

# Micotoxinas en harinas derivadas de trigo y soja detectadas por prueba de Elisa

Alejandra María Peruzzo<sup>(1)</sup> y Rosanna Nora Pioli<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (Conicet), Universidad Nacional de Rosario (UNR), Facultad de Ciencias Agrarias (FCA), Instituto de Investigaciones en Ciencias Agrarias Rosario (IICAR), Campo Experimental J.F. Villarino, CC N° 14, S2125ZAA Zavalla, Santa Fe, Argentina. E-mail: peruzzo@iicar-conicet.gob.ar <sup>(2)</sup>IICAR, UNR, Consejo Investigaciones Científicas UNR (CIUNR), FCA, Laboratorio de Biodiversidad Vegetal y Microbiana (BioVyM), Campo Experimental J.F. Villarino, CC N° 14, S2125ZAA Zavalla, Santa Fe, Argentina. E-mail: pioli@iicar-conicet.gob.ar

Resumen – El objetivo de este trabajo fue evaluar la presencia de micotoxinas en las harinas derivadas de trigo y soja expuestas a la infección de *Fusarium graminearum* y detectadas por prueba de Elisa. La contaminación fue evaluada durante 2010 y 2012, en condiciones de invernadero, a través de inoculaciones artificiales, y en lotes de producción en campo, expuestos a infecciones naturales. Se utilizaron 26 muestras de harinas derivadas de cariopsis de trigo y semillas de soja. La detección de micotoxinas deoxinivalenol y zearalenona se realizó por kit de Elisa. En harinas de trigo de diversos ambientes, se detectaron ambas micotoxinas – deoxinivalenol y zearalenona –, mientras que en harinas de soja sólo se detectó zearalenona. Las concentraciones de esas micotoxinas observadas en las harinas no son admisibles para el consumo humano y animal. El kit de Elisa constituyó una herramienta biotecnológica efectiva para la detección de la contaminación predominante de zearalenona, producida por *F. graminearum*, en harinas de trigo y soja de diferentes ambientes semicontrolados y naturales.

Términos para indexación: *Fusarium graminearum*, *Glycine max*, *Triticum aestivum*, deoxinivalenol, zearalenona.

## Mycotoxins in flours derived from wheat and soybean detected by the Elisa test

Abstract – The objective of this work was to evaluate the presence of mycotoxins in flours derived from wheat caryopses and soybean seed exposed to *Fusarium graminearum* infection and detected by the Elisa test. Contamination was evaluated during 2010 and 2012, in greenhouse conditions, by artificial inoculation, and on field-production batches exposed to natural infections. Twenty-six samples of flours derived from wheat caryopses and soybean seeds were used. Detection of the mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone was performed by an Elisa kit. In wheat flour of different environments both mycotoxins – deoxynivalenol and zearalenone – were detected, while in soybean flour only zearalenone was detected. Mycotoxins concentrations observed in these flours are inappropriate for human and animal consumption. Elisa kit constituted an effective biotechnological tool for the detection of prevailing contamination by zearalenone, caused by *F. graminearum* in wheat and soybean flours of different, semicontrolled and natural environments.

Index terms: *Fusarium graminearum*, *Glycine max*, *Triticum aestivum*, deoxynivalenol, zearalenone.

### Introducción

El complejo fúngico *Fusarium* Link:Fr. ha sido considerado históricamente un patógeno de cereales (*Poaceae*), por ser el agente causal del tizón de plántulas, la fusariosis de la espiga en trigo (FET), y la pudrición de la base de la caña y espiga de maíz (Champeil et al., 2004). En Sur América, los agentes causales aislados frecuentemente son *F. graminearum* Schwabe y *F. culmorum* (W.G. Sm.) (Enfermedades..., 2004), y *F. graminearum* es la especie predominante en la zona central de Argentina (Malbrán et al., 2012). *Fusarium graminearum* se ha aislado también de raíces, tallos, frutos, y semillas de otros cultivos de la familia

Fabaceae, tales como soja, lentejas, habas y arvejas (Pioli et al., 2000). En 2004, se reportó la primera asociación patogénica entre *F. graminearum* y soja (Pioli et al., 2004). En este contexto, la amplia gama de hospedantes de *Fusarium*, el depósito de inóculo en el suelo, los residuos de cultivos predecesores y la falta de estrategias efectivas de control han incrementado la incidencia de la enfermedad en el área agroecológica centro. Asimismo, la rotación de maíz-soja-trigo no inhibe la supervivencia ni el desarrollo del patógeno, cuando las condiciones ambientales son conductivas o favorables para el proceso infeccioso (Pioli et al., 2000).

