



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Tesis Doctoral

Caracterización de *Fusarium poae* mediante
metodologías moleculares y su potencial
producción de toxinas

Lic. María Inés Dinolfo

Dr. Sebastián A. Stenglein

Director

Dra. María Laura García

Asesor Académico

2014



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECRETARIA DE POSGRADO

Tesis Doctoral para optar al grado académico de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas Área Ciencias Biológicas - Acreditada por CONEAU. Categoría A. Res. 521/01.

Tesis Doctoral

Caracterización de *Fusarium poae* mediante metodologías moleculares y su potencial producción de toxinas

Lic. María Inés Dinolfo

Tesista

Comité Evaluador:

Dra. Graciela Pose

Dra. Resnik Silvia

Dra. Alconada Magliano Teresa María

....A Tar,
.....A mis pequeños grandes héroes, Santi y Nico
.....A ese angelito que me ilumina desde algún lado, Alejandro.....

Agradecimientos

- A mi familia por acompañarme en todas mis decisiones.
- A mis abuelos por tener siempre la palabra justa.
- A Sebastián por ser un excelente director, por guiarme, enseñarme, transmitirme su pasión y lo más importante, por dejarme ser, por aceptar mis ideas y opiniones. GRACIAS!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
- A Sebastián y sobre todo a Virginia, porque no me olvido que gracias a ustedes pude desarrollar mi tesis en Azul. Siempre les estaré agradecida.
- A mis *co-equipers* Lu y Eli, por ser pilares en estos años, por tantos momentos de alegría, viajes y demás, con ustedes da gusto venir a trabajar. Gracias por aguantarme estos años.
- A mis amigos de Posadas, los de siempre, por recorrer todos los caminos juntos y ser las personas más maravillosas que me pudo haber dado la vida.
- A mis compañeros, Fabricio, Sol, Maxi, Ceci, John, Germán por haber compartido todos estos años y hacer de Genética un lugar agradable para trabajar.
- A las personas que colaboraron de una u otra manera con esta tesis: Guille, Germán, Adriana, Agustín, Silvina y Ángeles.
- A la Universidad Nacional de Misiones por mi formación de grado.
- A la Facultad de Agronomía de Azul y al Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de La Plata.
- A la ANPCyT y CONICET por las becas brindadas.
- Al PRH0032/PICT 110-2008 por financiar el trabajo de esta tesis doctoral.
- A mi entrañable *ansiedad* que por lo que veo me va a acompañar varios años más.
- A todas aquellas personas que colaboraron para que hoy pueda estar defendiendo esta tesis.

Índice General

- Capítulo I

Introducción general

- Capítulo 2

Materiales y métodos

- Capítulo 3

Caracterización de aislamientos de *Fusarium poae* mediante metodologías moleculares

- Capítulo 4

Identificación de regiones codificantes asociadas a la producción de toxinas del patógeno

- Capítulo 5

Conclusiones y perspectivas finales

Índice

• Capítulo I

1.1	Conceptos generales de cultivo de trigo y cebada	1
1.2	Generalidades de la fusariosis	4
1.3	Sintomatología	5
1.4	El género <i>Fusarium</i>	9
1.5	Agente causal	9
1.6	Reproducción y variabilidad en <i>Fusarium poae</i>	14
1.7	Caracterización molecular: marcadores de ADN	17
○	Marcadores de tipo ISSR	19
○	Marcadores de tipo AFLP	21
○	Marcadores de tipo SRAP	23
1.8	Micotoxinas	24
1.9	Micotoxinas producidas por <i>Fusarium poae</i>	27
1.10	Situación actual en la Argentina	31
1.11	Hipótesis	33
1.12	Objetivos	33
1.12.1	Objetivo general	33
1.12.2	Objetivos particulares	33

• Capítulo II

2.1	Recolección de las muestras	34
2.2	Extracción del ADN	42
2.3	Reacciones específicas para <i>Fusarium poae</i>	43
2.4	Conservación de los aislamientos obtenidos	45
2.5	Amplificaciones de regiones MAT-1 y MAT-2	46
2.6	Amplificaciones mediante marcadores de tipo ISSR	48

2.6.1 Visualización de los fragmentos amplificados	49
2.6.2 Tinción y revelado de geles de poliacrilamida	50
2.7 Amplificaciones mediante marcadores de tipo AFLP	51
o Digestión de ADN	51
o Ligación de adaptadores	52
o Reacción de amplificación pre-selectiva	53
o Amplificación selectiva	54
2.7.1 Visualización de los fragmentos amplificados	55
2.8 Amplificaciones mediante marcadores de tipo SRAP	56
2.8.1 Secuenciación de fragmentos obtenidos mediante marcadores de tipo SRAP	58
2.9 Análisis estadístico de los datos para la totalidad de los marcadores empleados	59
2.10 Análisis molecular de la varianza y de variabilidad genética	62
2.11 Aislamientos utilizados para detectar aislamientos de <i>Fusarium poae</i> con el potencial de producir nivalenol	64
2.12 Muestras de semillas	64
2.12.1 Extracción del ADN	65
2.13 Secuenciamiento de productos amplificados	66
2.14 Protocolo de PCR	67
2.15 Análisis de Nivalenol y Deoxynivalenol mediante HPLC/FD	68

• Capítulo III

3 Resultados	70
3.1 Aislamientos de <i>Fusarium poae</i> utilizados para este estudio	70
3.2 Amplificación de regiones MAT-1 y MAT-2	71
3.3 Resultados de los marcadores ISSR	74

3.4 Resultados de los marcadores AFLP	80
3.5 Comparación de matrices de similitudes	86
3.6 Discusión	86
3.7 Resultados de los marcadores SRAP	91
3.7.1 Fragmentos secuenciados obtenidos mediante marcadores SRAP	97
3.8 Discusión	98

- **Capítulo IV**

4.1 Resultados	102
4.2 Discusión	104

- **Capítulo V**

5.1 Conclusiones y perspectivas finales	108
---	-----

- **Referencias bibliográficas**

Referencias bibliográficas	111
Publicaciones derivadas de la presente tesis	128

Índice de figuras

Figura 1. Triángulo de la enfermedad	6
Figura 2. Espigas de trigo con síntomas de fusariosis	8
Figura 3. Granos de trigo infectados con <i>Fusarium</i>	8
Figura 4. A-Espiga de trigo infectada con <i>Fusarium poae</i> . B- Espiga de trigo sana.	13
Figura 5. A- Granos de trigo infectados con <i>Fusarium poae</i> . B-Granos de trigo sanos.	13
Figura 6. Principios del método de ISSR	19
Figura 7. Principios del método de AFLP	22
Figura 8. Principios del método de SRAP	24
Figura 9. Estructura química del nivalenol	28
Figura 10. ‘Cluster TRI’ responsable de la biosíntesis de tricotecenos. Adaptados de Desjardins (2006)	30
Figura 11. Observación al microscopio de un aislamiento identificado morfológicamente como <i>Fusarium poae</i>	35
Figura 12. Origen de los aislamientos de <i>Fusarium poae</i> estudiados	42
Figura 13. Conservación de los aislamientos de <i>Fusarium poae</i>	45
Figura 14. Amplificación del fragmento de 220 pb específico para <i>Fusarium poae</i>	70
Figura 15. Reacción de PCR simple MAT-1 y MAT-2	71
Figura 16. Reacción de PCR ‘multiplex’ MAT-1 y MAT-2	71
Figura 17. Patrones de amplificación obtenidos con el cebador Biolab E	75
Figura 18. Dendograma obtenido del análisis de marcadores ISSR	77
Figura 19. Patrones de amplificación obtenidos con la combinación ECO-AC/MSE-CC	80

<u>Figura 20.</u> Dendograma obtenido mediante marcadores moleculares de tipo AFLP	83
<u>Figura 21.</u> Patrones de amplificación obtenidos con la combinación SRAP2F/SRAP3R	91
<u>Figura 22.</u> Dendograma obtenido mediante marcadores moleculares de tipo SRAP	93
<u>Figura 23.</u> Amplificación del fragmento específico para detectar aislamientos de <i>Fusarium poae</i> con el potencial de producir nivalenol	102

Índice de tablas

<i>Tabla 1.</i> Aislamientos de <i>Fusarium poae</i> utilizados en esta tesis	37
<i>Tabla 2.</i> Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de MAT-1 y MAT-2	47
<i>Tabla 3.</i> Secuencias y temperaturas de apareamiento de los cebadores utilizados	49
<i>Tabla 4.</i> Componentes de la reacción de digestión mediante enzimas de restricción	52
<i>Tabla 5.</i> Componentes de la reacción de ligación de adaptadores	52
<i>Tabla 6.</i> Componentes de la amplificación pre-selectiva	53
<i>Tabla 7.</i> Componentes de la amplificación selectiva	54
<i>Tabla 8.</i> Secuencias de cebadores usados para el análisis de SRAP	57
<i>Tabla 9.</i> Amplificaciones de los idiomorfos MAT	72
<i>Tabla 10.</i> Análisis de fragmentos MAT seleccionados	74
<i>Tabla 11.</i> Análisis de fragmentos SRAP	97
<i>Tabla 12.</i> Producción de nivalenol de aislamientos de <i>Fusarium poae</i> analizados por HPLC/FD	103

Abreviaturas y siglas

Siglas/abreviaturas

-ADN
-AFLP

-AMOVA
-APG
-BEA
-BLAST

-CAPS

-CCC

-cm
-CTAB
-DAS
-dNTP
-DON
-DTT
-EDTA
-EN
-FAO

-FX
-FD
-HMG
-HPLC

-hs
-HT-2
-INTA

-ISSR

-MAS
-MON
-MBD

Significado

Ácido desoxirribonucleico
Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados
Análisis molecular de la varianza
Agar papa glucosado
Beauvericina
Herramienta de búsqueda de alineamientos locales básicos
Secuencia polimórfica amplificada y cortada
Coeficiente de correlación cofenética
Centímetros
Cetil-trimetil bromuro de amonio
Diacetoxiscirpenol
Desoxirribonucleótido trifosfato
Deoxynivalenol
Dithiothreitol
Etilen-diamonio-tetra-acetato
Eniatinas
Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación
Fusarenona-X
Detección fluorescente
Grupo de alta movilidad
Cromatografía líquida de alta precisión
Horas
Toxina HT-2
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
Amplificación de fragmentos ubicados entre secuencias repetitivas simples
Monoacetoxiscirpenol
Moniliformina
Matriz básica de datos

Siglas/abreviaturas

-min
-mM
-NCBI

-NEO
-NIV
-ORF
-OTU
-pb
-PCR

-PVP
-RAPD

-rpm
-SCAR

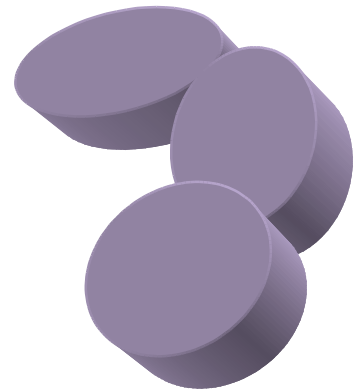
-SM
-SNA
-SNP
-SRAP

-SSR
-STO
-μl
-UPGMA

-UV
-T2
-TBE
-TE
-TEMED
-TLC
-Tm

Significado

Minutos
Milimolar
Centro Nacional de Información
Biotecnológica
Neosolaniol
Nivalenol
Marco abierto de lectura
Unidades taxonómicas operativas
Pares de bases
Reacción en cadena de la
polimerasa
Polivinil pirrolidona
Polimorfismos de ADN
amplificados al azar
Revoluciones por minuto
Amplificación de regiones de
secuencias caracterizadas
Simple Matching
Spezieller Nährstoffarmer Agar
Polimorfismo de nucleótido simple
Polimorfismos de amplificación de
secuencias relacionadas
Secuencia simple repetitiva
Scirpentriol
Microlitros
Ligamiento promedio no
ponderado
Ultravioleta
Toxina T2
Tris-Borato-EDTA
Tris-EDTA
Tetramethylethylenediamina
Cromatografía de capa delgada
Temperatura de fusión



Capítulo I:

Introducción general



1.1 Conceptos generales del cultivo de trigo y cebada

El género *Triticum* es un complejo de especies cuyo origen radica en Asia Menor, Siria y Palestina provenientes de cereales silvestres y otros logrados sólo bajo domesticación (INTA, 1981). Un ejemplo es el trigo pan, *Triticum aestivum* L., el cual es producto de cruzamientos de especies originadas con anterioridad a los cuales se le suman mutaciones ocurridas de manera inesperada y del cual se han encontrado granos carbonizados de hace 6.700 años, en la localidad de Jarmo, al este de Irak (Heiser, 1990; INTA, 1981).

En la Argentina, las primeras semillas de trigo fueron sembradas en el primer establecimiento español, conocido con el nombre de Sancti Spíritu, fundado en 1537, en la confluencia de los ríos Carcarañá y Coronda, dentro del actual departamento de San Jerónimo en la provincia de Santa Fe (SAGPyA, 2004).

El trigo, junto con el arroz y el maíz, componen los tres granos básicos que forman parte de la dieta humana (INTA, 1981). El mismo ha sido empleado para distintos usos, obteniéndose como producto principal la harina para la fabricación de pan, del cual se obtiene además sémola y almidón utilizados como adhesivos en la industria del papel y la elaboración de alcohol (Satorre *et al.*, 2003). Además, el germen de trigo contiene aminoácidos especiales destinados a enriquecer alimentos para desayunos y lactantes. Más aún, su envoltura es utilizada como ingrediente para la elaboración de alimentos de ganado (Satorre *et al.*, 2003).

La Argentina es el mayor productor sudamericano de trigo, ocupando el 15° lugar en cuanto a la producción mundial de este cereal, con un área total de

4.628.800 hectáreas sembradas logrando una producción total de 14.093.730 toneladas (Anuario 2012, Bolsa de Comercio de Rosario).

Dada la gran diversidad genética que presenta el trigo, esta especie puede crecer y desarrollarse en variados ambientes. Las principales regiones trigueras argentinas abarcan la provincia de Buenos Aires, sur de Entre Ríos, centro-sur de Santa Fe, sudoeste de Córdoba y este de la provincia de la Pampa, donde los climas varían de húmedo, con precipitaciones que rondan un promedio de 800 mm anuales, a semiáridos, con precipitaciones promedio de 600 mm anuales (INTA, 1981).

La cebada cultivada *Hordeum vulgare* L. descende de la cebada silvestre (*Hordeum spontaneum* K. Koch), la cual crece en el Oriente Medio. En 1875 se la cita por primera vez en la estadística de exportación con 2 toneladas, a pesar ello no se conoce fecha exacta de los comienzos del cultivo en la Argentina (Tomaso, 2004).

La cebada es de gran importancia a nivel mundial dado que se utiliza para la alimentación de los animales y del hombre, como así también para la industria cervecera (Prats & Clément-Grandcourt, 1969).

Mundialmente, la Argentina ocupa el 14° lugar en cuanto a la producción de cebada, con una superficie sembrada de 1.171.240 hectáreas que constituyen una producción de 3.644.000 toneladas (Anuario 2012, Bolsa de Comercio de Rosario).

Las principales regiones argentinas destinadas a la producción de cebada son el sudeste de la provincia de Buenos Aires, la zona del sudoeste bonaerense en conjunto con la Pampa, la zona del área central de Buenos Aires, y la zona

formada por el este de Santa Fe y oeste de Córdoba. Las tres primeras zonas producen más del 90% del tonelaje nacional de cebada, mientras que la última zona produce alrededor del 10% (Anuario 2012, Bolsa de Comercio de Rosario).

Tanto el trigo como la cebada son plantas monocotiledóneas pertenecientes a la familia de las gramíneas (*Poaceae*), la cual contempla plantas herbáceas (a veces leñosas), de crecimiento anual, caracterizadas por la presencia de inflorescencia de tipo espiguilla (Dewey, 1985).

En cuanto a la época de siembra, tanto el trigo como la cebada, son cultivos de invierno, es decir, se siembran a finales de otoño y principios de invierno y se cosechan a finales de la primavera principios de verano. Ambos cultivos suelen ser antecidos por maíz, sorgo, girasol y soja en las áreas cultivadas.

El trigo y la cebada son cultivos que comparten los lugares de siembra en lo que respecta a la región pampeana de nuestro país. Sin embargo, en el último año, se observó un importante cambio en la elección del cultivo de cosecha fina, donde gran parte de la superficie, anteriormente ocupada por el trigo, fue sembrada con cebada, debido principalmente a las restricciones comerciales (Molfese & Seghezzo, 2013). Estos cultivos suelen estar expuestos a distintos tipos de estreses en lo que respecta a su interacción con el medio ambiente, entre los cuales podemos mencionar estreses abióticos, como lo son la temperatura y las condiciones hídricas; y estreses bióticos, principalmente enfermedades producidas por virus, hongos y/o bacterias, entre otros.

Las enfermedades de las plantas representan uno de los factores bióticos que inducen pérdidas en los cultivos y son una amenaza constante para una

producción favorable. Entre ellas, las enfermedades fúngicas producen pérdidas considerables en cuanto a rendimiento y calidad en los granos cosechados. Un ejemplo de ello, es la fusariosis de la espiga causada por especies del género *Fusarium*, responsable de causar, por ejemplo, pérdidas del 60% de la producción de trigo en Entre Ríos, en los años 1993, 2000, 2001 y 2002 (Velázquez *et al.*, 2013).

1.2 Generalidades de la fusariosis

Los hongos tienen gran capacidad para infectar tejidos vegetales vivos, con un gran poder de invasión, diseminación y deterioro de productos almacenados. A todo esto, se le añade la capacidad genética que algunos de ellos poseen para producir metabolitos secundarios tóxicos denominados “*micotoxinas*”, con la consecuente posibilidad de producir micotoxicosis en los humanos y en los animales que consumen el alimento contaminado. Este conjunto de factores hace que los hongos formen un grupo importante dentro de la microbiología alimentaria (Gimeno & Martins, 2011).

Dentro de las enfermedades fúngicas del trigo y de la cebada, entre otros, una de las más importantes es la conocida bajo el nombre de fusariosis de la espiga, golpe blanco o tizón de la espiga, primeramente considerada como una enfermedad de índole secundario, pero que dada su frecuencia de aparición y severidad, se ha convertido en una de las principales enfermedades de los cereales (McMullen *et al.*, 1997).

La fusariosis es una enfermedad que provoca serios daños en los cultivos, provocando pérdidas ya sea por la reducción del rendimiento, por la presencia de

granos decolorados de aspecto arrugado y/o por la contaminación con micotoxinas, todo lo que conduce a reducir la calidad de las semillas (McMullen *et al.*, 1997). La primera cita de esta enfermedad fue realizada en Inglaterra por Smith (1884) quien atribuyó la enfermedad a un hongo llamado *Fusisporium culmorum*. Más tarde, la fusariosis fue citada por primera vez en Estados Unidos por Arthur (1891). En la Argentina, la fusariosis fue asociada a la pudrición radicular en trigo y maíz citándose por primera vez en el año 1927 (Marchionatto, 1932).

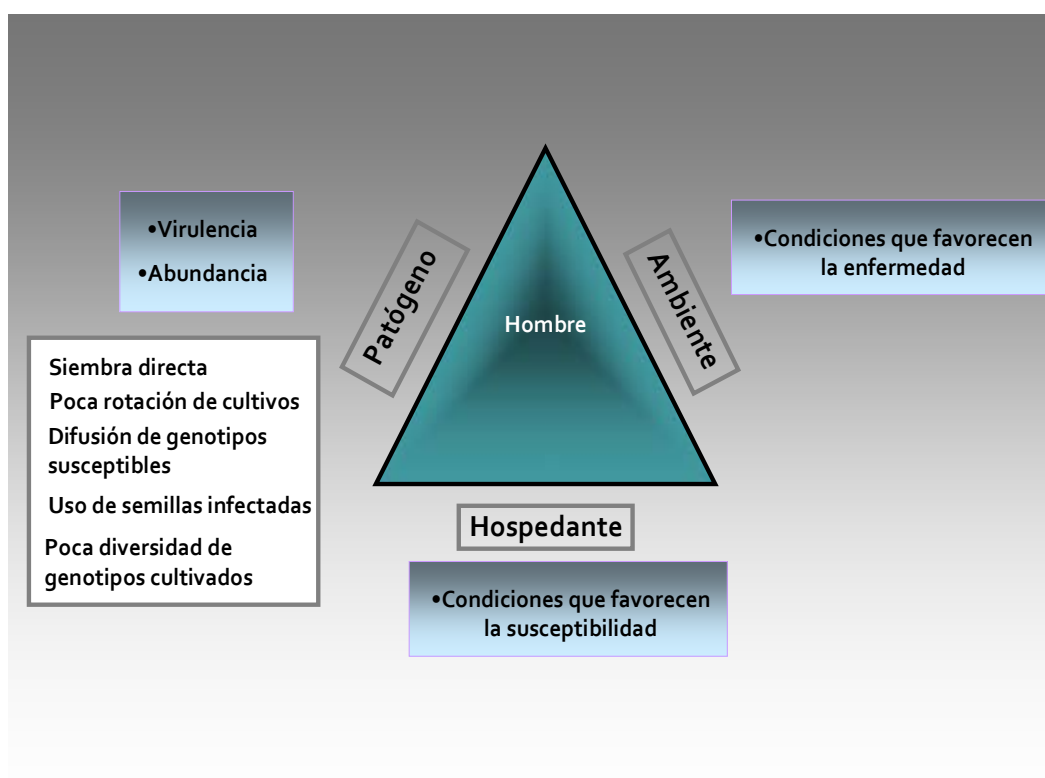
Esta enfermedad ha incrementado su ocurrencia debido al uso de sistemas de labranza tales como la siembra directa, ampliamente utilizada en estos días; la rotación con maíz como antecesor al cultivo de trigo y la difusión de germoplasma de trigo susceptibles a la fusariosis (Galich & Galich, 1996). El viento y la lluvia son los factores más importantes en lo que respecta a la dispersión del inóculo. Más aún, los artrópodos vectores, ácaros e insectos podrían ser responsables secundarios de la amplia diseminación de esta enfermedad (Parry *et al.*, 1995).

1.3 Sintomatología

El contacto del patógeno y el hospedante en presencia de condiciones climáticas extremas como demasiado frío o calor, no asegura la producción de la enfermedad; por lo que debe estar presente un tercer componente formado por un conjunto de condiciones ambientales dentro de los límites favorables que permitan el desarrollo de la enfermedad en las plantas (Agrios, 1999). Los tres componentes de la enfermedad forman lo que se conoce como “*triángulo de las*

enfermedades”, donde cada lado del triángulo representa los componentes, siendo el tamaño del mismo proporcional a la suma de las características de cada componente (Agrios, 1999). El cuarto componente central en este esquema es el hombre, quien modifica los tres principales componentes mediante diferentes prácticas como la siembra directa, la introducción de genotipos susceptibles, entre otros (Fig. 1).

Figura 1. Triángulo de la enfermedad.



El desarrollo de la fusariosis se ve favorecido por condiciones climáticas como lluvias frecuentes, de medias a altas temperaturas y alto porcentaje de humedad relativa coincidentes con el período de floración o llenado del grano

(McMullen *et al.*, 1997). Asimismo, se observan diferencias de requerimientos de temperatura y humedad para la germinación e infección de las especies fúngicas causantes de la enfermedad (Xu & Nicholson, 2009).

A pesar de las diferencias fisiológicas entre los cultivos de trigo y cebada, el ingreso de esporas es similar en estos dos cultivos. Sin embargo, el trigo es más susceptible a la deposición de esporas dispersas por el aire en comparación a la cebada, ya que en el primero la antesis se manifiesta por la visualización de las anteras por fuera de las espiguillas, mientras que en cebada la antesis no siempre puede ser observada por extrusión de las anteras por fuera de la espiguilla (Miralles *et al.*, 2011).

Los primeros síntomas aparecen pocos días después de la infección y son caracterizados por el blanqueamiento de las espigas, observándose a los granos infectados arrugados, de coloración blanco-rosada a pardo clara, dependiendo del momento de infección y de las condiciones climáticas preponderantes durante el desarrollo de la enfermedad (Fig. 2-Fig. 3) (Reis & Carmona, 2002). A pesar de ello, se ha observado la presencia de *Fusarium* en granos asintomáticos (Barreto *et al.*, 2004; Kulik & Jestoi, 2009; Stenglein *et al.*, 2012).

Figura 2. Espigas de trigo con síntomas de fusariosis.



Figura 3. Granos de trigo infectados con *Fusarium*.



1.4 El género *Fusarium*

El género *Fusarium* fue citado como tal en el año 1809 por el micólogo Link, en referencia a la existencia de esporas fusiformes en los hongos. Más tarde, en 1832, Fries encontró un hongo similar en avena y estableció un nuevo género llamado *Fusisporium* (Stack, 2003). Finalmente, en 1881, Saccardo decidió unificar los géneros fúngicos, dando el nombre de *Fusarium* a las especies encontradas, dado que *Fusarium* y *Fusisporium* presentaban las mismas características morfológicas (Stack, 2003).

El género *Fusarium* pertenece al Phylum Ascomycota del Orden Hypocreales y la Familia Hypocreaceae, el cual engloba no sólo especies con ciclo sexual, perfecto o teleomórfico, sino también aquellas que sólo presentan una fase asexual, anamorfa o imperfecta (Liddell, 2003).

Las especies del género *Fusarium* constituyen un grupo cosmopolita de hongos filamentosos capaces de colonizar tejidos vivos en cualquier etapa del ciclo de vida de sus huéspedes. Son generalmente saprófitos con estrategias efectivas de supervivencia incluyendo clamidosporas, hifas engrosadas y peritecios resistentes (Liddell, 2003).

1.5 Agente causal

La fusariosis es causada por un complejo de hongos de especies del género *Fusarium*, de las cuales cinco son las predominantes en todo el mundo: *F. graminearum* (syn. *Gibberella zeae*) conformado por una serie de linajes o grupos (O'Donnell *et al.*, 2008), *F. culmorum*, *F. poae*, *F. avenaceum* (syn. *Gibberella avenacea*), y *F. nivale* (syn. *Monographella nivalis*), siendo la primera de estas la

que ocurre con mayor frecuencia en todo el mundo (Galich, 1987; Reis & Carmona, 2002). *F. culmorum* es la especie de índole secundaria más frecuente en Europa, mientras que *F. poae* lo es en América. Las dos restantes especies, *F. avenaceum* y *F. nivale*, se las ha aislado esporádicamente.

La identificación de las especies de *Fusarium* es sumamente compleja debido a la gran variación de características tanto morfológicas como fisiológicas y genéticas. La separación de las especies de *Fusarium* incluye el estudio de la morfología de la colonia, la pigmentación, la tasa de crecimiento, la presencia/ausencia de microconidios y macroconidios, su tamaño y forma, presencia o ausencia de clamidosporas, presencia o ausencia de esclerocios o esporodoquios, entre otras (Nelson *et al.*, 1983; Windels, 1991).

Fusarium poae (Peck) Wollenweber produce un micelio aéreo denso, con colores que van del blanco al rojo, que puede convertirse en marrón rojizo de acuerdo a la edad del cultivo en medio de cultivo artificial agar papa glucosado 2% (APG). El color de la colonia debajo del micelio aéreo puede variar del blanco al amarillo a un denso rojo carmín. En el medio agar-agua clavel (CLA), *F. poae* desarrolla conglomerados de monofiálides con pequeñas ramificaciones o sin ellas (5-18 μm). Los microconidios son abundantes, globosos, con forma oval a piriforme, y sin o con sólo un septo, 5-10 μm long x 5-8 μm lat. Los macroconidios son poco frecuentes de observar, típicamente con forma de hoz, con 2-5 septos, 18-38 μm long x 3,5-7 μm lat y con una célula basal en forma de pie (Booth, 1971; Desjardins, 2006; Leslie & Summerell, 2006; Nelson *et al.*, 1983).

Fusarium poae es estable en cultivo artificial y frecuentemente produce un aroma frutal característico similar a amil-acetato. El teleomorfo de *F. poae* aún no se conoce (Stenglein, 2009).

Debido a que *Fusarium poae* produce microconidios ovales en conidióforos ramificados, fue descrito primeramente dentro del género *Sporotrichum*, hasta que se logró el cultivo puro del mismo y se observó la producción de macroconidios en algunos aislamientos (Summerell *et al.*, 2001). La abundante producción de microconidios globosos posiciona a *F. poae* en la sección Sporotrichiella de Wollenweber & Reinking (Nelson *et al.*, 1983). Algunas veces, el rápido crecimiento del micelio aéreo y el color rojo carmín debajo de la superficie en cultivo APG, hace que el hongo sea similar en apariencia a algunas especies de *Fusarium* de la sección Arthrosporiella, Roseum y Discolor (Nelson *et al.*, 1983). La ausencia de polifíalides y de clamidosporas distingue a *F. poae* de *F. sporotrichioides* (Nelson *et al.*, 1983). Asimismo, las distintivas fiálides permiten separar a *F. poae* de *F. tricinctum* (Leslie & Summerell, 2006).

Fusarium langsethiae es una especie que, debido a sus características morfológicas, era identificada erróneamente como *F. poae*. En el año 2004, *F. langsethiae* fue considerada una nueva especie, debido a su lento crecimiento, poco micelio aéreo, ausencia de olor característico y distinto perfil micotoxicológico en comparación con *F. poae* (Torp & Nirenberg, 2004).

Los métodos tradicionales de diagnóstico para la detección e identificación de las especies de *Fusarium*, pueden resultar dificultosos debido a que estas especies poseen características morfológicas similares, como es el caso de *F. poae*

con *F. langsethiae* (Knutsen *et al.*, 2004; Torp & Nirenberg, 2004; Wilson *et al.*, 2004; Yli-Mattila *et al.*, 2004). Sin embargo, técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han sido de gran utilidad para corroborar los datos obtenidos mediante análisis micológicos de rutina. La mayoría de los cebadores diseñados para la identificación de especies se basan en secuencias de ADN ribosómico nuclear (ADNr), el cual está presente en múltiples copias repetidas en “*tándem*” (Seifert & Lévesque, 2004). También se consideran para este tipo de estudio, secuencias codificadoras de copia única rica en intrones, tales como los genes codificadores de la calmodulina, la β -tubulina, la histona H3 o el gen factor de elongación 1 α (EF-1 α). Este último tiene una gran utilidad a nivel filogenético, ya que permite la discriminación a nivel de especie en el género *Fusarium* (Seifert & Lévesque, 2004).

La PCR ofrece una metodología potencialmente sensible, rápida y específica, para identificar la mayoría de los patógenos relacionados con la fusariosis de la espiga y un buen ejemplo de esto, es el trabajo de Parry & Nicholson (1996), donde los autores describen un método de PCR para identificar a *Fusarium poae*.

Fusarium poae es un patógeno que presenta un amplio espectro de hospedantes, de los cuales, se pueden mencionar a la cebada, el trigo, el maíz, la avena, el arroz, la alfalfa, la soja, el girasol y el tomate, entre otros (Booth, 1971; Stenglein *et al.*, 2009). Su presencia puede visualizarse por lesiones necróticas en las glumas y semillas abortadas (Fig. 4- Fig. 5) (Barreto *et al.*, 2004).

Al igual que la mayoría de los hongos fitopatógenos, pasa parte de su ciclo de vida en las plantas como huésped, y otra parte de él en los residuos vegetales depositados en el suelo.

Figura 4. A- Espiga de trigo infectada con *Fusarium poae*. B- Espiga de trigo sana.



Figura 5. A- Granos de trigo infectados con *Fusarium poae*. B- Granos de trigo sanos.



1.6 Reproducción y variabilidad en *Fusarium poae*

Las poblaciones que conforman una determinada especie están integradas por individuos que reflejan diversas características morfológicas, fisiológicas y de conducta. La realidad indica que aquellos individuos resultantes de reproducción sexual, se espera sean diferentes entre sí en diversas características, más allá de conservar los progenitores y ciertas similitudes entre ellos. Por otro lado, los individuos resultantes de procesos asexuales muestran una notable disminución en lo que respecta al grado de variabilidad entre los descendientes, pero aún así ciertos individuos mostrarán diferencias significativas (Agrios, 1999).

Existen diferentes mecanismos importantes generadores de variabilidad en patógenos fúngicos como lo son:

- **Mutación:** cambios que pueden darse de manera repentina en el material genético de los organismos, que produce algún tipo de modificación en la secuencia de bases del ADN, ya sea adición o supresión de bases, sustitución de una base por otra, inserción de un nuevo segmento del ADN o inversión de los mismos (Agrios, 1999)
- **Recombinación:** ocurre durante la división meiótica del cigoto, como resultado de entrecruzamientos genéticos en los que las partes de las cromátidas de un cromosoma del par se intercambian con partes de las cromátidas del otro cromosoma del par. En los hongos, los gametos o núcleos haploides suelen dividirse mitóticamente para producir micelio y esporas haploides, que resultan en grupos de individuos genéticamente distintos relativamente homogéneos, que pueden producir asexualmente grandes poblaciones hasta el siguiente ciclo sexual (Agrios, 1999).

Existen otros procesos semejantes a la sexualidad en los hongos, como lo son:

- **Heterocariosis:** como resultado de la fertilización o anastomosis, las células de las hifas de los hongos o partes de éstas contienen núcleos que son genéticamente diferentes (Agrios, 1999).
- **Parasexualidad:** es el proceso por el cual durante la multiplicación se produce entrecruzamiento en algunas divisiones mitóticas y como consecuencia, aparecen recombinantes genéticos por la separación del núcleo diploide en componentes haploides (Agrios, 1999).
- **Heteroploidía:** es la existencia de células, tejidos u organismos completos que tienen número cromosómico por núcleo que difieren del número normal para el organismo en particular. Suele estar asociada con la diferenciación celular y representa una situación normal del proceso de desarrollo de la mayoría de los eucariontes (Agrios, 1999).

La reproducción sexual de los hongos se lleva a cabo por la fusión de núcleos sexualmente compatibles para la posterior producción de esporas recombinantes. La compatibilidad reproductiva está determinada por un sitio particular del genoma denominado “*locus MAT*”, que define el tipo sexual o ‘mating type’, término usado para diferenciar individuos que son sexualmente compatibles (Conde-Ferrández, 2007). Este locus contiene dos alelos funcionales idiomórficos denominados MAT-1 y MAT-2, debido a que ocupan el mismo lugar en el cromosoma pero no comparten similaridad de secuencia y ocasionalmente,

de tamaño, por lo que normalmente no se produce recombinación entre ellos (Leslie & Summerell, 2006; Tugeon, 1998). Aún no se conocen los mecanismos por el cual estos dos alelos han ocupado el mismo lugar en el cromosoma, sin embargo, se cree que en un comienzo han sido idénticos y luego divergieron a través de sucesivos eventos de adición/delección/rearreglos (Tugeon, 1998). En cuanto a su composición, estos alelos contienen un dominio de caja α conservado y un dominio de caja de grupo de alta movilidad (HMG) motivos de unión al ADN, lo cual es congruente con sus funciones ya que, en general, los genes *MAT* codifican para factores de transcripción (Conde-Ferrández, 2007). Estos sitios han sido empleados como regiones flanqueantes en el diseño de cebadores, con el objetivo de identificar en los aislamientos potencialidad de cruzamiento. Uno de ellos, es el trabajo de Kerényi *et al.* (2004) quienes amplificaron regiones flanqueantes a las cajas α y HMG por PCR inversa de distintas especies de *Fusarium* incluido *F. poae*. Los fragmentos resultantes fueron clonados y secuenciados, permitiendo el diseño de un par de cebadores flanqueantes del MAT-1 y MAT-2, los cuales fueron testeados en ocho aislamientos de *F. poae* amplificando seis de ellos el fragmento de 200pb correspondiente al MAT-1 y los otros dos restantes, uno de 260pb, correspondiente al MAT-2, demostrando que esta especie puede tener presente ambos alelos en distintos aislamientos de la misma especie (Kerényi *et al.*, 2004). Los genes *MAT* se encuentran, por lo tanto, presentes en especies de *Fusarium* consideradas asexuales e incluso son funcionales, siendo consistente con la hipótesis de que su fase sexual debe ser crítica o rara en la naturaleza, y por ello no ha sido observada (Conde-Ferrández, 2007).

Fusarium poae es un patógeno haploide cuyo ciclo sexual es aún desconocido; pese a ello varios autores han investigado sobre la variabilidad genética presente en este patógeno mediante el empleo de distintas técnicas moleculares (Dinolfo *et al.*, 2010; Kerényi *et al.*, 1997; Somma *et al.*, 2010; Vogelgsang *et al.*, 2010).

1.7 Caracterización molecular: Marcadores de ADN

El desarrollo de la Biología Molecular a fines de la década del 80 y principios del 90 permitió contar con una herramienta como la PCR ampliamente usada para el análisis del ADN genómico. Una de sus mayores utilidades ha sido el desarrollo de marcadores de ADN, útiles para estudios de cruzamientos, taxonomía, evolución, clonado de genes, entre otras. Es así como hoy en día se cuenta con numerosas técnicas que logran determinar con mayor precisión la variabilidad genética de los individuos. Los marcadores moleculares son una herramienta útil en el análisis de la variación genética en las poblaciones de hongos fitopatógenos. Los marcadores genéticos moleculares son fragmentos o porciones de ADN que pueden asociarse o no a características deseables, y que pueden visualizarse como bandas específicas en una matriz de separación. Los antecedentes de los marcadores genéticos moleculares son la separación por electroforesis de isoenzimas y proteínas de reserva, los cuales tuvieron su mayor auge en la década del 80. Sin embargo, en el inicio de los 90, fueron ampliamente sustituidos por los marcadores de ADN, porque permiten el estudio y la manipulación directa del material hereditario o fragmentos de él (Ramón *et al.*, 2005).

Un marcador molecular es simplemente un segmento de ADN con una ubicación específica en un cromosoma (punto de referencia) cuya herencia puede seguirse en individuos de una población. La secuencia puede pertenecer a regiones codificantes (genes) o sin función conocida (Levitus *et al.*, 2010). En la actualidad, se dividen en los denominados “*anónimos*” o que no requieren información de la secuencia previa al análisis o “*dependiente de secuencia*” basados en el empleo de cebadores específicos diseñados a partir de la secuencia total o parcial del fragmento amplificado. Entre los primeros se pueden citar a los RAPD (polimorfismos de ADN amplificados al azar), los ISSR (amplificación de fragmentos ubicados entre secuencias repetitivas simples), AFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados), SRAP (polimorfismos de amplificación de secuencias relacionadas), entre otros. Entre los segundos se encuentran los SCAR (amplificación de regiones de secuencias caracterizadas), los CAPS (secuencia polimórfica amplificada y cortada), los SNP (polimorfismo de nucleótido simple) o los SSR (microsatélites o secuencias simple repetitiva) (Ramón *et al.*, 2005).

El reciente uso de marcadores moleculares para examinar la estructura de las poblaciones de patógenos de las plantas está proveyendo niveles de precisión que no estaban disponibles previamente, revolucionando el análisis de la biología de poblaciones (McDermott & McDonald, 1993; Milgroom & Fry, 1997).

El uso de marcadores ISSR posee ventajas frente a otros marcadores neutrales, como los RAPD, porque el tamaño de los cebadores y las condiciones de astringencia de la reacción los hacen más confiables en estudios de variabilidad (Bornet & Branchard, 2001). Otra de las ventajas que ofrece esta técnica se centra principalmente en la variación que detecta, así como en su reproducibilidad debida principalmente a las altas temperaturas de apareamiento utilizadas en la PCR. Por otro lado, para diseñar los cebadores no es necesario conocer la secuencia del genoma del organismo en estudio. Pueden visualizarse tanto en geles de agarosa como de poliacrilamida y además, son sencillos de ajustar, rápidos, eficientes y poco costosos, en comparación con otros tipos de marcadores como los AFLP.

La base genética del polimorfismo de ISSR es la ausencia o presencia de fragmentos amplificados de un tamaño determinado por mutaciones puntuales, inversiones, inserciones y/o deleciones.

En cuanto a su aplicabilidad, los ISSR pueden ser utilizados como marcadores en la resolución de múltiples problemas biológicos. Los polimorfismos que presentan, además de su heredabilidad, permiten aplicarlos en la identificación de individuos, distinción de variedades intraespecíficas, identificación de paternidad y maternidad, mapeo genético, evaluación de diversidad y subdivisión genética de poblaciones, reconstrucciones filogenéticas, introgresión e hibridización y distinción de individuos con origen clonal y sexual (Pradeep *et al.*, 2002; Wolfe, 2000; Zietkiewicz *et al.*, 1994).

En los hongos, los ISSR han sido usados para el estudio de la variabilidad genética en otras especies del género *Fusarium*, como es el ejemplo de *F.*

oxysporum, *F. graminearum*, *F. culmorum* y *F. poae* (Bayraktar *et al.*, 2007; Dinolfo *et al.*, 2010; Mishra *et al.*, 2003a, 2004).

- **Marcadores de tipo AFLP**

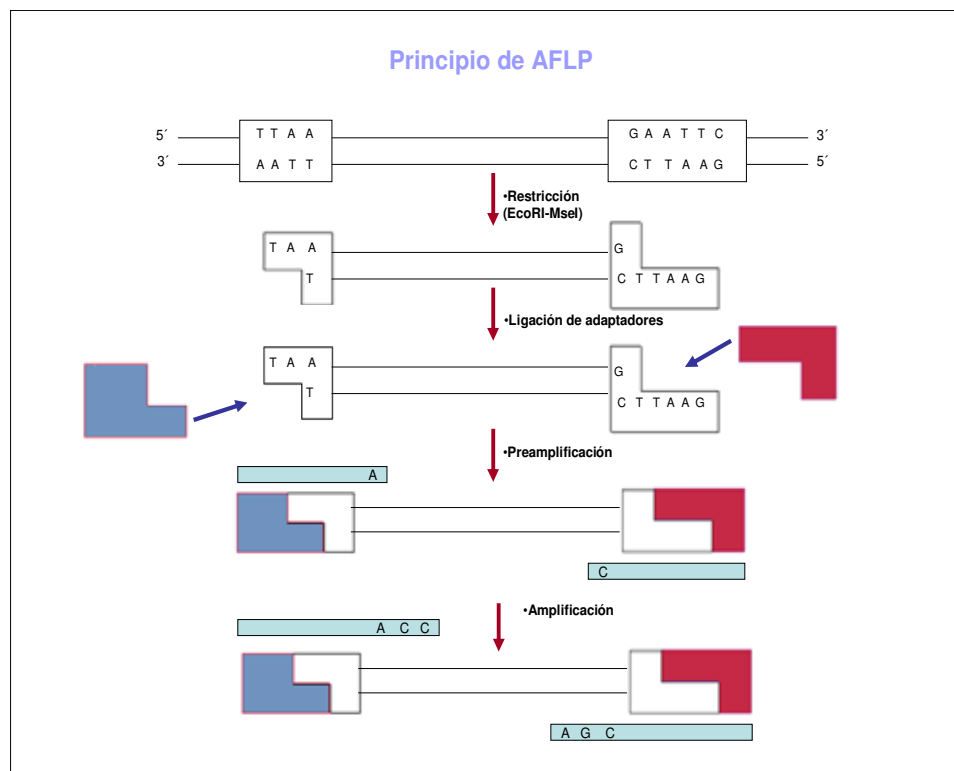
La técnica conocida como “*polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados*” (AFLP) combina la especificidad, mediante el uso de enzimas de restricción, sumado a la velocidad y practicidad de detección, mediante el empleo de la PCR. El ensayo de AFLP involucra tres pasos cruciales. El primero de ellos implica la restricción del ADN genómico total mediante la utilización de enzimas de restricción, generalmente una de corte frecuente y otra de corte poco frecuente, que dejan como resultado extremos cohesivos, a los cuales posteriormente se les ligan oligonucleótidos adaptadores. El segundo, implica una amplificación selectiva de fragmentos con cebadores específicos y bases degeneradas en los extremos 3´ y por último el análisis del gel conteniendo los fragmentos amplificados (Fig. 7) (Vos *et al.*, 1995).

