



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Trabajo de Tesis Doctoral

**VARIABILIDAD GENÉTICA DE *FUSARIUM
GRAMINEARUM*, POTENCIAL PRODUCCIÓN
DE TOXINAS Y SUS IMPLICANCIAS EN LA
CALIDAD DE LOS GRANOS DE CEBADA**

Lic. Eliana Castañares

Tesista

Dr. Sebastián A. Stenglein

Director

Dra. Maria L. García

Codirectora

2016



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

Trabajo de Tesis Doctoral

VARIABILIDAD GENÉTICA DE *FUSARIUM GRAMINEARUM*, POTENCIAL PRODUCCIÓN DE TOXINAS Y SUS IMPLICANCIAS EN LA CALIDAD DE LOS GRANOS DE CEBADA

Lic. Eliana Castañares

Tesista

Dr. Sebastián A. Stenglein

Director

Dra. Maria L. García

Codirectora

Comité Evaluador:

AGRADECIMIENTOS

☀️ A Todas y Cada Una de las personas que me apoyaron, alentaron, acompañaron y colaboraron en estos años para poder llevar a cabo este trabajo y permitirme alcanzar el impensado título de doctor: Muchas Gracias!!!

☀️ A CONICET por las becas otorgadas para desarrollar mi trabajo de tesis doctoral.

☀️ Al PICT 2011-N°030 (FONCyT-SECyT), PIP 2014-N°0551 (CONICET) y a la UNCPBA por los subsidios otorgados que permitieron financiar este trabajo de tesis.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I: Introducción General

1.1 Generalidades del cultivo de cebada	1
1.2 Fusariosis de la espiga	6
1.2.1 Agentes causales de la Fusariosis de la espiga	9
1.2.2 Fuentes de inóculo	11
1.2.3 Sintomatología	13
1.2.4 Manejo de la enfermedad	14
1.2.5 Micotoxinas	16
1.3 <i>Fusarium graminearum</i>	19
1.3.1 Micotoxinas producidas por el complejo <i>F. graminearum</i>	25
1.3.2 Vías biosintéticas de las toxinas más importantes producidas por el complejo <i>F. graminearum</i>	27
1.4 Técnicas moleculares para identificación de especies y para estudios de variabilidad	31
1.4.1 Marcadores AFLP	33
1.4.2 Marcadores SRAP	35
1.5 Métodos para la cuantificación de micotoxinas	37
1.6 Situación a nivel mundial y nacional del complejo <i>F. graminearum</i> en cebada	40
1.7 Hipótesis	42
1.8 Objetivo General	42

1.8.1 Objetivos Específicos	42
-----------------------------	----

CAPÍTULO II: Materiales y Métodos Generales

2.1 Recolección de las muestras	43
---------------------------------	----

2.2 Obtención de los aislamientos e identificación morfológica de los mismos	44
--	----

2.3 Extracción del ADN	48
------------------------	----

2.4 Determinación de la calidad y cuantificación del ADN obtenido	49
---	----

2.5 Identificación molecular de los aislamientos del complejo <i>F. graminearum</i>	50
---	----

2.6 Conservación de los aislamientos	52
--------------------------------------	----

2.7 Determinación del potencial toxicogénico (Genotipo)	52
---	----

2.8 Secuenciación de aislamientos representativos	54
---	----

2.9 Preparación de inóculo	57
----------------------------	----

CAPÍTULO III: Capacidad toxicogénica y toxicológica de aislamientos de

***Fusarium graminearum* s.s. obtenidos de cebada en la Argentina**

3.1 Introducción	58
------------------	----

3.2 Materiales y métodos	60
--------------------------	----

3.2.1 Determinación del potencial toxicológico (Quimiotipo)	60
---	----

3.2.2 Análisis estadístico	62
----------------------------	----

3.2.3 Identificación y comprobación de la patogenicidad de dos nuevas especies causantes de la Fusariosis de la espiga en cebada en la Argentina	62
--	----

3.3 Resultados	65
----------------	----

3.3.1 Aislamientos obtenidos	65
------------------------------	----

3.3.2	Potencial toxicogénico (Genotipo)	66
3.3.3	Potencial Toxicológico (Quimiotipo)	69
3.3.4	Análisis estadístico	72
3.3.5	Perfil de producción de DON y sus acetyl derivados de <i>F. graminearum</i> s.s. aislados de cebada	73
3.3.6	Primer reporte de <i>Fusarium cerealis</i> y <i>F. pseudograminearum</i> en cebada en la Argentina	75
3.4	Discusión	79
CAPÍTULO IV: Variabilidad genética de aislamientos del complejo <i>Fusarium graminearum</i> obtenidos de cebada en Argentina, Brasil y Uruguay		
4.1	Introducción	88
4.2	Materiales y métodos	90
4.2.1	Aislamientos del complejo <i>Fusarium graminearum</i> empleados	90
4.2.2	Marcadores AFLP	95
4.2.2.1	Digestión y Ligación	95
4.2.2.2	Preamplificación	96
4.2.2.3	Amplificación	97
4.2.2.4	Corridas electroforéticas para la separación de los fragmentos amplificados	99
4.2.3	Marcadores SRAP	100
4.2.3.1	Corridas electroforéticas para la separación de los fragmentos amplificados	102

4.2.4	Tinción y revelado de los geles de poliacrilamida	103
4.2.5	Secuenciación de fragmentos generados por los marcadores SRAP	104
4.2.6	Análisis estadístico	105
4.3	Resultados	107
4.3.1	Identificación de los aislamientos mediante PCR	107
4.3.2	Potencial toxicogénico (Genotipo)	108
4.3.3	Identificación en base a los genes <i>RED</i> y <i>Tri101</i>	109
4.3.4	Test de Mantel	113
4.3.5	Agrupamientos obtenidos con los marcadores AFLP y SRAP	114
4.3.6	Diversidad genotípica	120
4.3.7	Secuencias de los fragmentos generados por los marcadores SRAP	122
4.4	Discusión	123
CAPÍTULO V: Efectos de <i>Fusarium graminearum</i> y <i>F. pseudograminearum</i> sobre parámetros de calidad de cebada cervecera		
5.1	Introducción	130
5.2	Materiales y métodos	132
5.2.1	Aislamientos utilizados	132
5.2.2	Diseño del ensayo a campo	133
5.2.3	Producción de toxinas <i>in vivo</i>	136
5.2.4	Producción de toxinas <i>in vitro</i> (Potencial toxicológico)	136
5.2.5	Evaluación del porcentaje de proteínas y peso de mil granos	138
5.2.6	Análisis estadísticos	138

5.3 Resultados	138
5.3.1 Producción de toxinas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	138
5.3.2 Porcentaje de proteínas y peso de mil granos	141
5.4 Discusión	143
CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES	150
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	154
ANEXO I: Medios de cultivos y Soluciones	181
ANEXO II: Artículos publicados	183

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cultivo de cebada	2
Figura 2. Espiga y granos de cebada con síntomas de Fusariosis de la espiga	14
Figura 3. Imágenes de macroconidios tomadas del 'Manual del Laboratorio de <i>Fusarium</i> ' (Leslie & Summerell 2006). <i>Fusarium graminearum</i> (A), <i>F. cerealis</i> (= <i>F. crookwellense</i>) (B), <i>F. pseudograminearum</i> (C) (Escala = 25 µm)	21
Figura 4. Esquema de la vía biosintética propuesta para la producción de tricotecenos en <i>Fusarium</i> (McCormick et al. 2011)	28
Figura 5. Estructura química de DON, NIV, 3-ADON y 15-ADON	29
Figura 6. Estructura química de ZEA	30
Figura 7. Diagrama de la técnica AFLP	35
Figura 8. Diagrama de la técnica SRAP	37
Figura 9. Diagrama de la técnica ELISA	39
Figura 10. Mapa satelital de la zona de muestreo y número de muestras por localidad (entre paréntesis)	44
Figura 11. Colonia de <i>F. graminearum</i> en APG 2 %	45
Figura 12. Colonia de <i>F. graminearum</i> en CLA	46
Figura 13. Colonia de <i>F. graminearum</i> en tubo APG 2 % pico de flauta	46
Figura 14. Frascos Erlenmeyer con inóculo de <i>F. graminearum</i> y <i>F. pseudograminearum</i> incubados en agitador rotativo	57
Figura 15. Macetas con plantas de cebada para inoculación	64
Figura 16. Observación al microscopio de un aislamiento de <i>F. graminearum</i>	66

s.s. (40X). Macroconidios (A), Clamidosporas (B), Esporodoquios (C)

Figura 17. Reacción de PCR específica con cebadores Fg16 F/R de aislamientos representativos de *F. graminearum* s.s. 66

Figura 18. Reacción de PCR con cebadores Tri13DON F/R de aislamientos representativos de *F. graminearum* s.s. 67

Figura 19. Reacción de PCR con cebadores Tri13NIV F/R de aislamientos representativos de *F. graminearum* s.s. 68

Figura 20. Reacción de PCR “multiplex” de aislamientos representativos de *F. graminearum* s.s. 68

Figura 21. Reacción PCR con cebadores PKS4 F/R de aislamientos representativos de *F. graminearum* s.s. 69

Figura 22. Frecuencia relativa de la concentración de 3-ADON (A) y 15-ADON (B) producida por *F. graminearum* s.s. aislados de cebada 73

Figura 23. Observación al microscopio de un aislamiento de *F. pseudograminearum* (40X). Macroconidios (A), Esporodoquios (B) y colonia de *F. pseudograminearum* en tubo APG pico de flauta (C) 76

Figura 24. Observación al microscopio de un aislamiento de *F. cerealis* (40X). Macroconidios con clamidosporas (A), Macroconidios (B) y colonia de *F. cerealis* en tubo APG pico de flauta (C) 77

Figura 25. Síntomas de *F. cerealis* (A) y *F. pseudograminearum* (B) en espigas de cebada 79

Figura 26. Reacción de PCR específica con cebadores Fg16 F/R (A) y Fg16N F/R 108

(B)

Figura 27. Alineamiento de las secuencias resultantes de la amplificación del gen <i>TRI101</i> de cinco miembros del complejo <i>F. graminearum</i>	112
Figura 28. Alineamiento de las secuencias resultantes de la amplificación del gen <i>RED</i> de cinco miembros del complejo <i>F. graminearum</i>	113
Figura 29. Patrones de amplificación obtenidos con marcadores AFLP (A) y SRAP (B)	116
Figura 30. Dendograma obtenido con los marcadores AFLP	117
Figura 31. Dendograma obtenido con los marcadores SRAP	119
Figura 32. Diagrama del ensayo en parcelas divididas	135
Figura 33. Ensayo a campo con diseño en parcelas divididas	135
Figura 34. Frascos inoculados incubados en cámara de crecimiento (A) y frascos conteniendo granos de la variedad Scarlett inoculados con: Fpseu, Fgra y Fpseu/Fgra, respectivamente (B)	137

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Origen y distribución geográfica de especies, hospedantes conocidos y quimiotipo de tricoteceno tipo B de especies del complejo <i>F. graminearum</i> (Aoki et al. 2012)	23
Tabla 2. Secuencias de los cebadores utilizados para corroborar molecularmente los aislamientos del complejo <i>F. graminearum</i>	51
Tabla 3. Secuencias de los cebadores utilizados para determinar el potencial toxicogénico	54
Tabla 4. Secuencias de los cebadores de las regiones conservadas utilizadas	55
Tabla 5. Origen y producción de toxinas de los aislamientos de <i>F. graminearum</i> s.s.	70
Tabla 6. Concentraciones máximas, mínimas y medias de los tricotecenos producidos por aislamientos de <i>F. graminearum</i> s.s. de cebada	72
Tabla 7. Perfiles de la producción de DON y sus acetil derivados por aislamientos de <i>F. graminearum</i> s.s. de cebada	74
Tabla 8. Números de accesoión de “GenBank” de los aislamientos de <i>F. pseudograminearum</i> y <i>F. cerealis</i> secuenciados	78
Tabla 9. País de origen, genotipo de tricotecenos, especie y hospedante de los aislamientos del complejo <i>F. graminearum</i> utilizados en este estudio	92
Tabla 10. Componentes de la reacción de digestión mediante enzimas de restricción	96
Tabla 11. Componentes de la reacción de ligación con adaptadores AFLP	96

Tabla 12. Componentes de reacción de preamplificación	97
Tabla 13. Componentes de la reacción de amplificación	98
Tabla 14. Secuencias de los cebadores utilizados en las reacciones con los marcadores SRAP (Wang et al. 2010)	101
Tabla 15. Componentes de reacción utilizados en las reacciones con los marcadores SRAP	101
Tabla 16. Números de accesoión de “GenBank” de los 24 aislamientos del complejo de especies de <i>F. graminearum</i> secuenciados utilizados en este estudio	111
Tabla 17. Resultados de AMOVA basados en los marcadores AFLP de las poblaciones del complejo <i>F. graminearum</i> (A) y <i>F. graminearum</i> s.s. (B) de Argentina, Brasil y Uruguay	121
Tabla 18. Resultados de AMOVA basados en los marcadores SRAP de las poblaciones del complejo <i>F. graminearum</i> (A) y <i>F. graminearum</i> s.s. (B) de Argentina, Brasil y Uruguay	122
Tabla 19. Secuencias de SRAP y resultados del BlastX	123
Tabla 20. Datos de Temperatura, Humedad relativa (HR) promedio y Precipitación acumulada desde la fecha de inoculación a la fecha de cosecha	136
Tabla 21. Análisis de la varianza para la producción de DON	139
Tabla 22. Test de Tukey ($\alpha = 0,05$) para la interacción Año-Variedad	140
Tabla 23. Análisis de la varianza para el peso de mil granos	142
Tabla 24. Test de Tukey ($\alpha = 0,05$) para las variables Año (A) y Variedad (B)	142

SIGLAS/ABREVIATURAS

3-ADON	3-acetildeoxinivalenol
15-ADON	15-acetildeoxinivalenol
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados
AMOVA	Análisis molecular de la varianza
APG	Agar papa glucosado
BLAST	Herramienta de búsqueda de alineamientos locales básicos
CLA	Agar agua con clavel
CMC	Carboximetil celulosa
CTAB	Cetil-trimetil-bromuro de amonio
dNTP	Desoxirribonucleotido trifosfato
DON	Deoxinivalenol
ELISA	Ensayo de inmuno-adsorción vinculado a enzimas
FAO	Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación
g	Gramo
GC	Cromatografía gaseosa
ha	Hectárea
h-hs	Hora-horas
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
L	Litro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
min	Minutos
NCBI	Centro nacional de información biotecnológica
NIV	Nivalenol
nm	Nanómetro
ORF	Marco abierto de lectura
pb	Pares de base
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PVP	Polivinil pirrolidona
RED	Reductasa
rpm	Revoluciones por minuto
s	segundo
SNA	Agar pobre en nutrientes
SRAP	Polimorfismos de amplificación de secuencias relacionadas
TBE	Tris-Borato-EDTA
TE	Tris-EDTA

TEF	Factor de elongación de traducción
TRI101	Tricotecen 3-O-acetiltransferasa
U	Unidades
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromolar
UPGMA	Ligamiento promedio no ponderado
UV	Ultravioleta
v/v	Volumen en volumen
ZEA	Zearalenona

CAPÍTULO I

Introducción General

1.1 Generalidades del cultivo de cebada

La producción de cultivos de grano tiene un papel preponderante en la actividad agrícola mundial. De su producción y distribución, depende la alimentación en el mundo y de su calidad, la mejora en la alimentación. Los granos de cereales son un alimento fundamentalmente energético, en cuya composición destaca la presencia de carbohidratos y proporciones moderadas de proteínas y lípidos, siendo el componente cuantitativamente más importante el almidón (Satorre et al. 2003).

Dentro de los cereales de importancia mundial se encuentra la cebada (*Hordeum vulgare* L.), la cual es una planta monocotiledonea anual perteneciente a la familia de las Poáceas (gramíneas). La cebada cultivada descende de la cebada silvestre (*Hordeum spontaneum* K. Koch), su origen se atribuye al antiguo Egipto y corresponde a alrededor de 10.000 años a.C.

Se distinguen dos tipos de cebada, la de dos hileras y la de seis hileras. La cebada de dos hileras tiene menor contenido de proteínas que la de seis hileras, por lo que es más conveniente para la producción de malta, mientras que la de seis hileras es más adecuada para la alimentación animal (FAO 2009). En la Argentina la primera se utiliza principalmente para la industria cervecera y la segunda como forraje.

El cultivo de cebada (Figura 1) tiene la particularidad de poder adaptarse a diferentes condiciones climáticas y geográficas. Es un cereal que se encuentra ampliamente difundido en todo el mundo, ocupando el cuarto lugar en superficie sembrada, después del trigo, el maíz y el arroz (Dirección de Mercados

Agrícolas (2015).

Los principales productores mundiales son la Unión Europea, Rusia, Ucrania, Canadá, Australia, EE.UU., Argentina, entre otros. En la campaña 2012/2013 Argentina se colocó en el segundo lugar como exportador mundial de cebada. Aproximadamente el 25 % de la producción nacional se destina al mercado interno para las malterías y el 75 % restante se exporta como grano cervecero, forrajero o malta (Dirección de Mercados Agrícolas 2015).

Figura 1. Cultivo de cebada.



El aumento mundial de la demanda de cebada cervecera está relacionado al aumento de la producción mundial de cerveza, que pasó de 1.300 millones de hectolitros en 1998 a 1.800 millones de hectolitros en 2008, con una proyección de crecimiento que pronostica superar los 2.000 millones de hectolitros en los próximos 10 años (Cattáneo 2011).

En la Argentina se siembra en los meses de Junio, Julio y primera quincena de Agosto, mientras que la cosecha se realiza en los meses de Noviembre, Diciembre o principios de Enero. Es un cultivo que depende y está impulsado activamente por las malterías o cervecerías, que son las que establecen un contrato con el productor para la producción de una variedad determinada en base a ciertas características específicas (Savin & Aguinaga 2011).

La producción de cebada cervecera de nuestro país ha crecido notablemente en los últimos veinte años, acompañado dicho crecimiento, por la ampliación de la distribución geográfica del cultivo, siendo, en la campaña 2013-2014, la provincia de Buenos Aires responsable de más del 90 % de la producción nacional, seguido de Santa Fe, La Pampa, Córdoba y Entre Ríos (Anuario Estadístico 2014, Bolsa de Comercio de Rosario). La posibilidad de adelantar unos 15 días la siembra de soja de segunda, por tener la cebada un ciclo más corto que el trigo y por los buenos rendimientos que se han obtenido en los últimos años en comparación con el trigo, ha favorecido el incremento de su área de siembra. En la campaña 2008/2009 se sumó la mayor oferta de contratos de siembra de cebada por parte de las malterías y los buenos precios alcanzados por la cebada, lo cual llevó a alcanzar las 440.000 ha sembradas, con un rendimiento promedio de $3,5 \text{ tn ha}^{-1}$ y con una producción aproximada de 1.475.000 tn (SAGPyA 2009). En la campaña 2014/15, la superficie sembrada fue de 1.006.118 ha y la superficie cosechada de 888.873 ha, con una producción de 2.901.492 tn y un rendimiento de $3,2 \text{ tn ha}^{-1}$ (SIIA 2015). Actualmente, en la Argentina se

siembran diferentes variedades de cebada, siendo Scarlett la variedad más cultivada en nuestro país, ocupando alrededor del 70 % de la producción, con excelente relación rendimiento/calidad maltera y Shakira la segunda variedad en superficie, con alto potencial de rendimiento (Federico Moreyra-EEA INTA Bordenave-Comunicación personal).

Luego de la cosecha, los granos de cebada deben cumplir con determinados estándares de calidad en cada uno de los rubros que tienen influencia durante la etapa industrial (producción de malta y elaboración de cerveza). Las bases y tolerancias de recibo son establecidas en las Normas de Calidad y Comercialización de Cebada Cervecera (Resolución SENASA 27/2013):

- Bases de comercialización
 - Capacidad germinativa (mínimo): 98 %.
 - Materias extrañas (máximo): 0,5 %.
 - Granos dañados (máximo): 0,5 %.
 - Granos quebrados y/o pelados (máximo): 1,5 %.
 - Calibre sobre zaranda de 2,5 mm (mínimo): 85 %.
 - Humedad: 12,0 %.
- Tolerancias de recibo
 - Capacidad germinativa (mínimo): 95 %.
 - Granos dañados (máximo) 1,5 %.
 - Materias extrañas (máximo): 1 %.
 - Granos quebrados y/o pelados (máximo): 4 %.
 - Granos con carbón (máximo): 0,2 %.

- Granos picados (máximo): 0,5 %.
- Material bajo zaranda de 2,2 mm (máximo): 4 %.
- Calibre sobre zaranda de 2,5 mm (mínimo): 80 %.
- Proteína mínima (sustancia seca): 9 %.
- Proteína máxima (sustancia seca): 13,0 %.
- Humedad: máximo 12,5 %.
- Libre de insectos y/o arácnidos.

La cebada cervecera que exceda las tolerancias establecidas de recibo obligatorio, que presente olores comercialmente objetables o que por cualquier otra causa sea de calidad inferior que impida su uso para el fin específico, se considerará fuera de la presente normativa. A su vez, en la Norma de Calidad y Comercialización figuran los niveles de bonificaciones y rebajas así como la metodología de análisis recomendada para los parámetros establecidos.