El principal riesgo alimentario para los productos derivados de cereales consiste en la acumulación de

micotoxinas en los granos infectados (Egmond et al., 2007), debido a que su consumo resulta tóxico para los seres humanos y animales (European Commission, 2006). Las micotoxinas son metabolitos secundarios, que se generan durante el proceso de infección fúngica, y pueden causar intoxicación a quien consuma alimentos por ellas contaminados. El género *Fusarium* produce toxinas de la familia de los tricotecenos (toxina T-2 y deoxinivalenol, entre otras), zearalenona y fumonicina (Presello et al., 2006). Luego de la cosecha, la contaminación toxicogénica suele persistir y hasta incrementar debido a su estabilidad química y térmica (Champeil et al., 2004). Esto impulsó la determinación de umbrales de tolerancia de micotoxinas en harinas y derivados por parte de la Comisión Europea (European Commission, 2006). Por esta razón, la detección y control de estos metabolitos fúngicos son de vital importancia para el consumo interno y el excedente exportable.

Los métodos de detección de micotoxinas frecuentemente utilizados se basan en cromatografía líquida de alta resolución, espectrometría de masas en tándem, resonancia plasmónica superficial o biosensores electroquímicos de afinidad (Vidal et al., 2013). No obstante, estas técnicas requieren un equipamiento costoso y personal altamente capacitado. Por ello, el uso de los kits de detección de toxinas por Elisa (de sus siglas en inglés, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) surgió como alternativa simple, económica, y altamente específica, que tiene la ventaja adicional de ser portables (Zheng et al., 2005). El principio de la técnica se basa en la unión específica de antígeno (micotoxina)-anticuerpo y es una de las más utilizadas en análisis de rutina, para determinar la contaminación de maíz con deoxinivalenol y zearalenona, producidos por *F. graminearum* (Huang et al., 2014), y la detección de aflatoxinas de *Aspergillus niger* en alimentos y subproductos (Pei et al., 2009).

En el contexto regional, *F. graminearum* es uno de los géneros fúngicos más frecuentes y relevantes, por su capacidad de producir micotoxinas en regiones templadas (Serrano et al., 2013). Por ello, resulta prioritaria la detección temprana de estas toxinas por el riesgo alimentario de contaminación y consumo de granos y harinas (Egmond et al., 2007).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la presencia de micotoxinas en las harinas derivadas de cariopsis de

trigo y semillas de soja, expuestas a la infección por *F. graminearum* y detectarlas por prueba de Elisa.

## Material y Métodos

La contaminación de harinas derivadas de cariopsis de trigo y semillas de soja con micotoxinas de *F. graminearum* fue evaluada durante 2010 y 2012, en condiciones de invernadero a través de inoculaciones artificiales, y en lotes de producción en campo, expuestos a infecciones naturales.

Los aislamientos de *F. graminearum* utilizados pertenecen a un set previamente caracterizado por su patogenia in vivo y toxicogenia in vitro, en medio arroz. El aislamiento CE111/04 fue obtenido de *Pisum sativum* L. (arveja), en la localidad de Álvarez, Santa Fe (2004); el CE112/05 fue aislado de *Glycine max* (soja), en la localidad de Clarke, Santa Fe (2005); y el FB39/04 obtenido de *Vicia fava* (haba) en la localidad de Álvarez, Santa Fe (2004). Las inoculaciones se realizaron en los cultivares 'Federal' y 'BioInta 1006', de *Triticum aestivum* (trigo), y el cultivar pre-comercial 'CSOSU.1' de soja, seleccionados por su susceptibilidad al patógeno (Peruzzo, 2015). En cada interacción cultivar-aislamiento de *F. graminearum* (nueve tratamientos), se inocularon tres repeticiones de 10 espigas de trigo (total 30 espigas), y las vainas de tres repeticiones de 10 plantas del cultivar de soja (Cuadro 1). Las inoculaciones para obtener semillas potencialmente contaminadas con micotoxinas de *F. graminearum* se repitieron en dos ciclos: año 1, de ajuste metodológico; y año 2, de replicación. Los tratamientos fueron incluidos en un diseño de bloques completos aleatorizados.

A fin de comparar y validar los resultados, en las harinas obtenidas de las inoculaciones, se evaluaron las siguientes moliendas producidas en ambiente semicontrolado de invernadero y en lotes de producción en campo: muestras de cariopsis y semillas de los mismos cultivares de trigo y soja de invernadero, sin inoculación; muestras de cariopsis y semillas de los mismos cultivares de trigo y soja, expuestos a infección natural de *F. graminearum*; y, muestras de cariopsis y semillas de cultivares comerciales de trigo y soja, expuestos a cultivares con infecciones naturales de *F. graminearum* provenientes de agriculturas de la provincia de Santa Fe (Argentina) (Cuadro 1). Las muestras obtenidas en los distintos tratamientos fueron

almacenadas a 4°C, en bolsas de papel marrón, hasta su uso.