La base genética del polimorfismo de AFLP es la ausencia o presencia de fragmentos amplificados de un tamaño determinado dado por mutaciones puntuales, inversiones, inserciones y deleciones que llevan a la pérdida o ganancia de un sitio de restricción o la alteración de la secuencia reconocida o amplificada por los iniciadores (Levitus *et al.*, 2010). Su implementación en el laboratorio requiere de una infraestructura considerable, son relativamente laboriosos para su obtención y el costo es de medio a alto (Levitus *et al.*, 2010).

Esta técnica permite obtener un gran número de fragmentos representando una herramienta útil en la detección de variabilidad genética, todo lo cual puede ser visualizado en un único gel (Vos *et al.*, 1995).

Los marcadores AFLP han sido utilizados en diversas especies del género *Fusarium*, como por ejemplo *F. graminearum*, *F. asiaticum* y *F. poae* (Qu *et al.*, 2008; Somma *et al.*, 2010).

Figura 7. Principio de marcadores moleculares de tipo AFLP.

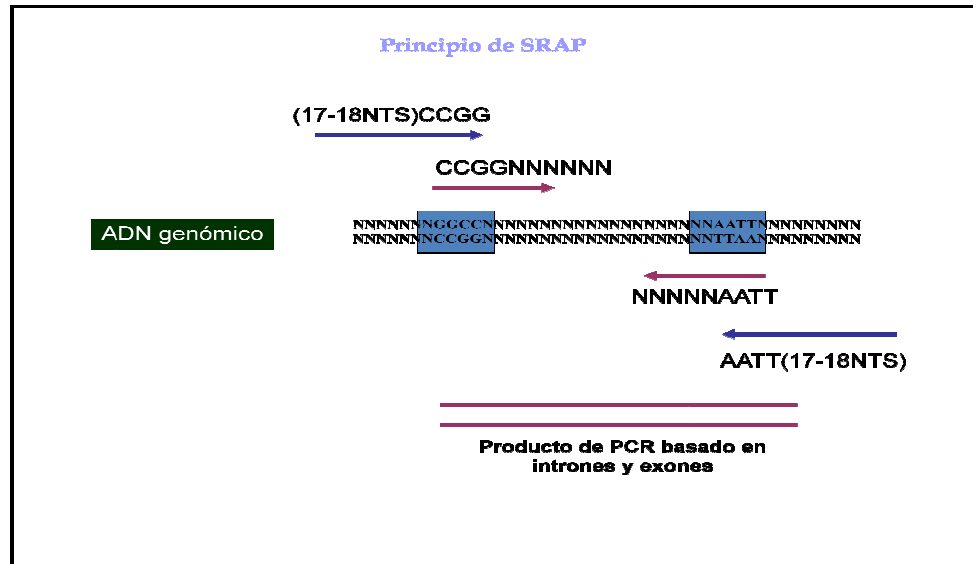


- **Marcadores de tipo SRAP**

La técnica de “*polimorfismos amplificados relacionados a secuencias*” (SRAP) tiene como finalidad amplificar marcos abiertos de lectura (‘Open Reading Frame’, ORFs), es decir, tripletes de secuencias nucleotídicas que representan aminoácidos. Para ello, se basa en la utilización de dos tipos de cebadores, ambos constituidos por 17 o 18 nucleótidos, siendo las primeras bases inespecíficas, seguidas por una secuencia CCGG en el cebador delantero para amplificar regiones exónicas y AATT en el cebador reverso para amplificar regiones intrónicas (Fig. 8). Dado que las regiones exónicas están muy conservadas entre los individuos, se utiliza un cebador reverso basado en secuencias menos conservadas entre individuos como son los intrones, promotores y espaciadores, para lograr incrementar el nivel de polimorfismo. De esta manera se cuenta con un marcador molecular capaz de generar fragmentos polimórficos basadas en intrones y exones (Li & Quiros, 2001). Esta técnica aporta simplicidad y permite el aislamiento de fragmentos resultantes para su posterior secuenciado, lo que trae aparejado la posibilidad de amplificar ORFs y comprobar si hay diferencias en lo que respecta a presencia o ausencia de los mismos en distintos aislamientos de una misma especie.

La base genética del polimorfismo deriva fundamentalmente en la variación en el largo de intrones, promotores y espaciadores, existentes entre individuos (Li & Quiros, 2001).

Figura 8. Principio de marcadores moleculares de tipo SRAP.



Los marcadores de tipo SRAP fueron desarrollados para estudiar la variabilidad genética y localizar regiones codificantes en el genoma de *Brassica oleracea* (Li & Quiros, 2001). Más tarde, algunos investigadores adoptaron esta técnica para analizar la variabilidad genética presente en distintos géneros de hongos como *Puccinia striiformis*, *Ganoderma* sp. y *F. culmorum* pudiendo identificar polimorfismos útiles a la hora de analizar la variabilidad genética entre los individuos (Irzykowska *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2006; Pasquali *et al.*, 2010).

1.8 Micotoxinas

Uno de los principales problemas relacionados a la presencia de especies de *Fusarium* en productos utilizados en la fabricación de alimentos, es la

capacidad, de algunas especies de este género, de producir ciertas micotoxinas con efectos nocivos tanto en la salud humana como en los animales.

La importancia del problema relacionado a las micotoxinas comenzó a apreciarse durante la Segunda Guerra Mundial, cuando en Rusia y en muchos otros países el consumo de granos “*enmohecidos*” causó en numerosas personas y animales necrosis en la piel, hemorragias, insuficiencia renal y hepática, incluso la muerte. Síntomas similares aparecieron también en caballos que fueron alimentados con paja “*enmohecida*” (Agris, 1999).

En el año 1932, pacientes de la zona rural de Rusia, Kazajstán y otros países de Asia Central experimentaban náuseas, vómitos y diarreas. En casos más severos, desarrollaban lesiones necróticas en el tracto gastrointestinal y otros órganos, llegando, en ciertos pacientes, a ser letales (Desjardins, 2006). Estas epidemias fueron vividas repetidamente en Rusia desde el siglo XIX, hasta que los pacientes fueron sometidos a una dieta libre de granos, notándose una favorable recuperación de los mismos. Fue por ello, que en el año 1943, el Ministerio Soviético de la Salud llamó a esta enfermedad ‘*alimentary toxic aleukia*’ (ATA), la cual estaba asociada al consumo de granos contaminados con micotoxinas producidas por *Fusarium poae* y *F. sporotrichioides* (Desjardins, 2006). Desde el año 1820 al 1957, síntomas similares fueron observados en pacientes originarios de Japón, determinándose también, que la enfermedad se debía al consumo de alimentos basados en trigo, cebada y arroz contaminados con diversas especies de *Fusarium* (Desjardins, 2006). Sin embargo, en 1960 un gran número de jóvenes turcos murieron en Inglaterra después de consumir maníes contaminados; fue en este año que se comenzó a considerar a las micotoxinas

como un problema a nivel mundial, el cual requeriría de investigaciones intensivas (Agrios, 1999).

Las micotoxinas pueden estar presentes en alimentos basados en cereales y oleaginosas, peligrando la inocuidad de los mismos sobre los consumidores. En estos casos, la concentración de las micotoxinas retenidas en los productos finales dependerá de las condiciones de los procesos de elaboración del mismo, como así también de la concentración inicial de las micotoxinas.

El desarrollo del hongo y la producción de micotoxinas en los cereales pueden ocurrir en distintas fases del proceso productivo: maduración, cosecha, transporte, procesado o almacenamiento de granos (Mallmann & Dilkin, 2011). La presencia de hongos productores de toxinas en los cereales, no siempre conduce a la existencia de micotoxinas en los mismos, cuya producción requiere que el hongo esté estresado por ciertos factores tales como desbalance nutricional, sequía o exceso de agua (Rodrigues *et al.*, 2012).

Cuando las micotoxinas son ingeridas por humanos y/o animales, pueden producir efectos deletéreos en la salud, resultando en consecuencias negativas ya sean económicas, sanitarias y comerciales. Pueden además, afectar la salud debido a sus propiedades anabólicas, estrogénicas, carcinogénicas, inmunosupresoras, mutagénicas y teratogénicas. El peligro de las micotoxinas no es sólo producir efectos nocivos en sus consumidores, sino además el daño que representan para los diferentes órganos y sistemas, disminuyendo la actividad reproductiva óptima (Mallmann & Dilkin, 2011).

1.9 Micotoxinas producidas por *Fusarium poae*

Fusarium poae tiene la capacidad de producir una amplia gama de micotoxinas, las cuales no son más que proteínas o polisacáridos provenientes del metabolismo secundario de los hongos, es decir productos metabólicos que no son esenciales para el metabolismo primario (Summerell *et al.*, 2001).

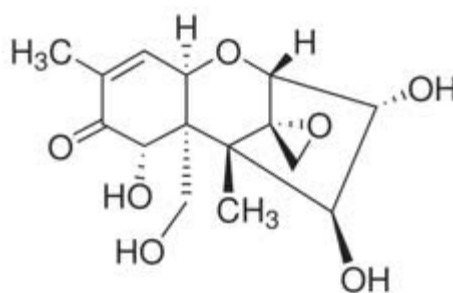
Dentro de las micotoxinas más importantes capaces de ser sintetizadas por *Fusarium poae* se encuentran las pertenecientes al grupo de los tricotecenos, nombre recibido luego de que se aisló por primera vez en 1948 en *Trichothecium roseum* (Summerell *et al.*, 2001). Los tricotecenos son pequeñas moléculas anfipáticas capaces de moverse pasivamente a través de las membranas celulares, los cuales se encuentran formados por sesquiterpenos epóxidos cuyas características químicas llevan a dividirlo en cuatro subtipos, de los cuales dos pueden ser sintetizado por *F. poae*: el tipo A y el tipo B (Gutleb *et al.*, 2002). La diferencia se caracteriza por la presencia o ausencia de un grupo keto en el C-8, respectivamente (Jurado *et al.*, 2005). Dentro de los tricotecenos del tipo A, *F. poae* es capaz de producir diacetoxyscirpenol (DAS), monoacetoxyscirpenol (MAS), scirpentriol (STO), toxina HT-2, toxina T-2, neosolaniol (NEO) y tricotecenos de tipo B como nivalenol (NIV) y fusarenona-X (FX). Este grupo de micotoxinas ha demostrado tener efectos inmunosupresores, proapoptóticos, neurotóxico, citotóxico y linfotóxico en consumidores humanos y animales (Chaudhary & Rao, 2010; Forsell & Petska, 1985; Jun *et al.*, 2007; Lamprecht *et al.*, 1989; Lautraite *et al.*, 1997). En estos momentos es discutida la producción de las toxinas T-2 y HT-2 por *F. poae*.

Fuera del grupo de los tricotecenos, se ha demostrado la capacidad de *F. poae* de producir eniatinas (EN), beauvericina (BEA) y moniliformina (MON) (Jestoi *et al.*, 2008; Thrane *et al.*, 2004). Primeramente, estas micotoxinas han sido consideradas micotoxinas “menores” en cuanto a los efectos que pueden causar sobre los consumidores en comparación con aquellas pertenecientes al grupo de los tricotecenos, pero contrario a ello, se ha demostrado un notable efecto genotóxico con consecuentes aberraciones cromosómicas, efectos inmunosupresores y citotóxicos (Caló *et al.*, 2004; Föllmann *et al.*, 2009; Knasmüller *et al.*, 1997).

Se ha citado la capacidad de *Fusarium poae* de producir deoxynivalenol (DON) (Salas *et al.*, 1999), pero estudios recientes no han podido confirmarlo.

Dentro de los tricotecenos del tipo B capaz de ser sintetizado por *Fusarium poae*, el más importante es el nivalenol (NIV) ya que se ha considerado a esta especie como la principal productora de esta micotoxina, especialmente reconocida por sus efectos tóxicos sobre los consumidores (Fig. 9).

Figura 9. Estructura química del nivalenol.



Muchos investigadores se han focalizado en los efectos de la exposición al NIV tanto en los humanos como en los animales. Ejemplo de ello es el trabajo de

Nagashima *et al.* (2006) los cuales observaron que el NIV causaba serios daños en la proliferación celular e inducía a la apoptosis en la línea celular HL60 perteneciente a células de leucemia promielocíticas humanas. Similares resultados fueron obtenidos por Marzocco *et al.* (2009) en líneas celulares de macrófagos de monocitos murinos. En cerdos, las intoxicaciones con NIV raramente ocurren, sin embargo se han observado necropatías y ulceraciones gástricas con alimentos contaminados con 2,5 a 5 µg/g (Mallmann & Dilkin, 2011).

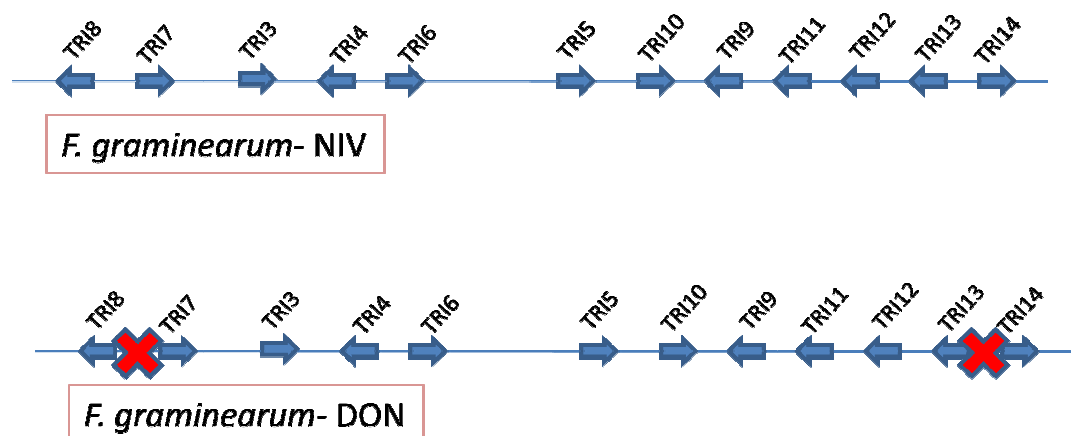
La biosíntesis de los tricotecenos en el género *Fusarium* implica una compleja vía que involucra procesos de oxigenaciones, isomerizaciones, ciclizaciones y esterificaciones (Desjardins, 2006).

En los hongos, los genes responsables de la biosíntesis de metabolitos secundarios están típicamente agrupados en ‘clusters’. En el caso de los tricotecenos, 12 genes se encuentran involucrados en su biosíntesis localizados en el ‘cluster TRI’, incluyendo una tricodiene sintetasa (*TRI5*), la oxigenasa P450 (*TRI4* y *TRI11*), acetiltransferasa (*TRI3* y *TRI7*), factores de transcripción (*TRI6* y *TRI10*), una bomba de eflujo de toxina (*TRI12*) y dos proteínas hipotéticas no identificadas (*TRI8* and *TRI9*). Los genes *TRI13* y *TRI14* están regulados por el gen *TRI10l*. El gen acetiltransferasa (*TRI101*) forma parte de la biosíntesis de los tricotecenos, sin embargo no se ha encontrado ligado al ‘cluster TRI’ (Lee *et al.*, 2002). La identificación de los genes involucrados en la biosíntesis de los tricotecenos, como la ubicación de los mismos en el genoma, ha sido posible gracias a la disponibilidad del genoma de *F. graminearum*, secuenciado en el año 2003 en el ‘Broad Institute’ (Desjardins, 2006) (Fig. 10).

Dentro de los genes implicados en la biosíntesis de los tricotecenos, los genes *TRI7* y el *TRI13* adquieren especial importancia en la síntesis del NIV, dado que se requieren para la acetilación y oxigenación del oxígeno del C-4 para producir NIV y 4 acetylnivalenol, respectivamente (Desjardins, 2006; Lee *et al.*, 2009). Estos genes se encuentran deletionados, inactivados o carentes de función en aquellos aislamientos productores de DON (Fig. 10).

Figura 10. ‘Cluster TRI’ responsable de la biosíntesis de tricotecenos.

Adaptado de Desjardins (2006).



En los últimos años, se han diseñado cebadores específicos basados en los genes TRI para detectar, mediante el uso de la PCR, potenciales aislamientos de *Fusarium* productores de NIV. Ward *et al.* (2002) desarrollaron un set específico de cebadores basados en el polimorfismo del gen *TRI12* para detectar potenciales aislamientos de *F. graminearum* productores de NIV. Más tarde, en el año 2007, Quarta *et al.* (2005) diseñaron otro set de cebadores basados en el *TRI7* de acuerdo a lo descrito por Lee *et al.* (2001) y Ward *et al.* (2002). En 2008, un set

específico de cebadores basados en el gen *TRI3* fue diseñado para detectar aislamientos de *F. graminearum* con el potencial de producir NIV (Wang *et al.*, 2008). Recientemente, Pasquali *et al.* (2011) compararon la totalidad de los cebadores, previamente diseñados, en aislamientos de *F. poae*, no siendo aptos para detectar potenciales productores de NIV en esta especie.

1.10 Situación actual en la Argentina

En los últimos años, se ha observado un incremento en la ocurrencia de hongos patógenos en cultivos de especial importancia económica para nuestro país, como lo son el trigo y la cebada. Entre ellos, se ha manifestado frecuentemente la ocurrencia de *Fusarium poae*, entre otras especies de este género. Este panorama actual se ve beneficiado por la expansión de sistemas de siembra directa sin adecuadas rotaciones de cultivos, la difusión de genotipos susceptibles, el uso de semillas infectadas, los cambios climáticos y la escasa diversidad de genotipos utilizados para la siembra; todas estas causas probablemente influyen en el aumento de la presión del inóculo sobre potenciales hospedantes.

Fusarium poae es un patógeno que ha incrementado su frecuencia de aparición a nivel mundial en los últimos años, por lo cual ha adquirido especial importancia en lo que respecta al conocimiento de su biología. Más aún, si sumado a la presencia de este patógeno, tenemos en cuenta el potencial de producir diversos tipos de micotoxinas, muchas de las cuales resisten los procesos de elaboración de alimentos y persisten en los productos finales, siendo

consumidos tanto por los humanos como por los animales, provocando en ellos una amplia gama de efectos negativos que van en detrimento de la salud.

Es por ello que resulta indispensable caracterizar aislamientos de *Fusarium poae* evaluando su variabilidad genética, permitiéndonos conocer la estructura poblacional de esta especie fúngica, y analizando la potencialidad de producir ciertas micotoxinas. Esta información resulta imprescindible para planificar estudios de manejo integrado de esta patología, como desarrollar germoplasmas tolerantes a este patógeno, como así también obtener mapas toxicológicos de la especie.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, es que se plantea la siguiente hipótesis con sus respectivos objetivos.

1.11 Hipótesis

“Los aislamientos de *Fusarium poae* son heterogéneos a nivel genómico y en su potencial producción de toxinas”

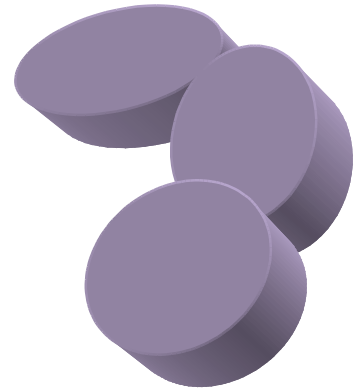
1.12 Objetivos

1.12.1 Objetivo general

- Aportar conocimientos básicos sobre uno de los patógenos fúngicos de interés agronómico más importante como productor de toxinas nocivas para la salud humana y de los animales.

1.12.2 Objetivos particulares

- Evaluar la variabilidad genética de aislamientos de *Fusarium poae*.
- Identificar regiones codificantes asociadas a la producción de toxinas del patógeno.



Capítulo II:

Materiales y métodos



2.1 Recolección de las muestras

Para este estudio se utilizaron aislamientos obtenidos de la Argentina y otros cedidos por distintos investigadores (Tabla 1), llegando a contar con una colección de 173 aislamientos totales de *Fusarium poae* de distintos lugares del mundo (Fig. 12). Para la obtención de los cultivos puros de la Argentina, se procedió a tomar 100 semillas de trigo y/o cebada al azar de muestras de 2 kg, se las desinfectó superficialmente mediante el empleo de alcohol etílico al 70% por 2 min y luego se las sumergió en hipoclorito de sodio al 1% durante 2 min, finalizando con dos lavados con agua estéril durante 2 min. Posteriormente, se colocaron, mediante la utilización de una pinza previamente flameada, las semillas en placas de Petri conteniendo agar papa glucosado 2% (APG) (200 gr de extracto de papa, 20 gr de glucosa, 20 gr de agar, 800 ml de agua destilada y 0,25 gr de cloranfenicol) y se incubaron a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 5-7 días, con alternancia de 12 hs luz/oscuridad.

Una vez alcanzado ese período de tiempo, se realizaron las primeras determinaciones morfológicas de los hongos desarrollados en las diferentes semillas. Las colonias que mostraron un abundante micelio aéreo, primeramente de color pálido, oscureciéndose con el paso del tiempo hasta adquirir una coloración marrón rojiza, similar al esperado para *Fusarium poae*, fueron repicadas a cajas de Petri con agar clavel (CLA) (20 gr de agar en 1000 ml de agua, al cual se le colocan hojas de clavel, previamente desinfectadas) y tubos pico de flauta con APG, e incubadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 5-7 días, con alternancia de 12 hs luz/oscuridad (Leslie & Summerell, 2006). Pasado ese período de tiempo, se realizaron las observaciones microscópicas para poder identificar a los

aislamientos, teniendo en cuenta que *Fusarium poae* posee una notable producción de microconidios globosos o napiformes, sin septos u ocasionalmente uniseptados, con escasa producción de macroconidios, en su mayoría con 3 septos, con una célula apical curvada, célula basal en forma de pie y con un característico olor dulce (Leslie & Summerell, 2006) (Fig. 11).

Figura 11. Microconidios de *Fusarium poae*. Observación al microscopio de un aislamiento identificado morfológicamente como *Fusarium poae* (40 x).



Una vez obtenidos los aislamientos que correspondían a la descripción detallada previamente, se procedió a la obtención del cultivo monospórico de los mismos, el cual consistió en realizar una suspensión de conidios en 2 ml totales de agua estéril. De dicha suspensión, se tomaron 100 μ l y se sembró en superficie en placas de Petri conteniendo medio APG. Se las llevó a la cámara de crecimiento a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ con alternancia 12 hs luz/oscuridad, se las dejó aproximadamente 2 días y se realizó el traspaso de las colonias iniciadas de una espora a otra caja de Petri con medio de cultivo Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) (KH_2PO_4 1 gr;

KNO_3 1 gr; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 gr; KCl 0,5 gr; glucosa 0,2 gr; sacarosa 0,2 gr; agar 20 gr y agua destilada hasta 1000 ml).

Tabla 1. Aislamientos de *Fusarium poae* utilizados en esta tesis.

Aislamientos	Género/especie/Variedad	País	Ciudad/Región	Año
HSu1a&#	<i>Hordeum vulgare</i> -Q. scarlett	Argentina	Cnel. Suarez	2006
HPu1a&	<i>Hordeum vulgare</i> -Q. alfa	Argentina	Puán	2006
HPu4a&	<i>Hordeum vulgare</i> -Q. scarlett	Argentina	Puán	2006
HTA1a* &#	<i>Hordeum vulgare</i> -Q. scarlett	Argentina	Tres Arroyos	2007
HBe1a* &	<i>Hordeum vulgare</i> -Q. scarlett	Argentina	Belloq	2007
HBe1c&	<i>Hordeum vulgare</i> -Q. scarlett	Argentina	Belloq	2007
HBig1a* &#	<i>Hordeum vulgare</i> -B1215	Argentina	Bigand	2007
TCa1a&#	<i>Triticum aestivum</i> -Buck manantial	Argentina	Castelar	2005
TSS1b&	<i>Triticum aestivum</i> -Baguette 10	Argentina	Sancti Spiritu	2006
TSS2a* &	<i>Triticum aestivum</i> -Klein Chajá	Argentina	Sancti Spiritu	2006
THo1b* &	<i>Triticum aestivum</i> -Población chilena	Argentina	Los Hornos	2005
THo1d&#	<i>Triticum aestivum</i> -Población chilena	Argentina	Los Hornos	2005
TPu1a* &#	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Argentina	Puán	2005
TPu1c&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Argentina	Puán	2005
TSa1a* &	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Argentina	Saladillo	2007
TSm1a&	<i>Triticum aestivum</i> -Baguette 21	Argentina	San Manuel	2007
TBig1a&#	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Argentina	Bigand	2007
TMa1a&#	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Argentina	25 de Mayo	2007
TJu1a* &	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Argentina	Junín	2007
TPe1a&#	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Argentina	Pergamino	2007
LSP1a&#	<i>Lycopersicum esculentum</i> -SD	Argentina	San Pedro	2003
MICA-T-01* &	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Argentina	Bragado	SD
MICA-T-04&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Argentina	Arrecifes	SD
MICA-T-06* &#	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Argentina	San Antonio de Areco	SD
MICA-T-07&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Argentina	Junín	SD
MICA-A-01* &#	<i>Avena sativa</i> -SD	Argentina	Gualeduaychu	SD
MICA-A-02* &	<i>Avena sativa</i> -SD	Argentina	Gualeduaychu	SD
MICA-A-03* &	<i>Avena sativa</i> -SD	Argentina	Urdinarrain	SD
MICA-A-04* &	<i>Avena sativa</i> -SD	Argentina	Urdinarrain	SD
MICA-A-05*	<i>Avena sativa</i> -SD	Argentina	Basavilbaso	SD
CA1* &	<i>Triticum aestivum</i> -Buck Guapo	Argentina	Coronel Suárez	2004
CA2* &	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Argentina	Necochea	2004
CA3* &	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Argentina	25 de Mayo	2004
CA4* &	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Argentina	25 de Mayo	2004
CA5* &	<i>Triticum aestivum</i> -Buck Sureño	Argentina	Coronel Pringles	2004
CA6* &	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Argentina	Guaminí	2003
CA7* &	<i>Triticum aestivum</i> -Buck Guapo	Argentina	Azul	2004
4/4343/1	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Reino Unido	Suffolk	SD
1021&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Reino Unido	Lancashire	2006
887* &	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Reino Unido	W. Yorshire	2006
747&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Reino Unido	Buckinghamshire	2003
736* &	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Reino Unido	Norfolk	2003

Tabla 1. Continuación.

731*	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Reino Unido	Hereford & Worcester	2003
721*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Reino Unido	Humberside	2003
720	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Reino Unido	Merseyside	2003
718*	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Reino Unido	Northumberland	2003
563&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Reino Unido	Oxfordshire	2002
552&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Reino Unido	Surrey	2002
527*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Reino Unido	County Durham	2002
522*	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Reino Unido	Cambridgeshire	2002
506*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Reino Unido	Somerset	2002
444*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Reino Unido	Hereford	2002
303*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Reino Unido	Kent	2001
300	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Reino Unido	Nottinghamshire	2001
295*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Reino Unido	Norfolk	2001
173&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Reino Unido	Hampshire	1998
141	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Reino Unido	Wiltshire	1998
F18*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Reino Unido	Cambridge	SD
F600&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Reino Unido	SD	SD
4/3084/1*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Reino Unido	Surrey	SD
4/3084/2&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Reino Unido	Surrey	SD
4/3084/3&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Reino Unido	Surrey	SD
4/3084/4*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Reino Unido	Surrey	SD
I14-99*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Italia	SD	1999
6025*&	<i>Hordeum vulgare</i> -SD	Finlandia	Ylistaro	2006
6070&	<i>Avena sativa</i> -SD	Finlandia	Maaninka	2006
6101	<i>Avena sativa</i> -SD	Finlandia	Rovaniemi	2006
6107*	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Finlandia	Mikkeli	2006
6129	<i>Hordeum vulgare</i> -SD	Finlandia	Kymenlaakso	2006
6159*	<i>Avena sativa</i> -SD	Finlandia	Varsinais-Suomi	2006
6191*&	<i>Avena sativa</i> -SD	Finlandia	Pirkanmaa	2006
6273	<i>Secale cereale</i> -SD	Finlandia	Piikkio	2006
6326*&	<i>Hordeum vulgare</i> -SD	Finlandia	Satakunta	2006
6947*	<i>Hordeum vulgare</i> -SD	Finlandia	Jokionen	2006
6085	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Finlandia	Jokionen	2006
6183*	<i>Hordeum vulgare</i> -SD	Finlandia	North Ostrobothnia	2006
Fp0335*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Suiza	Solothurn	2003
Fp0338	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Suiza	Belpberg	2003
Fp0378*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Suiza	Seedorf	2003
Fp0503&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Suiza	Ruppoldsried	2005
3107*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Polonia	SD	2003
6410*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Polonia	SD	2006
6408*	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Polonia	SD	2006

Tabla 1. Continuación.

61401&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Polonia	SD	2006
6402*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Polonia	SD	2006
60902*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Polonia	SD	2006
F730*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Alemania	SD	SD
F732&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Alemania	SD	SD
F733*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Alemania	SD	SD
GE1*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Alemania	Dedelow(Uckermarck)	2001
GE2&	SD	Alemania	Bonn	2001
GE3&	SD	Alemania	Paulineae (Havelland)	2004
GE4*&	SD	Alemania	Paulineae (Havelland)	2004
GE5*&	SD	Alemania	Paulineae (Havelland)	2004
GE6	SD	Alemania	Paulineae (Havelland)	2004
GE7	SD	Alemania	Paulineae (Havelland)	2004
GE8*&	SD	Alemania	Paulineae (Havelland)	2004
GE9*&	SD	Alemania	Paulineae (Havelland)	2004
GE10*&	SD	Alemania	Paulineae (Havelland)	2004
GE11	SD	Alemania	Hohennauen (Havelland)	2004
GE12*&	SD	Alemania	Hohennauen (Havelland)	2004
GE13*&	SD	Alemania	Paulineae (Havelland)	SD
P1	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Canada	Manitoba	2008
P2*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Canada	Saskatchewan	2008
P3	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Canada	Saskatchewan	2008
P4&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Canada	Saskatchewan	2008
P5*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Canada	Saskatchewan	2008
P6	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Canada	Saskatchewan	2008
P7*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Canada	Saskatchewan	2008
P8	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Canada	Saskatchewan	2008
P9*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Canada	Saskatchewan	2008
P10&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Canada	Saskatchewan	2008
P11	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Canada	Saskatchewan	2008
P12*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Canada	Saskatchewan	2008
P13&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Canada	Saskatchewan	2008
P14	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Canada	Saskatchewan	2008
P15*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Canada	Saskatchewan	2008
P16	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Canada	Saskatchewan	2008
P17	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Canada	Saskatchewan	2008
P18*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Canada	Alberta	2008
P19	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Canada	Alberta	2008
P20*	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Canada	Alberta	2008
P21*	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Canada	Alberta	2008
P22&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Canada	Alberta	2008

Tabla 1. Continuación.

P23*	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Canada	Ontario	2008
Bo101.1*&	SD	Bélgica	SD	2008
Bo104.2&	SD	Bélgica	SD	2008
Bo203.2&	SD	Bélgica	SD	2008
Bo207.1*&	SD	Bélgica	SD	2008
Ve108.1*&	SD	Bélgica	SD	2008
Zw316.2&	SD	Bélgica	SD	2008
Zw314.1*	SD	Bélgica	SD	2008
Zw313.1	SD	Bélgica	SD	2008
Zw310.2*	SD	Bélgica	SD	2008
Zw307.2	SD	Bélgica	SD	2008
Zw210.1*&	SD	Bélgica	SD	2008
Zw116.1	SD	Bélgica	SD	2008
Zw106.1*	SD	Bélgica	SD	2008
To108.1*&	SD	Bélgica	SD	2008
To302.1*&	SD	Bélgica	SD	2008
182/I468*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Francia	Este	2007
183/I469*	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Francia	Este	2007
187/I473	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Francia	Este	2007
188/I474*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Francia	Centro/Norte	2007
192/I478*	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Francia	Oeste	2007
194/I480	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Francia	Este	2007
195/I481	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Francia	Centro/Norte	2007
196/I482	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Francia	Oeste	2007
198/I484*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Francia	Centro/Norte	2007
199/I485*	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Francia	Centro/Norte	2007
204/I490*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Francia	Oeste	2007
205/I491	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Francia	Oeste	2007
206/I492*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Francia	Centro/Norte	2007
I71*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Francia	Sudeste	2007
I72*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Francia	Sudeste	2007
I109*&	<i>Zea mays</i> -SD	Francia	Sudoeste	2007
I110*&	<i>Zea mays</i> -SD	Francia	Sudoeste	2007
I111&	<i>Zea mays</i> -SD	Francia	Centro/Norte	2007
I475*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Francia	Este	2007
I476&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Francia	Oeste	2007
I477	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Francia	Este	2007
TAPO 21*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Hungría	SD	1992
TAPO 34*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Hungría	SD	1992
LT03 08 (57)*&	<i>Brassica oleracea</i> -SD	Luxemburgo	Nothum	SD
LT03 35 (80)*&	<i>Brassica oleracea</i> -SD	Luxemburgo	Nothum	SD

Tabla 1. Continuación.

LT14 05 (491)*&	<i>Zea mays</i> -SD	Luxemburgo	Kayl	SD
LT14 27 (504)*&	<i>Zea mays</i> -SD	Luxemburgo	Kayl	SD
LT15 16 (525)*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Luxemburgo	Dippach	SD
127 sorpa 7-U1*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Uruguay	Soriano	SD
93 payca 11-U2*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Uruguay	Paysandú	SD
20 riogr 2-U3*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Uruguay	Río Negro	SD
61 colta 11-U4*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Uruguay	Colonia	SD
150 sanle 17-U5*&	<i>Triticum aestivum</i> -SD	Uruguay	San José	SD

* Aislamientos utilizados para el análisis con marcadores moleculares de tipo SRAP

& Aislamientos utilizados para el diseño de un cebador específico para amplificar regiones que codifiquen para la producción de nivalenol

Aislamientos utilizados para el análisis de nivalenol y deoxynivalenol mediante HPLC/FD

SD: sin datos

-Los aislamientos MICA fueron provistos por H. González, Universidad Nacional de Buenos Aires, Argentina.

-Los aislamientos de Bélgica fueron provistos por K. Audenaert, University of Gent, Departamento de Ciencias Biológicas, Gent, Bélgica.

-Los aislamientos de Canadá fueron provistos por R. Clear, Grain Research Laboratory, Canadian Grain Commission, Winnipeg, Canada.

-Los aislamientos de Inglaterra, Italia y Alemania (F730, F732, F733) fueron provistos por P. Nicholson, John Innes Centre, Norwich, UK.

-Los aislamientos de Finlandia fueron provistos por P. Parikka, MTT Agrifood Research Finland, Jokioinen, Finlandia.

-Los aislamientos de Francia fueron provistos por C. Barreau, INRA-MycSA, Francia.

-Los aislamientos de Alemania fueron provistos por U. Korn, Leibniz-Centre for Agricultural Landscape Research, Müncheberg, Alemania.

-Los aislamientos de Hungría fueron provistos por L. Hornok, Agricultural Biotechnology Center, Szent István University, Gödöllő, Hungría.

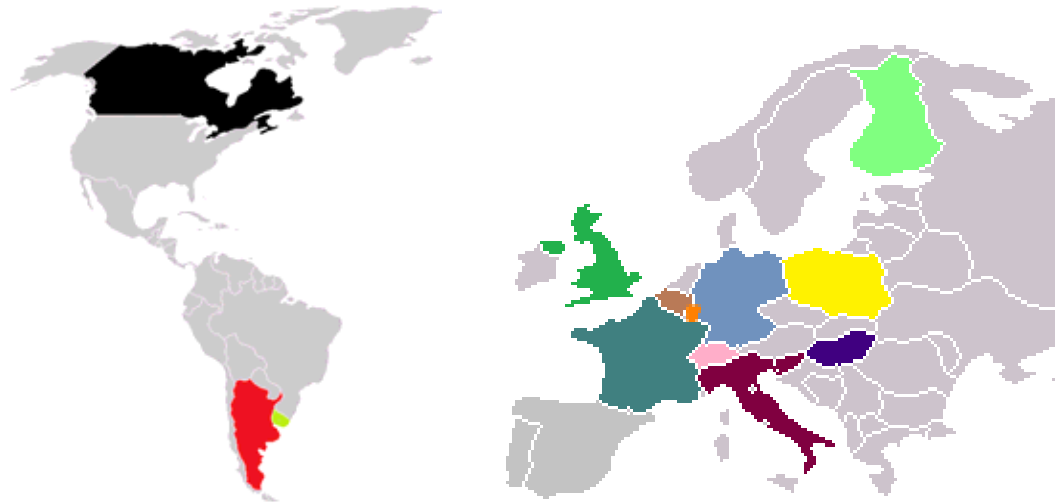
-Los aislamientos de Luxemburgo fueron provistos por M. Pasquali, Centre of Research Public-Gabriel Lippmann, Belvaux, Luxemburgo.

-Los aislamientos de Polonia fueron provistos por T. Kulik, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Polonia.

-Los aislamientos de Suiza fueron provistos por S. Vogelgsang, Research Station Agroscope Reckenholz-Tanikon, Zurich, Suiza.

-Los aislamientos de Uruguay fueron provistos por D. Pan, Laboratorio de Micología, Facultad de Ingeniería, Montevideo, Uruguay.

Figura 12. Origen de los aislamientos de *Fusarium poae* estudiados.



2.2 Extracción del ADN

La extracción del ADN se realizó siguiendo el protocolo CTAB (Cetil-trimetil-bromuro de amonio) (Doyle & Doyle, 1990) modificado (Stenglein & Balatti, 2006).

Los aislamientos monospóricos fueron incubados en cajas de Petri con medio APG a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 5 días, con alternancia de 12 hs luz/oscuridad. Se raspó el micelio aéreo proveniente de 2 cajas de Petri con un bisturí previamente lavado con alcohol 70%. Se colocó en un mortero estéril con nitrógeno líquido y se molió rápidamente. Una vez molido el micelio, se añadió 800 μl de 'buffer' (100 mM Tris-HCl + 20 mM EDTA + 1,4 M NaCl + 0,2% β -mercaptoetanol) al cual se le adicionó 200 μl de CTAB al 10% + 1% polivinilpirrolidona (PVP) y finalmente se lo trituró.

El micelio triturado se colocó en tubos Eppendorf estériles de 2 ml, los que se incubaron 30 min a 60°C en un termobloque seco (Major Science CO.,

LTD). Posteriormente, se lavó con cloroformo isoamilalcohol (12:1) ($\pm 600 \mu\text{l}$), se mezcló y se centrifugó durante 5 min a 14.000 rpm. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf estéril de 2 ml, al cual se le agregó 2/3 de volumen de isopropanol frío (aprox. 500-600 μl) y se lo colocó en el freezer -20°C para que precipite el ADN (toda la noche). El ADN precipitado se centrifugó durante 7-10 min a 14.000 rpm y se lavó el 'pellet' con etanol al 75% - acetato de amonio 10 mM (200-400 μl). Se golpeó suavemente para facilitar el desprendimiento del 'pellet' y se centrifugó de 5-10 min a 14.000 rpm. La fase líquida se descartó y el 'pellet' se lavó con etanol frío 70% (200-300 μl). Se centrifugó nuevamente 1-5 min a 14.000 rpm, se secó el 'pellet' y se resuspendió en 150 μl de 'buffer' TE (10 mM Tris-HCl pH 8 + 1 mM EDTA pH 8). Se lo dejó durante 1 h a 37°C y se lo colocó en el freezer a -20°C . Se realizaron las cuantificaciones del ADN con un fluorómetro (Qubit Fluorometer, Invitrogen). Paralelamente para comprobar la calidad del ADN extraído, se realizaron corridas electroforéticas del ADN extraído en geles de agarosa al 0,7% conteniendo 4 μl de GelRedTM (Biotium, Hayward, CA, USA) en 'buffer' TBE 1X (90 mM Tris-borato + 1 mM EDTA). Las corridas electroforéticas se realizaron a una corriente de 80 voltios durante 2-4 hs. La visualización del ADN se realizó por irradiación con luz UV. Los geles se documentaron digitalmente (DOC-6490, Biodynamics S.R.L, Buenos Aires, Argentina).

2.3 Reacciones específicas para *Fusarium poae*

Basados en las características morfológicas y dado que *Fusarium poae* podría ser identificado equívocamente con otras especies del género como son el

caso de *F. langsethiae*, *F. sporotrichioides* y *F. tricinctum* (Torp & Nirenberg, 2004), se han desarrollado cebadores específicos para esta especie, que permiten, mediante PCR, confirmar molecularmente lo determinado mediante observaciones microscópicas (Parry & Nicholson, 1996). Por tal motivo, se realizaron reacciones de PCR con cebadores específicos para *F. poae* a los cuales se les incluyó un aislamiento de *F. sporotrichioides* como control negativo y un aislamiento de *F. poae* cedido por el Dr. Nicholson, del John Innes Centre, Norwich, Inglaterra, como control positivo.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 μ l, conteniendo 10-20 ng de ADN genómico, 'buffer' de reacción 10X (20 mM Tris-HCL pH 8, 100 mM KCL, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glicerol, 0,5% Tween 20® y 0,5% Nonidet P40®), 2,5 mM de MgCL₂, 200 μ M de cada dNTP, 0,5 μ M de cada cebador (Fp82F 5'-CAAGCAAACAGGCTCTTCACC-3'; Fp82R -5'-TGTTCCACCTCAGTGACAGGTT-3'), 1,25 unidades de *Taq* polimerasa (InbioHigway, Tandil), 10% de solución de Cresol Red (Sigma-Aldrich Co. St Louis, MO), 0,05% Tween 20®, 0,05% Nonidet P40® y agua destilada estéril hasta completar el volumen final.

