquense* RC-J174 y RC-J283 en un medio de cultivo a base de pasto

Actividad Acuosa	RC-J174		RC-J283	
	Media $\pm$ D.E			
0,995	4,30 $\pm$ 4,57 <sup>a</sup>		5,53 $\pm$ 7,46 <sup>a</sup>	
0,98	2,36 $\pm$ 3,27 <sup>b</sup>		4,97 $\pm$ 8,25 <sup>a</sup>	
0,95	1,9 $\pm$ 4,35 <sup>bc</sup>		2,70 $\pm$ 4,03 <sup>a</sup>	
0,93	0,54 $\pm$ 1,27 <sup>cd</sup>		0,65 $\pm$ 1,54 <sup>a</sup>	
0,91	0,02 $\pm$ 0,09 <sup>d</sup>		ND	
<b>Temperatura °C</b>				
15	3,38 $\pm$ 4,65 <sup>a</sup>		5,53 $\pm$ 8,59 <sup>a</sup>	
25	1,25 $\pm$ 2,04 <sup>b</sup>		1,97 $\pm$ 3,14 <sup>b</sup>	
30	0,81 $\pm$ 2,85 <sup>b</sup>		0,81 $\pm$ 1,97 <sup>b</sup>	
<b>Días incubación</b>				
5	0,80 $\pm$ 2,94 <sup>b</sup>		0,11 $\pm$ 0,40 <sup>b</sup>	
15	2,00 $\pm$ 3,58 <sup>a</sup>		2,62 $\pm$ 4,36 <sup>ab</sup>	
25	2,64 $\pm$ 3,81 <sup>a</sup>		5,58 $\pm$ 8,08 <sup>a</sup>	

ND, no detectado <LC. D.E., Desvío estándar. Valores con letras iguales no son significativamente diferente (LSD-Fisher  $p > 0,01$ ).

#### • Zearalenona

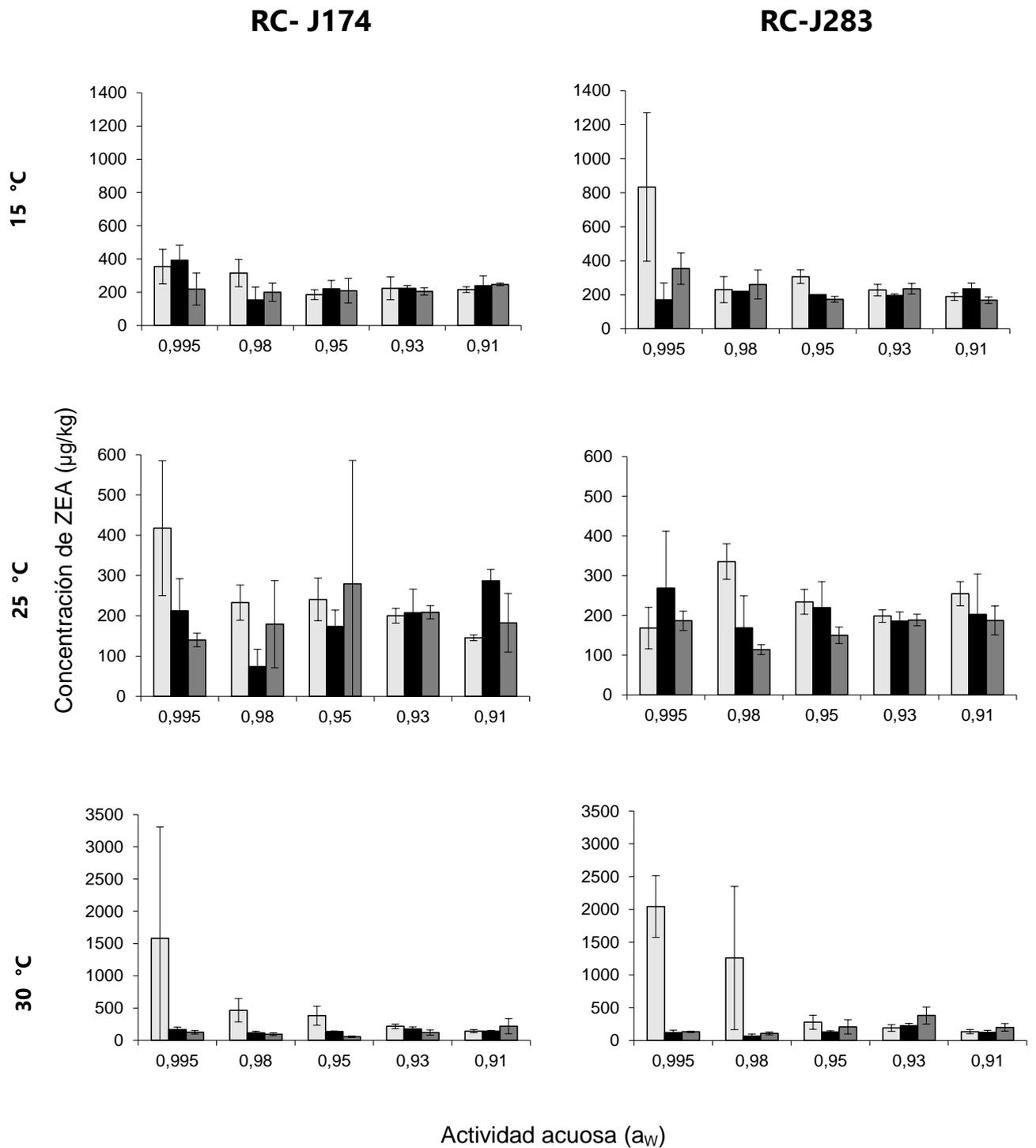
En el presente estudio, se observó que ambas cepas fueron capaces de producir esta micotoxina en todas las condiciones ensayadas. La mayor producción, en ambas cepas, se observó a 30 °C, a la máxima  $a_w$  analizada y al menor tiempo de incubación. En general, se observó que los niveles de ZEA producidos por la cepa RC-J283, fueron mayores en comparación con la cepa RC-J174 (Figura 8).

Teniendo en cuenta la temperatura de incubación, la producción de ZEA fue mayor a 30 °C, para ambas cepas, disminuyendo a medida que la temperatura se reducía para la cepa RC-J174, mientras que para la cepa RC-J283, decreciendo en el siguiente orden: 15 y 25 °C.

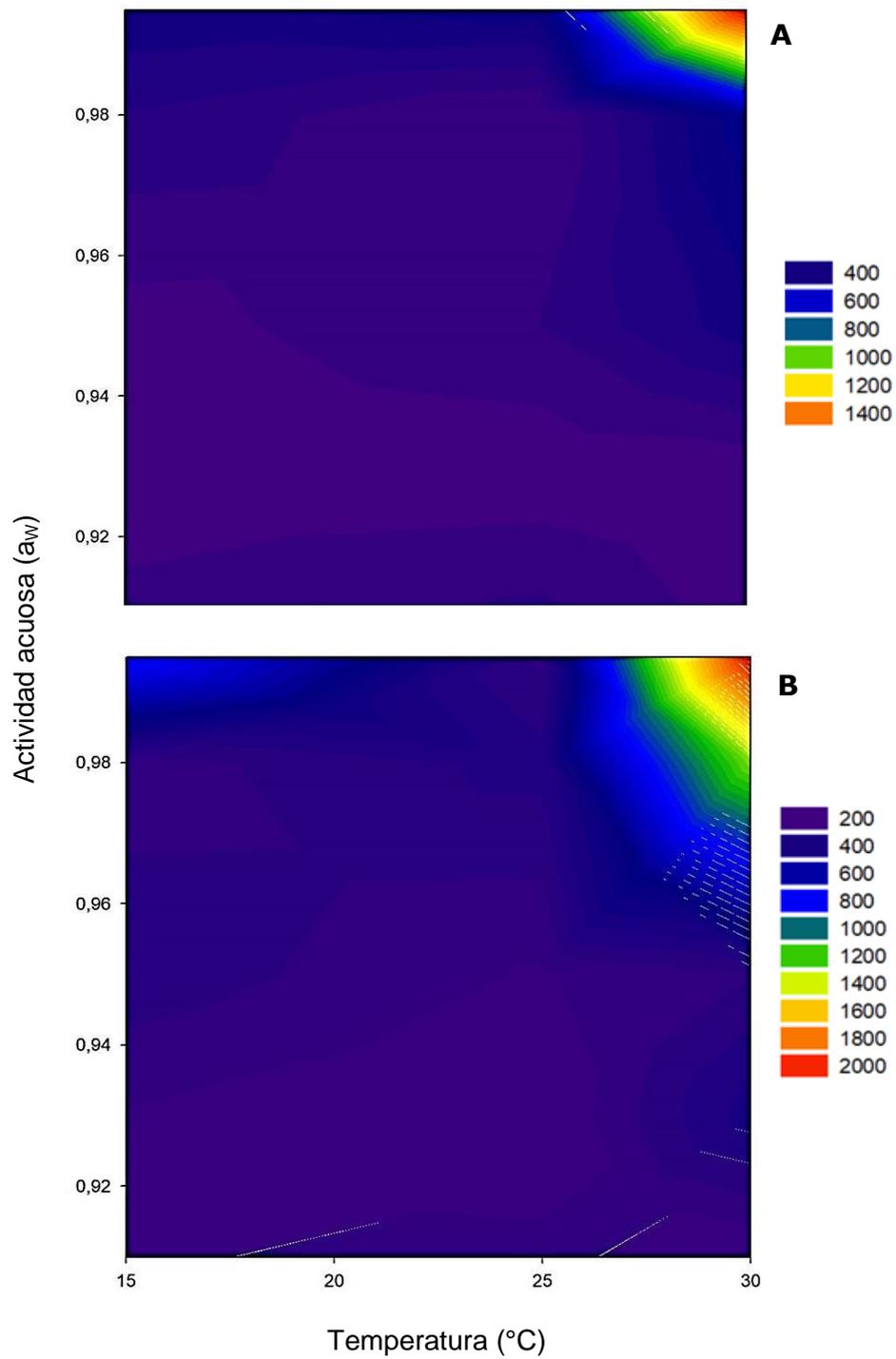
A 25 °C, la producción máxima se observó a los 5 días de incubación, a la  $a_w$  0,995, para la cepa RC-J174, y a 0,98, para la cepa RC-J283. A 15 °C, la producción máxima se observó a la  $a_w$  0,995, a los 5 y 15 días de incubación para las cepas RC-J283 y RC-J174, respectivamente. Es importante destacar que la cepa RC-J174 empleada para este estudio, fue seleccionada por ser una cepa no productora de ZEA, de acuerdo a los resultados observados en el ensayo de capacidad toxicogénica realizado en arroz (capítulo IV).

Con los datos obtenidos de las dos cepas evaluadas se graficaron mapas de contorno, a fin de identificar las condiciones óptimas y marginales de  $a_w$  y temperatura, para la producción de ZEA. De esta figura se desprende que, las condiciones óptimas para la producción de esta micotoxina, para ambas cepas, ocurren en el rango de 0,995-0,98 de  $a_w$  y a la máxima temperatura (30 °C) analizada.

El análisis de varianza de los datos de ZEA indicó que, para la cepa RC-J174, todos los factores individuales ( $a_w$ , T y D) así como sus interacciones de dos y tres vías (excepto T x  $a_w$ ) influenciaron significativamente la producción de ZEA, siendo el factor D el más influyente, mientras que para la cepa RC-J283 sólo el factor D, influyó significativamente en la producción de ZEA (Tabla 7). Los test a posteriori para la cepa RC-J174, mostraron que existían diferencias significativas (LSD-Fisher,  $p < 0,01$ ) entre 5 días de incubación con respecto a 15 y 25 D. Mientras que, para la cepa RC-J283, se encontraron diferencias significativas entre 5 y 15 días de incubación. Además, para la cepa RC-J174, se observaron diferencias significativas entre el máximo (0,995) y los mínimos (0,93 y 0,91) niveles de  $a_w$  ensayados, mientras que para la cepa RC-J283, se observaron diferencias significativas entre los niveles de  $a_w$  0,995 y 0,98. Con respecto a la temperatura, no se observaron diferencias significativas para la cepa RC-J283, mientras que para la cepa RC-J174, se observaron diferencias significativas entre 25 °C y la máxima (30 °C) temperatura ensayada (Tabla 8).



**Figura 8.** Niveles medios de zearalenona (µg/kg) producidos por *Fusarium chaquense* RC-J174 y RC-J283, en un medio de cultivo a base de pasto ajustado a diferentes niveles de actividad de agua y temperatura, a diferentes tiempos de incubación (5 días □ 15 días ■ 25 días ▒).



**Figura 9.** Mapas de contorno de *Fusarium chaquense* RC-J174 (A) y RC-J238 (B), en relación a la actividad de agua y a la temperatura. Los números en la escala se refieren a los niveles medios de zearalenona ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

**Tabla 7.** Análisis de varianza del efecto de la actividad de agua ( $a_w$ ), temperatura (T), días de incubación (D), y sus interacciones sobre la producción de zearalenona por *Fusarium chaquense* RC-J174 y RC-J283, en un medio de cultivo a base de pasto

Fuente de Variación	Grados de libertad	RC-J174		RC-J283	
		Cuadrado medio	F-Snedecor	Cuadrado medio	F-Snedecor
T	2	0,86	5,71*	0,18	0,61
$a_w$	4	0,65	4,28*	1,03	3,47
D	2	3,63	24,02*	1,45	4,89*
T x $a_w$	8	0,13	0,83	0,34	1,14
T x D	4	1,27	8,43*	0,32	1,07
$a_w$ x D	8	1,04	6,85*	0,14	0,48
T x $a_w$ x D	16	0,33	2,20*	0,44	1,47

\*Significativo  $p \leq 0,01$ .

**Tabla 8.** Influencia de la actividad acuosa ( $a_w$ ), temperatura (T) y días de incubación (D) sobre la producción de zearalenona por *Fusarium chaquense* RC-J174 y RC-J283 en un medio de cultivo a base de pasto

Actividad Acuosa	RC-J174		RC-J283	
	Media $\pm$ D.E			
0,995	396,39 $\pm$ 655,16 <sup>a</sup>		475,89 $\pm$ 632,08 <sup>a</sup>	
0,98	203,61 $\pm$ 138,18 <sup>ab</sup>		234,56 $\pm$ 380,88 <sup>b</sup>	
0,95	209,44 $\pm$ 132,58 <sup>ab</sup>		188,56 $\pm$ 97,68 <sup>ab</sup>	
0,93	190,01 $\pm$ 58,18 <sup>b</sup>		204,74 $\pm$ 84,20 <sup>ab</sup>	
0,91	178,84 $\pm$ 86,98 <sup>b</sup>		188,35 $\pm$ 56,51 <sup>ab</sup>	
<b>Temperatura °C</b>				
15	229,65 $\pm$ 96,01 <sup>ab</sup>		242,33 $\pm$ 208,22 <sup>a</sup>	
25	208 $\pm$ 118,02 <sup>b</sup>		200,08 $\pm$ 77,34 <sup>a</sup>	
30	269,24 $\pm$ 526,14 <sup>a</sup>		332,84 $\pm$ 558,53 <sup>a</sup>	
<b>Días incubación</b>				
5	354,88 $\pm$ 509,79 <sup>a</sup>		431,13 $\pm$ 554,10 <sup>a</sup>	
15	183,00 $\pm$ 95,92 <sup>b</sup>		159,67 $\pm$ 92,08 <sup>b</sup>	
25	170,29 $\pm$ 104,82 <sup>b</sup>		184,46 $\pm$ 95,50 <sup>ab</sup>	

D.E., Desvío estándar. Valores con letras iguales no son significativamente diferente (LSD-Fisher  $p > 0,01$ ).

#### • Beauvericina

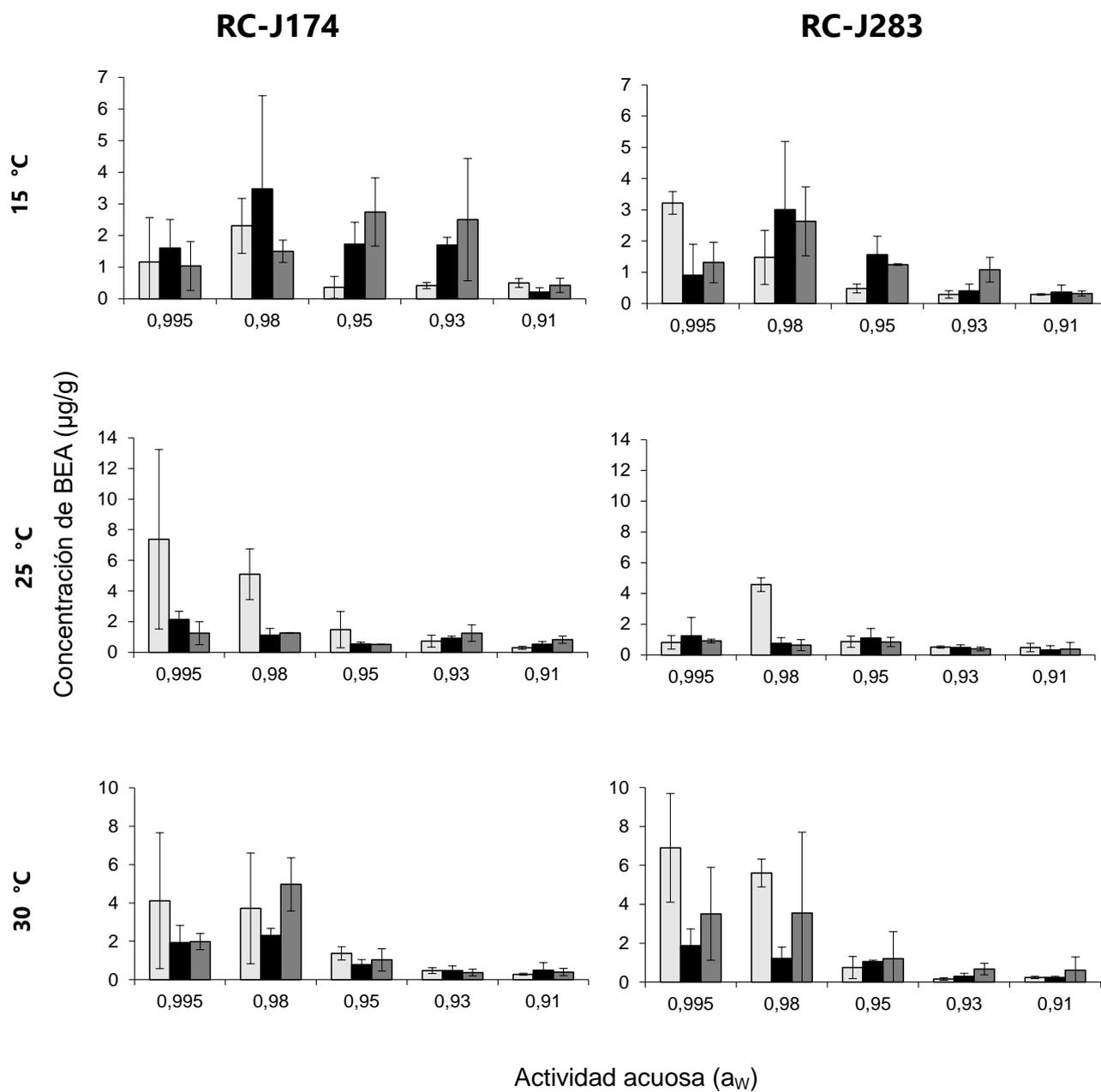
Con respecto a la BEA, se observó producción de esta micotoxina, en ambas cepas, en todas las condiciones ensayadas. La producción máxima, para ambas cepas, se observó a la máxima  $a_w$  analizada y a los 5 días de incubación, pero a diferentes temperaturas de incubación: 25 y 30 °C para la cepa RC-J174 y RC-J283, respectivamente. En general, se observó que los niveles máximos de BEA producidos por ambas cepas, fueron similares, si bien mostraron un comportamiento diferente (Figura 10).

Teniendo en cuenta la temperatura de incubación, la producción de BEA fue mayor a 30 °C disminuyendo a medida que la temperatura se reducía para la cepa RC-J283, mientras que para la cepa RC-J174, la producción fue mayor a 25 °C decreciendo en el siguiente orden: 30 y 15 °C. A la máxima temperatura ensayada (30 °C) la mayor producción de BEA para la

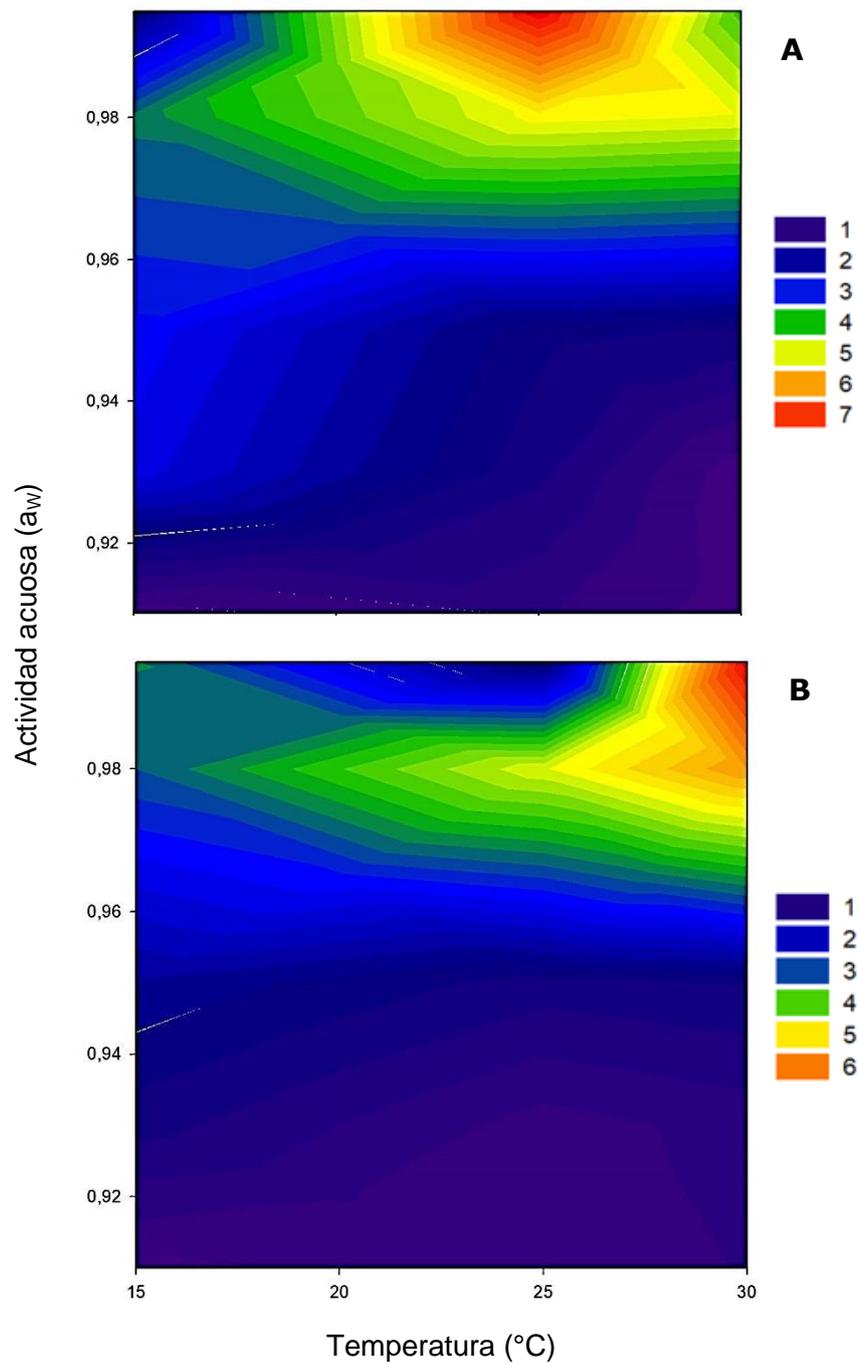
cepa RC-J174 se observó a la  $a_w$  0,98 a los 25 días de incubación, mientras que para la cepa RC-J283 se observó a 0,995 a los 5 días de incubación. A 25 °C, la producción máxima se observó a los 5 días de incubación, para ambas cepas, a 0,995 de  $a_w$ , para la cepa RC-J174, y a 0,98, para la cepa RC-J283. A 15 °C, la producción máxima se observó a 0,98 a los 15 días de incubación para la cepa RC-174 y mientras que para la cepa RC-J283, la producción máxima se observó a 0,995 a los 5 días de incubación seguido de 0,98 a los 15 días de incubación.

Con los datos obtenidos de las dos cepas evaluadas se graficaron mapas de contorno, a fin de identificar las condiciones óptimas y marginales de  $a_w$  y temperatura, para la producción de BEA. De esta figura se desprende que, las condiciones óptimas para la producción de esta micotoxina, para ambas cepas estarían en un rango de 0,98-0,995 de  $a_w$  y 20-30 °C de temperatura (Figura 11).

El análisis de varianza indicó que, para ambas cepas, sólo la  $a_w$ , como así también las interacciones de dos y tres vías (excepto T x D para la cepa RC-J283) influenciaron significativamente la producción de BEA (Tabla 9). De este mismo análisis se desprende que, para ambas cepas, la  $a_w$  fue el factor más influyente para la producción de BEA. Los test a posteriori LSD-Fisher ( $p > 0,01$ ) mostraron que, para ambas cepas, los niveles de producción de BEA a las mayores  $a_w$  (0,98 y 0,995) evaluadas no fueron significativamente diferentes entre sí. Además, no se observaron diferencias significativas, para la cepa RC-J174, entre las  $a_w$  0,95 y 0,93, las cuales si mostraron diferencias significativas respecto a 0,91. Mientras que para la cepa RC-J283 no se observaron diferencias significativas entre las  $a_w$  0,91 y 0,93 entre sí, pero si respecto de 0,95. Los niveles de producción de BEA para ambas cepas no variaron significativamente a los diferentes tiempos y temperaturas de incubación ensayadas (Tabla 10).



**Figura 10.** Niveles medios de beauvericina ( $\mu\text{g/g}$ ) producidos por *Fusarium chaquense* RC-J174 y RC-J283, en un medio de cultivo a base de pasto ajustado a diferentes niveles de actividad de agua y temperatura, a diferentes tiempos de incubación (5 días  $\square$  15 días  $\blacksquare$  25 días  $\blacksquare$ ).



**Figura 11.** Mapas de contorno de *Fusarium chaquense* RC-J174 (A) y RC-J238 (B), en relación a la actividad de agua y a la temperatura. Los números en la escala se refieren a los niveles medios de beauvericina ( $\mu\text{g/g}$ ).

**Tabla 9.** Análisis de varianza del efecto de la actividad de agua ( $a_w$ ), temperatura (T), días de incubación (D) y sus interacciones sobre la producción de beauvericina por *Fusarium chaquense* RC-J174 y RC-J283 en un medio de cultivo a base de pasto

Fuente de Variación	Grados de libertad	RC-J174		RC-J283	
		Cuadrado medio	F-Snedecor	Cuadrado medio	F-Snedecor
T	2	0,01	0,12	0,3	2,73
$a_w$	4	3,14	31,28*	3,48	31,46*
D	2	0,12	1,22	0,2	1,85
T x $a_w$	8	0,44	4,36*	0,4	3,60*
T x D	4	0,66	6,52*	0,2	1,85
$a_w$ x D	8	0,33	3,24*	0,3	2,75*
T x $a_w$ x D	16	0,24	2,41*	0,25	2,25*

\*Significativo  $p \leq 0,01$ .

**Tabla 10.** Influencia de la actividad acuosa ( $a_w$ ), temperatura (T) y días de incubación (D) sobre la producción de beauvericina por *Fusarium chaquense* RC-J174 y RC-J283, en un medio de cultivo a base de pasto

Actividad Acuosa	RC-J174		RC-J283	
	Media $\pm$ D.E		Media $\pm$ D.E	
0,995	2,39 $\pm$ 2,84 <sup>a</sup>		2,30 $\pm$ 2,24 <sup>a</sup>	
0,98	2,86 $\pm$ 1,93 <sup>a</sup>		2,40 $\pm$ 2,15 <sup>a</sup>	
0,95	1,17 $\pm$ 0,90 <sup>b</sup>		0,97 $\pm$ 0,55 <sup>b</sup>	
0,93	0,92 $\pm$ 0,91 <sup>b</sup>		0,45 $\pm$ 0,32 <sup>c</sup>	
0,91	0,39 $\pm$ 0,26 <sup>c</sup>		0,36 $\pm$ 0,28 <sup>c</sup>	
<b>Temperatura °C</b>				
15	1,40 $\pm$ 1,36 <sup>a</sup>		1,24 $\pm$ 1,16 <sup>a</sup>	
25	1,67 $\pm$ 2,35 <sup>a</sup>		0,96 $\pm$ 1,08 <sup>a</sup>	
30	1,60 $\pm$ 1,84 <sup>a</sup>		1,69 $\pm$ 2,36 <sup>a</sup>	
<b>Días incubación</b>				
5	1,98 $\pm$ 2,69 <sup>a</sup>		1,65 $\pm$ 2,19 <sup>a</sup>	
15	1,25 $\pm$ 1,17 <sup>a</sup>		0,99 $\pm$ 0,98 <sup>a</sup>	
25	1,44 $\pm$ 1,37 <sup>a</sup>		1,25 $\pm$ 1,54 <sup>a</sup>	

D.E., Desvío estándar. Valores con letras iguales no son significativamente diferente (LSD-Fisher  $p > 0,01$ ).