La toma de muestras para la molienda y la obtención de sus respectivas harinas se realizaron de acuerdo a las Reglas Internacionales para Evaluación de Semillas (International Seed Testing Association, 2012). La molienda diferenciada de las semillas y cariopsis correspondientes a cada tratamiento se realizó con un molinillo de laboratorio (tamaño de partícula de 11 µm), que resultó en harina de cuatro tratamientos de soja y ocho de trigo, en invernadero, junto con cuatro tratamientos de soja y 10 de trigo en campo.

La cuantificación de las micotoxinas deoxinivalenol y zearalenona se realizó mediante la utilización

de un kit de Elisa, Ridascreen Fast, (R-Biopharm, GmbH, Darmstadt, Alemania). Para ello, cada pocillo se cubrió con anticuerpos de captura contra anticuerpos antimicotoxinas. Se agregaron estándares de deoxinivalenol o zearalenona para obtener la curva de calibración o las soluciones muestrales a evaluar. Luego, se adicionaron a dichos pocillos el conjugado micotoxinas-enzimas y anticuerpos-anticmicotoxinas. La micotoxina libre y el conjugado micotoxina-enzima compiten para unirse a sitios del anticuerpo-anticmicotoxina. Paralelamente, los anticuerpos antimicotoxina se unieron a los anticuerpos de captura. El conjugado micotoxina-enzima que no se unió fue removido por lavados con tampón fosfato 10 mmol L<sup>-1</sup> Tween 20. El sustrato cromógeno fue agregado a los pocillos y puesto a incubar. La subsecuente reacción produjo una coloración azul, que al adicionar la solución de corte, viró al amarillo. Esta reacción colorimétrica se midió a 450 nm, con un espectrofotómetro de microtitulación, Metrolab 950, (Neocientífica SA, Córdoba, Argentina). El límite de cuantificación fue de 200 y 50 ppb para deoxinivalenol y zearalenona, respectivamente. La concentración de micotoxina para cada tratamiento fue calculada usando el software Ridasoft Win (R-Biopharm, GmbH, Darmstadt, Alemania), para determinaciones individuales, en base al porcentaje de absorbancia (%A), donde: %A = (absorbancia estándar/absorbancia estándar cero) × 100, linealizada mediante logit/log (Aydin et al., 2011). La Unión Europea ha regulado los valores umbrales para el caso de las semillas o cariopsis de cereales (*Poaceae*), definiendo los límites de cuantificación en 750 ppb, para deoxinivalenol, y 100 ppb para zearalenona (European Commission, 2006). Sin embargo, no se dispone de umbrales en semillas y derivados de leguminosas (*Fabaceae*), por ello, se consideraron los mismos niveles de tolerancia definidos para cereales.

Durante un primer experimento, se realizó el ajuste metodológico de la aplicación del kit Ridascreen Fast Deoxinivalenol y se calibró el lector manual de Elisa en paralelo a la medición de un lector de 96 pocillos (Stat Fax 2100 Microplate Reader, Awareness Technology Inc., Florida, Estados Unidos), perteneciente a la Cátedra de Inmunología de la Facultad de Ciencias Médicas, de la Universidad Nacional de Rosario.

Durante el segundo experimento, se realizó un nuevo ajuste del kit y del lector manual de Elisa y

**Cuadro 1.** Muestras de cariopsis de trigo y soja, sometidas a distintas condiciones ambientales (inoculación en invernadero y lotes de producción en campo), evaluadas para la cuantificación de micotoxinas.