Como se mencionó anteriormente, el principal destino de la cebada en nuestro país es para la industria de elaboración de malta y cerveza. Debido a que la elaboración de malta es un proceso fundamentalmente biológico en el que la germinación de los granos de cebada es el aspecto central, es importante considerar que todas las variables que afecten la estructura de los granos cosechados jugarán un rol muy importante en la capacidad de los granos de germinar con su máxima energía y expresar su posibilidad de modificación del endosperma, es decir exponer los gránulos de almidón para ser hidrolizados. Un secado inadecuado, un almacenamiento con exceso de humedad, presencia de insectos o mezclas con cosechas anteriores, pueden afectar el potencial de

germinación. La modificación del endosperma así como la síntesis de enzimas hidrolíticas (citolíticas, proteolíticas y amilolíticas) que conservan su actividad biológica para la elaboración de cerveza son el objetivo principal de la elaboración de malta (Savin & Aguinaga 2011). Los pasos claves en el proceso de elaboración de cerveza incluyen:

- Formación de malta: requiere un paso de remojo para elevar la humedad de los granos de 12 % hasta un 40 % y la subsecuente germinación del grano, durante la cual se produce la síntesis y liberación de enzimas hidrolíticas y la disolución de la estructura física del endosperma. A continuación se produce una etapa de calentamiento mediante secado, para reducir el contenido de humedad alcanzado durante la germinación.
- Molienda: para permitir el pasaje por los tamices y eliminar los restos de cáscaras de los cereales molidos.
- Maceración: de esta etapa resulta la formación del mosto. Subsecuentemente es hervido con el lúpulo, el cual además de otorgarle un sabor amargo característico, es el encargado de estabilizar la espuma.
- Fermentación: consiste en la adición de levaduras al mosto para convertir los carbohidratos en alcohol etílico y dióxido de carbono (CO₂).

1.2 Fusariosis de la espiga

El desarrollo de los cultivos depende de la disponibilidad de agua y de los nutrientes del suelo donde se desarrollen, así como de factores del ambiente

como temperatura, luz y humedad. La presencia de factores externos como organismos patógenos (hongos, bacterias, virus), el clima desfavorable, la presencia de malezas e insectos perjudiciales, pueden afectar el desarrollo de los cultivos causando un crecimiento deficiente de los mismos y provocando mermas en el rendimiento.

Una de las enfermedades que afecta a los cereales de grano pequeño en todo el mundo es la Fusariosis de la espiga, la cual es una enfermedad fúngica causada por especies del género *Fusarium*. Inicialmente fue considerada una enfermedad de índole secundaria, pero dada su frecuencia de aparición y severidad, se ha convertido en una de las principales enfermedades de los cereales (McMullen et al. 1997). La enfermedad ha sido registrada frecuentemente en regiones con alta humedad y temperatura, donde las lluvias frecuentes o rocíos coinciden con el período de floración o el período temprano de llenado del grano de los cultivos, favoreciendo su desarrollo.

El primer reporte de la Fusariosis de la espiga fue realizado en Inglaterra por Smith (1884), donde se atribuyó la enfermedad a *Fusisporium culmorum*. Posteriormente, se realizaron registros de la enfermedad en trigo en Estados Unidos, donde se la asoció a *Fusarium graminearum* (Johnson et al. 1920). En la Argentina, los primeros síntomas de Fusariosis de la espiga comenzaron a observarse a principios de la década del 30, pero hasta 1945 no fue observada en forma generalizada, siendo en esa época la zona más afectada el norte de la provincia de Buenos Aires y sur de Santa Fe (Galich 1987).

Los daños causados por la enfermedad en trigo incluyen la reducción del rendimiento, del peso hectolítrico, del tenor proteico, del poder germinativo y del vigor de las semillas (Reis & Carmona 2002). En general, el cultivo de cebada es menos susceptible a la Fusariosis de la espiga que el cultivo de trigo. Esto es debido a que en trigo, a partir de un foco de infección, el patógeno puede migrar de una espiguilla a otra a través del raquis y expandir la enfermedad afectando la espiga entera, mientras que en cebada usualmente no existe una expansión de la enfermedad, o la infección solo se puede extender desde las espiguillas infectadas a las adyacentes (McCallum & Tekauz 2002; Bushnell et al. 2003; Steffenson 2003; Langevin et al. 2004). De esta forma, el impacto en el rendimiento es mayor en trigo que en cebada. Sin embargo, esta enfermedad es de gran interés para la industria maltera y cervecera ya que puede afectar los parámetros de calidad de los granos de cebada por obtenerse granos de menor tamaño, menor extracto de malta y porcentaje de germinación, además generar “off-flavors” (aromas y sabores no deseados) en la cerveza (Gyllang et al. 1981). Cuando el hongo produce la infección, el micelio desarrollado puede impedir el transporte de nutrientes necesarios para el desarrollo del grano, provocando un menor número de granos por espiga y menor peso de mil granos. Esto provoca granos de menor tamaño, con menor contenido de almidón y, a su vez, se puede alterar la proporción de proteínas y enzimas importantes en el proceso de malteado (Schwarz 2003). Se ha observado en ensayos a campo en los que se realiza una inoculación artificial de las espigas de cebada, una significativa reducción del tamaño y de la capacidad de germinación del grano cosechado y

un ligero incremento en el contenido de proteína y nitrógeno del grano (Sarlin et al. 2005).

1.2.1 Agentes causales de la Fusariosis de la espiga

La Fusariosis de la espiga es causada por el género *Fusarium*, el cual es un complejo de hongos filamentosos que pertenecen al Phylum *Ascomycota*, orden *Hypocreales*, familia *Hypocreaceae*. El género fue introducido por el micólogo Link en 1809 como *Fusisporium* y las especies que lo comprenden pueden causar enfermedades en plantas, humanos y animales domésticos (Rebell 1981; Krcmery et al. 1997; Vismar et al. 2002). En general, son saprófitos y parásitos facultativos capaces de colonizar tejidos vivos en cualquier etapa durante el ciclo de vida del hospedante y establecerse en tejidos senescentes o residuos de cultivos. La mayoría de las especies de *Fusarium* son heterotálicas, es decir, presentan los órganos sexuales masculinos y femeninos segregados en talos distintos, de modo que requieren dos talos para que ocurra la reproducción sexual o pueden presentar ambos órganos sexuales en un mismo talo pero que es autoestéril (autoincompatible), siendo necesaria la unión de dos talos compatibles para que se lleve a cabo la reproducción sexual (Nuevo Diccionario Ilustrado de Micología 2006). Dentro de este grupo se encuentran *F. pseudograminearum*, *F. cerealis*, *F. culmorum*, *F. solani*, entre otras.

Wollenweber & Reinking (1935) dividieron el género *Fusarium* en 16 secciones, 65 especies y 77 variedades y formas subespecíficas, agrupando las especies en cada sección según características morfológicas. Luego, Nelson et al.

(1983), basados en la publicación 'Die Fusarien' de Wollenweber y Reinking, describieron 30 especies de *Fusarium* y ofrecieron una descripción menos detallada de 16 especies adicionales. Posteriormente, Leslie & Summerell (2006) desarrollaron un manual en el que describieron 70 especies diferentes.

Las especies predominantes en todo el mundo que pueden causar la Fusariosis de la espiga son: *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* y *F. poae* (Reis & Carmona 2002). *F. graminearum* es la especie más distribuida en todo el mundo, siendo predominante en regiones cálidas y húmedas, mientras que *F. culmorum* y *F. avenaceum* son comunes en Europa y *F. poae* es frecuente tanto en Europa como en América.

Los miembros de este género fúngico se han encontrado en diversos ambientes en muchas partes del mundo, pudiendo ser aislados de suelo, granos, frutos, residuos de cosecha, entre otros (Summerell et al. 2010). Las especies de *Fusarium* presentan diferentes condiciones óptimas de crecimiento e infección, por lo tanto, las especies dominantes presentes en un cereal pueden diferir entre estaciones y entre regiones.

Debido a la diversidad de especies de *Fusarium* que pueden infectar diversos cultivos, muchas veces no hay evidencia cierta de que la enfermedad es producida por un determinado agente etiológico en particular. En esos casos, deben considerarse los postulados de Koch para comprobar la hipótesis de que dicho agente etiológico es el causante de la enfermedad, basándose en los siguientes puntos:

- El patógeno debe encontrarse asociado con la enfermedad en todas las plantas enfermas que se examinen.
- El patógeno debe aislarse y desarrollarse en un cultivo puro en medios nutritivos y se deben describir sus características.
- El patógeno que se desarrolle en un cultivo puro debe ser inoculado en plantas sanas de la misma variedad en que apareció la enfermedad y debe producir la misma enfermedad en las plantas inoculadas.
- El patógeno debe aislarse una vez más en un cultivo puro y sus características deben corresponder a las anotadas previamente.

Cuando los puntos anteriores se cumplen, se tendrá certeza de que el patógeno es el responsable de la enfermedad (Agrios 1999).

1.2.2 Fuentes de inóculo

Todas las especies de *Fusarium* que pueden infectar los cereales son capaces de sobrevivir saprofiticamente sobre los residuos de cosecha. Esto constituye la principal fuente de inóculo, que puede estar formada por conidios, clamidosporas, fragmentos de hifas y, en aquellas especies que presentan reproducción sexual, ascosporas. Este inóculo puede ser dispersado a través de insectos, por la lluvia y el viento. En el caso de las ascosporas, algunos autores sugieren que en presencia de lluvias o alta humedad, éstas son liberadas de los peritecios en una sustancia gelatinosa y luego de un periodo de sequedad son dispersadas en el aire, mientras que otros autores sugieren que las lluvias son

necesarias para la formación y maduración de los ascos pero no para la liberación de las ascosporas (Parry et al. 1995; Paulitz 1996). Por su parte, los conidios, debido a su naturaleza hidrofílica y pegajosa, requieren salpicaduras de lluvia o lluvia con viento para luego ser transportados a cortas distancias (Reis & Carmona 2002). Tanto los conidios como las ascosporas requieren, a su vez, una temperatura adecuada para su formación. En *F. graminearum* se ha observado que la temperatura óptima para la producción de ascosporas es de 28 °C y de 32 °C para los macroconidios (Pereyra & Lori 2013).

Después de la liberación del inóculo puede ocurrir la infección de los cultivos, siendo el periodo de mayor susceptibilidad durante antesis y hasta el periodo de desarrollo del grano lechoso a pastoso. Algunos autores sugieren que, en cebada, la entrada del hongo a través de los estomas es rara y que la vía de entrada a través de las anteras es menos importante que en trigo, debido a que en cebada las anteras son exsertas después de la dehiscencia del polen, contrario a lo que ocurre en trigo (Lewandowski et al. 2006). Otros autores, sugieren que el hongo entra en las flores principalmente a través de las grietas formadas entre la lema y palea, consiguiendo el acceso al interior de la lema, palea y cariósipide, los cuales tienen células epidérmicas de paredes delgadas susceptibles a la infección fúngica (Bushnell et al. 2005; Lewandowski et al. 2006).

El grado de desarrollo de la enfermedad depende no solo del estado de desarrollo del hospedante y de la cantidad de inóculo, sino también de la duración de la exposición a condiciones de alta humedad relativa ($\geq 90\%$) y a una determinada temperatura (generalmente 25 °C) (Reis & Carmona 2002,

Parry et al. 1995). Sin embargo, se ha sugerido que en condiciones de humedad prolongada, la enfermedad puede desarrollarse con temperaturas por debajo del óptimo y con bajos niveles de inóculo (McMullen et al. 1997). Otra fuente de inóculo son las semillas infectadas con el hongo, pero si bien éstas pueden causar pudriciones radiculares o muerte de plántulas, no son importantes para la infección de las espigas. Además, las prácticas agrícolas, como la no labranza del suelo, lo cual deja residuos de cosechas disponibles para el desarrollo fúngico, también influye en el grado de infección (Pereyra & Lori 2013; Reis & Carmona 2013).

1.2.3 Sintomatología

La aparición de los síntomas puede iniciarse tres días después de la infección. Las espigas de cebada infectadas pueden mostrar un oscurecimiento o una apariencia acuosa, mientras que los granos se caracterizan por ser más pequeños que los normales, se tornan arrugados, con una coloración marrón especialmente en la base, observándose en ocasiones una coloración salmón-rosada debido al desarrollo de micelio fúngico y conidios y en ocasiones pueden observarse peritecios azul-negruzco producidos por *F. graminearum* (McMullen et al. 1997)(Figura 2). A su vez, se ha observado la presencia de especies de *Fusarium* en granos asintomáticos (Barreto et al. 2004; Stenglein et al. 2012).

Figura 2. Espiga y granos de cebada con síntomas de Fusariosis de la espiga.



1.2.4 Manejo de la enfermedad

Debido a la dependencia de la Fusariosis de la espiga a las condiciones climáticas, es una de las enfermedades de los cereales más difícil de manejar e implica la necesidad de un manejo integrado para su control. Una medida consiste en la labranza del suelo, la cual provoca que los residuos de cosecha queden bajo el suelo, reduciendo la fuente de inóculo, ya que la ausencia de luz impide la formación de peritecios. Debido a que el sistema de labranza favorece la erosión del suelo, otra alternativa para reducir la fuente de inóculo es la rotación de los cultivos. Algunos autores sugieren que un periodo de dos años de rotación de cultivos con cultivos no susceptibles promueve la destrucción natural del patógeno en los residuos y en el suelo (Pereyra & Lori 2013). Sin embargo, otros autores indican que la diversidad de especies de *Fusarium* en suelos cultivados no es afectada por la utilización de diferentes sistemas de rotación de

cultivos (Silvestro et al. 2013). Por otra parte, se ha demostrado que un sistema de alternancia labranza/rotación de cultivos permite mantener un porcentaje de cobertura de residuos en el suelo además de reducir la fuente de inóculo (Watkins & Boosalis 1994). Otros autores sugieren que aunque se realice una rotación de cultivos, la Fusariosis de la espiga puede ocurrir ya que las ascosporas están presentes en el aire todo el año y son transportadas a grandes distancias asegurando la presencia de inóculo en el período de floración del cultivo (Reis & Carmona 2013).

Otra medida consiste en el desarrollo de variedades tolerantes a la enfermedad y en la utilización de variedades resistentes al frío. El desarrollo de variedades tolerantes en cebada es una tarea compleja ya que la Fusariosis de la espiga es una enfermedad controlada por múltiples genes, requiriéndose además que las variedades desarrolladas presenten el cumplimiento de ciertas características agronómicas y de calidad para el malteado (Steffenson 2003). Por otra parte, el desarrollo de variedades resistentes al frío permitiría que el periodo de floración, momento en el cual se produce la infección, se alcance cuando las condiciones climáticas (temperaturas menores a 20 °C) son menos favorables para el desarrollo de la enfermedad (Reis & Carmona 2013).

Otras técnicas empleadas son el control biológico, particularmente usada como una alternativa en cultivos orgánicos, en el que se utilizan bacterias u otros aislamientos fúngicos antagonistas de especies de *Fusarium* que compitan por el sustrato y, el control químico, en el cual se emplean fungicidas, los cuales son

recomendables de aplicar solo cuando las condiciones ambientales predichas pueden conducir a la enfermedad.

1.2.5 Micotoxinas

La mayoría de las especies de *Fusarium* son capaces de producir micotoxinas, las cuales son consideradas metabolitos secundarios producidos por ciertos hongos, dado que su biosíntesis no es requerida para las funciones primarias de crecimiento y reproducción. Las micotoxinas producidas por *Fusarium* incluyen tres clases importantes: tricotecenos, fumonisinas y zearalenonas, además de otras micotoxinas menores como eniatinas, beauvericinas, moniliforminas, entre otras (Desjardins 2006).

Los tricotecenos son sesquiterpenos tricíclicos que contienen un doble enlace entre los carbonos 9 y 10 y un anillo 12,13-epóxido. Pueden ser divididos en dos grupos basados en si tienen o no un grupo carbonilo en la posición del C-8. Los tricotecenos del grupo A, los cuales no tienen un grupo carbonilo en la posición del C-8, están representados por Diacetoxiscirpenol (DAS) y toxina T-2, mientras que los tricotecenos del grupo B, los cuales tienen un grupo carbonilo en el C-8, están representados por Nivalenol (NIV) y su derivado acetilado 4-acetilnivalenol y Deoxinivalenol (DON) y sus derivados acetilados 3-acetildeoxinivalenol (3-ADON) y 15-acetildeoxinivalenol (15-ADON).

Los tricotecenos se unen a los ribosomas eucarióticos e inhiben la síntesis de proteínas mediante el bloqueo de la traducción e inhibición de la elongación de la cadena peptídica. La actividad de los tricotecenos también produce estrés

oxidativo debido a la generación de radicales libres (Riley & Norred 1996). Los síntomas comunes en humanos y animales, causados por la ingestión de estas toxinas, incluyen lesiones en la mucosa del tracto gastrointestinal, resultando en hemorragias y toxicidades hematológicas (Joffe 1974, 1978; Fink-Gremmels 1999). En el caso de altas dosis de ingestión, los síntomas agudos son vómitos y rechazo del alimento, mientras que la toxicidad crónica es caracterizada por anorexia, reducción de la ganancia de peso, cambios neuroendócrinos y efectos inmunológicos (Williams et al. 1989; Larsen et al. 2004).

Además, los tricotecenos tienen varios efectos fitotóxicos en una amplia variedad de plantas, tejidos de plantas y líneas celulares, provocando marchitez, clorosis, necrosis, entre otros (Desjardins 2006). Estos efectos se deben a su acción como inhibidores de la síntesis proteica.

Las fumonisinas son largas cadenas de amino polialcoholes. Provocan inhibición del metabolismo de espingolípidos y son consideradas carcinogénicas. Han sido asociadas con cáncer esofágico en humanos y provocan leucoencefalomalacia en caballos, una enfermedad cerebral que puede ser mortal después de pocos días del consumo de alimentos contaminados (Desjardins & Proctor 2007).

Las zearalenonas (ZEA) son micotoxinas estrogénicas no esteroideas que no han sido asociadas con casos de micotoxicosis fatal en humanos y animales. La zearalenona es una lactona macrocíclica con alta afinidad a los receptores estrógenos y de baja toxicidad aguda (Kuiper et al. 1997). En mamíferos, particularmente en cerdos, causa infertilidad, edema vulvar, prolapso vaginal e

hipertrofia mamaria en hembras y feminización en machos (Blaney et al. 1984; Dacasto et al. 1995). En vacas, produce infertilidad, reducción de la producción de leche e hiperestrogismo (Mirocha et al. 1974).

Las micotoxinas pueden ser acumuladas en los cultivos infectados y, después de la ingestión, pueden conducir al desarrollo de enfermedades (micotoxicosis) en humanos y animales (Ueno 1977). El tipo y la cantidad de micotoxinas producida por una especie fúngica varía año a año y depende principalmente del cultivo, de las condiciones climáticas y de las condiciones de almacenamiento de los granos (Placinta et al. 1999). La producción de una micotoxina en particular es confinada a determinadas especies fúngicas y puede ser específica a una especie o aislamiento. Muchas micotoxinas son estables luego de procesos de elaboración de alimentos y bebidas y, por lo tanto, es posible encontrarlas también en los productos procesados (Lauren & Smith 2001). Los granos de cereales pueden ser contaminados con micotoxinas en el campo cuando las condiciones ambientales son favorables para la infección con el hongo y los niveles pueden ser incrementados durante el almacenamiento.

En los granos, la principal acumulación de micotoxinas se produce en los tejidos externos de las espigas (lema y palea) y, debido a que estos tejidos son retenidos en los granos de cebada luego de la cosecha y mantenidos en el procesamiento, los granos de cebada destinados a la industria pueden contener altos niveles de micotoxinas (Steffenson 2003).

Algunas etapas desarrolladas durante el proceso de malteado pueden reducir el contenido de toxinas inicial. Por ejemplo, en la etapa de remojo el

contenido de DON y ZEA puede ser reducido por la solubilización de estas toxinas. Sin embargo, debido a que las especies de *Fusarium* son capaces de crecer durante las primeras etapas del proceso de malteado, la toxina puede ser sintetizada durante la germinación y, considerando que es estable a 120 °C, los niveles no se alteran durante la etapa de secado (“kilning”), pudiéndose encontrar la toxina en el producto terminado (Schwarz 2003). A su vez, la presencia de toxinas influye en las etapas de la producción de cerveza como la fermentación, ya que puede afectar la funcionalidad de las levaduras (Hazel & Patel 2004).

Por otro lado, debido a que los lotes de granos que no superan los requisitos de comercialización son generalmente destinados a la alimentación animal, granos contaminados con DON y ZEA pueden provocar diversos problemas de micotoxicosis, particularmente en cerdos, que incluyen rechazo del alimento, vomitos e hiperestrogismo (Trenholm et al. 1994; Zinedine et al. 2007).