El termociclador (XP Termal Cycler, Bioer Technology Co, LTD) fue programado con un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 2 min. Luego, para un ciclo de desnaturalización a 95°C por 30 seg, apareamiento ('annealing') a 62°C por 30 seg, extensión a 72°C por 45 seg, los cuales fueron repetidos 29 veces. La reacción se finalizó con 2 min de extensión final a 72°C.

Los productos de PCR obtenidos se sembraron en geles de agarosa al 1,5% conteniendo 4 μ l de GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, USA) e inmersos en

'buffer' TBE 1X. Para determinar el tamaño del fragmento, se utilizó un marcador de peso molecular conocido de 100pb (Genbiotech S.R.L., Buenos Aires, Argentina) con un rango de fragmentos distinguibles de 100pb a 1500pb. Las corridas electroforéticas se realizaron a una corriente de 80 voltios durante 2 hs.

La visualización de los fragmentos obtenidos se realizó por irradiación con luz UV. Los geles fueron registrados con el sistema de documentación digital DOC-6490 (Biodynamics S.R.L., Buenos Aires, Argentina).

2.4 Conservación de los aislamientos obtenidos

Para mantener la integridad del material biológico usado en este estudio, se procedió a conservar los aislamientos fúngicos en tubos pico de flauta con el medio de cultivo SNA (Nirenberg, 1976). Por otro lado, pequeños trozos de medio de cultivo SNA conteniendo a cada uno de los aislamientos de interés fueron colocados en tubos Eppendorf estériles de 2 ml y en frascos caramelo con vaselina líquida, todos ellos mantenidos a 4°C (Fig. 13).

Figura 13. Conservación de los aislamientos de *F. poae*.



2.5 Amplificaciones de regiones MAT-1 y MAT-2

Considerando que la compatibilidad sexual en hongos heterotálicos está determinada por el “*locus MAT*”, compuesto por dos idiomorfos (MAT-1 y MAT-2) y habiendo evidencia de que ambos idiomorfos fueron amplificados en especies con ciclo sexual desconocido y que podrían generar variabilidad genética (Kerényi *et al.*, 2004), es que se plantea amplificar estos idiomorfos en aislamientos de *F. poae* como posible mecanismo que pueda explicar la variabilidad encontrada en esta especie. Para cumplimentar con este objetivo se utilizaron la totalidad de los aislamientos de *F. poae* citados en la Tabla 1.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 μ l, conteniendo los mismos reactivos que la reacción de PCR detallada previamente, a los cuales se le adicionó 0,5 μ M de cada cebador (Tabla 2).

El termociclador (XP Termal Cyclor, Bioer Technology Co, LTD) fue programado con un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 2 min. Luego, para un ciclo de desnaturalización a 94°C por 30 seg, apareamiento a 50°C-52°C (MAT-1 y MAT-2, respectivamente) por 30 seg, extensión a 72°C por 5 min, los cuales fueron repetidos 29 veces. La reacción se finalizó con 10 min de extensión final a 72°C. También se realizó una reacción ‘multiplex’ con ambos pares de cebadores y a una temperatura de 52°C para poder amplificar, en una sola reacción y con las mismas condiciones que las descriptas anteriormente, ambos idiomorfos.

Todas la reacciones fueron repetidas por lo menos dos veces para verificar la reproducibilidad.

Tabla 2. Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de MAT-1 y MAT-2.

Cebadores	Secuencia (5'-3')
MAT-1-F	CGC CCT CTK AAY GSC TTC ATG
MAT-1-R	GGA RTA RAC YTT AGC AAT YAG GGC
MAT-2-F	CGA CCT CCC AAY GCY TAC AT
MAT-2-R	TGG GCG GTA CTG GTA RTC RGG

Los fragmentos del ADN, productos de la amplificación por PCR, se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% conteniendo 4 µl de GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, USA) inmersos en 'buffer' TBE 1X. Las corridas electroforéticas se realizaron a una corriente de 80 voltios durante 2-4 hs.

La visualización de los fragmentos obtenidos se realizó por irradiación con luz UV. Los geles fueron registrados con el sistema de documentación digital DOC-6490 (Biodynamics S.R.L, Buenos Aires, Argentina).

Para corroborar que los fragmentos amplificados correspondan a los alelos MAT-1 y MAT-2, se procedió a purificar distintos fragmentos para su posterior secuenciado. Para ello se eligieron al azar 3 aislamientos de *F. poae*: uno de ellos que amplificó sólo para MAT-1, otro aislamiento sólo para MAT-2 y un último aislamiento que fue capaz de amplificar para MAT-1 y MAT-2. Se realizaron las reacciones correspondientes y se purificaron los productos de amplificación utilizando 'PureLinK PCR purification kit' (Invitrogen, Löhne, Germany) siguiendo las especificaciones del fabricante. El secuenciamiento del ADN se hizo en ambos sentidos mediante el uso de 'Big Dye Terminator versión 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit' (Applied Biosystems Foster City, CA, USA) en

un secuenciador Applied Biosystems (ABI/Hitachi Genetic Analyzer 3130). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos existentes del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (Astchul *et al.*, 1990).

2.6 Amplificaciones mediante marcadores de tipo ISSR

Para cumplimentar con este objetivo se evaluaron la totalidad de los aislamientos de *Fusarium poae* detallados en la Tabla 1.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 μ l, conteniendo 10-20 ng de ADN genómico, 'buffer' de reacción 10X (20 mM Tris-HCL pH 8, 100 mM KCL, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glicerol, 0,5% Tween 20® y 0,5% Nonidet P40®), 2,5 mM de MgCL₂, 200 μ M de cada dNTP, 0,7 μ M de cebador, 1,25 unidades de *Taq* polimerasa (InbioHighway, Tandil, Buenos Aires), 10% de solución Cresol Red (Sigma- Aldrich Co. St Louis, MO) y agua destilada estéril hasta completar el volumen final.

El termociclador (XP Termal Cycler, Bioer Technology Co, LTD) fue programado con un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 7 min. Luego, se programó para un ciclo de desnaturalización a 94°C por 1 min, apareamiento a 50°C por 1 min 15 seg, extensión a 72°C por 4min, los cuales fueron repetidos 32 veces. La reacción se finalizó con 7 min de extensión final a 72°C. La temperatura de apareamiento varió según el cebador utilizado (Tabla 3).

Todas la reacciones fueron repetidas por lo menos dos veces para verificar la reproducibilidad.

La amplificación de fragmentos de ADN mediante ISSR se realizó con 20 cebadores utilizando 32 aislamientos de *Fusarium poae* al azar (Tabla 3) de los

cuales se seleccionaron 6 de ellos por mostrar un patrón claro de amplificación para todos los genotipos seleccionados. Los cebadores seleccionados fueron: Bio3-A5, Biolab D, Biolab E, Biolab F, Biolab H y Biolab J.

Tabla 3. Secuencia y temperatura de apareamiento de los cebadores utilizados.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)
Bio1-A3	(AG) ₈ TA	52
Bio2-A3	(GA) ₈ ACC	58
Bio3-A3	(GAG) ₅ CAG	60
Bio4-A3	(AC) ₈ C	52
Bio1-N	(CAA) ₅	40
Bio2-N	(ATG) ₆	48
Bio3-N	(CT) ₈	48
Bio1-A5	GAG (AGG) ₅	60
Bio2-A5	CTC (GTG) ₅	40
Bio3-A5	(GAG) ₅ CAG	53
Biolab A	(AC) ₈	57
Biolab B	(AG) ₈ TG	52
Biolab C	(AG) ₈ CG	54
Biolab D	(AG) ₈	48
Biolab E	CTC (GT) ₈	48
Biolab F	CT (GA) ₈	53
Biolab G	GAG (CAA) ₅	52
Biolab H	(GCC) ₅	66
Biolab I	(CAA) ₅	55
Biolab J	(CAC) ₅	53

2.6.1 Visualización de los fragmentos amplificados

Los fragmentos del ADN, productos de la amplificación por PCR de los marcadores de tipo ISSR, fueron separados con un equipo de electroforesis vertical omniPAGE maxi (Genbiotech), con geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 4% y urea 5 M, sumergidos en 'buffer' TBE al 1X. Los vidrios

fueron lavados inicialmente con detergente neutro y agua estéril, y luego dos lavados con alcohol 95% y alcohol 70%, respectivamente. Una vez armado el gel para realizar electroforesis, se le adicionó una solución que contenía 75 ml totales de poliacrilamida al 4%, 75 μ l de N, N, N', N' Tetrametiletilendiamina (TEMED) y 150 μ l de persulfato de amonio al 25% y se lo dejó polimerizar durante toda la noche.

A cada una de las reacciones de amplificación se les adicionó 10 μ l de 'buffer' de carga conteniendo azul de bromofenol 0,25%-sacarosa 40% y se las desnaturalizó por 2 min a 90°C para lograr mayor separación de los fragmentos resultantes. Una vez finalizado el tiempo correspondiente, se las colocó en hielo y se sembró 20 μ l del producto de PCR mediante el uso de una microjeringa Hamilton. Los productos fueron separados a 56mA constantes por aproximadamente 4 hs.

2.6.2 Tinción y revelado de geles de poliacrilamida

La tinción y el revelado de geles de poliacrilamida se realizó basándose en los protocolos de Bassam *et al.* (1991) con algunas modificaciones que se detallan a continuación. Al finalizar la electroforesis, los vidrios fueron desmontados y los geles resultantes fueron separados de los vidrios y puestos en soportes para su posterior tinción. Primeramente, se los colocó en ácido acético al 10% por 20 min para su correcta fijación. Pasado ese período de tiempo se realizaron tres lavados consecutivos con agua destilada, de una duración de 2 min cada uno y luego se los colocó en un recipiente protegido de la luz para la tinción con nitrato de plata (1g/l) y formaldehído al 0,056% por 30 min. Inmediatamente, se lavó el gel con

agua destilada por 10 seg y se los colocó en la solución reveladora conteniendo carbonato de sodio (30g/l), formaldehído al 0,056%, tiosulfato de sodio al 10%, hasta la correcta visualización de los fragmentos. Una vez obtenida la definición buscada, se los colocó en ácido acético al 10% por 20 min y finalmente 10 min en agua destilada. El montaje de los geles para su secado se realizó mediante la colocación de los mismos en papel celofán.

2.7 Amplificaciones mediante marcadores de tipo AFLP

Para cumplimentar con este objetivo se evaluaron la totalidad de los aislamientos de *Fusarium poae* detallados en la Tabla 1.

La técnica de AFLP se realizó siguiendo el protocolo de Vos *et al.* (1995).

- **Digestión del ADN**

El ADN genómico total (100 ng) fue digerido con dos enzimas de restricción, una de corte poco frecuente (*EcoRI*, New England Biolabs, Hitchin, Hertfordshire, UK) con sitio de corte 5'G[↓]AATTC 3' y otra de corte frecuente (*MseI*, New England Biolabs, Hitchin, Hertfordshire, UK) con sitio de corte 5'T[↓]TAA 3'. La primera de ellas reconoce 6pb, mientras que la *MseI* tiene lugar de reconocimiento de 4pb. La mezcla de la reacción de digestión se detalla a continuación (Tabla 4).

Tabla 4. Componentes de la reacción de digestión mediante enzimas de restricción.

Componente	Volumen
ADN genómico total (100ng)	5µl
Enzima <i>MseI</i> (2,5U)	0,25µl
'Buffer' NEB	2,5µl
"Albúmina de suero bovino" (BSA) 100X	0,25µl
Enzima <i>EcoRI</i> (20U)	1µl
'Buffer' <i>EcoRI</i>	0,25µl
Agua destilada estéril	15,75µl

La reacción se incubó por 2 hs a 37°C. Pasado ese período de tiempo, las muestras se colocaron en hielo.

- **Ligación de adaptadores**

A la solución anterior se le adicionan los siguientes componentes para permitir la ligación de adaptadores a los extremos cohesivos obtenidos mediante la actividad de las enzimas de restricción (Tabla 5).

Tabla 5. Componentes de la reacción de ligación de adaptadores.

Componente	Volumen
Mezcla digestión	20µl
Adaptador <i>EcoRI</i> (5pmoles/µl)	0,5µl
Adaptador <i>MseI</i> (50pmoles/µl)	0,5µl
T4 ADN Ligasa	0,3µl
'Buffer' T4 ADN Ligasa (100U)	2,5µl
Agua destilada estéril	1,2µl

La reacción se incubó a $16^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ teniendo en cuenta la temperatura óptima de actividad de las enzimas. Luego se colocó en hielo y se realizó una dilución 1:10 en ‘buffer’ TE 1X para su posterior amplificación pre-selectiva.

- **Reacción de amplificación pre-selectiva**

Para la reacción de amplificación pre-selectiva, se tomaron 5 μl del ADN previamente digerido y ligado, y se le adicionó los siguientes componentes (Tabla 6).

Tabla 6. Componentes de la amplificación pre-selectiva.

Componentes	Volumen
ADN digerido y ligado	5 μl
‘Buffer’ PCR 10X	2,5 μl
Cl_2Mg (25mM)	2,5 μl
dNTP (10mM)	1 μl
Partidor <i>EcoRI</i> (10pmoles/ μl)	0,6 μl
Partidor <i>MseI</i> (10pmoles/ μl)	0,6 μl
<i>Taq</i> polimerasa	0,25 μl
Agua destilada estéril	12,55 μl

La solución resultante se colocó en el termociclador (XP Thermal Cycler, Life Express, Bioer Technology Co, LTD), el cual fue programado de la siguiente manera: primero, un ciclo de desnaturalización inicial de 94°C por 2 min; luego,

un ciclo de desnaturalización de 94°C por 30 seg, uno de apareamiento de los cebadores de 55°C por 1 min y un ciclo de extensión de 72°C por 1 min, todos ellos repetidos por un total de 20 ciclos. Finalmente, un ciclo de extensión final de 72°C por 5 min totales.

Una vez finalizada la etapa de amplificación pre-selectiva, se realizó una dilución 1:20 de la solución total en 'buffer' TE al 1X.

- **Amplificación selectiva**

Finalmente, se tomaron 5 µl de la solución resultante de la amplificación pre-selectiva para usar de templado en este paso, a la cual se le adicionó los siguientes componentes (Tabla 7). Para este paso, se utilizaron dos combinaciones de cebadores: ECORI-AC/MSEI-CC y ECORI-AC/MSEI-CA.

Tabla 7. Componentes de la amplificación selectiva.

Componentes	Volumen
ADN preamplificado	5µl
'Buffer' PCR 10X	2,5µl
Cl ₂ Mg (25mM)	2,5µl
dNTP (10mM)	1,6µl
Cebador <i>EcoRI</i> (1pmol/µl)	1µl
Cebador <i>MseI</i> (5pmol/µl)	1µl
<i>Taq</i> polimerasa	0,25µl
Agua destilada estéril	6,15µl

El termociclador (XP Thermal Cycler, Life Express, Bioer Technology Co, LTD) fue programado de la siguiente manera: una desnaturalización inicial de 94°C por 4 min, seguido de una desnaturalización a 94°C de 30 seg, un ciclo de apareamiento de cebadores a 65°C por 30 seg, con descenso de 0,7°C por ciclo hasta llegar a 56°C y un ciclo de extensión de 72°C por 1 min. Estos últimos tres pasos se repitieron por un total de 11 veces. Luego se continuó con un ciclo de desnaturalización de 94°C por 30 seg, seguido de 25 ciclos de una desnaturalización a 94°C por 30 seg, uno de apareamiento de cebadores a 56°C por 30 seg y uno de extensión a 72°C por 1 min. Finalmente se concluyó con un segmento de extensión final de 72°C por 5 min. Todas las reacciones fueron repetidas por lo menos dos veces para verificar la reproducibilidad.

2.7.1 Visualización de los fragmentos amplificados

Los fragmentos resultantes, fueron separados en una cuba de secuenciado (Large Format Vertical, Genbiotech), con gel desnaturalizante de poliacrilamida al 6% y urea 5 M. El 'buffer' de corrida empleado fue TBE al 1X. Los vidrios fueron lavados primeramente con detergente neutro, seguido por un lavado con alcohol 95% y alcohol 70%, respectivamente. El vidrio corto fue tratado con una solución de 1 ml de etanol al 95%, al cual se le adicionó 5 µl de ácido acético y 3 µl de Bind Silane (Sigma-Aldrich Co. St Louis, MO), para permitir que el gel se adhiriera al vidrio chico, facilitando el proceso de tinción. La solución se adicionó mediante la utilización de papel "tissue" y fue dejada por 5 min. Pasado ese período de tiempo, se realizaron lavados con agua destilada estéril, seguido de lavados de alcohol al 95% y 70%, respectivamente, con el fin de evitar

contaminación con esta solución en el vidrio de mayor tamaño, lo que provocaría una rotura del gel a la hora de desmontarlo.

Una vez tratados los vidrios, se le adicionó una solución que contenía 80 ml totales de solución de poliacrilamida al 5%, 80 μ l de TEMED y 160 μ l de persulfato de amonio al 25% y se lo dejó polimerizar durante toda la noche.

Los vidrios fueron montados en el soporte y se realizó un precalentamiento de los mismos mediante una precorrida a 55W constantes por 30 min. Paralelamente, a cada una de las reacciones de amplificación se le adicionó 10 μ l de 'buffer' de carga conteniendo azul de bromofenol 0,25%- sacarosa 40% y se las desnaturizó por 5 min a 95°C. Pasado ese tiempo se colocaron las mismas en gradillas refrigeradas para su posterior siembra. La corrida electroforética se realizó a 55W constantes por aproximadamente 2,5 hs.

La tinción y el revelado de los geles se realizó mediante el protocolo de Bassam *et al.* (1991) con las modificaciones detalladas anteriormente.

2.8 Amplificaciones mediante marcadores de tipo SRAP

Para cumplimentar con este objetivo y analizar si este tipo de marcador molecular es apto para analizar la variabilidad genética en este patógeno, se evaluaron 105 aislamientos de *Fusarium poae* seleccionados al azar (Tabla 1).

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 25 μ l conteniendo 10-20 ng de ADN genómico total y los siguientes reactivos: 'buffer' de reacción 10X, 25 mM de MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, 0,25 μ M de cada cebador y 2,5 U de *Taq* polimerasa (InbioHighway, Tandil, Buenos Aires).

El termociclador de gradiente (Life Express, Bioer) fue programado de la siguiente manera: los primeros cinco ciclos fueron corridos a 94°C por 5 min, 94°C por 1 min, 35°C por 1 min y 72°C por 1 min para la desnaturalización inicial, desnaturalización, apareamiento y extensión, respectivamente. Luego la temperatura de apareamiento se elevó a 50°C por un total de 35 ciclos finales. Finalmente, se realizó una extensión final de 10 min a 72°C.

Todas la reacciones fueron repetidas por lo menos dos veces para verificar la reproducibilidad.

La amplificación de los fragmentos SRAP se realizó con 9 combinaciones de cebadores, de los cuales se eligieron 8 de ellos (SRAP 1F/1R-SRAP 2F/2R-SRAP 3F/3R-SRAP 2F/1R- SRAP 1F/3R- SRAP 3F/2R- SRAP 2F/3R- SRAP 3F/1R, Tabla 8) por mostrar un patrón claro de amplificación para todos los genotipos, presentando fragmentos polimórficos, reproducibles en las correspondientes repeticiones.

Tabla 8. Secuencias de cebadores usados para el análisis de SRAP.

Cebadores	Secuencias (5´-3´)
SRAP 1F	TGA GTC CAA ACC GGA TA
SRAP 2F	TGA GTC CAA ACC GGT CA
SRAP 3F	TGA GTC CAA ACC GGA AG
SRAP 1R	GAC TGC GTA CGA ATT GTC
SRAP 2R	GAC TGC GTA CGA ATT CCA
SRAP 3R	GAC TGC GTA CGA ATT GGT

La visualización de los fragmentos amplificados se realizó con la misma metodología utilizada para marcadores de tipo ISSR. La tinción de los geles de poliacrilamida se realizó de acuerdo a Bassam *et al.* (1991) con las modificaciones mencionadas anteriormente.

2.8.1 Secuenciación de fragmentos obtenidos mediante marcadores de tipo SRAP

Para comprobar la eficacia de este tipo de marcadores en lo que respecta a su capacidad de poder amplificar 'ORF', se procedió a purificar ciertos fragmentos, para posteriormente realizar el secuenciado de los mismos.

Para ello, se cortaron los fragmentos de interés con un bisturí, previamente desinfectado con alcohol y se colocaron en Eppendorf de 2 ml. A los mismos se le adicionó 50 µl de agua destilada estéril y con la ayuda de un tip se logró desintegrar el gel en el líquido adicionado. Posteriormente, se los colocó en un termobloque seco a 95°C por el término de 5 min y se procedió a centrifugarlos a 14.000 rpm por 5 min. Una vez logrado este paso, se realizó una reamplificación del fragmento, utilizando distintas cantidades de ADN, con iguales concentraciones y condiciones de ciclado que las descritas anteriormente para este tipo de marcadores moleculares.

Una vez obtenido el producto de reacción de PCR, se sembró la totalidad de los mismos en geles de agarosa al 1,5% y se lo corrió a 80V por el término de 1h. Se visualizó el gel bajo luz UV y se procedió a cortar la banda de interés con un bisturí, previamente desinfectado con alcohol, colocándose la misma en un Eppendorf de 2 ml. Una vez alcanzado este paso se procedió a purificar el

fragmento mediante el uso de ‘Purelink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit’ (Invitrogen), según el manual de procedimiento. Se cuantificó la solución obtenida y se envió a secuenciar en ambos sentidos mediante el uso de ‘Big Dye Terminator versión 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit’ (Applied Biosystems Foster City, CA, USA) en un secuenciador Applied Biosystems (ABI/Hitachi Genetic Analyzer 3130).

Una vez obtenidas las secuencias, se editaron y se compararon con la base de datos existentes para *Fusarium*, conocida como base de datos FUSARIUM-ID (Geiser *et al.*, 2004). Asimismo, las secuencias obtenidas fueron depositadas en la base de datos del NCBI (Altschul *et al.*, 1990).

2.9 Análisis estadístico de los datos para la totalidad de los marcadores empleados

A los datos ISSR, AFLP y SRAP obtenidos se les realizó un análisis de agrupamiento de manera individual. A partir de los documentos fotográficos de los fragmentos de ADN amplificados y separados por electroforesis, se generó una matriz binaria de datos. Esta es una matriz $n \times t$ donde las n filas representan los caracteres o variables (fragmentos ISSR, AFLP y SRAP) y las t columnas representan los genotipos (OTU- Unidades Taxonómicas Operativas) (Sneath & Sokal, 1973).

Se construyó una matriz básica de datos (MBD) de presencia/ausencia para el análisis con los datos obtenidos de los marcadores moleculares. Los fragmentos amplificados con los marcadores ISSR, AFLP y SRAP se consideraron como: presencia “1” o ausencia “0” de fragmentos.

Los patrones de amplificación generados por los diferentes genotipos se contrastaron, obteniéndose distintas combinaciones: **A**, número de fragmentos observados en ambos genotipos [1,1], **B**, número de fragmentos observados en un genotipo y que están ausentes en el otro [1,0], **C**, número de fragmentos ausentes en el primer genotipo y presente en el segundo [0,1] y **D**, fragmentos ausentes en ambos genotipos [0,0].

La similitud entre dos genotipos se cuantificó aplicando tres coeficientes de asociación que miden las coincidencias y diferencias entre los estados observados en ambos genotipos. Legendre & Legendre (1983) clasificaron los coeficientes de asociación en “*simétricos*”, cuando utilizan la doble ausencia o doble cero para el cálculo de la matriz de similitud; y “*asimétricos*”, cuando no consideran a la doble ausencia como indicador de semejanza.

A partir de la MBD se construyó una matriz de similitud utilizando, el coeficiente simétrico ‘Simple Matching’ y dos coeficientes asimétricos, el coeficiente de asociación ‘Jaccard’ y el coeficiente de ‘Dice’, según lo definen Sneath & Sokal (1973).

El coeficiente de ‘Simple Matching’ (SM) expresado por la fórmula:

$$SM = \frac{A+D}{A+B+C+D}$$

Se define como la proporción de características que coinciden entre dos OTU, es decir toma a los genotipos como similares si ambos presentan una banda (A[1,1]), o no la presentan (D[0,0]).

El coeficiente de asociación de 'Jaccard' no considera como elemento a favor de la similitud a los casos en que ambos genotipos tienen ausente el carácter comparado (D[0,0]). El coeficiente se calcula de la siguiente manera (Crisci & López Armengol, 1983):

$$J = \frac{A}{A+B+C}$$

El coeficiente denominado de 'Dice' confiere mayor peso a las coincidencias, es equivalente a la ecuación de Nei & Li (1979) y se expresa de la siguiente manera (Sneath & Sokal, 1973):

$$\text{Dice} = \frac{2A}{2A+B+C}$$

Los valores de similitud de los coeficientes oscilan entre 1 y 0 que equivalen a la máxima y mínima similitud, respectivamente. Las OTUs se agruparon mediante la técnica de ligamiento promedio no ponderado (UPGMA), que parte de **n** genotipos separados y los agrupa en sucesivos conjuntos (de

número menor que **n**) para llegar finalmente a un solo conjunto que contiene las **n** unidades.

Para medir el grado en que los fenogramas representan los valores de la matriz de similitud, se utilizó la técnica del coeficiente de correlación cofenética (CCC). La misma consiste en construir una nueva matriz de similitud a partir de los valores del fenograma denominada matriz cofenética y calcular la correlación existente entre los valores de dicha matriz y los de la matriz de similitud. Generalmente los valores oscilan entre 0,6 y 0,95 y se demostró que valores superiores a 0,8 indican una buena representación de la matriz de similitud por parte del dendograma (Sneath & Sokal, 1973).

La estructura obtenida a partir de la matriz de similitud con la técnica de agrupamiento se representó gráficamente en un dendograma, mostrando la relación o el grado de similitud entre los genotipos.

Para el análisis de agrupamiento y la generación de los dendogramas se utilizó el software NTSYS-pc 2.1 (Rohlf, 1998).

2.10 Análisis molecular de la varianza y de variabilidad genética

El análisis molecular de la varianza, AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992) se emplea para particionar la varianza en sus componentes jerárquicos (ej. variabilidad entre individuos dentro de poblaciones, entre poblaciones dentro de grupos de poblaciones y entre grupos de poblaciones) y para probar la significancia de los componentes de la varianza. El procedimiento se basa en un análisis de varianza clásico que utiliza distancia entre haplotipos (patrones multilocus o de amplificación únicos), asumiendo que las muestras poblacionales

poseen el mismo patrón de apareamiento. Para ello, fue necesario separar la colección mundial de aislamientos de *Fusarium poae* en dos grupos, americanos y europeos, respectivamente, para poder llevar a cabo este tipo de análisis.

La matriz de distancia se construyó empleando el coeficiente de distancia Euclideo equivalente al número de diferencias entre los patrones de amplificación de dos individuos. Para establecer el nivel de significancia de los componentes de la varianza se obtiene el estadístico ϕ (similar al estadístico F) mediante permutaciones al azar. La probabilidad de obtener por azar un estadístico mayor que el observado se toma como el nivel de significancia estadística.

La variabilidad genética (heterocigosis esperada) fue estimada para toda la población y para los dos grupos identificados (Nei, 1987). La heterocigosis esperada (H) corresponde a la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de una población puedan ser distinguidos usando el marcador en cuestión. Por lo tanto, un valor de “1” indica una elevada variabilidad genética y un valor de “0” indica una población homogénea.

Para el análisis se utilizó el programa Arlequín versión 2.0 (Schneider *et al.*, 2000).

Para comparar el grado de correlación entre matrices de similitud obtenidas mediante marcadores de tipo ISSR y AFLP, se realizó el test de Mantel de comparación de matrices proporcionado por el programa NTSYS-pc 2.1 mediante el procedimiento MXCOMP (Mantel, 1967).

2.11 Aislamientos utilizados para detectar aislamientos de *Fusarium poae* con el potencial de producir nivalenol

Para este objetivo se emplearon un total de 125 aislamientos monospóricos de *Fusarium poae* (Tabla 1). Además, se contó con 4 aislamientos de *F. cerealis* (productores de NIV), 2 de *F. culmorum* (productores de NIV), 1 de *F. langsethiae* (productor de NIV), 1 de *F. sporotrichioides* (productor de NIV) y 7 aislamientos de *F. graminearum* (productores de DON y NIV). También se evaluaron linajes del complejo *F. graminearum* como *F. austramericanum* NRRL 2903, *F. meridionale* NRRL 28436, *F. graminearum sensu stricto* NRRL 31084 y *F. cortaderiae* NRRL 29297 (pertenecientes a la Colección de Cultivos ARS), así como también aislamientos de *Fusarium* aislados a partir de muestras de granos (*F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. chlamydosporum*, *F. sporotrichioides*, *F. equiseti* y *F. acuminatum*).

2.12 Muestras de semillas

Un total de 12 muestras de semillas de trigo y cebada (2 kg) fueron provistas por agricultores de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Se tomaron un total de 200 semillas al azar, las cuales fueron desinfectadas mediante el empleo de alcohol etílico al 70% por 2 min y luego, sumergidas en hipoclorito de sodio al 1% durante 2 min, finalizando con dos lavados con agua estéril durante 2 min.

Posteriormente, con la ayuda de una pinza previamente flameada, se las depositó en cajas de Petri con APG al 2% y se las incubó a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ con alternancia de 12 hs luz de día/oscuridad.

Una vez alcanzado ese período de tiempo, se realizaron las primeras determinaciones morfológicas de los hongos desarrollados en las diferentes semillas. Las colonias que mostraron características similares a las descritas para el género *Fusarium* fueron colocadas en tubos pico de flauta con APG y en placas de Petri con CLA e incubadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 5-7 días, con alternancia de 12 hs luz/oscuridad (Leslie & Summerell, 2006). Pasado ese período, se realizaron las observaciones microscópicas correspondientes para identificar las distintas especies de *Fusarium*, teniendo en cuenta las características descritas por Leslie & Summerell (2006).

2.12.1 Extracción del ADN

La extracción de ADN de los aislamientos utilizados se realizó de acuerdo al protocolo CTAB modificado por Stenglein & Balatti (2006) previamente descrito.

Para las muestras de cereales, la extracción de ADN se realizó mediante el protocolo CTAB. Para ello, se tomaron 20 gr de semillas por muestra, las cuales y mediante la utilización de un molinillo de café, fueron trituradas por 1 min. La molienda final fue colocada en Eppendorf estériles de 2 ml y se procedió con el protocolo CTAB (Nicholson *et al.*, 1996).

La calidad del ADN fúngico y el de las semillas fue examinado mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,7% conteniendo 4 μl de GelRedTM (Biotium, Hayward, USA) a 80 V en 'buffer' TE al 1X por 3 hs a temperatura ambiente. La visualización del ADN se realizó bajo luz UV para evaluar la

calidad del ADN extraído, mientras que la concentración del mismo fue calculada usando un fluorómetro (Qubit Fluorometer, Invitrogen) según el manual de uso.

2.13 Secuenciamiento de productos amplificados

Para este estudio se probaron diferentes combinaciones de cebadores, derivados de los genes *TRI13* y *TRI7* de *Fusarium graminearum* 88-1 (productor de nivalenol), en 25 aislamientos de *Fusarium poae* seleccionados al azar. Solamente uno de ellos diseñado en base a la región *TRI7*, fue capaz de amplificar fragmentos de distintos tamaños (700, 450 y 200pb) en 3 de los 25 aislamientos de *F. poae* evaluados. Los fragmentos resultantes fueron purificados mediante el uso de ‘Purelink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit’ (Invitrogen). El secuenciado del ADN en ambos sentidos se realizó mediante el uso del kit ‘Big Dye Terminator version 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit’ (Applied Biosystems, CA) en un secuenciador Applied Biosystems (ABI / Hitachi Genetic Analyzer 3130). Las secuencias resultantes fueron comparadas con la base de datos del NCBI (Altschul *et al.*, 1990), lo que permitió observar homología entre el fragmento de 450pb y el gen *TRI7*. Basados en los datos obtenidos y mediante el uso del programa Primer 3, un nuevo par de cebadores fue generado resultado del alineamiento de las secuencias de *F. poae* y la región *TRI7* del *F. graminearum* 88-1. La secuencia de los cebadores nivPf (directo) y nivPr (reverso) seleccionados fueron 5'-TATCCTTGCATGGCAATGCC-3' y 5'-AAATGGCGATACGAGTATTGA-3', respectivamente.

Para contar con controles positivos para la reacción de PCR, se utilizaron 3 aislamientos de *F. poae* productores de NIV determinados por Vogelgsang *et al.* (2008b), FP-0335, FP-0338 y FP-0378 y 17 aislamientos argentinos productores de NIV determinados en este estudio (Tabla 1).

Para confirmar que el fragmento amplificado corresponde a parte de la secuencia del gen *TRI7*, se secuenciaron los fragmentos amplificados mediante la utilización de los cebadores, en aislamientos de *Fusarium poae* seleccionados al azar. Las secuencias fueron comparadas con las existentes en el NCBI (Altschul *et al.*, 1990) y depositadas en esta misma base de datos.

2.14 Protocolo de PCR

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl conteniendo los mismos reactivos que los detallados previamente para las reacciones específicas de PCR para *Fusarium poae*. El termociclador (XP Thermal Cycler, Bioer Technology Co, LTD) fue programado con un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 2 min. Luego, para un ciclo de desnaturalización a 95°C por 10 seg, apareamiento de los cebadores a 65°C por 10 seg y extensión a 72°C por 20 seg, los cuales fueron repetidos 25 veces. La reacción se finalizó con 2 min de extensión final a 72°C.

Las reacciones de PCR específicas para cada especie de *Fusarium* aisladas de grano (*F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. sporotrichioides*, *F. equiseti* y *F. acuminatum*) se realizaron de acuerdo a Nicholson *et al.* (1998), Williams *et al.* (2002), Mishra *et al.* (2003b), Niessen *et al.* (2004), Jurado *et al.* (2005).

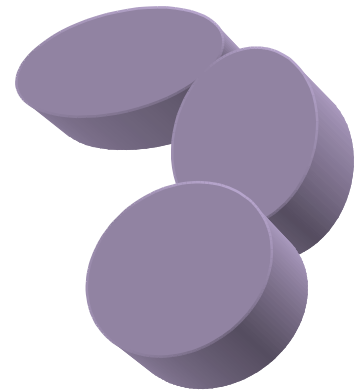
Los productos resultantes fueron examinados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% conteniendo GelRed™ (Biotium, Hayward, USA), en 'buffer' TBE al 1X por 1 h a temperatura ambiente. Los fragmentos fueron visualizados bajo luz UV. El tamaño de los fragmentos del ADN fue estimado mediante la comparación de los fragmentos con un marcador de peso molecular conocido de 100pb (Genbiotech S.R.L., Buenos Aires, Argentina).

2.15 Análisis de Nivalenol y Deoxynivalenol mediante HPLC/FD

Un total de 12 aislamientos argentinos de *Fusarium poae* provenientes de diferentes regiones y hospedantes seleccionados al azar fueron analizados mediante HPLC/FD para testear la producción de NIV/DON (Tabla 1). Los aislamientos de *F. poae* fueron cultivados en Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 25 gr de arroz de grano largo, a los cuales se le adicionó 10 ml de agua destilada antes de autoclavar los mismos dos veces por 30 min a 121°C. Cada Erlenmeyer fue inoculado con un disco de 3 mm de diámetro de agar tomado de un margen de una colonia crecida en SNA (Nirenberg, 1976) a 25°C por siete días y fueron agitados una vez al día al cabo de 1 semana. Los cultivos fueron luego incubados por 28 días a 25°C en la oscuridad. Cumplido el periodo de incubación, el contenido de los Erlenmeyers fue secado a 50°C por 24 hs y luego almacenados a -20°C hasta el correspondiente análisis de las toxinas.

Para la extracción y el lavado de las toxinas se utilizó una versión modificada del protocolo original de Cooney *et al.* (2001). El análisis para la detección de NIV y DON se realizó en base a las condiciones descriptas por Barros *et al.* (2008). El residuo seco fue disuelto en 400 µl de metanol/agua

(5:95), homogeneizado por vórtex e inyectado dentro del sistema de HPLC mediante la técnica de inyección de bucle completo (Hewlett Packard model 1100 pump, Palo Alto, CA, USA; Rheodyne manual injector with a 50 μ L loop, Rheodyne, Cotati, CA, USA). El sistema de HPLC consistió en una bomba modelo 1100 de Hewlett Packard (Palo Alto, CA) conectada a un detector de longitud de onda variable de la Serie 1100 de Hewlett Packard y a un módulo de datos Hewlett Packard Kayak XA (HP ChemStation Rev. A.06.01). La separación cromatográfica se realizó en columnas de fase reversa LunaTM C18 (100 x 4,6 mm, tamaño de partícula de 5 μ M) conectadas a una columna de seguridad SecurityGuardTM (4 x 3,0 mm) conteniendo la misma fase. La fase móvil consistió en la mezcla metanol/agua (12:88) con un caudal de 1,5 ml/min. El detector se programó a 220 nm con una atenuación de 0,01 AUFS. La cuantificación fue relativa a un estándar externo de DON y NIV (Sigma-Aldrich Co. St Louis, MO) desde 1 a 4 μ g/ml en metanol/agua (5:95). El límite de detección fue de 5 ng/g para cada toxina.



Capítulo III:

Caracterización de aislamientos
de *Fusarium poae* mediante
metodologías moleculares



3 Resultados

3.1 Aislamientos de *Fusarium poae* utilizados para este estudio

Todos los aislamientos previamente identificados como *Fusarium poae* amplificaron un fragmento de 220pb, mientras que el aislamiento de *F. sporotrichioides* (F95), utilizado como control negativo, no mostró ningún tipo de amplificación, confirmando de esta manera la identificación microscópica de los aislamientos (Fig. 14).

Figura 14. Amplificación del fragmento de 220pb específico para *F. poae*. **M**, corresponde al marcador de peso molecular. **F95**, pertenece al aislamiento de *F. sporotrichioides* utilizado como control negativo.



Se obtuvieron 173 aislamientos de *Fusarium poae* para el desarrollo de este trabajo.

3.2 Amplificación de regiones MAT-1 y MAT-2

De la totalidad de los aislamientos analizados, 58 amplificaron sólo el fragmento correspondiente a MAT-1 (200pb); 31 amplificaron el fragmento correspondiente a MAT-2 (260pb) y los restantes 84 aislamientos amplificaron para ambos mediante PCR simple (Fig. 15) y PCR ‘multiplex’ (Fig. 16) (Tabla 9).

Figura 15. Fragmentos de 200pb correspondiente al alelo MAT-1 y de 260pb correspondiente al alelo MAT-2 mediante PCR simple. **M**, corresponde al marcador de peso molecular.

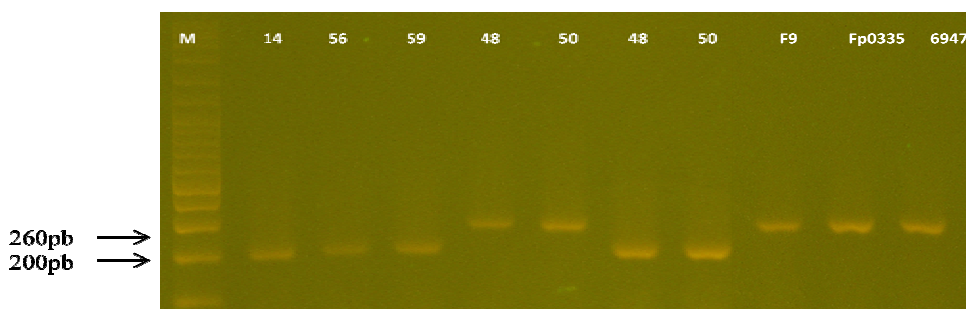


Figura 16. Fragmentos de 200pb correspondiente al alelo MAT-1 y de 260pb correspondiente al alelo MAT-2 mediante PCR ‘multiplex’. **M**, corresponde al marcador de peso molecular.

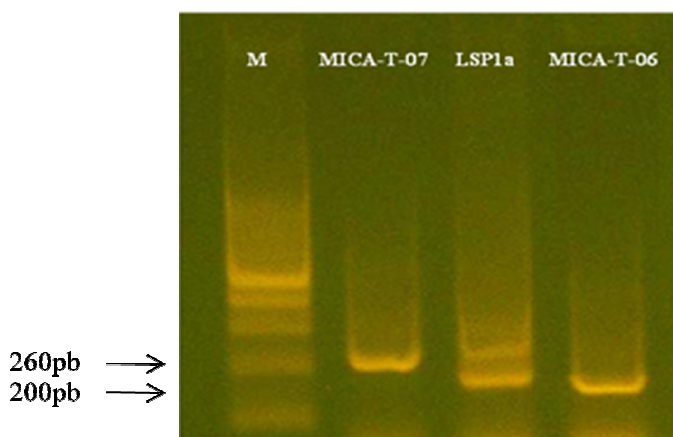


Tabla 9. Amplificaciones de los idiomorfos MAT.

Aislamientos	MAT-1	MAT-2	Aislamientos	MAT-1	MAT-2
HSu1a	-	+	720	+	+
HPu1a	+	-	718	+	+
HPu4a	+	-	563	+	+
HTA1a	+	-	552	+	+
HBe1a	+	-	527	+	+
HBe1c	+	+	522	+	-
HBig1a	+	+	506	+	+
TCa1a	-	+	444	+	-
TSS1b	+	+	303	+	+
TSS2a	+	-	300	+	+
THo1b	+	+	295	+	+
THo1d	-	+	173	+	+
TPu1a	+	-	141	+	+
TPu1c	+	+	F18	+	-
TSa1a	+	-	F600	+	+
TSm1a	+	+	4/3084/1	+	+
TBig1a	-	+	4/3084/2	+	-
TMa1a	+	+	4/3084/3	+	+
TJu1a	+	-	4/3084/4	+	+
TPe1a	-	+	I14-99	+	+
LSP1a	+	+	6025	+	+
MICA-T-01	+	+	6070	+	+
MICA-T-04	+	+	6101	-	+
MICA-T-06	+	+	6107	+	+
MICA-T-07	+	-	6129	-	+
MICA-A-01	+	-	6159	-	+
MICA-A-02	+	+	6191	+	+
MICA-A-03	+	+	6273	+	+
MICA-A-04	+	+	6326	+	+
MICA-A-05	+	+	6947	-	+
CA1	+	-	6085	-	+
CA2	+	-	6183	+	+
CA3	+	+	Fp0335	-	+
CA4	+	-	Fp0338	+	+
CA5	+	-	Fp0378	-	+
CA6	-	+	Fp0503	+	+
CA7	+	+	3107	+	-
4/4343/1	-	+	6410	+	-
1021	+	-	6408	+	-
887	+	-	61401	+	-
747	+	+	6402	-	+
736	+	+	60902	+	-
731	+	+	F730	+	-
721	+	-	F732	+	-

Tabla 9. Continuación.