Especie	Cultivar	Origen, año de recolección
Inoculación, en invernadero		
Trigo	'Federal' (CE111/04) <sup>(1)</sup>	Zavalla, 2012
	'Federal' (FB39/04) <sup>(1)</sup>	Zavalla, 2012
	'Federal' (CE112/05) <sup>(1)</sup>	Zavalla, 2012
	'BioINTA 1006' (CE111/04) <sup>(1)</sup>	Zavalla, 2012
	'BioINTA 1006' (FB39/04) <sup>(1)</sup>	Zavalla, 2012
	'BioINTA 1006' (CE112/05) <sup>(1)</sup>	Zavalla, 2012
	'Federal' (control invernadero)	Zavalla, 2012
Soja	'CSOSU.1' (CE111/04) <sup>(1)</sup>	Zavalla, 2012
	'CSOSU.1' (FB39/04) <sup>(1)</sup>	Zavalla, 2012
	'CSOSU.1' (CE112/05) <sup>(1)</sup>	Zavalla, 2012
	'CSOSU.1' (control invernadero)	Zavalla, 2012
Lotes de producción, en campo		
Trigo	'Federal' (control natural)	Oliveros, 2010
	'BioINTA' (control natural)	Oliveros, 2010
	'Gavilán'	Pujato, 2010
	'Cronox'	Pujato, 2010
	'Baguette 9'	Casilda, 2010
	'Baguette 11'	Fuentes, 2010
	'Baguette 17'	Casilda, 2010
	'ACA315'	Casilda, 2010
	'Themix 1'	Casilda, 2010
	'Themix 2'	Casilda, 2010
Soja	'CSOSU.1' (control natural)	Venado Tuerto, 2010
	'A3700'	Salto, 2010
	'Torcacita 58'	Salto, 2010
	'NA3731'	Salto, 2010

<sup>(1)</sup>Cepas de *Fusarium graminearum* inoculadas en los cultivares, en invernadero.

se determinó la concentración de ambas micotoxinas – deoxinivalenol y zearalenona – en las muestras de harina, de acuerdo al protocolo especificado por Ridascreen Fast Deoxinivalenol y Zearalenona. Los kits fueron almacenados a 4°C y se llevaron a temperatura ambiente antes de su uso. La extracción de deoxinivalenol se realizó con agua destilada y, para zearalenona, se utilizó metanol 70%.

## Resultados y Discusión

Durante el primer experimento en invernadero, las muestras de harina de trigo fueron limitadas debido a la escasa obtención de cariopsis a partir de espigas infectadas. Sin embargo, se obtuvieron harinas derivadas de semillas de soja infectadas con los tres aislamientos de *F. graminearum* (Cuadro 2). Se realizó el ajuste metodológico de la aplicación del kit Ridascreen Fast Deoxinivalenol y calibración del lector manual de Elisa. Durante esta evaluación, los aislamientos de *F. graminearum* toxicogénicos, in vitro, transmitieron deoxinivalenol de las semillas a la harina de soja (in vivo), pero en valores inferiores al umbral de tolerancia definido por la Unión Europea para las harinas de cereales (750 ppb) (Cuadro 2). A su vez, los valores experimentales obtenidos por el lector manual no mostraron diferencias con los obtenidos por el citado lector de referencia.

En el segundo ciclo de inoculaciones, obtención de semillas y molienda, se determinó la concentración de ambas micotoxinas, deoxinivalenol y zearalenona, en las harinas derivadas de todos los tratamientos: cultivares inoculados en invernadero, los expuestos a infección de *F. graminearum*, en condiciones naturales, y sus respectivos controles (Cuadros 3 y 4). Los cultivares de trigo con inoculación de CE111/04 presentaron valores superiores al umbral exigido para ambas micotoxinas (Cuadro 3); y el cultivar 'BioINTA'

**Cuadro 2.** Concentración de deoxinivalenol<sup>(1)</sup>, en harina derivada de vainas de soja 'CSOSU.1' infectadas con tres cepas de *Fusarium graminearum* (experimento1).

Aislamiento	Deoxinivalenol (ppb)
'CSOSU.1' (FB39/04)	294
'CSOSU.1' (CE111/04)	<222
'CSOSU.1' (CE112/05)	<222

<sup>(1)</sup>Rango de detección del kit para deoxinivalenol: 222–6000 ppb. Umbrales de tolerancia para harinas de cereales y soja: 750 ppb.

infectado con FB39/04 también presentó valores de deoxinivalenol superiores al umbral. Por su parte, los mismos cultivares 'Federal' y 'BioINTA', infectados con CE112/05, superaron el umbral de la Unión Europea para la toxina zearalenona. Estos datos muestran que los dos cultivares de trigo elegidos por su susceptibilidad a la *Fusariosis* resultaron también sensibles a ambas micotoxinas, deoxinivalenol y zearalenona (Cuadro 3). Los controles de invernadero no infectados mostraron valores de concentraciones menores que los del umbral y aceptables para el consumo.

El cultivar 'Federal', expuesto a la infección de *F. graminearum* en condiciones naturales, fue el único control que superó el umbral admitido de zearalenona. Esto podría deberse a su susceptibilidad al hongo combinada con el ambiente presente, durante el ciclo de cultivo, lo que resultó favorable para la infección y el desarrollo de la enfermedad, según lo reportado por Moschini et al. (2001) para la zona del sur de Santa Fe.