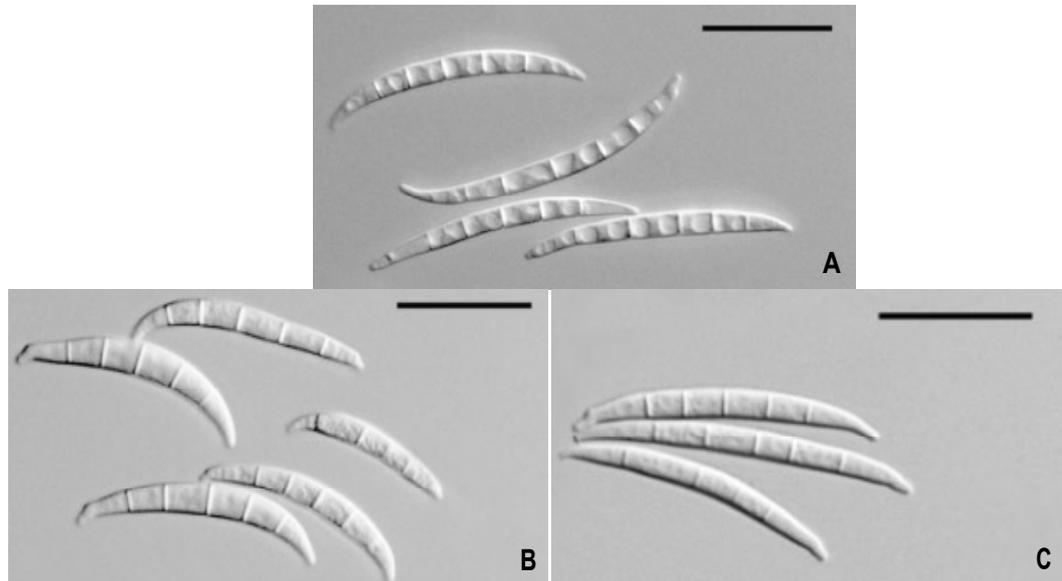
1.3 *Fusarium graminearum*

El mayor agente causal de la Fusariosis de la espiga en granos pequeños en todo el mundo es *Fusarium graminearum* Schwabe. Fue descrito en 1838 como el estado asexual de *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch, el cual fue aislado de maíz (*Zea mays* L.) por el micólogo americano Lewis David von Schweinitz en 1822 (Saccardo 1886). A diferencia de la mayoría de las especies de *Fusarium*, su estilo de vida es homotálico, es decir, que la reproducción sexual se realiza en un

solo talo, que es por lo tanto autocompatible (Nuevo Diccionario Ilustrado de Micología 2006). Su fuente primaria de inóculo son las ascosporas.

Tradicionalmente las especies de *Fusarium* han sido separadas en base a la morfología y las características de las colonias, como pigmentación, tipo de micelio, entre otras. El medio de cultivo recomendado para la identificación de las características morfológicas de los aislamientos es el Agar Agua con Clavel (CLA) debido a que favorece el desarrollo consistente, en forma y tamaño, de conidios, clamidosporas y otras estructuras morfológicas, mientras que para observar las características de las colonias se utiliza Agar Papa Glucosado (APG). Las colonias de *F. graminearum* a menudo pueden ser confundidas con *F. pseudograminearum* Aoki & O'Donnell y *F. cerealis* (Cooke) Sacc. (= *F. crookwellense* Burgess, Nelson & Toussoun). *Fusarium graminearum* y *F. pseudograminearum* se diferencian principalmente por la formación de peritecios en CLA o en Agar Zanahoria, *F. graminearum* es homotático y usualmente forma peritecios en ambos medios de cultivo mientras que *F. pseudograminearum* es heterotático y no puede formar peritecios (Leslie & Summerell 2006). Por otro lado, la diferencia con *F. cerealis* radica en la forma de los macroconidios, los cuales son más cortos y más anchos en la parte media que los macroconidios de *F. graminearum* (Figura 3).

Figura 3. Imágenes de macroconidios tomadas del ‘Manual del Laboratorio de *Fusarium*’ (Leslie & Summerell 2006). *Fusarium graminearum* (A), *F. cerealis* (= *F. crookwellense*)(B) y *F. pseudograminearum* (C) (Escala = 25 μ m).



Fusarium graminearum es considerado un complejo de especies, conocido como FGSC (“*Fusarium graminearum* species complex”), que comprende hasta la fecha 16 especies filogenéticas: *F. austroamericanum* (linaje 1), *F. meridionale* (linaje 2), *F. boothii* (linaje 3), *F. mesoamericanum* (linaje 4), *F. acaciae-mearnsii* (linaje 5), *F. asiaticum* (linaje 6), *F. graminearum sensu stricto* (*F. graminearum* s.s. linaje 7), *F. cortaderiae* (linaje 8) y *F. brasilicum*, *F. vorosii*, *F. gerlachii*, *F. aethiopicum*, *F. ussurianum*, *F. louisianense*, *F. nepalense*, *Fusarium* sp. (sin nombre asignado), a los cuales no se les ha asociado un número de linaje (Sarver et al. 2011; Aoki et al. 2012).

Se han realizado intensas comparaciones morfológicas de una colección mundial del complejo *F. graminearum*, pero solo seis especies y tres grupos de

especies fueron resueltos dentro del complejo *F. graminearum*, lo cual refleja su similar morfología y el solapamiento de las características de los conidios (Aoki et al. 2012). Por dicho motivo, la diferenciación de especies del complejo de *F. graminearum* radica fundamentalmente en el empleo de métodos moleculares, principalmente la amplificación de regiones conservadas y posterior secuenciación, dada la dificultad de diferenciarlas en base a sus características morfológicas.

Las especies del complejo *F. graminearum* tienen el potencial de producir tricotecenos del tipo B, de los cuales se han descrito tres diferentes quimiotipos: 15-ADON, cuando DON y 15-ADON es producido; 3-ADON, cuando DON y 3-ADON es producido y NIV, además de zearalenonas (Desjardins 2006). Cabe aclarar que existe una diferencia entre el significado de quimiotipo y genotipo. Mientras que el genotipo se refiere a la constitución genética o secuencia de ADN, el quimiotipo es utilizado cuando el fenotipo químico es expresado y detectado por análisis químicos (Desjardins 2008). La expresión de un genotipo de tricotecenos no siempre predice el correspondiente quimiotipo. Mientras que algunas especies del complejo *F. graminearum* comprenden solo un quimiotipo, por ejemplo *F. meridionale*, otras pueden contener dos o más quimiotipos diferentes dependiendo del origen geográfico de la población, por ejemplo *F. graminearum* s.s. y *F. asiaticum* (Tabla 1). Por otra parte, pese a que las especies del complejo *F. graminearum* presentan diferente origen geográfico y su distribución varía alrededor del mundo, pudiendo infectar varios cultivos (Tabla 1), algunas presentan preferencia por determinados hospedantes, por ejemplo,

F. asiaticum en arroz, *F. boothii* y *F. meridionale* en maíz y *F. graminearum* s.s. en trigo, cebada y maíz (van der Lee et al. 2015).

Tabla 1. Origen y distribución geográfica de especies, hospedantes conocidos y quimiotipo de tricoteceno tipo B de especies del complejo *F. graminearum* (Aoki et al. 2012).

Especie de FGSC	Origen Geográfico	Países de Ocurrencia	Hospedantes Conocidos	Quimiotipo de Tricotecenos		
				NV	3-ADON	15-ADON
<i>F. austroamericanum</i>	Sudamérica	Sudamérica (Brasil, Venezuela)	Vid herbácea, maíz	+	+	+
<i>F. meridionale</i>	Sudamérica	Sudamérica (Brasil), América Central (Guatemala), Sudáfrica, Australia, Nueva Caledonia, Nepal, Corea, EE.UU.	Cebada, maíz, trigo, suelo	+		
<i>F. boothii</i>	América Central	Sudáfrica, México, Guatemala, Nepal, Corea, EE.UU.	Maíz			+
<i>F. mesoamericanum</i>	América Central	América Central (Honduras), EE.UU.	Barana, hiedra de uva (<i>Parthenocissus tricuspidata</i>)	+	+	
<i>F. acaciae-mearnsii</i>	Hemisferio Sur	Australia, Sudáfrica	Acacia negra (<i>Acacia mearnsii</i>), suelo	+	+	
<i>F. asiaticum</i>	Asia	Asia (China, Nepal, Japón, Corea), Brasil, EE.UU.	Cebada, trigo, maíz, avena, arroz	+	+	+
<i>F. graminearum</i> s.s.	Norteamérica	Norteamérica, Sudamérica, Europa, Asia (Japón, China, Corea), Sudáfrica	Maíz, trigo, mijo, varios cereales, hoja de hellecho de cuero (<i>Rumex asiaticiformis</i>)	+	+	+
<i>F. cortaderiae</i>	Sudamérica	Sudamérica (Argentina, Brasil), Oceanía (Australia, Nueva Zelanda)	Pampae grass (<i>Cortaderia selloana</i>), maíz, clavel, cebada	+	+	
<i>F. brasiliicum</i>	Sudamérica	Brasil	trigo, suelo			
<i>F. vorasii</i>	Asia	Japón (Hokkaido), Hungría	Cebada, avena	+	+	
<i>F. gerlachii</i>	Norteamérica	EE.UU.	Trigo	+	+	+
<i>F. aethiopicum</i>	Hemisferio Sur	Etiopía	Trigo, caña gigante (<i>Arundo donax</i>)	+	+	
<i>F. ussuriicum</i>	Asia	Extremo este de la Federación Rusa	Trigo			+
<i>F. louisianense</i>	Norteamérica	EE.UU.	Trigo, avena	+	+	
<i>F. nepolense</i>	Asia	Nepal	Trigo			+
<i>Fusarium</i> sp. NRRL34461	Hemisferio Sur	Sudáfrica	Arroz			+
			Suelo			

Respecto a la distribución mundial de especies y su quimiotipo/genotipo de tricotecenos en trigo y cebada, en Asia se han aislado principalmente especies de *F. graminearum* s.s. con genotipo 3-ADON o 15-ADON y *F. asiaticum* con genotipo NIV (Suga et al. 2008). A su vez, se observó una distribución geográfica asociada a condiciones climáticas, en la cual se observaron predominantemente aislamientos de *F. asiaticum* productores de 3-ADON, 15-ADON y NIV en regiones cálidas y *F. graminearum* s.s. productor de 15-ADON en regiones frías (Zhang et al. 2007). En Europa, la principal especie del complejo *F. graminearum* aislada de cebada es *F. graminearum* s.s., encontrándose predominantemente el quimiotipo 15-ADON (van der Lee et al. 2015). En Norteamérica, la especie predominante es *F. graminearum* s.s. y se ha observado un reemplazo de los aislamientos con quimiotipo 15-ADON por los 3-ADON, sin embargo, también se ha reportado la presencia de *F. asiaticum* con genotipo de NIV (van der Lee et al. 2015).

En estudios llevados a cabo en Sudamérica en trigo y cebada la especie predominante es *F. graminearum* s.s. con genotipo 15-ADON, sin embargo se han identificado otras cinco especies que también afectan estos cultivos: *F. asiaticum* (NIV), *F. austroamericanum* (3-ADON), *F. brasiliicum* (NIV), *F. cortaderiae* (NIV) y *F. meridionale* (NIV) (Alvarez et al. 2009; Scoz et al. 2009; Astolfi et al. 2011, 2012; Reynoso et al. 2011; Pan et al. 2013, Umpierrez-Failache et al. 2013; Del Ponte et al. 2015).

1.3.1 Micotoxinas producidas por el complejo *F. graminearum*

Los principales tricotecenos producidos por las especies del complejo *F. graminearum* son DON y NIV, de los cuales las reglamentaciones vigentes han dado especial atención a DON, para el que se ha establecido un límite de $1,25 \mu\text{g g}^{-1}$ en cereales sin procesar por parte de la Comisión de Regulación (EC) de las comunidades europeas (Regulación EC 1881/2006, Regulación EC 1126/2007). Por otro lado, la Comisión del Codex Alimentarius, en la 38° reunión realizada en Suiza en Julio del 2015, ha establecido un límite de $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ para productos a base de cereales para lactantes y niños, $1 \mu\text{g g}^{-1}$ para harina, copos y sémola derivados de trigo, maíz y cebada y $2 \mu\text{g g}^{-1}$ para trigo, maíz y cebada destinado a procesamiento (FAO 2015). En la Argentina, existe un anteproyecto en el que se establecen niveles máximos de DON en cereales ($2 \mu\text{g g}^{-1}$), productos a base de cereales (harinas) ($1 \mu\text{g g}^{-1}$), alimentos a base de cereales para lactantes y niños de corta edad ($0,5 \mu\text{g g}^{-1}$) (Comisión del Codex Alimentarius 2013).

El DON, también conocido como vomitoxina, es un potente inhibidor de la ingesta de alimentos y tiene factor emético. Además, es conocido por afectar el tracto gastrointestinal y el sistema inmune (Rotter et al. 1996). Es un compuesto muy estable durante el almacenamiento y procesamiento de los alimentos y no se degrada a altas temperaturas (Scott 1991).

El NIV y su derivado 4-acetilnivalenol han sido reportados como inhibidores de síntesis de proteínas ribosomales en células animales y sistemas libres de células de la bacteria *Escherichia coli* (Desjardins 2006). La frecuencia de contaminación con NIV es de interés ya que es considerado más tóxico que DON

en humanos y animales domésticos (Minervini et al. 2004), sin embargo no hay reglamentaciones vigentes en cereales para esta toxina.

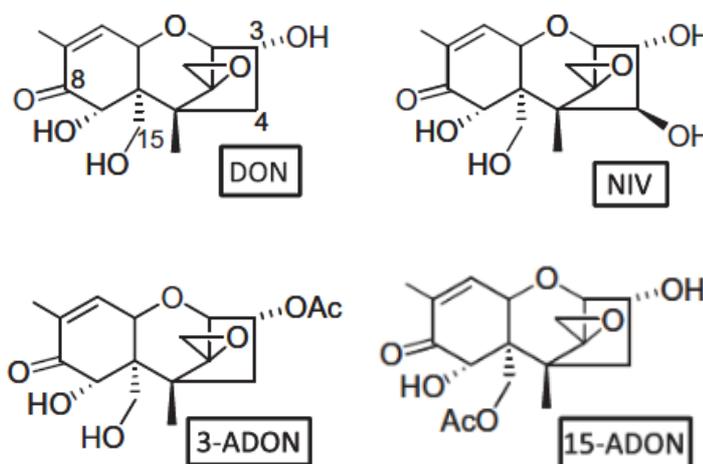
Otra micotoxina de importancia producida por las especies del complejo *F. graminearum* es la ZEA. El metabolismo de ZEA provoca la síntesis de diferentes metabolitos, entre ellos el α -zearalenol (comercialmente conocido como zeranol), un compuesto utilizado como promotor del crecimiento prohibido por la Unión Europea. Se ha encontrado la presencia de este metabolito en la orina de rumiantes y equinos, lo que ha sido asociado al metabolismo de ZEA y compuestos relacionados presentes naturalmente en las pasturas infectadas con especies de *Fusarium* (Miles et al. 1996). La producción de ZEA se ve favorecida en condiciones de alta humedad (Blaney et al. 1998), por lo que es importante realizar un adecuado almacenamiento del grano cosechado para evitar el continuo desarrollo fúngico y la subsecuente contaminación con micotoxinas. La FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) propone, de acuerdo a los países, límites de entre 0,05 y 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ para maíz y otros cereales contaminados con esta toxina (FAO 2004), mientras que la Comisión de Regulación (EC) de las comunidades europeas establece un límite de 0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Regulación EC 1881/2006; Regulación EC 1126/2007).

1.3.2 Vías biosintéticas de las toxinas más importantes producidas por el complejo *F. graminearum*

La vía biosintética de los tricotecenos en las especies de *Fusarium* comienza con una ciclación de pirofosfato de farnesilo, el primer intermediario metabólico, para formar tricodieno. Esta reacción es codificada por el gen *TRI5*, el cual fue caracterizado por primera vez en la toxina T-2 producida por un aislamiento de *F. sporotrichioides* Sherbakoff (Hohn & VanMiddlesworth 1986; Hohn & Beremand 1989). Posteriormente, con la secuenciación del genoma de *F. graminearum* realizada en 2003 en el “Broad Institute” (Desjardins 2006), se determinó que los genes (*TRI*) que regulan la biosíntesis de tricotecenos están involucrados en tres loci: un “cluster” central que contiene la mayoría de los genes que controlan la biosíntesis de tricotecenos (*TRI8*, *TRI7*, *TRI3*, *TRI4*, *TRI6*, *TRI5*, *TRI10*, *TRI9*, *TRI11*, *TRI12*, *TRI13*, *TRI14*)(Brown et al. 2004), un “cluster” conformado por los genes *TRI1-TRI16* (Meek et al. 2003; Peplow et al. 2003) y el gen *TRI101* (Kimura et al. 1998).

Dentro de los tricotecenos de tipo B, NIV y DON difieren en la presencia/ausencia de un grupo hidroxilo en la posición del C-4 (Figura 5). La producción de DON versus NIV es catalizada por los genes *TRI13* y *TRI7* (Lee et al. 2001, 2002). En los aislamientos productores de DON, estos genes tienen múltiples inserciones y deleciones que impiden la formación de un grupo hidroxilo en la posición del C-4 (Brown et al. 2002; Lee et al. 2002). En cuanto a 3-ADON y 15-ADON, estos difieren en la presencia de un grupo acetilo en los C-3 o C-15, respectivamente, como se observa en la Figura 5. Tres genes pueden controlar la presencia y ausencia de las funciones acetilo en las posiciones de C-3 y C-15: *TRI101* que codifica la acetilación en C-3 de isotricodermol a isotricodermin; *TRI3* que codifica una enzima que cataliza la acetilación en el C-15; *TRI8* que cataliza la eliminación del grupo acetilo en el C-3 (Desjardins 2006). Se ha hipotetizado que la falta de expresión o función del *TRI3* o *TRI8* provoca la formación de 3-ADON (Kimura et al. 2003).

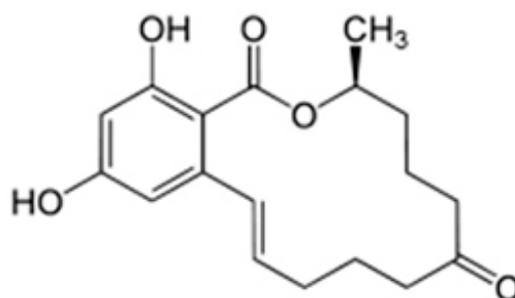
Figura 5. Estructura química de DON, NIV, 3-ADON y 15-ADON.



A su vez, respecto a los derivados acetilados de DON, inicialmente se correlacionaron los polimorfismos en la secuencia de los genes *TRI3* y *TRI12* con los genotipos 3-ADON y 15-ADON y se utilizaron como marcadores para distinguir entre estos genotipos (Quarta et al. 2006; Starkey et al. 2007). El gen *TRI12* es una bomba de eflujo de tricotecenos, aislado en un principio del “cluster” *TRI5* de *F. sporotrichioides*, que cuando se expresa junto al gen *TRI3* incrementa significativamente la tasa de conversión y acumulación de calonectrin en transformantes de levadura (Desjardins 2006).

Por otro lado, la biosíntesis de ZEA incluye diferentes ciclizaciones y modificaciones de un precursor nonacético. Para su biosíntesis son requeridos dos policétidos sintasas contiguos (Desjardins 2006). Lysøe et al. (2006) determinaron que el gen *PKS4* codifica una enzima necesaria para la producción de ZEA. PKSs (“Fungal polyketide synthases”) son enzimas multidominio con función iterativa. Se han identificado 15 genes *PKS* en *F. graminearum*, de los cuales ocho tienen un dominio ER (“enoyl reductase”) requerido para la biosíntesis de ZEA (Lysøe et al. 2006). En la figura 6 se observa la estructura química de ZEA.

Figura 6. Estructura química de ZEA.



1.4 Técnicas moleculares para identificación de especies y para estudios de variabilidad

El desarrollo de la Biología Molecular a fines de la década del 80 y principios del 90 permitió disponer de técnicas para identificar con mayor precisión a las especies fúngicas causantes de enfermedades en los cultivos, como así también para determinar la capacidad de producir micotoxinas. El desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (“Polymerase Chain Reaction”-PCR), creada por Kary B. Mullis en 1983, permitió desarrollar técnicas rápidas y eficientes tendientes a corroborar y/o acelerar el proceso de identificación. Nicholson et al. (1998) desarrollaron dos pares de cebadores para la identificación del complejo *F. graminearum*, uno de los cuales (Fg16N) amplifica un fragmento de 280 pb (pares de bases), mientras que el otro (Fg16) amplifica diferentes fragmentos en un rango de 380-580 pb dependiendo de la especie dentro del complejo *F. graminearum*. Debido a la diversidad de especies dentro del complejo *F. graminearum*, para la identificación de las mismas se ha utilizado la amplificación de diferentes fragmentos conservados en la especies, y posterior secuenciación, como el *Factor de elongación de traducción* (“Translation elongation factor”-TEF), *Reductasa (RED)*, *Tricotecen 3-O-acetiltransferasa (Tri101)*, *Fosfato permeasa (PHO)*, entre otros (O’Donnell et al. 2000). Por otro lado, para determinar las micotoxinas que puede producir cada especie se han diseñado cebadores basados en la secuencias de los genes involucrados en las vías biosintéticas de cada toxina. Por ejemplo, se desarrollaron cebadores basados en los genes *TRI* para determinar la potencial

producción de tricotecenos y en el gen *PKS4* para la producción de ZEA (Chandler et al. 2003; Quarta et al. 2006; Meng et al. 2010).