Aislamientos	MAT-1	MAT-2	Aislamientos	MAT-1	MAT-2
F733	+	-	Zw314.1	+	-
GE1	+	+	Zw313.1	+	+
GE2	-	+	Zw310.2	+	-
GE3	-	+	Zw307.2	+	-
GE4	-	+	Zw210.1	+	+
GE5	-	+	Zw116.1	+	+
GE6	-	+	Zw106.1	+	+
GE7	-	+	To108.1	+	+
GE8	+	-	To302.1	+	+
GE9	+	-	182/I468	+	-
GE10	+	-	183/I469	+	+
GE11	+	-	187/I473	+	+
GE12	+	-	188/I474	+	+
GE13	+	+	192/I478	+	+
P1	+	-	194/I480	+	-
P2	-	+	195/I481	+	+
P3	-	+	196/I482	+	+
P4	+	-	198/I484	+	+
P5	-	+	199/I485	+	+
P6	-	+	204/I490	+	+
P7	+	+	205/I491	+	+
P8	-	+	206/I492	+	+
P9	-	+	I71	+	+
P10	-	+	I72	+	+
P11	+	-	I109	+	+
P12	-	+	I110	+	+
P13	+	-	I111	+	+
P14	+	-	I475	+	-
P15	+	+	I476	+	-
P16	+	+	I477	+	+
P17	+	+	TAPO 21	+	-
P18	+	+	TAPO 34	-	+
P19	+	+	LT03 08 (57)	+	-
P20	+	+	LT03 35 (80)	+	-
P21	+	+	LT14 05 (491)	+	-
P22	+	-	LT14 27 (504)	+	-
P23	+	+	LT15 16 (525)	+	+
Bo101.1	+	-	127 sorpa 7-U1	+	+
Bo104.2	+	-	93 payca 11-U2	+	+
Bo203.2	+	+	20 riogr 2-U3	-	+
Bo207.1	+	-	61 colta 11-U4	+	-
Ve108.1	+	+	150 sanle 17-U5	+	-
Zw316.2	+	-			

El resultado del proceso de secuenciación y su posterior comparación con la base de datos existentes, permitió corroborar que, tal como se esperaba, los fragmentos amplificados corresponden a las regiones bajo estudio (Tabla 10). Las secuencias resultantes del idiomorfo MAT-2 fueron depositadas en la base de datos del GenBank con los siguientes números de accesiones: KF876686-KF876687. Las secuencias del MAT-1 no pudieron ser depositadas en el GenBank por ser secuencias menores a 200pb.

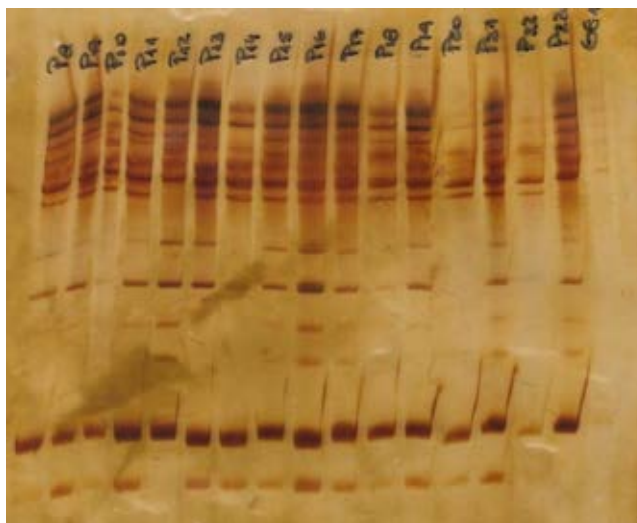
Tabla 10. Análisis de fragmentos MAT seleccionados.

Aislamiento seleccionado	MAT amplificado	E-value	Identidad/NCBI	Accesión
MICA-T-06	MAT-1	1e-71	100%	AJ535627
MICA-T-07	MAT-2	6e-106	100%	AJ535631
LSP1a	MAT-1	2e-95	100%	AJ535627
LSP1a	MAT-2	2e-63	100%	AJ535631

3.3 Resultados de los marcadores ISSR

La variabilidad genética de los aislamientos de *Fusarium poae* se determinó en base a marcadores moleculares del tipo ISSR (Fig. 17). Con los 6 cebadores ISSR seleccionados se amplificaron un total de 121 fragmentos de ADN, de los cuales 68 fueron polimórficos entre los aislamientos de *F. poae* analizados (56,19%).

Figura 17. Patrones de amplificación obtenidos con el cebador Biolab E.



En base a los fragmentos amplificados se estableció la similitud entre los aislamientos utilizando los tres coeficientes de asociación, escogiéndose el coeficiente de ‘Simple Matching’ por mostrar el menor grado de distorsión (CCC=0,88).

El análisis de agrupamiento permitió diferenciar claramente el grupo de aislamientos de *Fusarium poae* con los aislamientos utilizados como grupos externos *F. sporotrichioides* y *F. langsethiae* en un 44% de similitud. Además permitió discriminar 169 haplotipos de los 173 aislamientos de *F. poae* analizados (Fig. 18).

La técnica de ISSR permitió obtener un agrupamiento parcial entre los aislamientos de *Fusarium poae* evaluados y el lugar de origen de cada uno de ellos. En el dendograma se puede observar el agrupamiento de dos ‘clusters’ con 75% de similitud entre ellos: el ‘cluster I’, el cual se resuelve en dos ‘subclusters’ designados ‘subcluster Ia’ y ‘subcluster Ib’ y el ‘cluster II’ que incluye el 85% de

la totalidad de los aislamientos de *F. poae* analizados. El ‘subcluster Ia’ contiene a la mayoría de los aislamientos de *F. poae* provenientes de Bélgica y 11 aislamientos provenientes de Francia, Canadá y Alemania mientras que el ‘subcluster Ib’ incluye sólo aislamientos de Bélgica y Alemania. El ‘cluster II’ se resuelve en dos ‘subclusters’ designados ‘subcluster IIa’ y ‘subcluster IIb’ el cual contiene solamente aislamientos provenientes de Uruguay. El ‘subcluster IIa’ se resuelve con un 82% de similitud en dos nuevos ‘subclusters’: el ‘subcluster IIa1’ y el ‘subcluster IIa2’. El primero de ellos incluye 11 aislamientos provenientes de la Argentina, mientras que el ‘subcluster IIa2’ incluye aislamientos provenientes de la Argentina, Inglaterra, Francia, Italia, Finlandia, Suiza, Alemania, Polonia, Canadá, Luxemburgo y Hungría.

La diversidad de los aislamientos de *Fusarium poae* fue estimada en 0,9998 (DS=0,0007).

Los resultados del AMOVA indicaron que parte de la variabilidad está dada por diferencias entre los aislamientos del grupo americano y europeo del hongo (10,49%; $P < 0,001$), mientras que el 89,51% restante de debió a diferencias dentro de los grupos.

Figura 18. Dendograma obtenido del análisis de marcadores ISSR.

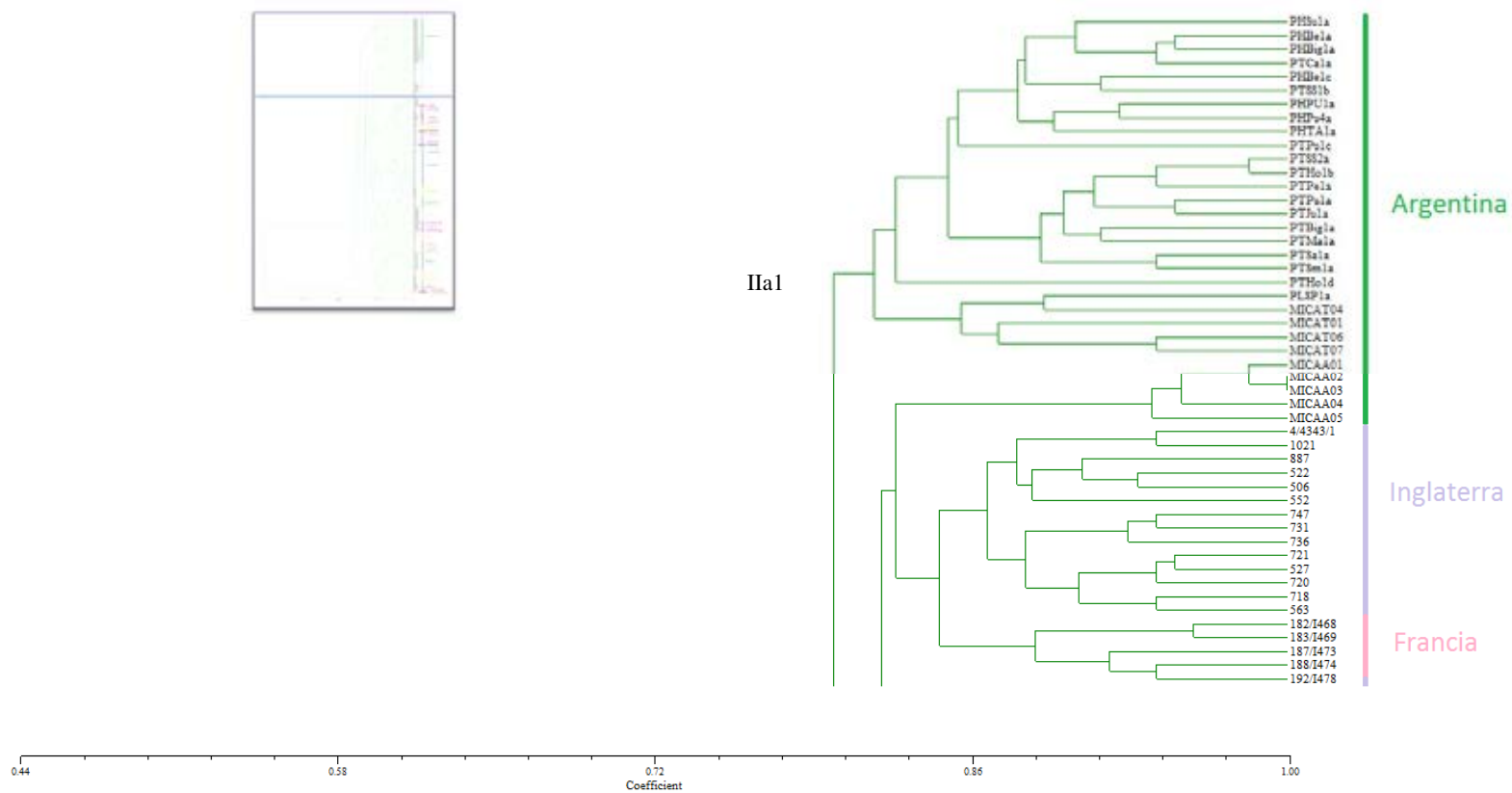


Figura 18. Continuación.

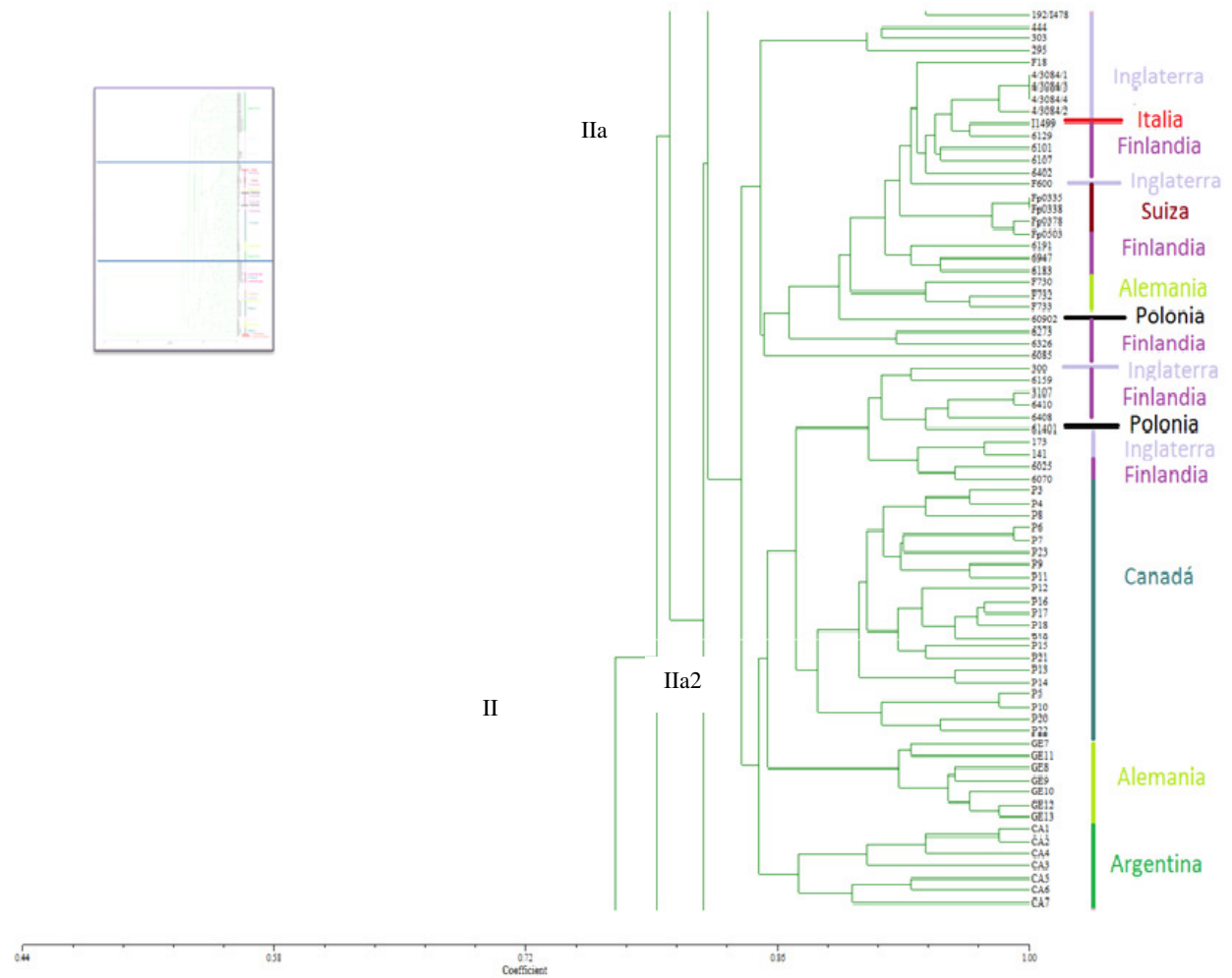
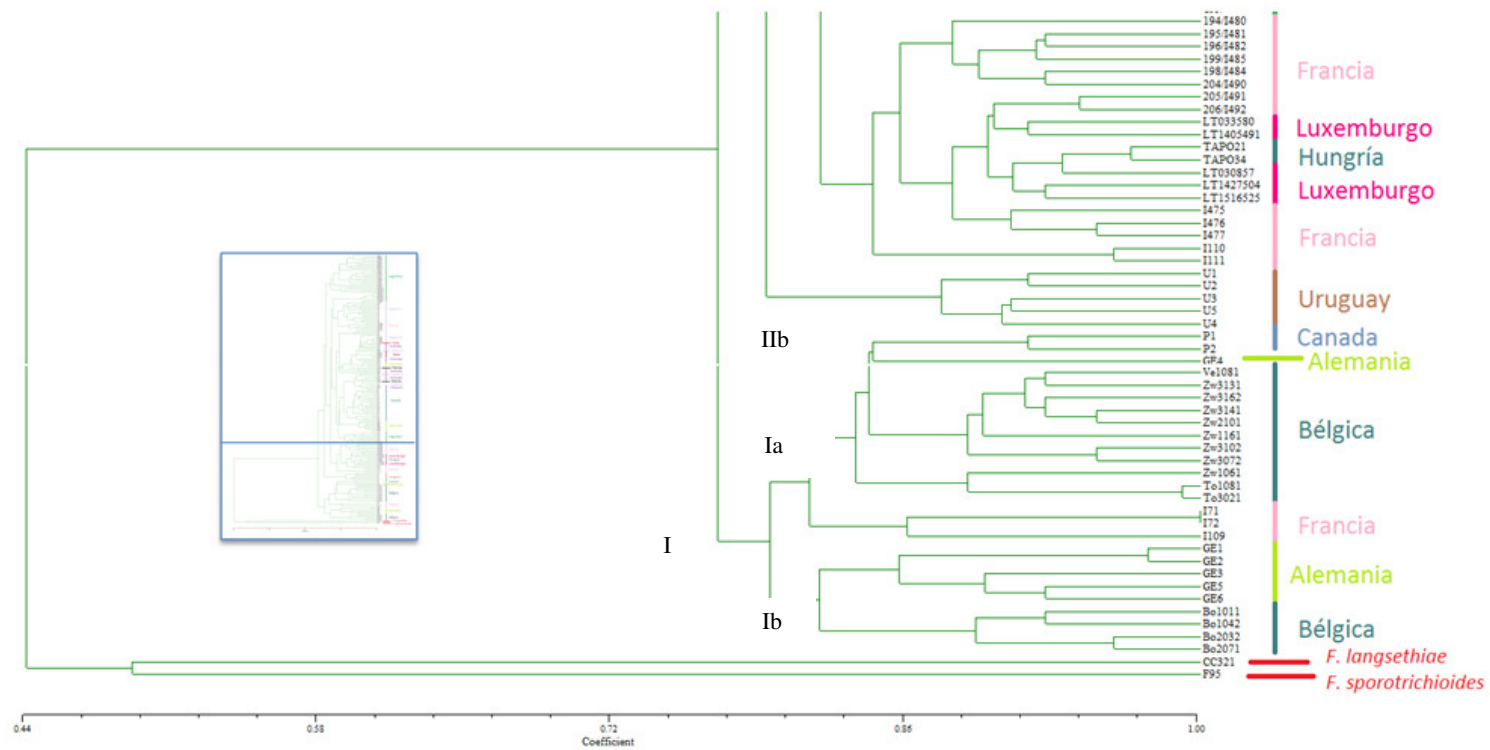


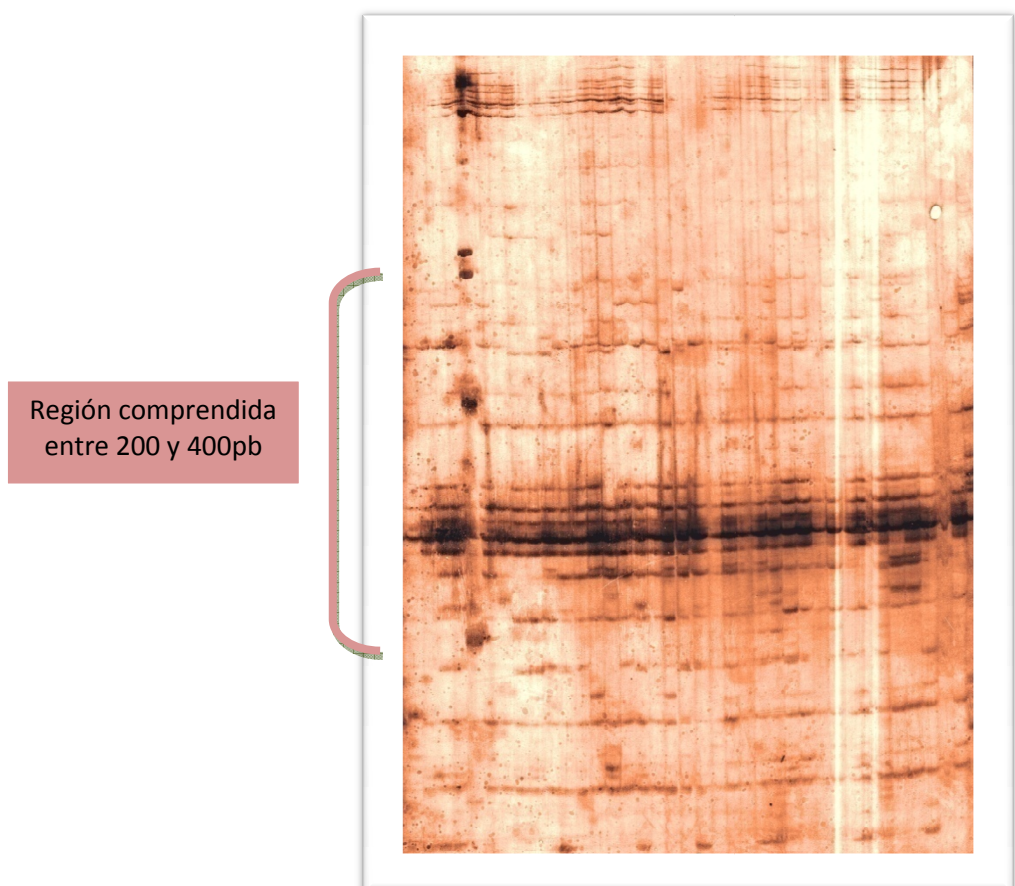
Figura 18. Continuación.



3.4 Resultados de los marcadores AFLP

La variabilidad genética de los aislamientos de *Fusarium poae* se determinó en base a marcadores moleculares de tipo AFLP (Fig. 19). Las dos combinaciones de cebadores utilizadas, permitió amplificar un total de 32 fragmentos, de los cuales 30 (96,87%) fueron polimórficos, considerando aquellos fragmentos ubicados entre los 200 y 400pb.

Figura 19. Patrones de amplificación obtenidos con la combinación ECO-AC/MSE-CC.



En base a los fragmentos amplificados se estableció la similitud entre los aislamientos utilizando los tres coeficientes de asociación, escogiéndose el coeficiente de 'Simple Matching' por mostrar el menor grado de distorsión (CCC=0,78).

El análisis de agrupamiento permitió discriminar 150 haplotipos de los 173 aislamientos de *Fusarium poae* analizados (Fig. 20), pero no permitió diferenciar el grupo de aislamientos de *F. poae* con los aislamientos utilizados como grupos externos a la especie, *F. sporotrichioides* y *F. langsethiae* encontrándose estos aislamientos en 'clusters' compartidos con aislamientos de *F. poae*. La técnica de AFLP no permitió agrupar parcialmente los aislamientos en base a su lugar de origen.

El 'cluster I' se resolvió con un 54% de similitud con respecto a los demás 'clusters' e incluyó sólo dos aislamientos de *F. poae* obtenidos de Francia mientras que el 'cluster II' se resolvió en dos 'subclusters': el 'subcluster IIa' y el 'subcluster IIb' el cual contiene sólo dos aislamientos procedentes de Bélgica. El 'subcluster IIa' se resolvió en dos nuevos 'subclusters' designados 'subcluster IIa1', el cual contiene los restantes aislamientos de *F. poae* analizados provenientes de los distintos países sumados *F. sporotrichioides* y *F. langsethiae*, y el 'subcluster IIa2' el cual contiene aislamientos de *F. poae* provenientes de Bélgica.

La diversidad de *Fusarium poae* fue estimada en 0,9982 (DS=0,0009).

Los resultados del AMOVA indicaron que parte de la variabilidad está dada por diferencias entre los aislamientos del grupo americano y europeo del

hongo (1,42%; $P < 0,007$), mientras que el 98,58% restante de debió a diferencias dentro de los grupos.

Figura 20. Dendograma obtenido mediante marcadores moleculares de tipo AFLP.

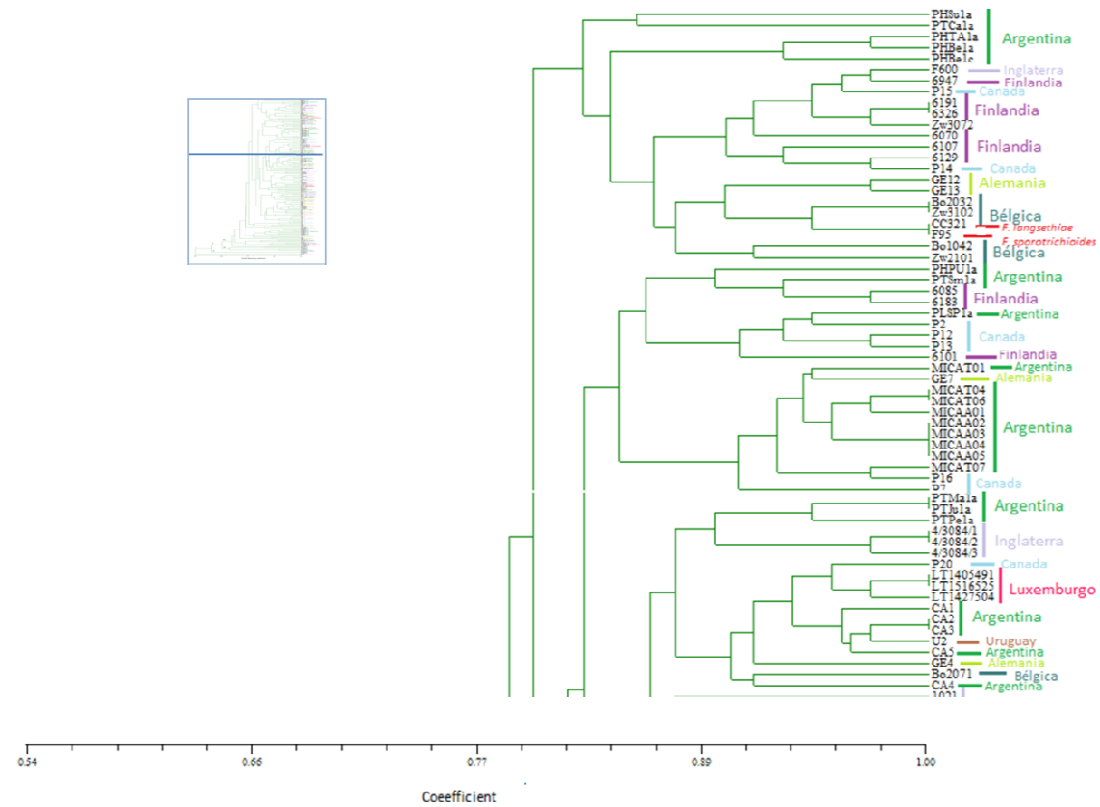


Figura 20. Continuación.

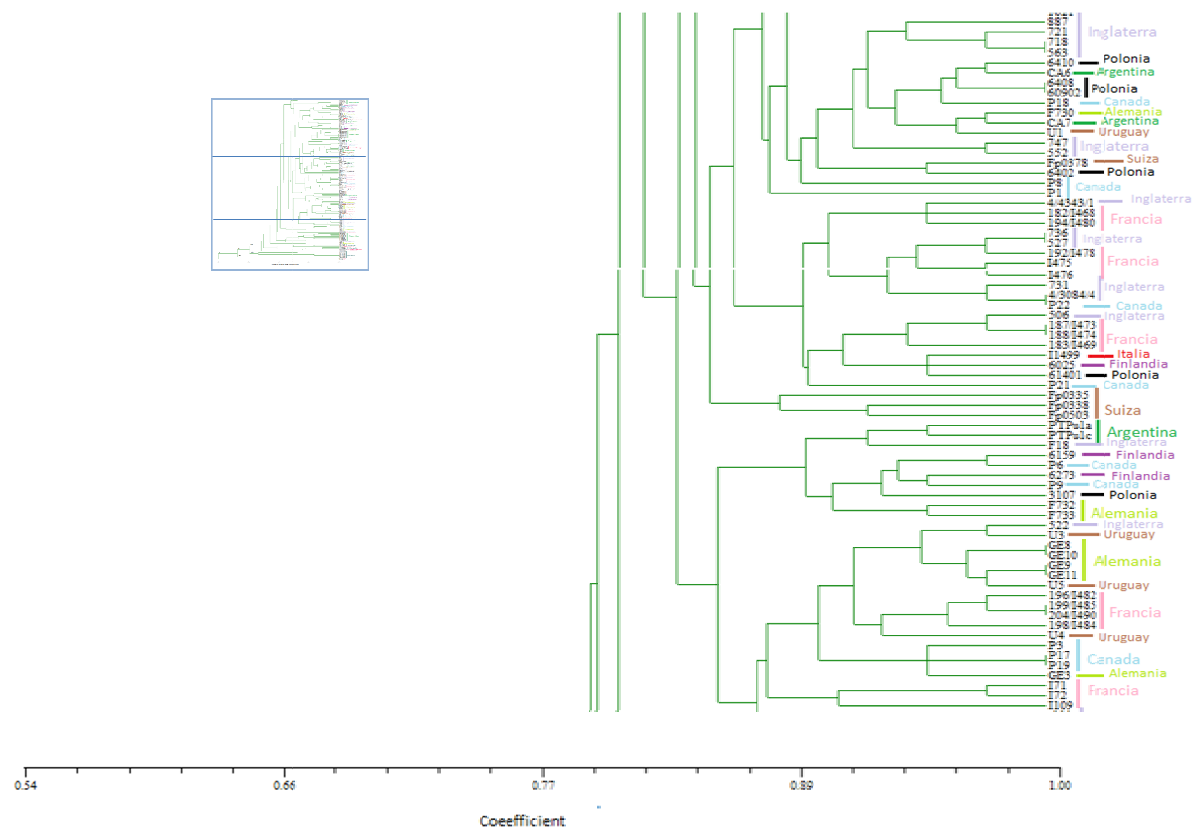
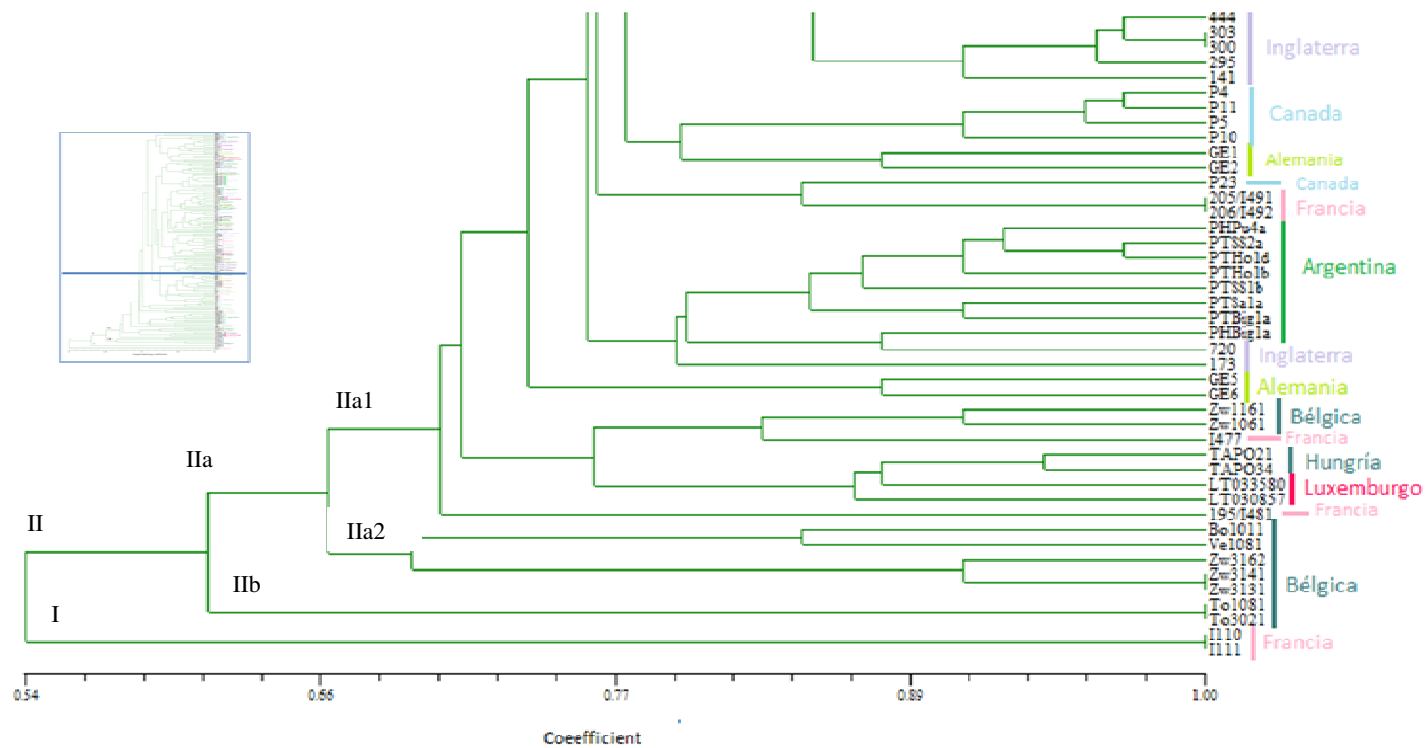


Figura 20. Continuación.



3.5 Comparación de matrices de similitudes

La comparación de las matrices de similitudes, obtenidas con los marcadores moleculares ISSR y AFLP fue analizada mediante el programa MXCOMP el cual arrojó un valor de $r=0,20$ lo que indica que las matrices obtenidas no se correlacionan, por lo cual se analizaron de manera independiente.

3.6 Discusión

En lo que respecta a las especies del género *Fusarium*, distintos autores han desarrollado estudios en los que evalúan la variabilidad genética de especies de este género mediante el empleo de distintos marcadores moleculares. Mishra *et al.* (2003a) mediante el uso de marcadores moleculares de tipo ISSR, investigaron la variabilidad genética presente en *F. culmorum*. Los resultados arrojaron una notable variabilidad intraespecífica entre los aislamientos procedentes de Inglaterra, Polonia, Irlanda, Rusia, Holanda, Nueva Zelanda, Australia, Alemania, Canadá, India, Dinamarca y Estados Unidos. Asimismo, el análisis demostró un agrupamiento parcial entre los aislamientos de *F. culmorum* evaluados y el lugar de origen de los mismos (Mishra *et al.*, 2003a). Más tarde, estos mismos autores, utilizaron la técnica de ISSR para evaluar la estructura genética de *F. graminearum* obtenidos de tres provincias distintas de Canadá (Alberta, Saskatchewan y Manitoba). Los resultados arrojaron un importante grado de variabilidad genética entre los aislamientos, no siendo posible agruparlos en base a su origen (Mishra *et al.*, 2004).

En el año 2007, 74 aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* procedentes de distintas provincias de Turquía, fueron evaluados mediante

marcadores moleculares de tipo ISSR. Los resultados revelaron variación genética entre los aislamientos evaluados, pero no se observó agrupamiento entre los aislamientos evaluados y el lugar de origen de cada uno de ellos (Bayraktar *et al.*, 2007). En conjunto, todos estos trabajos confirman la utilidad de los ISSR a la hora de evaluar variabilidad genética en distintas especies del género *Fusarium*.

En lo que respecta a la variabilidad genética de *Fusarium poae*, en esta tesis y mediante el empleo de marcadores moleculares de tipo ISSR, se logró detectar gran variabilidad entre los aislamientos de *F. poae* evaluados y un agrupamiento parcial entre los aislamientos y su país de origen. A su vez, la mayoría de la variación resultó de diferencias genéticas observadas dentro de cada grupo (americano y europeo) más que entre grupos. Resultados similares fueron obtenidos por Kerényi *et al.* (1997) quienes determinaron la relación genética entre 54 aislamientos de *F. poae* obtenidos de Canadá, Nueva Zelanda, Sudáfrica, Reino Unido, Japón, Finlandia y Hungría mediante marcadores moleculares de tipo RAPD, revelando un 80% de variabilidad genética mediante el análisis de agrupamiento. En este caso, la técnica de RAPD tampoco fue capaz de agrupar la totalidad de los aislamientos de acuerdo a la región geográfica de origen (Kerényi *et al.*, 1997). Sumado a ello, Dinolfo *et al.* (2010) determinaron, mediante la técnica de ISSR, que un 99% de los aislamientos de *F. poae* evaluados diferían entre sí. Además, observaron un agrupamiento parcial entre los aislamientos de *F. poae* evaluados procedentes de la Argentina e Inglaterra, encontrándose mayor diferencia entre los grupos (Argentina e Inglaterra) más que dentro de cada grupo.

Otro marcador molecular ampliamente utilizado para evaluar la variabilidad genética en especies de *Fusarium* es la técnica de AFLP. En el año 2009, Ramírez *et al.* (2009) evaluaron 133 *F. verticillioides* obtenidos de maíz de diferentes provincias argentinas y los resultados indicaron que la relación genética obtenida de los individuos evaluados no se correspondió con su origen (Ramírez *et al.*, 2009).

Astolfi *et al.* (2011) y Alvarez *et al.* (2011) evaluaron aislamientos de *F. graminearum* aislados de trigos del sur de Brasil y de la Argentina, respectivamente, agrupándose las especies de *F. graminearum* de acuerdo a su linaje correspondiente. Estos trabajos permiten comprobar la utilidad de los marcadores AFLP a la hora de diferenciar linajes dentro del complejo de especies de *F. graminearum*.

En este trabajo de tesis, la técnica de AFLP permitió detectar variación entre los aislamientos de *F. poae* evaluados. Las diferencias dentro de aislamientos de grupos americanos y europeos fue mayor que la encontrada entre los dos grupos. Mediante el empleo de este tipo de marcadores, no se pudo observar agrupamiento en relación al origen de los aislamientos, como si fue posible observarlo mediante los marcadores de tipo ISSR. A diferencia de los marcadores ISSR, la técnica de AFLP no fue capaz de discriminar entre los aislamientos de *F. poae* y aquellos usados como grupos externos: *F. langsethiae* y *F. sporotrichioides*.

Asimismo, Somma *et al.* (2010) determinaron la variabilidad genética de 81 aislamientos de *F. poae* aislados de trigo del norte de Italia, mediante la técnica

de AFLP, detectando variabilidad genética entre los aislamientos sin observar agrupamiento definido en base a la producción de micotoxinas.

Es de destacar, que aunque los marcadores moleculares utilizados en este trabajo fueron capaces de detectar similares valores de diversidad, la matriz de correlación obtenida entre las matrices de similitud de AFLP e ISSR mostró un valor de $r=0,20$, por lo cual los dendogramas resultantes difieren como para poder analizarlos de manera conjunta. Podríamos suponer que la región en el genoma detectado por ambos marcadores moleculares, como así también el número de cebadores utilizados en ambos casos, podría afectar la correlación existente entre ambos tipos de marcadores.

Algunos autores han encontrado una buena correlación entre dendogramas obtenidos con diferentes marcadores moleculares. En 2007, Bayraktar *et al.* (2007) analizaron 74 *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* obtenidos de garbanzos de Turquía para evaluar su variabilidad genética mediante el empleo de marcadores RAPD e ISSR. La correlación entre las matrices de similitudes obtenidas mediante el empleo de ambos marcadores fue de $r= 0,96$ (Bayraktar *et al.*, 2007).

Mediante la técnica de PCR, se pudieron amplificar los idiomorfos MAT en el genoma de *Fusarium poae* y la mayoría de los aislamientos evaluados (48,55%) amplificaron ambos idiomorfos en el mismo aislamiento. Kerényi *et al.* (2004) amplificaron los idiomorfos MAT en ocho aislamientos de *F. poae* pero ninguno de ellos fue capaz de amplificar ambos idiomorfos en un mismo aislamiento. Irzykowska *et al.* (2013) amplificaron ambos idiomorfos en 35 aislamientos de *F. culmorum* aislados de la base de los tallos y raíces de plantas

de cebada originarias de distintas provincias de Polonia. Todos los aislamientos evaluados fueron capaces de amplificar MAT-1 o MAT-2, pero ninguno de ellos amplificó para ambos idiomorfos en un mismo aislamiento. Sin embargo, Cepni *et al.* (2012) amplificaron ambos idiomorfos de manera conjunta en dos aislamientos de *F. culmorum*.

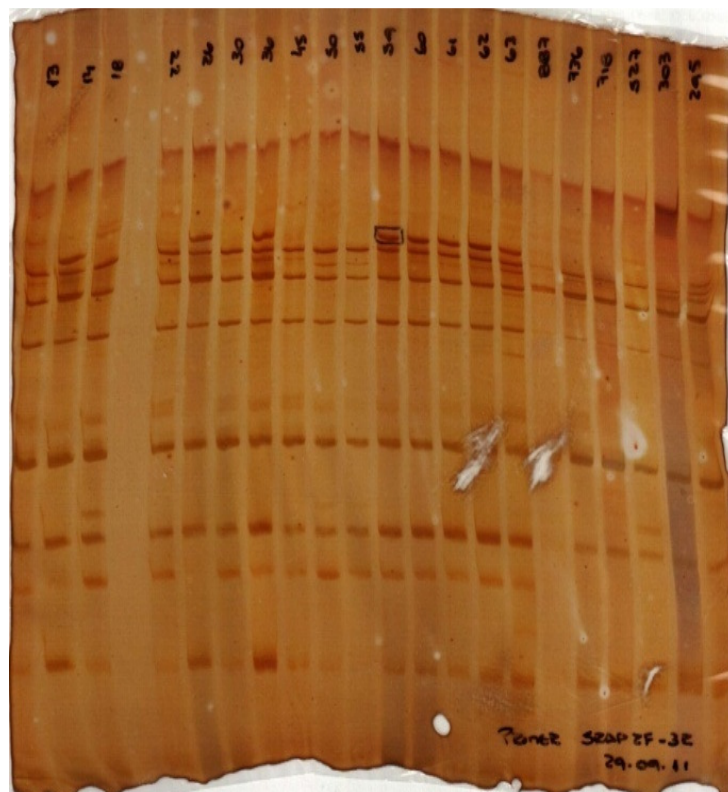
En conclusión, ambos marcadores moleculares detectaron una gran variabilidad genética entre los individuos de *Fusarium poae* evaluados. Sin embargo, los marcadores de tipo ISSR mostraron mayor información sobre la variación interespecífica debido a que fue capaz de separar la población de *F. poae* de aquellos aislamientos utilizados como grupo externo, y además permitió obtener un agrupamiento parcial entre los aislamientos y su lugar de origen.

El grado de variabilidad encontrado en los aislamientos de *Fusarium poae* podría deberse a mutaciones, parasexualidad y migración, eventos que podrían ser responsables de la gran variabilidad genética encontrada en *F. poae* (Kristler & Miao, 1992). Asimismo, la presencia de los idiomorfos MAT-1 y MAT-2 en un mismo aislamiento de *F. poae*, podría indicar una condición homotética de esos aislamientos, similar a la presente en aislamientos de *F. graminearum* con ciclo sexual conocido, con la presencia de ambos idiomorfos en el genoma (Yun *et al.*, 2000). Sin embargo, estudios más específicos enfocados en los idiomorfos MAT de *F. poae* son necesarios para poder establecer si estos resultados encontrados poseen algún rol específico en la variabilidad genética de *F. poae*.