## V. DISCUSIÓN

En el presente estudio se analizó el efecto de dos de los parámetros abióticos más importantes como son la  $a_w$  y temperatura sobre el crecimiento y producción de micotoxinas por *F. chaquense* en un medio a base de pasto. Debido a que *F. chaquense* representa una nueva especie recientemente descrita no existen trabajos comparables, es por ello que realizaremos comparaciones con especies filogenéticamente relacionadas como son *F. langsethiae*, *F. sporotrichioides* y otras especies pertenecientes al FSAMSC. Estas especies son importantes patógenos de avena, trigo y cebada, todas son productoras de tricotecenos y debido a eso son muy estudiadas (Mateo et al., 2002; Kokkonen et al., 2010, 2012; Medina y Magan, 2011).

En el presente estudio, las cepas de *F. chaquense* alcanzaron una tasa de crecimiento máxima a valores comprendidos entre 25-30 °C y a la  $a_w$  más alta (0,995) reflejando las condiciones climáticas locales de la región de aislamiento de esta especie (húmedales de Chaco) donde la temperatura anual oscila entre 20-24 °C (máxima absoluta pueden alcanzar su punto máximo de 46,5 °C) y la precipitación media anual es de 1300 mm, concentradas en primavera y verano (Alberto, 2018). Mientras que a la  $a_w$  más baja (0,90), las cepas crecieron lentamente a las 3 temperaturas evaluadas. Estudios previos referidos a los requerimientos de agua y temperatura para el crecimiento de especies de *Fusarium* relacionados a *F. chaquense* como son *F. langsethiae* y *F. sporotrichioides*, indicaron que estas especies tuvieron un crecimiento óptimo a 25 °C entre 0,995-0,98 de  $a_w$  en un medio de cultivo a base de avena. Sin embargo, bajo estrés hídrico ( $a_w$  0,95 y 0,93) las cepas de *F. sporotrichioides* fueron más tolerantes que las de *F. langsethiae* (Kokkonen et al., 2012). Resultados similares fueron obtenidos por Medina y Magan (2010) los cuales evaluaron el crecimiento de cepas de *F. langsethiae* de diferentes países del norte de Europa, demostrando de igual manera que el crecimiento era óptimo a 25 °C entre 0,995 y 0,98 de  $a_w$  en un medio de cultivo a base de avena, y además, informaron que no se observaron diferencias significativas entre las distintas cepas utilizadas en dicho estudio. Además, estos investigadores observaron que la velocidad de crecimiento de las cepas se vio disminuida a medida que la  $a_w$  de los medios de cultivo o granos disminuyó, y que en todos los casos estos valores fueron menores cuando la temperatura de incubación fue menor a 20 °C. En líneas generales, los resultados del presente trabajo se asemejan a lo expuesto por los autores citados.

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 subóptimo, 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 pastos por *F. chaquense*.

Con respecto al estudio del efecto de la temperatura,  $a_w$  y D sobre la producción de micotoxinas, en general las condiciones para la producción de las micotoxinas fueron diferentes a las óptimas para crecimiento. El perfil de producción de ambas cepas de *F. chaquense* fue en orden de importancia (>concentraciones): T-2, HT-2, BEA ( $\mu\text{g/g}$ ) y por último ZEA ( $\mu\text{g/kg}$ ) en muy bajas concentraciones. El perfil de producción de micotoxinas, con la excepción de la producción de ZEA, de *F. chaquense* es similar al descrito para *F. langsethiae* y *F. sporotrichioides* (Langseth et al., 1998; Thrane et al., 2004; Jestoi et al., 2008). Además, al igual que en estas especies, la toxina T-2 siempre es el tricoteceno tipo A producido en mayores concentraciones. La prevalencia de esta toxina estaría ligada a su vía biosintética, ya que T-2 es uno de los metabolitos finales de la misma, lo que explicaría su abundancia en cultivos de *F. langsethiae*, *F. sporotrichioides* (Desjardins, 2006) y *F. chaquense*. Por otro lado, la producción de BEA por *F. langsethiae* y *F. sporotrichioides* no ha sido estudiada en profundidad (Thrane et al., 2004; Kokkonen et al., 2010). Se sabe que esta micotoxina es sintetizada por una vía diferente a la de los tricotecenos (Desjardins y Proctor, 2007) y, por lo tanto, las concentraciones de estas toxinas no se esperaba necesariamente que se correlacionaran. Las concentraciones detectadas en nuestro estudio indicarían que la síntesis de tricotecenos predomina sobre BEA y más aún sobre ZEA, al menos en bajo las condiciones y sustrato usados en el presente trabajo.

Durante el presente estudio, los máximos niveles de producción de T-2, para ambas cepas de *F. chaquense* evaluadas, fueron obtenidos a la máxima  $a_w$  (0,995), a 30 °C y al menor tiempo de incubación, seguido de una  $a_w$  de 0,98, a 15 °C y a 25 días de incubación. En cuanto al otro tricoteceno tipo A estudiado, HT-2, las máximas concentraciones, para ambas cepas, se detectaron a las  $a_w$  0,95 - 0,98, a 15 °C y a los 25 días de incubación. En general, los niveles de T-2 y HT-2 producidos por la cepa RC-J283, fueron mayores si se compara con la otra cepa estudiada. Nuestros resultados coinciden parcialmente con los obtenidos por Kokkonen et al. (2012). Estos investigadores demostraron que las condiciones donde se producen las máximas concentraciones de estas micotoxinas difirieron entre las dos especies estudiadas; cepas de *F. sporotrichioides* produjeron mayores concentraciones de T-2 + HT-2 a 15 °C y 0,995 de  $a_w$ , mientras que *F. langsethiae* produjo el máximo a una  $a_w$  de 0,98 a 25 °C, cuando crecían en un medio a base de avena. Estudios anteriores realizados por Kokkonen et al. (2010) demostraron que las condiciones de 15 °C y 0,995 de  $a_w$  favorecían la producción de toxinas tanto de *F. sporotrichioides* como de *F. langsethiae*. Sobre la base de sus resultados concluyeron que la  $a_w$  fue el factor más importante que controlaba la producción de T-2 y HT-2 en lugar de la temperatura, cuando crecían sobre una mezcla de tres cereales (avena, trigo y cebada). La diferencia con nuestro estudio

puede deberse que estos autores no incluyeron 30 °C en sus experimentos, debido a que esta temperatura no se registra en su país (Finlandia) durante el cultivo de avena, trigo y cebada, cereales en los cuales *F. langsethiae* y *F. sporotrichioides* son los responsables de la incidencia natural de tricotecenos tipo A. Medina y Magan (2011) estudiaron la producción de tricotecenos tipo A por parte de 8 cepas de *F. langsethiae* de diferentes países del norte de Europa e incluyeron 30 y 35 °C, demostrando que las condiciones óptimas de  $a_w$  y temperatura para T-2 fueron a 0,98/20 °C, mientras que para HT-2 lo fueron a 0,995/30 °C. Por otra parte, se pudo demostrar que ambas cepas de *F. chaquense*, empleadas en este estudio, fueron capaces de producir ZEA con niveles máximos observados a 30 °C, a la máxima  $a_w$  analizada y al menor tiempo de incubación. En general, se observó que los niveles de ZEA producidos por la cepa RC-J283, fueron mayores en comparación con la cepa RC-J174, siendo importante destacar que esta última, fue seleccionada por ser una cepa no productora de ZEA en el ensayo de capacidad toxicogénica que se realizó en arroz (Capítulo IV). Kokkonen et al. (2010) determinaron que para cepas de *F. graminearum* y *F. culmorum*, la condición más favorable para la producción de ZEA fue 0,96 de  $a_w$  y a 25 °C. Otros estudios han propuesto  $a_w$  elevadas como condición óptima (0,98 o superiores) para la producción de ZEA por parte de estas dos especies de *Fusarium* (Greenhalgh et al., 1983; Velluti et al., 2000, 2001). Aunque, en el estudio de Jimenez et al. (1996), se informó una  $a_w$  un poco más baja (0,97) como la más favorable. Estudios llevados a cabo por numerosos investigadores confirmaron que un cambio de temperatura desde cálidas a condiciones más frías podría elevar la producción de esta micotoxina (Greenhalgh et al., 1983; Lori et al., 1990; Ryu y Bullerman, 1999; Velluti et al., 2000; Blaney y Dodman, 2002; Martins y Martins, 2002; Llorens et al., 2004a). Considerando los resultados obtenidos en el presente trabajo, pudimos demostrar que la máxima producción de ZEA por parte de las cepas de *F. chaquense*, ocurre a  $a_w$  más altas que las informadas para *F. graminearum* y *F. culmorum*, principales especies productoras de ZEA.

Con respecto a la producción de BEA, en el presente estudio se pudo observar que los niveles máximos, para ambas cepas, fueron obtenidos a la máxima  $a_w$  analizada (0,995) y a los 5 días de incubación, pero a diferentes temperaturas de incubación, 25 y 30 °C para la cepa RC-J174 y RC-J283, respectivamente. En general, se observó que los niveles máximos de BEA producidos por ambas cepas, fueron similares, si bien mostraron un comportamiento diferente. Kokkonen et al. (2010) determinaron en mezclas de cereales (trigo, avena y cebada) el efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción de BEA por parte de siete especies de *Fusarium* en tres combinaciones diferentes de  $a_w$  y temperatura, demostrando que la producción máxima de esta toxina por parte de *F. sporotrichioides* ocurre a una  $a_w$  de 0,96 y a 25 °C y que además, *F. poae* produce las mayores concentraciones bajo dos condiciones diferentes, 0,995/15 °C y 0,96/25 °C. En los

últimos años se ha dado una mayor importancia a la investigación de esta micotoxina, considerada emergente, en cereales debido a sus efectos tóxicos sobre las plantas y los animales (Jestoi, 2008).

De acuerdo a nuestros resultados, las condiciones climáticas que se presentan en los humedales de Chaco serían conductivas para el desarrollo de *F. chaquense* y la producción de micotoxinas. Además, esta especie parecería ser muy versátil, ya que puede crecer y producir micotoxinas en un amplio rango de  $a_w$  y temperaturas, tal lo planteado en nuestra hipótesis, lo que le daría una ventaja adaptativa sobre otras especies de *Fusarium* y esto explicaría su alta frecuencia de aislamiento en pastos naturales que crecen en esta región.

## **CAPÍTULO VI**

## CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

### VI.1. CONCLUSIONES

- ✓ Se detectó por primera vez en nuestro país una amplia gama de micotoxinas producidas por especies pertenecientes al género *Fusarium* en pastos naturales (Poaceae) destinados a la alimentación bovina. Algunos metabolitos presentes, como tricotecenos tipo A (T-2 y HT-2), la ZEA y sus derivados son motivo de preocupación para los rumiantes, ya que el riesgo depende directamente de su nivel en el alimento, la presencia simultánea y cantidad de otras micotoxinas, y de la edad y estado de salud del animal.
- ✓ Los niveles de ZEA y sus derivados ( $\alpha$  y  $\beta$  ZEA) encontrados en los pastos naturales analizados durante el presente estudio serían suficientes para que una vez consumidos por el ganado bovino puedan biotransformarse en el rumen e hígado y por lo tanto encontrarse en orina tanto zeranol ( $\alpha$ -ZAL), como ZEA y sus derivados.
- ✓ Estudios realizados en febrero y septiembre de 2014 indicarían que no hay una variación estacional en cuanto al tipo y concentración de las micotoxinas detectadas en pastos.
- ✓ La contaminación con micotoxinas de *Fusarium* en pastos naturales que son consumidos por ganado bovino parece no ser un fenómeno esporádico, sino que ocurre a lo largo del todo el año y en diferentes años como pudo observarse durante el presente estudio.
- ✓ Las muestras de pasto analizadas mostraron entre un 60 y 100% de contaminación con especies del género *Fusarium*. Las especies predominantes aisladas e identificadas, mediante marcadores morfológicos, en la mayoría de las muestras analizadas fueron: *F. acuminatum*/*F. armeniacum* y *F. semitectum*. También se encontraron otras especies en muy baja frecuencia como: *F. sporotrichoides*, *F. chlamydosporum*, *F. equiseti*, *F. proliferatum*, *F. solani* y *F. subglutinans*, entre otras.
- ✓ No se observó una variación estacional en cuanto a las especies de *Fusarium* presentes en los diferentes géneros de pastos analizados (todos pertenecientes a la familia Poaceae).
- ✓ Se encontró una diversidad relativamente baja (índices de Shannon y Simpson  $<1$ ) de especies de *Fusarium* presentes en los pastos analizados, esto podría deberse a la prevalencia (dominancia) de cepas de *F. acuminatum*/*F. armeniacum*.
- ✓ El perfil toxicogénico de 50 cepas clasificadas morfológicamente como *F. acuminatum*/*F. armeniacum* (especie aislada con mayor prevalencia), mostro que las mismas eran importantes productoras de tricotecenos tipo A (T-2, HT-2, NEO y DAS). Este hallazgo nos permitió decir que las cepas correspondían a la especie *F.*

*armeniicum*, especie morfológicamente indistinguible de *F. acuminatum*, pero con la diferencia, según revisión bibliográfica, de que la primera es productora de tricotecenos tipo A.

- ✓ La identificación molecular de un sub-set de 14 cepas de *F. armenicum*, mediante comparación de la secuencia parcial de EF-1 $\alpha$  reveló una alta homología con una cepa de referencia de *F. armenicum*. Sin embargo, todas nuestras cepas presentaban microconidios, carácter morfológico no descrito para esta especie.
- ✓ El análisis filogenético multilocus (EF-1 $\alpha$  y RPB2) de un importante número de cepas aisladas durante 2011 y 2014 e identificadas morfológicamente como *F. armenicum* reveló que estas cepas constituían un único clado monofilético robustamente soportado que no incluía ninguna de las especies de *Fusarium* descritas hasta el momento, y por lo tanto constituyen una nueva especie dentro de este importante género a la cual denominamos *F. chaquense*.
- ✓ *Fusarium chaquense* pertenece al FSAMSC, un linaje de *Fusarium* que poseen la habilidad de producir tricotecenos. Además, *F. chaquense* es filogenéticamente diferente de *F. armenicum*, pero ambas especies están estrechamente relacionadas.
- ✓ En base al perfil toxicogénico, podemos afirmar que esta nueva especie produce principalmente tricotecenos tipo A. También se detectaron algunas micotoxinas producidas por *Fusarium* consideradas emergentes como es BEA. Por último, un bajo porcentaje de cepas (solo el 16%) fueron capaces de producir ZEA en muy bajas concentraciones.
- ✓ Es importante recalcar que *F. chaquense* ha sido aislado de plantas asintomáticas a partir de un ecosistema natural con mínima actividad antropogénica, por lo tanto, sería una especie saprofita.
- ✓ Los estudios ecofisiológicos revelaron que *F. chaquense* sería una especie muy versátil ya que puede crecer y producir micotoxinas, de manera óptima y sub-óptima, en un amplio rango de  $a_w$  y temperaturas. Esta plasticidad le daría una ventaja adaptativa sobre otras especies de *Fusarium*, lo que explicaría su preponderancia en pastos naturales que crecen en los humedales de Chaco.
- ✓ Debido a que *F. chaquense* fue la especie más abundante encontrada en los pastos naturales analizados en ambos años, esta especie sería la responsable de la presencia natural de tricotecenos tipo A en los mismos y no así de la presencia de ZEA ya que de 70 cepas estudiadas solo el 16% fueron capaces de producir esta toxina y a muy bajas concentraciones
- ✓ Toda la información obtenida durante el presente estudio es relevante por la importancia de *F. chaquense* como fuente de contaminación con micotoxinas y por

los posibles efectos toxicológicos de las mismas en este sistema natural.

## VI.2. PERSPECTIVAS FUTURAS

- ✓ Secuenciar el genoma completo de dos cepas de *F. chaquense* con el fin de aportar importante información acerca de su potencial metabólico, realizar análisis comparativos con otras especies filogenéticamente relacionadas, etc.
- ✓ Estudiar en mayor profundidad, las dos especies de *Fusarium* encontradas en los pastos en alta frecuencia después de *F. chaquense* y que en la literatura son reconocidos como productores de ZEA, como son *F. semitectum* (*F. incarnatum*) y *F. equiseti*.
- ✓ Continuar la investigación en ambientes naturales, no agrícolas, enfocándonos en distintos tipos de pastizales (de altura, de llanura semiárida y llanura húmeda de origen chaco-pampeana), de manera tal de ampliar nuestros conocimientos acerca de la historia evolutiva, biogeográfica y taxonómica de *Fusarium* en nuestro país.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

- Alberto JA (2018) El Chaco oriental y sus fisonomías vegetales. *Geográfica Digital* 3: 1-14.
- Albonico M, Schutz LF, Caloni F, Cortinovis C, Spicer LJ (2016) Toxicological effects of fumonisin B<sub>1</sub> alone and in combination with other fusariotoxins on bovine granulosa cells. *Toxicon* 118: 47–53.
- Albonico M, Schutz LF, Caloni F, Cortinovis C, Spicer LJ (2017) *In vitro* effects of the *Fusarium* mycotoxins fumonisin B<sub>1</sub> and beauvericin on bovine granulosa cell proliferation and steroid production. *Toxicon* 128: 38–45.
- Altomare C, Petrini O, Logrieco A, Bottalico A (1997) Taxonomic relationships among the toxigenic species *Fusarium acuminatum*, *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium tricinctum* by isozyme analysis and RAPD assay. *Can J Bot* 75: 1674-1684.
- Alvarado PI (2011) Área de Alimentos y Alimentación. FCV, UNCPBA. <http://www.palva@vet.unicen.edu.ar>
- Ambrose BA, Lerner DR, Ciceri P, Padilla CM, Yanofsky MF, Schmidt RJ (2000) Molecular and genetic analyses of the *Silky1* gene reveal conservation in floral organ specification between eudicots and monocots. *Mol Cell* 5: 569-579.
- Aoki T, Vaughan MM, McCormick SP, Busman M, Ward TJ, Kelly A, O'Donnell K, Johnston PR, Geiser DM (2015) *Fusarium dactylidis* sp. nov., a novel nivalenol toxin-producing species sister to *F. pseudograminearum* isolated from orchard grass (*Dactylis glomerata*) in Oregon and New Zealand. *Mycologia* 107: 409-418.
- Aráoz LF (2004) Trazabilidad de la carne bovina en la Argentina. Proyecto FAO–Países del MERCOSUR ampliado, “Apoyo a la Integración del Sector Agropecuario del Cono Sur para Contribuir a las Políticas de Seguridad Alimentaria” (TCP/RLA/2910). [http://www.ipcva.com.ar/files/trazabilidad\\_ra.pdf](http://www.ipcva.com.ar/files/trazabilidad_ra.pdf).
- Arelovich HM, Bravo RD, Martínez MF (2011) Development, characteristics, and trends for beef cattle production in Argentina. *Animal frontiers* 1: 37-45.
- Auerbach H, Maas RFM, Op den Camp HJM, Pol A, Fink-Gremmels J (1998) Biodegradation of aflatoxin B<sub>1</sub> by bovine rumen microorganisms *in vitro* and its effects on rumen fermentation. *Rev Med Vet* 149: 149-173.
- Axford L, Simpson T, Willis C (2004) Synthesis and incorporation of the first polyketide synthase free intermediate in monocerin biosynthesis. *Angew Chem* 43: 727–730.
- Balajee S, Borman A, Brandt M, CANO J, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, Guarro J, Haase G, Kibbler C, Meyer W, O'Donnell K, Petti C, Rodriguez-Tudela J, Sutton D, Velegraki A, Wickes B (2009) Sequence-based Identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Mucorales* species in the clinical mycology laboratory: Where are we and where should we go from here?. *J Clin Microbiol* 47:877–884.
- Barbetti MJ (1985) Survey of fungi associated with subterranean clover leaves and petioles in Western Australia. *Plant Pathol* 34: 49–53.

- Barbetti MJ (1986) Effect of season, trash and fungicides on fungi associated with subterranean clover. *Aust J Exp Agric* 26: 431–435.
- Barbetti MJ (1990) Fungi associated with seed of subterranean clover (*Trifolium subterraneum*) in Western Australia. *Seed Sci Technol* 18: 673–679.
- Barbetti MJ, Allen JG (2005) Association of *Fusarium* species, with potential for mycotoxicosis, on pods of annual Medicago in Western Australia. *Aust J Agric Res* 56: 279–284.
- Bavera G, Boco O, Beguet H, Petryna A (2002) Promotores de crecimiento y modificadores del metabolismo. Cursos de Producción Bovina de Carne, FAV UNRC <http://www.producción-animal.com.ar>.
- Beguet H (2002) Manejo de pastizales naturales serranos. Cursos de Producción Bovina de Carne, FAV UNRC <http://www.produccion-animal.com.ar>.
- Bennett JW, Klich M (2003) Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* 16: 497-516.
- Benyon F, Burgess L, Sharp P (2000) Molecular genetic investigations and reclassification of *Fusarium* species in sections *Fusarium* and *Roseum*. *Mycol Res* 104:1164–1174.
- Benyon FHL, Burgess LW (1997) Characterization of *Fusarium avenaceum* subspecies *avenaceum*, *nurragi*, and *aywerte*. *Cereal Res Commun* 25: 579-580.
- Berek L, Petri IB, Mesterházy A, Téren J, Molnár J (2001) Effects of mycotoxins on human immune functions *in vitro*. *Toxicol In Vitro* 15: 25-30.
- Bertero A, Moretti A, Spicer L, Caloni F (2018) *Fusarium* molds and mycotoxins: potential species-specific effects. *Toxins* 10: 244.
- Berthiller F, Crews C, Dall'Asta C, de Saeger S, Haesaert G, Karlovsky P, Oswald IP, Seefelder W, Speijers G, Stroka J (2013) Masked mycotoxins: A review. *Mol Nutr Food Res* 57: 165–186.
- 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. *J Agric Food Chem* 53: 3421–3425.
- Berthiller F, Werner U, Sulyok M, Krska R, Hauser MT, Schuhmacher R (2006) Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) determination of phase II metabolites of the mycotoxin zearalenone in the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Food Addit Contam* 23:1194–1200.
- Betina V (1989) Structure-activity relationships among mycotoxins. *Chem-Biol Interact* 71: 105–146.
- Blackwell M (2011) The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Am J Bot* 98: 926–938.
- Blaney BJ, Dodman RL (2002) Production of zearalenone, deoxynivalenol, nivalenol, and acetylated derivatives by Australian isolates of *Fusarium graminearum* and *F. pseudograminearum* in relation to source and culturing conditions. *Aust J Agric Res* 53: 1317–1326.

- Böhm J, Razzazi-Fazeli E (2005) Effects of mycotoxins on domestic pet species. En: The Mycotoxin Blue Book. Diaz D (Ed) Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp 77–91.
- Bommert P, Satoh-Nagasawa N, Jackson D, Hirano HY (2005) Genetics and evolution of inflorescence and flower development in grasses. *Plant Cell Physiol* 46: 69-78.
- Bosch U, Mirocha CJ, Abbas HK, Di Menna M (1989) Toxicity and toxin production by *Fusarium* isolates from New Zealand. *Mycopathologia* 108: 73–79.
- Bottalico A, Perrone G (2002) Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *Eur J Plant Pathol* 108: 611-624.
- Bourne H, Sanders D, McCormick F (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349: 117-27.
- Bräse S, Encinas A, Keck J, Nising CF (2009) Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. *Chem Rev* 109: 3903-3990.
- Broomhead JN, Ledoux DR, Bermudez AJ, Rottinghaus GE (2002) Chronic effects of fumonisin B<sub>1</sub> in broilers and turkeys fed dietary treatments to market age. *Poult Sci* 81: 56–61.
- Burgess L (2014) 2011 McAlpine Memorial Lecture – A love affair with *Fusarium*. *Australas Plant Pathol* 43:359–368.
- Burgess LW, Bryden WL (2012) *Fusarium*: a ubiquitous fungus of global significance. *Microbiol Aust* 33: 22-25.
- Burgess LW, Forbes GA, Windels C, Nelson PE, Marasas WFO, Gott KP (1993) Characterization and distribution of *Fusarium acuminatum* subsp. *armeniicum* subsp. nov. *Mycologia* 85: 119-124.
- Burgess LW, Nelson PE, Toussoun T A, Forbes GA (1988) Distribution of *Fusarium* species in sections *Roseum*, *Arthrosporiella*, *Gibbosum* and *Discolor* recovered from grassland, pasture and pine nursery soils of eastern Australia. *Mycologia* 80: 815–824.
- Burgess LW, Summerell BA (2000) Taxonomy of *Fusarium*: *Fusarium acuminatum* stat. & comb. nov. *Mycotaxon* 75: 347-348.
- Burgess LW, Summerell BA, Backhouse D, Benyon F, Levic J (1996) Biodiversity and population studies in *Fusarium*. *Sydowia* 48:1-11.
- Caloni F, Spotti M, Auerbach H, Op den Camp H, Gremmels JF, Pompa G (2000) *In vitro* metabolism of fumonisin B<sub>1</sub> by ruminal microflora. *Vet Res Commun* 24: 379–387.
- Castresana J (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* 17: 540–552.
- Cendoya E, Pinson-Gadais L, Farnochi M, Ramirez M, Chéreau S, Marcheguy 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. *Int J Food Microbiol* 253: 12-19.
- Chang DC, Grant GB, O'Donnell K, Wannemuehler KA, Noble-Wang J, Rao CY, Jacobson LM, Crowell CS, Sneed RS, Lewis FM, Schaffzin JK, Kainer MA, Genese CA, Alfonso EC,

- Jones DB, Srinivasan A, Fridkin SK, Park BJ (2006) Multistate outbreak of *Fusarium* keratitis associated with use of a contact lens solution. *J Am Med Assoc* 296: 953-963.
- Changwa R, Abia W, Msagati T, Nyoni H, Ndleve K, Njobeh P (2018) Multi-mycotoxin occurrence in dairy cattle feeds from the Gauteng province of South Africa: A pilot study using UHPLC-QTOF-MS/MS. *Toxins* 10: 294.
- Coté LM, Nicoletti J, Swanson SP, Buck WB (1986) Production of deepoxydeoxynivalenol (DOM-1), a metabolite of deoxynivalenol, by *in vitro* rumen incubation. *J Agric Food Chem* 34: 458-460.
- Council for Agricultural Science and Technology (CAST) (2003) Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems, Task Force Report N°139, Ames, Iowa, USA.
- Creppy EE (2002) Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol Lett* 127: 19-28.
- Dall'Asta C, Falavigna C, Galaverna G, Battilani P (2012) Role of maize hybrids and their chemical composition in *Fusarium* infection and fumonisin production. *J Agric Food Chem* 60: 3800–3808.
- Dallyn H, Fox A (1980) Spoilage of material of reduced water activity by xerophilic fungi. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 15: 129-139.
- Davicino RA (2012) Residuos de medicamentos veterinarios y anabólicos en carnes: enfoque técnico-legal en Argentina y el Mercosur. [http:// www.comersinriesgos.com](http://www.comersinriesgos.com).
- Denli M, Blandon JC, Salado S, Guynot ME, Pérez JF (2017) Effect of dietary zearalenone on the performance, reproduction tract and serum biochemistry in young rats. *J Appl Anim Res* 45: 619–622.
- Desjardins A (2006) *Fusarium* Mycotoxins: Chemistry, Genetics and Biology, APS Press, St. Paul, MN, pp 79-108.
- Desjardins AE, Proctor RH (2007) Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *Int J Food Microbiol* 119: 47-50.
- Di Rienzo J, Casanoves F, Balzarina M, Gonzalez L, Tablada M, Robledo C. (2018) Infostat versión 2018. Centro de Transferencia Infostat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. <http://www.Infostat.com.ar>.
- Döll S, Dänicke S (2011) The *Fusarium* toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding. *Prev Vet Med* 102: 132–145.
- Doohan FM, Brennan J, Cooke BM (2003) Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *Eur J Plant Pathol* 109: 755-768.
- Driehuis F, Spanjer MC, Scholten J, Te Giffel M (2008) Occurrence of mycotoxins in maize, grass and wheat silage for dairy cattle in the Netherlands. *Food Addit Contam Part B* 1: 41–50.
- Dunière L, Sindou J, Chaucheyras-Durand F, Chevallier I, Thévenot-Sergentet D (2013) Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. *Anim Feed Sci Technol* 182: 1–15.