**Cuadro 3.** Concentración de deoxinivalenol y zearalenona, en harinas de cultivares de trigo infectados con tres aislamientos de *Fusarium graminearum* y expuestos a condiciones naturales para la infección.

Cultivar	Deoxinivalenol (ppb)	Zearalenona (ppb)
Inoculación, en invernadero		
'Federal' (CE111/04) <sup>(1)</sup>	>6000*	188,88*
'Federal' (FB39/04) <sup>(1)</sup>	<222	63,39
'Federal' (CE112/05) <sup>(1)</sup>	<222	306,74*
'Federal' (control invernadero)	233	<50
'BioINTA' (CE111/04) <sup>(1)</sup>	>6000*	>400*
'BioINTA' (FB39704) <sup>(1)</sup>	>6000*	<50
'BioINTA' (CE112/05) <sup>(1)</sup>	<222	260,80*
'BioINTA' (control invernadero)	234	<50
Lotes de producción, en campo		
'Federal' (control natural)	<222	197,08*
'BioINTA' (control natural)	<222	<50
'Gavilán'	253	<50
'Cronox'	<222	<50
'Baguette9'	<222	<50
'Baguette11'	<222	<50
'Baguette17'	<222	<50
'ACA315'	<222	<50
'Themix1'	251	<50
'Themix2'	277	<50

<sup>(1)</sup>Cepas de *Fusarium graminearum* inoculadas en los cultivares de trigo, en invernadero. Rango de detección del kit: para deoxinivalenol, 222–6000 ppb; para zearalenona, 50–400 ppb. \*Valores superiores a los niveles máximos regulados por la Unión Europea en alimentos. Umbrales de tolerancia de la Unión Europea para harinas de cereales y soja: 750 ppb, para deoxinivalenol; y 100 ppb, para zearalenona.

Asimismo, Martínez et al. (2010) y Aydin et al. (2011) detectaron una correlación positiva entre el contenido de humedad, durante el período de producción de semillas y molienda, y el contenido de fumonisinas en maíz y aflatoxinas en arroz, respectivamente. Por otro lado, la harina de los cultivares comerciales expuestos a distintos ambientes de producción presentaron valores inferiores al umbral, para ambas toxinas, coincidiendo con ambientes no conductivos para la enfermedad (Cuadro 3).

En el caso de soja, el cultivar 'CSOSU.1' solamente presentó valores superiores al umbral para zearalenona, en las interacciones con FB39/04 y CE112/05 (Cuadro 4), expresando susceptibilidad sólo para dicha toxina. La presencia de tricotecenos, eniانتinas, y zearalenona producidos por distintas especies de *Fusarium* en leguminosas fue reportada previamente en el Norte de Australia por Tan et al. (2011).

Por su parte, el control de invernadero sin inoculación mostró valores admitidos por la Unión Europea, para ambas micotoxinas evaluadas. Sin embargo, el control 'CSOSU.1', expuesto a condiciones naturales en lotes de producción, presentó un valor superior al umbral establecido por la Unión Europea para zearalenona (Cuadro 4), por causas similares a las referidas previamente para el respectivo control de trigo. El resto de los cultivares comerciales, expuestos a distintos ambientes de producción, presentaron

valores admisibles para ambas micotoxinas, lo que evidencia que tales condiciones ambientales no fueron conductivas para la producción de toxinas en los respectivos controles de trigo.

Al comparar el comportamiento toxicogénico in vitro e in vivo de cada aislamiento, se pudo observar que CE111/04, en interacciones in vivo, amplió su perfil toxicogénico, produciendo no sólo deoxinivalenol, si no también zearalenona en valores de rechazo por el riesgo de toxicidad alimentaria. CE112/05 mantuvo su perfil toxicogénico in vitro como in vivo, superando el umbral admitido para zearalenona. FB39/04 produjo distintas micotoxinas, sea in vitro sobre sustrato arroz (deoxinivalenol) o in vivo (zearalenona). Estos datos corroboran los de Covarelli et al. (2012), que destacaron que algunos aislamientos de *F. verticillioides* eran capaces de producir potencialmente éstas y otras micotoxinas bajo condiciones ambientales particulares y diversas, y que esta capacidad podía revertirse o restituirse. Las cepas de *F. graminearum* evaluadas en interacciones con trigo produjeron ambas micotoxinas, deoxinivalenol (>750 ppb) y zearalenona (>100 ppb), en concentraciones no admisibles para el consumo, mientras que al interactuar con soja, sólo produjeron valores no admisibles de zearalenona (Cuadros 3 y 4).