3.7 Resultados de los marcadores SRAP

La variabilidad genética de los aislamientos de *Fusarium poae* se determinó en base a marcadores moleculares de tipo SRAP, para comprobar si es factible la utilización de esta técnica para el estudio de variabilidad genética en esta especie (Fig. 21). Con las 8 combinaciones de cebadores seleccionadas, se amplificaron un total de 117 fragmentos de ADN, de los cuales 96 fragmentos (82,05%) fueron polimórficos.

Figura 21. Patrones de amplificación obtenidos con la combinación SRAP2F/SRAP3R.



La similitud entre genotipos se cuantificó mediante el uso de tres coeficientes de asociación, de los cuales se seleccionó el índice de ‘Simple Matching’ por mostrar el menor grado de distorsión ($CCC=0,87$).

Figura 22. Dendograma obtenido mediante marcadores moleculares de tipo SRAP.

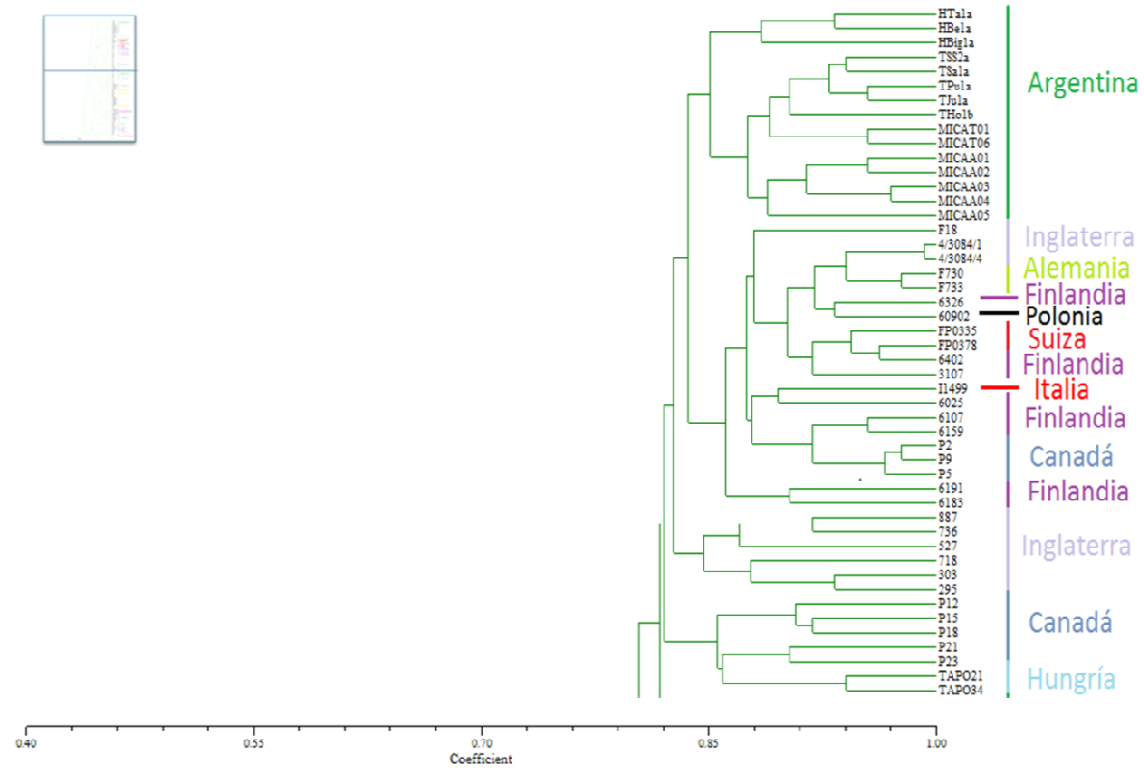


Figura 22. Continuación.

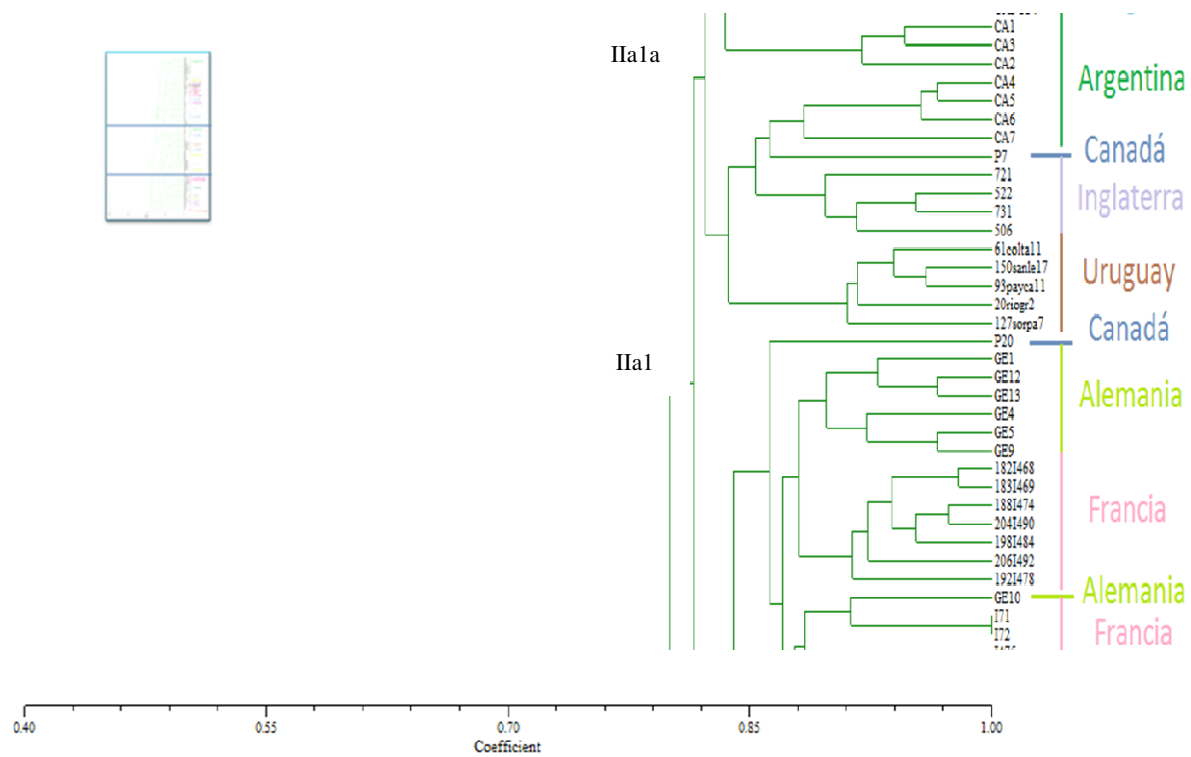
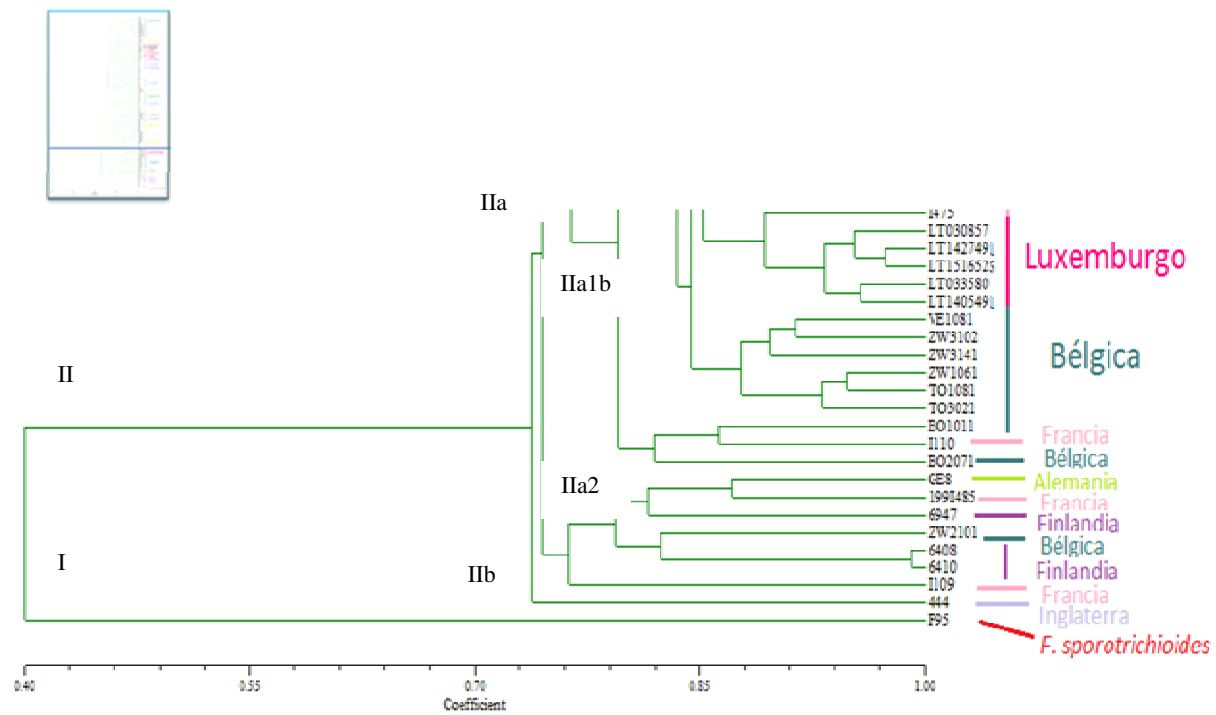


Figura 22. Continuación.



El análisis de agrupamiento permitió diferenciar claramente el grupo de aislamientos de *Fusarium poae* con el aislamiento utilizado como grupo externo *F. sporotrichioides*. Además permitió discriminar 104 haplotipos de los 105 aislamientos de *F. poae* analizados (Fig. 22).

En el dendograma se puede observar el agrupamiento de dos 'clusters' con 40% de similitud entre ellos: el 'cluster I', que incluye solamente el aislamiento de *F. sporotrichioides* (F95) y el 'cluster II' que incluye todos los aislamientos de *F. poae* analizados (Fig.22). El 'cluster II' se resuelve en dos 'subclusters' designados 'subcluster Iib', el cual incluye solamente un aislamiento de *F. poae* procedente de Inglaterra, y el 'subcluster Iia', que incluye los restantes aislamientos de *F. poae* evaluados. El 'subcluster Iia' se resuelve en dos 'subclusters' designados 'subcluster Iia2', el cual incluye aislamientos de *F. poae* procedentes de Alemania, Francia, Finlandia, Bélgica y Polonia, y el 'subcluster Iia1', que incluye el 92,38% de los aislamientos de *F. poae* analizados. El 'subcluster Iia1' se resuelve en dos 'subclusters' designados 'subcluster Iia1a' y 'subcluster Iia1b', el cual incluye aislamientos de Polonia, Bélgica, Alemania, Luxemburgo y Francia. El 'subcluster Iia1a' incluye aislamientos procedentes de la Argentina, Uruguay, Suiza, Hungría e Italia y algunos aislamientos de Finlandia, Inglaterra, Polonia y Alemania. En general, los aislamientos europeos se distribuyeron a lo largo del dendograma a diferencia de aquellos procedentes del continente americano.

La diversidad de *Fusarium poae* se estimó en 0.998 (DS= 0.0018). Los resultados del AMOVA arrojaron un 9,17% de diferencias entre grupos (americanos y europeos) y un 90,83% de diferencias dentro de cada grupo.

3.7.1 Fragmentos secuenciados obtenidos mediante marcadores SRAP

De la amplificación de los fragmentos obtenidos mediante esta técnica, se seleccionaron ocho fragmentos al azar (4 polimórficos y 4 monomórficos), los cuales fueron purificados y secuenciados.

Las secuencias resultantes fueron editadas y comparadas con la base de dato existente para *Fusarium* conocida como Fusarium ID (Geiser *et al.*, 2004) (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis de fragmentos SRAP.

Fragmentos seleccionados	Cebadores	Tipo de fragmento	Número Acceso GenBank	BlastX score (bits)	FUSARIUM ID
S6107	SRAP3F/3R	Polimórfico	KJ805783	147.1	<i>F. oxysporum</i> PHW808:FOPG_17988.1
				147.1	<i>F. oxysporum</i> Fo5176:FOXB_20935.1
				147.1	<i>F. oxysporum</i> PHW815:FOQG_17741.1
				146.7	<i>F. oxysporum</i> PHW815:FOQG_17269.1
				146.7	<i>F. oxysporum</i> PHW815:FOQG_17321.1
				115.9	<i>F. verticillioides</i> 7600:FVEG_06582.5
				71.2	<i>F. graminearum</i> PH-1: FGSG_07754.3
S3107T	SRAP3F/3R	Monomórfico	KJ805790	68.5	<i>F. verticillioides</i> 7600:FVEG_13223.5
				98.2	<i>F. verticillioides</i> 7600: FVEG_10146.5
				96.2	<i>F. oxysporum</i> PHW808:FOPG_13871.1
				87.8	<i>F. graminearum</i> PH-1:FGSG_03986.3
S45	SRAP2F/2R	Polimórfico	KJ805787	43.1	<i>F. graminearum</i> PH-1:FGSG_08699.3
S48T	SRAP2F/2R	Monomórfico	KJ805786	43.1	<i>F. graminearum</i> PH-1:FGSG_08699.3
S59	SRAP2F/3R	Polimórfico	KJ805784	48.1	<i>F. oxysporum melonis</i> :FOMG_13602.1
				40.0	<i>F. verticillioides</i> 7600:FVEG_16745.5
S59T	SRAP2F/3R	Monomórfico	KJ805789	55.0	<i>F. oxysporum</i> PHW808: FOPG_08978.1
				55.0	<i>F. verticillioides</i> 7600: FVEG_09114.5
				41.5	<i>F. graminearum</i> PH-1:FGSG_02583.3
S110	SRAP3F/1R	Polimórfico	KJ805788	98.5	<i>F. graminearum</i> PH-1: FGSG_06426.3
S110T	SRAP3F/1R	Monomórfico	KJ805785	73.5	<i>F. oxysporum</i> PHW808:FOPG_01692.1
				72.7	<i>F. verticillioides</i> 7600:FVEG_06490.5
				83.5	<i>F. graminearum</i> PH-1:FGSG_06426.3
				55.8	<i>F. verticillioides</i> 7600: FVEG_06490.5
				51.6	<i>F. oxysporum melonis</i> :FOMG_12090.1

Las secuencias analizadas fueron homólogas a proteínas hipotéticas de diferentes especies de *Fusarium*. El contenido GC promedio de los fragmentos secuenciados fue de 44,71%.

3.8 Discusión

Fusarium poae es un patógeno que ha incrementado su ocurrencia en los últimos años (Infantino *et al.*, 2012; Stenglein *et al.*, 2012; Lenc, 2011; Pereyra & Dill-Macky, 2010).

A lo largo de la historia, se han desarrollado estudios focalizados en evaluar la variabilidad genética de *Fusarium poae* pero ninguno de ellos utilizó previamente marcadores de tipo SRAP (Dinolfo *et al.*, 2010; Kerényi *et al.*, 1997; Liu & Sundheim, 1996).

En este estudio, la técnica de SRAP fue capaz de amplificar un total de 117 fragmentos dentro de los cuales un alto porcentaje (82,05%) mostró ser polimórfico entre los aislamientos evaluados. Este resultado permite confirmar la utilidad de este tipo de marcadores a la hora de estudiar la variabilidad genética en *F. poae*.

Asimismo, el análisis de los agrupamientos permitió definir 104 haplotipos entre los 105 aislamientos de *Fusarium poae* analizados, sin embargo, no fue posible agrupar los mismos en base a su lugar de origen. A pesar de ello, se puede observar un agrupamiento parcial de los aislamientos en base a su lugar de origen, similar al encontrado en este trabajo de tesis mediante marcadores moleculares de tipo ISSR. Los resultados antes mencionados concuerdan con aquellos encontrados por Kerényi *et al.* (1997) quienes evaluaron aislamientos de *F. poae*

mediante estudios de VCG y técnica de RAPD no pudiendo en este caso correlacionar los resultados obtenidos con los hospedantes o lugares de orígenes de los aislamientos evaluados (Kerényi *et al.*, 1997). Asimismo, en el año 2010, Vogelgsang *et al.* (2010) analizaron aislamientos de *F. poae* provenientes de distintos lugares como Suiza, Canadá, Alemania, Finlandia, Hungría, Noruega, Rusia, Dinamarca y Estados Unidos. Los aislamientos fueron evaluados en base a marcadores microsatélites no pudiendo, nuevamente en este caso, ser agrupados de acuerdo a su lugar de origen. Dinolfo *et al.* (2010) evaluaron aislamientos de *Fusarium poae* provenientes de la Argentina e Inglaterra. Los mismos fueron evaluados mediante marcadores de tipo ISSR y en este caso, tampoco pudieron ser agrupados de acuerdo a lugar de origen y hospedante. En el mismo año, Somma *et al.* (2010) evaluaron un total de 81 aislamientos de *Fusarium poae* provenientes de Italia mediante marcadores moleculares de tipo AFLP. En este caso, no fue posible agrupar los aislamientos acorde a la producción de micotoxinas, planteado como objetivo en este trabajo (Somma *et al.*, 2010).

En lo que respecta a la diversidad de la población, la técnica de SRAP permitió determinar que el 99% de los genotipos de los aislamientos de *Fusarium poae* analizados era diferente, porcentaje equivalente al encontrado mediante el uso de marcadores de tipo ISSR y AFLP. Asimismo, resultados similares fueron obtenidos por Dinolfo *et al.* (2010) y Somma *et al.* (2010), quienes observaron un alto nivel de variabilidad genética entre los aislamientos de *F. poae* evaluados mediante ISSR (99%) y AFLP (61%), respectivamente.

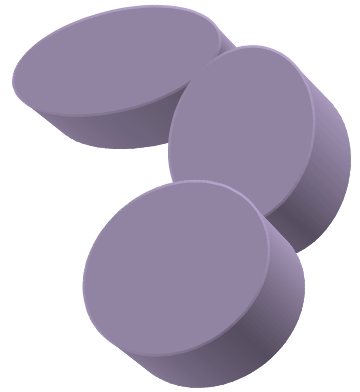
Los resultados del AMOVA demostraron claramente que las diferencias encontradas en los aislamientos se deben a diferencias dentro de cada grupo, es

decir dentro del grupo americano y europeo, que entre los grupos. Estas diferencias fueron similares a las encontradas mediante el uso de marcadores de tipo ISSR y AFLP, en este trabajo de tesis. Dinolfo *et al.* (2010) indicaron resultados concordantes a los obtenidos, mostrando en ese caso que los aislamientos provenientes de la Argentina e Inglaterra presentaban diferencias mayores dentro de cada grupo (90,83%) que entre los dos grupos en sí (9,17%). Sin embargo, el trabajo realizado por Somma *et al.* (2010) mostró resultados similares de diferencias entre y dentro de cada grupo (70%), lo cual podría atribuirse no sólo a la diferencia de técnica utilizada en cada caso, sino al tipo de aislamiento analizado ya que en el primer trabajo se evalúan aislamientos procedentes de la Argentina e Inglaterra y en el segundo, sólo aislamientos procedentes de Italia.

La técnica de SRAP es útil, no sólo para el estudio de variabilidad genética, sino también que brinda la posibilidad de amplificar ORF. En este estudio, el contenido de bases GC de alrededor de un 44,71% indica una alta probabilidad de encontrar regiones ricas en GC como son los ORFs. Los análisis de BLASTx confirmaron las probabilidades, mostrando que las secuencias analizadas compartían homología con diferentes proteínas hipotéticas de otras especies del género *Fusarium*. Estos resultados corroboran la capacidad de este tipo de marcadores moleculares para amplificar regiones codificantes presentes en el genoma de *Fusarium poae*. Más aún, los polimorfismos encontrados en los fragmentos secuenciados podrían indicarnos una expresión diferencial de proteínas entre los individuos.

A pesar de la existencia de trabajos, previamente desarrollados, para evaluar la variabilidad genética presentes en los hongos (Sun *et al.*, 2006; Pasquali *et al.*, 2010; Irzykowska *et al.*, 2013), este es el primer trabajo que secuencía los fragmentos resultantes para corroborar la capacidad de los marcadores de tipo SRAP a la hora de amplificar ORFs en hongos.

En resumen, los marcadores moleculares de tipo SRAP permiten analizar la variabilidad genética como así también amplificar regiones codificantes en aislamientos de *Fusarium poae*.



Capítulo IV:

Identificación de regiones
codificantes asociadas a la
producción de toxinas del
patógeno

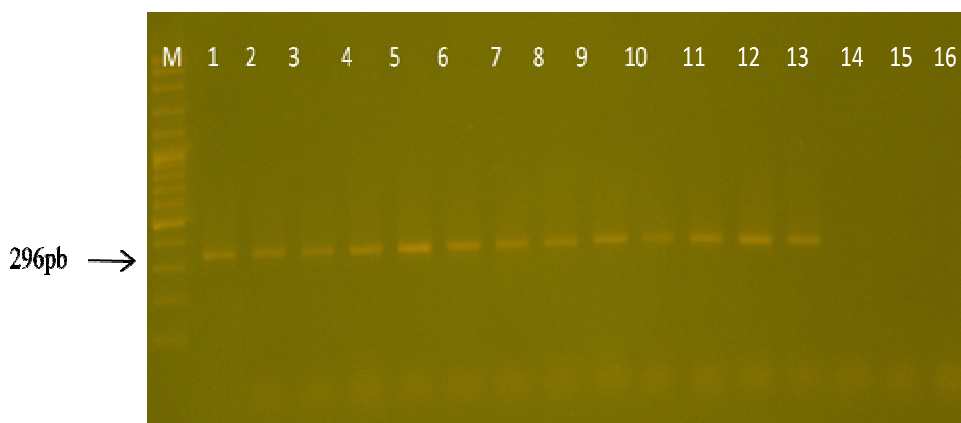


4.1 Resultados

El nuevo par de cebadores desarrollado para amplificar la región en el genoma de *Fusarium poae* que codifica para la producción de NIV, fue ajustado en cuanto a las temperaturas, tiempo de cada ciclo y números de ciclos para poder acceder de esta manera a una técnica rápida y confiable.

La utilización del nuevo par de cebadores permitió obtener un fragmento de 296pb, sin observar ningún tipo de amplificación en el resto de las especies de *Fusarium* analizadas, lo que demuestra y corrobora la especificidad de la nueva técnica (Fig. 23).

Figura 23. Amplificación del fragmento específico para detectar aislamientos de *F. poae* con el potencial de producir nivalenol. M: corresponde al marcador de peso molecular de 100pb. Línea 1 a la 13: corresponde a distintos aislamientos de *F. poae*; 14: *F. culmorum*; 15: *F. sporotrichioides*; 16: *F. langsethiae*.



Para confirmar que el fragmento amplificado se corresponde con parte de la secuencia del gen *TRI7*, responsable de codificar para la producción de NIV, se

secuenciaron los fragmentos amplificados mediante la utilización de los cebadores nivP en ocho aislamientos de *F. poae* seleccionados al azar (FP-TCP1a de la Argentina; FP-P2 de Canadá; FP-6025 de Finlandia; FP-6402, 61401 y 60902 de Polonia; FP-0378 de Alemania y FP-I475 de Francia, Tabla 1). Las secuencias fueron comparadas con las existentes en la base de datos del NCBI (Altschul *et al.*, 1990) mostrando un 99-100% de homología entre ellas y un 81% de homología con el gen *TRI7* (E-value 1e-57) perteneciente al aislamiento 88-1 de *F. graminearum* (aislamiento secuenciado y productor de NIV). Las secuencias resultantes fueron depositadas en la base de datos del NCBI bajo los números de accesiones: JN614907-JN614914.

En cuanto a la producción de micotoxinas evaluadas mediante HPLC/FD, los 12 aislamientos de *Fusarium poae* analizados fueron capaces de producir sólo NIV en un rango de entre 0,3-3,5 µg/g, sin mostrar valores de producción de DON (Tabla 12).

Tabla 12. Producción de nivalenol de aislamientos de *Fusarium poae* analizados por HPLC/FD.

Aislamientos de <i>F. poae</i> evaluados	Producción de NIV (µg/g)
HSu1a	2,3
HTa1a	0,6
HBig1a	1,0
TCa1a	0,4
THo1d	0,5
TPu1a	0,7
TBig1a	3,5
TMa1a	2,2
TPe1a	0,9
LSP1a	1,3
MICA-T-06	1,5
MICA-A-01	0,3

En cuanto a las muestras de cereales analizadas, la especie más frecuentemente aislada fue *F. poae* (15 aislamientos) en todas las muestras analizadas, seguida por *F. graminearum* (7), *F. oxysporum* (4), *F. chlamydosporum* (3), *F. acuminatum* (1), *F. equiseti* (1) y *F. sporotrichioides* (1). Estos aislamientos fueron probados con la nueva técnica desarrollada y sólo los aislamientos de *F. poae* amplificaron el fragmento de 296pb. Más aún, del ADN obtenido de la extracción realizada de semillas se amplificó el fragmento de 296pb, solamente en aquellas muestras de las cuales previamente se había aislado *F. poae*.

De esta manera, se cuenta con una técnica que permite detectar aislamientos de *Fusarium poae* con el potencial de producir NIV directamente de muestras de semillas que pudieran estar contaminadas con el patógeno.

4.2 Discusión

El desarrollo de cebadores específicos para detectar, mediante PCR, regiones específicas de cada especie del género *Fusarium* ha sido motivo de investigación de varios grupos. En el año 1996, Parry & Nicholson analizaron aislamientos de *Fusarium poae* aislados de trigo, mediante el uso de marcadores moleculares de tipo RAPD. Dos fragmentos resultantes, compartidos por la totalidad de los aislamientos evaluados, fueron purificados y secuenciados permitiendo de esta manera el desarrollo de cebadores específicos capaces de identificar de manera sencilla y mediante la técnica de PCR aislamientos de *F. poae* (Parry & Nicholson, 1996).

En los últimos años, se han desarrollado cebadores específicos que permiten detectar de manera sencilla y económica potenciales productores de

micotoxinas. En el año 2007, Kulik *et al.* (2007) desarrollaron un par de cebadores específicos para amplificar el gen *esyn1* que codifica para la enzima eniatina sintetasa, intermediaria en el síntesis de eniatinas. De esta manera se cuenta con una herramienta que de manera simple permite evaluar la potencialidad de los aislamientos de *F. poae* de producir este tipo de micotoxina.

Siendo ampliamente reconocida la capacidad de *Fusarium poae* como principal productor de NIV en el género, es que se consideró la necesidad de desarrollar cebadores específicos que permitan determinar la potencial producción de esta micotoxina.

La capacidad de *Fusarium poae* para producir NIV ha sido estudiada en diversos sustratos. En el año 1993, Sugiura *et al.* (1993) evaluaron muestras de trigo de diferentes campos en Hokkaido, al norte de Japón para evaluar la ocurrencia natural de NIV. Los resultados mostraron que *F. poae* fue una de las especies más aisladas. Estos aislamientos fueron evaluados mediante cromatografía gaseosa para detectar la producción de NIV mostrando un rango de producción entre 1,3 a 23,8 $\mu\text{g/g}$, considerando a esta especie como una de las principales en cuanto a la producción de esta nociva toxina en los granos de trigo de Hokkaido (Sugiura *et al.*, 1993). Más tarde, 21 aislamientos de *F. poae* aislados de trigo, cebada y avena de Polonia y Noruega fueron evaluados en cuanto a la producción de NIV en arroz y en distintos medios líquidos. En ambos casos, la producción de micotoxinas se evaluó con cromatografía gaseosa con espectrometría de masa arrojando valores de producción entre 0,01 $\mu\text{g/l}$ a 7 $\mu\text{g/l}$ en medio líquido y un rango de 0,1 $\mu\text{g/g}$ a 18 $\mu\text{g/g}$ en arroz, demostrando en ambos casos la capacidad de *F. poae* de producir NIV en medios con distintos

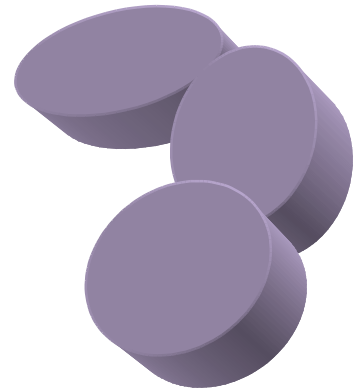
sustratos (Liu *et al.*, 1998). Thrane *et al.* (2004) evaluaron la capacidad de 49 aislamientos de *F. poae* de producir una amplia gama de micotoxinas. En este estudio se concluyó que *F. poae* era un notable productor de NIV dado que 41 aislamientos de *F. poae* tuvieron la capacidad de producir esta micotoxina de la totalidad de los aislamientos analizados (Thrane *et al.*, 2004).

Jestoi *et al.* (2008) evaluaron la capacidad de diferentes especies del género *Fusarium* de producir determinadas micotoxinas en granos de arroz en condiciones controladas de laboratorio (*in vitro*) y en granos de cebada y trigo inoculados artificialmente con las diferentes especies (*in vivo*). *F. poae* fue responsable de la producción de NIV sobre cultivos de arroz (10 µg/g); mientras que la cebada inoculada con *F. poae* mostró una producción de NIV de 0,082 µg/g y en trigo de 0,065 µg/g. Todos estos resultados confirman la producción de NIV por parte de aislamientos de *F. poae*. En ese mismo año, Vogelgsang *et al.* (2008a) evaluaron la capacidad de aislamientos de *F. poae* de producir micotoxinas “*in vitro*” en arroz y simultáneamente, evaluaron el efecto de distintos sustratos en lo que respecta al tipo y cantidad de micotoxinas producidas. Para este último objetivo utilizaron granos de arroz, de trigo, de avena y de maíz. Mediante cromatografía líquida-espectrometría de masa en “*tándem*” (LC-MS/MS), determinaron que la producción de NIV en arroz fue de 11,7 µg/g, mientras que en el arroz utilizado como sustrato en el segundo experimento, no mostró producción de NIV, lo que podría ser explicado, según los autores, por la pérdida de habilidad por parte del aislamiento, de producir esta micotoxina. En lo que respecta a los otros sustratos evaluados, la mayor producción de NIV se observó en maíz seguido por el trigo y la avena, con un rango entre el límite de

detección y 10,6 µg/g. Es de destacar, que los distintos aislamientos evaluados, mostraron diferencias en cuanto a la producción de NIV, concluyendo que la producción de NIV en *F. poae* no sólo depende del aislamiento evaluado sino también del sustrato utilizado (Vogelgsang *et al.*, 2008a). Recientemente, Somma *et al.* (2010) evaluaron 81 aislamientos de *F. poae* procedentes de trigos sembrados en Italia. Mediante la técnica de HPLC determinaron que el 88% de los aislamientos evaluados fue capaz de producir NIV en cantidades considerables con un mínimo de 0,2 µg/g y un máximo de 865µg/g.

Los resultados de este estudio y estudios previos muestran que diferentes aislamientos de *F. poae* procedentes de los mismos lugares de origen, pueden variar en su producción de micotoxinas, lo cual puede deberse a diferencias en las condiciones de cultivo, sustrato y período de incubación (Vogelgsang *et al.*, 2008a; Kokkonen *et al.*, 2010; Fanelli *et al.*, 2012).

De esta manera, se cuenta con un par de cebadores específicos y una técnica que permite detectar aislamientos de *Fusarium poae* con el potencial de producir NIV directamente de muestras de trigo y/o cebada que pudieran estar contaminadas. Este punto adquiere especial importancia a la hora de analizar aquellas muestras destinadas a consumo humano y/o animal y a la comercialización de granos, ya que mediante una técnica rápida y eficiente se pueden seleccionar sustratos libres de una potencial contaminación de este tipo de micotoxina producida por este patógeno.



Capítulo V:

Conclusiones y
perspectivas finales



5.1 Conclusiones finales

En este trabajo de tesis se llevaron a cabo estudios que aportan al conocimiento sobre *Fusarium poae*, uno de los patógenos fúngicos de interés agronómico más importante como productor de toxinas nocivas para la salud humana y de los animales.

Se evaluó la presencia de idiomorfos MAT y la variabilidad genética en una colección mundial de *F. poae* mediante distintos tipos de marcadores moleculares. Mediante este análisis fue posible:

- Determinar la presencia de MAT-1 y MAT-2 no sólo en diferentes aislamientos, sino que además se observó por primera vez la presencia de ambos idiomorfos en un mismo aislamiento, lo que podría indicar la presencia de aislamientos potencialmente homotáticos. Sin embargo, surge de este punto estudiar específicamente los idiomorfos MAT en *F. poae* para dilucidar y confirmar que estos resultados podrían jugar un rol en la variabilidad encontrada en esta especie.
- Comparar la diversidad genética de una colección mundial de *F. poae* mediante marcadores de tipo ISSR y AFLP permitiendo observar una elevada variabilidad en la población de este patógeno, conocimiento básico para el desarrollo de programas de mejoramiento.
- Determinar un alto grado de variabilidad con la técnica de SRAP en *F. poae* y corroborar la eficacia de la técnica para identificar ORFs en hongos. Se cuenta ahora con una herramienta adecuada para el estudio de la variabilidad y la posibilidad de identificar esas regiones codificantes en

especies cuyo genoma aún se desconoce. Sumado a ello, los fragmentos polimórficos resultantes podrían demostrar una expresión de proteínas diferencial entre los aislamientos evaluados.

Se amplificó una región codificante para la producción de nivalenol en *F. poae*, mediante lo cual fue posible:

- Diseñar cebadores capaces de amplificar la región codificante del gen para la producción de nivalenol, y permitir, mediante el uso de la técnica de PCR, detectar aislamientos de *F. poae* con el potencial de producir esta toxina. Se cuenta con una herramienta sencilla y rápida para detectar muestras de trigo y/o cebada con el potencial de estar contaminadas con NIV, y más aún para su aplicación en el sistema agroalimentario. De los resultados obtenidos surge la necesidad de contar con cebadores específicos para el resto de las micotoxinas capaces de ser producidas por *Fusarium poae*.

Todos estos resultados, proporcionan conocimientos básicos y de aplicación que contribuirán en el desarrollo de estrategias de mejoramiento tendientes a obtener variedades de cultivos tolerantes a *Fusarium poae*.

La hipótesis que se planteó en este trabajo fue que “Los aislamientos de *Fusarium poae* son heterogéneos a nivel genómico y en su potencial producción de toxinas”. Las evidencias surgidas de los objetivos abordados permiten aceptar de manera parcial la hipótesis planteada, debido a que por un lado se pudo demostrar una alta variabilidad genética de la población mundial de *Fusarium*

poae estudiada, pero por otro lado, todos los aislamientos demostraron poseer capacidad genética para producir NIV.

Referencias bibliográficas



- Agrios G.N., 1999. Fitopatología. Limusa S.A. México.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403-410.
- Arthur J.C., 1891. Wheat Scab. *Indiana Agricultural Experiment Station Bulletin* **36**: 53-60.
- Alvarez C.L., Somma S., Proctor R.H., Stea G., Mulé G., Logrieco A.F., Fernandez Pinto V., Moretti A., 2011. Genetic diversity in *Fusarium graminearum* from a major wheat-producing region of Argentina. *Toxins* **3**: 1294-1309.
- Astolfi P., Reynoso M.M., Ramirez M.L., Chulze S.N., Alves T.C.A., Tessmann D.J., Del Ponte E.M., 2011. Genetic populations structure and trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat in southern Brazil. *Plant Pathology* **61**: 289-295.
- Barreto D., Carmona M., Ferrazini M., Zanelli M., Pérez B.A., 2004. Occurrence and pathogenicity of *Fusarium poae* in barley in Argentina. *Cereal Research Communications* **32**: 53-60.
- Barros G., García D., Oviedo S., Ramirez M.L., Torres A., Chulze S., 2008. Deoxynivalenol and nivalenol analysis in soybean and soy flour. *World Mycotoxin Journal* **1**: 263-266.
- Bassam B., Caetano-Anolles G., Gresshoff P., 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. *Analytical Biochemistry* **196**: 80-83.
- Bayraktar H., Dolar F.S., Maden S., 2007. Use of RAPD and ISSR markers in detection of genetic variation and population structure among *Fusarium*

- oxysporum* f. sp. *ciceris* isolates on Chickpea in Turkey. *Journal of Phytopathology* **156**: 146-154.
- Booth C., 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. p. 32-72.
- Bornet B., Branchard M., 2001. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* **19**: 209-215.
- Caló L., Fornelli F., Ramires R., Nenna S., Tursi A., Caiaffa M.F., Macchia L., 2004. Cytotoxic effects of the mycotoxin beauvericin to human cell lines of myeloid origin. *Pharmacological Research* **49**: 73-77.
- Cepni E., Tunali B., Gürel F., 2012. Genetic diversity and mating types of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* originating from different agro-ecological regions in Turkey. *Journal of Basic Microbiology* **52**: 1-9.
- Chaudhary M., Rao L., 2010. Brain oxidative stress after dermal and subcutaneous exposure of T-2 toxin in mice. *Food and Chemical Toxicology* **48**: 3436-3442.
- Conde-Ferrández L., 2007. El locus *mat* (*mating-type*) de los ascomicetos: su evolución, estructura y regulación. *Revista Iberoamericana de Micología* **24**: 95-99.
- Cooney J.M., Lauren D.R., di Menna M.E., 2001. Impact of competitive fungi on trichothecene production by *Fusarium graminearum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 522-526.

- Crisci J.V., López Armengol M.F., 1983. Introducción a la Teoría y Práctica de la Taxonomía Numérica. Monografía 26, Serie de Biología, Programa de Monografías Científicas, OEA, Washington D.C.
- Desjardins A.E., 2006. *Fusarium* mycotoxins. Chemistry, genetics, and biology. St. Paul, MN, APS Press.
- Dewey D.R., 1985. The genomic system of classification as a guide to intergeneric hybridization with the perennial Triticeae. Springer US. p. 209-279.
- Dinolfo M.I., Stenglein S.A., Moreno M.V., Nicholson P., Jennings P., Salerno G.L., 2010. ISSR markers detect high genetic variation among *Fusarium poae* isolates from Argentina and England. *European Journal of Plant Pathology* **127**: 483-491.
- Doyle J.J., Doyle J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**: 13-15.
- Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**: 479-491.
- Fanelli F., Schmidt-Heydt M., Haidukowski M., Geisen R., Logrieco A., Mulé G., 2012. Influence of light on growth, fumonisin biosynthesis and *FUM1* gene expression by *Fusarium proliferatum*. *International Journal of Food Microbiology* **153**: 148-153.
- Föllmann W., Behm C., Degen G.H., 2009. The emerging *Fusarium* toxin enniatin B: in-vitro studies on its genotoxic potential and cytotoxicity in V79 cells in relation to other mycotoxins. *Mycotoxin Research* **25**: 11-19.

- Forsell J. H., Petska J.J., 1985. Relation of 8-ketotrichothecene and zearalenone analog structure to inhibition of mitogen-induced human lymphocyte blastogenesis. *Applied and Environmental Microbiology* **50**: 1304-1307.
- Galich M.T., 1987. Importancia y difusión de la Fusariosis del trigo en Argentina. En: Taller de la fusariosis de la espiga en América del Sur. Eds: Kohli M.M. CIMMYT. p. 7-26.
- Galich M.T., Galich A., 1996. Enfermedades de trigo en el área sur de Córdoba y Santa Fe. Experiencias en control químico. En: I Jornada de Control Químico de Enfermedades de Trigo en Sistemas para Alta Productividad. Org. INTA-CIMMYT. Bolsa de Cereales de Buenos Aires.
- Geiser D.M., del Mar Jimenez-Gasco M., Kang S., Makalowska I., Veeraraghavan N., Ward T.J., Zhang N., Kuldau G.A., O'Donnell K., 2004. FUSARIUM-ID v.1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* **110**: 473-480.
- Gimeno A., Martins M.L., 2011. Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos. Special Nutrients, Inc.
- Gutleb A., Morrison E., Murk A., 2002. Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **11**: 309-330.
- Heiser C.B., 1990. Seed to civilization. Cap I. The story of food. Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press.
- INTA. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 1981. El cultivo de trigo. Colección "Principales Cultivos de la Argentina". Ministerio de Agricultura

y Ganadería de la Nación, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires.

Infantino, A., Santori, A., Shah, D.A., 2012. Community structure of the *Fusarium* complex on wheat seed in Italy. *European Journal of Plant Pathology* **132**: 499-510.

Irzykowska L., Bocianowski J., Batur-Ciesniewska A., 2013. Association of mating-type with mycelium growth rate and genetic variability of *Fusarium culmorum*. *Central European Journal of Biology* **8**: 701-711.

Jestoi M.N., Paavanen-Huhtala S., Parikka P., Yli-Mattila T., 2008. *In vitro* and *in vivo* mycotoxin production of *Fusarium* species isolated from Finnish grains. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* **41**: 545-558.

Jun D.Y., Kim J.S., Park H.S., Song W.S, Bae Y.S., Kim Y.H., 2007. Cytotoxicity of diacetoxyscirpenol is associated with apoptosis by activation of caspase-8 and interruption of cell cycle progression by down-regulation of cdk4 and cyclin B1 in human Jurkat T cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* **222**: 190-201.

Jurado M., Vázquez C., Patiño B., Gonzalez-Jaén M.T., 2005. PCR detection assays for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides*. *Systematic and Applied Microbiology* **28**: 562-568.

Kerényi Z., Táborhegyi E., Pomázi A., Hornok L., 1997. Variability amongst strains of *Fusarium poae* assessed by vegetative compatibility and RAPD polymorphism. *Plant Pathology* **46**: 882-889.

- Kerényi Z., Moretti A., Waalwijk C., Oláh B., Hornok L., 2004. Mating type sequences in asexually reproducing *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 4419-4423.
- Kistler H.C., Miao V.P.M., 1992. New models of genetic change in filamentous fungi. *Annual Review of Phytopathology* **30**: 131-152.
- Knasmüller S., Bresgen N., Kassie F., Mersch-Sundermann V., Gelderblom W., Zöhrer E., Eckl P.M., 1997. Genotoxic effects of three *Fusarium* mycotoxins, fumonisin B₁, moniliformin and vomitoxin in bacteria and in primary cultures of rat hepatocytes. *Mutation Research* **391**: 39-48.
- Knutsen A.K., Torp M., Holst-Jensen A., 2004. Phylogenetic analyses of the *Fusarium poae*, *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae* species complex based on partial sequences of the translation elongation factor-1 alpha gene. *International Journal of Food Microbiology* **95**: 287-295.
- Kokkonen M., Ojala L., Parikka P., Jestoi M., 2010. Mycotoxin production of selected *Fusarium* species at different culture conditions. *International Journal of Food Microbiology* **143**: 17-25.
- Kulik T., Jestoi M., 2009. Quantification of *Fusarium poae* DNA and associated mycotoxins in asymptotically contaminated wheat. *International Journal of Food Microbiology* **130**: 233-237.
- Kulik T., Pszczółkowska A., Fordonski G., Olszewski J., 2007. PCR approach based on the *esyf1* gene for the detection of potential enniatin-producing *Fusarium* species. *International Journal of Food Microbiology* **116**: 319-324.