El conocimiento de la variabilidad genética del patógeno es importante para entender el impacto de ciertas fuerzas evolutivas sobre la dinámica de la población y la epidemiología de la enfermedad. Hay dos mecanismos responsables de la variabilidad en hongos (Agrios 1999):

- La mutación, que es un cambio repentino en el material genético de un organismo, que es transmitido hereditariamente a la progenie. Las mutaciones representan cambios en la secuencia de bases del ADN, ya sea por sustitución de una base por otra, o por adición o delección de pares de bases. Las mutaciones ocurren espontáneamente en todos los organismos que se reproducen sexual o asexualmente.
- La recombinación de factores genéticos, que ocurre durante la división meiótica del cigoto durante la reproducción sexual. En los hongos los núcleos haploides suelen dividirse mitóticamente para producir micelio y esporas haploides, que resultan en grupos de individuos genéticamente distintos, que pueden producir asexualmente grandes poblaciones hasta el siguiente ciclo sexual.

Las características de los individuos que resultan de un proceso sexual difieren, aun cuando dichos individuos conservan muchas características de los progenitores. En el caso de los individuos que se reproducen de manera asexual, la frecuencia y el grado de variabilidad entre la progenie disminuye, mas allá de que aun muestren ciertas características diferentes (Agrios 1999).

Se han desarrollado muchas técnicas para estudiar la variabilidad genética de los individuos, incluyendo Polimorfismos de ADN Amplificados al Azar (“Random Amplified Polymorphic DNA”-RAPD), Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos Amplificados (“Amplified Fragment Length Polymorphism”- AFLP), Polimorfismos de Amplificación de Secuencias Relacionadas (“Sequence-Related Amplified Polymorphism”-SRAP), Número Variable de Repeticiones en Tándem (“Variable Number of Tandem Repeats”-VNTR), Polimorfismos de Nucleótidos Simples (“Single Nucleotide Polymorphism”-SNP) (Wang et al. 2011). La elección de cada marcador depende de la disponibilidad, el conocimiento o la preferencia del investigador.

1.4.1 Marcadores AFLP

Uno de los marcadores comúnmente utilizados para estudiar la diversidad genética y la estructura de la población en el complejo *F. graminearum* es AFLP (Monds et al. 2005; Akinsanmi et al. 2006a; Ramirez et al. 2007; Qu et al. 2008; Lee et al. 2009; Alvarez et al. 2011; Astolfi et al. 2012).

Esta técnica, descrita por Vos et al. (1995), es basada en la amplificación de fragmentos de restricción de un total de ADN genómico digerido, mediante una PCR.

La técnica involucra tres pasos:

- Generación de los fragmentos de restricción: el ADN es cortado con enzimas de restricción y luego los adaptadores son ligados a los extremos de los fragmentos de ADN para generar el ADN templado para

la amplificación. La secuencia de los adaptadores y el adyacente sitio de restricción sirve como sitio de unión de los cebadores para la subsecuente amplificación de los fragmentos de restricción.

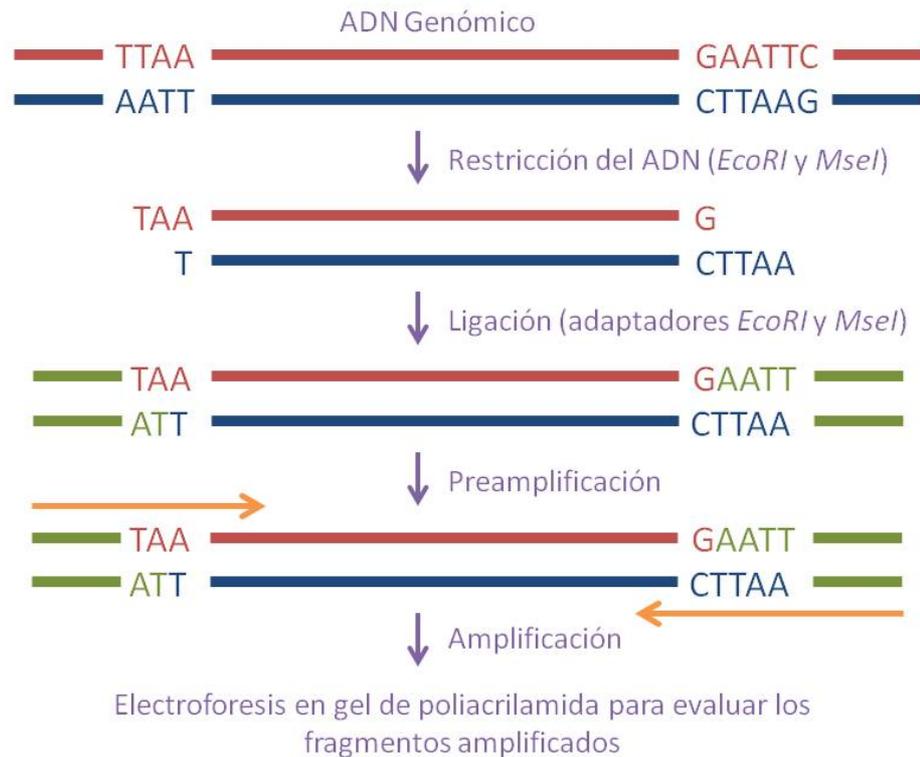
- Amplificación selectiva de los fragmentos de restricción: los nucleótidos selectivos son incluidos en el extremo 3' de los cebadores para amplificar un grupo de los fragmentos de restricción. Los cebadores AFLP constan de tres partes: el extremo 5' correspondiente al adaptador, la secuencia del sitio de restricción y los nucleótidos selectivos en el extremo 3'. Para ADN complejo, se utiliza un paso de preamplificación, donde el ADN es amplificado con cebadores con un solo nucleótido selectivo y luego el producto de la amplificación es diluido y utilizado como templado para la amplificación, utilizando cebadores con dos o tres nucleótidos selectivos. Todos los cebadores de AFLP comienzan con un residuo de guanina (G) en el extremo 5', lo cual previene el fenómeno de dobles bandas. El número de fragmentos amplificados puede ser controlado por la naturaleza y por el número (dos o tres) de nucleótidos selectivos.

- Análisis de los fragmentos amplificados.

Mediante este método los fragmentos de restricción generados pueden ser visualizados sin conocimiento previo de la secuencia de nucleótidos, utilizándose ADN de cualquier origen o complejidad (Vos et al. 1995). La principal desventaja de este método es su costo y complejidad, debido a que requiere

múltiples pasos de digestión, ligación y amplificación, los cuáles son difíciles de optimizar.

Figura 7. Diagrama de la técnica AFLP.



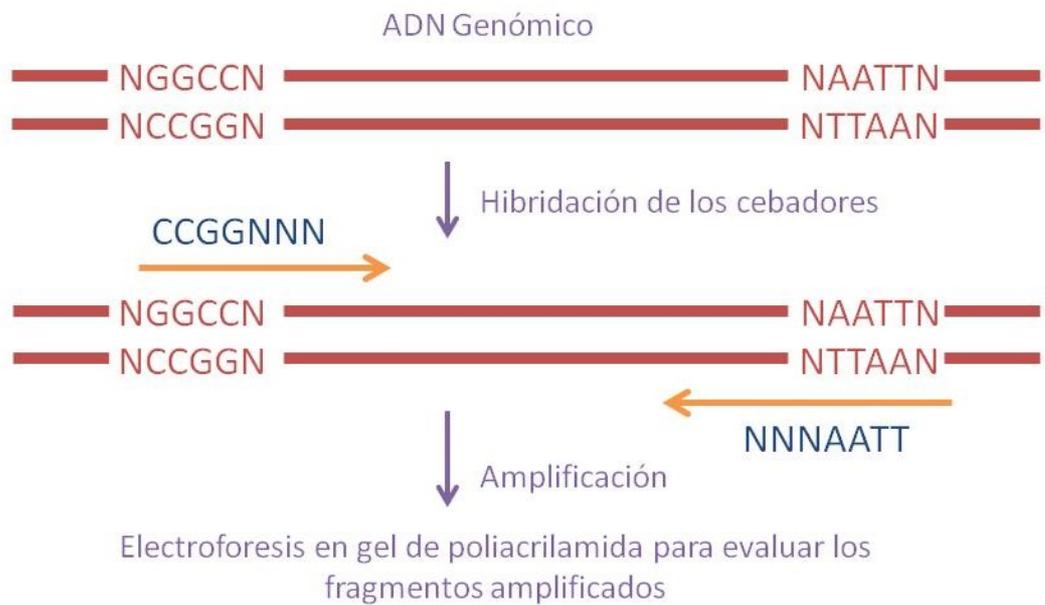
1.4.2 Marcadores SRAP

Otra técnica que se ha empleado para estudiar la variabilidad genética de las especies del complejo *F. graminearum* son los marcadores SRAP (Fernando et al. 2006; Guo et al. 2008). Fue desarrollada por Li & Quiros (2001), con el objetivo de amplificar marcos abiertos de lectura ("Open Reading Frames"-ORFs).

Esta técnica se basa en una amplificación mediante PCR con dos cebadores. El cebador directo (“Forward”) consiste en una secuencia central de 14 bases de longitud. Las primeras 10 bases en el extremo 5’ son una secuencia de relleno de constitución no específica, continua una secuencia ‘CCGG’ y luego tres nucleótidos selectivos en el extremo 3’. El cebador reverso (“Reverse”) contiene la misma secuencia de relleno que el cebador directo, a la cual continua una secuencia ‘AATT’ seguida de tres nucleótidos selectivos en el extremo 3’. Ambos cebadores tienen un contenido GC de 40-50 %.

El propósito de utilizar una secuencia ‘CCGG’ es amplificar preferencialmente regiones exónicas, mientras que las secuencias ‘AATT’ son utilizadas para amplificar preferentemente regiones intrónicas y regiones con promotores. Mientras las secuencias exónicas son generalmente conservadas entre los individuos, los intrones y promotores son usualmente variables. Esta disimilitud hace posible generar fragmentos polimórficos basados en intrones y exones. La posibilidad de esta técnica de amplificar ORFs la hace interesante para determinar si los fragmentos generados por estos marcadores codifican para proteínas de interés.

La técnica de SRAP combina simplicidad, seguridad y la posibilidad de secuenciar fragmentos seleccionados con el objetivo de detectar ORFs.

Figura 8. Diagrama de la técnica SRAP.

1.5 Métodos para la cuantificación de micotoxinas

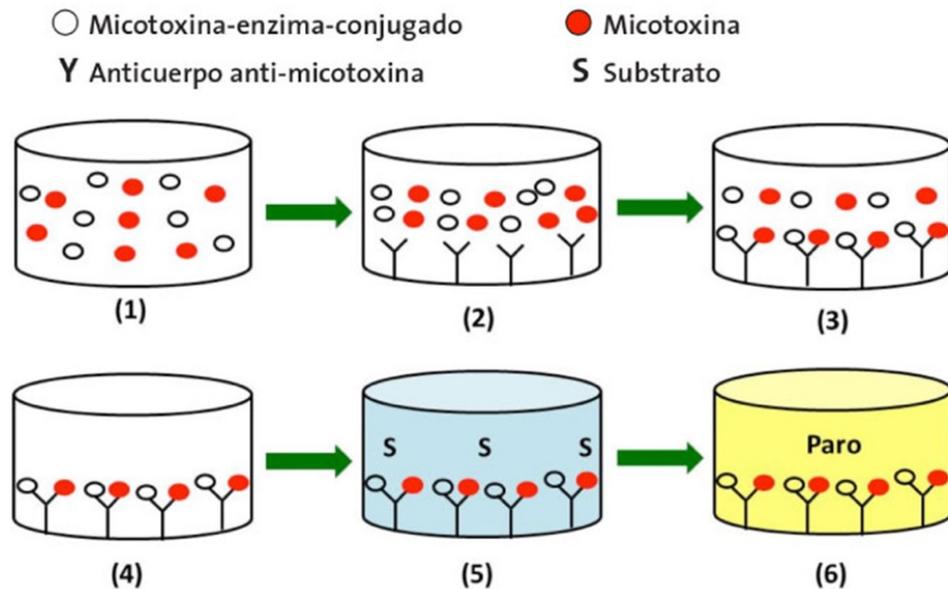
Dada la importancia de las micotoxinas tanto por sus efectos nocivos para la salud humana y animal como por las implicancias que tienen en la industria alimenticia, el número de regulaciones sobre el contenido máximo de micotoxinas permitido en alimentos se ha extendido a varios países (FAO 2004). Para determinar dicho contenido de micotoxinas se han empleado varios métodos, entre los que se incluyen las técnicas cromatográficas, las cuales son basadas en la distribución o partición de una muestra entre dos fases: una fase estacionaria y una fase móvil. Aquellos componentes que son mantenidos preferentemente en la fase estacionaria se conservan más tiempo que los que son distribuidos selectivamente en la fase móvil. Como consecuencia los solutos son eluidos del sistema a concentraciones locales en la fase móvil en orden de su

coeficiente de distribución creciente con respecto a la fase estacionaria, lográndose de este modo la separación. El sistema de distribución (la parte donde los solutos son distribuidos entre las dos fases) puede estar constituido por una columna formada por un tubo rellena de un material particulado en el cual la fase estacionaria está unido o recubierto. La fase móvil, que puede ser gas o líquida, pasa bajo presión a través de la columna para eluir la muestra. Como resultado de diferentes fuerzas entre las moléculas y la fase estacionaria, cada soluto es retenido en diferente grado y, de este modo, los que son retenidos débilmente eluyen primero y los retenidos más fuertes después. Dentro de estas técnicas se encuentra la cromatografía gaseosa (“Gas Chromatography”-GC), desarrollada en 1941 por Martin & Synge como una alternativa a la cromatografía líquida, sugiriendo que la fase móvil líquida podía ser reemplazada por un gas adecuado. Dicha recomendación fue basada en el hecho que debido a la mayor difusividad de los solutos en los gases, comparado con los líquidos, el proceso de equilibrio involucrado en los procesos cromatográficos puede ser mucho más rápido y así las columnas más eficientes y los tiempos de separación más cortos.

Debido a la necesidad de las industrias alimenticias de obtener resultados en cortos períodos de tiempo, se han desarrollado métodos simples, rápidos y fáciles de usar, que proveen resultados confiables para el análisis de micotoxinas. Dentro de estos métodos se encuentra la técnica de ELISA (“Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay”), el cual es un enzimo-inmuno ensayo directamente

competitivo basado en la habilidad de un anticuerpo específico de distinguir estructuras tridimensionales de una micotoxina específica.

Figura 9. Diagrama de la técnica ELISA.



La toxina es extraída de la muestra molida con un solvente y luego una parte del extracto de la muestra y el conjugado enzima-toxina son mezclados (1) y dispuestos en los pocillos recubiertos con anticuerpos (2). Las toxinas de las muestras y los estándares de control compiten con el conjugado por los sitios de unión de los anticuerpos (3). Después de un paso de lavado (4), se agrega el sustrato para la enzima y se desarrolla un color azul (5). La intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración de la toxina en la muestra o al estándar. Luego se agrega una solución "stop", para detener la reacción, y la solución se torna color amarillo (6). Finalmente, se realiza una medición óptica

utilizando un lector ELISA con un filtro de absorbancia de 450 nm y se comparan la densidad óptica de las muestras con las de los estándares.

1.6 Situación a nivel mundial y nacional del complejo *F. graminearum* en cebada

Mundialmente, en comparación con los estudios llevados a cabo en trigo, se han realizado pocos trabajos en los que se evalúe la contaminación de granos de cebada con aislamientos del complejo *F. graminearum*. En China, Yang et al. (2008) determinaron que la especie predominante causante de la Fusariosis de la espiga en cebada fue *F. asiaticum*, siendo también encontradas especies de *F. graminearum* s.s. y *F. meridionale*, mientras que Boutigny et al. (2014) reportaron que la única especie aislada de cebada en Francia fue *F. graminearum* s.s. En Sudamérica, el único trabajo realizado en cebada fue realizado en Brasil por Astolfi et al. (2011). Dichos autores determinaron que tres especies del complejo *F. graminearum* fueron las principales causantes de la Fusariosis de la espiga en cebada: *F. graminearum* s.s., *F. meridionale* y *F. austroamericanum*, siendo detectados los tres genotipos de tricotecenos.

En la Argentina, los estudios del complejo *F. graminearum* para evaluar el genotipo o la producción de tricotecenos NIV, DON, 15-ADON, 3-ADON se han llevado a cabo principalmente en trigo, aunque también se han realizado trabajos en maíz y soja. En la mayoría de los casos, la especie predominante fue *F. graminearum* s.s. con genotipo 15-ADON, aunque también se han aislado especies de *F. meridionale* y *F. boothii* (Alvarez et al. 2009; Reynoso et al. 2011;

Barros et al. 2012; Sampietro et al. 2011). Sin embargo, no se han realizado trabajos en los que se evalúe el perfil genético y químico de aislamientos del complejo *F. graminearum* obtenidos de cebada.

Por otro lado, a nivel mundial se han realizado diversos trabajos en los que se evalúa el efecto de *F. graminearum* en parámetros de calidad de cebada, como el contenido de proteínas, el peso de mil granos, la capacidad germinativa, además de parámetros de calidad de importancia en la malta, uno de los productos obtenidos del procesamiento de los granos, como las proteínas en el mosto, el color y la viscosidad del mosto, el extracto de malta, entre otros. Otro parámetro de calidad evaluado de gran relevancia, es la contaminación con micotoxinas tanto en los granos como en la malta y en la cerveza, así como el efecto de “gushing” (salida abrupta de espuma de las cervezas), el cual es provocado por la contaminación con DON (Schwarz et al. 1995, 2006; Choo et al. 2004; Sarlin et al. 2005; Ma et al. 2009; Clear et al. 2013). Sin embargo, en la Argentina no se han realizado trabajos de los efectos de *F. graminearum* en cebada.

Dada la importancia mundial de este patógeno, por ser el principal causante de la Fusariosis de la espiga en cereales y considerando el potencial de producir micotoxinas de estas especies, de relevancia tanto para la salud de los consumidores como para la calidad de los granos destinados a la industria, se plantea como hipótesis y objetivos del presente trabajo:

1.7 Hipótesis

 “Los aislamientos de *Fusarium graminearum* son heterogéneos a nivel genómico y poseen un variado potencial de producción de toxinas que alteran los niveles de calidad de los granos de cebada”.

1.8 Objetivo General

 Aportar conocimientos básicos sobre uno de los patógenos fúngicos de interés agro-alimenticio más importante como generador de mermas en el rendimiento de los cultivos y como productor de toxinas nocivas para la salud humana y de los animales.

1.8.1 Objetivos Específicos

 Evaluar la variabilidad genética de aislamientos de *Fusarium graminearum* obtenidos de granos de cebada.

 Determinar la potencialidad en la producción de toxinas: nivalenol, deoxinivalenol y los derivados 3-acetildeoxinivalenol / 15-acetildeoxinivalenol y zearalenonas.

 Evaluar la implicancia de *F. graminearum* en los aspectos que hacen a la calidad agro-industrial de los granos de cebada.

CAPÍTULO II

Materiales y Métodos Generales

2.1 Recolección de las muestras

En este estudio fueron analizadas 130 muestras de cebada de distintas variedades provenientes de las principales zonas productoras de la provincia de Buenos aires y sur de Santa Fe, de las campañas 2010, 2011 y 2012 (Figura 10). Las muestras fueron recolectadas o cedidas por los productores en bolsas conteniendo 2 Kg de material. Luego fueron reducidas al azar a 200 g y almacenadas en la heladera hasta su utilización.

Figura 10. Mapa satelital de la zona de muestreo y número de muestras por localidad (entre paréntesis).



2.2 Obtención de los aislamientos e identificación morfológica de los mismos

Para la obtención de los aislamientos de *F. graminearum*, las muestras de cebada (200 g) fueron reducidas a 400 granos con un divisor de granos “Cuarteador peine” Cerealtools® y desinfectadas superficialmente mediante un

lavado con hipoclorito de sodio al 1 %, un lavado con alcohol al 70 % y finalmente, dos lavados con agua destilada estéril, todos por un tiempo de 2 min. Posteriormente, los granos desinfectados fueron sembrados en placas de Petri estériles (10 cm de diámetro) conteniendo APG 2 % con cloranfenicol (Anexo I), para evitar el crecimiento bacteriano, mediante la utilización de una pinza previamente flameada, e incubados en una cámara de crecimiento por 5-7 días a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ con alternancia de 12 hs luz/oscuridad.

Transcurrido dicho período de tiempo, se seleccionaron aquellos aislamientos que presentaban características similares a *F. graminearum* (colonias rosadas o rojizas con abundante micelio color blanco, pardo o rosado)(Figura 11) para realizar la determinación morfológica de los mismos. Para ello, los aislamientos seleccionados fueron repicados a placas de Petri estériles (5,5 cm de diámetro) con CLA (Anexo I) y a tubos APG 2 % pico de flauta (Figura 12 y 13)(Leslie & Summerell 2006) e incubados aproximadamente 15 días en las mismas condiciones descritas anteriormente.