- Eckard S, Wettstein FE, Forrer HRY, Vogelsang S (2011) Incidence of *Fusarium* species and mycotoxins in silage maize. *Toxins* 3: 949–967.
- EFSA (2005) European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from the Commission related to fumonisins as undesirable substances in animal feed. *EFSA J* 235:1–32.
- EFSA (2011a) European Food Safety Authority. Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed. *EFSA J* 9: 1–187.
- EFSA (2011b) European Food Safety Authority. Scientific opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. *EFSA J* 9: 1–124.
- EFSA (2014) European Food Safety Authority. Scientific opinion on the risks to human and animal health related to the presence of beauvericin and enniatins in food and feed. *EFSA J* 12: 3802.
- Ellis ML, Díaz Arias MM, Leandro LF, Munkvold GP (2012) First report of *Fusarium armeniacum* causing seed rot and root rot on soybean (*Glycine max*) in the United States. *Plant Dis* 96:1693.
- Elmer WH, Marra RE, Bo Li HL (2016) Incidence of *Fusarium spp.* on the invasive *Spartina alterniflora* on Chongming Island, Shanghai, China. *Biol Invasions* 18:2221-2227.
- Erasmuson AF, Scahill BG, West DM (1994) Natural zearanol ( $\alpha$ -zearalanol) in the urine of pasture-fed animals. *J Agric Food Chem* 42: 2721-2725.
- Eriksen GS, Pettersson H (2004) Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Anim Feed Sci Technol* 114:205–239.
- 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.
- Fekete C, Logrieco A, Giczey G, Hornok L (1997) Screening of fungi for the presence of the trichodiene synthase encoding sequence by hybridization to the Tri5 gene cloned from *Fusarium poae*. *Mycopathologia* 138: 91–97.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Fink-Gremmels J (2008a) Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. *Food Addit Contamin* 25: 172-180.
- Fink-Gremmels J (2008b) The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. *Vet J* 176: 84–92.
- Flaherty JE, Pirttilä AM, Bluhm BH, Woloshuck CP (2003) PAC1, a pH- regulatory gene from *Fusarium verticillioides*. *Appl Environ Microbiol* 69: 5222-5227.
- Flannery BM, Clark ES, Pestka JJ (2012) Anorexia induction by the trichothecene deoxynivalenol (vomitin) is mediated by the release of the gut satiety hormone peptide YY. *Toxicol Sci* 130:289–297
- Flores-Flores ME, Lizarraga E, de Cerain AL, Gonzalez-Penas E (2015) Presence of mycotoxins in animal milk: A review. *Food Control* 53:163-176.

- Floyd R, Abebe E, Papert A, Blaxter M (2002) Molecular barcodes for soil nematode identification. *Mol Ecol* 11: 839-50.
- Foroud NA, Eudes F (2009) Trichothecenes in cereals grains. *Int J Mol Sci* 10: 147-173.
- Fotso J, Leslie JF, Smith JC (2002) Production of beauvericin, moniliformin, fusaproliferin, and fumonisins (B)<sub>1</sub>, (B)<sub>2</sub>, and (B)<sub>3</sub> by fifteen ex-type strains of *Fusarium* species. *Appl Environ Microbiol* 68: 5195- 5197.
- Fox EM, Howlett BJ (2008) Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Curr Opin Microbiol* 11: 481-487.
- Gajecki M, Gajecka M, Jakimiuk E, Zielonk L, Obremski K (2010) Zearalenone: Undesirable substance. En: *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons*. Rai M, Varma A (Eds) Springer-Verlag, Berlin, pp 131-144.
- García SC, Santini FJ (1996) Excesos de forraje en primavera. *Revista Campo y Tecnología INTA* 29: 51-53.
- Geiser D, Aoki T, Bacon C, Baker S, Bhattacharyya M, Brandt M, Brown D, Burgess L, Chulze S, Coleman J, Correll J, Covert S, Crous P, Cuomo C, De Hoog G, Di Pietro A, Elmer W, Epstein L, Frandsen R, Freeman S, Gagkaeva T, Glenn A, Gordon T, Gregory N, Hammond-Kosack K, Hanson L, del Mar Jiménez-Gasco M, Kang S, Kistler H, Kuldau G, Leslie J, Logrieco A, Lu G, Lysøe E, Ma L, McCormick S, Migheli Q, Moretti A, Munaut F, O'Donnell K, Pfenning L, Ploetz R, Proctor R, Rehner S, Robert V, Rooney A, Bin Salleh B, Scandiani M, Scauflaire J, Short D, Steenkamp E, Suga H, Summerell B, Sutton D, Thrane U, Trail F, Van Diepeningen A, VanEtten H, Viljoen A, Waalwijk C, Ward T, Wingfield M, Xu J, Yang X, Yli-Mattila T, Zhang N (2013) One fungus, one name: defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. *Phytopathology* 103: 400–408.
- Geiser DM, Jiménez-Gasco MM, Kang S, Makalowska I, Veeraraghavan N, Ward TJ, Zhang N, Kuldau GA, O'Donnell K (2004) FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Eur J Plant Pathol* 110: 473-479.
- Gelderblom WC, Kriek NP, Marasas WF, Thiel PG (1991) Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B<sub>1</sub>, in rats. *Carcinogenesis* 12: 1247–1251.
- Gerez JR, Pinto P, Callu P (2015) Deoxynivalenol alone or in combination with nivalenol and zearalenone induce systemic histological changes in pigs. *Exp Toxicol Pathol* 67:89–98
- Gilchrist L, Fuentes G, Martínez C, López R, Duveiller E, Singh R, Henr M, García, A (2005) Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. 2 ed. México, D.F. CIMMYT, pp 68.
- Glenn A (2007) Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. *Anim Feed Sci Technol* 137: 213-240.
- Goloboff PA, Farris JS, Nixon KC (2008) TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24: 774–786.

- Gómez PO, Peretti MA, Pizarro JB, Cascardo AR (1991) Delimitación y caracterización de la región. En: El desarrollo agropecuario pampeano. Barsky O (Ed) Grupo Editor Latinoamericano, Buenos Aires, pp 77-94.
- Gove JH, Patil GP, Swindel BF, Taillie C (1994) Ecological diversity and forest management. En: Handbook of Statistics. Environmental Statistics. Patil GP, Rao CR, Ross NP (Eds.) North Holland/Elsevier Science Publishers, Nueva York, pp 409-462.
- Gräfenhan T, Schroers H, Nirenberg H, Seifert K (2011) An overview of the taxonomy, phylogeny and typification of some nectriaceous fungi classified in *Cosmospora*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Stilbella* and *Volutella*. *Stud Mycol* 68:79-113.
- Grass Phylogeny Working Group (GPWG) (2001) Phylogeny and subfamilial classification of the grasses (Poaceae). *Ann Mo Bot Gard* 88: 373-457.
- Greenhalgh R, Neish GA, Miller JD (1983) Deoxynivalenol, acetyldeoxynivalenol, and zearalenone formation by Canadian Isolates of *Fusarium graminearum* on solid substrates. *Appl Environ Microbiol* 46: 625–629.
- Hadley G, Wolf C, Harsh S (2006) Dairy cattle culling patterns, explanations, and implications. *J Dairy Sci* 89: 2286–2296.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95-98.
- Hammer O, Harpe DAT, Ryan PD (2001) PAST Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electronica* 4: 9.
- Hansen K, Lobuglio K, Pfister D (2005) Evolutionary relationships of the cup-fungus genus *Peziza* and Pezizaceae inferred from multiple nuclear genes: RPB2,  $\beta$ -tubulin, and LSU rDNA. *Mol Phylogenet Evol* 36:1-23.
- Hawksworth DL (2001) The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol Res* 105: 1422–1432.
- Hibbett D, Ohman A, Glotzer D, Nuhn M, Kirk P, Nilsson H (2011) Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal Biol Rev* 25: 38-47.
- Hillis D, Bull J (1993) An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst Biol* 42: 182-192.
- Hillis D, Moritz C, Mable B (1996) Molecular Systematics. 2nd Edition. Editorial Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts U.S.A., pp 655.
- Holda K, Glogowski R (2014) A survey of deoxynivalenol and zearalenone content in commercial dry foods for growing dogs. *Anim Sci* 53: 11–117.
- Holmquist GU, Walter HW, Stahr HM (1983) Influence of temperature, pH, water activity and antifungal agents on growth of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *J Food Sci* 48: 778-782.
- Hornbogen T, Glinski M, Zocher R (2002) Biosynthesis of depsipeptide mycotoxins in *Fusarium*. *Eur J Plant Pathol* 108: 713-718.

- Hove M, Van Poucke C, Njumbe-Ediagea E, Nyanga LK, De Saeger S (2016) Review on the natural co-occurrence of AFB<sub>1</sub> and FB<sub>1</sub> in maize and the combined toxicity of AFB<sub>1</sub> and FB<sub>1</sub>. *Food Control* 59:675–682.
- Howard PC, Warbritton A, Voss KA, Lorentzen RJ, Thurman JD, Kovach RM, Bucci TJ (2001) Compensatory regeneration as a mechanism for renal tubule carcinogenesis of fumonisin B<sub>1</sub> in F344/N/NctrBR rats. *Environ Health Perspect* 109: 309–314.
- Hsu IC, Smalley EB, Strong FM, Ribelin WE (1972) Identification of T-2 toxin in moldy corn associated with a lethal toxicosis in dairy cattle. *Appl Microbiol* 24: 684–690.
- Huertos Hidalgo O (2004) Estudio comparativo y evaluación de diferentes técnicas cromatográficas en el análisis de residuos de corticosteroides en muestras biológicas, Madrid. <https://eprints.ucm.es/5333/1/T27449.pdf>. ISBN: 84-669-2682-8
- Humpf HU, Voss KA (2004) Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins. *Mol Nutr Food Res* 48: 255–269.
- Hussein HS, Brasel JM (2001) Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167: 101-134.
- Huszenicza G, Fekete S, Szigeti G, Kulcsár M, Fébel H, Kellems RO, Nagy P, Cseh S, Veresegyházy T, Hullár I (2000) Ovarian consequences of low dose peroral *Fusarium* (T-2) toxin in a ewe and heifer model. *Theriogenology* 53: 1631–1639.
- IARC (2002) International Agency for Research on Cancer. Fumonisin B<sub>1</sub>. 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.
- ICNafp (2018) Código Internacional de Nomenclatura para algas, hongos y plantas. Fundación Herbario Greuter, Berlín, Alemania, pp 169-190.
- Infocampo (2018):<https://www.infocampo.com.ar/aumentaron-mas-del-76-las-exportaciones-de-carne-vacuna-segun-agroindustria/>. Acceso enero de 2019
- Instituto de Promoción de la Carne Vacuna Argentina (IPCVA) (2018) Informe de mercados internacionales de carne bovina. [http://www.ipcva.com.ar/documentos/1959\\_1545333\\_603\\_informemensualdeexportacionesnoviembre2018.pdf](http://www.ipcva.com.ar/documentos/1959_1545333_603_informemensualdeexportacionesnoviembre2018.pdf). Acceso diciembre de 2018.
- Jestoi M (2008) Emerging *Fusarium*-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 48: 21–49.
- Jestoi MN, Paavanen-Huhtala S, Parikka P, Yli-Mattila T (2008) *In vitro* and *in vivo* mycotoxin production of *Fusarium* species isolated from Finnish grains. *Arch Phytopathol Plant Protect* 41: 545–558.
- Jimenez M, Mañez M, Hernandez E (1996) Influence of water activity and temperature on the production of zearalenone in corn by three *Fusarium* species. *Int J Food Microbiol* 29: 417–421.
- Jonsson M, Atosuo J, Jestoi M, Nathanail AV, Kokkonen UM, Anttila M, Koivisto P, Lilius EM, Peltonen K (2015) Repeated dose 28-day oral toxicity study of moniliformin in rats. *Toxicol Lett* 233: 38-44.

- Kallela K, Ettala E (1984) The oestrogenic *Fusarium* toxin (zearalenone) in hay as a cause of early abortions in the cow. *Nord Vet Med* 36: 305–309.
- 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. *Eur J Plant Pathol* 108: 653-660.
- Karim NF, Mohd M, Nor NM, Zakaria L (2016) Saprophytic and potentially pathogenic *Fusarium* species from peat soil in Perak and Pahang. *Trop Life Sci Res* 27:1–20.
- Kasson M, O'Donnell K, Rooney A, Sink S, Ploetz R, Ploetz J, Konkol J, Carrillo D, Freeman S, Mendel Z, Smith J, Black A, Hulcr J, Bateman C, Stefkova K, Campbell P, Geering A, Dann E, Eskalen A, Mohotti K, Short D, Aoki T, Fenstermacher K, Davis D, Geiser D (2013) An inordinate fondness for *Fusarium*: Phylogenetic diversity of fusaria cultivated by ambrosia beetles in the genus *Euwallacea* on avocado and other plant hosts. *Fungal Genet Biol* 56:147-57.
- Katoh K, Rozewicki J, Yamada K (2017) MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinform.* [https://doi: 10.1093/bib/bbx108](https://doi.org/10.1093/bib/bbx108)
- Keller NP, Turner G, Bennett JW (2005) Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol* 3: 937–947.
- Kennedy DG, Hewitt SA, McEvoy JD, Currie JW, Cannavan A, Blanchflower WJ, Elliot CT (1998) Zeranone is formed from *Fusarium* spp. toxins in cattle *in vivo*. *Food Addit Contam* 15: 393-400.
- Kinzy T, Ripmaster T, Woolford J (1994) Multiple genes encode the translation elongation factor EF-1 gamma in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 22: 2703-7.
- Kleinova M, Zöllner P, Kahlbacher H, Hochsteiner W, Lindner W (2002) Metabolic profiles of the mycotoxin zearalenone and of the growth promoter zeranone in urine, liver, and muscle of heifers. *J Agric Food Chem* 50: 4769–4776.
- Kokkonen M, Jestoi M, Laitila A (2012) Mycotoxin production of *Fusarium langsethiae* and *Fusarium sporotrichioides* on cereal-based substrates. *Mycotoxin Res* 28: 25–35.
- Kokkonen M, Ojala L, Parikka P, Jestoi M (2010) Mycotoxin production of selected *Fusarium* species at different culture conditions. *Int J Food Microbiol* 143: 17–25.
- Kommedahl T, Windels CE, Stucker RE (1979) Occurrence of *Fusarium* species in roots and stalks of symptomless corn plants during the growing season. *Phytopathology* 69: 961-966.
- Krebs CJ (1989) Species diversity measures. En: Ecological Methodology. Krebs CJ (ed.), Harper Collins, New York, NY pp 328–370.
- Kriek NP, Kellerman TS, Marasas WF (1981) A comparative study of the toxicity of *Fusarium verticillodes* (*F. moniliforme*) to horses, primates, pigs, sheep and rats. *Onderstepoort J Vet Res* 48: 129–131.

- Krska R, Schuhmacher R, Grasserbauer M, Lemmens M, Lemmens-Gruber R, Adler A, Lew H (1997) Effects of beauvericin to mammalian tissue and its production by Austrian isolates of *Fusarium proliferatum* and *Fusarium subglutinans*. *Mycotoxin Res* 13: 11–16.
- Kvas M, Marasas WF, Wingfield BD, Wingfield MJ, Steenkamp ET (2009) Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. *Fungal Divers* 34:1-21.
- Lacey J (1989) Prevention of mold growth and mycotoxin production through control environmental factors. En: *Mycotoxins and Phytotoxins*. Natori S, Hashimoto K Ueno Y (Eds.) Elsevier, Amsterdam, pp 161-168.
- Lamprecht SC, Knox-Davies PS, Marasas WFO (1988) Fungi associated with root rot of annual *Medicago* spp. in South Africa. *Phytophylactica* 20: 281–286.
- Lamprecht SC, Marasas WFO, Knox-Davies PS, Calitz FJ (1990) Cross-pathogenicity of *Fusarium avenaceum* and *Fusarium graminearum* Gr. 1 to *Medicago truncatula* and wheat. *Phytophylactica* 22: 209–211.
- Lamprecht SC, Marasas WFO, Thiel PG, Schneider DJ, Knox-Davies PS (1986) Incidence and toxigenicity of seedborne *Fusarium* species from annual *Medicago* species in South Africa. *Phytopathology* 76: 1040–1042.
- Langseth W, Bernhoft A, Rundberget T, Kosiak B, Gareis M (1998) Mycotoxin production and cytotoxicity of *Fusarium* strains isolated from Norwegian cereals. *Mycopathologia* 144: 103–113.
- Larrea F, Chirinos M (2007) Impact on human health of hormonal additives used in animal production. *Rev Invest Clin* 59: 206-211.
- Lattanzio V, Solfrizzo M, Visconti A (2009) Enzymatic hydrolysis of T-2 toxin for the quantitative determination of total T-2 and HT-2 toxins in cereals. *Anal Bioanal Chem* 395: 1325 – 1334.
- Launay FM, Ribeiro L, Alves P, Vozikis V, Tsitsamis S, Alfredsson G, Sterk SS, Blokland M, Litia A, Lövgren T, Tuomola M, Kennedy G, Kennedy DG (2004) Prevalence of zeranol, taleranol and *Fusarium* spp. toxins in urine: implications for the control of zeranol abuse in the European Union. *Food Addit Contam* 21: 833-839.
- Lauren DR, Di Menna ME, Greenhalgh R, Miller JD, Neish GA, Burgess L W (1988) Toxin-producing potential of some *Fusarium* species from a New Zealand pasture. *New Zeal J Agr Res* 31: 219–225.
- Lauren DR, Sayer ST, Di Menna ME (1992) Trichothecene production by *Fusarium* species isolated from grain and pasture throughout New Zealand. *Mycopathologia* 120: 167–176.
- Laurence MH, Burgess LW, Summerell BA, Liew EC (2012) High levels of diversity in *Fusarium oxysporum* from non-cultivated ecosystems in Australia. *Fungal Biology* 116: 289-297.
- Laurence MH, Summerell BA, Burgess LW, Liew ECY (2011) *Fusarium burgessii* sp. nov. representing a novel lineage in the genus *Fusarium*. *Fungal Divers* 49:101–112.
- Laurence MH, Walsh JL, Robinson DM, Johansen RM, Petrovic T, Vu TT, Buegess LW, Summerell BA (2015) Six novel species of *Fusarium* from natural ecosystems in Australia. *Fungal Divers* 77: 349-366.

- 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 JL (Ed.) Lavoisier Publishing, New York, pp 347-366.
- Leslie JF (1991) Mating populations in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*) *Phytopathology* 81: 1058–1060.
- Leslie JF, Summerell BA (2006) The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Professional, Ames, Iowa, USA.
- Leslie JF, Summerell BA (2011) In search of New *Fusarium* species. *Plant Breed Seed Sci* 63: 93-101.
- Leslie JF, Zeller KA, Lamprecht SC, Rheeder JP, Marasas WF (2005) Toxicity, pathogenicity and genetic differentiation of five species of *Fusarium* from sorghum and millet. *Phytopathology* 95: 275-283.
- Leslie JF, Zeller KA, Logrieco A, Mulè G, Moretti A, Ritieni A (2004) Species diversity of and toxin production by *Gibberella fujikuroi* species complex strains isolated from native prairie grasses in Kansas. *Appl Environ Microbiol* 70:2254–2262.
- Liu Y, Hall B (2004) Body plan evolution of ascomycetes, as inferred from an RNA polymerase II phylogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4507-4512.
- Liu Y, Whelen S, Hall B (1999) Phylogenetic relationships among ascomycetes: Evidence from an RNA polymerase II subunit. *Mol Biol Evol* 16: 1799-1808.
- Llorens A, Mateo R, Hinojo MJ, Logrieco A, Jimenez M (2004a) Influence of the interactions among ecological variables in the characterization of zearalenone producing isolates of *Fusarium* spp. *Syst Appl Microbiol* 27: 253–260.
- Llorens A, Mateo R, Hinojo MJ, Valle-Algarra FM, Jiménez M (2004b) Influence of environmental factors on the biosynthesis of type B trichothecenes by isolates of *Fusarium* spp. from Spanish crops. *Int J Food Microbiol* 94: 43-54.
- Logrieco A, Altomare C, Moretti A, Bottalico A (1992) Cultural and toxigenic variability in *Fusarium acuminatum*. *Mycol Res* 96: 518-523.
- Logrieco A, Bottalico A, Mulè G (2003) Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *Eur J Plant Pathol* 109: 645-667.
- Logrieco A, Mulè G, Moretti A, Bottalico A (2002) Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *Eur J Plant Pathol* 108: 597-609.
- Lori GA, Henning CP, Violante A, Alippi HE, Varsavsky E (1990) Relation between the production of deoxynivalenol and zearalenone and the mycelial growth of *Fusarium graminearum* on solid natural substrates. *Microbiología* 6:76–82.
- Ludwig JA, Reynolds JF (1988) *Statistical Ecology: A Primer On Methods And Computing*. John Wiley and Sons, Nueva York, pp 223-256.
- Macchia L, Di Paola R, Fornelli F, Nena S, Moretti A, Napolitan R, Logrieco A, Caiaffa, MF, Tursi A, Bottalico A (1995). Cytotoxicity of beauvericin to mammalian cells. En: Book of Abstracts of International Seminar on *Fusarium*: Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity, Martina Franca, Italy, pp 72-73.

- Magan N, Aldred D (2007a) Why do fungi produce mycotoxin?. En: Food Mycology. A multifaceted approach to Fungi and Food. Dijksterhuis J, Samson R (Eds) CRC Press, London, pp 121-133.
- Magan N, Aldred D (2007b) Environmental fluxes and fungal interactions: Maintaining a competitive edge. En: Stress in yeast and filamentous fungi. Van West P, Avery S 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. *Trans Br Mycol Soc* 82: 71-81.
- Magan N, Lacey J (1984b) Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. *Trans Br Mycol Soc* 82: 83-93.
- Malachova A, Sulyok M, Beltrán E, Berthiller F, Krska R (2014) Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography-Tandem mass spectrometric method covering bacterial and fungal metabolites including all relevant mycotoxins in four model food matrices. *J Chromatogr A* 1362: 145–156.
- Malekinejad H, Schoevers EJ, Daemen IJ, Zijstra C, Colenbrander B, Fink-Gremmels, J, Roelen BA (2007) Exposure of oocytes to the *Fusarium* toxins zearalenone and deoxynivalenol causes aneuploidy and abnormal embryo development in pigs. *Biol Reprod* 77: 840–847.
- Marasas WF, Riley RT, Hendricks KA, Stevens VL, Sadler TW, Gelineau-Van Waes JG, Missmer SA, Cabrera J, Torres O, Gelderblom WCA, Allegood J, Martínez C, Maddox J, Miller JD, Starr L, Sullards MC, Roman AV, Voss KA, Wang E, Merrill Jr AH (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.
- Marasas WFO, Burgess LW, Anelich RY, Lamprecht SC, van Schalkwyk J (1988) Survey of *Fusarium* species associated with plant debris in South African soils. *S Afr J Bot* 54: 63-71.
- Marasas WFO, Rabie CJ, Lubben A, Nelson PE, Toussoun TA, Van Wyk, PS (1987) *Fusarium napiforme*, a new species from millet and sorghum in southern Africa. *Mycologia* 79: 910-914.
- Marín S, Magan N, Ramos AJ, Sanchis V (2004) Fumonisin-producing strains of *Fusarium*: A review of their ecophysiology. *J Food Prot* 67: 1792-1805.
- Marín S, Sanchis V, Ramos A (2011) Factores ecofisiológicos que condicionan el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas. En: Las Micotoxinas y su Efecto en la Salud Animal y Humana. Ramos A (Ed) Madrid Vicente Ediciones, España, pp 73-93.
- Marín S, Sanchis V, Ramos AJ, 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. *Mycol Res* 102: 831-837.

- Marmer WM, Maxwell RJ, Williams JE (1984) Effects of dietary regimen and tissue site on bovine fatty acid profiles. *J Anim Sci* 59: 109-121.
- Marroquín-Cardona A, Johnson N, Phillips T, Hayes A (2014) Mycotoxins in a changing global environment – A review. *Food Chem Toxicol* 69: 220-230.
- Martins ML, Martins HM (2002) Influence of water activity, temperature and incubation time on the simultaneous production of deoxynivalenol and zearalenone in corn (*Zea mays*) by *Fusarium graminearum*. *Food Chem* 79: 315–318
- Mateo JJ, Mateo R, Jime M (2002) Accumulation of type A trichothecenes in maize, wheat and rice by *Fusarium sporotrichioides* isolates under diverse culture conditions. *Int J Food Microbiol* 72: 115–123.
- Mateo R, Medina A, Gimeno-Adelantado JV, 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, Visconti A (Eds) Kluwer Academic Publishers, the Netherlands, pp 219-235.
- McCormick SP, Stanley AM, Stover NA, Alexander NJ (2011) Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. *Toxins* 3: 802-814.
- Medina A, Magan N (2010) Comparisons of water activity and temperature impacts on growth of *Fusarium langsethiae* strains from northern Europe on oat-based media. *Int J Food Microbiol* 142: 365–369.
- Medina A, Magan N (2011) Temperature and water activity effects on production of T-2 and HT-2 by *Fusarium langsethiae* strains from north European countries. *Food Microbiol* 28: 392–398.
- Miles CO, Erasmuson AF, Wilkins AL, Towers NR, Smith BL, Garthwaite I, Scahill BG, Hansen RP (1996) Ovine metabolism of zearalenone to  $\alpha$ -zearalanol (zeranol). *J Agric Food Chem* 44: 3244–3250.
- Minervini F, Dell'Aquila ME (2008) Zearalenone and reproductive function in farm animals. *Int J Mol Sci* 9: 2570–2584.
- Minervini F, Dell'Aquila ME, Maritato F, Minoia P, Visconti A (2001) Toxic effects of the mycotoxin zearalenone and its derivatives on in vitro maturation of bovine oocytes and 17 beta-estradiol levels in mural granulosa cell cultures. *Toxicol In Vitro* 15: 489–495.
- Mogensen JM, Sørensen SM, Sulyok M, van der Westhuizen L, Shephard GS, Frisvad JC, Thrane U, Krska R, Nielsen KF (2011) Single kernel analysis of fumonisins and other fungal metabolites in maize from South African subsistence farmers. *Food Addit Contam Part A* 28: 1724–1734.
- Molina A, Rúgolo de Agrasar Z (2006) Flora chaqueña Argentina (Formosa, Chaco y Santiago del Estero), Familia Gramineas. INTA, Buenos Aires, pp 1-848.
- Moss MO, Thrane U (2004) *Fusarium* taxonomy with relation to trichothecene formation. *Toxicol Lett* 1: 23-28.
- Mostrom M, Jacobsen B (2011) Ruminant mycotoxicosis. *Vet Clin Food Anim Pract* 27: 315–344.

- Moussa T, Al-Zahrani H, Kadasa N, Ahmed S, de Hoog S, Al-Hatmi A (2017) Two new species of the *Fusarium fujikuroi* species complex isolated from the natural environment. *Antonie van Leeuwenhoek* 110:819–832.
- Munkvold GP (2017) *Fusarium* species and their associated mycotoxins. En: Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. Moretti A, Susca A (Eds) Humana Press, New York, NY, pp 51-106.
- Myburg RB, Dutton MF, Chuturgoon AA (2002) Cytotoxicity of fumonisin B<sub>1</sub>, diethylnitrosamine, and catechol on the SNO esophageal cancer cell line. *Environ Health Perspect* 110: 813–815.
- Nagl V, Woechtl B, Schwartz-Zimmermann HE, Hennig-Pauka I, Moll WD, Adam G, Berthiller F (2014) Metabolism of the masked mycotoxin deoxynivalenol-3-glucoside in pigs. *Toxicol Lett* 229: 190–197.
- Nagy R, Hornok L (1994) Electrophoretic karyotype differences between two subspecies of *Fusarium acuminatum*. *Mycologia* 86: 203-208.
- Nayaka C, Wulff E, Udayashankar A, Nandini B, Niranjana S, Mortensen C, Prakash H (2011) Prospects of molecular markers in *Fusarium* species diversity. *Appl Microbiol Biotechnol* 90: 1625–1639.
- Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ (1994) Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin Microbiol Rev* 7: 479 – 504.
- Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WF (1983) *Fusarium* species: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania, USA: Pennsylvania State University.
- Nichea M, Cendoya E, Zachetti V, Chiacchiera S, Sulyok M, Krska R, Torres A, Chulze S, Ramírez M (2015a) Mycotoxin profile of *Fusarium armeniacum* isolated from natural grasses intended for cattle feed. *World Mycotoxin J* 4: 451-457.
- Nichea M, Palacios S, Chiacchiera S, Sulyok M, Krska R, Torres A, Chulze S, Ramírez M (2015b) Presence of multiple mycotoxins and other fungal metabolites in native grasses from a wetland ecosystem in Argentina intended for grazing cattle. *Toxins* 7: 3309-3329.
- Nicholson P, Simpson DR, Wilson AH, Chandler E, Thomsett M (2004) Detection and differentiation of trichothecene and enniatin-producing *Fusarium* species on small-grain cereals. *Eur J Plant Pathol* 110: 503-514.
- Nitschke E, Nihlgard M, Varrelmann M (2009) Differentiation of eleven *Fusarium* spp. isolated from sugar beet, using restriction fragment analysis of a Polymerase Chain Reaction-amplified translation elongation factor 1 $\alpha$  gene fragment. *Phytopathology* 99: 921-929.
- O'Donnell K, Cigelnik E (1997) Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol Phylogenet Evol* 7: 103-116.
- O'Donnell K, Cigelnik E, Nirenberg HI (1998) Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90: 465-493.