- Lamprecht S.C., Marasas W.F.O., Sydenham E.W., Thiel P.G., Knox-davies P.S., Van Wyk P.S., 1989. Toxicity to plants and animals of an undescribed, neosolaniol monoacetate-producing *Fusarium* species from soil. *Plant Soil* **114**: 75-83.
- Lautraite S., Rio B., Guinard J., Parent-Massin D., 1997. *In vitro* effects of diacetoxyscirpenol (DAS) on human and rat granulo-monocytic progenitors. *Mycopathologia* **140**: 59-64.
- Lee T.D., Oh D.W., Kim H.S., Lee J., Kim Y.H., Yun S.H., Lee Y.W., 2001. Identification of deoxynivalenol and nivalenol producing chemotypes of *Giberella zae* by using PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 2966-2972.
- Lee T., Han Y.-K., Kim K.-H., Yun S.-H., Lee Y.-W., 2002. *Tri13* and *Tri7* determine deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zae*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 2148-2154.
- Lee J., Chang I.-Y., Kim H., Yun S.-H., Leslie J.F., Lee Y.-W., 2009. Genetic diversity and fitness of *Fusarium graminearum* populations from rice in Korea. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 3289–3295.
- Legendre L., Legendre P., 1983. Numerical Ecology. Elsevier. Amsterdam.
- Lenc L., 2011. Fusarium Head blight and *Fusarium* spp. occurring on grain of spring wheat in an organic farming system. *Phytopathologia* **62**: 31-39.
- Leslie J.F., Summerell B.A., 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Oxford, Blackwell.
- Levitus G., Echenique V., Rubinstein C., Hopp E., Mroginski L., 2010. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. INTA-Argenbio.

- Li G., Quiros C.F., 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics* **103**: 455-461.
- Li G., Gao M., Yang B., Quiros C.F., 2003. Gene for gene alignment between the *Brassica* and *Arabidopsis* genomes by direct transcriptome mapping. *Theoretical and Applied Genetics* **107**: 168-180.
- Liddell C.M., 2003. Systematics of *Fusarium* species and allies associated with Fusarium Head Blight. En: Fusarium Head Blight of wheat and barley. Eds: Leonard K.J., Bushnell W.R. The American Phytopathological Society. Minnesota, USA.
- Liu W.Z., Sundheim, L., 1996. Nitrate nonutilizing mutants and vegetative compatibility groups in *Fusarium poae*. *Fungal Genetics and Biology* **20**: 12-17.
- Liu W., Sundheim L., Langseth W., 1998. Trichothecene production and the relationship to vegetative compatibility groups in *Fusarium poae*. *Mycopathologia* **140**: 105-114.
- MAGyP. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2012. En: Anuario Estadístico 2012. Bolsa de Comercio de Rosario.
- Mallmann C.A., Dilkin P., 2011. Mycotoxins and mycotoxicosis in swine. Eds: Douglas Zaviezo. Special Nutrients, Inc.
- Mantel N.A., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* **27**: 209-220.

- Marchionatto J.B., 1932. La Fusariosis del trigo y del maíz. Boletín 30. Ministerio de Agricultura de la Nación. Ciudad de Buenos Aires.
- Marzocco S., Russo R., Bianco G., Autore G., Severino L., 2009. Pro-apoptotic effects of nivalenol and deoxynivalenol trichothecenes in J774A.1 murine macrophages. *Toxicology Letters* **189**: 21-29.
- McDermott J.M., McDonald B.A., 1993. Gene flow in plant pathosystems. *Annual Review of Phytopathology* **31**: 353-373.
- McMullen M., Jones R., Gallenberg D., 1997. Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease* **81**: 1340-1348.
- Milgroom, M.G., Fry, W.E., 1997. Contributions of population genetics to plant disease epidemiology and management. *Advances in Botanical Research* **24**:1-30.
- Miralles D.J., Arisnabarreta S., Alzueta I., 2011. Desarrollo ontogénico y generación de rendimiento. En: Cebada Cervecera. Eds: Miralles D.J., Benech-Arnold R.L., Abeledo G. Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires.
- Mishra P.K., Fox R.T.V., Culham A., 2003a. Inter-simple sequence repeat and aggressiveness analyses revealed high genetic diversity, recombination and long range dispersal in *Fusarium culmorum*. *Annals of Applied Biology* **143**: 291-301.
- Mishra P.K., Fox R.T.V., Culham A., 2003b. Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic Fusaria. *FEMS Microbiology Letters* **218**: 329-332.

- Mishra P.K., Tewari J.P., Clear R.M., Turkington T.K., 2004. Molecular genetic variation and geographical structuring in *Fusarium graminearum*. *Annals of Applied Biology* **145**: 299-307.
- Molfese E. R., Seghezzo M.L., 2013. Panorama complicado 2012/2013: escasa cantidad de trigo de baja calidad. INTA. <http://inta.gob.ar/documentos/panorama-complicado-2012-2013-escasa-cantidad-de-trigo-de-baja-calidad/>
- Nagashima H., Nakagawa H., Iwashita K., 2006. Cytotoxic effects of nivalenol on HL60 cells. *Mycotoxins* **56**: 65-70.
- Nei M., Li W.H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 5269-5273.
- Nei M., 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press. New York.
- Nelson P.E., Toussoun T.A., Marasas W.F.O., 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania.
- Nicholson P., Lees A.K., Maurin N., Parry D.W., Rezanoor H.N., 1996. Development of a PCR assay to identify and quantify *Microdochium nivale* var. *nivale* and *Microdochium nivale* var. *majus* in wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **48**: 257-271.
- Nicholson P., Simpson D.R., Weston G., Rezanoor H.N., Lees A.K., Parry D.W., Joyce D., 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and

Fusarium graminearum in cereals using PCR assays. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **53**: 17-37.

Niessen L., Schmidt H., Vogel R.F., 2004. The use of *Tri5* gene sequences for PCR detection and taxonomy of trichothecene-producing species in the *Fusarium* section *Sporotrichiella*. *International Journal of Food Microbiology* **95**: 305-319.

Nirenberg H.I., 1976. Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium* Sektion *Lisiole*. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft* **169**: 1-117.

O'Donnell K., Ward T.J., Aberra D., Kistler H.C., Aoki T., Orwig N., Kimura M., Bjørnstad A., Klemsdal S.S., 2008. Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. *Fungal Genetics and Biology* **45**: 1514-1522.

Pasquali M., Komjati H., Lee D., Bayles R., 2010. SRAP technique efficiently generates polymorphisms in *Puccinia striiformis* isolates. *Journal of Phytopathology* **158**: 708-711.

Pasquali M., Beyer M., Bohn T., Hoffmann L., 2011. Comparative analysis of genetic chemotyping methods for *Fusarium*: *Tri13* polymorphism does not discriminate between 3- and 15-acetylated deoxynivalenol chemotypes in *Fusarium graminearum*. *Journal of Phytopathology* **159**: 700-704.

Parry D.W., Jenkinson P., McLeod L., 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals- a review. *Plant Pathology* **44**: 207-238.

- Parry D.W., Nicholson P., 1996. Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. *Plant Pathology* **45**: 383-391.
- Pereyra, S., Dill-Macky, R., 2010. *Fusarium* species recovered from wheat and barley grains in Uruguay, pathogenicity and deoxynivalenol content. *Agrociencia Uruguay* **14**: 33-44.
- Pradeep R., Sarla N., Siddiq E.A., 2002. Inter simple sequence repeats (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* **128**: 9-17.
- Prats J., Clément-Grandcourt M., 1969. Los cereales. Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Qu B., Li H.P., Zhang J.B., Xu Y.B., Huang T., Wu A.B., Zhao C.S., Carter J., Nicholson P., Liao Y.C., 2008. Geographic distribution and genetic diversity of *Fusarium graminearum* and *F. asiaticum* on wheat spikes throughout China. *Plant Pathology* **57**: 15-24.
- Quarta A., Mita G., Haidukowski M., Santino A., Mule G., Visconti A., 2005. Assessment of trichothecene chemotypes of *Fusarium culmorum* occurring in Europe. *Food Additives and Contaminants* **22**: 309-315.
- Ramirez M.M., Chulze S.N., Zeller K.A., Torres A.M., Leslie J.F., 2009. Genetic structure of *Fusarium verticillioides* population isolated from maize in Argentina. *European Journal of Plant Pathology* **123**: 207-215.
- Ramón D., Morán M., Costa J., López F., Arriola A., Martín A.C., Cuéllar R., Camacho R., Rodríguez F., 2005. Biotecnología en el sector agroalimentario. Genoma España. Fundación española para el desarrollo de la investigación en genómica y proteómica. p. 6

- Reis E., Carmona M., 2002. Fusariosis del trigo Biología, epidemiología y estrategias para su manejo. BASF Argentina S.A. Buenos Aires.
- Rodrigues I., Naehrer K., 2012. A three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feedstuffs and feed. *Toxins* **4**: 663-675.
- Rohlf F.I., 1998. Ntsys-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system Version 2.0. Applied Biostatistics. New York. USA. Exeter Software.
- SAGPyA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, 2004. Programa Nacional de Calidad de Trigo. http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/programas/dma/publicaciones/calidad_de_trigo/calidad_trigo.php
- Salas B., Steffenson B.J., Casper H.H., Tacke B., Prom L.K., Fetch Jr., T.G., Schwarz P.B., 1999. *Fusarium* species pathogenic to barley and their associated mycotoxins. *Plant Disease* **83**: 667-674.
- Satorre E.H., Benech Arnold R.L., Slafer G.A., de la Fuente E.B., Miralles D.J., Otegui M.E., Savin R., 2003. Producción de granos. Bases funcionales para su manejo. Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires.
- Seifert K.A., Lévesque C.A., 2004. Phylogeny and molecular diagnosis of micotoxigenic fungi. *European Journal of Plant Pathology* **110**: 449-471.
- Smith W.G., 1884. Diseases of Field and Garden Crops. London MacMillan & Co.
- Sneath P.H., Sokal R.R., 1973. Numerical taxonomy. Freeman. San Francisco.
- Schneider S., Roessli D., Excoffier L., 2000. Arlequin. Version 2.0: A Software for Populations Genetic Data Analysis. University of Geneva. Switzerland.

- Somma S., Alvarez C., Ricci V., Ferracane L., Ritieni A., Logrieco A., Moretti A., 2010. Trichothecene and beauvericin mycotoxin production and genetic variability in *Fusarium poae* isolated from wheat kernels from northern Italy. *Food Additives and Contaminants* **27**: 729-737.
- Stack R.W., 2003. History of Fusarium Head Blight with emphasis on North America. En: Fusarium Head Blight of wheat and barley. Eds: Leonard K.J., Bushnell W.R. The American Phytopathological Society. Minnesota, USA.
- Stenglein S.A., Balatti P.A., 2006. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Argentina as revealed by virulence and molecular markers. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **68**: 158-167.
- Stenglein S.A., Barreto D., Nicholson P., Chandler E., Brambilla V., Piris E.M., Saliva V., Mitidieri M., Salerno G., 2009. First report of *Fusarium poae* on tomato in Argentina. *Plant Pathology* **58**: 401-410.
- Stenglein S.A., 2009. *Fusarium poae*: a pathogen that needs more attention. *Journal of Plant Pathology* **91**: 25-36.
- Stenglein S. A., Dinolfo M.I., Bongiorno F., Moreno M.V., 2012. Response of wheat (*Triticum* spp.) and barley (*Hordeum vulgare*) to *Fusarium poae*. *Agrociencia* **46**: 299-306.
- Sugiura T., Fukasaku K., Tanaka T., Matsui Y., Ueno Y., 1993. *Fusarium poae* and *Fusarium crookwellense*, fungi responsible for the natural occurrence of nivalenol in Hokkaido. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 3334-3338.
- Summerell B.A., Leslie J.F., Blackhouse D., Bryden W.L., Burgess L.W., 2001. *Fusarium* Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Press. St. Paul,

Minnesota, USA.

- Sun S.-J., Gao W., Lin S.-Q., Zhu J., Xie B.-G., Lin Z.-B., 2006. Analysis of genetic diversity in *Ganoderma* population with a novel molecular marker SRAP. *Applied Microbiology and Biotechnology* **72**: 537-543.
- Thrane U., Adler A., Clasen P.-E., Galvano F., Langseth W., Lew H., Logrieco A., Nielsen K.F., Ritieni A., 2004. Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides*. *International Journal of Food Microbiology* **95**: 257-266.
- Tomaso J.C., 2004. Cebada, centeno y avena. Cereales menores de invierno. IDIA XXI **4**: 203-209.
- Torp M., Nirenberg H.I., 2004. *Fusarium langsethiae* sp. nov. on cereals in Europe. *International Journal of Food Microbiology* **95**: 247-256.
- Tugeon B.G., 1998. Application of mating type gene technology to problems in fungal biology. *Annual Review of Phytopathology* **36**: 115-137.
- Velazquez P.D., Formento A.N., Schutt L.S., Velazquez J.C., 2013. Comportamiento de cultivares de trigo, implantados en tres fechas de siembra frente a la fusariosis de la espiga. *Revista Agromercado. Cuadernillo Clásico de Trigo* **174**: 17-20.
- Vogelgsang S., Sulyok M., Bänziger I., Krska R., Schuhmacher R., Forrer H., 2008a. Effect of fungal strains and cereal substrates on *in vitro* mycotoxins production by *Fusarium poae* and *Fusarium avenaceum*. *Food Additives and Contaminants* **25**: 745-757.
- Vogelgsang S., Sulyok M., Hecker A., Jenny E., Krska R., Schuhmacher R., Forrer H.-R., 2008b. Toxicogenicity and pathogenicity of *Fusarium poae* and

Fusarium avenaceum on wheat. *European Journal of Plant Pathology* **122**: 265-276.

Vogelgsang S., Enkerli J., Jenny E., Roffler S., Widmer F., 2010. Characterization of *Fusarium poae* microsatellite markers on strains from Switzerland and other countries. *Journal of Phytopathology* **159**: 197-200.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**: 4407-4414.

Wang J.H., Li H.P., Qu B., Zhang J.B., Huang T., Chen F.F., Liao Y.C., 2008. Development of a generic PCR detection of 3-acetyldeoxynivalenol-, 15-acetyldeoxynivalenol- and nivalenol chemotypes of *Fusarium graminearum* clade. *International Journal of Molecular Science* **9**: 2495-2504.

Ward T.J., Bielawski J.P., Kistler H.C., Sullivan E., O'Donnell K., 2002. Ancestral polymorphism and adaptative evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America* **99**: 9278-9283.

Williams K.J., Dennis J.T., Smyl C., Wallwork H., 2002. The application of species-specific assays based on the polymerase chain reaction to analyze *Fusarium* crown rot of durum wheat. *Australasian Plant Pathology* **31**: 119-127.

Wilson A., Simpson D., Chandler E., Jennings P., Nicholson P., 2004. Development of PCR assays for the detection and differentiation of

Fusarium sporotrichioides and *Fusarium langsethiae*. *FEMS Microbiology Letters* **233**: 69-76.

Windels C.E., 1991. Current status of *Fusarium* taxonomy. *Phytopathology* **81**: 1048-1051.

Wolfe A., 2000. ISSR Resource Website. <http://www.biosci.ohio-state.edu/~awolfe/ISSR/ISSR.html>.

Xu X., Nicholson P., 2009. Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annual Review of Phytopathology* **384**: 83-103.

Yli-Mattila T., Mach R.L., Alekhina I.A., Bulat S.A., Koskinen S., Kullnig-Gradinger C.M., Kubicek C.P., Klemsdal S.S., 2004. Phylogenetic relationship of *Fusarium langsethiae* to *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* as inferred by IGS, ITS, β -tubulin sequences and UP-PCR hybridization analysis. *International Journal of Food Microbiology* **95**: 267-285.

Yun S.-H., Arie T., Kaneko I., Yoder O.C., 2000. Molecular organization of mating type loci in heterothallic, homothallic, and asexual *Gibberella/Fusarium* species. *Fungal Genetics and Biology* **31**: 7-20.

Zietkiewicz E., Raflaski A., Labuda D., 1994 Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchors polymerase chain reaction amplification. *Genomics* **20**: 176-183.

Los resultados de esta Tesis fueron publicados en revistas internacionales indexadas:

-Dinolfo M.I., Barros G.G., Stenglein S.A., 2012. Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* isolates with the potential to produce nivalenol. *FEMS Microbiology Letters* **332**: 99-104.

-Dinolfo M.I., Castañares E., Stenglein S.A., 2014. Characterization of a *Fusarium poae* world-wide collection by using molecular markers. *European Journal of Plant Pathology*. En prensa. DOI 10.1007/s10658-014-0448-z.

-Dinolfo M.I., Castañares E., Stenglein S.A., 2014. SRAP as informative molecular marker to study the *Fusarium poae* genetic variability. *Journal of Phytopathology*. Aceptado.

Development of a PCR assay to detect the potential production of nivalenol in *Fusarium poae*

María I. Dinolfo¹, Germán G. Barros^{2,3} & Sebastián A. Stenglein^{1,3,4}

¹Laboratorio de Biología Funcional y Biotecnología (BIOLAB)-CEBB, Facultad de Agronomía de Azul, UNCPBA, Azul, Buenos Aires, Argentina;

²Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina; ³Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina; and ⁴Cátedra de Microbiología, Facultad de Agronomía de Azul, UNCPBA, Azul, Buenos Aires, Argentina

Correspondence: Sebastián A. Stenglein, Laboratorio de Biología Funcional y Biotecnología (BIOLAB)-CEBB, Facultad de Agronomía de Azul, UNCPBA, Av. República de Italia # 780. 7300 Azul, Buenos Aires, Argentina. Tel./fax: +54 2281 433291; e-mail: stenglein@faa.unicen.edu.ar

Received 13 February 2012; revised 19 April 2012; accepted 20 April 2012.

Final version published online 15 May 2012.

DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02581.x

Editor: Jan Dijksterhuis

Keywords

Fusarium head blight; cereal grains; mycotoxins; rapid detection.

Abstract

Fusarium species can produce mycotoxins, which can contaminate cereal-based food producing adverse effects for human and animal health. In recent years, the importance of *Fusarium poae* has increased within the *Fusarium* head blight complex. *Fusarium poae* is known to produce trichothecenes, especially nivalenol, a potent mycotoxin able to cause a variety of toxic effects. In this study, a specific primer pair was designed based on the *tri7* gene to detect potential nivalenol-producing *F. poae* isolates. A total of 125 *F. poae*, four *F. cerealis*, two *F. culmorum*, one *F. langsethiae*, one *F. sporotrichioides* and seven *F. graminearum*, plus *F. austroamericanum*, *F. meridionale*, *F. graminearum sensu stricto* and *F. cortaderiae* from the NRRL collection were analysed, and only *F. poae* isolates gave a positive result for the presence of a 296-bp partial *tri7* DNA fragment. Moreover, the primer set was tested from cereal seed samples where *F. poae* and other *Fusarium* species with a negative result for the specific reaction (*F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. chlamydosporum*, *F. sporotrichioides*, *F. equiseti* and *F. acuminatum*) were isolated, and the expected fragment was amplified. We developed a rapid and reliable PCR assay to detect potential nivalenol-producing *F. poae* isolates.

Introduction

Fusarium head blight (FHB) is a disease of cereals caused by a complex of filamentous ascomycete fungi of genera *Fusarium* with a worldwide distribution (Stenglein, 2009). *Fusarium* species have a severe impact, reducing the yield and quality of seeds on diverse cereals such as wheat, barley, oat and corn (Kulik *et al.*, 2007). In addition, many species of the genus can produce mycotoxins, which are toxic metabolites that contaminate agricultural products along food production and can produce adverse effects for human and animal health (Moreno *et al.*, 2009).

Fusarium species are able to produce certain toxins such as fumonisin, enniatin, beauvericin, fusarin, moniliformin, fusaric acid, fusaproliferin and trichothecenes (Desjardins, 2006). Trichothecenes are tricyclic sesquiterpenes and some *Fusarium* species can produce the type A and/or the type B. Type A, such as T-2 toxin HT-2 toxin, neosolaniol and diacetoxyscirpenol (DAS) are more

acutely toxic than type B trichothecenes such as deoxynivalenol (vomitoxin-DON) and nivalenol (NIV). However, NIV is present in more chronic toxicoses (Prelusky *et al.*, 1994; Rotter *et al.*, 1996).

Fusarium poae is considered a weak pathogen and is commonly isolated from cereal glumes (Polley & Turner, 1995). Although this species has been previously considered as a secondary pathogen in the FHB complex, recent studies have shown that *F. poae* is a more prominent FHB-causing species (Stenglein, 2009). The main type B trichothecene produced by *F. poae* is NIV, which has been found in substantial amounts in cereal samples (Schollenberger *et al.*, 2006).

The main region containing genes involved in trichothecene biosynthesis is the *TRI* gene cluster, comprising 12 genes (*tri8*, *tri7*, *tri3*, *tri4*, *tri6*, *tri5*, *tri10*, *tri9*, *tri11*, *tri12*, *tri13* and *tri14*). Nivalenol production required *tri13* and *tri7* genes that produce the acetylation and oxygenation of the oxygen at C-4 to produce nivalenol and

4-acetyl nivalenol, respectively (Lee *et al.*, 2009). In recent years, genotype characterization based on PCR assays using primers developed from the *TRI* gene cluster to detect and screen important toxin-producing *Fusarium* species such as *Fusarium graminearum* (Chandler *et al.*, 2003; Quarta *et al.*, 2006; Ji *et al.*, 2007; Scoz *et al.*, 2009; Reynoso *et al.*, 2011; Sampietro *et al.*, 2011), *F. culmorum* (Jennings *et al.*, 2004) and *F. cerealis* (Chandler *et al.*, 2003) were published. Recently, Pasquali *et al.* (2011), comparing three PCR genotyping methods, were not able to identify NIV genotypes of *F. poae* based on the *tri7*, *tri12* and *tri13* genes, using primers previously designed for other species (Ward *et al.*, 2002; Quarta *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008).

Diagnostic assays based on the PCR allow researchers to analyse the potential contamination of cereal-based food with certain mycotoxins and to determine the potential risk for human and animal health. Therefore, the aim of this study was to develop a PCR method for the detection of potential NIV-producing *F. poae* isolates.

Materials and methods

Fungal isolates used in this study

A total of 125 *F. poae* isolates from different countries and hosts previously identified by a species-specific PCR (Parry & Nicholson, 1996), four *F. cerealis* (NIV producers), two *F. culmorum* (NIV producers), one *F. langsethiae* (NIV producer), one *F. sporotrichioides* (NIV producer) and seven *F. graminearum* (NIV and DON producers) were analysed (Table S1, Supporting information). Moreover, NIV producers *F. austroamericanum* NRRL 2903, *F. meridionale* NRRL 28436, *F. graminearum sensu stricto* NRRL 31084 and *F. cortaderiae* NRRL 29297, from the ARS Culture Collection, and *Fusarium* species isolated from seed samples (*F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. chlamyosporum*, *F. sporotrichioides*, *F. equiseti* and *F. acuminatum*) were also evaluated.

Grain samples

Twelve barley/wheat seed samples (2 kg) were provided by farmers from Buenos Aires province, Argentina. Seeds (400 per sample) were surface sterilized by immersing them for 3 min in 50% ethanol, 3 min in sodium hypochlorite (commercial 55 g Cl L⁻¹), washed three times with sterilized distilled water and deposited in Petri dishes (9 cm diameter) with potato dextrose agar (PDA) with chloramphenicol (50 µg mL⁻¹) and incubated for 7 days at 25 ± 2 °C under 12-h light/dark conditions. Potential *Fusarium* isolates were placed in tubes with PDA and in Petri dishes containing Spezieller Nährstoffarmer Agar

(SNA) and incubated for 7 days at 25 ± 2 °C under 12-h light/dark conditions for the identification according to Leslie & Summerell (2006).

DNA extraction

Monosporic genomic DNA from *Fusarium* isolates were extracted using a cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method described by Stenglein & Balatti (2006).

From cereal samples, 20 g of seeds per sample were ground to a fine powder for 1 min in a coffee-grinder and the DNA was extracted using the CTAB method described by Nicholson *et al.* (1996).

The quality of seed and fungal DNA was examined by electrophoresis in 0.8% (w/v) agarose gels containing Gel-Red™ (Biotium; Hayward) at 80 V in 1× Trisborate-EDTA buffer for 3 h at room temperature. The DNA was visualized under UV light. DNA concentrations were calculated using a fluorometer (Qubit Fluorometer; Invitrogen).

Sequencing of the amplified products

Different set of primers (data not shown) derived from the *tri13* and the *tri7* genes of the *F. graminearum* 88-1 NIV producer (Lee *et al.*, 2001) were designed and used for a first screening (25 *F. poae* isolates selected at random). Only one primer set of the *tri7* region was able to amplify fragments of different sizes (700, 450 and 200 bp) on three *F. poae* isolates of the 25 tested. The fragments were purified by AccuPrep® Gel Purification Kit (Bioneer Corporation). DNA sequencing, from both the sense and antisense ends of the fragments was carried out using Big Dye Terminator version 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, CA) in an Applied Biosystems Sequencer (ABI/Hitachi Genetic Analyzer 3130). The fragment of 450 bp was homologous to the *tri7* gene. Based on the obtained data, a specific primer pair was generated by aligning the *F. poae* sequences and the *tri7* region of the *F. graminearum* 88-1 using the Primer3 program. The selected primer sequences are nivPf (forward) 5'-TATCCTTGCATGGCAATGCC-3' and nivPr (reverse) 5'-AAATGGCGATACGAGTATTGA-3'.

To have positive controls for the PCRs, three NIV-*F. poae* producers determined by Vogelgsang *et al.* (2008b), FP-0335, FP-0338 and FP-0378 (Table 1), plus the 17 Argentinean NIV producers determined in this study (Table 1, see Nivalenol and deoxynivalenol HPLC/FD analysis section) were used. Moreover, the fragments amplified using the NIV-*F. poae* primers of eight *F. poae* isolates selected at random (FP-TCP1a, from Argentina; FP-P2, from Canada; FP-6025, from Finland; FP-6402, 61401, and 60902, from Poland; FP-0378, from Switzerland; FP-1475, from France; Table 2) were also sequenced

Table 1. *Fusarium poae* isolates used as positive NIV producers

Isolates designation	Country of origin	Year of isolation	Host	NIV production ($\mu\text{g g}^{-1}$)
FP-0335	Switzerland	2003	Wheat	Vogelgsang <i>et al.</i> (2008b)
FP-0338	Switzerland	2003	Wheat	Vogelgsang <i>et al.</i> (2008b)
FP-0378	Switzerland	2003	Wheat	Vogelgsang <i>et al.</i> (2008b)
FP-HSu1a	Argentina	2006	Barley	2.3
FP-HTa1a	Argentina	2007	Barley	0.6
FP-HPu5d	Argentina	2007	Barley	0.5
FP-HBig1a	Argentina	2007	Barley	1.0
FP-TCa1a	Argentina	2005	Wheat	0.4
FP-TSS2b	Argentina	2006	Wheat	6.1
FP-THo1d	Argentina	2006	Wheat	0.5
FP-TPu1a	Argentina	2005	Wheat	0.7
FP-TSa1b	Argentina	2007	Wheat	8.7
FP-TBig1a	Argentina	2007	Wheat	3.5
FP-TMa1a	Argentina	2007	Wheat	2.2
FP-TPe1a	Argentina	2007	Wheat	0.9
FP-LSP1a	Argentina	2003	Tomato	1.3
FP-MICA-T-06	Argentina	ND	Wheat	1.5
FP-MICA-A-01	Argentina	ND	Oat	0.3
FP-MICA-A-02	Argentina	ND	Oat	2.6
FP-MICA-A-03	Argentina	ND	Oat	1.9

ND, not determined.

to confirm that the amplified fragment corresponds to a part of the *tri7* gene sequence. The sequences were compared with the NCBI database using BLASTN (Altschul *et al.*, 1990). All sequences obtained were deposited in the NCBI/GenBank database under the accession numbers: JN614907–JN614914 (Table 2).

PCR protocols

The PCR was carried out using 10–25 ng of DNA in a total volume of 25 μL containing 10 \times reaction buffer, 0.5 μM of each primer, 200 μM of each dNTP (Genbiotech S.R.L.), 2.5 mM MgCl_2 and 1.25 U of Taq DNA polymerase (Inbio-Highway, Tandil, Argentina). DNA amplifications were performed in an XP thermal cycler (Bioer Technology Co.) with an initial denaturing step at

95 $^{\circ}\text{C}$ for 2 min, followed by 25 cycles at 95 $^{\circ}\text{C}$ for 10 s (denaturing step), 65 $^{\circ}\text{C}$ for 10 s (annealing), 72 $^{\circ}\text{C}$ for 20 s (extension) and a final extension cycle at 72 $^{\circ}\text{C}$ for 2 min.

PCRs using available species-specific primers for the *Fusarium* species isolated from grains (*F. graminearum*, *F. acuminatum*, *F. oxysporum*, *F. sporotrichioides* and *F. equiseti*) were made. The PCRs were carried out as described above, but using specific annealing temperatures and cycles according to Nicholson *et al.* (1998), Williams *et al.* (2002), Mishra *et al.* (2003), Niessen *et al.* (2004) and Jurado *et al.* (2005).

Products from PCRs were examined by electrophoresis in 1.5% (w/v) agarose gels containing GelRedTM (Bio-tium; Hayward) at 80 V in 1 \times Trisborate-EDTA buffer for 1 h at room temperature. Fragments were visualized under UV light. The size of the DNA fragments was estimated by comparing the DNA bands with a 100 bp DNA ladder (Genbiotech S.R.L., Buenos Aires, Argentina).

Table 2. *Fusarium poae* isolates used for sequencing

Isolates designation	Country of origin	Year of isolation	Host	Accession number
FP-TCP1a	Argentina	2004	Wheat	JN614914
FP-P2	Canada	2008	ND	JN614913
FP-6025	Finland	2006	Barley	JN614907
FP-6402	Poland	2006	Wheat	JN614908
FP-61401	Poland	2006	Wheat	JN614910
FP-60902	Poland	2006	Wheat	JN614909
FP-0378	Switzerland	2003	Wheat	JN614911
FP-I475	France	2007	Wheat	JN614912

ND, not determined.

Nivalenol and deoxynivalenol HPLC/FD analysis

Seventeen Argentinean *F. poae* isolates from different regions and hosts selected at random were analysed by HPLC/FD to test NIV/DON production (Table 1). *Fusarium poae* 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 $^{\circ}\text{C}$, twice. Each flask was inoculated with a 3-mm diameter agar disc taken from the margin of a colony

grown on SNA (Nirenberg, 1976) at 25 °C for 7 days. Flasks were shaken once a day by hand for 1 week. These cultures were incubated for 28 days at 25 °C in the 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 being analysed for toxin.

Toxin extraction and clean-up were carried out using a modified version of that originally reported by Cooney *et al.* (2001). For the detection of NIV and DON, the analysis was performed using the conditions described by Barros *et al.* (2008). The dried residue was dissolved in 400 µL of methanol/water (5 : 95), homogenized in a vortex mixer and injected into the HPLC system by full-loop injection technique (Hewlett Packard model 1100 pump, Palo Alto, CA and Rheodyne manual injector with a 50 µL loop; Rheodyne, Cotati, CA). The HPLC system consisted of a Hewlett Packard model 1100 pump connected to a Hewlett Packard 1100 Series variable wavelength detector and a data module Hewlett Packard Kayak XA (HP ChemStation Rev. A.06.01). Chromatographic separations were performed on a Luna™ C18 reversed-phase column (100 × 4.6 mm, 5 µM particle size) connected to a guard column SecurityGuard™ (4 × 3.0 mm) filled with the same phase. The mobile phase consisted of methanol/water (12 : 88), at a flow rate of 1.5 mL min⁻¹. The detector was set at 220 nm with an attenuation of 0.01 AUFS. Quantification was relative to external standards of DON and NIV (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO) from 1 to 4 µg mL⁻¹ in methanol/water (5 : 95). The detection limit was 5 ng g⁻¹ for each toxin.

Results and discussion

Fusarium poae is recognized as a more prominent member of the FHB complex (Yli-Mattila *et al.*, 2008; Kulik & Jestoi, 2009; Stenglein, 2009). Several researchers have developed specific primer pairs for PCR assays, to have a rapid, inexpensive and relative simple technique to identify *F. poae* isolates of cereal samples (Parry & Nicholson, 1996; Kulik, 2008; Yli-Mattila *et al.*, 2008). *Fusarium poae*

isolates used in our study were found to be positive based on the specific primer pair developed by Parry & Nicholson (1996).

Seventeen Argentinean isolates were analysed by HPLC/ FD for production of trichothecenes and only NIV was detected (0.3–8.7 µg g⁻¹; Table 1). This was in agreement with other studies (Vogelgsang *et al.*, 2008a, b; Yli-Mattila *et al.*, 2008), although a small number of isolates of the fungus have been reported that do not produce the toxin (Thrane *et al.*, 2004; Somma *et al.*, 2010). Variations in the produced toxin levels in the literature can be explained by differences in extraction or culturing of the isolates (Vogelgsang *et al.*, 2008a; Kokkonen *et al.*, 2010; Fanelli *et al.*, 2012).

Sequenced fragments of eight *F. poae* isolates were very homologous (99–100%) and showed 81% homology with the *tri7* gene (E-value 1e-57) of *Fusarium graminearum* 88-1.

Several studies have been carried out to detect natural contamination of cereals and grain-based products with mycotoxins producing species of the FHB complex using PCR assays. Lee *et al.* (2001) identified genetic differences between the trichothecene biosynthetic pathways of the NIV and DON chemotypes and developed a rapid method for *Gibberella zeae* genotype identification based on PCR analysis. Ward *et al.* (2002) designed specific primers based on the *tri12* gene sequences to identify NIV-producing *F. graminearum* isolates. Chandler *et al.* (2003) developed a number of PCR assays to amplify *tri7* and *tri13* sequences to characterize isolates of *F. graminearum*, *F. culmorum* and *F. cerealis* in terms of their NIV and DON potential production. Quarta *et al.* (2005) were able to develop specific primers targeting the *tri3* and *tri7* genes to identify 3A-DON, 15A-DON and NIV-*F. culmorum* producers based on the sequences of *Fusarium graminearum* described by Lee *et al.* (2001) and Ward *et al.* (2002). In our study, the PCR program was adjusted to different annealing temperatures and the number of cycles was reduced to obtain a rapid and reliable technique. The selected primers were evaluated on genomic DNA extracted from 125 *F. poae* isolates from

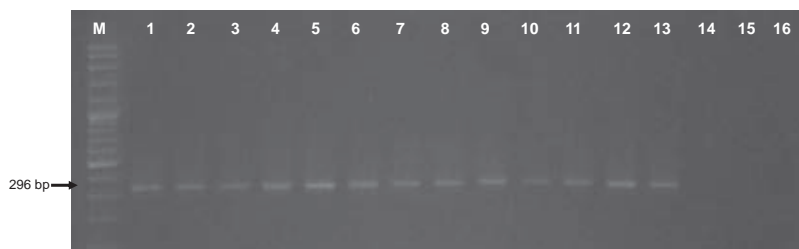


Fig. 1. Amplification of the specific fragment to detect nivalenol-producing *Fusarium poae* isolates. Lanes: M, 100 bp ladder; from 1 to 13, *Fusarium poae* isolates; 14, *F. culmorum*; 15, *F. sporotrichioides*; 16, *F. langsethiae*.

13 different countries and eight different hosts, plus other *Fusarium* species tested (see Materials and methods section). The *F. poae* isolates showed the presence of the 296-bp partial *tri7* DNA fragment (Fig. 1), whereas no product was amplified from other *Fusarium* species.

In our cereal sample analyses, *Fusarium poae* was the species with higher isolation frequency (15 isolates) in all seed samples analysed, followed by *F. graminearum* (seven), *F. oxysporum* (four), *F. chlamyosporum* (three), *F. acuminatum* (one), *F. equiseti* (one) and *F. sporotrichioides* (one). All of these isolates were tested with the new primer set for potential NIV-*F. poae* producers and only *F. poae* isolates amplified the expected fragment. Moreover, DNA obtained from seed samples amplified the product of 296 bp according to the size of our NIV-*F. poae*-specific PCR.

Acknowledgements

This work was supported by FONCYT-SECYT PRH32-PICT 2008/110 and PIP 167 CONICET.

References

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Evol* **215**: 403–410.
- Barros G, García D, Oviedo S, Ramirez ML, Torres A & Chulze S (2008) Deoxynivalenol and nivalenol analysis in soybean and soy flour. *World Mycotoxin J* **1**: 263–266.
- Chandler EA, Simpson DR, Thomsett MA & Nicholson P (2003) Development of PCR assays to *Tri7* and *Tri13* trichothecene biosynthetic genes, and characterisation of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*. *Physiol Mol Plant Pathol* **62**: 355–367.
- Cooney JM, Lauren DR & di Menna ME (2001) Impact of competitive fungi on trichothecene production by *Fusarium graminearum*. *J Agric Food Chem* **49**: 522–526.
- Desjardins AE (2006) *Fusarium Mycotoxins Chemistry Genetics and Biology*. APS Press, St. Paul, MN.
- Fanelli F, Schmidt-Heydt M, Haidukowski M, Geisen R, Logrieco A & Mulé G (2012) Influence of light on growth, fumonisin biosynthesis and *FUM1* gene expression by *Fusarium proliferatum*. *Int J Food Microbiol* **153**: 148–153.
- Jennings P, Coates ME, Turner JA, Chandler EA & Nicholson P (2004) Determination of deoxynivalenol and nivalenol chemotypes of *Fusarium culmorum* isolates from England and Wales by PCR assay. *Plant Pathol* **53**: 182–190.
- Ji L, Cao K, Hu T & Wang S (2007) Determination of deoxynivalenol and nivalenol chemotypes of *Fusarium graminearum* isolates from China by PCR assay. *J Phytopathol* **155**: 505–512.
- Jurado M, Vázquez C, Patiño B & Gonzalez-Jaén MT (2005) PCR detection assays for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides*. *Syst Appl Microbiol* **28**: 562–568.
- 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.
- Kulik T (2008) Development of a duplex PCR assay for the simultaneous detection of *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* from wheat. *J Plant Pathol* **90**: 425–432.
- Kulik T & Jestoi M (2009) Quantification of *Fusarium poae* DNA and associated mycotoxins in asymptotically contaminated wheat. *Int J Food Microbiol* **130**: 233–237.
- Kulik T, Pszczółkowska A, Fordonski G & Olszewski J (2007) PCR approach based on the *esyn1* gene for the detection of potential enniatin-producing *Fusarium* species. *Int J Food Microbiol* **116**: 319–324.
- Lee T, Oh D-W, Kim H-S, Lee J, Kim Y-H, Yun S-H & Lee Y-W (2001) Identification of deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae* using PCR. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2966–2972.
- Lee J, Chang I-Y, Kim H, Yun S-H, Leslie JF & Lee Y-W (2009) Genetic diversity and fitness of *Fusarium graminearum* populations from rice in Korea. *Appl Environ Microbiol* **75**: 3289–3295.
- Leslie JF & Summerell BA (2006) *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, Ames, IA.
- Mishra PK, Fox RTV & Culham A (2003) Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic Fusaria. *FEMS Microbiol Lett* **218**: 329–332.
- Moreno EC, Garcia GT, Ono MA, Vizoni É, Kawamura O, Hirooka EY & Ono EYS (2009) Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State, Brazil. *Food Chem* **116**: 220–226.
- Nicholson P, Lees AK, Maurin N, Parry DW & Rezanoor HN (1996) Development of a PCR assay to identify and quantify *Microdochium nivale* var. *nivale* and *Microdochium nivale* var. *majus* in wheat. *Physiol Mol Plant Pathol* **48**: 257–271.
- Nicholson P, Simpson DR, Weston G, Rezanoor HN, Lees AK, Parry DW & Joyce D (1998) Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. *Physiol Mol Plant Pathol* **53**: 17–37.
- Niessen L, Schmidt H & Vogel RF (2004) The use of *Tri5* gene sequences for PCR detection and taxonomy of trichothecene-producing species in the *Fusarium* section *Sporotrichiella*. *Int J Food Microbiol* **95**: 305–319.
- Nirenberg HI (1976) Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium* Sekion Lisiola. *Mitt Biol Bundesanst Land-Forstwirtschaft* **169**: 1–117.
- Parry DW & Nicholson P (1996) Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. *Plant Pathol* **45**: 383–391.
- Pasquali M, Beyer M, Bohn T & Hoffmann L (2011) Comparative analysis of genetic chemotyping methods for *Fusarium*: *Tri13* polymorphism does not discriminate between 3- and 15-acetylated deoxynivalenol chemotypes in *Fusarium graminearum*. *J Phytopathol* **159**: 700–704.