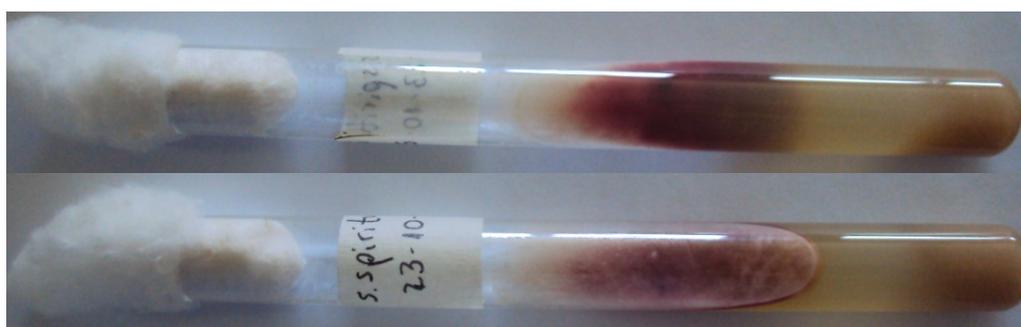
Figura 11. Colonia de *F. graminearum* en APG 2 %.



Figura 12. Colonia de *F. graminearum* en CLA.



Figura 13. Colonia de *F. graminearum* en tubo APG 2 % pico de flauta.



Luego fueron realizados los preparados microscópicos para realizar la identificación morfológica utilizando un microscopio óptico binocular (Olympus CX31), teniendo en cuenta que los aislamientos de *F. graminearum* usualmente presentan macroconidios delgados semicurvados a casi rectos, con 5-6 septos, con célula apical cónica y célula basal en forma de pie y es común observar clamidosporas en los macroconidios, mientras que no presentan microconidios. En cuanto a las características observadas en APG, es usual observar gran cantidad de micelio denso que varía de blanco a naranja pálido, con pigmentos

rojos en el agar. A su vez, es común observar esporodoquios rojos-marrones a naranja, los cuales son producidos lentamente (Leslie & Summerell 2006). Como se mencionó anteriormente, las colonias de *F. graminearum* pueden ser fácilmente confundidas con las colonias de *F. pseudograminearum* y *F. cerealis* por la características morfológicas similares que comparten.

Los aislamientos que presentaban características similares a las mencionadas para *F. graminearum*, fueron repicados a tubos con Agar sintético pobre en nutrientes (“Synthetic Nutrient-Poor Agar”-SNA)(Anexo I) para realizar posteriormente los cultivos monospóricos, ya que este medio promueve la esporulación y el buen desarrollo de las células conidiógenas. Se dejaron incubar los tubos durante 5 días, luego se cosechó una cantidad de micelio y se realizó una suspensión de conidios en tubos conteniendo 2 mL de agua destilada estéril. Finalmente, se midieron 50 μ L de dicha suspensión, se sembraron en placas de Petri estériles (10 cm de diámetro) con SNA y se esparció el contenido con una espátula de Drigalski, realizando de esta manera una siembra en superficie. Las placas se incubaron en una cámara de crecimiento durante 1-2 días a 25 ± 2 °C con alternancia de 12 hs luz/oscuridad. Transcurrido dicho período de tiempo, se observó bajo lupa binocular estereoscópica (Biotraza) y, con la ayuda de un ansa estéril, se recortó una porción de agar conteniendo un conidio germinado y se transfirió a otra placa de Petri con SNA.

2.3 Extracción del ADN

La extracción del ADN se realizó siguiendo el protocolo CTAB (Cetil-Trimetil-Bromuro de Amonio) modificado (Stenglein & Balatti 2006). Para ello, cada aislamiento monospórico caracterizado morfológicamente fue repicado a dos placas de Petri estériles (10 cm de diámetro), conteniendo APG 2 %, e incubado en una cámara de crecimiento durante 5 días a 25 ± 2 °C con alternancia de 12 hs luz/oscuridad. Una vez desarrollada cada colonia, se raspó el micelio con una espátula previamente desinfectada con alcohol etílico al 70 % y se colocó en un mortero. Luego, se agregó nitrógeno líquido y se molió rápidamente, realizando de esta manera la lisis mecánica de las células fúngicas. Seguidamente, se agregaron 800 μ L del “buffer” CTAB, 200 μ L de CTAB 10 % (Anexo I), 1 μ L de β -mercaptoetanol y 1 % de polivinil-pirrolidona (PVP), para provocar la lisis química de las células, y se mezcló hasta obtener una consistencia semilíquida. Posteriormente, se traspasó el contenido del mortero a dos tubos Eppendorf estériles de 2 mL y se incubó en un termobloque seco a 60 °C durante 30 min para desnaturalizar las proteínas. Transcurrido ese tiempo, se agregó a cada tubo Eppendorf aproximadamente 600 μ L de cloroformo-isoamilalcohol (12:1 v/v) y se centrifugó 5 min a 14000 rpm, de esta manera se obtuvieron tres fases: la acuosa superior en la que se encontraban los ácidos nucleicos y la orgánica inferior en la que se encontraban lípidos, polisacáridos y pigmentos, mientras que en la interfase se encontraban las proteínas y los restos celulares. Se tomó la fase superior y se colocó en otro Eppendorf estéril de 2 mL, se le adicionó 2/3 de isopropanol frío (500-600 μ L) para realizar la precipitación

del ADN y se colocó en el freezer (-20 °C) durante una noche. A continuación, se centrifugó 7-10 min a 14000 rpm, se descartó la fase líquida, se lavó el pellet con 200-400 µL de etanol 75 % - acetato de amonio 10 mM, se golpeó suavemente para lograr el desprendimiento de pellet del fondo del Eppendorf y se centrifugó nuevamente. Se repitió el procedimiento realizando el lavado con 200-300 µL de etanol 70 % frío. Finalmente, se descartó la fase líquida, se dejó secar el pellet colocándolo invertido sobre capas de papel secante y luego se realizó la resuspensión con 100-150 µL de “buffer” TE (Tris/HCl-EDTA)(Anexo I).

2.4 Determinación de la calidad y cuantificación del ADN obtenido

La determinación de la calidad del ADN obtenido se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 0,80 % conteniendo 3 µL de GelRed™, lo cual permite la visualización de los fragmentos mediante irradiación UV debido a que el GelRed se intercala con la molécula de ADN. Para ello se sembraron 8 µL de ADN, junto con 2 µL de azul de bromofenol sacarosa (Anexo I), el cual fue utilizado para proporcionar densidad y contener las muestras en las calles al momento de la siembra, y se realizó la corrida electroforética a 80 V durante 2 hs, utilizando “buffer” TBE (Tris base-Ácido bórico-EDTA)(Anexo I) 1 X. Luego se realizó la visualización con luz UV. Los geles de agarosa fueron registrados con el sistema de documentación digital DOC-6490 (Biodynamics S.R.L., Buenos Aires, Argentina).

La cuantificación del ADN se realizó con el fluorómetro Qubit™ (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.5 Identificación molecular de los aislamientos del complejo *F. graminearum*

Para confirmar la identificación morfológica, se realizó una PCR utilizando los cebadores clado-específicos y especie-específicos Fg16N F/R y Fg16 F/R, respectivamente, (Nicholson et al. 1998) a todos los aislamientos caracterizados morfológicamente como especies del complejo *F. graminearum*. Los cebadores Fg16N amplifican un fragmento monomórfico de 280 pb. Por otro lado, los cebadores Fg16 dan un producto de distinto tamaño para algunas de las especies del complejo *F. graminearum*: ± 400 pb para *F. graminearum* s.s. (23652 utilizado como control), ± 550 pb para *F. asiaticum* (NRRL 13818 utilizado como control) y ± 500 pb para *F. meridionale* (NRRL 28436 utilizado como control)(Waalwijk et al. 2003; Mugrabi de Kuppler et al. 2011; Covarelli et al. 2015). En todas las reacciones se utilizó como control negativo un aislamiento de *F. cerealis* (Herrero5). En la Tabla 2 se muestran las secuencias de los cebadores utilizados.

Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo utilizando 10-20 ng de ADN en un volumen total de 25 μ L, conteniendo 10 X de “buffer” de reacción (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 MgCl₂, 1 μ M de cada cebador, 30 μ M de dNTP (Genbiotech S.R.L., Buenos Aires, Argentina), 1 U de *Taq* ADN polimerasa (Inbio-Highway, Tandil, Argentina), 0,014 % de solución de Cresol Red (Sigma-Aldrich Co. St Louis, MO), 0,0005 % Tween 20®, 0,0005 % Nonidet P40® y agua destilada estéril hasta completar volumen final.

Las amplificaciones fueron realizadas en un XP termociclador (Bioer Technology Co.), realizando una PCR “touchdown”, para lo cual se comenzó con

un ciclo de desnaturalización a 95 °C por 30 s. La temperatura de apareamiento (“annealing”) fue de 66 °C para los primeros cinco ciclos, seguido de cinco ciclos a 64 °C y 62°C para los siguientes 15 ciclos, todos durante 20 s. Seguidamente, se realizó la extensión a 72 °C durante 45 s, terminando con un paso de extensión de 5 min.

Los fragmentos del ADN amplificados fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % conteniendo 3 µL de GelRed™. Para determinar el tamaño de los fragmentos amplificados se utilizó un marcador de peso molecular conocido de 100 pb (Genbiotech S.R.L., Buenos Aires, Argentina) con un rango de fragmentos distinguibles de 100 pb a 1500 pb. La corrida electroforética se realizó con una corriente de 80 V constantes durante 2 hs, utilizando “buffer” TBE 1 X. Transcurrido el tiempo de corrida, se realizó la visualización de los fragmentos mediante luz UV. Los geles de agarosa fueron registrados con el sistema de documentación digital DOC-6490 (Biodynamics S.R.L., Buenos Aires, Argentina).

Tabla 2. Secuencias de los cebadores utilizados para corroborar molecularmente los aislamientos del complejo *F. graminearum*.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Fragmento Amplificado (pb)
Fg16 F	CTC CGG ATA TGT TGC GTC AA	380-580
Fg16 R	GGT AGG TAT CCG ACA TGG CAA	
Fg16N F	ACA GAT GAC AAG ATT CAG GCA CA	280
Fg16N R	TTC TTT GAC ATC TGT TCA ACC CA	

2.6 Conservación de los aislamientos

Los aislamientos obtenidos del complejo *F. graminearum* fueron conservados en heladera a 4 °C en tubos pico de flauta con SNA, utilizando dos tubos por aislamiento. A su vez, se utilizaron para la conservación tubos Eppendorf de 2 mL conteniendo fragmentos de SNA con los aislamientos desarrollados. Se utilizó este medio de cultivo debido a la capacidad que posee de evitar mutaciones en las cepas fúngicas, conservando el material genético original.

2.7 Determinación del potencial toxicogénico (Genotipo)

El potencial toxicogénico de los aislamientos del complejo *F. graminearum* fue clasificado en NIV o DON con los cebadores Tri13NIV F/R y Tri13DON F/R, respectivamente (Chandler et al. 2003). NIV, DON, 15-ADON y 3-ADON también fueron determinados por una PCR “multiplex” con los cebadores Tri7F340/Tri7R965, 3551H/4056H, Tri3F971/Tri3R1679 y Tri3F1325/Tri3R1679, respectivamente (Quarta et al. 2006) (Tabla 3).

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µL, utilizando los mismos reactivos y en las mismas concentraciones mencionados anteriormente. El termociclador (XP Thermal Cycler, Bioer Technology Co.) fue programado con un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min. Luego, se programó una desnaturalización a 95 °C por 30 s, apareamiento (“annealing”) a 58 °C por 30 s (para los cebadores Tri13DON y Tri13NIV) y a 53 °C por 30 s (para

la PCR “multiplex”) y extensión a 72 °C por 45 s, repitiendo dicho ciclo 29 veces. Por último, se realizó una extensión final a 72 °C por 2 min.

A su vez, se realizó una reacción de PCR a todos los aislamientos del complejo *F. graminearum* con los cebadores PKS4 F/R (Meng et al. 2010) para determinar el potencial de producir ZEA. Se procedió con las mismas condiciones descritas anteriormente, utilizando como temperatura de apareamiento 60 °C. Las secuencias de los cebadores utilizados son descritas en la Tabla 3.

Los controles positivos utilizados en las reacciones de PCR fueron: *F. graminearum* s.s. B26/1 (genotipo 15-ADON), *F. austroamericanum* 2903 (genotipo 3-ADON) y *F. meridionale* 28436 (genotipo NIV). Para la reacción con los cebadores PKS4 F/R se utilizó como control positivo un aislamiento de *F. cerealis* (Herrero5). A su vez, fue incluido en cada reacción de PCR un aislamiento de *F. poae* (Hpu1a&) utilizado como control negativo.

Los productos de PCR fueron sembrados en geles de agarosa al 1,5 % con 3 µL de GelRed™, en cubas de electroforesis conteniendo “buffer” TBE 1 X. Las corridas electroforéticas se realizaron a 80 V durante 2 hs y los fragmentos amplificados fueron visualizados por irradiación con luz UV. Junto a la siembra de los productos de PCR fue incluido un marcador de peso molecular conocido de 100 pb (Genbiotech S.R.L., Buenos Aires, Argentina) para determinar el tamaño de los fragmentos amplificados. Cada reacción de PCR fue realizada al menos dos veces, sembrando los controles positivos, el marcador de peso molecular y el control negativo en un mismo gel. Los geles de agarosa fueron registrados con el

sistema de documentación digital DOC-6490 (Biodynamics S.R.L., Buenos Aires, Argentina).

Tabla 3. Secuencias de los cebadores utilizados para determinar el potencial toxicogénico.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Fragmento Amplificado (pb)
Tri13NIV F	CCA AAT CCG AAA ACC GCA G	312
Tri13NIV R	TTG AAA GCT CCA ATG TCG TG	
Tri13DON F	CAT CAT GAG ACT TGT KCR AGT TTG GG	282
Tri13DON R	GCT AGA TCG ATT GTT GCA TTG AG	
Tri7F340	ATC GTG TAC AAG GTT TAC G	625
Tri7R965	TTC AAG TAA CGT TCG ACA AT	
3551H	ACT TTC CCA CCG AGT ATT TT	525
4056H	CAA AAA CTG TTG TTC CAC TGC C	
Tri3F971	CAT CAT ACT CGC TCT GCT G	708
Tri3R1679	TTR TAG TTT GCA TCA TTR TAG	
Tri3F1325	GCA TTG GCT AAC ACA TGA	354
Tri3R1679	TTR TAG TTT GCA TCA TTR TAG	
PKS4 F	CGT CTT CGA GAA GAT GAC AT	280
PKS4 R	TGT TCT GCA AGC ACT CCG A	

2.8 Secuenciación de aislamientos representativos

Para confirmar la identificación molecular de algunos aislamientos se amplificaron porciones de tres regiones conservadas: *Reductasa (RED)*, *Tricotecen 3-o-acetiltransferasa (Tri101)* y *Factor de elongación de traducción*

(“Translation elongation factor”-*TEF*)(O’Donnell et al. 2000; Ward et al. 2008). En la tabla 4 se observan las secuencias de los cebadores utilizados. La amplificación de las regiones *RED* y *Tri101* fue utilizada para los 10 aislamientos seleccionados al azar del complejo *F. graminearum* y *RED*, *Tri101* y *TEF* para los aislamientos de *F. cerealis* y *F. pseudograminearum*.

Tabla 4. Secuencias de los cebadores de las regiones conservadas utilizadas.

Cebador	Secuencia 5'-3'	Fragmento amplificado (pb)
RED F	AGA CTC ATT CCA GCC AAG	990
RED R	TCG TGT TGA AGA GTT TGG	
Tri101 F	CAA GAT ACA GCT CGA CAC C	1300
Tri101 R	CTG GGT AGT TGT TCG AGA	
TEF F	ATG GGT AAG GAR GAC AAG AC	600
TEF R	GGA RGT ACC AGT SAT CAT GTT	

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando 10-20 ng de ADN en un volumen total de 25 µL, conteniendo 10 X de “buffer” de reacción, 2,5 mM de MgCl₂, 1 µM de cada cebador, 30 µM de cada dNTP (Genbiotech S.R.L., Buenos Aires, Argentina), 1 U de *Taq* ADN polimerasa (Inbio-Highway, Tandil, Argentina), 0,0005 % de Tween 20®, 0,0005 % de Nonidet P40® y agua destilada estéril hasta completar volumen final.

Las amplificaciones fueron desarrolladas en un termociclador XP (Bioer Technology Co.), el cual fue programado con un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min. Luego, se programó una desnaturalización a 95 °C por 30 s,

apareamiento (“annealing”) a 57 °C por 30 s (*Tri101* y *RED*) o a 54 °C por 30 s (*TEF*), extensión a 72 °C por 45 s, repitiendo dicho ciclo 29 veces. Por último, se realizó una extensión final a 72 °C por 2 min.

Para visualizar los fragmentos amplificados, los mismos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % con 3 µL de GelRed™ a 80 V constantes durante 2 hs. Junto a los productos de PCR amplificados se sembró un marcador de peso molecular conocido de 100 pb (Genbiotech S.R.L., Buenos Aires, Argentina). Los geles de agarosa fueron registrados con el sistema de documentación digital DOC-6490 (Biodynamics S.R.L., Buenos Aires, Argentina).

Posteriormente, los productos de PCR fueron purificados mediante la utilización del Kit de purificación “Purelink™ Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo Kit” (Invitrogen, Löhne, Germany) siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante. Luego, se cuantificó el producto obtenido y se envió a secuenciar al instituto de investigación CERELA-Tucumán (Centro de Referencia para Lactobacilos), en el cual se realiza la secuenciación mediante el uso de un “BigDye Terminator version 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 se editaron con el uso del BioEdit “Sequence Alignment Editor” y luego se compararon y depositaron en la base de datos del NCBI/GenBank.

2.9 Preparación de inóculo

Para preparar el inóculo para los respectivos ensayos se utilizó el medio de cultivo líquido CMC (carboximetil celulosa)(Anexo I). Para ello, una vez preparado y esterilizado el medio, se inoculó cada Erlenmeyer con el respectivo aislamiento monospórico de una colonia desarrollada en SNA de siete días de crecimiento. Luego, se incubó durante 10 días a 25 °C con agitación constante en un agitador rotativo FAC® (Figura 14). Transcurrido dicho período de tiempo, se procedió a realizar el conteo de conidios con la utilización de una cámara de Neubauer, ajustando a la concentración deseada con el empleo de agua destilada estéril. Antes de realizar la inoculación, se agregó a cada inóculo Tween 20® como surfactante.

Figura 14. Frascos Erlenmeyer con inóculo de *F. graminearum* y *F. pseudograminearum* incubados en agitador rotativo.



CAPÍTULO III

**Capacidad toxicogénica y
toxicológica de
aislamientos de *Fusarium
graminearum* s.s.
obtenidos de cebada en la
Argentina**

3.1 INTRODUCCIÓN ¹

Fusarium graminearum s.s. es el miembro dominante del complejo de especies de *F. graminearum* causante de la Fusariosis de la espiga en granos de cereales pequeños en todo el mundo. Uno de los cereales afectados por este patógeno fúngico es la cebada (*Hordeum vulgare* L.), el cual es el segundo cultivo de invierno de importancia en la Argentina, luego del trigo. El principal daño producido por la infección con las especies del complejo *F. graminearum* es la reducción del rendimiento del cultivo, aunque la contaminación de los granos con micotoxinas es un aspecto de gran preocupación (Desjardins 2006). Una de las micotoxinas que puede estar presente en los granos contaminados es el deoxinivalenol (DON), un tricoteceno de tipo B, que ha sido asociado con vómitos, rechazo del alimento, pérdida de calidad en la malta y efecto de “gushing” (salida abrupta de espuma) en la cerveza (Schwarz et al. 1996; Oliveira et al. 2012). Otro tricoteceno tipo B comúnmente encontrado en los granos contaminados es el nivalenol (NIV), el cual es más tóxico en humanos y animales que el DON (Minervini et al. 2004).

En los últimos años, se han desarrollado varios ensayos de PCR para predecir los quimiotipos de *F. graminearum*/*F. culmorum* basados en las secuencias de los genes de la vía biosintética de los tricotecenos. Por ejemplo, Lee et al. (2001, 2002) y Chandler et al. (2003) desarrollaron cebadores para

¹ Los resultados del presente capítulo fueron publicados en: “International Journal of Food Microbiology” 2014 (79, 57-63), con el título “Trichothecene genotypes and production profiles of *Fusarium graminearum* isolates obtained from barley cultivated in Argentina”; “Journal of Phytopathology” 2013 (161, 586-589), con el título “*Fusarium cerealis* associated with barley seeds in Argentina” y “Plant Disease” 2012 (96, 763), con el título “*Fusarium pseudograminearum* associated with barley kernels in Argentina” (Anexo II).

diferenciar los genotipos DON de los de NIV basados en las secuencias de los genes *TRI7* y *TRI13*. Bakan et al. (2002) desarrollaron cebadores basados en las secuencias de los genes *TRI5* y *TRI6* para diferenciar altos o bajos productores de DON, mientras que para diferenciar 15-ADON, 3-ADON y NIV se desarrollaron cebadores basados en los genes *TRI3*, *TRI5* y *TRI7*, respectivamente (Quarta et al. 2006).