- O'Donnell K, Nirenberg HI, Aoki T, Cigelnik E (2000) A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience* 41: 61–78.
- O'Donnell K, Rooney AP, Proctor RH, Brown DW, McCormick SP, Ward TJ, Frandsen RJN, Lysøe E, Rehner SA, Aoki T, Robert VARG, Crous P, Groenewald J, Kang S, Geiser D (2013) Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal Genet Biol* 52, 20–31.
- O'Donnell K, Sarver BA, Brandt M, Chang DC, Noble-Wang J, Park BJ, Sutton DA, Benjamin L, Lindsley M, Padhye A, Geiser DM, Ward TJ (2007) Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic fusaria, including isolates from the multistate contact lens - Associated US Keratitis outbreaks of 2005 and 2006. *J Clin Microbiol* 45: 2235–2248.
- O'Donnell K, Sutton D, Fothergill A, McCarthy D, Rinaldi M, Brandt M, Zhang N, Geiser D (2008) Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and *in vitro* antifungal resistance within the *Fusarium solani* Species Complex. *J Clin Microbiol* 46: 2477-2490.
- O'Donnell K, Ward TJ, Robert VA, Crous PW, Geiser DM, Kang S (2015) DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions. *Phytoparasitica* 43: 583–595.
- O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, Sarver BA, Balajee SA, Schroers HJ, Summerbell RC, Robert VA, Crous PW, Zhang N, Aoki T, Jung K, Park J, Lee YH, Kang S, Park B, Geiser DM (2010) Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. *J Clin Microbiol* 48: 3708-3718.
- O'Donnell K, Ward TJ, Geiser DM, Kistler CH, Aoki T (2004) Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genet Biol* 41: 600-23.
- ONCCA (2010) Oficina Nacional de Control del Comercio Agropecuario. Disposición 5701/05. Clasificación de vacunos en pie para faena. <http://www.oncca.gov.ar/documentos/dispo5701-05a1.pdf>.
- Osweller GD (2000) Mycotoxins-contemporary issues of food animal health and productivity. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 16: 511–530.
- Osweller GD, Kehrl ME, Stabel JR, Thurston JR, Ross PF, Wilson TM (1993) Effect of fumonisin-contaminated corn screenings on growth and health of feeder calves. *J Anim Sci* 71: 459–466.
- Pal M, Gizaw F, Abera F, Shukla P K, Hazarika R A (2015) Mycotoxins: A growing concern to human and animal health. *Beverage Food World* 42: 42-50.
- Palmero D, González M, Iglesias C, Ruíz G, Tello JC (2008) Effects of water potential on spore germination and viability of *Fusarium* species. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35: 1411-1418.

- Park B, Park J, Cheong K, Choi J, Jung K, Kim D, Lee Y, Ward TJ, O'Donnell K, Geiser D, Kang S (2010) Cyber infrastructure for *Fusarium*: three integrated platforms supporting strain identification, phylogenetics, comparative genomics and knowledge sharing. *Nucleic Acids Res* 39:1-7.
- Pascale, M., Panzarini, G., Visconti, A. (2012). Determination of HT-2 and T-2 toxins in oats and wheat by ultra-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *Talanta*. 89: 231-236.
- Pestka JJ (2010) Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. *Arch Toxicol* 84: 663–679
- Phan H (2004) *Fusarium* Species Associated with Tropical Grasses in Australia. PhD Thesis, The University of Sydney, Sydney, Australia, Sydney, pp 191.
- Phan HT, Burgess LW, Summerell B, Clarkson JR (2004) *Gibberella gaditjirii* (*Fusarium gaditjirii*) sp. nov., a new species from tropical grasses in Australia. *Stud Mycol* 50: 261-272.
- Pitt JI, Hocking AD (1985) Fungi and spoilage. Academic Press. Sydney, Australia.
- Pittman Y, Kandl K, Lewis M, Valente L, Kinzy T (2009) Coordination of eukaryotic translation elongation factor 1A (eEF1A) function in actin organization and translation elongation by the guanine nucleotide exchange factor eEF1B $\alpha$ . *J Biol Chem* 284: 4739-47.
- Pittman Y, Valente L, Jeppesen M, Andersen G, Patel S, Kinzy T (2006) Mg<sup>2+</sup> and a key lysine modulate exchange activity of eukaryotic translation elongation factor 1B $\alpha$ . *J Biol Chem* 281: 19457-68.
- Pizzo F, Caloni F, Schreiber NB, Cortinovis C, Spicer LJ (2016) *In vitro* effects of deoxynivalenol and zearalenone major metabolites alone and combined, on cell proliferation, steroid production and gene expression in bovine small-follicle granulosa cells. *Toxicol* 109: 70–83.
- Pizzo F, Caloni F, Schutz LF, Totty ML, Spicer LJ (2015) Individual and combined effects of deoxynivalenol and  $\alpha$ -zearalenol on cell proliferation and steroidogenesis of granulosa cells in cattle. *Environ Toxicol Pharmacol* 40: 722–728.
- Plasencia J, Mirocha CJ (1991) Isolation and characterization of zearalenone sulfate produced by *Fusarium* spp. *Appl Environ Microbiol* 57: 146–150.
- Postic J, Cosic J, Vrandecic K, Jurkovic D, Saleh AA, Leslie J F (2012) Diversity of *Fusarium* species isolated from weeds and plant debris in Croatia. *J Phytopathol* 160: 76-81.
- Proctor RH, Brown DW, Plattner RD, Desjardins AE (2003) Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. *Fungal Genet Biol* 38: 237–249.
- Proctor RH, Desjardins AE, McCormick SP, Plattner RD, Alexander NJ, Brown DW (2002) Genetic analysis of the role of trichothecene and fumonisin mycotoxins in the virulence of *Fusarium*. *Eur J Plant Pathol* 108: 691-698.
- Prosperini, A., Meca, G., Font, G., Ruiz, M.J. (2012). Study of the cytotoxic activity of beauvericin and fusaproliferin and bioavailability in vitro on Caco-2 cells. Food and

- Chemical Toxicology. 2356–2361.
- Pulina G, Battacone G, Brambilla G, Cheli F, Danieli PP, Masoero F, Pietri A, Ronchi B (2014) An update on the safety of foods of animal origin and feeds. *Ital J Anim Sci* 13: 845–856.
- Rabie CJ, Sydenham EW, Thiel PG, Lübben A, Marasas WFO (1986) T-2 toxin production by *Fusarium acuminatum* isolated from oats and barley. *Appl Environ Microbiol* 52: 594-596.
- Ramírez ML, Chulze S, Magan N (2004a) Impact of environmental factors and fungicides on growth and deoxinivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentinian wheat. *Crop Prot* 23: 117-125.
- Ramírez ML, Chulze S, Magan N (2006) Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxinivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grains. *Int J Food Microbiol* 106: 291-296.
- Ramírez ML, Chulze SN, 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.
- Rearte DH (1994) El *feed lot* en la Argentina. Programa de Ámbito Nacional, Producción Animal I (PAN PA-I). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Balcarce.
- Rearte DH, Pieroni GA (2001) Supplementation of temperate pastures. En: International Grassland Congress. <http://www.internationalgrasslands.org/files/igc/publications/2001/tema19-2.pdf>.
- Reddy KR, Salleh B, Saad B, Abbas HK, Abel CA, Shier WT (2010) An overview of micotoxin contamination in foods and its implications for human health. *Toxin Rev* 29: 3-26.
- Reed KFM, Moore DD (2009) A preliminary survey of zearalenone and other mycotoxins in Australian silage and pasture. *Anim Prod Sci* 49: 696–703.
- Reig Riera MM (2010) Desarrollo de métodos rápidos de detección de residuos medicamentosos en animales de granja. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. [http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/8644/tesisUPV3390\\_Indice.pdf](http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/8644/tesisUPV3390_Indice.pdf)
- Rep M, Meijer M, Houterman PM, van der Does HC, Cornelissen BJC (2005) *Fusarium oxysporum* evades I-3-mediated resistance without altering the matching avirulence gene. *Mol Plant Microbe In* 18: 15–23.
- Reyes Velasquez W (2011) Micotoxicosis en rumiantes. En: Micotoxinas y Micotoxicosis. Ramos Girona A (Ed.) Editorial A, Madrid Vicente, Ediciones, pp187-218.
- Reynoso MM, Chulze SN, Zeller KA, Torres AM, Leslie JF (2009) Genetic structure of *Fusarium verticillioides* populations isolated from maize in Argentina. *Eur J Plant Pathol* 123: 207-215.
- Richard JL (2007) Some major mycotoxins and their mycotoxicoses- An overview. *Int J Food Microbiol* 119:3-10.
- Rocha L, Laurence M, Proctor R, McCormick M, Summerell B, Liew E (2015) Variation in type A trichothecene production and trichothecene biosynthetic genes in *Fusarium goulgardi* from natural ecosystems of Australia. *Toxins* 7: 4577-4594.

- Rocha O, Ansari K, Doohan FM (2005) Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review. *Food Addit Contam* 22:369–378.
- Rodríguez-Carrasco Y, Fattore M, Albrizio S, Berrada H, Mañes J (2015) Occurrence of *Fusarium* mycotoxins and their dietary intake through beer consumption by the European population. *Food Chem* 178: 149-155.
- Rychlik M, Humpf HU, Marko D, Dänicke S, Mally A, Berthiller F, Klaffke H, Lorenz N (2014) Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including “masked” mycotoxins. *Mycotoxin Res* 30: 197–205.
- Ryu D, Bullerman LB (1999) Effect of cycling temperatures on the production of deoxynivalenol and zearalenone by *Fusarium graminearum* NRRL 5883. *J Food Prot* 62: 1451–1455.
- Salvat A, Moschini RC, Comerio RM, Balbuena O, Rosellio Brajovich JE, Cristos D, Rojas D, Ricca A, Salerno JC (2016) Zearalenone content in animal fodder samples in relation to weather conditions in Colonia Benitez, northeastern Argentina. *Australasian Plant Pathol* 45: 251-259.
- 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 B<sub>1</sub> production of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on corn. Part I: The effect of initial headspace carbon dioxide concentration. *Int J Food Microbiol* 114: 160–167.
- Sampietro D, Marín P, Iglesias J, Presello D, Vattuone M, Catalan C, Gonzalez Jaen M (2010) A molecular based strategy for rapid diagnosis of toxigenic *Fusarium* species associated to cereal grains from Argentina. *Fungal Biol* 114:74-81.
- Sánchez Márquez S, Bills GF, Zabalgogeoazcoa I (2008) Diversity and structure of the fungal endophytic assemblages from two sympatric coastal grasses. *Fungal Divers* 33:87–100.
- Sanchis V, Magan N (2004) Environmental profiles for growth and mycotoxin production. En: *Mycotoxins in Food: Detection and Control*. Magan N, Olsen M (Eds), Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK, pp 174-189.
- Sanchis V, Marín S, Magan N, Ramos AJ (2006) Ecophysiology of fumonisin producers in *Fusarium* section *Liseola*. En: *Advances in Experimental Medicine and Biology. Advances in Food Mycology*. Hocking A, Samson R, Pitt J, Thrane U (Eds) Springer US, pp 115-122.
- Sandoval-Denis M, Swart W, Crous P (2018) New *Fusarium* species from the Kruger National Park, South Africa. *MycKeys* 34: 63–92.
- Santini FJ, García SC, Sciotti A, Castaño J (1995) Una tonelada de carne por hectárea. *Revista Campo y Tecnología INTA* 21: 3-26.
- Santos RR, Schoevers EJ, Roelen BAJ, Fink-Gremmels J (2013) Mycotoxins and female reproduction: *In vitro* approaches. *World Mycotoxin J* 6: 245–253.
- SAyDS (2006) Secretaria de Ambiente y Desarrollo sustentable de la Nación. Humedales de la República Argentina. <https://www.yumpu.com/es/document/view/12321681/humedales-de-la-republica-argentina-secretaria-de-ambiente-y->. Acceso enero de 2019.

- Schmidt-Heydt M, Magan N, Geisen R (2008) Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors. *FEMS Microbiol Lett* 284: 142-149.
- Schollenberger M, Müller HM, Rühle M, Drochner W (2008) Natural occurrence of 16 *Fusarium* toxins in edible oil marketed in Germany. *Food Control* 19: 475-482.
- Schollenberger M, Müller HM, Rühle M, Suchy S, Plank S, Drochner W (2006) Natural occurrence of 16 *Fusarium* toxins in grains and feedstuffs of plant origin from Germany. *Mycopathologia* 161: 43-52.
- Schroers H, Baayen R, Meffert JP, de Gruyter J, Hooftman M, O'Donnell K (2004) *Fusarium foetens*, a new species pathogenic to begonia elatior hybrids (*Begonia* x *hiemalis*) and the sister taxon of the *Fusarium oxysporum* species complex. *Mycologia* 96:393-406.
- Schroers H, O'Donnell K, Lamprecht S, Kammeyer P, Johnson S, Sutton D, Rinaldi M, Geiser D, Summerbell R (2009) Taxonomy and phylogeny of the *Fusarium dimerum* species group. *Mycologia* 101:44-70.
- Seeling K, Dänicke S, Valenta H, Van Egmond HP, Schothorst RC, Jekel AA, Lebzien P, Schollenberger M, Razzazi-Fazeli E, Flachowsky G (2006) Effects of *Fusarium* toxin-contaminated wheat and feed intake level on the biotransformation and carry-over of deoxynivalenol in dairy cows. *Food Addit Contam* 23: 1008-1020.
- SENASA (2007) Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Listado de ensayos analíticos acreditados bajo la norma ISO/IEC 17.025 ante el organismo argentino de acreditación. Disponible en: [http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File946-listado\\_de\\_ensayos\\_acreditados\\_julio\\_2007.pdf](http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File946-listado_de_ensayos_acreditados_julio_2007.pdf).
- Shannon CE, Weaver W (1949) *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press, Champaign, IL, US.
- Shimshoni JA, Cuneah O, Sulyok M, Krska R, Galon N, Sharir B, Shlosberg A (2013) Mycotoxins in corn and wheat silage in Israel. *Food Addit Contam Part A* 30: 1614-1625.
- Sidhu GS (2002) Mycotoxin genetics and genes clusters. *Eur J Plant Pathol* 108: 705-711.
- Simpson EH (1949) Measurement of diversity. *Nature* 163: 688.
- Skládanka J, Nedělník J, Adam V, Doležal P, Moravcová H, Dohnal V (2011) Forage as a primary source of mycotoxins in animal diets. *Int J Environ Res Public Health* 8: 37-50.
- Smith GW (2012) Fumonisin. En: *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*, 2nd ed. Gupta RC (Ed) Elsevier Inc, London, UK, pp 1205-1219.
- Smith JF (2006) Review of zearalenone studies with sheep in New Zealand. En: *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*. New Zealand Society of Animal Production, pp 306-310.
- Sokal R, Sneath P (1963) *Principles of Numerical Taxonomy*. Freeman WH (Ed) San Francisco, pp 359.
- Solo Campo (2019): <http://solocampo.com/subio-la-exportacion-pero-cayo-el-consumo-interno-de-carne-vacuna-en-2018/>. Acceso enero de 2019.
- Starr C, Taggart R (2006) *Biología: La unidad y la diversidad de la vida*. Thomson Editores, México, pp 242-248, 300-315.

- Stepien M, Sokol-Leszczynska B, Luczak M (2007) Mycotoxins, food products and human health. *Postepy Mikrobiol* 46: 167-177.
- Steyn PS (1998) The biosynthesis of mycotoxins. *Rev Med Vet* 6: 469-478.
- Streit E, Schatzmayr G, Tassis P, Tzika E, Marin D, Taranu I, Tabuc C, Nicolau A, Aprodu I, Puel O, Oswald I (2012) Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed: Focus on Europe. *Toxins* 4: 788–809.
- Sulyok M, Berthiller F, Kraska R, Shuhmacher R (2006) Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Commun Mass Spectrom* 20: 2649–2659.
- Sulyok M, Kraska R, Schuhmacher R (2007) A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semiquantitative screening of moldy food samples. *Anal Bioanal Chem* 389: 1505–1523.
- Sulyok M, Kraska R, Schuhmacher R (2010) Application of an LC-MS/MS based multi-mycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds. *Food Chem* 119: 408–416.
- Summerell B, Leslie J, Liew E, Laurence M, Bullock S, Petrovic T, Bentley A, Howard C, Peterson S, Walsh J, Burgess L (2011) *Fusarium* species associated with plants in Australia. *Fungal Divers* 46:1 – 27.
- Summerell BA, Laurence MH, Liew EC, Leslie JF (2010) Biogeography and phulogeography of *Fusarium*: a review. *Fungal Divers* 44: 1-11.
- Summerell BA, Rugg CA, Burgess LW (1995) Characterization of *Fusarium babinda* sp. nov. *Mycol Res* 99: 1345-1348.
- Sutton DA, Brandt MB (2011) *Fusarium* and other opportunistic hyaline fungi. En: Manual of Clinical Microbiology. ASM Press, Washington, DC, pp 1853–1879.
- Sweetser D, Nonet M, Young R (1987) Prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases have homologous core subunits. *Proc Natl Acad Sci* 84: 1192-1196.
- Szécsi Á, Magyar D, Tóth S, Szoke C (2013) *Poaceae*: A rich source of endophytic fusaria. *Acta Phytopathol Entomol Hung* 48: 19-32.
- Talavera G, Castresana J (2007) Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Syst Biol* 56: 564–577.
- Taylor J, Fisher M (2003) Fungal multilocus sequence typing - it's not just for bacteria. *Curr Opin Microbiol* 6: 351-356.
- Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC (2000) Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet Biol* 31: 21-32.
- Thevis M, Fuschholler G, Schänzer W (2011) Zeranol: Doping offence or mycotoxin? A case-related study. *Drug Test Anal* 3: 777–783.
- Thrane U, Adler A, Clasen PE, Galvano F, Langseth W, Lew H, Logrieco A, Nielsen KF, Ritieni A (2004) Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and

- Fusarium sporotrichioides*. *Int J Food Microbiol* 95: 257–266.
- Tiemann U, Dänicke S (2007) *In vivo* and *in vitro* effects of the mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol on different non-reproductive and reproductive organs in female pigs: A review. *Food Addit Contam* 24:306–314.
- Torres A, Ramirez ML, 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.
- Upadhaya SD, Park MA, Ha JK (2010) Mycotoxins and their biotransformation in the rumen: A review. *Asian-Australas J Anim Sci* 23: 1250–1260.
- Van Asselt ED, Azambuja W, Moretti A, Kastelein P, De Rijk TC, Stratakou I, Van Der Fels-Klerx HJA (2012) Dutch field study on fungal infection and mycotoxin concentrations in maize. *Food Addit Contam* 29: 1556-1565.
- Van Der Westhuizen L, Shephard GS, Rheeder JP, Burger HM (2010) Individual fumonisin exposure and sphingoid base levels in rural populations consuming maize in South Africa. *Food Chem Toxicol* 48: 1698–1703.
- Velluti A, Marín S, Bettucci L, Ramos AJ, Sanchis V (2000) The effect of fungal competition on colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* and on fumonisin B<sub>1</sub> and zearalenone formation. *Int J Food Microbiol* 59: 59-66.
- Velluti A, Marín S, Gonzalez R, Ramos AJ, Sanchis V (2001) Fumonisin B<sub>1</sub>, zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* in mixed cultures on irradiated maize kernels. *J Sci Food Agric* 81: 88–94.
- Visconti A. and Pascale M. (1998). Determination of zearalenone in corn by means of immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A.*, 815: 133-140.
- Voss KA, Chamberlain WJ, Bacon CW, Norred WP (1993) A preliminary investigation on renal and hepatic toxicity in rats fed purified fumonisin B<sub>1</sub>. *Nat Toxins* 1: 222–228.
- Voss KA, Riley RT, Norred WP, Bacon CW, Meredith FI, Howard PC, Plattner RD, Collins TF, Hansen D, Porter JK (2001) An overview of rodent toxicities: Liver and kidney effects of *Fusarium moniliforme* and fumonisins. *Environ Health Perspect* 109: 259–266.
- Voss KA, Smith GW, Haschek WM (2007) Fumonisin: toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. *Anim Feed Sci Technol* 137: 299-325.
- Wagacha JM, Muthomi JW (2008) Mycotoxin problem in Africa: current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *Int J Food Microbiol* 124: 1-12.
- Walsh J, Laurence M, Liew E, Sangalang A, Burgess L, Summerell B, Petrovic T (2010) *Fusarium*: two endophytic novel species from tropical grasses of northern Australia. *Fungal Divers* 44: 149-159.
- Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT, Merrill AH (1991) Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins: implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *Biol Chem* 266: 14486-14490.

- Wang Q, Xu L (2012) Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: A short review. *Molecules* 17: 2367–2377.
- Wang Z, Binder M, Dai Y, Hibbett D (2004) Phylogenetic relationships of *Sparassis* inferred from nuclear and mitochondrial ribosomal DNA and RNA polymerase sequences. *Mycologia* 95:1015–1029.
- Wangikar PB, Dwivedi P, Sinha N, Sharma AK, Telang AG (2005) Teratogenic effects in rabbits of simultaneous exposure to ochratoxin A and aflatoxin B<sub>1</sub> with special reference to microscopic effects. *Toxicology* 215: 37–47.
- Warth B, Parich A, Atehnkeng J, Bandyopadhyay R, Schuhmacher R, Sulyok M, Krska R (2012) Quantitation of mycotoxins in food and feed from Burkina Faso and Mozambique using a modern LC-MS/MS multitoxin method. *J Agric Food Chem* 60: 9352–9363.
- Watanabe M, Yonezawa T, Lee K, Kumagai S, Sugita-Konishi Y, Goto K, Hara-Kudo Y (2011) Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. *BMC Evol Biol* 11: 322.
- Wenz J, Jensen S, Lombard J, Wagner B, Dinsmore R (2007) Herd management practices and their association with bulk tank somatic cell count on United States dairy operations. *J Dairy Sci* 90: 3652–3659.
- Whitlow LW, Hagler WM (2010) Mold and mycotoxin issues in dairy cattle: effects, prevention and treatment. *Adv Dairy Technol* 20: 195-209.
- Wicklow DT, Hesseltine CW, Shotwell OL, Adams GL (1980) Interference competition and aflatoxin levels in corn. *Phytopathology* 70: 761-764.
- Wilson J, Otsuki T (2001) Global trade and food safety: winners and losers in a fragmented system, Working Paper, Agriculture Land, Commodity Prices, Markets, N° 2689, World Bank.
- Wing N, Bryden WL, Lauren DR, Burgess LW (1994) Toxicogenicity of *Fusarium* species and subspecies in section *Gibbosum* from different regions of Australia. *Mycol Res* 97: 1441-1446.
- Wing N, Lauren DR, Bryden WL, Burgess LW (1993) Toxicity and trichothecene production by *Fusarium acuminatum* subsp. *acuminatum* and *Fusarium acuminatum* subsp. *armeniacum*. *Nat Toxins* 1: 229-234.
- Wong DH, Barbetti MJ, Sivasithamparam K (1984) Effects of soil temperature and moisture on the pathogenicity of fungi associated with root rot of subterranean clover. *Aust J Agric Res* 35: 675–684.
- Wu F (2014) Perspective: time to face the fungal threat. *Nature* 516: S7.
- Xu XM, Nicholson P, Thomsett MA, Simpson D, Cooke BM, Doohan FM, Brennan J, Monaghan S, Moretti A, Mulé G, Hornok L, Beki E, Tatnell J, Ritini A, Edwards SG (2008) Relationship between the fungal complex causing *Fusarium* head blight of wheat and environmental conditions. *Phytopathology* 98: 69-78.
- Zain M (2011) Impact of mycotoxins on humans and animals. *J Saudi Chem Soc* 15: 129–144.

- Zeller KA, Summerell BA, Bullock S, Leslie JF (2003) *Gibberella konza* (*Fusarium konzum*) sp. nov. from prairie grasses, a new species in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 95: 943-954.
- Zhou T, He J, Gong J (2008) Microbial transformation of trichothecene mycotoxins. *World Mycotoxin J* 1: 23-30.
- Zinedine A, Soriano JM, Moltó JC, Mañes J (2007) Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food Chem Toxicol* 45: 1-18.

**PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A  
CONGRESOS**

## PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

Como resultado del presente trabajo de tesis se publicaron 3 trabajos y se realizaron 5 presentaciones a congresos.

Publicaciones:

- Ramirez M L., Chulze S. N., Torres A. M., Zachetti V. G. L., Nichea M. J., Cendoya E., Palacios S. A. (2014). Variación estacional de la presencia de micotoxinas en pasturas naturales destinadas a la alimentación bovina. **Revista SNS publicación periódica Científica-Tecnológica** 1: 49-54.
- Nichea, M. J., Cendoya E., Zachetti, V.G.L., Chiacchiera, S. M., Sulyok, M., Krska, R., Torres A. M., Chulze S. N., Ramirez M. L. (2015). Mycotoxin profile of *Fusarium armeniacum* isolated from natural grasses intended for cattle feed. **World Mycotoxin Journal** 4: 451-457. ISSN 1875-0796.
- Nichea, M. J., Palacios, S.A., Chiacchiera, S. M., Sulyok, M., Krska, R., Torres, A. M., Chulze, S. N., Ramirez, M. L. (2015). Presence of multiple mycotoxins and other fungal metabolites in native grasses from a wetland ecosystem in Argentina intended for grazing cattle. **Toxins** 7: 3309-3329. ISSN 2072-6651.

Presentaciones a congresos:

- **Perfil toxicogénico de cepas de *Fusarium armeniacum* aisladas de pasturas naturales destinadas a la alimentación bovina.** Nichea M.J., Cendoya E., Zachetti V.G.L., Sulyok M., Krska R., Ramirez M.L. VII Congreso Latinoamericano de Micotoxicología. Rio Cuarto, Córdoba, Argentina. 3 al 6 de diciembre de 2013.
- **Especies de *Fusarium* presentes en pastos naturales destinados a la alimentación bovina.** Nichea M.J., Palacios S. A., Torres A.M., Chulze S.N., Ramirez M.L. XII Congreso Argentino de Micología, XXIII Jornadas de Micología, Buenos Aires, Argentina. 24 al 27 de agosto de 2014. Resumen publicado en: Lilloa 51 (suplemento): 243-244 (ISSN 0075-9481).

- **Influencia de factores ambientales sobre el crecimiento de *Fusarium armeniacum* aislado de pastos naturales destinados a la alimentación bovina.** Nichea M. J., Torres A. M., Ramirez M. L. VIII Congreso Latinoamericano de Micología, Medellín, Colombia. 4 al 7 de noviembre 2014. Resumen publicado en: Actualidades Biológicas 34 (1): 398-399 (ISSN 0304-3584).
- ***Fusarium* species and mycotoxins present on native grasses from a wetland ecosystem in Argentina.** Nichea M. J., Sulyok M., Krska R., Chulze S. N., Torres A. M., Ramirez M. L. 13<sup>th</sup> European Fusarium Seminar, Martina Franca, Italia. Mayo 2015.
- ***Fusarium chaquense* sp. nov, una nueva especie productora de tricotecenos tipo A aislada de pastos naturales en los humedales de Chaco, Argentina.** Nichea M. J., Palacios S. A., Cendoya E., Romero C. J., Chulze S. N., Torres A. M., Ramirez M. L. IX Congreso Latinoamericano de Micología (IX CLAM), 22 al 25 de agosto del 2017, Lima, Perú.

## VARIACIÓN ESTACIONAL DE LA PRESENCIA DE MICOTOXINAS EN PASTURAS NATURALES DESTINADAS A LA ALIMENTACIÓN BOVINA

### SEASONAL VARIATION IN THE CONTENT OF MYCOTOXINS IN NATURAL GRASSES DEVOTED FOR CATTLE FEED

María L. Ramírez, Sofía N. Chulze, Adriana M. Torres, Vanessa G. Zachetti, María J. Nichea, Eugenia Cendoya y Sofía A. Palacios.

Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

#### Resumen

Los problemas potenciales derivados de la contaminación con especies de *Fusarium* y sus micotoxinas en las pasturas naturales destinadas a la alimentación bovina han sido poco estudiados. Si bien el diagnóstico de las micotoxicosis es extremadamente difícil, internacionalmente se conoce que en zonas con climas templados los pastos, forrajes y ensilados ocasionalmente causan problemas en el ganado. Los efectos provocados por micotoxinas pueden reducir la productividad y, en ocasiones, provocar la muerte. Los trastornos clínicos se pueden presentar esporádicamente, pero son más frecuentes las intoxicaciones subclínicas, en las cuales las micotoxinas o sus metabolitos afectan los parámetros productivos, ocasionan inmunosupresión o persisten en la carne o en otros productos derivados, como la leche, razón por la cual deben ser considerados como un riesgo para la salud pública.