- Polley RW & Turner JA (1995) Surveys of stem base diseases and *Fusarium* ear diseases in winter wheat in England, Wales and Scotland, 1989–1990. *Ann Appl Biol* **126**: 45–59.
- Prelusky DB, Rotter BA & Rotter RG (1994) Toxicology of mycotoxins. *Mycotoxins in Grain: Compounds other than Aflatoxin* (Miller JD & Trenholm HL, eds), pp. 359–404. Eagan Press, St. Paul, MN.
- Quarta A, Mita G, Haidukowski M, Santino A, Mulé G & Visconti A (2005) Assessment of trichothecene chemotypes of *Fusarium culmorum* occurring in Europe. *Food Addit Contam* **22**: 309–315.
- Quarta A, Mita G, Haidukowski M, Logrieco A, Mulé G & Visconti A (2006) Multiplex PCR assay for the identification of nivalenol 3- and 15-acetyl-deoxynivalenol chemotypes in *Fusarium*. *FEMS Microbiol Lett* **259**: 7–13.
- Reynoso MM, Ramirez ML, Torres AM & Chulze SN (2011) Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* strains isolated from wheat in Argentina. *Int J Food Microbiol* **145**: 444–448.
- Rotter B, Prelusky DB & Petska JJ (1996) Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J Toxicol Environ Health* **48**: 1–34.
- Sampietro DA, Diaz CG, Gonzalez V, Vattuone MA, Ploper LD, Catalan CA & Ward TJ (2011) Species diversity and toxigenic potential of *Fusarium graminearum* complex isolates from maize fields in northwest Argentina. *Int J Food Microbiol* **145**: 359–364.
- Schollenberger M, Müller H-M, 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.
- Scoz LB, Astolfi P, Reartes DS, Schmale DG, Moraes MG & Del Ponte EM (2009) Trichothecene mycotoxin genotypes of *Fusarium graminearum sensu stricto* and *Fusarium meridionale* in wheat from southern Brazil. *Plant Pathol* **58**: 344–351.
- Somma S, Alvarez C, Ricci V, Ferracane L, Ritieni A, Logrieco A & Moretti A (2010) Trichothecene and beauvericin mycotoxin production and genetic variability in *Fusarium poae* isolated from wheat kernels from northern Italy. *Food Addit Contam* **27**: 729–737.
- Stenglein SA (2009) *Fusarium poae*: a pathogen that needs more attention. *J Plant Pathol* **91**: 25–36.
- Stenglein SA & Balatti PA (2006) Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Argentina as revealed by pathogenic and molecular markers. *Physiol Mol Plant Pathol* **68**: 158–167.
- Thrane U, Adler A, Clasen P-E, 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.
- Vogelgsang S, Sulyok M, Bänziger I, Krska R, Schuhmacher R & Forrer H-R (2008a) Effect of fungal strain and cereal substrate on *in vitro* mycotoxin production by *Fusarium poae* and *Fusarium avenaceum*. *Food Addit Contam* **25**: 745–757.
- Vogelgsang S, Sulyok M, Hecker A, Jenny E, Krska R, Schuhmacher R & Forrer H-R (2008b) Toxigenicity and pathogenicity of *Fusarium poae* and *Fusarium avenaceum* on wheat. *Eur J Plant Pathol* **122**: 265–276.
- Wang J-H, Li H-P, Qu B, Zhang J-B, Huang T, Chen F-F & Liao Y-C (2008) Development of a generic PCR detection of 3-acetyldeoxynivalenol- 15-acetyldeoxynivalenol- and nivalenol chemotypes of *Fusarium graminearum* clade. *Int J Mol Sci* **9**: 2495–2504.
- Ward TJ, Bielawski JP, Kistler HC, Sullivan E & O'Donnell K (2002) Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. *P Natl Acad Sci USA* **99**: 9278–9283.
- Williams KJ, Dennis JT, Smyl C & Wallwork H (2002) The application of species-specific assays based on the polymerase chain reaction to analyze *Fusarium* crown rot of durum wheat. *Australas Plant Pathol* **31**: 119–127.
- Yli-Mattila T, Paavananen-Huhtala S, Jestoi M, Parikka P, Hietaniemi V, Gagkaeva T, Sarlin T, Haikara A, Laaksonen S & Rizzo A (2008) Real-time PCR detection and quantification of *Fusarium poae*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae* in cereal grains in Finland and Russia. *Arch Phytopathology Plant Protect* **41**: 243–260.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. *Fusarium* isolates used in this study for specific NIV-PCR analysis.

Please note: Wiley-Blackwell is not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Characterization of a Fusarium poae world-wide collection by using molecular markers

María I. Dinolfo, Eliana Castañares & Sebastián A. Stenglein

European Journal of Plant Pathology

Published in cooperation with the
European Foundation for Plant
Pathology

ISSN 0929-1873

Eur J Plant Pathol
DOI 10.1007/s10658-014-0448-z



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Koninklijke Nederlandse Planteziektenkundige Vereniging. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Characterization of a *Fusarium poae* world-wide collection by using molecular markers

María I. Dinolfo · Eliana Castañares ·
Sebastián A. Stenglein

Accepted: 30 April 2014
© Koninklijke Nederlandse Planteziektenkundige Vereniging 2014

Abstract *Fusarium poae* has been considered as a minor species among those that cause Fusarium Head Blight (FHB) disease but in recent years several researchers have documented a high frequency of occurrence of this species. In this study, a total of 173 *F. poae* isolates from Argentina, Belgium, Canada, England, Finland, France, Germany, Hungary, Italy, Luxembourg, Poland, Switzerland and Uruguay were evaluated by using inter simple sequence repeats (ISSR) and amplified fragment length polymorphism (AFLP) to evaluate genetic variability within *F. poae* and to amplify MAT idiomorphs as a possible mechanism that could explain part of the variability found in this species. The molecular analysis obtained from both molecular markers showed a high intraspecific variability. However, a partial clustering between *F. poae* isolates and their geographic origin was obtained by ISSR markers while AFLP showed isolates from different geographic locations distributed throughout the dendrogram. Moreover,

ISSR grouped all the *F. poae* isolates into a different cluster from the *F. langsethiae* and *F. sporotrichioides* isolates used as outgroups compared with the dendrogram obtained using AFLP markers. Analysis of molecular variance (AMOVA) indicated a high genetic variability in the *F. poae* collection, with most of the genetic variability resulting from differences within, rather than between, American and European populations by using both molecular markers. Regarding MAT idiomorphs, for most *F. poae* isolates both MAT-1 and MAT-2 were present from each isolate.

Keywords AFLP · *Fusarium poae* · Genetic variability · ISSR · MAT

Introduction

Fusarium Head Blight (FHB) is a disease of small grain cereals that reduces production and quality of barley, wheat and oat. FHB is especially important because of the ability of *Fusarium* species to produce mycotoxins harmful to human and animal health.

The most frequent *Fusarium* species isolated from grain exhibiting FHB symptoms are *Fusarium graminearum*, *F. poae*, *F. avenaceum* and *F. culmorum* (Nicholson et al. 2003). *F. poae* has been considered as a minor species among the FHB disease complex but in recent years several researchers have documented a high frequency of occurrence (Audenaert et al. 2009; Lindblad et al. 2013; Stenglein et al. 2012). However, there have been few reports of diversity of *F. poae* populations.

M. I. Dinolfo · E. Castañares · S. A. Stenglein
Laboratorio de Biología Funcional y Biotecnología
(BIOLAB)-INBIOTEC-CICBA, Facultad de Agronomía de
Azul, UNCPBA, Av. República de Italia # 780, 7300 Azul,
Buenos Aires, Argentina

M. I. Dinolfo · E. Castañares · S. A. Stenglein
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
(CONICET), Buenos Aires, Argentina

S. A. Stenglein (✉)
Cátedra de Microbiología. Facultad de Agronomía de Azul,
UNCPBA, Av. de Italia # 780, 7300 Azul, Buenos Aires,
Argentina
e-mail: stenglein@faa.unicen.edu.ar

Basic knowledge of the population structure of plant pathogens is needed to know fungal adaptability sources, to understand the behaviour of the pathogen in response to new agriculture practices and to elucidate differences according to geographic origin or mycotoxin production (Chandra Nayaka et al. 2011). Several molecular markers have been used to genetically characterize *Fusarium* populations such as inter simple sequence repeats (ISSR) in *F. culmorum* and *F. poae* (Dinolfo et al. 2010; Mishra et al. 2003); amplified fragment length polymorphism (AFLP) in *F. poae*, *F. graminearum* and *F. asiaticum* (Akinsanmi et al. 2008; Astolfi et al. 2011; Qu et al. 2008; Somma et al. 2010); simple sequence repeats (SSR) in *F. poae* (Vogelgsang et al. 2010); random amplification of polymorphic DNA (RAPD) in *F. graminearum* and *F. poae* (Kerényi et al. 1997; Ouellet and Seifert 1993).

ISSR is a useful tool that, like AFLP, requires no prior DNA sequence knowledge for PCR amplification. For this reason these types of molecular markers are known as anonymous DNA markers or sequence non-specific techniques (Agarwal et al. 2008; Leslie et al. 2007). ISSR is a simple and robust technique that allows the identification of genome regions between microsatellite loci with the potential for producing high levels of genomic information (Chandra Nayaka et al. 2011; Su et al. 2008). AFLP combines restriction enzyme digestion with PCR technology (Vos et al. 1995). This technique generates fingerprints with multiple fragments derived from throughout the genome, resulting in a high degree of discrimination and identification of *Fusarium* species (Akinsanmi et al. 2008; Alvarez et al. 2011; Astolfi et al. 2011).

Genetic maps of phytopathogenic fungi have been built with the help of DNA markers and genomic sequence information, including the mating-type locus (MAT) which determines sexual compatibility of heterothallic fungi (Manzo-Sánchez et al. 2007). The two idiomorphs at this locus share no sequence similarity: the product of the MAT-1 idiomorph has a conserved α -domain whereas the product of MAT-2 has a conserved HMG domain (high mobility group) indicating they encode transcription factors (Conde-Ferráez 2007). However, the homothallic *Fusarium graminearum* species contains both MAT-1 and MAT-2 loci in the genome (Yun et al. 2000). Kerényi et al. (2004) used these regions to design primers in order to determine MAT-1 and MAT-2 not only in *Fusarium* species known to have sexual stages, but also in *Fusarium* species in which sexual

reproduction is unknown such as *F. poae*, showing that *F. poae* is presumably capable of heterothallic mating.

One of the aims of the present study was to evaluate the genetic variability in a world-wide collection of *Fusarium poae* isolates by using ISSR and AFLP markers and, as studies on the potential for mating could increase the knowledge of *Fusarium* species to maintain their diversity (Kerényi et al. 2004) another objective was to amplify MAT idiomorphs as a possible mechanism that could help to explain the variability found in this species.

Materials and methods

Fungal isolates and genomic DNA extraction

A total of 173 monosporic *Fusarium poae* isolates from Argentina, England, Italy, Finland, Switzerland, Poland, Germany, Canada, Belgium, France, Hungary, Luxembourg and Uruguay and two isolates of *F. langsethiae* (CC321) and *F. sporotrichioides* (F95) used as out groups, were evaluated in this study (Table 1). All *Fusarium* isolates were conserved on Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) slants according to Leslie and Summerell (2006).

Total genomic DNA of all isolates was extracted using the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method according to Stenglein and Balatti (2006). DNA concentrations were calculated using a fluorometer (Qubit Fluorometer, Invitrogen). All *Fusarium poae* isolates were identified by PCR using species-specific primers according to Parry and Nicholson (1996).

ISSR markers

The ISSR-PCR was performed with six ISSR primers (CTC(GT)₈, (AG)₈, (CAC)₅, CT(GA)₈, AGG(CT)₈ and (GCC)₅) that were selected based on the results of initial screening of 25 ISSR primers against a set of 30 representative isolates of *Fusarium poae*. PCR was performed in a XP thermal cycler (Bioer Technology Co, Hangzhou, China) according to Dinolfo et al. (2010). The annealing temperature was 48 °C for the first two primers, 53 °C for the following three and 66 °C for the last one listed above. The amplification products were separated by vertical electrophoresis using 4 % polyacrylamide gel with 5 M urea for denaturing DNA. Gel fixing, staining and developing followed to visualize the

Table 1 *Fusarium* isolates used in this study and MAT amplifications

Isolate	Figures isolate code	Host	Geographic origin	City or region	Year of isolation	MAT 1	MAT 2
HSu1a	Fp-Ar1	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Argentina	Coronel Suarez	2006	-	+
HPu1a	Fp-Ar2	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Argentina	Puán	2006	+	-
HPu4a	Fp-Ar3	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Argentina	Puán	2007	+	-
HTa1a	Fp-Ar4	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Argentina	Tres Arroyos	2007	+	-
HBela	Fp-Ar5	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Argentina	Belloq	2007	+	-
HBelc	Fp-Ar6	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Argentina	Belloq	2007	+	+
HBig1a	Fp-Ar7	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Argentina	Bigand	2007	+	+
TCa1a	Fp-Ar8	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	Castelar	2005	-	+
TSS1b	Fp-Ar9	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	Sanci Spiritu	2006	+	+
TSS2a	Fp-Ar10	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	Sanci Spiritu	2006	+	-
THo1b	Fp-Ar11	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	Los Hornos	2005	+	+
THo1d	Fp-Ar12	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	Los Hornos	2005	-	+
TPu1a	Fp-Ar13	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	Puán	2005	+	-
TPu1c	Fp-Ar14	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	Puán	2005	+	+
TSa1a	Fp-Ar15	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	Saladillo	2007	+	-
TSm1a	Fp-Ar16	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	San Manuel	2007	+	+
TBig1a	Fp-Ar17	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	Bigand	2007	-	+
TMa1a	Fp-Ar18	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	25 de Mayo	2007	+	+
TJu1a	Fp-Ar19	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	Junin	2007	+	-
TPe1a	Fp-Ar20	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	Pergamino	2007	-	+
LSPla	Fp-Ar21	<i>Lycopersicon esculentum</i> L.	Argentina	San Pedro	2003	+	+
MICA-T-01	Fp-Ar22	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	Bragado	NN	+	+
MICA-T-04	Fp-Ar23	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	Arrecifes	NN	+	+
MICA-T-06	Fp-Ar24	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	San Antonio de Areco	NN	+	+
MICA-T-07	Fp-Ar25	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	Junin	NN	+	-
MICA-A-01	Fp-Ar26	<i>Avena sativa</i> L.	Argentina	Guauguaychu	NN	+	-
MICA-A-02	Fp-Ar27	<i>Avena sativa</i> L.	Argentina	Guauguaychu	NN	+	+
MICA-A-03	Fp-Ar28	<i>Avena sativa</i> L.	Argentina	Urdinarrain	NN	+	+
MICA-A-04	Fp-Ar29	<i>Avena sativa</i> L.	Argentina	Urdinarrain	NN	+	+
MICA-A-05	Fp-Ar30	<i>Avena sativa</i> L.	Argentina	Basavilbaso	NN	+	+
4/4343/1	Fp-En1	<i>Triticum aestivum</i> L.	England	Suffolk	NN	-	+
1021	Fp-En2	<i>Triticum aestivum</i> L.	England	Lancashire	2006	+	-
887	Fp-En3	<i>Triticum aestivum</i> L.	England	W. Yorkshire	2006	+	-
747	Fp-En4	<i>Triticum aestivum</i> L.	England	Buckinghamshire	2003	+	+
736	Fp-En5	<i>Triticum aestivum</i> L.	England	Norfolk	2003	+	+
731	Fp-En6	<i>Triticum aestivum</i> L.	England	Hereford & Worcester	2003	+	+
721	Fp-En7	<i>Triticum aestivum</i> L.	England	Humberside	2003	+	-
720	Fp-En8	<i>Triticum aestivum</i> L.	England	Mersyside	2003	+	+
718	Fp-En9	<i>Triticum aestivum</i> L.	England	Northumberland	2003	+	+
563	Fp-En10	<i>Triticum aestivum</i> L.	England	Oxfordshire	2002	+	+
552	Fp-En11	<i>Triticum aestivum</i> L.	England	Surrey	2002	+	+

Table 1 (continued)

Isolate	Figures isolate code	Host	Geographic origin	City or region	Year of isolation	MAT 1	MAT 2
527	Fp-En12	<i>Triticum aestivum</i> L.	England	County Durham	2002	+	+
522	Fp-En13	<i>Triticum aestivum</i> L.	England	Cambridgeshire	2002	+	-
506	Fp-En14	<i>Triticum aestivum</i> L.	England	Somerset	2002	+	+
444	Fp-En15	<i>Triticum aestivum</i> L.	England	Hereford	2002	+	-
303	Fp-En16	<i>Triticum aestivum</i> L.	England	Kent	2001	+	+
300	Fp-En17	<i>Triticum aestivum</i> L.	England	Nottinghamshire	2001	+	+
295	Fp-En18	<i>Triticum aestivum</i> L.	England	Norfolk	2001	+	+
173	Fp-En19	<i>Triticum aestivum</i> L.	England	Hampshire	1998	+	+
141	Fp-En20	<i>Triticum aestivum</i> L.	England	Wiltshire	1998	+	+
F18	Fp-En21	<i>Triticum aestivum</i> L.	England	Cambridge	NN	+	-
F600	Fp-En22	<i>Triticum aestivum</i> L.	England	NN	NN	+	+
4/3084/1	Fp-En23	<i>Triticum aestivum</i> L.	England	Surrey	NN	+	+
4/3084/2	Fp-En24	<i>Triticum aestivum</i> L.	England	Surrey	NN	+	-
4/3084/3	Fp-En25	<i>Triticum aestivum</i> L.	England	Surrey	NN	+	+
4/3084/4	Fp-En26	<i>Triticum aestivum</i> L.	England	Surrey	NN	+	+
I14-99	Fp-It	<i>Triticum aestivum</i> L.	Italy	NN	1999	+	+
6025	Fp-F11	<i>Triticum aestivum</i> L.	Finland	Ylistaro	2006	+	+
6070	Fp-F12	<i>Avena sativa</i> L.	Finland	Maaninka	2006	+	+
6101	Fp-F13	<i>Avena sativa</i> L.	Finland	Rovaniemi	2006	-	+
6107	Fp-F14	<i>Triticum aestivum</i> L.	Finland	Mikkeli	2006	+	+
6129	Fp-F15	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Finland	Kymenlaakso	2006	-	+
6159	Fp-F16	<i>Avena sativa</i> L.	Finland	Varsinais-Suomi	2006	-	+
6191	Fp-F17	<i>Avena sativa</i> L.	Finland	Pirkanmaa	2006	+	+
6273	Fp-F18	<i>Secale cereale</i> L.	Finland	Piikio	2006	+	+
6326	Fp-F19	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Finland	Satakunta	2006	+	+
6947	Fp-F110	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Finland	Jokionen	2006	-	+
6085	Fp-F111	<i>Triticum aestivum</i> L.	Finland	Jokionen	2006	-	+
6183	Fp-F112	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Finland	North Ostrobothnia	2006	+	+
Fp0335	Fp-Sw1	<i>Triticum aestivum</i> L.	Switzerland	Solothurn	2003	-	+
Fp0338	Fp-Sw2	<i>Triticum aestivum</i> L.	Switzerland	Belpberg	2003	+	+
Fp0378	Fp-Sw3	<i>Triticum aestivum</i> L.	Switzerland	Seedorf	2003	-	+
Fp0503	Fp-Sw4	<i>Triticum aestivum</i> L.	Switzerland	Ruppoldsried	2005	+	+
3107	Fp-Po1	<i>Triticum aestivum</i> L.	Poland	NN	2003	+	-
6410	Fp-Po2	<i>Triticum aestivum</i> L.	Poland	NN	2006	+	-
6408	Fp-Po3	<i>Triticum aestivum</i> L.	Poland	NN	2006	+	-
61401	Fp-Po4	<i>Triticum aestivum</i> L.	Poland	NN	2006	+	-
6402	Fp-Po5	<i>Triticum aestivum</i> L.	Poland	NN	2006	-	+
60902	Fp-Po6	<i>Triticum aestivum</i> L.	Poland	NN	2006	+	-
F730	Fp-Gel	<i>Triticum aestivum</i> L.	Germany	NN	NN	+	-
F732	Fp-Ge2	<i>Triticum aestivum</i> L.	Germany	NN	NN	+	-
F733	Fp-Ge3	<i>Triticum aestivum</i> L.	Germany	NN	NN	+	-

Table 1 (continued)

Isolate	Figures isolate code	Host	Geographic origin	City or region	Year of isolation	MAT 1	MAT 2
P1	Fp-Ca1	<i>Triticum aestivum</i> L.	Canada	Manitoba	2008	+	-
P2	Fp-Ca2	<i>Triticum aestivum</i> L.	Canada	Saskatchewan	2008	-	+
P3	Fp-Ca3	<i>Triticum aestivum</i> L.	Canada	Saskatchewan	2008	-	+
P4	Fp-Ca4	<i>Triticum aestivum</i> L.	Canada	Saskatchewan	2008	+	-
P5	Fp-Ca5	<i>Triticum aestivum</i> L.	Canada	Saskatchewan	2008	-	+
P6	Fp-Ca6	<i>Triticum aestivum</i> L.	Canada	Saskatchewan	2008	-	+
P7	Fp-Ca7	<i>Triticum aestivum</i> L.	Canada	Saskatchewan	2008	+	+
P8	Fp-Ca8	<i>Triticum aestivum</i> L.	Canada	Saskatchewan	2008	-	+
P9	Fp-Ca9	<i>Triticum aestivum</i> L.	Canada	Saskatchewan	2008	-	+
P10	Fp-Ca10	<i>Triticum aestivum</i> L.	Canada	Saskatchewan	2008	-	+
P11	Fp-Ca11	<i>Triticum aestivum</i> L.	Canada	Saskatchewan	2008	+	-
P12	Fp-Ca12	<i>Triticum aestivum</i> L.	Canada	Saskatchewan	2008	-	+
P13	Fp-Ca13	<i>Triticum aestivum</i> L.	Canada	Saskatchewan	2008	+	-
P14	Fp-Ca14	<i>Triticum aestivum</i> L.	Canada	Saskatchewan	2008	+	-
P15	Fp-Ca15	<i>Triticum aestivum</i> L.	Canada	Saskatchewan	2008	+	+
P16	Fp-Ca16	<i>Triticum aestivum</i> L.	Canada	Saskatchewan	2008	+	+
P17	Fp-Ca17	<i>Triticum aestivum</i> L.	Canada	Saskatchewan	2008	+	+
P18	Fp-Ca18	<i>Triticum aestivum</i> L.	Canada	Alberta	2008	+	+
P19	Fp-Ca19	<i>Triticum aestivum</i> L.	Canada	Alberta	2008	+	+
P20	Fp-Ca20	<i>Triticum aestivum</i> L.	Canada	Alberta	2008	+	+
P21	Fp-Ca21	<i>Triticum aestivum</i> L.	Canada	Alberta	2008	+	+
P22	Fp-Ca22	<i>Triticum aestivum</i> L.	Canada	Alberta	2008	+	-
P23	Fp-Ca23	<i>Triticum aestivum</i> L.	Canada	Ontario	2008	+	+
GE1	Fp-Ge4	<i>Triticum aestivum</i> L.	Germany	Dedelow (Uckermark)	2001	+	+
GE2	Fp-Ge5	NN	Germany	Bonn	2001	-	+
GE3	Fp-Ge6	NN	Germany	Paulineae (Havelland)	2004	-	+
GE4	Fp-Ge7	NN	Germany	Paulineae (Havelland)	2004	-	+
GE5	Fp-Ge8	NN	Germany	Paulineae (Havelland)	2004	-	+
GE6	Fp-Ge9	NN	Germany	Paulineae (Havelland)	2004	-	+
GE7	Fp-Ge10	NN	Germany	Paulineae (Havelland)	2004	-	+
GE8	Fp-Ge11	NN	Germany	Paulineae (Havelland)	2004	+	-
GE9	Fp-Ge12	NN	Germany	Paulineae (Havelland)	2004	+	-
GE10	Fp-Ge13	NN	Germany	Paulineae (Havelland)	2004	+	-
GE11	Fp-Ge14	NN	Germany	Hohennauen (Havelland)	2004	+	-
GE12	Fp-Ge15	NN	Germany	Hohennauen (Havelland)	2004	+	-
GE13	Fp-Ge16	NN	Germany	Paulineae (Havelland)	NN	+	+
Bo101.1	Fp-Bel	NN	Belgium	NN	2008	+	-
Bo104.2	Fp-Be2	NN	Belgium	NN	2008	+	-
Bo203.2	Fp-Be3	NN	Belgium	NN	2008	+	+
B0207.1	Fp-Be4	NN	Belgium	NN	2008	+	-
Ve108.1	Fp-Be5	NN	Belgium	NN	2008	+	+

Table 1 (continued)

Isolate	Figures isolate code	Host	Geographic origin	City or region	Year of isolation	MAT 1	MAT 2
Zw316.2	Fp-Be6	NN	Belgium	NN	2008	+	-
Zw314.1	Fp-Be7	NN	Belgium	NN	2008	+	-
Zw313.1	Fp-Be8	NN	Belgium	NN	2008	+	+
Zw310.2	Fp-Be9	NN	Belgium	NN	2008	+	-
Zw307.2	Fp-Be10	NN	Belgium	NN	2008	+	-
Zw210.1	Fp-Be11	NN	Belgium	NN	2008	+	+
Zw116.1	Fp-Be12	NN	Belgium	NN	2008	+	+
Zw106.1	Fp-Be13	NN	Belgium	NN	2008	+	+
To108.1	Fp-Be14	NN	Belgium	NN	2008	+	+
To302.1	Fp-Be15	NN	Belgium	NN	2008	+	+
182/1468	Fp-Fr1	<i>Triticum aestivum</i> L.	France	East	2007	+	-
183/1469	Fp-Fr2	<i>Triticum aestivum</i> L.	France	East	2007	+	+
187/1473	Fp-Fr3	<i>Triticum aestivum</i> L.	France	East	2007	+	+
188/1474	Fp-Fr4	<i>Triticum aestivum</i> L.	France	Center/North	2007	+	+
192/1478	Fp-Fr5	<i>Triticum aestivum</i> L.	France	West	2007	+	+
194/1480	Fp-Fr6	<i>Triticum aestivum</i> L.	France	East	2007	+	-
195/1481	Fp-Fr7	<i>Triticum aestivum</i> L.	France	Center/North	2007	+	+
196/1482	Fp-Fr8	<i>Triticum aestivum</i> L.	France	West	2007	+	+
198/1484	Fp-Fr9	<i>Triticum aestivum</i> L.	France	Center/North	2007	+	+
199/1485	Fp-Fr10	<i>Triticum aestivum</i> L.	France	Center/North	2007	+	+
204/1490	Fp-Fr11	<i>Triticum aestivum</i> L.	France	Center/North	2007	+	+
205/1491	Fp-Fr12	<i>Triticum aestivum</i> L.	France	West	2007	+	+
206/1492	Fp-Fr13	<i>Triticum aestivum</i> L.	France	West	2007	+	+
I71	Fp-Fr14	<i>Triticum aestivum</i> L.	France	Center/North	2007	+	+
I72	Fp-Fr15	<i>Triticum aestivum</i> L.	France	Center/North	2007	+	+
I109	Fp-Fr16	<i>Zea mays</i> L.	France	Southwest	2007	+	+
I110	Fp-Fr17	<i>Zea mays</i> L.	France	Southwest	2007	+	+
I111	Fp-Fr18	<i>Zea mays</i> L.	France	Center/North	2007	+	+
I475	Fp-Fr19	<i>Triticum aestivum</i> L.	France	East	2007	+	-
I476	Fp-Fr20	<i>Triticum aestivum</i> L.	France	West	2007	+	-
I477	Fp-Fr21	<i>Triticum aestivum</i> L.	France	East	2007	+	+
TAPO21	Fp-Hu1	<i>Triticum aestivum</i> L.	Hungary	NN	1992	+	-
TAPO34	Fp-Hu2	<i>Triticum aestivum</i> L.	Hungary	NN	1992	-	+
LT03 08(57)	Fp-Lu1	<i>Brassica oleracea</i> L.	Luxembourg	Nothum	NN	+	-
LT03 35(80)	Fp-Lu2	<i>Brassica oleracea</i> L.	Luxembourg	Nothum	NN	+	-
LT14 05(491)	Fp-Lu3	<i>Zea mays</i> L.	Luxembourg	Kayl	NN	+	-
LT14 27(504)	Fp-Lu4	<i>Zea mays</i> L.	Luxembourg	Kayl	NN	+	-
LT15 16(525)	Fp-Lu5	<i>Zea mays</i> L.	Luxembourg	Dippach	NN	+	+
CA1	Fp-Ar31	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	Coronel Suarez	2004	+	-
CA2	Fp-Ar32	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	Necochea	2004	+	-
CA3	Fp-Ar33	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	25 de Mayo	2004	+	+

Table 1 (continued)

Isolate	Figures isolate code	Host	Geographic origin	City or region	Year of isolation	MAT 1	MAT 2
CA4	Fp-A134	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	25 de Mayo	2004	+	-
CA5	Fp-A135	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	Coronel Pringles	2004	+	-
CA6	Fp-A136	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	Guamini	2003	-	+
CA7	Fp-A137	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	Azul	2004	+	+
U1	Fp-Ur1	<i>Triticum aestivum</i> L.	Uruguay	Colonia	NN	+	-
U2	Fp-Ur2	<i>Triticum aestivum</i> L.	Uruguay	Soriano	NN	-	+
U3	Fp-Ur3	<i>Triticum aestivum</i> L.	Uruguay	San José	NN	+	+
U4	Fp-Ur4	<i>Triticum aestivum</i> L.	Uruguay	Río Negro	NN	+	-
U5	Fp-Ur5	<i>Triticum aestivum</i> L.	Uruguay	Paysandú	NN	+	+
F95	Fs-En	NN	England	NN	NN		
CC321	Fl-En	NN	England	NN	NN		

MICA isolates were kindly provided by H. González, University of Buenos Aires, Argentina

Isolates from Belgium were kindly provided by K. Audenaert, University of Gent, Department of Biological Sciences, Gent, Belgium

Isolates from Canada were kindly provided by R. Clear, Grain Research Laboratory, Canadian Grain Commission, Winnipeg, Canada

Isolates from England, Italy, and Germany (F730, F733) were kindly provided by P. Nicholson, John Innes Centre, Norwich, UK

Isolates from Finland were kindly provided by P. Parikka, MTT Agrifood Research Finland, Jokioinen, Finland

Isolates from France were kindly provided by C. Barreau, INRA-MycSA, France

Isolates from Germany were kindly provided by U. Korn, Leibniz-Centre for Agricultural Landscape Research, Müncheberg, Germany

Isolates from Hungary were kindly provided by L. Hornok, Agricultural Biotechnology Center, Szent István University, Gödöllő, Hungary

Isolates from Luxembourg were kindly provided by M. Pasquali, Centre of Research Public-Gabriel Lippmann, Belvaux, Luxembourg

Isolates from Poland were kindly provided by T. Kulik, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Poland

Isolates from Switzerland were kindly provided by S. Voegelisang, Research Station Agroscope Reckenholz-Tanikon, Zurich, Switzerland

Isolates from Uruguay were kindly provided by D. Pan, Laboratorio de Micología, Facultad de Ingeniería, Montevideo, Uruguay

Isolates from Brazil were kindly provided by E. Del Ponte, University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Fp Fusarium poae, *Fs Fusarium sporotrichioides*, *Fl Fusarium langsethiae*

DNA fragments by using the silver-staining protocol according to Bassam et al. (1991).

AFLP markers

Genomic DNA was completely digested with *EcoRI* and *MseI* (New England Biolabs, Hitchin, Hertfordshire, UK) and ligated to AFLP adapters at 37 °C for 5 h. The digested and ligated templates were diluted ten-fold with TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0 and 1 mM EDTA pH 8.0) 1× buffer before pre-amplification. The pre-amplified products were diluted 20-fold with TE 1× buffer and the PCR-AFLP reaction was performed by using two primer pair combinations (ECORI + AC/MSEI + CC and ECORI + AC/MSEI + CA). The AFLP-PCR was performed according to Vos et al. (1995) modified by Leslie and Summerell (2006). The products were separated and visualized according to the description for ISSR markers. The presence/absence of AFLP fragments ranging from 200 to 400 bp was analyzed.

Data analysis

ISSR and AFLP amplification products were scored manually and separately and recorded in a binary present/absent format. All amplification products were scored including those that were monomorphic. Cluster analysis based on Simple Matching coefficient was performed on the similarity matrix employing the “un-weighted pair group method using arithmetic means” (UPGMA) algorithm (Sneath and Sokal 1973).

NTSYSpc version 2.0 was used to perform these analyses (Rohlf 1998). An analysis of molecular variance (AMOVA) was performed to examine hierarchical population structure using distances between haplotypes. The distance chosen was a Euclidean metric equivalent to the number of differences between two individuals in their multilocus profile. Gene diversity (expected heterozygosity, H) (Nei 1987), or the average probability that two randomly chosen alleles at a locus are different, was estimated for the entire population, as well as for the two populations (American and European isolates), with the assumption that the populations are in Hardy–Weinberg equilibrium. Arlequin 2000 was the software used to perform these analyses (Schneider et al. 2000).

Comparison of similarity matrix between ISSR and AFLP was performed using the MXCOMP programme of the NTSYS-pc 2.0 (Rohlf 1998).

Mating type analysis

Conserved portions encoding the α and HMG box of the MAT-1 and MAT-2 idiomorphs respectively were amplified for the entire set of isolates according to Kerényi et al. (2004). The primer sequences were fusALPHAfor (5'-CGCCCTCTKAAYGSCCTTCATG-3') and fusALPHArev (5'-GGARTARACYTTAGCAATYAGG GC-3') to amplify MAT-1 and fusHMGfor (5'-CGACCT CCAAAYGCYTACAT-3') and fusHMGrev (5'-TGGG CGGTACTGGTARTCRGG-3') to amplify MAT-2. The PCR conditions were: 95 °C for 2 min, followed by 30 cycles consisting of 30 s at 94 °C, 30 s at 50 °C (for MAT-1) and 52 °C (for MAT-2), 5 min at 72 °C and a final elongation step at 72 °C for 10 min. Moreover, a multiplex PCR was done for the entire collection of isolates at 52 °C with the two set of primers at the same conditions described above. Amplification products were examined by electrophoresis in 1.5 % (w/v) agarose gels containing GelRed™ (Biotium; Hayward) at 80 V in 1× Trisborate-EDTA buffer for 1 h at room temperature and fragment sizes were estimated. To confirm that the amplified fragments correspond to MAT-1 and MAT-2 idiomorphs, amplification products from three isolates were purified by using the *PureLinK* PCR purification kit (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina) and sequenced, from both the sense and antisense ends of the amplification products by using Big Dye Terminator version 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, CA) in an Applied Biosystems Sequencer (ABI/Hitachi Genetic Analyzer 3130). One amplification product was purified from a MAT-1 isolate (MICA-T-06), another from a MAT-2 isolate (MICA-T-07) and two amplification products from an isolate with both MAT-1 and MAT-2 (LPS1a). All the sequences were compared, using BLASTN, with sequences in the NCBI database (Altschul et al. 1990). The MAT-2 sequences were deposited in the NCBI/GenBank database with accession numbers: KF876686-KF876687. The MAT-1 sequences were not submitted to GenBank because these sequences were less than 200 bp in length.

Results

Genetic variability determination

Genetic variability among *Fusarium poae* isolates was analyzed using ISSR and AFLP. Regarding ISSR, 68

amplification products were polymorphic among a total of 121 amplification products obtained from the DNA of *F. poae* isolates. Cluster analysis resolved 169 haplotypes among the 173 isolates analyzed with one cluster that included all the *F. poae* isolates and another cluster with *F. langsethiae* and *F. sporotrichioides*, at an arbitrary level of 44 % similarity (Fig. 1). ISSR partially resolved clusters of *F. poae* isolates based upon their country of origin. At 75 % of similarity, two clusters were resolved: cluster I which was resolved into two sub-clusters that were designated as Ia and Ib, and cluster II, which included 85 % of the total of *F. poae* analyzed.

Sub-cluster Ia contained most of the *F. poae* isolates from Belgium and 11 isolates from France, Canada and Germany while sub-cluster Ib included only isolates from Belgium and Germany. Cluster II was resolved into two sub-clusters designated as sub-cluster IIa and sub-cluster IIb, the latter of which only contained isolates from Uruguay. Sub-cluster IIa was resolved at 82 % of similarity into two sub-clusters designated as sub-cluster IIa1 and IIa2. The first of them included only isolates from Argentina, while sub-cluster IIa2 included most of the *F. poae* isolates obtained from different countries such as Argentina, England, France, Italy, Finland, Switzerland, Germany, Poland, Canada, Luxembourg and Hungary.

The *Fusarium poae* diversity was estimated to be 0.9998 (DS=0.0007). AMOVA results demonstrated that most of the variation resulted from genetic differences within (89.51 %) rather than from differences between American and European populations (10.49 %).

AFLP analysis (amplification products ranging from 200 to 400 bp) revealed that 30 were polymorphic among a total of 32 amplification products obtained from the DNA of *F. poae* isolates. Cluster analysis defined 150 haplotypes among all the *F. poae* isolates analyzed. The AFLP technique was not able to resolve *F. poae*, *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae* (Fig. 2). Unlike the dendrogram obtained from ISSR markers, AFLP was not able to partially group *F. poae* isolates according to geographical origin. Notably, cluster I was resolved at 54 % of similarity which included two *F. poae* isolates obtained from France, while cluster II was resolved into two sub-clusters designated as sub-cluster IIa and sub-cluster IIb which contained only two isolates from Belgium. Sub-cluster IIa was resolved into two sub-clusters designated sub-cluster IIa1 which contained the remaining isolates analyzed from different

countries plus *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae* throughout the dendrogram and sub-cluster IIa2 which contained *F. poae* isolates obtained from Belgium.

The population diversity was estimated to be 0.9982 (DS=0.0009). The most variability was found in differences within American and European isolates (98.58 %), compared with those found between groups (1.42 %), by using AMOVA analysis.

When a comparison of the similarity matrix obtained from ISSR and AFLP analysis was made, there was no correlation among the analyzed markers ($r=0.20$) and the results were analyzed individually.

Mating type analysis

One hundred seventy three *Fusarium poae* isolates were analyzed for the presence of MAT-1 or MAT-2 idiomorphs by single and multiplex PCRs (Fig. 3). A 200 bp fragment corresponding to the MAT-1 idiomorph was amplified from 58 isolates, a 260 bp fragment corresponding to MAT-2 idiomorph was amplified from 31 isolates and from the remaining 84 *F. poae* isolates, both MAT-1 and MAT-2 idiomorphs were amplified (Table 1). No relationship between country of origin and MAT amplifications was observed. The MAT-1 and MAT-2 sequences from selected isolates showed 100 % homology with MAT-1 (GenBank accession AJ535627) and MAT-2 (AJ535631) genes from *Fusarium poae*, respectively.

Discussion

Previous studies using ISSR and AFLP markers were conducted to assess genetic variability of *Fusarium* isolates. When Mishra et al. (2003) used ISSR markers to investigate *F. culmorum* genetic variability of isolates from England, Poland, Ireland, Russia, Netherlands, New Zealand, Australia, Germany, Canada, India, Denmark and USA, a high level of intraspecific variability was observed. Moreover, cluster analysis showed a general relationship between the *F. culmorum* isolates and their geographical origin (Mishra et al. 2003). The same authors then used ISSR to evaluate the genetic structure of *F. graminearum* isolates obtained from Alberta, Saskatchewan and Manitoba, Canada. They observed a high level of genetic variability but were unable to group the isolates according to geographical origins (Mishra et al. 2004).

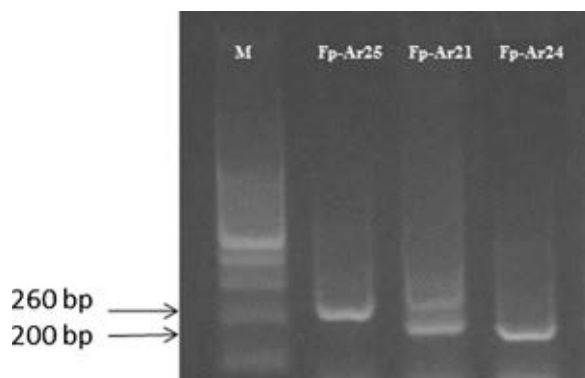


Fig. 3 MAT-1 and MAT-2 amplifications of representative *F. poae* obtained by multiplex PCR. The arrows indicate the 200 bp fragments corresponding to MAT-1 and 260 bp corresponding to MAT-2. M = molecular marker

Regarding the current study of genetic variability in *Fusarium poae*, using ISSR markers a high level of genetic variation was detected among *F. poae* isolates and a partial clustering was found between isolates and the country of origin. Moreover, most of the variation resulted from genetic differences within (89.51 %), rather than from differences between American and European populations (10.49 %). Similar results were reported by Kerényi et al. (1997), who determined the genetic relationship among 54 *F. poae* isolates obtained from Canada, New Zealand, South Africa, United Kingdom, Japan, Finland and Hungary by using RAPD. Cluster analysis revealed a moderate level of genetic variability (80 %) among the *F. poae* isolates analyzed. However, RAPD technique was not able to group the isolates according to their geographical origin (Kerényi et al. 1997). Moreover, Dinolfo et al. (2010), using ISSR markers, determined that 99 % of the *F. poae* isolates evaluated from Argentina and England were different and a partial clustering between isolates and geographical origin was found. Most differences were within (83 %) rather than between isolates from Argentina and England (17 %) (Dinolfo et al. 2010).

Another molecular marker widely used to study genetic variability in *Fusarium* species is AFLP, especially *F. graminearum*. Alvarez et al. (2011) and Astolfi et al. (2011) evaluated *F. graminearum* isolated from Argentina and Brazil, respectively grouping *F. graminearum* species complex isolates according to their corresponding lineage.

In our study, AFLP markers revealed a high level of variation among the *Fusarium poae* isolates (99 %). The differences within American and European populations

were higher (98.58 %) than those between populations (1.42 %). Moreover, no clustering between isolates and country of origin was found. Interestingly, unlike ISSR, AFLP markers were unable to discriminate between *F. poae* isolates and *F. langsethiae* and *F. sporotrichioides*. Likewise, Somma et al. (2010) determined a high level of genetic variability in 81 *F. poae* isolates obtained from wheat grown in northern Italy by using AFLP. However, no correlation between clusters and mycotoxin production was found (Somma et al. 2010).

Although both molecular markers used in our study detected a high level of diversity within *F. poae*, the correlation between the similarity matrix obtained by ISSR and AFLP was not significant ($r=0.20$). The genomic regions detected by the two markers and the number of primers used may affect the correlation among different marker systems.

In our study the MAT idiomorphs in different *Fusarium poae* isolates was assessed. Kerényi et al. (2004) demonstrated that MAT-1 or MAT-2 idiomorphs are present and expressed from the genome of eight *F. poae* isolates. Irzykowska et al. (2013) amplified both idiomorphs separately in the genome of 35 *F. culmorum* isolates from stem bases and roots of barley plants originating from different Polish provinces. Kerényi et al. (2004) evaluated the presence and expression of MAT-1 and MAT-2 not only in *F. poae*, but also in different *Fusarium* species with no known sexual stage, suggesting the possibility of a heterothallic condition and that these species may have a cryptic sexual cycle. Interestingly, most *F. poae* isolates (48.5 %) analyzed in our study contained both MAT-1 and MAT-2 idiomorphs; Cepni et al. (2012) reported the same observation in two *F. culmorum* isolates.

In conclusion, both ISSR and AFLP molecular marker systems detected a high level of intraspecific variation among *Fusarium poae* isolates. However, ISSR markers discriminated the *F. poae* population from *F. langsethiae* and *F. sporotrichioides* and produced a partial clustering relating the *F. poae* isolates and their geographical origin.

Different events such as mutations, parasexual reproduction, and migration could be responsible for the high variability found in *Fusarium poae* isolates (Kristler and Miao 1992). *F. poae* isolates with both MAT-1 and MAT-2 idiomorphs, will indicate that these isolates are potentially homothallic. However, more specific studies on *F. poae* MAT idiomorphs are needed to elucidate and to confirm if this result could play a role in *F. poae* variability.