Para el complejo *F. graminearum* se han descrito tres perfiles de tricotecenos: quimiotipo NIV, cuando es producido NIV; quimiotipo 15-ADON, cuando es producido DON y 15-ADON; quimiotipo 3-ADON, cuando es producido DON y 3-ADON (Desjardins 2006). Como se mencionó en la introducción general, la definición de quimiotipo de tricoteceno debe ser usado cuando el fenotipo químico es expresado y detectado por análisis químicos, mientras que la definición de genotipo es utilizado cuando se basa en la secuencia de ADN (Desjardins 2008). La detección de un genotipo de tricoteceno no siempre predice la presencia del metabolito correspondiente (Desjardins 2008), aunque por lo general, los resultados genotípicos concuerdan con el correspondiente quimiotipo (Ward et al. 2002; Quarta et al. 2006; Yli-Mattila et al. 2009; Reynoso et al. 2011).

Se han desarrollado pocos estudios del complejo *F. graminearum* en cebada alrededor del mundo. Yang et al. (2008) encontró que la mayoría de los aislamientos de cebada en China pertenecieron al genotipo DON. Astolfi et al. (2011) y Boutigny et al. (2014) reportaron que el genotipo 15-ADON fue el predominante en cebada en el Sur de Brasil y Francia, respectivamente. Sin

embargo, en la Argentina no se han desarrollado estudios del perfil genotípico y químico de aislamientos de *F. graminearum* s.s. obtenidos de cebada. Por dicho motivo, el objetivo de este estudio fue caracterizar el perfil químico y genotípico de tricotecenos de aislamientos de *F. graminearum* s.s. obtenidos de granos de cebada de diferentes campos de las principales regiones productoras de la Argentina.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Determinación del potencial toxicológico (Quimiotipo)

El análisis del potencial toxicológico fue realizado de acuerdo a Alvarez et al. (2009). Para ello se utilizaron frascos Erlenmeyer de 250 mL, a los cuales se les agregó 25 g de arroz y 15 mL de agua destilada y se esterilizaron en autoclave a 125 °C durante 20 min. Posteriormente, cada frasco fue inoculado con los aislamientos monospóricos de *F. graminearum* s.s., utilizando colonias desarrolladas en medio APG 2 % de siete días de crecimiento. Para determinar la ausencia de tricotecenos en el arroz, fueron empleados controles negativos, para lo cual se utilizaron frascos Erlenmeyer preparados de la misma manera descrita anteriormente pero sin inocular. Tanto los Erlenmeyer inoculados como los controles negativos fueron incubados a 25 °C durante 14 días y luego a 10 °C durante 14 días en oscuridad.

Posteriormente, se procedió a realizar la extracción de tricotecenos (DON, 15-ADON, 3-ADON y NIV) utilizando 125 mL del solvente de extracción constituido por acetonitrilo-acetato de etilo-agua (50:41:9) y se llevó a centrifuga

a 300 rpm durante 1 h. Transcurrido ese tiempo, se filtró con papel Whatman #1 y a 20 mL del filtrado se le agregó 1,4 g de sulfato de amonio.

A continuación, se realizó una purificación para lo cual se hizo pasar el extracto por una columna constituida por carbón activado-alúmina-celita (0,7:0,5:0,3), se lavó dos veces con el solvente de extracción, luego se evaporó a sequedad en Baño María y al residuo obtenido se le agregaron 3 mL de acetato de etilo. Se calentó nuevamente a Baño María hasta ebullición, se filtró en papel Whatman #1 y se recolectó en matraz para llevar a sequedad en un Rotavapor®. Seguidamente se transfirió a un tubo Eppendorf con 500 µL de acetato de etilo-metanol (95:5) y se evaporó a sequedad el solvente bajo una corriente de nitrógeno. A partir de ese momento los tubos se pudieron almacenar a -18 °C hasta volver a ser utilizados, previa resuspensión con 500 µL de acetato de etilo-metanol (95:5).

Para la derivatización, se midieron 100 µL de las muestras, se colocaron en el vial y se les inyectó nitrógeno hasta sequedad. Luego se agregaron 100 µL de tolueno-acetonitrilo (80:20), se agitó con un vortex durante 10 s, se agregaron 50 µL de derivatizante (anhídrido trifluoro-acético) y se agitó nuevamente. Posteriormente, se colocó en baño de arena a 80 °C durante 30 min, se dejó enfriar 2-3 hs hasta temperatura ambiente, se agregaron 1,2 mL de bicarbonato de sodio al 5 % y se agitó con un vortex 20 s. Finalmente, se agregaron 400 µL de tolueno junto con el estándar interno 2-amino-5-clorobenzofenona (ACBP), se agitó 20 s, se centrifugó 2 min y la capa superior formada se separó en otro vial, que luego se inyectó en el cromatógrafo.

Para la detección y cuantificación de tricotecenos se utilizó un cromatógrafo de gases Shimadzu Modelo GC17 con detección de captura de electrones ^{63}N , equipado con inyector Split/splitless y equipado con columna capilar RX-5MS (25 m x 0,2 mm id). Los límites de detección fueron de $0,02 \mu\text{g g}^{-1}$ para DON y sus derivados acetilados y $0,05 \mu\text{g g}^{-1}$ para NIV. Los estándares de DON, 15-ADON, 3-ADON y NIV fueron “SIGMA chemical company” (St Louis, MO, USA).

La presencia de tricotecenos fue confirmada con un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS QP 5050A, Shimadzu®).

3.2.2 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante análisis estadísticos exploratorios, histogramas y el empleo del test Shapiro Wilk, todos ellos mediante el uso del “Software Statistica” v 8.0 (Statsoft, Inc., 1984-2007, Tulsa, OK, USA).

3.2.3 Identificación y comprobación de la patogenicidad de dos nuevas especies causantes de la Fusariosis de la espiga en cebada en la Argentina

Junto a los aislamientos de *F. graminearum* se obtuvieron aislamientos cuyas colonias presentaban características similares a las colonias de *F. graminearum*. Los mismos fueron identificados morfológicamente de la misma manera descrita para *F. graminearum* considerando las características morfológicas de cada especie propuestas por Leslie & Summerell (2006). Los

aislamientos obtenidos fueron caracterizados como posibles aislamientos de *F. pseudograminearum* y *F. cerealis*.

Posteriormente, los aislamientos fueron identificados mediante la amplificación y secuenciación de tres regiones conservadas: *Tri101*, *RED* y *TEF*, realizando las condiciones descritas previamente (Capítulo II). Adicionalmente, se determinó el potencial toxicogénico de las especies en estudio, realizando una PCR “multiplex” para determinar el potencial de producir NIV, DON, 3-ADON o 15-ADON y una PCR simple para el potencial de producir ZEA, según lo descrito previamente (Capítulo II).

Debido a que no hay registros previos de la presencia de *F. cerealis* y *F. pseudograminearum* como patógenos de cebada en la Argentina, se realizó un test de patogenicidad para evaluar los postulados de Koch y comprobar que las especies aisladas causan la enfermedad. Para ello, se realizaron dos ensayos (uno para cada especie) en los que se sembraron semillas de cebada de la variedad Shakira, variedad de la que fueron obtenidos los aislamientos. Las semillas fueron sembradas en macetas de plástico, utilizándose 8 macetas por ensayo, y fueron regadas oportunamente y mantenidas libres de malezas. Se dejó una planta por maceta conteniendo cada una ± 5 espigas. Una vez llegado al período de floración, se realizó la inoculación por aspersión hasta chorreo cuando el 50 % de las espigas estaban emergidas, con la utilización de un rociador de mano, empleando una concentración de inóculo de $8 \cdot 10^4$ conidios mL^{-1} para *F. cerealis* y $1 \cdot 10^4$ conidios mL^{-1} para *F. pseudograminearum* (Capítulo II). Se inocularon 30 espigas seleccionadas al azar, mientras que 10 espigas al azar de diferentes

plantas fueron inoculadas con agua destilada estéril para utilizarlas como control (Figura 15). Luego, las plantas inoculadas fueron cubiertas con bolsas de polietileno e incubadas por 48-72 hs en una cámara de crecimiento bajo un ciclo de 12 hs luz/oscuridad a 25 ± 2 °C. Posteriormente, se quitó la bolsa de las plantas y las mismas fueron trasladadas a un invernáculo. Transcurridos 20 días de la inoculación, se procedió a evaluar los síntomas de la enfermedad por observación visual. A continuación, se procedió a re-aislar los aislamientos bajo estudio de los granos sintomáticos mediante la siembra en placas de Petri estériles (10 cm de diámetro) con APG 2 % y CLA para luego realizar la identificación morfológica según lo descrito previamente (Capítulo II).

Figura 15. Macetas con plantas de cebada para inoculación.



3.3 RESULTADOS

3.3.1 Aislamientos obtenidos

Del total de muestras de cebada analizadas (130), en 27 de ellas se obtuvieron aislamientos con características morfológicas representativas del complejo *F. graminearum* (Figura 16).

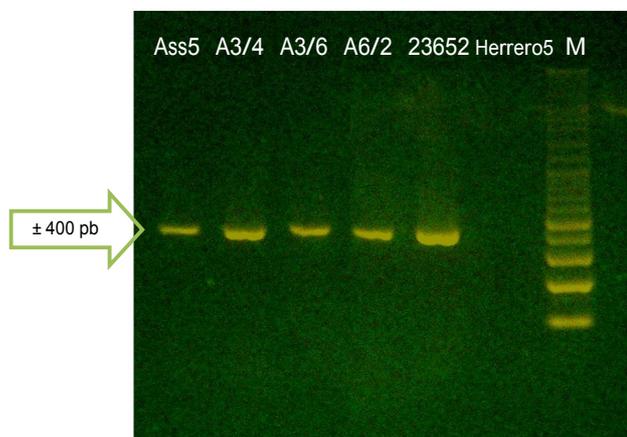
El protocolo utilizado para la extracción del ADN fue adecuado, dando como resultado ADN de buena calidad que luego permitió obtener claros productos de PCR, mientras que la cantidad del ADN obtenido fue de alrededor de 20 µg mL⁻¹.

Luego de realizar la reacción de PCR con cebadores específicos (Capítulo II), se determinó que 110 de los aislamientos obtenidos produjeron un fragmento de aproximadamente 280 pb con el par de cebadores Fg16N, indicando que pertenecían al complejo *F. graminearum*. A su vez, se observó la amplificación de un fragmento de aproximadamente 400 pb con los cebadores Fg16 F/R, indicando que pertenecerían a aislamientos de *F. graminearum* s.s. (Figura 17). Por otro lado, los 10 aislamientos secuenciados, mediante la amplificación de dos regiones conservadas (*RED* y *TRI101*), mostraron alto grado de similitud (95-99 %) con *F. graminearum* s.s.

Figura 16. Observación al microscopio de un aislamiento de *F. graminearum* s.s. (40X). Macroconidios (A), Clamidosporas (B), Esporodocios (C).



Figura 17. Reacción de PCR específica con cebadores Fg16 F/R de aislamientos representativos de *F. graminearum* s.s. Cuatro aislamientos de *F. graminearum* s.s., seguido de un control positivo, un control negativo y un marcador de peso molecular conocido (M).



3.3.2 Potencial toxicogénico (Genotipo)

Los 110 aislamientos de *F. graminearum* s.s. obtenidos amplificaron un fragmento de aproximadamente 282 pb con los cebadores Tri13DON F/R y no se observaron amplificaciones con los cebadores Tri13NIV F/R, siendo clasificados

como representativos del genotipo DON (Figura 18). A su vez, todos los aislamientos amplificaron fragmentos de aproximadamente 525 pb y 708 pb en la PCR “multiplex” y fueron clasificados como genotipo DON/15-ADON (Figura 20). A su vez, todos los aislamientos de *F. graminearum* s.s. amplificaron un fragmento de aproximadamente 280 pb con los cebadores PKS4 F/R, indicando el potencial de producir ZEA (Figura 21). Todos los controles positivos amplificaron el fragmento específico de acuerdo a los cebadores utilizados en los ensayos de PCR.

Figura 18. Reacción de PCR con cebadores Tri13DON F/R de aislamientos representativos de *F. graminearum* s.s. Ocho aislamientos de *F. graminearum* s.s., seguido de un control genotipo DON, un control genotipo NIV y un marcador de peso molecular conocido (M).

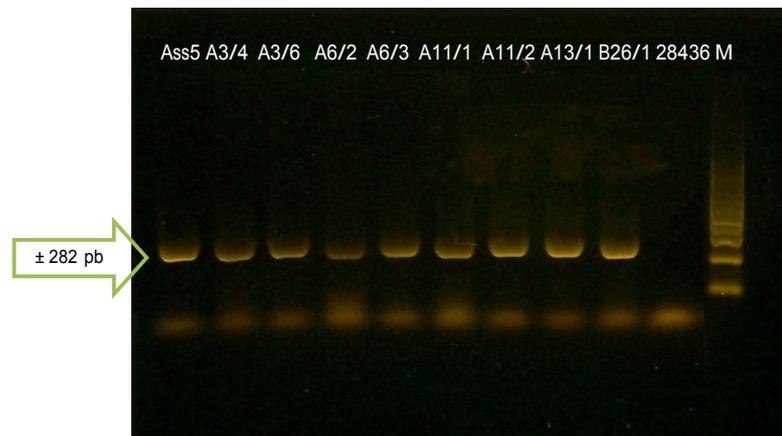


Figura 19. Reacción de PCR con cebadores Tri13NIV F/R de aislamientos representativos de *F. graminearum* s.s. Marcador de peso molecular conocido (M), seguido de seis aislamientos de *F. graminearum* s.s., un control genotipo DON y un control genotipo NIV.



Figura 20. Reacción de PCR “multiplex” de aislamientos representativos de *F. graminearum* s.s. Control negativo, control genotipo DON/3-ADON, control genotipo DON/15-ADON, seguido de cinco aislamientos de *F. graminearum* s.s. con genotipo DON/15-ADON, control genotipo NIV y marcador de peso molecular conocido (M).

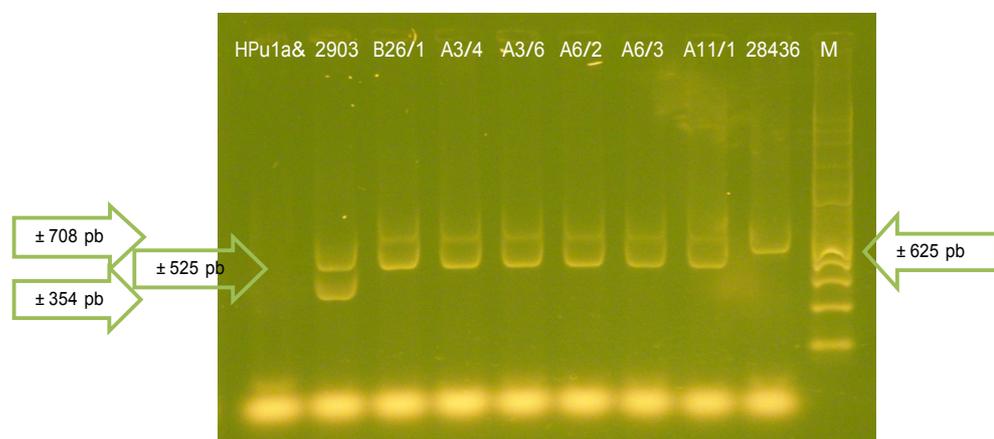
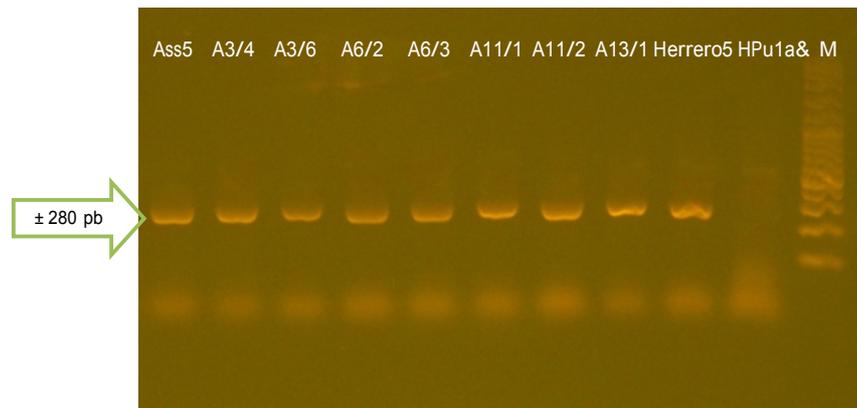


Figura 21. Reacción PCR con cebadores PKS4 F/R de aislamientos representativos de *F. graminearum* s.s. Ocho aislamientos de *F. graminearum* s.s., seguido de control positivo, un control negativo y marcador de peso molecular conocido (M).



3.3.3 Potencial Toxicológico (Quimiotipo)

Los análisis químicos de los aislamientos de *F. graminearum* s.s. obtenidos de granos de cebada mostraron su capacidad de producir altas cantidades de las toxinas evaluadas, especialmente DON (Tabla 5). El 95 % de los aislamientos produjo DON, el 71 % produjo 15-ADON, el 63 % 3-ADON y el 52 % NIV. En todos los aislamientos en los que se detectó NIV, éste fue producido en simultáneo con DON pero en baja cantidad, excepto para el aislamiento A85/1 que produjo solo NIV, también en baja cantidad. Solo en un bajo número de aislamientos (10 de 96) se observó que DON fue producido en menor cantidad que los demás tricotecenos evaluados, en el resto se observaron siempre mayores cantidades de DON. La Tabla 6 muestra las cantidades promedio y el rango de producción de cada toxina.

Tabla 5. Origen y producción de toxinas de los aislamientos de *F. graminearum* s.s.

Aislamiento ^a	Año/Localidad	Variedad de cebada	NIV $\mu\text{g g}^{-1}$	DON $\mu\text{g g}^{-1}$	3-ADON $\mu\text{g g}^{-1}$	15-ADON $\mu\text{g g}^{-1}$
Ass5	2010/S.Spiritu	Scarlett	n.d.	4,22	0,37	2,11
A3/4	2010/Tapalqué	Scarlett	0,14	88,85	3,80	n.d.
A3/6	2010/Tapalqué	Scarlett	n.d.	17,90	7,15	1,30
A6/2	2010/Azul	Shakira	n.d.	0,23	n.d.	n.d.
A6/3	2010/Azul	Shakira	n.d.	66,48	1,25	8,04
A11/1	2010/Azul	Scarlett	0,14	5,25	0,30	0,20
A11/2	2010/Azul	Scarlett	n.d.	45,60	1,00	1,10
A13/1	2010/Azul	Scarlett	0,14	14,30	1,00	n.d.
A13/2	2010/Azul	Scarlett	0,13	9,65	1,00	0,60
A13/3	2010/Azul	Scarlett	0,14	363,50	8,60	21,50
A13/4	2010/Azul	Scarlett	0,27	701,30	3,20	n.d.
A13/5	2010/Azul	Scarlett	0,14	12,45	0,30	3,05
A13/6	2010/Azul	Scarlett	n.d.	43,02	3,90	1,94
A17/1	2010/Olavarría	Scarlett	n.d.	19,27	5,52	3,11
A23/4	2011/T.Lauquen	Scarlett	n.d.	58,10	4,73	0,76
A27/3	2011/Azul	Shakira	0,13	8,90	n.d.	n.d.
A27/1	2011/Azul	Shakira	n.d.	2,25	4,55	0,60
A27/2	2011/Azul	Shakira	n.d.	4,97	n.d.	0,36
A27/5	2011/Azul	Shakira	0,14	13,00	0,75	0,35
A27/9	2011/Azul	Shakira	0,14	18,55	0,75	1,25
A27/10	2011/Azul	Shakira	0,30	34,20	2,42	0,58
A27/14	2011/Azul	Shakira	0,14	21,65	0,28	0,10
A27/16	2011/Azul	Shakira	0,16	25,25	4,40	0,55
A27/17	2011/Azul	Shakira	0,14	5,37	3,75	5,40
A27/18	2011/Azul	Shakira	0,14	4,97	4,80	0,75
A27/20	2011/Azul	Shakira	0,16	49,14	n.d.	0,80
A29/5	2011/Azul	Scarlett	n.d.	83,23	2,33	0,79
A29/7	2011/Azul	Scarlett	0,15	18,21	0,15	7,90
A29/9	2011/Azul	Scarlett	n.d.	6,25	n.d.	n.d.
A29/11	2011/Azul	Scarlett	n.d.	22,20	0,20	n.d.
A29/12	2011/Azul	Scarlett	0,14	2,72	n.d.	5,35
A29/14	2011/Azul	Scarlett	0,27	21,80	0,70	n.d.
A29/15	2011/Azul	Scarlett	0,15	205,60	1,15	5,50
A32/4	2011/Azul	Scarlett	0,14	29,80	0,10	0,30
A33/2	2011/Tandil	Scarlett	0,14	27,80	n.d.	3,65
A33/4	2011/Tandil	Scarlett	0,13	1,20	n.d.	10,85
A33/9	2011/Tandil	Scarlett	n.d.	6,84	1,66	0,14
A33/10	2011/Tandil	Scarlett	n.d.	11,42	1,18	0,20
A33/11	2011/Tandil	Scarlett	0,14	19,80	0,85	0,80
A33/14	2011/Tandil	Scarlett	n.d.	1,18	0,63	n.d.
A33/16	2011/Tandil	Scarlett	n.d.	n.d.	0,12	n.d.
A33/17	2011/Tandil	Scarlett	0,14	5,86	1,15	2,25
A33/20	2011/Tandil	Scarlett	0,28	3,90	n.d.	0,09
A33/22	2011/Tandil	Scarlett	n.d.	4,08	n.d.	2,04
A33/24	2011/Tandil	Scarlett	0,27	5,50	n.d.	n.d.
A33/27	2011/Tandil	Scarlett	0,27	1,95	n.d.	n.d.
A33/28	2011/Tandil	Scarlett	n.d.	16,92	n.d.	n.d.
A33/29	2011/Tandil	Scarlett	0,14	4,35	2,45	0,10
A33/30	2011/Tandil	Scarlett	n.d.	75,40	n.d.	1,18

Tabla 5. Continuación.