En estudios previos realizados en nuestros laboratorios con el objetivo de detectar la presencia natural de zearalenona (ZEA) y sus derivados en pasturas naturales, hemos demostrado la presencia no solo de estas micotoxinas, sino de al menos otros cien metabolitos fúngicos entre micotoxinas, antibióticos y otros de acción desconocida. Entre las micotoxinas detectadas requieren especial atención los tricotecenos tipo A (toxina T-2, HT-2, neosolaniol), de toxicidad probada para ganado vacuno. Si bien no se detectó la presencia de aflatoxinas, sí se encontraron numerosos precursores que, por sus efectos tóxicos, son objeto de investigación en todo el mundo. Como consecuencia de estos resultados nos planteamos las siguientes hipótesis: a) existe una variación estacional en el contenido de micotoxinas tanto cualitativo como cuantitativo (tipo de micotoxinas y cantidad) en pasturas naturales destinadas a la alimentación de ganado bovino; b) además, hay una asociación entre el tipo de micotoxinas presentes naturalmente y el género y especie de las pasturas así como también las especies de *Fusarium*

#### Abstract

Studies about potential problems arising from *Fusarium* and their mycotoxins contamination in natural grasses devoted to cattle feed are scarce. Globally, in areas with temperate climates, grass, fodder and silage occasionally cause problems in cattle. The effects caused by mycotoxins can reduce productivity and sometimes cause death, although the diagnosis is extremely difficult mycotoxicosis. Clinical disorders may occur occasionally but more often do subclinical intoxications, where mycotoxins or their metabolites affect growth performance, cause immunosuppression or persist in meat or other products, such as milk, and must be considered a public health risk. In a previous study we have demonstrated the natural occurrence of zearalenone and its derivatives, and also the presence of at least 100 other fungal metabolites among mycotoxins, antibiotics and others in natural pastures. Among these, type A trichothecenes (especially T-2 toxin, HT-2, neosolaniol), with proven toxicity to cattle, require special attention. We did not detect the presence of aflatoxins but we have found several biosynthetic precursors that, due to their toxic effects, are currently under research around the world. As a consequence of these results we have proposed the following hypotheses: a) there is a seasonal variation in both the qualitative and quantitative content of mycotoxins (mycotoxin type and quantity) in natural grasses devoted to cattle feed, and b) in addition, there is an association between the type of naturally occurring mycotoxins and genera/species of natural grasses as well as *Fusarium* species found. To corroborate these hypotheses, we will sample natural grasses intended for cattle feed in a farm located in Chaco province at different times of the year (summer, fall, winter and spring) and determine the natural occurrence of mycotoxins by HPLC-MS/MS. Furthermore we will identify the *Fusarium* species present. The results will

presentes. Para corroborar estas hipótesis se muestrearán pasturas naturales destinadas a la alimentación bovina en un establecimiento de la provincia del Chaco en distintas épocas del año (verano, otoño, invierno y primavera) y se les determinará la incidencia natural de micotoxinas por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (LC-MS/MS). Además, se aislarán e identificarán las especies de *Fusarium* presentes. Los resultados serán de utilidad para los productores, ya que les permitirán conocer qué tipo de pasturas naturales son de riesgo debido a la contaminación con micotoxinas y si existe una variación estacional en estas sustancias, lo que posibilitará hacer un manejo diferencial de las pasturas.

**Palabras clave:** micotoxinas, pastos naturales, ganado bovino, *Fusarium*.

be useful for farmers: knowing what kind of natural grasses pose a risk due to mycotoxins contamination and if there is a seasonal variation in these metabolites, they will be able to carry out a differential management.

**Keywords:** mycotoxins, natural grasses, cattle, *Fusarium*.

## Introducción

La actividad ganadera de la Argentina se concentra en la región pampeana y en la del Noreste (NEA). Estas presentan climas templados y subtropicales con lluvias que permiten el desarrollo de pastizales, pasturas y verdes que representan el sustento nutricional de la ganadería en su conjunto.

La producción de res con hueso en los últimos cinco años fue de 3,15 millones de toneladas anuales en promedio y se exportó el 16 %, lo que ubica a nuestro país como quinto productor (después de Estados Unidos, Brasil, Unión Europea y China) y como octavo exportador de carne (después de Brasil, Australia, Estados Unidos, India, Nueva Zelanda y Canadá) en el mundo (MAGPyA, 2010). La Cuota Hilton es un cupo de exportación de carne vacuna sin hueso de alta calidad y valor que la Unión Europea otorga a países productores y exportadores. La norma que lo regula en la actualidad es el Reglamento CE N.º 810/2008 (Comisión Europea, 2008). La Argentina es el país que mayor porcentaje de cuota posee, con 28 000 toneladas anuales, lo que representa casi la mitad de la Cuota Hilton que otorga Europa. Se cubre con cortes de carne de vacuno procedentes de novillos, novillitos o vaquillonas que han sido alimentados exclusivamente con pasturas desde su destete.

En países con sistemas intensivos de producción de carne se utilizan anabólicos para mejorar los parámetros productivos, especialmente la velocidad del crecimiento y la conversión alimenticia. Los anabólicos pueden ser de origen endógeno (naturales) o sintéticos. Entre los anabólicos esteroides sintéticos del grupo no estilbénicos se ubica el zeranol (Bavera *et al.*, 2002). En nuestro país el zeranol es una sustancia hormonal cuyo

uso está prohibido para animales destinados al consumo humano en establecimientos inscriptos como proveedores para la Unión Europea y otros países. Kennedy *et al.* (1998) demostró que el zeranol puede ser formado *in vivo* en el rumen de bovinos a partir de los metabolitos producidos por *Fusarium*. Existe, entonces, una fuente natural de zeranol que es la presencia de zearalenona (ZEA) y sus derivados, contaminantes naturales de pasturas, como ha sido demostrado en Australia y Nueva Zelanda (Reed y Moore, 2009).

En los últimos años, en numerosos establecimientos se ha detectado zeranol en orina de animales durante inspecciones rutinarias del Senasa. Como consecuencia de esto, no se les ha permitido la exportación, con las consiguientes pérdidas económicas para los productores, quienes, por su parte, declaraban no haber administrado zeranol como anabólico.

Se llevó a cabo en nuestro laboratorio un estudio piloto para detectar la presencia natural de ZEA en dos establecimientos ganaderos en los cuales se habían encontrado orinas positivas para zeranol. En ambos, ubicados en la provincia del Chaco, se recolectaron 106 muestras de pasturas naturales durante julio de 2011. Las muestras fueron analizadas usando un LC-MS/MS que permitió la detección y cuantificación de 327 metabolitos fúngicos, incluidas micotoxinas, antibióticos y otros compuestos de acción desconocida. El análisis reveló la presencia de ZEA en 95 de las 106 muestras analizadas, con una concentración media de 84,5 µg/kg (rango= 0,7-2,120 µg/kg). También se encontraron  $\alpha$  y  $\beta$ -zearalenol. Lo sorprendente fue la detección de 110 metabolitos, algunos de ellos con probada toxicidad en rumiantes, como son los tricotecnos tipo A. Se detectó la presencia de toxina T-2 (n= 67, con una concentración media en muestras positivas de 439,2

µg/kg) y toxina HT-2 (n=52, con una concentración media en muestras positivas de 451,5 µg/kg) con un alta frecuencia. También se hallaron otros metabolitos con muy alta frecuencia, como los producidos por *Fusarium* (por ej.: beauvericina, equisetina, aurofusarina), precursores de las aflatoxinas, como la esterigmatocistina, metabolitos producidos por especies de *Alternaria* y ácido norsolorínico, entre otros (Ramírez *et al.*, 2012). Se observó que el 100 % de las pasturas presentaba un 100 % de contaminación.

Se aislaron e identificaron las especies de *Fusarium* presentes. La más común resultó ser *F. armeniacum* (65 % a 85 %), muy emparentada con *F. acuminatum*, aunque diferente en cuanto a la producción de toxinas (*F. armeniacum* es un gran productor de tricotecenos tipo A —toxina T2, HT-2, neosolaniol, DAS—, mientras que *F. acuminatum* no lo es). Dicho resultado fue de relevancia al dar lugar a la primera descripción de *F. armeniacum* hecha en nuestro país (Nichea *et al.*, 2013). Los resultados de este trabajo, realizado como servicio a productores ganaderos afectados, fueron presentados en el taller de “Evaluación de posibles causas de ocurrencia de zeranól y sus metabolitos en orina de animales vivos” organizado por el Senasa y sirvieron como sustento para una modificación en la normativa vigente, la resolución n.º 447/2004 de la ex Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. La disposición N.º 3/2012 de la Dirección General de Laboratorios y Control Técnico del Senasa contempla la aparición de zeranól en orina por el metabolismo de la micotoxina ZEA.

Es importante destacar algunos aspectos del trabajo. Por ejemplo, que el muestreo se realizó durante el invierno (julio y agosto), motivo por el cual no fue posible identificar las plantas recolectadas hasta el nivel de especie, ya que no presentaban inflorescencias. Se conoce que en la zona evaluada los géneros más comúnmente encontrados (pertenecientes a la familia *Poaceae*) son *Leersia hexandra*, *Luziola peruviana*, *Sorghastrum setosum*, *Spartina argentinensis*, *Cynodon dactylon*, entre otras. Quizás también se deba a la época del año la especie de *Fusarium* prevalente encontrada, ya que se asocia a tejido vegetal senescente (Leslie y Summerell, 2006).

La alta frecuencia de contaminación de las pasturas con especies de *Fusarium* no es una sorpresa, debido a que representantes de este género se aíslan de una amplia variedad de plantas y suelos en todo el mundo, donde se hallan como patógenos, endófitos o saprófitos de una amplia variedad de plantas y suelos en todo el mundo (Leslie & Summerell, 2006; Summerell *et al.*, 2010). Investigaciones recientes sugieren que las especies de *Fusarium* son comúnmente encontradas como endófitos en pastizales (principalmente de la familia

*Poaceae*) en los Estados Unidos, Australia y Hungría (Sánchez Márquez *et al.*, 2008; Szecsi *et al.*, 2013).

Los problemas potenciales derivados de la contaminación con micotoxinas en pastos naturales destinados a la alimentación bovina han sido poco estudiados. A nivel mundial, en zonas con climas templados, los pastos, forrajes y ensilados ocasionalmente causan problemas en el ganado. Los efectos provocados por micotoxinas pueden reducir la productividad y, en ocasiones, provocar la muerte. Los trastornos clínicos se pueden presentar esporádicamente, pero son más frecuentes las intoxicaciones subclínicas en las cuales las micotoxinas o sus metabolitos afectan los parámetros productivos, ocasionan inmunosupresión o persisten en la carne o en otros productos derivados, como la leche, por lo cual deben ser considerados como un riesgo para la Salud Pública (Reyes Velásquez, 2011; Zain, 2011).

Por todo lo antes mencionado, nos planteamos el siguiente objetivo general y los objetivos específicos como parte de un proyecto que fue presentado en el marco de los Premios Senasa a la investigación, transferencia y comunicación de la sanidad, la calidad y la inocuidad agroalimentarias 2014 y obtuvo el 2.º premio a equipos consolidados en Investigación y Transferencia en Protección Vegetal.

## Objetivo general

Evaluar el impacto del tipo de pastura natural (género/especie) y el estado fenológico de las plantas sobre la presencia de micotoxinas y determinar la variación estacional de las especies de *Fusarium*.

## Objetivos específicos

- 1) Determinar la contaminación natural con micotoxinas en pasturas naturales destinadas a la alimentación bovina recolectadas en las distintas épocas del año (verano, otoño, invierno y primavera).
- 2) Identificar las especies de *Fusarium* presentes mediante marcadores morfológicos y moleculares.

## Materiales, métodos y diseño experimental

### Muestreo

Se realizará el muestreo de las pasturas naturales en un establecimiento ubicado en la provincia del Chaco. Se delimitarán tres zonas de muestreo de 100 x 100 m, cuatro en los extremos del lote y uno en la zona central (esto dependerá de la forma del lote). Para el muestreo de cada zona se determinará un área de 10 000 m<sup>2</sup> (100 m x 100 m) en la que se trazarán dos diagonales que se extenderán a partir de ambas esquinas, y de cada diagonal se tomarán 10 puntos separados entre ellos por una distancia aproximada de 10 m. Una vez determinados los puntos de muestreo se cortará la pastura a 10 mm por encima del nivel del suelo (una planta de cada sitio de muestreo). Cada planta se colocará en una bolsa de papel debidamente identificada, se transportará al laboratorio, se secará en estufa de aire forzado a 45 °C y se almacenarán a 4 °C hasta su posterior análisis. Cuando sea posible, se determinará el género y especie de las pasturas recolectadas. Se realizarán cuatro muestreos, correspondientes a las estaciones del año: verano, otoño, invierno y primavera.

### Aislamiento de las especies de *Fusarium*

Se cortarán segmentos de la pastura (de aproximadamente 5 mm) que serán lavados para eliminar desechos y partículas de suelo. El lavado inicial se hará con agua destilada estéril que contendrá Tween 80 (1 gota cada 200 ml); será seguido por 5 lavados sucesivos con agua destilada estéril. Las piezas lavadas se colocarán en cajas de Petri con medio Nash y Snyder, selectivo para *Fusarium* (Leslie y Summerell, 2006), a razón de 10 pedazos por cada una (10 cajas, 100 piezas en total). Las placas se incubarán a 25 °C durante 7 días bajo ciclos de 12 h de luz blanca y negra, respectivamente. Las colonias que presenten características del género *Fusarium* se transferirán al medio agar hojas de clavel (AHC) y se incubarán durante 7 días a 24 °C bajo ciclos de 12 h de luz blanca y negra, respectivamente, para su posterior identificación.

### Identificación de las especies de *Fusarium* usando marcadores morfológicos

A partir del medio AHC se realizarán aislamientos monospóricos, para lo cual se tomará una pequeña cantidad de propágulos fúngicos y se realizará una suspensión en 10 ml de agua destilada estéril. Luego de homogeneizar dicha suspensión se transferirá a

una placa de Petri con agar agua, se diseminará por rotación y se descartará el excedente. Las placas se incubarán inclinadas durante 16 a 18 h a 24 °C para permitir la germinación de las esporas. Posteriormente se procederá a observar bajo la lupa (con aumento de 40 x) y a obtener conidios germinados mediante aguja histológica. Un conidio se transferirá a AHC en placas de Petri de 6 cm y otro, a un tubo de agar papa glucosado (APG). Los cultivos se incubarán durante dos semanas con ciclos alternativos de luz blanca y luz negra de 12 h a 24 °C. La identificación de las cepas se realizará siguiendo la metodología propuesta por Leslie y Summerell (2006).

### Identificación de las especies de *Fusarium* usando marcadores moleculares

#### Producción de la biomasa fúngica

Se realizará una suspensión en Tween 20 de esporas de cada cepa desarrollada en medio AHC y se transferirá a frascos Erlenmeyer de 250 ml, que contendrán 50 ml de medio completo. Se incubarán a 28 °C durante 2 a 3 días en un agitador rotatorio (150 rpm) y se cosechará el micelio por filtración, lavándolo con agua destilada estéril y secándolo entre hojas de papel absorbente. Las muestras serán almacenadas a -20 °C hasta el momento de realizar la extracción del ADN.

#### Extracción, purificación y cuantificación del ADN genómico

El micelio congelado se pulverizará con nitrógeno líquido en morteros y se distribuirá en tubos Eppendorf. El ADN será extraído con buffer CTAB (bromuro de cetiltrimetil amonio) siguiendo la metodología propuesta por Leslie y Summerell (2006). El ADN genómico fúngico se cuantificará por comparación visual usando ADN del bacteriófago  $\lambda$  digerido con HindIII como ADN testigo teñido con bromuro de etidio. Las muestras de ADN serán separadas por electroforesis en gel de agarosa al 0,8 - 1 %.

#### Amplificación y secuenciación de diferentes regiones del ADN conservadas

Se amplificarán por PCR las secuencias conservadas del genoma correspondiente al factor de elongación EF1 $\alpha$ . Se usarán los cebadores y las condiciones de PCR descritas por O'Donnell *et al.* (1998). Los productos de amplificación se examinarán por elec-

troforesis en geles de agarosa al 1,5 % teñidos con bromuro de etidio y se visualizarán con un transiluminador UV. El tamaño de los fragmentos obtenidos se estimará por comparación con ADN testigo (New England Biolabs, 100-bp Ladder) con bandas de referencia que oscilan entre 1000 y 100 pb.

Previo al secuenciamiento, los productos de PCR serán purificados utilizando columnas de purificación de ADN (DNA Wizard DNA Clean-Up Kit, Promega, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante y se obtendrán los datos de las secuencias de ADN amplificadas obtenidos a partir de cada cadena. Ambas cadenas de ADN serán secuenciadas con cada set de cebadores utilizados. Los datos de las secuencias de las dos bandas serán alineados con el programa BioEdit versión 4.7.8 (Hall, 1999) y las secuencias obtenidas se compararán con una base de datos (Genbank).

## Incidencia natural de micotoxinas en pasturas naturales

Las muestras de pasturas naturales se pulverizarán a un tamaño de partícula de 1 mm<sup>2</sup> usando un molinillo (Cyclotech, Foss Tecator). La detección y cuantificación se realizará siguiendo la metodología de Sulyok *et al.* (2007) con un equipo QTRAP 5500 MS/MS (Applied Biosystems, Foster City, CA) equipado con la fuente de ionización por electrospray TurboIonSpray (ESI) de origen y un sistema de UHPLC 1290 series (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). La separación cromatográfica se realizará a 25 °C en una columna Gemini® C18 (150 x 4,6mm ID, 5), equipada con una precolumna de C18 (4x3 mm ID) de Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU. Se utilizará el software Analistas ® versión 1.5.2 (AB Sciex, Foster City, CA, EE. UU.) para controlar el instrumento LC-MS/MS, así como para la integración manual y automática de los picos. La evaluación adicional de los datos se llevará a cabo en Microsoft Excel 2007.

## Resultados esperados

Uno de los resultados más relevantes, que impactará sobre las áreas disciplinares, es demostrar fehacientemente si existen variaciones estacionales tanto cualitativas como cuantitativas en la presencia de micotoxinas en pasturas naturales destinadas a la alimentación bovina. En estudios previos hemos demostrado que las pasturas naturales presentan contaminación natural con numerosas micotoxinas y otros metabolitos fúngicos, algunos de los cuales tienen toxicidad demostrada en rumiantes, y que la exposición crónica a bajas dosis

de estas puede tener efectos en los parámetros productivos y determinar las conocidas pérdidas económicas que pueden ser directas e indirectas (estas últimas, si bien difíciles de cuantificar, son las mayores).

Las pérdidas directas son causadas por la muerte de los animales, la disminución de los índices reproductivos (abortos, infertilidad, malformaciones), la reducción de la productividad en los animales sobrevivientes y otras alteraciones debidas a enfermedades transitorias, enfermedades subclínicas con disminución de la producción de leche, carne o lana y aumento de la susceptibilidad a otras enfermedades debido a depresión inmunológica. Las pérdidas indirectas incluyen compra de ganado para sustituir los animales muertos y los gastos asociados al diagnóstico de las intoxicaciones y al tratamiento de los animales afectados.

La incidencia real de las micotoxinas en salud animal y en salud pública permanece incierta, debido a varias causas: a menudo estos metabolitos se encuentran en muy bajas concentraciones que son difíciles de detectar, los síntomas no siempre son bien definidos, por ejemplo la falta de apetito (anorexia), el desmejoramiento general o la reducción de peso pueden fácilmente ser confundidos con otras muchas enfermedades, y, muchas veces, los técnicos y los productores no están suficientemente alertas sobre los problemas de micotoxicosis.

Los resultados serán de utilidad para los productores, ya que les permitirán conocer qué tipo de pastos naturales son de riesgo debido a la contaminación con micotoxinas y si se encuentra una variación estacional en el contenido de estos metabolitos para poder hacer un manejo diferencial de las pasturas.

## Bibliografía

Bavera, Guillermo; Beguet, Héctor y Ana Petryna (2002), "Promotores del crecimiento y modificadores del metabolismo. Curso de Producción Bovina de Carne", FAV-UNRC. Disponible en: <www.produccion-animal.com.ar>.

Hall, Thomas (1999), "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT", *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, pp. 95-98.

Kennedy, Glenn *et al.* (1998), "Zeranol is formed from *Fusarium* spp. toxins in cattle *in vivo*", *Food Additives and Contaminants*, 15, pp. 393-400.

Leslie, John y Brett Summerell (2006), "*The Fusarium Laboratory Manual*", Ames: Blackwell Professional.

Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (2010), "Sistema Integrado de Información Agropecuaria", disponible en: <<http://www.siiia.gov.ar/index.php/series-por-tema/ganaderia>>.

Nichea, M. J.; Cendoya, E.; Zachetti, V. G. L.; Sulyok, M.; Krska, R. y M. L. Ramirez (2013), "Perfil toxicogénico de cepas de *Fusarium armeniacum* aisladas de pasturas naturales destinadas a la alimentación bovina", *VII Congreso Latinoamericano de Micotoxicología*, Río Cuarto, Córdoba, Argentina, p. 122.

O'Donnell, Kerry; Kistler, Corby; Cigelnik, Elizabeth y Randy Ploetz (1998), "Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies", *Proceeding of the National Academy of Science (USA)*, 95, pp. 2044-2049.

Ramirez, M. L.; Chiacchiera, S. M.; Sulyok, M.; Nichea, M. J.; Palacios S.; Gonzalez Pereyra, M. L.; Krska R. y S. N. Chulze (2012), "Preliminary survey of zearalenone and other mycotoxins in Argentinean natural pastures intended for cattle feed", *7th Conference of The World Mycotoxin Forum and XIII the IUPAC International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins*, November 5-9, Rotterdam, pp. 131-132.

Reed, K. F. M. y D. D. Moore (2009), "A preliminary survey of zearalenone and other mycotoxins in Australian silage and pasture", *Animal Production Science*, 49, pp. 696-703.

Reglamento (CE) N.º 810/2008 de la Comisión. Relativo a la apertura y el modo de gestión de los contingentes arancelarios de carnes de vacuno de calidad superior fresca, refrigerada o congelada, y de carne de búfalo congelada (Refundición), *Diario Oficial de la Unión Europea*. 2008. L 219/3.

Reyes Velásquez, W. (2011), "Micotoxicosis en rumiantes", en Ramos Girona, Antonio (coord.) *Micotoxinas y Micotoxicosis*, Madrid, AMV Ediciones, pp. 187-217.

Sánchez Márquez, Salud; Bills, Gerald e Iñigo Zabalgoeazcoa (2008), "Diversity and structure of the fungal endophytic assemblages from two sympatric coastal grasses", *Fungal Diversity* 33, pp. 87-100.

Szécsei, Árpád; Magyar, D., Tóth, S. y Csaba Szoke (2013), "*Poaceae*: A rich source of endophytic fusaria", *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 48, pp. 19-32.

Sulyok, Michael; Krska, Rudolf y Rainer Schuhmacher (2007), "Application of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method to multi-mycotoxin determination in raw cereals and evaluation of matrix effects", *Food Additives and Contaminants*, 24, pp. 1184-1195.

Summerell, Brett *et al.* (2010), "Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review", *Fungal Diversity* 44, pp. 3-13.

Zain, Mohamed (2011), "Impact of mycotoxins on humans and animals", *Journal of Saudi Chemical Society*, 15, pp.129-144.

## Mycotoxin profile of *Fusarium armeniacum* isolated from natural grasses intended for cattle feed

M.J. Nichea<sup>1</sup>, E. Cendoya<sup>1</sup>, V.G.L. Zachetti<sup>1</sup>, S.M. Chiacchiera<sup>2</sup>, M. Sulyok<sup>3</sup>, R. Krska<sup>3</sup>, A.M. Torres<sup>1</sup>, S.N. Chulze<sup>1</sup> and M.L. Ramirez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>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; <sup>2</sup>Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas Fco-Qcas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta 36 Km 601, 5800 Río Cuarto, Córdoba, Argentina; <sup>3</sup>Department IFA-Tulln, BOKU Vienna, Konrad Lorenzstr. 20, 3430 Tulln, Austria; [mramirez@exa.unrc.edu.ar](mailto:mramirez@exa.unrc.edu.ar)

Received: 21 April 2014 / Accepted: 30 November 2014

© 2015 Wageningen Academic Publishers

### RESEARCH ARTICLE

#### Abstract

*Fusarium armeniacum* has been found as a saprophyte on natural grasses devoted to cattle feed in Argentina. This species has been reported as highly toxigenic due to the production of trichothecenes type A, but the information available about its toxigenic profile is incomplete. Thus, the aim of the present study was to determine the toxigenic ability of 50 *F. armeniacum* isolates recovered from natural grasses using a multitoxin method based on LC-MS/MS. In addition, morphological identification of 15 selected isolates was confirmed by sequencing the translation elongation factor 1 $\alpha$ . Out of the 327 metabolites analysed, only 10 were detected: T-2 toxin (T-2), T-2 triol, T-2 tetraol, HT-2 toxin (HT-2), diacetoxyscirpenol (DAS), monoacetoxyscirpenol (MAS), neosolaniol (NEO), aurofusarin (AUF), beauvericin (BEA) and zearalenone (ZEA). The most common group of mycotoxins produced by the isolates on rice under laboratory conditions was trichothecenes type A, and some minor *Fusarium* mycotoxins, such as BEA and AUF. Some isolates were also able to produce ZEA. Among the trichothecene type A, HT-2, T-2, NEO were clearly synthesised at the highest levels and frequency, followed by DAS and MAS. HT-2, T-2, NEO and DAS production was detected in 48 (96%), 47 (94%), 47 (94%) and 38 (76%) isolates, respectively. The ability of *F. armeniacum*, to produce ZEA and AUF has been demonstrated here for the first time. Given the new information provided about the toxigenic profile of this species, commonly associated with natural grasses in Argentina, the threat to animal health posed by this fungus should not be underestimated.

**Keywords:** *Fusarium*, cattle feed, mycotoxins, trichothecenes type A, zearalenone

#### 1. Introduction

Meat production in Argentina is based on the exploitation of natural sources with traditional extensive grazing. Animals grazing in rangelands, pastures, and grasslands with little or no integration of crops involved are a common practice in Argentina. A previous pilot survey was undertaken to ascertain the presence of multiple mycotoxins (by LC-MS/MS) in 40 samples of natural grasses (*Poaceae*) in two beef cattle farms located in the wetlands of Chaco province in Argentina (Ramirez *et al.*, 2012). The analysis revealed the presence of zearalenone (ZEA) and partial co-occurrence of  $\alpha$  and  $\beta$ -zearalenol. T-2 toxin (T-2) and

HT-2 toxin (HT-2) were found in high frequency as well. Other fungal metabolites that were found to be prevalent were beauvericin (BEA), equisetin and aurofusarin (AUF), metabolites produced by *Alternaria* spp., sterigmatocystin and its precursors, and anthraquinone derivatives such as emodin, chrysophanol and skyrin. Mycological analysis of the natural grass samples revealed that 100% of the samples were contaminated with *Fusarium* being *Fusarium armeniacum* the most common species found (Nichea, unpublished results). The result is not surprising because representatives of the genus *Fusarium* occur as pathogens, endophytes or saprobes in a wide range of plants and soil worldwide (Leslie and Summerell, 2006; Summerell *et al.*,

2010). Recently surveys have also suggested that *Fusarium* species are commonly found as endophytes of the *Poaceae* in grassland ecosystems in the USA, Australia and Hungary (Leslie *et al.*, 2004; Phan 2006; Sanchez Marquez *et al.*, 2008; Szecsi *et al.*, 2013).

*F. armeniacum* was initially referred as *F. acuminatum* and then, due to similarities in macroconidial morphology, it was described as a subspecies of *F. acuminatum* (Burgess *et al.*, 1993). However, subsequent studies, e.g. Altomare *et al.* (1997), Benyon and Burgess (1997) and Benyon *et al.* (2000), showed that this taxon was a distinct species and it was raised to species rank by Burgess and Summerell (2000). Based on molecular chromosomal karyotypes, *F. armeniacum* is more closely related to *Fusarium sporotrichioides* than to *F. acuminatum* (Nagy and Hornok, 1994). *F. acuminatum* and *F. armeniacum* can be differentiated on the basis of pigmentation, speed of production of chlamydospores and growth rates. *F. armeniacum* has been found in maize in Minnesota (Kommedahl *et al.*, 1979) and was later recovered in Australia (Burgess *et al.*, 1988) and South Africa (Marasas *et al.*, 1988; Rabie *et al.*, 1986). *F. armeniacum* appears to be a saprophyte, until recently, when it was reported as a pathogen on soybean in the United States (Ellis *et al.*, 2012).

This species is highly toxigenic in a chick assay and can produce trichothecenes (Wing *et al.*, 1993, 1994). Strains of *F. armeniacum* contain the *TRI5* gene which is the first unique step in trichothecene biosynthesis, but *F. acuminatum* strains do not (Fekete *et al.*, 1997). Thus, earlier reports of the production of high levels of trichothecenes (specifically T-2, HT-2 and neosolaniol (NEO)) by *F. acuminatum*, e.g. Rabie *et al.* (1986) and Logrieco *et al.* (1992), are probably best attributed to *F. armeniacum*. The latter produces T-2 and related trichothecenes, and also produces BEA and fusarin C, but according to Desjardins (2006) the mycotoxin profile of this species is still incomplete.