Acknowledgments The authors thank Dr. Paul Nicholson for critical comments and suggestions on improving this manuscript. This research was supported by FONCYT PICT 110/2008 and 030/2011, CONICET and UNCPBA.

References

- Agarwal, M., Shrivastava, N., & Padh, H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*, *27*, 617–631.
- Akinsanmi, O. A., Backhouse, D., Simpfendorfer, S., & Chakraborty, S. (2008). Mycelial compatibility reactions of Australian *Fusarium graminearum* and *F. pseudograminearum* isolates compared with AFLP groupings. *Plant Pathology*, *57*, 251–261.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. P. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Evolution*, *215*, 403–410.
- Alvarez, C. L., Somma, S., Proctor, R. H., Stea, G., Mulé, G., Logrieco, A. F., et al. (2011). Genetic diversity in *Fusarium graminearum* from a major wheat-producing region of Argentina. *Toxins*, *3*, 1294–1309.
- Astolfi, P., Reynoso, M. M., Ramirez, M. L., Chulze, S. N., Alves, T. C. A., Tessmann, D. J., et al. (2011). Genetic populations structure and trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat in southern Brazil. *Plant Pathology*, *61*, 289–295.
- Audenaert, K., Van Broeck, R., Bekaert, B., De Witte, F., Heremans, B., Messens, K., et al. (2009). Fusarium head blight (FHB) in Flanders: population diversity, inter-species associations and DON contamination in commercial Winter wheat varieties. *European Journal of Plant Pathology*, *125*, 445–458.
- Bassam, B. J., Caetano-Anollés, G., & Gresshoff, P. M. (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, *196*, 80–83.
- Cepni, E., Tunali, B., & Gürel, F. (2012). Genetic diversity and mating types of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* originating from different agro-ecological regions in Turkey. *Journal of Basic Microbiology*, *52*, 1–9.
- Chandra Nayaka, S., Wulff, E. G., Udayashankar, A. C., Nandini, B. P., Niranjana, S. R., Mortensen, C. N., et al. (2011). Prospects of molecular markers in *Fusarium* species diversity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *90*, 1625–1639.
- Conde-Ferrández, L. (2007). El locus *mat* (*mating-type*) de los ascomicetos: su evolución, estructura y regulación. *Revista Iberoamericana de Micología*, *24*, 95–99.
- Dinolfo, M. I., Stenglein, S. A., Moreno, M. V., Nicholson, P., Jennings, P., & Salerno, G. L. (2010). ISSR markers detect high genetic variation among *Fusarium poae* isolates from Argentina and England. *European Journal of Plant Pathology*, *127*, 483–491.
- Irzykowska, L., Bocianowski, J., & Baturo-Ciesniewska, A. (2013). Association of mating-type with mycelium growth rate and genetic variability of *Fusarium culmorum*. *Central European Journal of Biology*, *8*, 701–711.
- Kerényi, Z., Táborhegyi, É., Pomázi, A., & Hornok, L. (1997). Variability amongst strains of *Fusarium poae* assessed by vegetative compatibility and RAPD polymorphism. *Plant Pathology*, *46*, 882–889.
- Kerényi, Z., Moretti, A., Waalwijk, C., Oláh, B., & Hornok, L. (2004). Mating type sequences in asexually reproducing *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*, 4419–4423.
- Kristler, H. C., & Miao, V. P. M. (1992). New models of genetic change in filamentous fungi. *Annual Review of Phytopathology*, *30*, 131–152.
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium laboratory manual*. Ames: Blackwell Publishing.
- Leslie, J. F., Anderson, L. L., Bowden, R. L., & Lee, Y.-W. (2007). Inter- and intra-specific genetic variation in *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology*, *119*, 25–32.
- Lindblad, M., Gidlund, A., Sulyok, M., Borjesson, T., Krska, R., Olsen, M., et al. (2013). Deoxynivalenol and other selected *Fusarium* toxins in Swedish wheat—occurrence and correlation to specific *Fusarium* species. *International Journal of Food Microbiology*. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.002.
- Manzo-Sánchez, G., James-Kay, A., Ortiz-Vázquez, E., & Simpson-Williamson, J. (2007). Desarrollo de mapas genéticos y físicos de hongos fitopatógenos: aplicaciones y perspectivas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, *25*, 54–65.
- Mishra, P. K., Fox, R. T., & Culham, A. (2003). Inter-simple sequence repeat and aggressiveness analyses revealed high genetic diversity, recombination and long-range dispersal in *Fusarium culmorum*. *Annals of Applied Biology*, *143*, 291–301.
- Mishra, P. K., Tewari, J. P., Clear, R. M., & Turkington, T. K. (2004). Molecular genetic variation and geographical structuring in *Fusarium graminearum*. *Annals of Applied Biology*, *145*, 299–307.
- Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia University Press. 512 pp.
- Nicholson, P., Chandler, E., Draeger, R. C., Gosman, N. E., Simpson, D. R., Thomsett, M., et al. (2003). Molecular tools to study epidemiology and toxicology of fusarium head blight of cereals. *European Journal of Plant Pathology*, *109*, 691–703.
- Ouellet, T., & Seifert, K. A. (1993). Genetic characterization of *Fusarium graminearum* strains using RAPD and PCR amplification. *Phytopathology*, *83*, 1003–1007.
- Parry, D. W., & Nicholson, P. (1996). Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. *Plant Pathology*, *45*, 383–391.
- Qu, B., Li, H. P., Zhang, J. B., Xu, Y. B., Huang, T., Wu, A. B., et al. (2008). Geographic distribution and genetic diversity of *Fusarium graminearum* and *F. asiaticum* on wheat spikes throughout China. *Plant Pathology*, *57*, 15–24.
- Rohlf, F. I. (1998). *NTSYSpc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.0. Applied biostatistics*. New York: Exeter Software.
- Schneider, S., Roessli, D., & Excoffier, L. (2000). *Arlequin. Version 2.0: A software for populations genetic data analysis*. Switzerland: University of Geneva.
- Sneath, P. H., & Sokal, R. R. (1973). *Numerical taxonomy*. San Francisco: Freeman.

- Somma, S., Alvarez, C., Ricci, V., Ferracane, L., Ritieni, A., Logrieco, A., et al. (2010). Trichothecene and beauvericin mycotoxin production and genetic variability in *Fusarium poae* isolated from wheat kernels from northern Italy. *Food Additives and Contaminants*, *27*, 729–737.
- Stenglein, S. A., & Balatti, P. A. (2006). Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Argentina as revealed by pathogenic and molecular markers. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *68*, 158–167.
- Stenglein, S. A., Dinolfo, M. I., Bongiorno, F., & Moreno, M. V. (2012). Response of wheat (*Triticum* spp.) and barley (*Hordeum vulgare*) to *Fusarium poae*. *Agrociencia*, *46*, 299–306.
- Su, H., Wang, L., Liu, L., Chi, X., & Zhang, Y. (2008). Use of inter-simple sequence repeat markers to develop strain-specific SCAR markers for *Flammulina velutipes*. *Journal of Applied Genetics*, *49*, 233–235.
- Vogelgsang, S., Enkerli, J., Jenny, E., Roffler, S., & Widmer, F. (2010). Characterization of *Fusarium poae* microsatellite markers on strains from Switzerland and other countries. *Journal of Phytopathology*, *159*, 197–200.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., et al. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, *23*, 4407–4414.
- Yun, S.-H., Arie, T., Kaneko, I., Yoder, O. C., & Turgeon, B. G. (2000). Molecular organization of mating type loci in heterothallic, homothallic, and asexual Gibberella/Fusarium species. *Fungal Genetics and Biology*, *31*, 7–20.



**SRAP as an informative molecular marker to study the
Fusarium poae genetic variability**

Journal:	<i>Journal of Phytopathology</i>
Manuscript ID:	JPHY-14-011
Manuscript Type:	Short Communication
Date Submitted by the Author:	09-Jan-2014
Complete List of Authors:	Dinolfo, Maria Castañares, Eliana Stenglein, Sebastian; Fac. Agronomia de Azul, BIOLAB
Keywords:	Fusarium poae, variability, SRAP

SCHOLARONE™
Manuscripts

Review

1
2
3 1 **SRAP to study the *Fusarium poae* genetic variability**
4

5 2
6
7

8 3 *Laboratorio de Biología Funcional y Biotecnología (BIOLAB-Azul)-INBIOTEC-*
9
10 4 *Facultad de Agronomía de Azul-UNCPBA*
11
12

13 5
14

15
16 6 **SRAP as an informative molecular marker to study the *Fusarium poae* genetic**
17
18 7 **variability**
19

20 8
21
22

23 9 María Inés Dinolfo¹, Eliana Castañares¹, Sebastián Alberto Stenglein^{1,2}
24
25

26 10
27

28 11 Authors address: ¹Laboratorio de Biología Funcional y Biotecnología (BIOLAB-Azul)-
29

30 12 INBIOTEC-Facultad de Agronomía de Azul-UNCPBA, CC 47, 7300, Azul, Buenos
31

32 13 Aires, Argentina; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
33

34 14 (CONICET), Argentina; ² Cátedra de Microbiología. Facultad de Agronomía de Azul,
35

36 15 UNCPBA, Av. de Italia # 780, 7300 Azul, Buenos Aires, Argentina.
37
38

39 16
40
41

42 17 E-mail: stenglein@faa.unicen.edu.ar
43
44

45 18
46
47

48
49 19 **Keywords:** *Fusarium poae*, genetic variability, Sequence-related amplified
50
51 20 polymorphism.
52

53 21
54
55

56 22
57
58
59
60

1 Abstract

2 *Fusarium poae* is one of the *Fusarium* species isolated from grains associated with
3 Fusarium Head Blight (FHB), whose occurrence has increased in the last years. In this
4 study, a total of 105 *F. poae* isolates from Argentina, Belgium, Canada, England,
5 Finland, France, Germany, Hungary, Italy, Luxembourg, Poland, Switzerland and
6 Uruguay were evaluated by using sequence-related amplified polymorphism (SRAP) to
7 analyze the capacity of this molecular marker to evaluate the *F. poae* genetic variability.
8 The molecular analysis showed high intraspecific variability within *F. poae* isolates and
9 a partial relationship was revealed between variability and the host/geographic origin.
10 Analysis of molecular variance (AMOVA) indicated a high genetic variability in the *F.*
11 *poae* collection, with most of the genetic variability resulting from differences within,
12 rather than between American and European populations. The analysis of sequenced
13 SRAP fragments targets into hypothetical proteins from different *Fusarium* species
14 showing that the SRAP technique not only allows studying *F. poae* genetic variability,
15 but also targets coding regions into the *F. poae* genome. To our knowledge this is the
16 first report on genetic variability of *F. poae* using SRAP technique and also
17 demonstrates the efficacy of this molecular marker to amplify open reading frames in
18 fungus.

19

20 Introduction

21 Fusarium head blight (FHB) is one of the most economically important diseases
22 affecting the production of wheat, barley and other small grains worldwide, which
23 causes yield losses and reduces seed quality not only by the fungus presence, but also
24 by mycotoxin production (Kulik et al. 2007). Some *Fusarium* species such as *Fusarium*

1
2
3 1 *graminearum*, *F. avenaceum*, *F. culmorum* and *F. poae* have been isolated from grains
4
5 2 with FHB symptoms (Xu et al. 2008; Kulik et al. 2011).
6
7

8 3 Although *F. graminearum* is the most frequently isolated species, in the last few years a
9
10 4 gradual increase in incidence of *F. poae* has been reported (Infantino et al. 2012; Lenc
11
12 5 2011; Pereyra and Dill-Macky 2010; Stenglein et al. 2012). *F. poae* is a cosmopolitan
13
14 6 pathogen able to synthesize mycotoxins including enniatins, beauvericin and type A (T-
15
16 7 2, HT2, diacetoxyscirpenol) and B (nivalenol) trichothecenes with recognized cytotoxic,
17
18 8 neurotoxic and carcinogenic activities (Gutleb et al. 2002; Meca et al. 2010; Thrane et
19
20 9 al. 2004).
21
22
23

24 10 Several studies have been developed to analyze intraspecific variability within
25
26 11 *Fusarium poae* by using different available tools such as vegetative compatibility tests
27
28 12 (VCG), random amplified polymorphic DNA (RAPD), inter simple sequence repeats
29
30 13 (ISSR), amplified fragment length polymorphisms (AFLP) and microsatellites (Dinolfo
31
32 14 et al. 2010; Kerényi et al. 1997; Somma et al. 2010; Vogelgsang et al. 2010). Moreover,
33
34 15 DNA sequences derived from the ribosomal internal transcribed spacer regions (ITS),
35
36 16 partial sequences of the ribosomal intergenic spacer region (IGS), the β -tubulin,
37
38 17 translational elongation factor-1 alpha (EF-1 α) genes and mitochondrial small subunit
39
40 18 rDNA (*mtSSU*) have been used to study *F. poae* genetic variability and phylogenetic
41
42 19 analyses (Alberti et al. 2011; Knutsen et al. 2004; Schmidt et al. 2004; Stenglein et al.
43
44 20 2010).
45
46
47
48

49 21 A molecular marker called sequence-related amplified polymorphism (SRAP) was
50
51 22 developed not only to analyze genetic variability, but also to amplify open reading
52
53 23 frames (ORFs). Firstly, SRAP has been developed to fingerprint and target coding
54
55 24 sequences in the *Brassica oleracea* genome (Li and Quiros 2001). Later, some
56
57
58
59
60

1
2
3 1 researchers have adopted this molecular marker to analyze genetic variability in some
4
5 2 fungus species such as *Puccinia striiformis*, *Ganoderma* sp., and *F. culmorum*. In these
6
7 3 studies the authors concluded that SRAP is an efficient technique to identify
8
9 4 polymorphisms useful to evaluate variability among individuals (Irzykowska et al.
10
11 5 2013; Pasquali et al. 2010; Sun et al. 2006).

12
13
14 6 Briefly, this molecular marker uses two primers with 17 or 18 nucleotides long, where
15
16 7 the first ten are nonspecific, followed by the sequence CCGG plus three nonspecific
17
18 8 nucleotides in the forward primer, with the aim to target exon regions, and AATT plus
19
20 9 three nonspecific nucleotides in the reverse primer to target promoters and/or intron
21
22 10 regions. The forward primer is based on the fact that exons are GC-rich regions (43%-
23
24 11 44%) (Li and Quiros 2001). However, there are conserved among individuals showing
25
26 12 low polymorphism levels. To solve this, the reverse primer is based on promoters and
27
28 13 introns that are AT-rich regions showing high polymorphic levels (Li and Quiros 2001).
29
30 14 SRAP is a technique that allows random amplification of coding regions in genome
31
32 15 with the possibility of isolating and sequencing fragments to target ORFs. The aims of
33
34 16 this work were to test the SRAP molecular marker for *Fusarium poae* genetic variability
35
36 17 studies and to assess the efficacy of this technique to amplify ORFs by sequencing some
37
38 18 fragments selected randomly.
39
40
41
42
43
44
45
46
47

48

49 **Materials and Methods**

50
51 21 A total of 105 monosporic *Fusarium poae* isolates from different countries and hosts
52
53 22 and a *F. sporotrichioides* isolate (F95) used as out group were evaluated (Table1). All
54
55 23 *F. poae* isolates were previously identified by a species-specific PCR reaction according
56
57 24 to Parry and Nicholson (1996). The isolates were conserved in Spezieller
58
59
60

1
2
3 1 Nährstoffarmer Agar (SNA) according to Leslie and Summerell (2006). The genomic
4
5 2 DNA from all *Fusarium* isolates was extracted using a cetyltrimethylammonium
6
7 3 bromide (CTAB) method according to Stenglein and Balatti (2006). The quality of
8
9 4 fungus DNA was examined by electrophoresis in 0.8% (w/v) agarose gels containing
10
11 5 GelRed™ (Biotium, Hayward, USA) at 80 V in 1X Trisborate-EDTA buffer for 3 h at
12
13 6 room temperature. The DNA was visualized under UV light. The DNA concentration
14
15 7 was estimated with a fluorometer (Qubit™-Invitrogen, Buenos Aires, Argentina).

16
17
18
19 8 SRAP amplifications were performed with eight randomly selected primer
20
21 9 combinations: SRAP1F/SRAP1R, SRAP1F/SRAP3R, SRAP2F/SRAP1R,
22
23 10 SRAP2F/SRAP2R, SRAP2F/SRAP3R, SRAP3F/2R, SRAP3F/SRAP1R,
24
25 11 SRAP3F/SRAP3R that were selected based on the results of an initial screening of nine
26
27 12 primer combinations against 32 representative *F. poae* isolates (Table 2).

28
29
30 13 Polymerase chain reactions (PCR) were carried out using 10-25 ng of DNA in a total
31
32 14 volume of 25 µl containing 10 X reaction buffer, 0.5 µM of each primer, 200 µM of
33
34 15 each dNTP (Inbio-Highway, Tandil, Argentina), 2.5 mM MgCl₂ and 1.25 U of Taq
35
36 16 DNA polymerase (Inbio-Highway, Tandil, Argentina). DNA amplifications were
37
38 17 performed in a XP Thermal cycler (Bioer Technology Co.) with the following program:
39
40 18 an initial denaturing at 94°C for 5 min followed by five cycles at 94°C for 2 min
41
42 19 (denaturing), 35°C for 1 min (annealing) and 72°C for 1 min (extension). Then, the
43
44 20 annealing temperature was raised to 50°C for other 35 cycles with a final extension at
45
46 21 72°C for 10 min. Each reaction was performed at least twice. The amplification
47
48 22 products were separated by vertical gel electrophoresis using 4% polyacrilamide DNA
49
50 23 sequence gel with 5 M urea. Gel fixing, staining and developing were followed to
51
52 24 visualize the DNA fragments by using the silver-staining protocol according to Bassam
53
54 25 et al. (1991). Presence or absent of SRAP fragments were scored manually and recorded
55
56
57
58
59
60

1 in a binary, present/absent format considering fragments with the same size as
2 homologous. Cluster analysis based on Simple Matching coefficient and an analysis of
3 molecular variance (AMOVA) were performed as described Dinolfo et al. (2010).

4 A total of eight SRAP fragments, four of them polymorphic and four monomorphic,
5 were cut from the gels and introduced individually into 1.5 ml sterile tubes. Fifty
6 microliters of distilled water were added into the tubes and the fragments were broken
7 with the help of tips. The final solution was heated at 95°C for 5 min by using a dry
8 heating block (Major Science Co., LTD). Finally, 5 µl of this final solution were taken
9 to carry out a new PCR-SRAP reaction with the conditions described above. The SRAP
10 fragments were purified using the *PureLink*[™] Quick Gel Extraction & PCR
11 Purification Combo Kit (Invitrogen, Life Technologies, Argentina). DNA sequencing,
12 from both the sense and antisense ends of the fragments was carried out using Big Dye
13 Terminator version 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems,
14 CA) in an Applied Biosystems Sequencer (ABI / Hitachi Genetic Analyzer 3130). The
15 sequences obtained were compared with the FUSARIUM ID database (Geiser et al.
16 2004).

18 **Results and Discussion**

19 *Fusarium poae* is an important pathogen whose occurrence has increased in the last years
20 (Infantino et al. 2012; Lenc 2011; Pereyra and Dill-Macky 2010; Stenglein et al. 2012).
21 Previous studies on the genetic variability of *F. poae* have been developed (Dinolfo et
22 al. 2010; Kerényi et al. 1997; Liu and Sundheim 1996). In our study, the SRAP
23 technique generated a total of 117 fragments among 105 isolates evaluated, of which 96
24 (82.05%) were polymorphic among all the *F. poae* isolates, showing that SRAP
25 markers are an useful tool to analyze the *F. poae* genome.

1 Cluster analysis of SRAP data defined 104 haplotypes among the 105 *Fusarium poae*
2 isolates analyzed which were partially grouped according to their country of origin
3 and/or their host (Fig. 1). Nevertheless, the majority of Argentinean isolates were
4 grouped into one cluster as well as those from Uruguay, Luxembourg and France (Fig.
5 1). The other isolates were distributed throughout the dendogram. This result is in
6 agreement with the result of Kerényi et al. (1997) who reported partial correlation
7 between the VCG and RAPD and the host/geographic origins of *F. poae* isolates
8 (Kerényi et al. 1997). Vogelgsang et al. (2010) analyzed *F. poae* from Switzerland,
9 Canada, Germany, Denmark, Finland, Hungary, Norway, Poland, Russia and the United
10 States of America by using microsatellite markers and not grouping was reported into
11 different clusters (Vogelgsang et al. 2010). Moreover, Dinolfo et al. (2010) evaluated *F.*
12 *poae* isolates from Argentina and England by using ISSR and observed no relationship
13 between clusters and the country of origin/host. In the same year, Somma et al. (2010)
14 evaluated 81 *F. poae* isolates from Italy by using AFLP and newly not relationship
15 between variability and other well-characterized traits such as mycotoxin profile was
16 found (Somma et al. 2010).

17 Diversity of the entire population was estimated to be 0.998 ($SD=0.018$). According to
18 this, Dinolfo et al. (2010) and Somma et al. (2010) observed a high level of genetic
19 diversity in the *F. poae* isolates analyzed by using ISSR (99%) and AFLP (61%),
20 respectively.

21 The AMOVA ($\Phi_{ST}=0.174$; $P<0.001$) indicated that most of the variation resulted from
22 genetic differences within (90.83%), rather than between American and European
23 populations (9.17%). Dinolfo et al. (2010) indicated that the differences within groups
24 were 83%, while that the differences between Argentinean and English isolates were
25 17%. However, similar values in differences between (70%) and within groups (70%)

1 were observed in Italian *F. poae* isolates (Somma et al. 2010). These differences could
2 be attributed not only in the technique used in each study, but also that in the first one,
3 the analysis was realized between Argentinean and England groups and in the last, only
4 Italian isolates were evaluated.

5 The GC content of the total SRAP sequenced fragments was over 44.71% (data not
6 shown), which indicates a high possibility to fall into GC-rich regions such as ORFs.

7 The BLASTx analysis found that the total of the sequences analyzed were homologous
8 with hypothetical proteins of different *Fusarium* species, showing that SRAP markers
9 are able to amplify coding regions in the *F. poae* genome (Table 3). Moreover,
10 hypothetical proteins from polymorphic fragments could demonstrate a differential
11 protein expression among individuals.

12 Although there are some reports that study fungus genetic variability using the SRAP
13 markers (Irzykowska et al. 2013; Pasquali et al. 2010; Sun et al. 2006), to our
14 knowledge, this is the first work that sequences SRAP fragments to corroborate the
15 efficacy to this molecular marker to amplify ORF.

16 In summary, our results indicated that the SRAP technique allows detecting a high
17 polymorphism level. Moreover, SRAP marker is a relatively cheap, easy, fast and
18 reliable method to generate hundreds of informative genetic markers in comparing with
19 other available molecular markers such as AFLP. More specifically, SRAP allows
20 analyzing the genetic variability and amplifying coding regions in *Fusarium poae*.

21

22 **Acknowledgments**

23 This work was supported by FONCY-SECYT PRH32-PICT 110/2008, PICT 030/2011,
24 CONICET and UNCPBA.

25

1
2
3 **1 References**
4

- 5
6 2 Alberti I, Prá DM, Tonti S, Montanari M, Prodi A, Pancaldi D. (2011) Biomolecular
7
8 3 characterization of *Fusarium poae* strains isolated from durum wheat in central
9
10 4 Italy. *Plant Breeding Seed Sci* 64:153-161.
11
12
13 5 Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM. (1991) Fast and sensitive silver staining
14
15 6 of DNA in polyacrilamide gels. *Ann Biochem* 196:80-83.
16
17
18 7 Dinolfo MI, Stenglein SA, Moreno MV, Nicholson P, Jennings P, Salerno GL. (2010)
19
20 8 ISSR markers detect high genetic variation among *Fusarium poae* isolates from
21
22 9 Argentina and England. *Eur J Plant Pathol* 127:483-491.
23
24
25
26 10 Geiser DM, del Mar Jimenez-Casco M, Kang S, Makalowska I, Veeraghavan N, Ward
27
28 11 TJ, Zhang N, Kuldau GA, O'Donnell K. (2004) FUSARIUM-ID v.1.0: A DNA
29
30 12 sequence database for identifying *Fusarium*. *Eur J Plant Pathol* 110:473-480.
31
32
33 13 Gutleb AC, Morrison E, Murk AJ. (2002) Cytotoxicity assays for mycotoxins produced
34
35 14 by *Fusarium* strains: a review. *Environ Toxicol Phar* 11:309-320.
36
37
38 15 Infantino A, Santori A, Shah DA. (2012) Community structure of the *Fusarium*
39
40 16 complex on wheat seed in Italy. *Eur J Plant Pathol* 132:499-510.
41
42
43
44 17 Irzykowska L, Bocianowski J, Baturó-Ciesniewska A. (2013) Association of mating-
45
46 18 type with mycelium growth rate and genetic variability of *Fusarium culmorum*.
47
48 19 *Cent Eur J Biol* 8:701-711.
49
50
51 20 Kerényi Z, Táborhegyi É, Pomázi A, Hornok L. (1997) Variability amongst strains of
52
53 21 *Fusarium poae* assessed by vegetative compatibility and RAPD polymorphism.
54
55 22 *Plant Pathol* 46:882-889.
56
57
58
59
60

- 1
2
3 1 Knutsen AK, Torp M, Holst-Jensen A. (2004) Phylogenetic analyses of the *Fusarium*
4
5 2 *poae*, *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae* species complex
6
7 3 based on partial sequences of the translation elongation factor-1 alpha gene. Int J
8
9 4 Food Microbiol 95:287-295.
10
11
12 5 Kulik T, Pszczółkowska A, Fordonski G, Olszewski J. (2007) PCR approach based on
13
14 6 the *esyn1* gene for the detection of potential enniatin-producing *Fusarium* species.
15
16 7 Int J Food Microbiol 116:319-324.
17
18
19 8 Kulik T, Jestoi M, Okorski A. (2011) Development of TaqMan assays for the
20
21 9 quantitative detection of *Fusarium avenaceum*/*Fusarium tricinctum* and *Fusarium*
22
23 10 *poae esyn1* genotypes from cereal grain. FEMS Microbiol Lett 314:49-56.
24
25
26
27 11 Lenc L. (2011) *Fusarium* Head blight and *Fusarium* spp. occurring on grain of spring
28
29 12 wheat in an organic farming system. Phytopathology 62:31-39.
30
31
32
33 13 Leslie JF, Summerell BA. (2006) *The Fusarium laboratory manual*. Iowa, USA:
34
35 14 Blackwell Publishing. 388 pp.
36
37
38 15 Li G, Quiros CF. (2001) Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new
39
40 16 marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and
41
42 17 gene tagging in *Brassica*. Theor Appl Genet 103:455-461.
43
44
45 18 Liu WZ, Sundheim L. (1996) Nitrate nonutilizing mutants and vegetative compatibility
46
47 19 groups in *Fusarium poae*. Fungal Genet Biol 20:12-17.
48
49
50 20 Meca G, Soriano JM, Gaspari A, Ritieni A, Moretti A, Mañes J. (2010) Antifungal
51
52 21 effects of the bioactive compounds enniatins A, A1, B, B1. Toxicon 56:480-485.
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 1 Parry DW, Nicholson P. (1996) Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae*
4
5 2 in wheat. *Plant Pathol* 45:383-391.
6
7 3 Pasquali M, Komjati H, Lee D, Bayles R. (2010) SRAP technique efficiently generates
8
9 4 polymorphisms in *Puccinia striiformis* isolates. *J Phytopathol* 158:708-711.
10
11
12 5 Pereyra S, Dill-Macky R. (2010) *Fusarium* species recovered from wheat and barley
13
14 6 grains in Uruguay, pathogenicity and deoxynivalenol content. *Agrociencia*
15
16 7 Uruguay 14:33-44.
17
18
19
20 8 Schmidt H, Adler A, Holst-Jensen A, Klemsdal SS, Logrieco A, Mach RL, Nirenberg
21
22 9 HI, Thrane U, Torp M, Vogel RF, Yli-Mattila T, Niessen L. (2004) An integrated
23
24 10 taxonomic study of *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae* and *Fusarium*
25
26 11 *sporotrichioides* based on the use of composite datasets. *Int J Food Microbiol*
27
28 12 95:341-349.
29
30
31
32 13 Somma S, Alvarez C, Ricci V, Ferracane L, Ritieni A, Logrieco A, Moretti A. (2010)
33
34 14 Trichothecene and beauvericin mycotoxin production and genetic variability in
35
36 15 *Fusarium poae* isolated from wheat kernels from northern Italy. *Food Addit*
37
38 16 *Contam* 27:729-737.
39
40
41
42 17 Stenglein SA, Balatti PA. (2006) Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in
43
44 18 Argentina as revealed by pathogenic and molecular markers. *Physiol Mol Plant P*
45
46 19 68:158–167.
47
48
49 20 Stenglein SA, Rodriguero MS, Chandler E, Jennings P, Salerno GL, Nicholson P.
50
51 21 (2010) Phylogenetic relationships of *Fusarium poae* based on EF-1 α and *mtSSU*
52
53 22 sequences. *Fungal Biol* 114:96-106.
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 1 Stenglein SA, Dinolfo MI, Bongiorno F, Moreno MV. (2012) Response of wheat
4
5 2 (*Triticum* spp.) and barley (*Hordeum vulgare*) to *Fusarium poae*. *Agrociencia*
6
7 3 46:299-306.
8
9
10 4 Sun S-J, Gao W, Lin S-Q, Zhu J, Xie B-G, Lin Z-B. (2006) Analysis of genetic
11
12 5 diversity in *Ganoderma* population with a novel molecular marker SRAP. *Appl*
13
14 6 *Microbiol Biot* 72:537-543.
15
16
17 7 Thrane U, Adler A, Clasen P-E, Galvano F, Langseth W, Lew H, Logrieco A, Nielsen
18
19 8 KF, Ritieni A. (2004) Diversity in metabolite production by *Fusarium*
20
21 9 *langsethiae*, *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides*. *Int J Food Microbiol*
22
23 10 95:257-266.
24
25
26 11 Vogelgsang S, Enkerli J, Jenny E, Roffler S, Widmer F. (2010) Characterization of
27
28 12 *Fusarium poae* microsatellite markers on strains from Switzerland and other
29
30 13 countries. *J Phytopathol* 159:197-200.
31
32
33 14 Xu X-M, Parry DW, Nicholson P, Thomsett MA, Simpson D, Edwards SG. (2008)
34
35 15 Relationship between the fungal complex causing *Fusarium* head blight pathogens
36
37 16 and their associated mycotoxins. *Eur J Plant Pathol* 120:21-34.
38
39
40
41
42 17
43
44
45 18
46
47
48 19
49
50
51 20
52
53
54 21
55
56
57 22
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 **Fig. 1** Cluster analysis dendrogram of the 105 *F. poae* isolates obtained by SRAP

2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

Table 1 *Fusarium* isolates used in this study

Isolate code	Host	Geographic origin	City or region	Year of isolation
HTA1a	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Argentina	Tres Arroyos	2007
HBe1a	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Argentina	Belloq	2007
HBig1a	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Argentina	Bigand	2007
TSS2a	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	Sancti Spiritu	2006
THo1b	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	Los Hornos	2005
TPu1a	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	Puán	2005
TSa1a	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	Saladillo	2007
TJu1a	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	Junín	2007
MICA-T-01	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	Bragado	NN
MICA-T-06	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	San Antonio de Areco	NN
MICA-A-01	<i>Avena sativa</i> L.	Argentina	Gualeguaychú	NN
MICA-A-02	<i>Avena sativa</i> L.	Argentina	Gualeguaychú	NN
MICA-A-03	<i>Avena sativa</i> L.	Argentina	Urdinarrain	NN
MICA-A-04	<i>Avena sativa</i> L.	Argentina	Urdinarrain	NN
MICA-A-05	<i>Avena sativa</i> L.	Argentina	Basavilbaso	NN
CA1	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	Coronel Suarez	2004
CA2	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	Necochea	2004
CA3	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	25 de Mayo	2004
CA4	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	25 de Mayo	2004
CA5	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	Coronel Pringles	2004
CA6	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	Guamini	2003
CA7	<i>Triticum aestivum</i> L.	Argentina	Azul	2004
887	<i>Triticum aestivum</i> L.	United Kingdom	W. Yorshire	2006
736	<i>Triticum aestivum</i> L.	United Kingdom	Norfolk	2003
731	<i>Triticum aestivum</i> L.	United Kingdom	Hereford & Worcester	2003
721	<i>Triticum aestivum</i> L.	United Kingdom	Humberside	2003
718	<i>Triticum aestivum</i> L.	United Kingdom	Northumberland	2003
527	<i>Triticum aestivum</i> L.	United Kingdom	County Durham	2002
522	<i>Triticum aestivum</i> L.	United Kingdom	Cambridgeshire	2002
506	<i>Triticum aestivum</i> L.	United Kingdom	Somerset	2002

444	<i>Triticum aestivum</i> L.	United Kingdom	Hereford	2002
303	<i>Triticum aestivum</i> L.	United Kingdom	Kent	2001
295	<i>Triticum aestivum</i> L.	United Kingdom	Norfolk	2001
F18	<i>Triticum aestivum</i> L.	United Kingdom	Cambridge	NN
4/3084/1	<i>Triticum aestivum</i> L.	United Kingdom	Surrey	NN
4/3084/4	<i>Triticum aestivum</i> L.	United Kingdom	Surrey	NN
114-99	<i>Triticum aestivum</i> L.	Italy	NN	1999
6025	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Finland	Ylistaro	2006
6107	<i>Triticum aestivum</i> L.	Finland	Mikkeli	2006
6159	<i>Avena sativa</i> L.	Finland	Varsinais-Suomi	2006
6191	<i>Avena sativa</i> L.	Finland	Pirkanmaa	2006
6326	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Finland	Satakunta	2006
6183	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Finland	North Ostrobothnia	2006
6947	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Finland	Jokionen	2006
Fp0335	<i>Triticum aestivum</i> L.	Switzerland	Solothurn	2003
Fp0378	<i>Triticum aestivum</i> L.	Switzerland	Seedorf	2003
3107	<i>Triticum aestivum</i> L.	Poland	NN	2003
6402	<i>Triticum aestivum</i> L.	Poland	NN	2006
6408	<i>Triticum aestivum</i> L.	Poland	NN	2006
6410	<i>Triticum aestivum</i> L.	Poland	NN	2006
60902	<i>Triticum aestivum</i> L.	Poland	NN	2006
F730	<i>Triticum aestivum</i> L.	Germany	NN	NN
F733	<i>Triticum aestivum</i> L.	Germany	NN	NN
P2	<i>Triticum aestivum</i> L.	Canada	Saskatchewan	2008
P5	<i>Triticum aestivum</i> L.	Canada	Saskatchewan	2008
P7	<i>Triticum aestivum</i> L.	Canada	Saskatchewan	2008
P9	<i>Triticum aestivum</i> L.	Canada	Saskatchewan	2008
P12	<i>Triticum aestivum</i> L.	Canada	Saskatchewan	2008
P15	<i>Triticum aestivum</i> L.	Canada	Saskatchewan	2008
P18	<i>Triticum aestivum</i> L.	Canada	Alberta	2008

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1	P20	<i>Triticum aestivum</i> L.	Canada	Alberta	2008
2	P21	<i>Triticum aestivum</i> L.	Canada	Alberta	2008
3	P23	<i>Triticum aestivum</i> L.	Canada	Ontario	2008
4	GE1	<i>Triticum aestivum</i> L.	Germany	Dedelow (Uckermark)	2001
5	GE4	NN	Germany	Paulineae (Havelland)	2004
6	GE5	NN	Germany	Paulineae (Havelland)	2004
7	GE9	NN	Germany	Paulineae (Havelland)	2004
8	GE10	NN	Germany	Paulineae (Havelland)	2004
9	GE12	NN	Germany	Hohennauen (Havelland)	2004
10	GE13	NN	Germany	Paulineae (Havelland)	NN
11	BO101.1	NN	Belgium	NN	2008
12	BO207.1	NN	Belgium	NN	2008
13	VE108.1	NN	Belgium	NN	2008
14	ZW314.1	NN	Belgium	NN	2008
15	ZW310.2	NN	Belgium	NN	2008
16	ZW106.1	NN	Belgium	NN	2008
17	TO108.1	NN	Belgium	NN	2008
18	TO302.1	NN	Belgium	NN	2008
19	ZW210.1	NN	Belgium	NN	2008
20	182/I468	<i>Triticum aestivum</i> L.	France	East	2007
21	183/I469	<i>Triticum aestivum</i> L.	France	East	2007
22	188/I474	<i>Triticum aestivum</i> L.	France	Center/North	2007
23	192/I478	<i>Triticum aestivum</i> L.	France	West	2007
24	198/I484	<i>Triticum aestivum</i> L.	France	Center/North	2007
25	199/I485	<i>Triticum aestivum</i> L.	France	Center/North	2007
26	204/I490	<i>Triticum aestivum</i> L.	France	West	2007
27	206/I492	<i>Triticum aestivum</i> L.	France	Center/North	2007
28	I71	<i>Triticum aestivum</i> L.	France	Southeast	2007
29	I72	<i>Triticum aestivum</i> L.	France	Southeast	2007
30	I109	<i>Zea mays</i> L.	France	Southwest	2007
31	I110	<i>Zea mays</i> L.	France	Southwest	2007
32	I475	<i>Triticum aestivum</i> L.	France	East	2007
33	TAPO21	<i>Triticum aestivum</i> L.	Hungary	NN	1992

55
56
57
58
59
60

TAPO34	<i>Triticum aestivum</i> L.	Hungary	NN	1992
LT03 08(57)	<i>Brassica oleracea</i> L.	Luxembourg	Nothum	NN
LT03 35(80)	<i>Brassica oleracea</i> L.	Luxembourg	Nothum	NN
LT14 05(491)	<i>Zea mays</i> L.	Luxembourg	Kayl	NN
LT14 27(504)	<i>Zea mays</i> L.	Luxembourg	Kayl	NN
LT15 16(525)	<i>Triticum aestivum</i> L.	Luxembourg	Dippach	NN
61colta11	<i>Triticum aestivum</i> L.	Uruguay	Colonia	NN
127sorpa7	<i>Triticum aestivum</i> L.	Uruguay	Soriano	NN
150sanle17	<i>Triticum aestivum</i> L.	Uruguay	San José	NN
20riogr2	<i>Triticum aestivum</i> L.	Uruguay	Río Negro	NN
93payca11	<i>Triticum aestivum</i> L.	Uruguay	Paysandú	NN
F95	NN	United Kingdom	NN	NN

NN, without data

MICA isolates were kindly provided by H. González, University of Buenos Aires, Argentina.

Isolates from Belgium were kindly provided by K. Audenaert, University of Gent, Department of Biological Sciences, Gent, Belgium

Isolates from Canada were kindly provided by R. Clear, Grain Research Laboratory, Canadian Grain Commission, Winnipeg, Canada.

Isolates from England, Italy, and Germany (F730, F733) were kindly provided by P. Nicholson, John Innes Centre, Norwich, UK.

Isolates from Finland were kindly provided by P. Parikka, MTT Agrifood Research Finland, Jokioinen, Finland.

Isolates from France were kindly provided by C. Barreau, INRA-MycSA, France.

Isolates from Germany were kindly provided by U. Korn, Leibniz-Centre for Agricultural Landscape Research, Müncheberg, Germany.

Isolates from Hungary were kindly provided by L. Hornok, Agricultural Biotechnology Center, Szent István University, Gödöllő, Hungary.

Isolates from Luxembourg were kindly provided by M. Pasquali, Centre of Research Public-Gabriel Lippmann, Belvaux, Luxembourg.

Isolates from Poland were kindly provided by T. Kulik, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Poland.

Isolates from Switzerland were kindly provided by S. Vogelgsang, Research Station Agroscope Reckenholz-Tanikon, Zurich, Switzerland.

Isolates from Uruguay were kindly provided by D. Pan, Laboratorio de Micología, Facultad de Ingeniería, Montevideo, Uruguay.

Isolates from Brazil were kindly provided by E. Del Ponte, University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Table 2 Primer sequences used for SRAP markers

Primers	Sequence (5'-3')
SRAP1F	TGA GTC CAA ACC GGA TA
SRAP1R	GAC TGC GTA CGA ATT GTC
SRAP2F	TGA GTC CAA ACC GGT CA
SRAP2R	GAC TGC GTA CGA ATT CCA
SRAP3F	TGA GTC CAA ACC GGA AG
SRAP3R	GAC TGC GTA CGA ATT GGT

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 3 Analysis of different SRAP fragments

Selected fragment code	Primers	Type of fragment	BlastX score (bits)	FUSARIUM ID
S6107	SRAP3F/3R	Polymorphic	127.8	<i>F. oxysporum</i> 4287: FOXG_08950
			126.3	<i>F. verticillioides</i> 7600: FVEG_06582
			76.2	<i>F. graminearum</i> PH-1: FGSG_07754.3
			73.5	<i>F. graminearum</i> PH-1: FGSG_04613.3
			73.5	<i>F. graminearum</i> PH-1: FGSG_02361.3
			58.9	<i>F. graminearum</i> PH-1: FGSG_00255.3
			57.7	<i>F. oxysporum</i> 4287: FOXG_01207.2
			56.2	<i>F. verticillioides</i> 7600: FVEG_00294.3
S3107T	SRAP3F/3R	Monomorphic	25.7	<i>F. verticillioides</i> 7600:FVEG_01453.3
S45	SRAP2F/2R	Polymorphic	43.1	<i>F. graminearum</i> PH-1:FGSG_08699.3
S48T	SRAP2F/2R	Monomorphic	43.1	<i>F. graminearum</i> PH-1:GFSG_08699.3
S59	SRAP2F/3R	Polymorphic	26.9	<i>F. oxysporum</i> 4287: FOXG_11635.2
			26.1	<i>F. graminearum</i> PH-1:FGSG_02054.3
S59T	SRAP2F/3R	Monomorphic	26.1	<i>F. verticillioides</i> 7600: FVEG_09114.3
S110	SRAP3F/1R	Polymorphic	95.1	<i>F. graminearum</i> PH-1: FGSG_06426.3
			65.8	<i>F. verticillioides</i> 7600: FVEG_06490.3
			65.4	<i>F. oxysporum</i> 4287: FOXG_08176.2
S110T	SRAP 3F/1R	Monomorphic	82.8	<i>F. graminearum</i> PH-1: FGSG_06426.3
			55.1	<i>F. verticillioides</i> 7600: FVEG_06490.3
			50.8	<i>F. oxysporum</i> 4287: FOXG_08176.2