En resumen, la cantidad de deoxinivalenol y zearalenona, detectadas usando kits de Elisa en las harinas, fue diferente como consecuencia de las interacciones o tratamientos, observándose que la contaminación con zearalenona fue la predominante en la mayoría de las muestras de trigo y soja. Estos resultados son nóveles y discrepan de estudios previos, que afirman que el deoxinivalenol, sus acetilados y nivalenol producidos por *F. graminearum* eran dominantes en el área de trigo de Argentina (Reynoso et al., 2011; Sampietro et al., 2011). Estos también proporcionan una perspectiva distinta sobre la producción de diferentes tipos de micotoxinas en el país. Adicionalmente, los aislamientos se identificaron como productores de diferentes tipos y niveles de toxinas, independientemente de su producción in vitro o in vivo, dependiendo del hospedante y del ambiente a los que estuvieron expuestos. En algunos casos, se obtuvieron co-ocurrencias de deoxinivalenol y zearalenona, en dos cultivares de trigo infectados por la misma cepa del hongo, tal cual lo observado previamente por varios autores para distintos tipos de micotoxinas (Stratton et al., 1993; Park et al., 1996; Muthomi et al., 2008). Por su

**Cuadro 4.** Concentración de deoxinivalenol y zearalenona, en semillas de soja infectadas con tres aislamientos de *Fusarium graminearum* y expuestas a condiciones naturales para la infección.

Cultivar	Deoxinivalenol (ppb)	Zearalenona (ppb)
Inoculación, en invernadero		
'CSOSU.1' (CE111/04) <sup>(1)</sup>	<222	89,92
'CSOSU.1' (FB39/04) <sup>(1)</sup>	<222	112,23*
'CSOSU.1' (CE112/05) <sup>(1)</sup>	310	124,30*
'CSOSU.1' (control invernadero)	<222	77,89
Lotes de producción, en campo		
'CSOSU.1' (control natural)	<222	104,31*
'Torcasita58'	225	<50
'A3700'	272	<50
'NA3731'	<222	<50

<sup>(1)</sup>Cepas de *Fusarium graminearum* inoculadas en el cultivar de soja susceptible, en invernadero. Rango de detección del kit: para deoxinivalenol, 222–6000 ppb; para zearalenona, 50–400 ppb. \*Valores superiores a los niveles máximos regulados por la Unión Europea en alimentos. Umbrales de tolerancia de la Unión Europea para harinas de cereales y soja: 750 ppb, para deoxinivalenol; y 100 ppb, para zearalenona.

parte, algunos reportes previos afirman la existencia de una correlación entre el índice de la enfermedad y el contenido de deoxinivalenol (Bai et al., 2001). Sin embargo, los resultados del presente estudio muestran que deoxinivalenol y zearalenona actuaron como factores toxicogénicos asociados principalmente a la contaminación y transmisión a las harinas de trigo y soja, más que como factores de patogenicidad de *F. graminearum* asociados a la severidad sintomática, generada en las espigas de trigo y vainas de soja durante el proceso de infección. Esto podría atribuirse a los recursos nutricionales que la planta le provee al hongo y al tiempo de exposición a las condiciones climáticas presentes entre el momento de transmisión y la cosecha (Champeil et al., 2004). Del Ponte et al. (2007) propusieron que las interacciones planta-hospedante-patógeno establecidas, los factores modificantes como la avirulencia / virulencia, la toxicogenia de las cepas de *F. graminearum*, y la resistencia de los cultivares al desarrollo del patógeno moldean las respuestas del hospedante, aunque cabe destacar que ciertos genotipos vegetales limitan el desarrollo del micelio en el grano, pero no son tolerantes a las micotoxinas. Por el contrario, otros tipos de cultivares pueden presentar síntomas graves y con bajos niveles de micotoxinas (Bai et al., 2001). Este caso permite inferir que la disminución en los niveles de micotoxina deoxinivalenol podría explicarse por la acción de enzimas vegetales que actúan en la detoxificación de la misma micotoxina, tal como lo observaron previamente Cowger & Arellano (2013).

Los controles de invernadero sin inoculación, tanto en trigo como en soja, mostraron valores de concentraciones de toxinas menores que los del umbral y aceptables para el consumo. La harina de los cultivares comerciales expuestos a infecciones naturales de otras cepas de *F. graminearum* presentaron valores inferiores al umbral de tolerancia para ambas micotoxinas, salvo en el caso de los cultivares de control de campo – 'Federal', de trigo, y 'CSOSU.1', de soja –, cuyas harinas tuvieron valores de zearalenona superiores al umbral de tolerancia debido a la combinación de su susceptibilidad y la infección de una cepa virulenta de *F. graminearum*, favorecida por ambientes conductivos tanto al desarrollo de la enfermedad como a la producción y transmisión de sus toxinas.