A33/31	2011/Tandil	Scarlett	0,27	4,02	n.d.	n.d.
A33/33	2011/Tandil	Scarlett	n.d.	n.d.	n.d.	0,18
A35/4	2011/La Madrid	Scarlett	n.d.	n.d.	n.d.	0,33
A62/1	2011/Azul	Scarlett	0,14	2,45	5,50	0,05
A62/3	2011/Azul	Scarlett	n.d.	2,70	n.d.	0,11
A62/9	2011/Azul	Scarlett	0,16	18,91	0,22	15,05
A62/10	2011/Azul	Scarlett	0,14	94,75	0,22	24,54
A68/1	2011/Tandil	Scarlett	n.d.	55,80	0,32	0,38
A68/3	2011/Tandil	Scarlett	n.d.	9,45	0,55	n.d.
A68/5	2011/Tandil	Scarlett	n.d.	60,73	0,99	0,23
A68/6	2011/Tandil	Scarlett	0,14	87,72	n.d.	0,15
A68/9	2011/Tandil	Scarlett	0,14	10,30	n.d.	0,80
A68/10	2011/Tandil	Scarlett	0,29	3,39	11,20	4,90
A68/4	2011/Tandil	Scarlett	0,27	6,45	n.d.	n.d.
A68/8	2011/Tandil	Scarlett	0,15	202,51	n.d.	5,05
A82/1	2011/Azul	Scarlett	0,14	7,17	3,55	7,55
A83/1	2011/Azul	Scarlett	n.d.	n.d.	0,52	n.d.
A85/1	2011/Azul	Scarlett	0,27	n.d.	n.d.	n.d.
A87/2	2011/Azul	Scarlett	0,27	1,40	n.d.	n.d.
A87/3	2011/Azul	Scarlett	0,14	6,39	2,00	2,10
A87/4	2011/Azul	Scarlett	0,15	64,80	2,50	2,75
A87/5	2011/Azul	Scarlett	n.d.	7,27	0,79	0,13
A87/1	2011/Azul	Scarlett	0,30	7,38	n.d.	n.d.
A87/7	2011/Azul	Scarlett	n.d.	5,08	n.d.	n.d.
A88/1	2011/Azul	Scarlett	n.d.	421,93	15,90	2,10
A88/2	2011/Azul	Scarlett	0,14	431,50	n.d.	4,70
A88/3	2011/Azul	Scarlett	n.d.	158,90	n.d.	n.d.
A90/1	2011/Azul	Scarlett	n.d.	136,90	1,29	4,44
A90/2	2011/Azul	Scarlett	n.d.	149,70	1,33	0,13
A92/1	2011/Olavarría	Scarlett	n.d.	28,65	n.d.	n.d.
A92/2	2011/Olavarría	Scarlett	n.d.	914,00	3,28	2,55
A92/8	2011/Olavarría	Scarlett	n.d.	24,22	0,74	0,67
A92/10	2011/Olavarría	Scarlett	0,14	31,04	1,40	4,20
A92/11	2011/Olavarría	Scarlett	0,28	22,10	1,27	1,80
A92/7	2011/Olavarría	Scarlett	0,14	22,40	7,20	6,95
A92/6	2011/Olavarría	Scarlett	n.d.	30,49	n.d.	0,10
A114/1	2012/Lobería	NN	n.d.	104,05	2,50	2,10
A114/2	2012/Lobería	NN	n.d.	68,32	n.d.	0,20
A116/1	2012/Necochea	NN	n.d.	8,11	4,61	0,62
A119/6	2012/San Cayetano	NN	n.d.	17,43	5,07	0,61
A119/8	2012/San Cayetano	NN	n.d.	228,46	0,67	0,22
A119/9	2012/San Cayetano	NN	n.d.	20,40	0,63	0,09
A119/12	2012/San Cayetano	NN	n.d.	0,41	n.d.	n.d.
A119/14	2012/San Cayetano	NN	0,27	0,86	n.d.	n.d.
A119/17	2012/San Cayetano	NN	n.d.	0,54	4,45	0,65
A119/18	2012/San Cayetano	NN	n.d.	50,30	3,36	1,21
A119/2	2012/San Cayetano	NN	n.d.	10,49	n.d.	n.d.
A119/30	2012/San Cayetano	NN	n.d.	41,05	4,33	0,88
A119/32	2012/San Cayetano	NN	n.d.	2,63	n.d.	n.d.
A119/33	2012/San Cayetano	NN	0,27	2,16	n.d.	n.d.
A119/39	2012/San Cayetano	NN	0,13	7,75	n.d.	0,50
A119/36	2012/San Cayetano	NN	n.d.	6,12	1,25	0,12

Tabla 5. Continuación.

A120/1	2012/Tres Arroyos	NN	0,14	9,37	20,00	17,25
A120/2	2012/Tres Arroyos	NN	0,27	0,45	n.d.	n.d.
A129/1	2012/Azul	Scarlett	n.d.	642,86	5,72	1,33
A129/2	2012/Azul	Scarlett	0,14	20,46	4,85	15,40
A129/3	2012/Azul	Scarlett	0,27	1,74	n.d.	n.d.
A129/4	2012/Azul	Scarlett	0,27	4,75	n.d.	n.d.
A129/5	2012/Azul	Scarlett	n.d.	34,75	3,61	0,44
A129/6	2012/Azul	Scarlett	n.d.	3,44	3,56	1,45
A130/1	2012/Azul	B1215	0,27	7,40	1,60	n.d.

^aEl primer número identifica las diferentes muestras y el número siguiente identifica los diferentes aislamientos obtenidos por muestra.

NN = dato no disponible.

n.d. = no detectado.

Tabla 6. Concentraciones máximas, mínimas y medias de los tricotecenos producidos por aislamientos de *F. graminearum* s.s. de cebada.

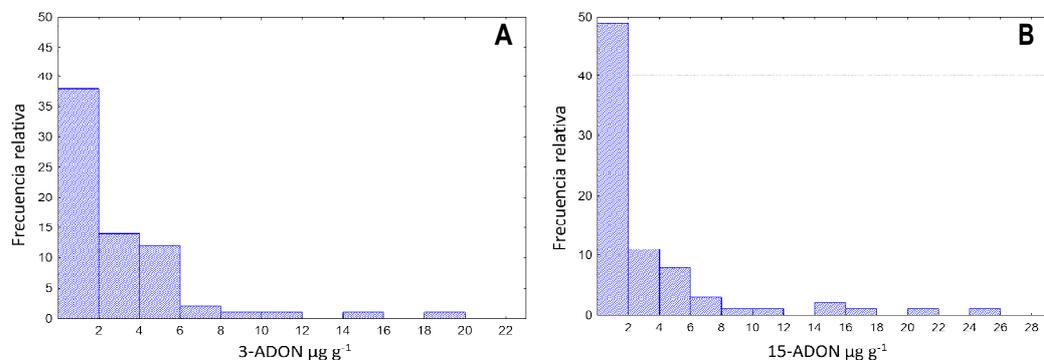
	NIV ($\mu\text{g g}^{-1}$)	DON ($\mu\text{g g}^{-1}$)	3-ADON ($\mu\text{g g}^{-1}$)	15-ADON ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Máximo	0,30	914,00	20,00	24,54
Mínimo	0,13	0,23	0,10	0,05
Media	0,19	62,28	2,91	2,96

3.3.4 Análisis estadístico

De acuerdo a los análisis químicos de los aislamientos, los resultados sugieren que DON es el principal tricoteceno producido por los aislamientos de *F. graminearum* s.s. de granos de cebada en la Argentina y es esperado que esté

presente en altas concentraciones. Sin embargo, también es probable encontrar 3-ADON y 15-ADON en bajas cantidades. La producción de ambos acetyl derivados de DON sigue una similar distribución no Gaussiana (Figura 22), con medias y desviaciones estándar (SD) estrechas (3-ADON, test Shapiro Wilk $p < 0,0001$, $n = 110$, media = 1,85, SD = 3,10; 15-ADON test Shapiro Wilk $p < 0,0001$, $n = 110$, media = 2,10, SD = 4,27). Los niveles máximos de producción también fueron similares para 3-ADON y 15-ADON (20,0 y 24,5 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente), lo cual sugiere que la capacidad de los aislamientos de producir cualquiera de los derivados acetilados está relacionada a su capacidad biosintética.

Figura 22. Frecuencia relativa de la concentración de 3-ADON (A) y 15-ADON (B) producida por *F. graminearum* s.s. aislados de cebada.



3.3.5 Perfil de producción de DON y sus acetyl derivados de *F. graminearum* s.s. aislados de cebada

De acuerdo a la biosíntesis de DON y sus acetyl derivados, se detectaron seis diferentes perfiles de producción de toxinas entre los diferentes aislamientos de *F. graminearum* s.s. de cebada (Tabla 7). El perfil predominante

fue caracterizado por la producción de DON + 3-ADON + 15-ADON. En menor cantidad, el segundo y tercero en proporción fueron DON y DON + 15-ADON, respectivamente. Simultáneamente, también se observó la producción de DON + 3-ADON, aunque en baja frecuencia. Solo dos de los 110 aislamientos fueron productores solamente de 15-ADON o 3-ADON.

Aunque fueron muestreadas diferentes variedades de cebada (Scarlett, Shakira y B1215), años y/o localidades geográficas, los aislamientos de *F. graminearum* s.s. no presentaron un patrón de producción de micotoxinas claro relacionado a ninguna de estas variables. Además, en una misma muestra fueron encontrados aislamientos con diferentes patrones de producción de tricotecenos (ej. muestras 33 y 92)(Tabla 5).

Tabla 7. Perfiles de la producción de DON y sus acetil derivados por aislamientos de *F. graminearum* s.s. de cebada.

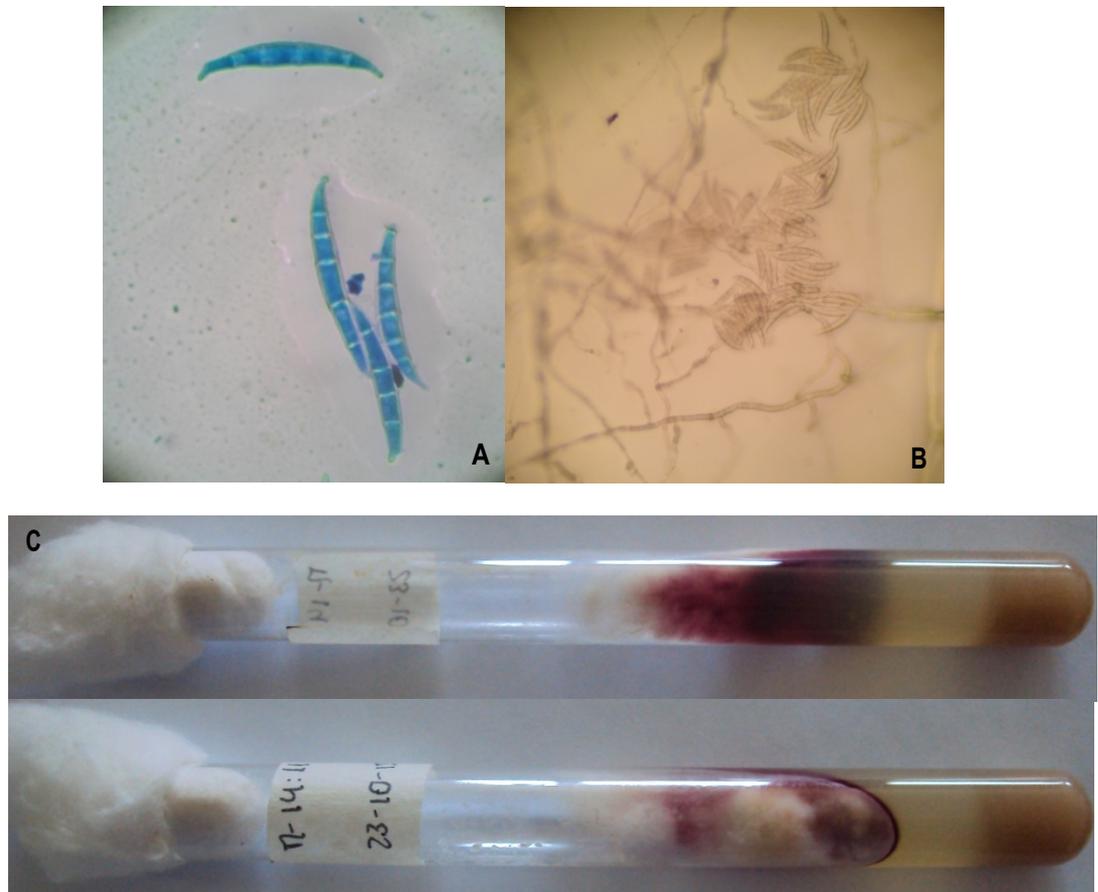
Perfil de tricotecenos	DON	3-ADON	15-ADON	N° de aislamientos	Porcentaje de aislamientos
I	+	+	+	60	54.5
II	+	-	-	21	19.1
III	+	-	+	16	14.5
IV	+	+	-	8	7.3
V	-	+	-	2	1.8
VI	-	-	+	2	1.8

3.3.6 Primer reporte de *F. cerealis* y *F. pseudograminearum* en cebada en la Argentina

Una de las especies obtenidas junto con los aislamientos de *F. graminearum* s.s. fue *F. pseudograminearum*, el cual fue obtenido de una muestra de cebada de la variedad Shakira de la localidad de Tres Arroyos en el año 2010.

Esta especie se caracterizó por producir abundante micelio aéreo blanco-amarillento a rojizo y formó pigmentos rojizos en APG. Por su parte, en CLA produjo abundantes macroconidios, relativamente delgados y casi rectos o moderadamente curvados y comúnmente 5-6 septos, mientras que no se observaron microconidios. En las colonias de tres semanas de crecimiento se observaron clamidosporas. Esta especie fue identificada morfológicamente como *F. pseudograminearum* Aoki & O'Donnell (Figura 23).

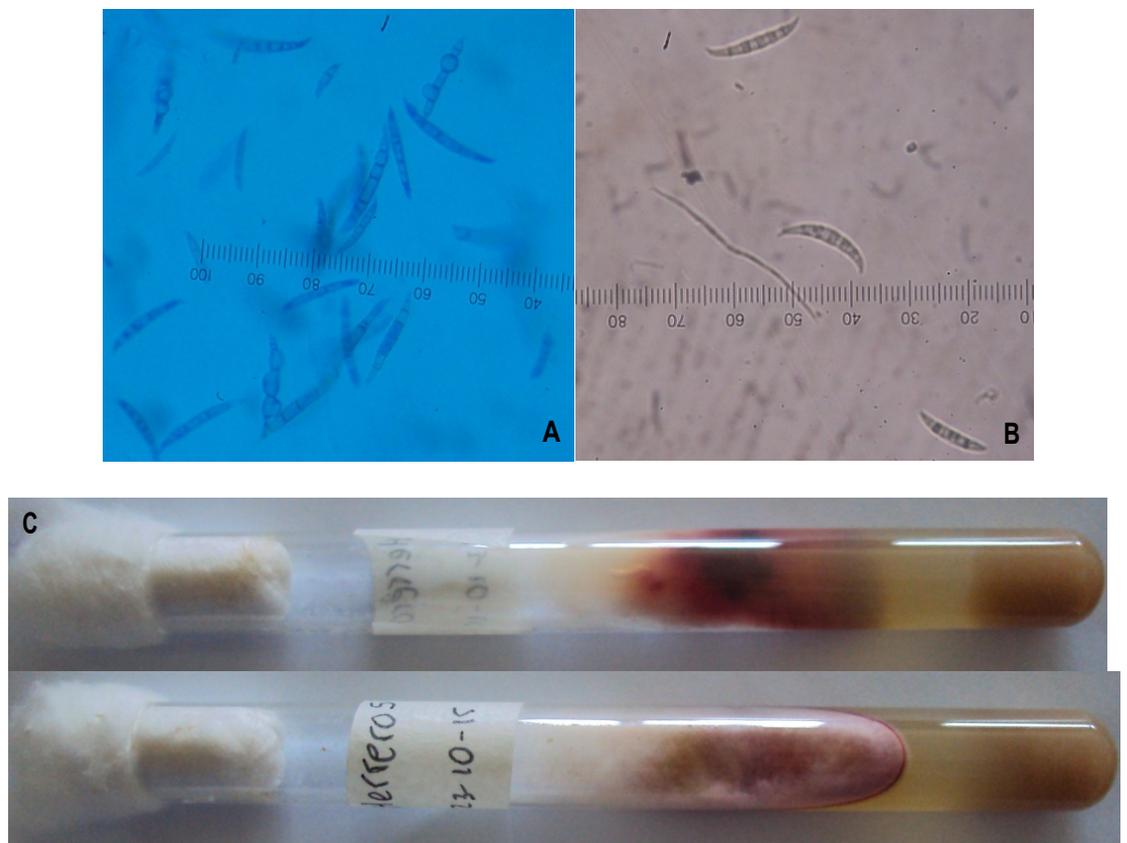
Figura 23. Observación al microscopio de un aislamiento de *F. pseudograminearum* (40X). Macroconidios (A), Esporodoquios (B) y colonia de *F. pseudograminearum* en tubo APG 2 % pico de flauta (C).



La otra especie aislada también produjo abundante micelio de color blanco y pigmentos rojos en APG, mientras que en CLA se observaron abundantes macroconidios formados en monofiálides en esporodoquios naranjas pálido, falcados, con la parte dorsal mas curva que la ventral y comúnmente con 5 septos. No se observaron microconidios y, luego de cuatro semanas, se observaron clamidosporas en las hifas aéreas y en los macroconidios, formadas en cadenas o en grupos. Esta especie fue identificada

morfológicamente como *F. cerealis* (Cooke) Sacc. (= *F. crookwellense* Burgess, Nelson & Toussoun) (Figura 24) y fue obtenida de una muestra de cebada de la variedad Shakira de la localidad de Treinta de Agosto en el año 2011.

Figura 24. Observación al microscopio de un aislamiento de *F. cerealis* (40X). Macroconidios con clamidosporas (A), Macroconidios (B) y colonia de *F. cerealis* en tubo APG 2 % pico de flauta (C).



La secuenciación de tres regiones conservadas (*RED*, *Tri101*, *TEF*) corroboró la identificación morfológica de cada especie, mediante la comparación con la base de datos del NCBI/“GenBank”. En la tabla 8 se muestran los números de accesión asignados a las regiones secuenciadas.

Tabla 8. Números de accesoión de “GenBank” de los aislamientos de *F. pseudograminearum* y *F. cerealis* secuenciados.

Aislamiento	<i>RED</i>	<i>Tri101</i>	<i>TEF</i>
<i>F. pseudograminearum</i> (M14/11)	JQ350697	JQ350698	JQ350699
<i>F. cerealis</i> (Herrero5)	JX682529	JX682530	JX682531

Por otra parte, la evaluación del potencial toxicogénico (genotipo) mostró que el aislamiento de *F. pseudograminearum* presentó el potencial de producir DON/3-ADON y ZEA, mientras que el aislamiento de *F. cerealis* presentó el potencial de producir NIV y ZEA.

Luego de realizar el test de patogenicidad para evaluar los postulados de Koch, en ambos ensayos se observó que los granos de las espigas no inoculadas (control) fueron asintomáticos, mientras que los de las espigas inoculadas mostraron una descoloración o una necrosis marrón oscura. A su vez, se observó una coloración marrón a negro en porciones del raquis de la espiga. En ambos casos, el hongo fue re-aislado de los granos sintomáticos e identificado nuevamente en base a las características morfológicas, demostrando la patogenicidad de ambas especies en las espigas de cebada.

Figura 25. Síntomas de *F. cerealis* (A) y *F. pseudograminearum* (B) en espigas de cebada.