Trichothecenes are agriculturally important mycotoxins that present a potential threat to animal health throughout the world. Trichothecenes are potent inhibitors of eukaryotic protein synthesis, including DNA, RNA synthesis, inhibition of mitochondrial function, effects on cell division and membrane effects (Desjardins, 2006). All trichothecenes have a tricyclic skeleton structure with an epoxide group, but they are divided into two structurally distinct groups based on the absence (type A trichothecenes) and the presence (type B trichothecenes) of a keto group at carbon atom 8 (C-8) of the skeleton. Examples of type A trichothecenes include T-2, HT-2, diacetoxyscirpenol (DAS) and NEO. Clinical signs of trichothecene infection in animals include feed refusal and vomiting, growth retardation, reproductive disorders, blood disorders, dermatitis, oral lesions and depression of the immune response (Li *et al.*, 2011). BEA belongs to

the cyclic hexadepsipeptide mycotoxins synthesised by numerous fungi that are considered as emerging *Fusarium* toxins. The extent of human, animal and plant exposure to this mycotoxin has not been well established (Stępień and Waskiewicz, 2013).

The identification of *Fusarium* species traditionally relies on the detection of both morphological and physiological features. However, discrimination among similar species is often difficult; translation elongation factor 1 $\alpha$  gene has been used as a single-locus identification tool and it is a suitable genetic marker for discriminating among *Fusarium* species (Geiser *et al.*, 2004). Because different *Fusarium* spp. possess variable toxigenic potential, accurate identification is necessary.

In the light of the prevalence of *F. armeniacum* in natural grasses intended for cattle feed in Argentina, it is relevant to characterise its toxigenic ability in order to evaluate the toxicological risk of the presence of this species. Thus, the aim of the present study was to determine the toxigenic ability of fifty *F. armeniacum* isolates recovered from natural grasses.

## 2. Materials and methods

### Fungal isolates

The study included 50 isolates of *F. armeniacum*. Single-spored cultures from colonies initially identified as *Fusarium* spp. were transferred to carnation leaf agar (CLA) and potato dextrose agar (PDA) and were further identified based on morphology (Leslie and Summerell, 2006). These were isolated from natural grasses obtained from two beef cattle farms located in Chaco province in Argentina. The sampling was done during winter, and therefore was not possible to identify the grasses (mainly *Poaceae*) up to species level due to the absence of inflorescence. The isolates are deposited at the Department of Microbiology and Immunology, Universidad Nacional de Rio Cuarto culture collection. Cultures are maintained in 15% glycerol at -80 °C.

### DNA extraction and PCR amplification of TEF-1 $\alpha$

Fifteen strains, selected to be representative of the different mycotoxins profiles, were grown in complete medium (Leslie and Summerell, 2006) and incubated on an orbital shaker (150 rpm) for at least three days at 25 $\pm$ 1 °C. The resulting mycelia were harvested by filtration through non-gauze milk filters (Ken AG, Ashland, OH, USA). Excess water was removed by blotting mycelia between clean paper towels, and dried mycelia were stored frozen at -20 °C. The DNA extraction was performed with a cetyl-trimethylammonium bromide method (Leslie and Summerell, 2006).

Analyses of the partial sequence of the translation elongation factor-1 $\alpha$  gene (*TEF-1 $\alpha$* ), were made following PCR amplification with the primers described by O'Donnell *et al.* (1998). The PCR experiments were conducted with 10-20 ng of fungal DNA in a total volume of 20  $\mu$ l of 1 $\times$  reaction buffer containing 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 U Taq DNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA), 0.2 mM dNTPs and 0.5  $\mu$ M of each TEF primer (EF1 5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3', EF2 5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3'). A negative control, containing all reagents and primers but no fungal DNA, was included in every set of reactions. PCR was conducted in a PTC-2000 Thermal Cycler (MJ Research Inc., Watertown, MA, USA) and the conditions were: 94 °C for 1 min, then 31 cycles at 94 °C for 30 sec, 56 °C for 45 sec and 72 °C for 1 min, followed by 72 °C for 5 min and at 4 °C. PCR products were separated by electrophoresis through 2% (w/w) agarose gels to confirm that a ~700 bp fragment was amplified for *TEF-1 $\alpha$* . Fragments were purified by filtration through DNA Wizard Clean-Up Kit (Promega). Sequencing of both strands was performed with an ABI 3130XL DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and each sequence was then aligned with ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), as implemented in the program BioEdit version 7.0.9.0 (Hall, 1999). A BLAST search for similarities was performed with the sequences obtained.

### Mycotoxin production

*F. armeniacum* isolates were cultured in Erlenmeyer flasks (250 ml) containing 25 g of long grain rice. Ten ml of distilled water was added before autoclaving for 30 min at 121 °C. The procedure was repeated twice. Each flask was inoculated with a 3 mm diameter agar disk taken from the margin of a colony grown on synthetic nutrient agar (Leslie and Summerell, 2006) at 25 °C for seven days. Flasks were shaken by hand once a day for 1 week. These cultures were incubated for 28 days at 25 °C in dark. At the end of the incubation period the contents of the flask were dried at 50 °C for 24 h and then stored at -20 °C until analysed for mycotoxins.

### Mycotoxin analysis

In brief, 5 g of each inoculated rice sample were extracted for 90 min with 20 ml of acetonitrile:water:acetic acid (79:20:1, v/v/v) on a rotary shaker (GFL 3017, GFL, Burgwedel, Germany). Extraction, dilution, and analysis were performed as described by Sulyok *et al.* (2007). The raw extracts were diluted in the extraction solvent (ratio 1:10), further diluted (ratio 1:2) with acetonitrile:water:acetic acid (20:79:1, v/v/v) and injected into the LC-MS/MS instrument. Chromatographic separation was performed at 25 °C on a Gemini<sup>®</sup> C<sub>18</sub>-column, 150 $\times$ 4.6 mm i.d., 5  $\mu$ m particle size, equipped with a C<sub>18</sub> 4 $\times$ 3 mm i.d. security

(all from Phenomenex, Torrance, CA, USA) and coupled to an 1290 series UHPLC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Two mixtures containing 5 mM ammonium acetate composed of methanol:water:acetic acid (eluent A: 10:89:1, v/v/v; and eluent B: 97:2:1, v/v/v;) were used as mobile phases in a gradient elution mode. After an initial time of 2 min at 100% eluent A, the proportion of eluent B was increased linearly to 50% within 2-5 min and 100% within 5-14 min, followed by a hold-time of 4 min at 100% eluent B and 2.5 min column re-equilibration at 100% of eluent A pumped at a flow rate was 1 ml/min.

Detection and quantification of the mycotoxins were performed with a QTrap 5500 MS/MS system (Applied Biosystems) with a turbo ion spray electrospray ionization (ESI) source. Electrospray ionization-MS/MS was performed in a scheduled multiple reaction monitoring (sMRM) mode, both in positive and negative polarities in two separate chromatographic runs per sample by scanning two fragmentation reactions per analyte. All samples were analysed using Analyst<sup>®</sup> software version 1.5.2 (AB Sciex, Foster City, CA, USA).

ESI-source settings: source temperature 550 °C, curtain gas 30 psi (206.8 kPa of max. 99.5% nitrogen), ion source gas 1 (sheath gas) 80 psi (551.6 kPa of nitrogen), ion source gas 2 (drying gas) 80 psi (551.6 kPa of nitrogen), ion-spray voltage -4,500 V and +5,500 V, respectively, collision gas (nitrogen) medium. Optimised analyte-dependent MS/MS parameters are given elsewhere (Malachová *et al.*, 2014). Unambiguous identification of the analytes was obtained by the acquisition of two MS/MS transitions per analyte and comparison of the related intensity ratio and the LC retention time to the related values of an authentic standard.

## 3. Results and discussion

Fifty isolates were morphologically identified as *F. armeniacum*. Colonies on PDA produced white aerial mycelium, red to apricot pigmentation in agar, and bright orange sporodochia in the centre of the culture. On CLA, macroconidia in orange sporodochia on carnation leaves and chlamydospores were formed abundantly. Further, 15 isolates were selected based on the different mycotoxin profile obtained (Table 1) in order to confirm their morphological identification. Species identity for the 15 selected isolates was confirmed by elongation factor gene (EF1- $\alpha$ ) sequencing using EF1 and EF2 primers. BLASTn analysis with the FUSARIUM-ID and NCBI database revealed 99 to 99.24 % sequence identity to *F. armeniacum* (NRRL 29133, GenBank Accession No. HM744659). Thus, both morphological and molecular criteria supported identification of the isolates as *F. armeniacum*. To the best of our knowledge, this is the first report with confirmed molecular identification of *F. armeniacum* isolates from natural grasses.

Table 1. Mycotoxin production profiles of *Fusarium armeniacum* isolates on rice culture.<sup>1,2</sup>

Isolate	T-2 (mg/kg)	T-2TE (mg/kg)	T-2TR (mg/kg)	HT-2 (mg/kg)	DAS (mg/kg)	MAS (mg/kg)	NEO (mg/kg)	AUF (mg/kg)	BEA (mg/kg)	ZEA (µg/kg)
*A4 20	16.51	34.80	3.18	7.38	0.04	0.02	4.68	118.56	0.85	ND
A4 17	11.03	ND	1.72	3.50	ND	ND	1.75	41.97	0.48	ND
A4 6	17.98	3.63	ND	5.54	0.08	ND	8.46	5.18	0.36	ND
A9 5	464.40	972.80	36.10	73.13	1.77	0.43	541.60	1,796.80	1.63	ND
A8 9	91.20	124.00	9.87	11.66	0.41	ND	229.52	1,208.80	0.57	ND
*A7 26	1.22	5.48	ND	0.12	ND	ND	9.88	3.49	0.91	ND
A8 25	191.28	314.16	14.35	24.64	0.79	0.11	382.88	1,264.00	1.04	ND
*A1 3	ND	ND	1.09	3.41	ND	ND	ND	ND	0.80	ND
A2 22	ND	ND	ND	0.51	ND	ND	ND	ND	0.50	ND
A5 19	28.91	ND	3.14	6.22	0.04	ND	6.87	1,034.40	1.20	ND
A4 11	101.28	ND	11.35	14.79	0.08	ND	27.02	1,192.80	0.46	ND
A6 3	23.10	92.48	4.28	9.77	ND	ND	2.56	286.48	0.50	ND
A10 12	57.42	314.40	3.72	4.22	0.68	ND	295.92	976.00	1.29	ND
A5 17	25.55	189.92	3.80	5.54	ND	ND	3.14	977.60	0.84	ND
A3 8	ND	ND	5.11	11.46	ND	ND	ND	ND	1.61	ND
*A7 24	24.25	499.60	9.36	50.86	0.17	ND	52.24	1,105.60	0.78	ND
*A6 26	115.20	81.28	10.52	16.88	0.15	ND	48.83	143.92	0.08	ND
A6 8	15.30	25.43	2.41	6.20	ND	ND	2.61	20.10	0.43	ND
A10 10	53.06	13.21	5.54	9.63	0.22	ND	38.68	6.64	7.39	ND
A2 1	134.88	310.88	8.54	18.26	1.14	0.27	419.84	1,095.20	0.27	ND
*A7 13	15.05	ND	0.57	2.66	0.12	ND	50.24	247.84	2.22	ND
A5 21	14.11	42.62	1.87	4.84	ND	ND	3.43	159.36	0.51	ND
A1 12	34.98	ND	3.86	30.03	0.99	0.50	8.10	67.08	0.84	ND
*A6 19	39.18	177.92	6.22	10.91	0.06	0.06	14.36	442.08	0.19	ND
*A1 20	31.82	ND	1.26	4.63	0.24	0.04	49.78	106.08	0.19	ND
*A2 11	90.56	ND	4.83	11.03	0.53	0.17	282.48	829.60	3.64	ND
A5 20	23.02	146.08	2.59	6.10	ND	ND	2.69	375.20	0.81	ND
A9 26	47.25	ND	2.43	3.52	0.41	ND	143.92	490.32	11.34	ND
A2 28	48.05	ND	2.10	3.68	0.42	ND	148.24	479.68	11.29	ND
A9 30	292.72	ND	14.09	31.18	0.89	ND	307.76	950.40	0.95	ND
*A7 27	329.12	98.08	5.30	31.38	1.90	0.32	112.80	65.94	1.64	ND
A10 5	77.73	164.32	22.06	ND	0.55	0.49	239.84	272.48	0.35	ND
A3 22	19.18	ND	1.95	2.04	0.36	ND	200.16	509.60	29.69	ND
*A9 12	120.40	59.34	3.27	10.26	0.30	0.06	58.34	345.52	0.03	ND
*A1 14	70.07	54.86	7.34	29.79	0.28	ND	160.16	110.00	15.02	ND
A6 2	23.88	ND	1.31	3.24	0.85	ND	54.15	9.17	25.04	ND
A8 22	23.75	ND	1.92	7.94	0.11	ND	5.71	16.53	0.46	ND
B2 7	250.80	ND	5.24	16.10	2.36	0.34	344.08	520.00	0.69	13.95
*B1 4	119.28	ND	54.62	146.80	0.10	ND	184.88	220.00	25.76	24.21
A8 6	547.44	ND	15.18	56.13	3.45	0.74	574.80	1,276.00	0.24	46.30
B3 20	67.34	ND	2.66	3.10	1.17	ND	231.04	862.40	0.58	167.92
*A1 1	168.80	ND	14.26	96.32	0.91	0.45	173.68	163.60	ND	ND
*X3 15	192.16	ND	1.00	10.10	1.73	0.21	194.24	322.24	0.85	ND
X1 9	142.24	163.68	11.18	102.48	0.78	1.06	149.44	360.00	14.26	ND
B3 16	0.58	2.79	ND	0.49	ND	ND	14.74	20.19	20.82	1,173.60
B3 13	346.96	ND	9.66	21.81	2.42	0.27	374.64	1,035.20	0.64	210.64
B2 19	39.91	ND	3.65	4.73	0.56	0.13	184.88	318.24	1.95	51.46
A9 23	0.61	ND	ND	ND	ND	ND	1.20	3.09	ND	78.74
X2 19	89.60	123.60	7.83	42.79	0.67	0.74	94.32	34.86	0.99	80.48
B1 15	115.92	150.80	2.44	8.38	0.97	0.12	179.20	255.52	19.94	4.03

<sup>1</sup> AUF = aurofusarin; BEA = beauvericin; DAS = diacetoxyscirpenol; HT-2 = HT-2 toxin; MAS = monoacetoxyscirpenol; NEO = neosolaniol; T-2 = T-2 toxin; T-2TE = T-2 tetraol; T-2TR = T-2 triol; ZEA = zearalenone.

<sup>2</sup> ND = not detected, i.e. below limit of detection. Strains labelled with an asterisk (\*) were analysed by the partial sequence of the translation elongation factor gene.

Three hundred and twenty seven metabolites were analysed by LC-MS/MS for all the studied isolates. Only two isolates were able to co-produce the following 10 mycotoxins: T-2, T-2 triol (T-2TR), T-2 tetraol (T-2TE), HT-2, DAS, monoacetoxyscirpenol (MAS), NEO, AUF, BEA and ZEA (Table 1). The more frequent profiles of toxin production found were the co-production of T-2, T-2TR, HT-2, DAS, MAS, AUF and BEA by 9 isolates followed by T-2, T-2TR, T-2TE, HT-2, DAS, MAS, NEO, AUF and BEA by 8 isolates. The most common mycotoxin group produced was trichothecene type A, although some minor *Fusarium* mycotoxins, such as BEA and AUF, were also produced. Some isolates were also able to produce ZEA.

Among the trichothecene type A, HT-2, T-2, NEO were clearly synthesised at the highest levels and frequency, followed by DAS and MAS. HT-2, T-2, NEO and DAS production was detected in 48 (96%), 47 (94%), 47 (94%) and 38 (76%), isolates respectively. The levels ranged from 0.58 to 547 mg/kg (mean concentration positive isolates = 101.17 mg/kg) for T-2, 1.20 to 542 mg/kg (mean concentration positive isolates = 141 mg/kg) for NEO, 0.12 to 147 mg/kg (mean concentration positive isolates = 20.55 mg/kg) for HT-2 and 0.04 to 3.45 mg/kg (mean concentration positive isolates = 0.76 mg/kg) for DAS. Other trichothecenes type A produced in low frequency was MAS (20 isolates). The related T-2 derivatives, T-2TR and T-2TE, have also been detected. T-2TR was produced by 45 isolates (90%) in levels ranging from 1.0 to 54.62 mg/kg, whereas T-2TE was produced by 23 isolates (46%) at levels ranging from 2.79 to 973 mg/kg.

BEA was produced by 48 isolates (96%) at levels ranging from 0.03 to 29.7 mg/kg with a mean concentration of positive isolates of 4.44 mg/kg. Almost all isolates (47 out of 50) were able to produce AUF at levels ranging from 3.09 to 1,797 mg/kg with a mean concentration of positive isolates of 471 mg/kg. ZEA was produced in low frequency (10 isolates, 20%) at concentrations ranging from 4.03 to 1,173.60 µg/kg.

The toxin pattern detected in the *F. armeniacum* cultures was partially in agreement with earlier studies conducted on the same species isolated from different regions of the world. *F. armeniacum* isolated during the present study were able to produce T-2, T-2TR, T-2TE, HT-2, DAS, MAS, NEO, AUF, BEA and ZEA in low frequency. It has been previously reported, that *F. armeniacum* isolates can produce trichothecene mycotoxins such as T-2, HT-2, DAS and NEO (Abbas *et al.*, 1989; Logrieco *et al.*, 1992; Moss and Thrane 2004; Rabie *et al.*, 1986). According to Desjardins (2006) *F. armeniacum* produces T-2 and related trichothecenes, and also produce BEA and fusarin C, however mycotoxin profiles of this species was incomplete.

Zitomer (2006) showed that 3 isolates of *F. armeniacum* have the ability to produce trichothecenes type A and B but were unable to produce ZEA. Isolate NRRL 6227 showed production of NIV, DON, NEO, HT-2, and T-2. Isolate NRRL 29133 showed production of NIV, DON, FUS-X, NEO, and DAS. Isolate NRRL 31970 showed production of NIV, DON, ADON, NEO, DAS, and T-2. The current isolates were unable to produce type B trichothecenes and fusarin C.

In the present study, nearly all the isolates of *F. armeniacum* produced AUF, a typical red pigment characteristic of many *Fusarium* species. The ZEA production was scattered among the isolates under study. To our knowledge the production of these compounds has not been previously reported for this *Fusarium* species and should be added to the scarce available information for this species.

Furthermore, it has to be stressed that, taking into account that *F. armeniacum* is commonly associated with natural grasses in Argentina, the threat to animal health posed by this fungus should not be underestimated. Further studies should strive to completely characterise exposures due to contamination by this *Fusarium* species. Also, the simultaneous production of a broad range of type A trichothecenes, BEA, AUF and ZEA, often at high levels, assessed for most of *F. armeniacum* isolates under study is very important since the co-occurrence of different toxic metabolites could imply additive and/or synergistic effects on target organisms.

In conclusion, new data on the toxigenic profile of an important number of *F. armeniacum* isolates have been obtained, confirming that this fungus could be a potent producer not only of T-2 and HT-2, but also of other trichothecenes A of concern, such as NEO, DAS, MAS, and BEA which is considered an emerging *Fusarium* mycotoxin. Furthermore, the ability of the fungus to produce ZEA and AUF has been shown for the first time.

## Acknowledgements

This work was supported by grants from SECyT-UNRC and CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas). M.J. Nichea, E. Cendoya and V.G.L. Zanchetti are fellow of CONICET and M.L. Ramirez, A.M. Torres, S.N. Chulze and S.M. Chiacchiera are members of the Research Career of CONICET. The LC-MS/MS system was funded by the Federal Country Lower Austria and co-financed by the European regional development fund of the European Union.

## References

- Abbas, H.K., Mirocha, C.J., Kommedahl, T., Vesonder, R.F. and Golinski, P., 1989. Production of trichothecene and nontrichothecene mycotoxins by *Fusarium* species isolated from maize in Minnesota. *Mycopathology* 108: 55-58.
- Altomare, C., Petrini, O., Logrieco, A. and Bottalico, A., 1997. Taxonomic relationships among the toxigenic species *Fusarium acuminatum*, *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium tricinctum* by isozyme analysis and RAPD assay. *Canadian Journal of Botany* 75: 1674-1684.
- Benyon, F.H.L. and Burgess, L.W., 1997. Characterization of *Fusarium avenaceum* subspecies *avenaceum*, *nurragi*, and *aywerte*. *Cereal Research Communications* 25: 579-580.
- Benyon, F.H.L., Burgess, L.W. and Sharp, P.J., 2000. Molecular genetic investigations and reclassification of *Fusarium* species in sections *Fusarium* and *Roseum*. *Mycological Research* 104: 1164-1174.
- Burgess, L.W. and Summerell, B.A., 2000. Taxonomy of *Fusarium*: *Fusarium acuminatum* stat & comb. nov. *Mycotaxon* 75: 347-348.
- Burgess, L.W., Forbes, G.A., Windels, C., Nelson, P.E., Marasas, W.F.O. and Gott, K.P., 1993. Characterization and distribution of *Fusarium acuminatum* subsp. *armeniaceum*, subsp. nov. *Mycologia* 85: 119-124.
- Burgess, L.W., Nelson, P.E., Toussoun, T.A. and Forbes, G.A., 1988. Distribution of *Fusarium* species in sections *Roseum*, *Arthrosporiella*, *Gibbosum*, and *Discolor* recovered from grassland, pasture, and pine nursery soils of eastern Australia. *Mycologia* 80: 815-824.
- Desjardins, A.E., 2006. *Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics, and biology. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, USA, 260 pp.
- Ellis, M.L., Díaz Arias, M.M., Leandro, L.F. and Munkvold, G.P., 2012. First Report of *Fusarium armeniacum* causing seed rot and root rot on soybean (*Glycine max*) in the United States. *Plant Disease* 96: 1693.
- Fekete, C., Logrieco, A., Gizey, G. and Hornok, L., 1997. Screening of fungi for the presence of the trichodiene synthase encoding sequence by hybridisation of the *tri5* gene cloned from *Fusarium poae*. *Mycopathology* 138: 91-97.
- Geiser, D.M., Jimenez-Gasco, M.D., Kang, S.C., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T.J., Zhang, N., Kuldau, G.A. and O'Donnell, K., 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 473-479.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Kommedahl, T., Windels, C.E. and Stucker, R. E., 1979. Occurrence of *Fusarium* species in roots and stalks of symptomless corn plants during the growing season. *Phytopathology* 69: 961-966.
- Leslie, J.F. and Summerell, B.A., 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing, Oxford, MS, USA.
- Leslie, J.F., Zeller, K.A., Logrieco, A., Mule, G., Moretti, A. and Ritieni, A., 2004. Species diversity and toxin production by strains in the *Gibberella fujikuroi* species complex isolated from native prairie grasses in Kansas. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 2254-2262.
- Li, Y., Wang, Z., Beier, R.C., Shen, J., De Smet, D., De Saeger S. and Zhang S., 2011. T-2 toxin, a trichothecene mycotoxin: review of toxicity, metabolism, and analytical methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 3441-3453.
- Logrieco, A., Altomare, C., Moretti, A. and Bottalico, A., 1992. Cultural and toxigenic variability in *Fusarium acuminatum*. *Mycological Research* 96: 518-523.
- Malachová, A., Sulyok, M., Beltrán, E., Berthiller, F. and Krska, R., 2014. Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. *Journal of Chromatography A* 1362: 145-56.
- Marasas, W.F.O., Burgess, L.W., Anelich, R.Y., Lamprecht, S.C. and Van Schalkwyk, J., 1988. Survey of *Fusarium* species associated with plant debris in South African soils. *South African Journal of Botany* 54: 63-71.
- Moss, M.O. and Thrane, U., 2004. *Fusarium* taxonomy with relation to trichothecene formation. *Toxicology Letters* 153: 23-28.
- Nagy, R. and Hornok, L., 1994. Electrophoretic karyotype differences between two subspecies of *Fusarium acuminatum*. *Mycologia* 86: 203-208.
- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E. and Ploetz, R.C., 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95: 2044-2049.
- Phan, H.T., 2006. *Fusarium* species associated with tropical grasses in Australia. PhD Thesis. University of Sydney, Sydney, Australia.
- Rabie, C.J., Sydenham, E.W., Thiel, P.G., Lübben, A. and Marasas, W.F.O., 1986. T-2 toxin production by *Fusarium acuminatum* isolated from oats and barley. *Applied and Environmental Microbiology* 52: 594-596.
- Ramirez, M.L., Chiacchiera, S.M., Sulyok, M., Nichea, M.J., Palacios, S., Gonzalez Pereyra, M.L., Krska, R. and Chulze, S.N., 2012. Preliminary survey of zearalenone and other mycotoxins in Argentinean natural pastures intended for cattle feed. In: Abstract book 7<sup>th</sup> Conference of The World Mycotoxin Forum and XIII the IUPAC International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. 5-9 November 2012, Rotterdam, the Netherlands, pp. 131-132.
- Sánchez Márquez, S., Bills, G.F. and Zabalgoitia, I., 2008. Diversity and structure of the fungal endophytic assemblages from two sympatric coastal grasses. *Fungal Diversity* 33: 87-100.
- Stępień, Ł. and Waśkiewicz, A., 2013. Sequence divergence of the enniatin synthase gene in relation to production of beauvericin and enniatins in *Fusarium* species. *Toxins* 5: 537-555.
- Sulyok, M., Krska, R. and Schuhmacher, R., 2007. Application of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method to multi-mycotoxin determination in raw cereals and evaluation of matrix effects. *Food Additives and Contaminants* 24: 1184-1195.
- Summerell, B.A., Laurence, M.H., Liew, E.C.Y. and Leslie, J.F., 2010. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. *Fungal Diversity* 44: 3-13.
- Szécsi, Á., Magyar, D., Tóth, S. and Szoke, C., 2013. *Poaceae*: a rich source of endophytic fusaria. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 48: 19-32.

- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Wing, N., Bryden, W.L., Lauren, D.R. and Burgess, L.W., 1994. Toxigenicity of *Fusarium* species and subspecies in section *Gibbosum* from different regions of Australia. *Mycological Research* 97: 1441-1446.
- Wing, N., Lauren, D.R., Bryden, W.L. and Burgess, L.W., 1993. Toxicity and trichothecene production by *Fusarium acuminatum* subsp. *acuminatum* and *Fusarium acuminatum* subsp. *armeniacum*. *Natural Toxins* 1: 229-234.
- Zitomer, N.C., 2006. Mycotoxicology to accompany phylogenetic revisions to the genus *Fusarium*. PhD thesis, Pennsylvania State University, State College, PA, USA.

Article

## Presence of Multiple Mycotoxins and Other Fungal Metabolites in Native Grasses from a Wetland Ecosystem in Argentina Intended for Grazing Cattle

María J. Nichea<sup>1</sup>, Sofia A. Palacios<sup>1</sup>, Stella M. Chiacchiera<sup>2</sup>, Michael Sulyok<sup>3</sup>, Rudolf Krska<sup>3</sup>, Sofia N. Chulze<sup>1</sup>, Adriana M. Torres<sup>1</sup> and María L. Ramirez<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas Fco-Qcas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta 36 Km 601, Río Cuarto 5800, Córdoba, Argentina; E-Mails: mnichea@exa.unrc.edu.ar (M.J.N.); spalacios@exa.unrc.edu.ar (S.A.P.); schulze@exa.unrc.edu.ar (S.N.C.); atorres@exa.unrc.edu.ar (A.M.T.)

<sup>2</sup> Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas Fco-Qcas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta 36 Km 601, Río Cuarto 5800, Córdoba, Argentina; E-Mail: schiacchiera@exa.unrc.edu.ar

<sup>3</sup> Department IFA-Tulln, BOKU Vienna, Konrad Lorenzstr 20, Tulln A-3430, Austria; E-Mails: michael.sulyok@boku.ac.at (M.S.); rudolf.krska@boku.ac.at (R.K.)

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: mramirez@exa.unrc.edu.ar; Tel.: +54-358-467-6429; Fax: +54-358-467-6231.

Academic Editor: Paola Battilani

Received: 27 June 2015 / Accepted: 14 August 2015 / Published: 20 August 2015

---

**Abstract:** The aim of this study was to evaluate the occurrence of several fungal metabolites, including mycotoxins in natural grasses (Poaceae) intended for grazing cattle. A total number of 72 and 77 different metabolites were detected on 106 and 69 grass samples collected during 2011 and 2014, respectively. A total of 60 metabolites were found across both years. Among the few mycotoxins considered toxic for ruminants, no samples of natural grasses were contaminated with aflatoxins, ochratoxin A, ergot alkaloids, and gliotoxin, among others. However, we were able to detect important metabolites (toxic to ruminants) such as type A trichothecenes, mainly T-2 toxin and HT-2 toxin (up to 5000 µg/kg each), and zearalenone (up to 2000 µg/kg), all at very high frequencies and levels. Other fungal metabolites that were found to be prevalent were other *Fusarium* metabolites like beauvericin, equisetin and aurofusarin, metabolites produced by *Alternaria* spp., sterigmatocystin and its precursors and anthrachinone derivatives. It is

important to point out that the profile of common metabolites was shared during both years of sampling, and also that the occurrence of important metabolites is not a sporadic event. Considering that this area of temperate grassland is used for grazing cattle all year long due to the richness in palatable grasses (Poaceae), the present work represents a starting point for further studies on the occurrence of multi-mycotoxins in natural grasses in order to have a complete picture of the extent of cattle exposure. Also, the present study shows that the presence of zearanol in urine of beef cattle may not be a consequence of illegal use of this banned substance, but the product of the natural occurrence of zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol in natural grasses intended for cattle feeding.