## Conclusiones

1. La prueba de Elisa constituyó una herramienta biotecnológica efectiva para la detección de micotoxinas de *Fusarium graminearum*.

2. En interacciones con *Triticum aestivum*, *F. graminearum* produjo deoxinivalenol y zearalenona en concentraciones no admisibles por su toxicidad para el consumo humano y animal.

3. Al interactuar con *Glycine max*, *F. graminearum* produjo valores no admisibles de zearalenona.

4. Las harinas del cultivar 'Federal', de trigo, y 'CSOSU.1', de soja, expuestos a infecciones naturales de *F. graminearum* en lotes de producción, mostraron valores de zearalenona superiores al umbral de tolerancia.

5. La contaminación con zearalenona fue predominante en las muestras de harinas de trigo y soja evaluadas.

## Agradecimientos

A la Fundación Nuevo Banco de Santa Fe, a la Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación de la Pcia. Santa Fe, y al Programa Estratégico Alimentario 2011.

## Referencias

- AYDIN, A.; AKSU, H.; GUNSEN, U. Mycotoxin levels and incidence of mould in Turkish rice. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.178, p.271-280, 2011. DOI: 10.1007/S10661-010-1688-9.
- BAI, G.-H.; PLATTNER, R.; DESJARDINS, A.; KOLB, F. Resistance to *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat. **Plant Breeding**, v.120, p.1-6, 2001.
- CHAMPEIL, A.; FOURBET, J.F.; DORÉ, T.; ROSSIGNOL, L. Influence of cropping system on *Fusarium* head blight and mycotoxin levels in winter wheat. **Crop Protection**, v.23, p.531-537, 2004. DOI: 10.1016/j.cropro.2003.10.011.
- COVARELLI, L.; STIFANO, S.; BECCARI, G.; RAGGI, L.; LATTANZIO, V.M.T.; ALBERTINI, E. Characterization of *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Italy: fumonisin production, pathogenicity and genetic variability. **Food Microbiology**, v.31, p.17-24, 2012. DOI: 10.1016/j.fm.2012.02.002.
- COWGER, C.; ARELLANO, C. *Fusarium graminearum* infection and deoxynivalenol concentrations during development of wheat spikes. **Phytopathology**, v.103, p.460-471, 2013. DOI: 10.1094/PHYTO-03-12-0054-R.
- DEL PONTE, E.M.; FERNANDES, J.M.C.; BERGSTROM, G.C. Influence of growth stage on *Fusarium* head blight and

