

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 α y β -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 zeranol 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 zeranol 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 m² (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 λ 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 α . 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 mm² 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.

Szécsi, 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.