**Keywords:** Poaceae; grasses; mycotoxins; *Fusarium*; cattle feed; bacterial and fungal metabolites

---

## 1. Introduction

Extensive beef production is a distinctive feature of Argentina. Beef production is generally based on grazing native grasses and cultivated pastures [1]. Nearly all the cattle are raised through grazing, with only 1.2% finished in corrals. Grazing throughout the year produces leaner beef cuts with less cholesterol and greater polyunsaturated fatty acids than beef finished on a high grain diet in feedlot [2]. Conventional cattle grazing in Argentina provides a desirable product for internal and external markets [3]. The prospects for Argentinean beef exports are promising, mainly due to the country's recent advancements in sanitary status. Argentina has been declared free of foot and mouth disease with vaccination, and also has been assigned the best possible status for a low Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) risk. These achievements, together with the fertile soil and climate characteristics for beef production, are driving forces for the increase in the country's beef exports [1].

Mycotoxins are naturally occurring compounds or secondary metabolites produced by fungi growing on plants in the field or during storage. Mycotoxins can contaminate raw agricultural products before and/or after harvest. Numerous mycotoxins can be produced by fungi invading plant material; however, only few mycotoxins have been recognized as toxic to ruminants. Mycotoxins relevant for ruminant's health are aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, fumonisins (B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>), trichothecenes, ergot alkaloids, and gliotoxin among others [4].

The negative effect of mycotoxins on the growth and health of livestock makes them a major problem for many production systems. Mycotoxicosis symptoms depend on the type of mycotoxin, the amount and duration of the exposure, the age, health and sex of the exposed individual, as well as on the dietary status and interactions among toxins. Low levels of mycotoxins may cause reduction decrease in food intake and performance, such as lowered milk production or decrease in body weight gain. Moderate levels of feed contamination frequently result in impaired resistance to infections, increased susceptibility to stress and reduced fertility. High levels of contamination may produce clinical disease, liver and kidney damage, oedema, increased blood clotting time and haemorrhaging, as well as altered digestion, absorption and metabolism of nutrients. Ruminants are less sensitive to the

negative mycotoxin effects since rumen microbiota can effectively degrade and deactivate mycotoxins, hence protecting the animal [5,6].

Beef animals in Argentina are finished either solely on natural grasses or pastures, on pastures with supplemented feeding (in most cases corn or sorghum silage) or in feedlots [7]. In Argentina, several reports showed mycotoxin contamination in cattle feed ingredients such as corn grains, mixed rations (corn, protein concentrate, *etc.*), corn silage, soybean pellet, wheat bran, *etc.* all used in feedlot rearing practice [8]. However, there is little information on the natural occurrence of mycotoxins in natural grasses (uncultivated) devoted to cattle grazing.

Of particular concern to the Argentinean livestock industry is that zearalenone is chemically similar to the growth promoting  $\alpha$ -zearalanol (zeranol), which is banned in Argentina as well as in the EU. In the last five years, zeranol has been detected in bovine urine during the routine analysis of beef cattle farms (enrolled as EU exporter) as part of a national residue control plan by the central governing authority, the National Service for Health and Food Quality (SENASA). It is important to remark that on those cattle farms, the cattle were raised through grazing of natural grasses, without any external inputs. The present research was primarily undertaken to ascertain if zearalenone was present in natural grasses on two beef cattle farms, in which a positive urine sample for zeranol from cattle had been previously found. It is well known that zeranol can be formed from  $\alpha$ -zearalenol and zearalenone *in vivo* in cattle [9]. Several reports from New Zealand and Northern Ireland have shown that zeranol might occur naturally in urine and bile from sheep and cattle, following metabolism of the mycotoxins zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol that can contaminate animal feedstuffs [9,10]. Thus, the finding of zeranol in an animal might, on its own, be insufficient proof that malicious abuse of zeranol has occurred. As natural grasses (Poaceae) were the unique feed source for the cattle raising in the aforementioned cattle farming, we wanted to probe for the first time in Argentina that natural grasses were contaminated with zearalenone and that it was the possible source of zeranol. The two farms in this study were located at a Ramsar Wetland site (27°20'S 58°50'W, Ramsar site No. 1366) in Chaco province, Argentina [11]. This wetland ecosystem is one of the three most biodiverse biomes of Argentina and it covers part of the Parana and Paraguay rivers floodplain complex at the eastern border of Chaco Province. The landscape consists of complex open water, aquatic vegetation, grasslands and gallery forests. This temperate grassland is used for grazing cattle all year long due to the richness of palatable grasses (Poaceae).

Based on what has been mentioned above, the aims of this study were to evaluate the occurrence of several fungal metabolites including mycotoxins in natural grasses intended for cattle grazing and to determine the co-occurrence of toxins that may be relevant to impairing cattle growth and health.

## 2. Results

### 2.1. Performance of the Applied Analytical Method

The performance characteristics of the analytical method obtained from five spiked blank samples are presented in Table 1 (only those analytes that have later been detected in the survey are shown). The limits of detection (LOD) ranged between 0.03 (averufin and festuclavine) and 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (kojic acid).

Spiking experiments using five individual samples at two concentration levels revealed that the apparent recoveries are in general lower than those obtained with other (grain-based) matrices [12,13].

**Table 1.** Performance characteristics of the analytical method for all analytes detected in the investigated grass samples.

Analyte	Apparent Recovery (%)	LOD <sup>a</sup> (µg/kg)
3-Nitropropionic acid	63.3 ± 9.5	0.40
Agroclavine	59.5 ± 5.1	0.08
Altenuene	157.8 ± 40.0	2.00
Alternariol	100.0 ± 9.5	0.50
Alternariol methyl ether	96.6 ± 8.8	0.05
Altertoxin-I	77.9 ± 6.5	0.80
Aspinolid B	75.5 ± 13.2	0.80
Asterric acid	140.0 ± 9.6	3.00
Aurofusarin	75.3 ± 4.7	4.00
Averantin	76.5 ± 0.9	0.04
Averufanin <sup>b</sup>	n.d. <sup>d</sup>	-
Averufin	54.50 ± 2.50	0.03
Beauvericin	41.8 ± 6.0	0.04
Brefeldin A	66.5 ± 6.2	2.00
Brevianamid F	76.2 ± 2.1	0.40
Chanoclavin	73.5 ± 31.2	0.05
Chrysophanol	114.8 ± 11.8	1.50
Clonostachydiol	80.0 ± 21.0	0.80
Curvularin	127.6 ± 15.8	0.40
Cytochalasin B	66.8 ± 7.1	1.50
Cytochalasin C	66.8 ± 6.1	0.40
Cytochalasin D	62.5 ± 4.1	0.20
Cytochalasin H	57.2 ± 5.6	15.00
Cytochalasin J	59.2 ± 7.9	2.00
Dechlorogriseofulvin	73.7 ± 9.1	1.50
Diacetoxyscirpenol	61.0 ± 9.8	0.25
Dihydrogriseofulvin	69.7 ± 8.8	1.00
Emodin	131.3 ± 28.2	0.08
Enniatin B	77.7 ± 42.9	0.01
Equisetin	215.0 ± 38.7	0.08
Festuclavine	73.1 ± 17.3	0.03
Fumonisin B <sub>1</sub>	59.8 ± 8.1	3.00
Griseofulvin	69.7 ± 4.8	0.80
HT-2 toxin	68.3 ± 1.0	4.00
Kojic acid	83.4 ± 12.2	20.00
Macrosporin	125.8 ± 5.2	0.20
Moniliformin	113.7 ± 6.7	1.00
Monocerin	73.8 ± 3.0	0.40
Neosolaniol	79.2 ± 3.5	0.50
Nidurufin <sup>b</sup>	n.d.	-

Table 1. Cont.

Analyte	Apparent Recovery (%)	LOD <sup>a</sup> (µg/kg)
Nivalenol	41.3 ± 12.0	0.80
Norsolorinic acid	47.0 ± 15.1	0.40
Penicillide	110.9 ± 16.3	1.50
Phycion	114.3 ± 16.6	8.00
Pseurotin A	73.7 ± 48.7	0.50
Radicicol	117.0 ± 12.0	0.40
Secalonic acid D	79.1 ± 8.6	4.00
Skyrin	76.1 ± 4.6	0.20
Sterigmatocystin	69.6 ± 4.0	0.30
Sulochrin	89.7 ± 14.9	1.50
T-2 toxin	64.1 ± 3.6	0.80
Tentoxin	56.2 ± 11.9	0.20
Tenuazonic acid	407.4 ± 108.9	3.00
Tryptophol	79.7 ± 6.4	15.0
Versicolorin A	103.7 ± 3.6	0.40
Versicolorin C <sup>c</sup>	n.d.	-
Zearalenone	124.6 ± 10.9	0.30
Zearalenone-4-sulfate	143.1 ± 16.1	0.40
α-zearalenol	120.6 ± 17.2	0.80
β-zearalenol	109.3 ± 15.6	0.80

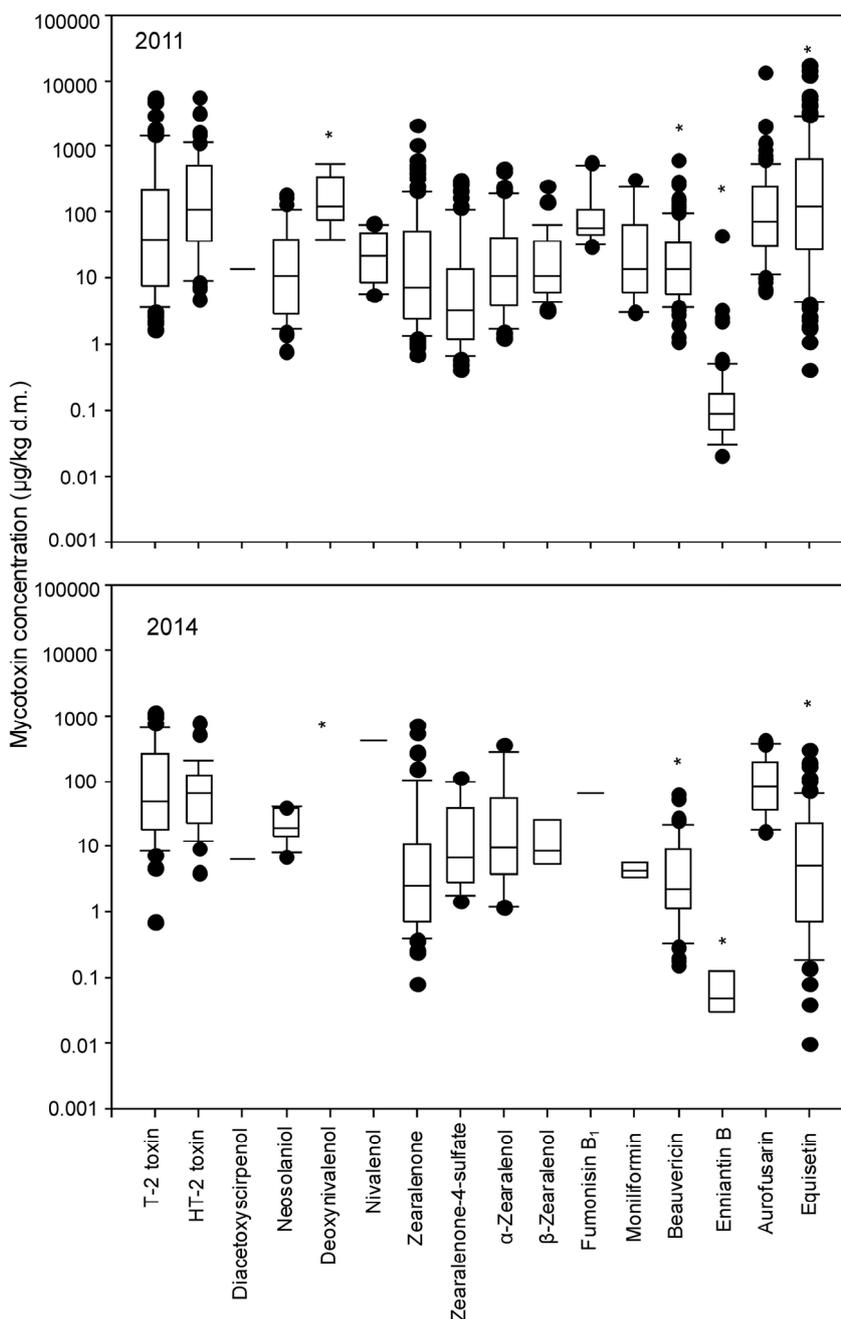
<sup>a</sup> LOD, limit of detection; <sup>b</sup> No standard available, estimation of concentration based on response and recovery of averufin; <sup>c</sup> No standard available, estimation of concentration based on response and recovery of versicolorin A; <sup>d</sup> n.d.: not determined.

## 2.2. Occurrence of Fungal Metabolites in Natural Grass Samples

A total number of 72 and 77 different metabolites were detected on grass samples collected during 2011 and 2014 years, respectively. A total of 60 metabolites were shared on both years evaluated. Data on shared mycotoxin prevalence between both sampling years as well as related median and maximum concentration in the positive samples are compiled in Table 2. The list of the most prevalent metabolites was similar between both years; despite this, there was a lower prevalence/or lower concentration in the grass samples from 2014. It was noticeable that, all the non-shared metabolites found in a particular year were detected in very few samples, these being unimportant metabolites in terms of toxicity for ruminants (Data not shown). The only exception was the presence of deoxynivalenol in grass samples collected during 2011. As an example, Figure 1 shows contamination levels of 16 *Fusarium* mycotoxins detected in both years of sampling (except deoxynivalenol), and significant differences ( $p < 0.05$ ) were found in the levels between both years in deoxynivalenol, beauvericin, enniatin B and equisetin, which appeared to be lower during 2014 in comparison with those collected during 2011.

In respect to *Fusarium* mycotoxins present in natural grass samples during both years evaluated, it was observed that during 2011, beauvericin and equisetin were present in all the samples and monocerin, zearalenone and aurofusarium were present in  $\geq 90\%$  of the samples. Other *Fusarium* mycotoxins detected at a prevalence of 40%–70% were HT-2 toxin, α-zearalenol, zearalenone-4

sulfate, T-2 toxin and enniantin B. Neosolaniol,  $\beta$ -zearalenol, nivalenol, moniliformin and fumonisin B<sub>1</sub> were detected at frequencies of 36%, 28%, 15%, 12% and 11%, respectively. Deoxynivalenol, enniantin A and A<sub>1</sub>, culmorin and diacetoxyscirpenol were found in low abundance  $\leq 10\%$ .



**Figure 1.** Box-plot for *Fusarium* mycotoxin concentration in grass samples during both years of study. (\* for a particular toxin denotes significant differences between both years evaluated according to Tukey Test ( $p < 0.001$ )).

**Table 2.** Occurrence and concentrations of the positive identified analytes in natural grass samples during 2011 and 2014.

Analyte	N° of Positives	Concentration of Positive Samples from 2011 (µg/kg d.m.)				N° of Positives	Concentration in Positive Samples from 2014 (µg/kg d.m.)			
		Median	75 Percentile	90 Percentile	Max		Median	75 Percentile	90 Percentile	Max
T-2 toxin	67/106	37.8	218	1375	5438	39/69	47.2	243	559	1095
HT-2 toxin	52/106	110	474	1149	5651	29/60	66.5	117	205	783
Diacetoxyscirpenol	2/106	13.6	21.5	21.5	21.5	2/69	6.49	10.5	10.5	10.5
Neosolaniol	36/106	10.4	39.0	94.5	187	11/69	19.4	38.1	39.6	39.9
Nivalenol	15/106	21.0	44.3	63.6	66.9	2/69	422	832	832	831
Zearalenone	95/106	7.20	50.3	203	2120	56/69	2.50	10.0	80.2	712
Zearalenone-4-sulfate	67/106	3.10	13.0	99.4	303	17/69	6.81	35.7	87.4	111
α-zearalenol	53/106	10.7	39.4	181	464	12/69	9.37	45.1	154	360
β-zearalenol	28/106	10.9	34.9	53.9	245	7/69	8.35	24.2	47.5	52.8
Fumonisin B <sub>1</sub>	11/106	57.2	97.0	442	566	2/69	64.0	98.7	98.7	98.7
Moniliformin	12/106	13.5	56.2	152	313	3/69	4.38	5.3	5.64	5.64
Beauvericin	106/106	13.5	33.2	95.1	624	43/69	2.23	9.1	18.5	63.4
Enniatin B	74/106	0.09	0.17	0.47	43.2	4/69	0.05	0.10	0.14	0.14
Aurofusarin	96/106	71.4	231	508	13238	25/69	80.7	195	365	409
Equisetin	106/106	118	624	2841	17264	63/69	2.21	12.8	54.8	297
Sterigmatocystin	96/106	4.15	16.5	42.6	733	41/69	6.78	15.1	53.8	147
Averantin	85/106	1.60	5.07	19.4	499	65/69	1.16	2.60	25.3	319
Averufanin	51/106	0.70	1.55	4.44	17.5	21/69	0.20	0.54	3.73	4.65
Averufin	67/106	3.80	8.57	20.4	173	67/69	2.78	8.00	49.3	401
Versicolorin A	20/106	0.65	1.35	27.4	46.5	38/69	3.08	11.9	103	719
Versicolorin C	33/106	1.50	2.42	4.22	25.3	47/69	3.36	10.1	43.9	209

Table 2. Cont.

Analyte	N° of Positives	Concentration of Positive Samples from 2011 (µg/kg d.m.)				N° of Positives	Concentration in Positive Samples from 2014 (µg/kg d.m.)			
		Median	75 Percentile	90 Percentile	Max		Median	75 Percentile	90 Percentile	Max
Nidurufin	41/106	0.60	41.2	91.1	228	30/69	0.87	3.58	10.1	28.3
Norsolorinic acid	59/106	3.60	23.4	93.6	257	44/69	3.55	6.76	23.7	63.1
Kojic acid	39/106	206	329	404	522	66/69	103	127	139	187
3-nitropropionic acid	32/106	2.70	5.70	9.94	28.8	37/69	3.77	1.91	28.0	102
Aspinolid B	40/106	39.2	82.6	186	602	27/69	10.0	25.0	43.7	423
Asterric acid	44/106	33.6	58.8	141	346	26/69	22.9	58.3	140.2	223
Sulochrin	42/106	23.7	62.6	90.1	198	30/69	18.3	52.7	283	172
Pseurotin A	31/106	4.70	8.37	13.4	15.2	10/69	7.88	23.4	148	29.5
Agroclavine	2/106	11.2	14.0	14.0	14.0	1/69				
Chanoclavin	69/106	2.60	49.1	180.6	2259	31/69	2.44	45.1	439	815
Festuclavine	5/106	32.1	93.6	98.4	98.4	5/69	7.63	75.6	215	215
Secalonic acid	28/106	72.9	116	229	1431	7/69	36.5	202	230	236
Griseofulvin	30/106	18.9	150	594	5880	4/69	23.4	75.0	123	123
Dechlorgriseofulvin	18/106	16.2	124	270	3904	2/69	20.0	32.5	32.5	32.5
Dihydrogriseofulvin	20/106	17.4	119	333	5720	3/69	14.2	55.6	69.4	69.4
Curvularin	73/106	9.30	39.7	358	5362	14/69	5.10	8.62	121	934
Brefeldin A	2/106	1648	2988	2988	2988	2/69	745	874	874	875
Penicillide	7/106	5.70	10.1	14.1	14.9	1/69	15.4			
Tenuazonic acid	28/106	31.4	59.4	141	222	27/69	2.43	4.67	11.3	178
Alternariol	105/106	65.3	160.	349	1036	61/69	17.4	58.0	136	1021
Alternariol methyl ether	67/106	12.6	33.3	69.2	377	67/69	10.5	20.2	39.2	160
Tentoxin	90/106	1.60	4.30	12.8	324	21/69	3.76	21.3	136	252

Table 2. Cont.

Analyte	N° of Positives	Concentration of Positive Samples from 2011 (µg/kg d.m.)				N° of Positives	Concentration in Positive Samples from 2014 (µg/kg d.m.)			
		Median	75 Percentile	90 Percentile	Max		Median	75 Percentile	90 Percentile	Max
Altenuene	23/106	10.3	15.5	19.8	28.4	2/69	14.3	18.7	18.7	18.7
Altetoxin-I	75/106	5.00	9.40	15.6	383	5/69	1.43	1.86	2.72	2.72
Macrosporin	60/106	2.85	8.90	21.8	50.4	17/69	1.95	4.53	19.2	76.2
Clonostachydiol	13/106	11.5	21.4	53.0	121	3/69	9.97	71.9	92.6	92.6
Cytochalasin B	10/106	90.0	136	925	1616	6/69	32.6	42.6	91.6	97.0
Cytochalasin C	14/106	27.9	64.6	264	412	3/69	33.6	38.1	39.5	39.5
Cytochalasin D	10/106	24.6	67.2	87.6	106	6/69	9.28	10.3	24.1	25.6
Cytochalasin H	9/106	368	1152	1802	2003	4/69	163	638	1064	1064
Cytochalasin J	20/106	40.8	133	215	434	4/69	122	436	677	677
Monocerin	106/106	66.7	215	1916	6745	65/69	20.7	46.9	642	7289
Brevianamid F	33/106	8.00	11.2	17.1	34.3	18/69	32.3	36.1	49.0	62.5
Tryptophol	75/106	73.1	113	217	466	67/69	67.3	226.8	1070	2513
Emodin	106/106	177	471	1551	3725	67/69	62.1	95.4	282	5401
Chrysophanol	104/106	41.1	77.8	142	15952	63/69	15.5	24.8	47.6	120
Phycion	74/106	69.9	166	391	17752	7/69	31.7	35.4	45.9	48.4
Skyrin	105/106	5.90	14.2	38.3	241	55/69	1.93	2.67	5.42	13.7
Radicicol	50/106	33.2	95.0	182	380	20/69	17.5	56.5	75.0	210

During 2014, monocerin and equisetin were also present in  $\geq 90\%$  whereas zearalenone was present in 81% of the samples analyzed. Other *Fusarium* mycotoxins detected at a prevalence of 40%–70% were T-2 toxin, HT-2 toxin and beauvericin. Aurofusarin, zearalenone-4 sulfate,  $\alpha$ -zearalenol and neosolaniol were detected at frequencies of 36%, 25%, 17% and 16%, respectively.  $\beta$ -zearalenol, enniantin B, moniliformin, diacetoxyscirpenol, nivalenol and fumonisin B<sub>1</sub> were found in low abundance  $\leq 10\%$ .

In particular, out of 106 natural grass samples collected during 2011, 95 were contaminated with zearalenone in concentrations ranging from 0.7–2120  $\mu\text{g}/\text{kg}$  d.m. (mean = 84.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Also, 52 grass samples were co-contaminated with zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol, both precursors of zearanol, while 22 samples showed co-occurrence of zearalenone,  $\alpha$ -zearalenol and  $\beta$ -zearalenol. In the 2014 grass samples, 56 out of 69 samples contaminated with zearalenone in concentrations ranging from 0.3–711.80  $\mu\text{g}/\text{kg}$  d.m. (mean = 41.40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  d.m.) were found. Also, seven grass samples were co-contaminated with zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol, both precursors of zearanol, and seven samples showed co-occurrence of zearalenone,  $\alpha$ -zearalenol and  $\beta$ -zearalenol.

Alternariol was the most frequent (99%) *Alternaria* mycotoxin found on natural grasses during 2011. Tentoxin, altertoxin-1, alternariol monomethyl ether and macrosporin were detected in frequencies ranging from 85% to 57%. Tenuazonic acid was detected in 26% of the samples analysed.

Alternariol monomethyl ether was the most frequent (97%) *Alternaria* mycotoxin found on natural grasses during 2014. Alternariol, tenuazonic acid, tentoxin and macrosporin were detected in frequencies ranging from 88% to 25%. Altertoxin-I was detected at very low frequency (7%) in the samples analysed.

Aflatoxin was not detected in any grass sample analysed during both years evaluated, but sterigmatocystin and some of its precursors exhibited a very high prevalence (sterigmatocystin: 90% in 2011 and 60% in 2014; averantin; 80% in 2011 and 99% in 2014). Averufin, norsolorinic acid, averufanin, versicolorin C, nidurufin and versicolorin A were detected in frequencies  $>20\%$  during both years.

Chanoclavin and curvularin were the most frequent *Penicillium* mycotoxin found on natural grass during both those years analyzed. Another eight metabolites (agroclavine, festuclavine, secalonic acid, dihydrogriseofulvin, dechlorgriseofulvin, brefeldin A and penicillide) produced by *Penicillium* species were also detected, but in low abundance  $\leq 27\%$  (see Table 1). Although some metabolites such as griseofulvin, dihydrogriseofulvin, dechlorgriseofulvin among others were found in low frequency, the maximum concentrations detected were very high in some samples.

Anthraquinones such as chrysophanol, emodin and skyrin that may be produced both by fungi and plants, were detected in high frequency ( $>80\%$ ) during both years and also at very high levels in some samples. However, physcion was detected in high frequency just in 2011 samples.

Cytochalasin B, C, D, H and J were detected in low frequency ( $\leq 20\%$ ), but some of them such as cytochalasin B was found in high concentration in some samples (1616  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

The bacterial metabolite monactin was found at low prevalence ( $\leq 10\%$ ) and also at low levels only in grass samples collected during 2011 (data not shown).

### 3. Discussion

To our knowledge, the present study represents the first survey on multi-mycotoxin contamination occurrence in natural grasses used for beef animal production. It was noticeable that the LC-MS/MS method applied possessed the performance characteristics required to obtain accurate results. Out of the 175 natural grass samples analysed, all showed contamination, being co-occurrence the rule. The use of the multi-metabolites LC-MS/MS method allowed us to ascertain the extent of the natural grasses' contamination. It is important to remark that the beef cattle grazing on both farms evaluated during 2011 and 2014 did not show any symptoms of mycotoxicosis. Since our main goal was to demonstrate that the farmers did not abuse the use of zearanol, we obtained samples in 2011, a year after the finding of zearanol in urine among cattle from both farms, in the paddocks where the cattle were grazing the year before. As we used a multi-toxin analytical method, we were able to detect co-occurrence of zearalenone and several metabolites for the first time in natural grasses. We conducted other sampling during 2014 in order to probe that our first findings were not a sporadic event, and to probe that it is normal to find zearalenone and other mycotoxins on natural grasses (uncultivated).

Numerous mycotoxins can be produced by fungi invading plant material; however, only few mycotoxins have been recognized as toxic to ruminants. The toxins detected in the present survey included the major mycotoxins of concern for ruminant health such as zearalenone, and trichothecenes, and others still not evaluated [4].

Common knowledge on animal mycotoxicosis indicates that ruminant animals are among the least susceptible animal species, as the rumen microflora effectively degrade and inactivate mycotoxins, hence protecting the animal [5]. Some microbes from the rumen have been identified for their ability to degrade mycotoxins or plant toxins. Among the first mycotoxins shown to be detoxified by ruminants were ochratoxin A [14], and aflatoxin B<sub>1</sub> [15,16]. The metabolism of different mycotoxins potentially encountered by ruminants has also been investigated, and it has been found that the mycotoxins zearalenone, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol and deoxynivalenol were well metabolized by whole rumen fluid, whereas aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin A were not [17]. Kennedy *et al.* [9] reported that 90% of zearalenone was hydrolyzed to  $\alpha$ -zearalenol by rumen microbes. Although the  $\alpha$  form of zearalenone is more estrogenic than its parent form, due to the low rate of absorption, ruminants are less susceptible to zearalenone toxicity [18].

Among the few mycotoxins considered toxic for ruminants, none of the natural grass samples collected in both years were contaminated with aflatoxins, ochratoxin A, ergot alkaloids, gliotoxin among others. However, we were able to detect important metabolites such as trichothecenes type A, and B, sterigmatocistin and zearalenone.

Data on zearalenone and derivatives detected during the present study are of concern if we consider, as an example, that beef cattle need to eat 10% of their weight body per day; an animal of 400 kg needs to eat 40 kg of natural grasses a day. Considering our results, 40 kg of natural grasses will result in an average daily intake of 3.38 mg of zearalenone and 2.0 mg  $\alpha$ -zearalenol per animal. Kleinova *et al.* [19] when feeding heifers with similar amounts of zearalenone (oat contaminated with 2.74 mg zearalenone per animal) and a control group with zearanol implant (25 mg), found in urine samples of the treated and control animals similar concentrations of zearanol ( $\alpha$ -zearalenol) and taleranol ( $\beta$ -zearalenol). In addition, in the heifers that have consumed oat contaminated with

zearalenone, zearalenone,  $\alpha$ -zearalenol and  $\beta$ -zearalenol in urine were also found. The present study showed that the presence of zearalenone in urine of beef cattle could be not a consequence of illegal use of this banned substance, but the product of the natural occurrence of zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol in natural grasses intended for cattle feeding. The high prevalence of these metabolites during both years is remarkable being that their presence is not a sporadic event.