- deoxynivalenol production in wheat. **Journal of Phytopathology**, v.155, p.577-581, 2007. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2007.01281.x.
- EGMOND, H.P. van; SCHOTHORST, R.C.; JONKER, M.A. Regulations relating to mycotoxins in food: perspectives in a global and European context. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.389, p.147-157, 2007. DOI: 10.1007/s00216-007-1317-9.
- ENFERMEDADES del maíz: una guía para su identificación en el campo. 4.ed. México: CIMMYT, 2004. 123p.
- EUROPEAN COMMISSION. Commission regulation (EC) n.º 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, Brussels, 20 Dec. 2006, v.364, p.5-24.
- HUANG, Y.; XU, Y.; HE, Q.; CHU, J.; DU, B.; LIU, J. Determination of zearalenone in corn based on a biotin-avidin amplified enzyme-linked immunosorbent assay. **Food and Agricultural Immunology**, v.25, p.186-199, 2014. DOI: 10.1080/09540105.2012.759540.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Sampling. In: INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **International rules for seed testing**: edition 2012: adopted at the Ordinary Meeting 2011, Glattbrugg, Switzerland to become effective on 1 January 2012. Zürichstr: International Seed Testing Association, 2012. p.2-50.
- MALBRÁN, I.; MOURELOS, C.A.; GIROTTI, J.R.; AULICINO, M.B.; BALATTI, P.A.; LORI, G.A. Aggressiveness variation of *Fusarium graminearum* isolates from Argentina following point inoculation of field grown wheat spikes. **Crop Protection**, v.42, p.234-243, 2012. DOI: 10.1016/j.cropro.2012.05.025.
- MARTÍNEZ, M.; MOSCHINI, R.; BARRETO, D.; BODEGA, J.; COMERIO, R.; FORJAN, H.; PIATTI, F.; PRESELLO, D.; VALENTINUZ, O. Factores ambientales que afectan el contenido de fumonisina en granos de maíz. **Tropical Plant Pathology**, v.35, p.277-284, 2010.
- MOSCHINI, R.C.; PIOLI, R.; CARMONA, M.; SACCHI, O. Empirical predictions of wheat head blight in the northern Argentinean Pampas Region. **Crop Science**, v.41, p.1541-1545, 2001. DOI: 10.2135/cropsci2001.4151541x.
- MUTHOMI, J.W.; NDUNG'U, J.K.; GATHUMBI, J.K.; MUTITU, E.W.; WAGACHA, J.M. The occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in Kenyan wheat. **Crop Protection**, v.27, p.1215-1219, 2008. DOI: 10.1016/j.cropro.2008.03.001.
- PARK, J.J.; SMALLEY, E.B.; CHU, F.S. Natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in field samples from the 1992 Wisconsin corn crop. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.1642-1648, 1996.
- PEI, S.C.; ZHANG, Y.Y.; EREMIN, S.A.; LEE, W.J. Detection of aflatoxin M1 in milk products from China by ELISA using monoclonal antibodies. **Food Control**, v.20, p.1080-1085, 2009. DOI: 10.1016/j.foodcont.2009.02.004.
- PERUZZO, A. Efecto de la capacidad toxicogénica de *Fusarium graminearum* y especies relacionadas sobre la calidad fisiológica de las semillas y harinas de trigo y soja. 2015. 119p. Tesis (Maestría) - Universidad Nacional de Rosario, Zavalla.
- PIOLI, R.N.; BENAVIDEZ, R.; MORANDI, E.N.; BODRERO, M. Estudio epidemiológico de enfermedades asociadas a carpelos y semillas de soja en Santa Fe, Argentina. **Fitopatología**, v.35, p.111-118, 2000.
- PIOLI, R.N.; MOZZONI, L.; MORANDI, E.N. First report of pathogenic association between *Fusarium graminearum* and soybean. **Plant Disease**, v.88, p.220, 2004. DOI: 10.1094/PDIS.2004.88.2.220A.
- PRESELLO, D.A.; IGLESIAS, J.; BOTTA, G.; REID, L.M.; LORI, G.A.; EYHÉRABIDE, G.H. Stability of maize resistance to the ear rots caused by *Fusarium graminearum* and *F. verticillioides* in Argentina and Canadian environments. **Euphytica**, v.147, p.403-407, 2006. DOI: 10.1007/s10681-005-9037-8.
- REYNOSO, M.M.; RAMIREZ, M.L.; TORRES, A.M.; CHULZE, S.N. Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* strains isolated from wheat in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v.145, p.444-448, 2011. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.020.
- SAMPIETRO, D.A.; DÍAZ, C.G.; GONZALEZ, V.; VATTUONE, M.A.; PLOPER, L.D.; CATALAN, C.A.N.; WARD, T.J. Species diversity and toxigenic potential of *Fusarium graminearum* complex isolates from maize fields in northwest Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v.145, p.359-364, 2011. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.021.
- SERRANO, A.B.; FONT, G.; MAÑES, J.; FERRER, E. Emerging *Fusarium* mycotoxins in organic and conventional pasta collected in Spain. **Food and Chemical Toxicology**, v.51, p.259-266, 2013. DOI: 10.1016/j.fct.2012.09.034.
- STRATTON, G.W.; ROBINSON, A.R.; SMITH, H.C.; KITTILSEN, L.; BARBOUR, M. Levels of five mycotoxins in grains harvested in Atlantic Canada as measured by high performance liquid chromatography. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.24, p.399-409, 1993. DOI: 10.1007/BF01128740.
- TAN, D.C.; FLEMATTI, G.R.; GHISALBERTI, E.L.; SIVASITHAMPARAM, K.; CHAKRABORTY, S.; OBANOR, F.; BARBETTI, M.J. Mycotoxins produced by *Fusarium* species associated with annual legume pastures and 'sheep feed refusal disorders' in Western Australia. **Mycotoxin Research**, v.27, p.123-135, 2011. DOI: 10.1007/s12550-010-0085-0.
- VIDAL, J.C.; BONEL, L.; EZQUERRA, A.; HERNÁNDEZ, S.; BERTOLÍN, J.R.; CUBEL, C.; CASTILLO, J.R. Electrochemical affinity biosensors for detection of mycotoxins: a review. **Biosensors and Bioelectronics**, v.49, p.146-158, 2013. DOI:10.1016/j.bios.2013.05.008.
- ZHENG, Z.; HANNEKEN, J.; HOCHINS, D.; KING, R.S.; LEE, P.; RICHARD, J.L. Validation of an ELISA test kit for the detection of ochratoxin A in several food commodities by comparison with HPLC. **Mycopathologia**, v.159, p.265-272, 2005. DOI: 10.1007/S11046-004-8663-3.