It is important to highlight the presence of zearalenone-4-sulfate in natural grass samples during both years. Sulfo-conjugation is part of the phase II detoxification process that plants and animals use to inactivate mycotoxins and other xenobiotics. It has also been demonstrated by Berthiller *et al.* [20] that *Arabidopsis thaliana* seedlings treated with zearalenone produced also zearalenone-4-sulfate. Zearalenone-4-sulfate formation seems to be a mechanism of self-protection. Despite its chemical alteration, there is evidence that the above mentioned metabolite has a similar toxic potential to those of their precursors when ingested with food, as attached functional groups like sulfate residues are likely to be enzymatically cleaved during digestion [21].

Among the type A trichothecenes, T-2 toxin, HT-2 toxin, neosolaniol and diacetoxyscirpenol were found in 2011 and 2014 and we did not find any significant differences in this group of mycotoxins between both years analysed. Some grass samples from 2011 showed very high concentration of T-2 toxin and HT-2 toxin, up to 5000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  d.m. each during 2011. T-2 and HT-2 toxin, the most prominent type A trichothecenes, often found together in plants, are some of the most toxic trichothecene detected in feed for cattle. Ruminants can rapidly de-acetylate T-2 toxin to HT-2 [22]. It is often difficult to distinguish the effects of T-2 toxin from HT-2 toxin *in vivo*; therefore, it is reasonable to sum up the concentrations of these toxins to evaluate clinical effects. T-2 toxin ingestion results in a severe irritation of the upper digestive tract, including a hemorrhagic ruminitis, due to its cytotoxic effects. The T-2 toxin is also believed to induce immune-suppression in cattle by decreasing serum concentrations of IgM, IgG and IgA, neutrophil functions and lymphocyte blastogenesis. Bovine infertility and abortion in the final trimester of gestation have also resulted from the consumption of feed contaminated with T-2 [6]. With the exception of T-2 toxin, cattle have not been adversely affected by others trichothecenes. The high levels of type A trichothecenes (especially T-2 and HT-2 toxins) can be explained due to the *Fusarium* species contamination. This assertion is supported by the mycological analysis of 2011 grass samples, which revealed that 100% of the samples were contaminated with *Fusarium*, being *F. armeniacum* the most common species found. Also, we have demonstrated that 50 selected *F. armeniacum* isolates were able to produce a broad range of type A trichothecenes (including T-2, HT-2, neosolaniol among others) [23]. Consequently, *F. armeniacum* could be responsible for the high prevalence of type A trichothecenes on natural grasses analysed during the present study.

Deoxynivalenol and nivalenol were the only trichothecene type B found in natural grasses, at very low frequencies and levels during 2011. Deoxynivalenol was not present in 2014, while nivalenol was found at very low frequency but at higher concentrations than in 2011. Deoxynivalenol, the most prominent type B trichothecene present in cattle feed worldwide, is not considered to be acutely toxic; it is considered to be a major cause of economic loss due to reduced performance. Clinical signs include gastrointestinal problems, soft stools, diarrhea, increased susceptibility to other diseases and decreased performance. Cattle are resistant to the emetic effects of deoxynivalenol, but reduced food intake was observed at 10–20 mg/kg in ruminants [24]. During the present work, deoxynivalenol was

detected in few samples ( $n = 9$ ) and at concentrations lower than the guidance value provided by the European Commission for bovine feed. Nivalenol was found in low prevalence (22% and 3%) with all sample values below 831.80  $\mu\text{g}/\text{kg}$  d.m., thereby presenting contamination levels within the range of surveys conducted elsewhere [25–29]. The risk associated with chronic exposure to low levels of nivalenol in animal feed is difficult to evaluate due to the limited data available in farm animals.

It is generally assumed that within the rumen the protozoal population has the highest capacity to detoxify ingested mycotoxins, but this may vary between different classes of mycotoxins. The contribution of bacteria and other rumen organisms might have been underestimated, as generally only the overall capacity to degrade a given mycotoxin has been tested [27]. Several mycotoxins are, however, able to modify the rumen microbiota as they exert antimicrobial, anti-protozoal and antifungal activity; typical examples are patulin, fusaric acid, beauvericin and enniatins. The findings that mycotoxins impair the rumen microbiota correspond to the observation in clinical practice where, following a period of feeding mould contaminated silage to dairy cows, a reduced filling of the rumen, poor feed conversion, and mild diarrhea are observed [30,31]. The co-occurrence of mycotoxins observed in the present study is relevant considering their potential effects on the rumen microbiota.

Enniatins and beauvericin are cytotoxic cyclic hexadepsipeptides produced by several *Fusarium* species and are known to be toxic to insects, bacteria and fungi [32]. Enniatin B was the most prevalent enniatin mycotoxin, present in 70% of the samples during 2011, but all the enniatins were found in very low concentrations. In 2014 samples, enniatin B was the only one enniatin detected at very low frequency and levels. Beauvericin was present in all analysed grass samples in 2011 and in 43 during 2014, at levels within the concentration range reported by other studies [33,34]. There are no data that indicate that beauvericin has potential toxicity to cattle.

The occurrence of alternariol, alternariol methyl ether, tentoxin and altertoxin I was high in the analysed samples (99%–70%) during 2011. Although, in samples from 2014, alternariol and alternariol methyl ether were present at very high frequencies (88% and 97%), tentoxin and altertoxin I were found at lower frequencies than in 2011. Overall, maximum levels of alternariol were higher than those reported in the literature with the exception of sunflower. *Alternaria* species produce more than 70 phytotoxins, but a small proportion of them has been chemically characterized and reported to act as mycotoxins to humans and animals. Some toxins such as alternariol, alternariol methyl ether, tenuazonic acid and altertoxins are described to induce harmful effects in animals, including fetotoxic and teratogenic effects. At present, knowledge of the possible effects of *Alternaria* toxins on farm and companion animals as well as the database describing the occurrence of these mycotoxins in feedstuffs are scarce and insufficient to assess the risk regarding *Alternaria* toxins for animal health [35].

Occurrence data on equisetin and monocerin on animal feed are very limited [36]. Both mentioned metabolites were found at very high frequencies in both years (>90%) and at very high concentration in some samples analysed in the present study. Equisetin was reported as a metabolite of *F. equiseti* and *F. semitectum* with weak activity against gram-positive bacteria and other cytotoxic activities [37]. Equisetin has been found as a natural contaminant in corn, wheat silage and corn silage but at concentrations lower than those obtained during the present study [36,38]. Monocerin is a polyketide fungal metabolite that exhibits antifungal, insecticidal, and plant pathogenic properties. It has been isolated from several fungal species [39]. Monocerin was present in all grass samples under study,

at relatively high concentrations comparable with those found by Shimshoni *et al.* [36] on corn silage. The toxic effect of this metabolite on ruminants is still unknown.

Aflatoxins were not detected during the present study, although we were able to detect several precursors (some at very high frequencies) in the biosynthetic aflatoxin (AF) pathway. This suggests *Aspergillus versicolor* as the fungal producer. The general accepted AF biosynthetic pathway scheme is: A hexanol CoA precursor → norsolorinic acid, NOR → averantin, AVN → hydroxyaverantin, HAVN → Oxoaverantin, OAVN → averufin, AVF → Hydroxyversicolorone, HVN → versiconal hemiacetal acetate, VHA → versiconal, VAL → versicolorin B, VERB → versicolorin A, VERA → demethyl-sterigmatocystin, DMST → sterigmatocystin, ST O-methylsterigmatocystin, OMST → aflatoxin B<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub> and aflatoxin G<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>. After the VHA step, there is a branch point in the pathway that leads to AFB<sub>1</sub> and AFG<sub>1</sub> formation as well as AFB<sub>2</sub> and AFG<sub>2</sub> [40]. In particular ST, the penultimate precursor of AF, is produced by more than 50 fungal species, including *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. versicolor* and *A. nidulans*, of which *A. versicolor* is the most common source. ST shares its biosynthetic pathway with aflatoxins. *A. nidulans* and *A. versicolor* are apparently unable to biotransform ST into OMST, the direct precursor of AFB<sub>1</sub> and AFG<sub>1</sub>. Consequently, substrates colonized by these fungi can contain high amounts of ST, while substrates invaded by *A. flavus* and *A. parasiticus* contain only low amounts of ST as most of it is converted into AFs. ST was detected in 90% and 60% of the grass samples analysed during 2011 and 2014, respectively. Owing to the structural similarities, AFs and ST share prominent toxic effects, including genotoxicity and carcinogenicity, being the AFs considered 150–200 times more potent than ST [41]. However, in contrast to AFs, only limited information on occurrence and toxicity of ST is available. Only limited data are available for other ruminants, but a case report describes haemorrhages and bloody diarrhea in cattle following exposure to ST [42]. Some grass samples showed very high levels of contamination with ST (up to 730 µg/kg d.m.) if we consider the guidance of the European Parliament [43] for feed, the concentration of ST must be regarded as significant.

Among the *Penicillium* metabolites, we were unable to detect in any samples patulin, mycophenolic acid, roquefortine C and PR toxin that are common mycotoxins found in grass silage around the world [44].

Several infrequently reported anthraquinone derivatives produced by fungi and plants were found during the present research, such as emodin, its methy-derivate physcion and chrysophanol and its respective dimer skyrin. The high maximum concentration detected of the above mentioned metabolites is also remarkable, mainly in samples from 2011. All these anthraquinones are commonly found on plants belonging to the Polygonaceae family, and have been reported as antibacterial, anti-inflammatory, antiviral anti-ulcerogenic and anticancer agents. Also, all these compounds play well-documented roles as chemopreventive effects [45].

During this study we have detected one bacterial metabolite with antibiotic activity: monactin at very low frequency (<10%) and concentrations in 2011 grass samples. This metabolite is a member of the macrotetrolide complex produced by a range of *Streptomyces* species [46]. At present, no data are available regarding the effect of this antibiotic present in grasses on ruminants.

We did not detect any of the indole-diterpenoid alkaloids in the natural grasses under study. These compounds are produced by species of the *Claviceps* genus within the Hypocreales that can infest plant species belonging to Poaceae (family of the true grasses). In Argentina, mycotoxicosis

among cattle has been reported due to the presence of indol-diterpenoid tremorgens, produced by *Claviceps paspali* present in grasses such as *Paspalum dilatatum* and *P. notatum* and by *Claviceps cynodontis* present on *Cynodon dactylon*. Also, ryegrass staggers caused by the endophytic fungi *Neotyphodium lolii* (that produce indol-diterpenoid alkaloids) in *Lolium perenne* occurs frequently in cattle in Argentina. Gangrenous ergotism caused by *C. purpurea* and *Festuca elation* has also been observed [47].

This study showed new and original data on the presence of multi-fungal and bacterial metabolites on natural grasses (non-cultivated) used for grazing cattle. Only few studies have investigated the presence of mycotoxins but just on cultivated grasses used as forage (mainly silage) for cattle feeding, most of them focus on few mycotoxins such as deoxynivalenol, zearalenone, fumonisins and aflatoxins [48–50].

## 4. Experimental Section

### 4.1. Sampling

Natural grass samples were obtained from two beef cattle farms located in the Chaco province of Argentina, included in the Ramsar site. One hundred and six grass samples (53 from each farm) were collected during July 2011, and 69 during July 2014. On each farm, a paddock of around 1000 ha was chosen for sampling. Each sample, corresponding to one plant, was cut at ground level and transported to the laboratory in a paper bag. The aerial harvested portions of plants, including leaf and stems, were immediately oven dried at 60 °C for 48 h or until constant weight, indicating that the entire aqueous portion was extracted from plant tissues. Since the sampling was done during winter, it was not possible to identify the grasses up to species level due to the absence of inflorescence but we can confirm that all belong to the Poaceae family.

The two cattle farms were located in the wetland of Chaco region in Argentina. This region covers part of the Parana and Paraguay rivers floodplain complex in the eastern border of Chaco Province and it is limited to the north by the Bermejo River which surrounds the city of Resistencia. The hydrological regimes of each river give rise to different pulses of flood and drought in these wetlands, regulating flood downstream and retaining waters in times of drought. The landscape is complex open water, aquatic vegetation, grasslands and gallery forests. The annual temperature ranges between 20 and 24 °C. Maximum absolute temperatures can peak at 46.5 °C. Mean annual rainfall is 1300 mm, concentrated in spring and summer. The most common species of grasses in the area under study are *Leersia hexandra*, *Luziola peruviana*, *Sorghastrum setosum*, *Spartina argentinensis*, *Cynodon dactylon* between others [51].

### 4.2. Mycotoxin Analysis

#### 4.2.1. Chemicals and Reagents

Methanol (LC gradient grade) and glacial acetic acid (p.a.) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany), acetonitrile (LC gradient grade) from VWR (Leuven, Belgium), and ammonium acetate

(MS grade) from Sigma-Aldrich (Vienna, Austria). Water was purified successively by reverse osmosis and an Elga Purelab ultra analytic system from Veolia Water (Bucks, UK) to 18.2 MΩ.

Standards of fungal and bacterial metabolites were obtained either as gifts from various research groups or from the following commercial sources: Romer Labs<sup>®</sup> Inc. (Tulln, Austria), Sigma-Aldrich (Vienna, Austria), Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Germany), Axxora Europe (Lausanne, Switzerland) and LGC Promochem GmbH (Wesel, Germany). Stock solutions of each analyte were prepared by dissolving the solid substance in acetonitrile (preferably), acetonitrile/water 1:1 (v/v), methanol, methanol/water 1:1 (v/v) or water. Thirty-four combined working solutions were prepared by mixing the stock solutions of the corresponding analytes for easier handling, and were stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The final working solution was freshly prepared prior to spiking experiments by mixing the combined working solutions.

#### 4.2.2. Extraction and Estimation of Apparent Recoveries

Three grams of each grass sample, previously pulverized in a mill with a 1 mm<sup>2</sup> mesh (Cyclotech, Foss Tecator, Höganäs, Sweden), were weighed into a 50 mL polypropylene tube (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and 20 mL of the extraction solvent (acetonitrile/water/acetic acid 79:20:1, v/v/v) were added. For spiking experiments, 0.25 g sample was used for extraction. Samples were extracted for 90 min on a GFL 3017 rotary shaker (GFL, Burgwedel, Germany) and diluted 1 + 1 with dilution solvent (acetonitrile/water/acetic acid 20:79:1, v/v/v). Five microliters of the diluted extracts were subsequently injected [13].

#### 4.2.3. LC-MS/MS Parameters

The LC-MS/MS has been previously described by Vishwanath *et al.* [52], but has been transformed to a more sensitive mass spectrometer and has been further extended [12]. Analysis was performed with a QTrap 5500 LC-MS/MS System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) equipped with TurboIonSpray electrospray ionization (ESI) source and a 1290 Series HPLC System (Agilent, Waldbronn, Germany). Chromatographic separation was performed at 25 °C on a Gemini C18-column, 150 × 4.6 mm i.d., 5 μm particle size, equipped with a C18 4 × 3 mm i.d. security guard cartridge (Phenomenex, Torrance, CA, USA).

ESI-MS/MS was performed in the time-scheduled multiple reaction monitoring (MRM) mode both in positive and negative polarities in two separate chromatographic runs per sample by scanning two fragmentation reactions per analyte. The MRM detection window of each analyte was set to its expected retention time  $\pm 27\text{ s}$  and  $\pm 48\text{ s}$  in the positive and the negative modes, respectively. Confirmation of positive analyte identification was obtained by the acquisition of two MRMs per analyte (with the exception of moniliformin and 3-nitropropionic acid, that exhibited only one fragment ion). This yielded 4.0 identification points according to the European Union Commission decision 2002/657 [53]. In addition, the LC retention time and the intensity ratio of the two MRM transitions agreed with the related values of an authentic standard within 0.1 min and 30%, respectively.

Quantification was performed using external calibration based on serial dilution of a multi-analyte stock solution. Results were corrected by apparent recoveries that had been determined by spiking five different blank samples at two concentration levels.

### 4.3. Statistical Analysis

Each particular metabolite concentration was evaluated by analysis of variance (ANOVA) to determine any differences between the years of sampling. The data were Log10 transformed to create a normal distribution. 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  $p \leq 0.01$ . All the analyses were done using SigmaStat for Windows Version 2.03 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## 5. Conclusions

A broad range (up to 77) of fungal metabolites was present in natural grasses (Poaceae) during two different years, and co-occurrence was the rule. It is important to point out that the profile of common metabolites was shared during both years of sampling, and also that the occurrence of important metabolites is not an exceptional phenomenon but seems to be very common. Some metabolites present such as type A trichothecenes (T-2 and HT-2), zearalenone and derivatives are of concern for ruminants. Partial degradation in the rumen does mean that they are less toxic to cattle than to other animals, but some of these degradation products can be more toxic than the original mycotoxin. There are some studies on synergistic effects and only a few of them include those metabolites that were the most prevalent in our study. So, it cannot be ruled out that low levels of several mycotoxins might be more problematic than high levels of an individual mycotoxin, due to their synergistic relationship.

## Acknowledgments

This work was supported by grants from SECyT-UNRC and CONICET grant N° 112 201201 005525 CO (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas). Nichea M.J. and Palacios S.A. are CONICET fellows and Ramirez M.L., Torres A.M., Chulze S.N. and Chiacchiera S.M. are members of the Research Career of CONICET. The LC-MS/MS system was funded by the Federal Country Lower Austria and co-financed by the European regional development fund of the European Union.

## Author Contributions

M.J.N. and S.A.P. performed the samples collection and preparation, S.M.C., M.S. and R.K. performed the metabolites analysis. M.L.R., A.M.T. and S.N.C. conceived and designed the experiments. M.L.R. and M.J.N. analysed the data and wrote the paper. M.S., S.N.C. and A.M.T. revised the manuscript.

## Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Arelovich, H.M.; Bravo, R.D.; Martinez, M.F. Development, characteristic, and trends for beef cattle production in Argentina. *Anim. Front.* **2011**, *1*, 37–45.

2. Garcia, P.T.; Pensela, N.A.; Sancho, A.M.; Latimori, N.J.; Kloster, A.M.; Amigone, M.A.; Casal, J.J. Beef lipids in relation to animal breed and nutrition in Argentina. *Meat Sci.* **2008**, *79*, 500–508.
3. Rotolo, G.C.; Rydberg, T.; Lieblein, G.; Francis, C. Emergency evaluation of grazing cattle in Argentina's Pampas. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2007**, *119*, 383–395.
4. Mostrom, M.; Jacobsen, B. Ruminant mycotoxicosis. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* **2011**, *27*, 315–344.
5. Fink-Gremmels, J. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. *Food Addit. Contam. Part A.* **2008**, *25*, 172–180.
6. Zain, M. Impact of mycotoxins on humans and animals. *J. Saudi Chem. Soc.* **2011**, *15*, 129–144.
7. Mathews, K.H.; Vanderveer, M. Beef Production, Markets, and Trade in Argentina and Uruguay: An Overview. Report Economic Research Service, USDA. Available online: <http://www.ers.usda.gov/publications/ldpm-livestock,-dairy,-and-poultry-outlook/ldpm-15901.aspx> (accessed on 20 February 2015).
8. Alonso, V.A.; Pereyra, C.M.; Keller, L.A.M.; Dalcerro, A.M.; Rosa, C.A.R.; Chiacchiera, S.M.; Cavaglieri, L.R. Fungi and mycotoxins in silage: An overview (Review). *J. Appl. Microbiol.* **2013**, *115*, 637–643.
9. Kennedy, D.G.; Hewitt, S.A.; McEvoy, J.D.; Currie, J.W.; Cannavan, A.; Blanchflower, W.J.; Elliot, C.T. Zearanol is formed from *Fusarium* sp. toxins in cattle *in vivo*. *Food Addit. Contam.* **1998**, *15*, 393–400.
10. Smith, J.F.; Morris, C.A. Review of zearalenone studies with sheep in New Zealand. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* **2006**, *66*, 306–310.
11. Ramsar Convention Secretariat. *The Ramsar Convention Manual: A Guide to the Convention on Wetlands (Ramsar, Iran, 1971)*, 6th ed.; Ramsar Convention Secretariat: Gland, Switzerland, 2013.
12. Malachova, A.; Sulyok, M.; Beltrán, E.; Berthiller, F.; Krska, R. Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography — Tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all relevant mycotoxins in four model food matrices. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1362*, 145–156.
13. Sulyok, M.; Berthiller, F.; Krska, R.; Shuhmacher, R. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 2649–2659.
14. Hult, K.; Telling, A.; Gatenbeck, S. Degradation of ochratoxin A in ruminants. *Appl. Environ. Microbiol.* **1976**, *32*, 443–444.
15. Allcroft, R.; Robert, B.A.; Lloyd, M.K. Excretion of aflatoxin in a lactating cow. *Food Cosmet. Toxicol.* **1968**, *6*, 619–625.
16. Engel, V.G.; Hagemeyer, H. Untersuchungen ueber den verblieb von aflatoxin B<sub>1</sub> im Verdaaundtarkt von Kuehen. *Milchwissenschaft* **1978**, *33*, 21–23.
17. Kiessling, K.H.; Pettersson, H.; Sandholm, K. Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **1984**, *47*, 1070–1073.
18. Seeling, K.; Lebzien, P.; Danicke, S.; Spilke, J.; Sudekum, K.H.; Flachowsky, G. Effects of level of feed intake and *Fusarium* toxin contaminated wheat on rumen fermentation as well as on blood and milk parameters in cows. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2006**, *90*, 103–110.

19. Kleinova, M.; Zöllner, P.; Kahlbacher, H.; Hochsteiner, W.; Lindner, W. Metabolic profiles of the mycotoxin zearalenone and of the growth promoter zeranol in urine, liver, and muscle of heifers. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4769–4776.
20. Berthiller, F.; Werner, U.; Sulyok, M.; Krska, R.; Hauser, M.T.; Schuhmacher, R. Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) determination of phase II metabolites of the mycotoxin zearalenone in the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Food Addit. Contam.* **2006**, *23*, 1194–1200.
21. Plasencia, J.; Mirocha, C.J. Isolation and characterization of zearalenone sulfate produced by *Fusarium* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *57*, 146–150.
22. Zhou, T.; He, J.; Gong, J. Microbial transformation of trichothecene mycotoxins. *World Mycotoxin J.* **2008**, *1*, 23–30.
23. Nichea, M.J.; Cendoya, E.; Zchetti, V.G.L.; Chiacchiera, S.M.; Sulyok, M.; Krska, R.; Torres, A.M.; Chulze, S.N.; Ramirez, M.L. Mycotoxin profile of *Fusarium armeniacum* isolated from natural grasses intended for cattle feed. *World Mycotoxin J.* **2015**, *8*, 451–457.
24. Osweiler, G.D. Mycotoxins-contemporary issues of food animal health and productivity. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* **2000**, *16*, 511–530.
25. Eckard, S.; Wettstein, F.E.; Forrer, H.R.Y.; Vogelsang, S. Incidence of *Fusarium* species and mycotoxins in silage maize. *Toxins* **2011**, *3*, 949–967.
26. Schollenberger, M.; Müller, H.M.; Rühle, M.; Suchy, S.; Plank, S.; Drochner, W. Natural occurrence of 16 *Fusarium* toxins in grains and feedstuffs of plant origin from Germany. *Mycopathologia* **2006**, *161*, 43–52.
27. Streit, E.; Schatzmayr, G.; Tassis, P.; Tzika, E.; Marin, D.; Taranu, I.; Tabuc, C.; Nicolau, A.; Aprodu, I.; Puel, O.; *et al.* Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed-focus on Europe. *Toxins* **2012**, *4*, 788–809.
28. Sulyok, M.; Krska, R.; Schuhmacher, R. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semiquantitative screening of moldy food samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 1505–1523.
29. Van Asselt, E.D.; Azambuja, W.; Moretti, A.; Kastelein, P.; De Rijk, T.C.; Stratakou, I.; van der Fels-Klerx, H.J. A Dutch field study on fungal infection and mycotoxin concentrations in maize. *Food Addit. Contam.* **2012**, *29*, 1556–1565.
30. Hadley, G.; Wolf, C.; Harsh, S. Dairy cattle culling patterns, explanations, and implications. *J. Dairy Sci.* **2006**, *89*, 2286–2296.
31. Wenz, J.; Jensen, S.; Lombard, J.; Wagner, B.; Dinsmore, R. Herd management practices and their association with bulk tank somatic cell count on United States dairy operations. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90*, 3652–3659.
32. Wang, Q.; Xu, L. Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: A short review. *Molecules* **2012**, *17*, 2367–2377.
33. Sulyok, M.; Krska, R.; Schuhmacher, R. Application of an LC-MS/MS based multi-mycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds. *Food Chem.* **2010**, *119*, 408–416.

34. Warth, B.; Parich, A.; Atehnkeng, J.; Bandyopadhyay, R.; Schuhmacher, R.; Sulyok, M.; Krska, R. Quantitation of mycotoxins in food and feed from Burkina Faso and Mozambique using a modern LC-MS/MS multitoxin method. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 9352–9363.
35. European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA J.* **2011**, *9*, 2407–2497.
36. Shimshoni, J.A.; Cuneah, O.; Sulyok, M.; Krska, R.; Galon, N.; Sharir, B.; Shlosberg, A. Mycotoxins in corn and wheat silage in Israel. *Food Addit. Contam. Part A* **2013**, *30*, 1614–1625.
37. Desjardins, A. *Fusarium Mycotoxins: Chemistry, Genetics and Biology*; APS Press: St. Paul, MN, USA, 2006; pp. 79–108.
38. Mogensen, J.M.; Sørensen, S.M.; Sulyok, M.; van der Westhuizen, L.; Shephard, G.S.; Frisvad, J.C.; Thrane, U.; Krska, R.; Nielsen, K.F. Single kernel analysis of fumonisins and other fungal metabolites in maize from South African subsistence farmers. *Food Addit. Contam. Part A* **2011**, *28*, 1724–1734.
39. Axford, L.; Simpson, T.; Willis, C. Synthesis and incorporation of the first polyketide synthase free intermediate in monocerin biosynthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 727–730.
40. Yu, J. Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination. *Toxins* **2012**, *4*, 1024–1057.
41. Versilovskis, A.; de Saeger, S. Sterigmatocystin: Occurrence in foodstuffs and analytical methods-an overview. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**, *54*, 136–147.
42. European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the risk for public and animal health related to the presence of sterigmatocystin in food and feed. *EFSA J.* **2013**, *11*, doi:10.2903/j.efsa.2013.3254.
43. European Parliament. Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed. *Off. J. L* **2002**, *140*, 10–21.
44. O'Brien, M.; Nielsen, K.F.; O'Kiely, P.; Forristal, P.D.; Fuller, H.T.; Frisvad, J.C. Mycotoxins and other secondary metabolites produced *in vitro* by *Penicillium paneum* Frisvad and *Penicillium roqueforti* Thom isolated from baled grass silage in Ireland. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9268–9276.
45. Hsu, S-C.; Chung, J.-G. Anticancer potential of emodin. *Biomedicine* **2012**, *2*, 108–116.
46. Jizba, J.; Sedmera, P.; Zima, J.; Beran, M.; Blumauerová, M.; Kandybin, N.V.; Samoukina, G.V. Macrotetrolide antibiotics produced by *Streptomyces globisporus*. *Folia Microbiol.* **1991**, *36*, 437–443.
47. Riet-Correa, F.; Rivero, R.; Odriozola, E.; Adrien, M.; Medeiros, R.M.T.; Schild, A.L. Mycotoxicoses of ruminants and horses. *J. Vet. Diagn. Investig.* **2013**, *25*, 692–708.
48. Driehuis, F.; Spanjer, M.C.; Scholten, J.M.; Te Giffel, M.C. Occurrence of mycotoxins in maize, grass and wheat silage for dairy cattle in the Netherlands. *Food Addit. Contam. Part B Surveill.* **2008**, *1*, 41–50.
49. Reed, K.F.M.; Moore, D.D. A preliminary survey of zearalenone and other mycotoxins in Australian silage and pasture. *Anim. Prod. Sci.* **2009**, *49*, 696–703.
50. Skládanka, J.; Nedělník, J.; Adam, V.; Doležal, P.; Moravcová, H.; Dohnal, V. Forage as a primary source of mycotoxins in animal diets. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2011**, *8*, 37–50.

51. Canevari, P.; Blanco, D.E.; Bucher, E.H.; Castro, G.; Davison, I. (Eds.) *Los Humedales de la Argentina. Clasificación, situación actual, conservación y legislación*; Wetlands International Publication: Buenos Aires, Argentina, 1998; Volume 46, p. 208.
52. Vishwanath, V.; Sulyok, M.; Labuda, R.; Bicker, W.; Krska, R. Simultaneous determination of 186 fungal and bacterial metabolites in indoor matrices by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395*, 1355–1372.
53. European Commission. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off. J. Eur. Union* **2002**, *29*, 10–32.

© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).