3.4 DISCUSIÓN

Todos los aislamientos de *F. graminearum* s.s. aislados de cebada analizados en el presente estudio amplificaron para el genotipo DON y 15-ADON. Se han publicado diferentes estudios en relación a la capacidad (a nivel genotipo) de producir tricotecenos de aislamientos del complejo *F. graminearum* en granos de cereales. Sin embargo, poco es conocido acerca de la población del complejo *F. graminearum* en granos de cebada. En China, la especie predominante causante de la Fusariosis de la espiga en cebada es *F. asiaticum* y el genotipo NIV es el más abundante. Sin embargo, también se obtuvieron en menor proporción aislamientos de *F. graminearum* s.s. pertenecientes al genotipo DON (Yang et al. 2008). En recientes estudios de genotipos de tricotecenos en granos de cebada

en Francia y Brasil, el genotipo 15-ADON fue el más frecuente entre los aislamientos de *F. graminearum* s.s., pero el genotipo 3-ADON también estuvo presente (Astolfi et al. 2011; Boutigny et al. 2014). Nuestros resultados concuerdan con la prevalencia del genotipo 15-ADON en granos de cebada en Sudamérica.

No hay información previa de los genotipos/quimiotipos de aislamientos del complejo *F. graminearum* de cebada en la Argentina. Con respecto a las poblaciones de *F. graminearum* de cereales pequeños, estudios llevados a cabo en trigo reportaron que los aislamientos de *F. graminearum* s.s. fueron predominantemente productores de 15-ADON (Fernandez Pinto et al. 2008; Alvarez et al. 2009; Reynoso et al. 2011). El quimiotipo 15-ADON fue también predominante en aislamientos de *F. graminearum* s.s. obtenidos de soja (Barros et al. 2012).

En el presente trabajo, los análisis químicos para determinar la producción de tricotecenos (quimiotipos) de los aislamientos de *F. graminearum* s.s. mostraron diferencias con los resultados de PCR (genotipos). Todos los aislamientos mostraron una reacción de PCR positiva para DON, mientras que en los resultados de los análisis químicos, el 95 % de los aislamientos fueron productores de DON en diferentes concentraciones. Esta discrepancia entre los análisis genotípicos y químicos también ha sido previamente reportada (Desjardins 2008; Somma et al. 2014) y puede ser explicada por el hecho de que los ensayos de PCR determinan el potencial de la producción de micotoxinas a

nivel genotipo, pero la producción *in vitro* de una toxina puede variar con las condiciones de crecimiento.

Un considerable número de los aislamientos que produjeron DON también fueron capaces de producir pequeñas cantidades de NIV, sin embargo, en las reacciones de PCR del presente trabajo ningún aislamiento amplificó para el genotipo NIV. Este resultado también fue reportado por Mugarib de Kuppler et al. (2011), quienes encontraron que aislamientos con genotipo DON tienden a producir pequeñas cantidades de NIV y que DON fue producido por aislamientos con genotipo NIV, aunque estas características no pudieron ser detectadas por los ensayos moleculares existentes. Fernandez Pinto et al. (2008) y Alvarez et al. (2009) también detectaron mediante análisis químicos que los aislamientos que producían DON podían producir pequeñas cantidades de NIV. Mugarib de Kuppler et al. (2011) sugirieron que esta situación puede ser atribuida al paso de conversión enzimática de DON a NIV y viceversa o como un subproducto de la biosíntesis.

En este estudio, DON, 15-ADON y 3-ADON fueron producidos simultáneamente por 60 (54,5 %) aislamientos. Además, 30 de los 60 aislamientos produjeron simultáneamente ambos acetil derivados en cantidades similares. A su vez, 22 de los 110 aislamientos produjeron 3-ADON en una relación 4:1 o mayor que 15-ADON y 10 de los 110 aislamientos produjeron 3-ADON y no produjeron 15-ADON, aunque los 110 aislamientos fueron caracterizados molecularmente como genotipo 15-ADON. Esta discrepancia encontrada entre los resultados genotípicos y químicos confirma que los ensayos

a nivel genotípico solos no son suficientes para predecir el perfil total de tricotecenos que los aislamientos pueden sintetizar, como fue también descrito por Mugarabí de Kuppler et al. (2011).

La reacción de PCR “multiplex” utilizada para la diferenciación de los genotipos 3-ADON y 15-ADON fue basada en la amplificación de la región *TRI3* (Quarta et al. 2006). Alexander et al. (2011) propusieron que *TRI3* no es una región determinante para discriminar entre los genotipos 3-ADON y 15-ADON y que el gen *TRI8* sería el responsable de esta diferenciación. El gen *TRI8* es requerido para la conversión de 3,15-diADON a 3-ADON o 15-ADON; en los aislamientos 3-ADON, la enzima codificada por el *TRI8* es una tricoteceno C-15 estearasa (deacetilasa), mientras que en los aislamientos 15-ADON es una C-3 estearasa. De acuerdo a estos resultados, la actividad diferencial del *TRI8* más que la carencia de actividad de *TRI3* o *TRI8* en algunos aislamientos es determinante de los quimiotipos 3-ADON o 15-ADON. Dichos autores sugieren que la baja producción de 3-ADON en un aislamiento genéticamente caracterizado como productor de 15-ADON es probablemente debido a la actividad del *TRI101*, una C-3 acetiltransferasa actuando sobre DON, el cual convierte isotrichodermol en isotrichodermin. Como DON no es el sustrato preferido del *TRI101*, la conversión a 3-ADON es lenta. Por otro lado, sugieren que la producción de bajas cantidades de 15-ADON por aislamientos caracterizados genotípicamente como 3-ADON puede ser explicado por la acetilación de DON en C-15 por parte del *TRI3*, el cual convierte 15-decalonectrin en calonectrin. Nuevamente, DON es un pobre sustrato de *TRI3* y esto puede

justificar la baja producción. De acuerdo con esos resultados, el gen *TRI8* es específico para la deacetilación a C-3 o C-15 en aislamientos 15-ADON o 3-ADON, respectivamente. Todavía queda por investigar si la actividad del *TRI8* es la base para la producción de aislamientos con 3-ADON y 15-ADON en cantidades relativamente similares. Si *TRI8* puede tener ambas actividades, es decir, catalizar la deacetilación de C-3 y C-15 en 3,15-ADON, es posible que un aislamiento que produce DON pueda también producir ambos acetil derivados si la actividad del *TRI8* es interrumpida o la enzima no cataliza completamente ambas reacciones. Recientemente, McCormick & Alexander (2014) observaron que un aislamiento de *F. graminearum* caracterizado como 3-ADON podía producir DON y 3-ADON, mientras que un aislamiento caracterizado como 15-ADON podía producir una mezcla de DON, 15-ADON, 3-ADON y 3,15-ADON. Dichos autores determinaron, basados en la expresión de los genes *TRI3* y *TRI101*, que el gen *TRI101* permite la conversión de DON en 3-ADON en un aislamiento caracterizado como 3-ADON o 15-ADON, mientras que el gen *TRI3* es funcional en ambos genotipos, siendo a su vez capaz de convertir DON en 15-ADON en los aislamientos caracterizados como 15-ADON pero no en los aislamientos 3-ADON, concluyendo que la actividad diferencial del *TRI3* y la especificidad del sustrato puede explicar la ocurrencia de ambos acetil derivados. Sin embargo, queda por investigar las causas de la producción de 15-ADON en aislamientos caracterizados genotípicamente como 3-ADON.

La producción simultánea de 3-ADON y 15-ADON en cantidades comparables por aislamientos de *F. graminearum* también fue reportada por

Szécsi et al. (2005), Fernández Pinto et al. (2008) y Alvarez et al. (2009). Previamente, Sugiura et al. (1990) reportaron la coproducción de ambos acetil derivados por aislamientos de *Gibberella zeae* aislados de cebada y trigo en Japón. Todos estos estudios tienen en común que la incubación de los aislamientos para la producción de tricotecenos fue realizada a dos temperaturas diferentes. Sugiura et al. (1990) encontraron diferencias en los patrones de producción de acetil derivados de DON cuando los aislamientos fueron incubados a 25 °C por 21 días en comparación con la incubación a 25 °C durante 2 semanas, seguidos por 2 semanas a 4 °C. Las primeras condiciones de incubación produjeron DON y ambos acetil derivados en cantidades similares, mientras que en el segundo set de condiciones no fue detectado 3-ADON. Los patrones de incubación del resto de los estudios mencionados arriba fueron 2 semanas a 10 °C seguido por 2 semanas a 25 °C y todos encontraron un número de aislamientos representativos que pudieron acumular similares cantidades de ambos acetil derivados. Como las condiciones ambientales pueden afectar dramáticamente la biosíntesis de metabolitos secundarios, esto puede ser una posible explicación para los resultados observados en estos estudios, así como los que fueron observados en los aislamientos de *F. graminearum* s.s. aislados de cebada en la Argentina en el presente trabajo, ya que las condiciones de incubación fueron similares. Sugiura et al. (1990) propusieron una actividad enzimática que cataliza la conversión de 3-ADON a 15-ADON regulada por la temperatura. También es posible que, si *TRI8* puede tener una actividad dual de catalizar la deacetilación del C-3 y C-15 en 3,15-ADON, para producir 15-ADON y

3-ADON respectivamente, esta actividad sea regulada por la temperatura u otras condiciones ambientales. En consecuencia, la discrepancia entre los análisis químicos y genotípicos en el presente trabajo podría ser explicada por la dependencia de las condiciones de crecimiento. Además, ambos tipos de análisis son necesarios para reflejar la potencial contaminación con tricotecenos en granos de cebada. Estudios adicionales de la relación entre factores ambientales, sustrato, condiciones del cultivo, etc. y la formación de acetil derivados de DON podrían ser de utilidad. Además, el desarrollo de un nuevo set de cebadores basados en la región *TR18* podría ser apropiado para complementar la diferenciación de los genotipos de los acetil derivados.

Diferentes perfiles de producción de tricotecenos de aislamientos de *F. graminearum* s.s. fueron encontrados en la misma localidad, e incluso en una misma muestra de granos de cebada. Esta observación es importante en relación con el tipo y la cantidad de micotoxinas que pueden ser encontradas en la misma o en diferentes muestras.

Este trabajo reveló por primera vez el potencial (genotipo) y el perfil de producción de tricotecenos (quimiotipo) de aislamientos de *F. graminearum* s.s. obtenidos de granos de cebada en la Argentina. El conocimiento del potencial y la producción de micotoxinas de este importante hongo en este cereal económicamente relevante es necesario para realizar evaluaciones de riesgo. Además, son requeridos continuos monitoreos para entender y predecir futuros cambios en el potencial toxicogénico/toxicológico de las poblaciones de *Fusarium*.

Además de ser el primer trabajo en el que se evalúa el potencial toxicogénico y toxicológico de aislamientos de *F. graminearum* s.s. causantes de la Fusariosis de la espiga en cebada, del presente estudio surgió el primer reporte de *F. cerealis* y *F. pseudograminearum* en cebada en la Argentina.

Fusarium pseudograminearum, asociado inicialmente a *F. graminearum* por sus similares características morfológicas designándose como *F. graminearum* grupo 1, fue descrito formalmente en 1999 por Aoki & O'Donnell (1999). A diferencia de *F. graminearum*, *F. pseudograminearum* es heterotálico y ha sido asociado principalmente con pudriciones de raíz en Australia, Norteamérica, Turquía, Nueva Zelanda (Nicol et al. 2004; Monds et al. 2005; Smiley et al. 2005; Leslie & Summerell 2006; Mishra et al. 2006). Sin embargo, también ha sido el causante de epifitias de Fusariosis de la espiga en Australia y se ha relacionado con esta enfermedad en ensayos de invernadero (Burgess et al. 1987; Akinsanmi et al. 2004; Monds et al. 2005). En la Argentina, el primer reporte asociado con Fusariosis de la espiga en trigo fue realizado por Alvarez et al. (2011). Los aislamientos de *F. pseudograminearum* pueden producir DON, 3-ADON y ZEA y se ha observado que la tasa de producción de ZEA en los aislamientos de *F. pseudograminearum* es mayor que para los aislamientos de *F. graminearum* (Blaney et al. 2002).

Fusarium cerealis fue aislado por primera vez de tubérculos de papa en Australia en 1971 (Burgess et al. 1982) y es frecuentemente encontrado en regiones templadas, siendo reportado en Australia, Canadá, Japón, Nueva Zelanda, Sudáfrica, Estados Unidos y diferentes partes de Europa (Lauren et al.

1992; Sugiura et al. 1993; Chandler et al. 2003; Leslie & Summerell 2006; Schmale et al. 2011). En la Argentina, esta especie ha sido aislada de maíz y trigo (López et al. 1997; Alvarez et al. 2011). Por otra parte, la primera ocurrencia de *F. cerealis* causando Fusariosis de la espiga en cebada fue reportada en China por Zhang et al. (2011). Esta especie es considerada un componente menor del complejo de especies causante de Fusariosis de la espiga con la habilidad de producir NIV y ZEA *in vitro* y ha sido considerada una de las principales especies de *Fusarium* responsables de la contaminación de granos de trigo con NIV y ZEA en Hokkaido, Japón (di Menna et al. 1991; Miller et al. 1991; Sugiura et al. 1993).

CAPÍTULO IV

**Variabilidad genética de
aislamientos del complejo
Fusarium graminearum
obtenidos de cebada en
Argentina, Brasil y
Uruguay**

4.1 INTRODUCCIÓN¹

El complejo *F. graminearum* comprende 16 especies filogenéticas pero la Fusariosis de la espiga es causada principalmente por *F. graminearum* s.s. o *F. asiaticum*, dependiendo de la región (Aoki et al. 2012). *Fusarium graminearum* s.s. es la especie dominante causante de la Fusariosis de la espiga de trigo en América. Sin embargo, estudios realizados en trigo y cebada en Sudamérica identificaron otras cinco especies que afectan estos cultivos: *F. asiaticum*, *F. austroamericanum*, *F. brasilicum*, *F. cortaderiae* y *F. meridionale* en trigo y *F. meridionale* y *F. austroamericanum* en cebada. Mientras que en la Argentina la Fusariosis de la espiga en trigo parece ser causada exclusivamente por *F. graminearum* s.s. (Alvarez et al. 2009; Reynoso et al. 2011) otras especies del complejo ocurren en Brasil y Uruguay en relativamente pequeña proporción (Scoz et al. 2009; Astolfi et al. 2011, 2012; Pan et al. 2013; Umpiérrez-Failache et al. 2013; Del Ponte et al. 2015).

Una revisión reciente de la estructura de la población del complejo *F. graminearum* mostró: I) una alta variabilidad (60-100 %), siendo mayor dentro de una población que entre poblaciones, II) que la subdivisión de la población dentro de una población es despreciable y III) que el flujo de genes es alto (Miedaner et al. 2008). Estos resultados fueron similares a los obtenidos en recientes estudios desarrollados en Sudamérica con una población de *F. graminearum* s.s. de trigo en Brasil (Astolfi et al. 2012) y maíz en la Argentina

¹ Los resultados del presente capítulo fueron publicados en: "Plant Pathology" 2015 (en prensa doi: 10.1111/ppa.12470), con el título "Species composition and genetic structure of *Fusarium graminearum* species complex populations affecting the main barley growing regions of South America" (Anexo II).

(Sampietro et al. 2011). Como se mencionó anteriormente, se han utilizado diversos marcadores para el estudio de la variabilidad genética, siendo los utilizados en este estudio los marcadores AFLP y SRAP. Sin embargo, hasta la fecha no se han reportado estudios comparando los resultados de diferentes marcadores para el análisis de la población del complejo *F. graminearum*. A su vez, son escasos los estudios de la diversidad de especies del complejo *F. graminearum* que afectan a la cebada en las principales regiones productoras de Sudamérica, tales como Argentina, Brasil y Uruguay. En Brasil, se identificó el perfil genotípico de tricotecenos de 92 aislamientos obtenidos de cebada, pero solo nueve aislamientos representativos de diferentes genotipos de tricotecenos se identificaron a nivel de especie, mediante la secuenciación de diferentes regiones génicas (Astolfi et al. 2011). Por otro lado, hasta el momento, la estructura genética de la población del complejo *F. graminearum* en Sudamérica se ha evaluado solo para aislamientos obtenidos de trigo mediante marcadores AFLP (Ramirez et al. 2007; Astolfi et al. 2012) y de maíz mediante marcadores VNTR (Sampietro et al. 2011).

Los objetivos planteados en el presente estudio fueron: 1) evaluar la variabilidad genética, mediante el empleo de dos sistemas de marcadores moleculares, de una colección de 117 aislamientos del complejo *F. graminearum* obtenidos de granos de cebada de las principales regiones productoras de Sudamérica; 2) evaluar el potencial de los aislamientos de producir tricotecenos del tipo B y ZEA mediante PCR y analizar una muestra de los aislamientos representativa de los diferentes genotipos de tricotecenos mediante la

secuenciación de los genes *RED* y *Tri101*, para confirmar su identificación a nivel de especie por comparación con aislamientos de referencia.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Aislamientos del complejo *Fusarium graminearum* empleados

En este estudio se utilizó una colección de 117 aislamientos monospóricos, la cual estuvo constituida por 43 aislamientos de Argentina, 35 de Brasil y 39 de Uruguay. Los aislamientos de Argentina fueron obtenidos según lo descrito previamente (Capítulo II) y constituyeron una submuestra, proveniente de 6 localidades durante dos estaciones de cultivo (2010 y 2011). Por otro lado, tanto los aislamientos de Brasil como los de Uruguay fueron cedidos gentilmente por el Dr. Emerson Del Ponte (Departamento de Fitopatología, Universidad Federal de Vicosa, Campus Universitario s/n, Vicosa, 36570-000, MG, Brasil) y por la Dra. Dinorah Pan (Laboratorio de Micología, Facultad de Ciencias-Facultad de Ingeniería, UdelaR, Julio Herrera y Reissig 565, 11200 Montevideo, Uruguay), respectivamente, en tubos Eppendorf conteniendo el ADN de los aislamientos. Los aislamientos de Brasil constituyeron una submuestra, proveniente de 19 localidades durante tres estaciones de cultivo (2007, 2008 y 2009) y los aislamientos de Uruguay constituyeron una submuestra proveniente de una localidad durante el año 2011. Todos ellos fueron seleccionados al azar de una colección de mayor tamaño. Además se incluyeron seis aislamientos de *F. graminearum* s.s. obtenidos de granos de trigo de la Argentina para comparar si se agrupaban junto con los aislamientos obtenidos de cebada. Para el análisis de

agrupamiento se utilizaron como controles positivos aislamientos de referencia de cinco especies del complejo *F. graminearum* (*F. graminearum* s.s., *F. meridionale*, *F. asiaticum*, *F. austroamericanum* y *F. cortaderiae*), mientras que como grupo externo se utilizó un aislamiento de *F. pseudograminearum* y uno de *F. cerealis* obtenidos de granos de cebada de la Argentina (Tabla 9).

Los aislamientos de Brasil (B) y Uruguay (U) fueron identificados mediante una reacción de PCR específica con los cebadores Fg16 F/R y Fg16N F/R y se determinó el potencial toxicogénico de los mismos, según lo descrito previamente (Capítulo II), mientras que los aislamientos de Argentina (A) habían sido previamente identificados y caracterizado su genotipo de tricotecenos (Capítulo III).

A su vez, se realizó la identificación de un grupo de aislamientos, seleccionados al azar, mediante la amplificación y secuenciación de dos regiones conservadas (*RED* y *Tri101*) (Capítulo II). Dentro de los aislamientos seleccionados, 12 fueron del genotipo NIV (B = 11 y U = 1), uno del genotipo 3-ADON (B = 1) y cinco del genotipo 15-ADON (B = 2, U = 3), además de los 10 aislamientos de Argentina con genotipo 15-ADON que fueron previamente secuenciados e identificados como *F. graminearum* s.s., seis de los cuales fueron utilizados en el presente estudio (Capítulo III).

Tabla 9. País de origen, genotipo de tricotecenos, especie y hospedante de los aislamientos del complejo *F. graminearum* utilizados en este estudio.

Aislamiento	País de Origen	Genotipo de Tricoteceno	Especie	Hospedante
Ass5^d	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A3/6	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A6/3	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A13/1	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A13/6	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A11/1	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A11/2^d	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A17/1	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A27/1	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A27/9	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A35/4^d	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A33/2	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A62/1	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A62/3	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A27/10	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A29/9^d	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A29/11	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A29/12	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A33/14	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A33/16^d	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A92/2	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A92/8	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A92/10	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A90/1	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A90/2	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A29/14	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A29/15	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A92/7	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A27/14	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A27/16	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A27/18	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A27/20	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A33/24	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A33/27	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A33/30	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A82/1	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A88/1	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A88/3	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A87/2	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A87/5	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A33/22	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.

Tabla 9. Continuación.

A92/11	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
A85/1^d	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U1	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U2	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U3	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U4	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U5	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U6	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U7	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U8^d	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U9	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U10	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U11	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U12	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U14	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U16^d	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U17	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U18	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U19	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U20^d	Uruguay	NIV	<i>F. cortaderiae</i>	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U21	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U22	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U23	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U24	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U28	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U29	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U30	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U36	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U38^d	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U40	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U53	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U44	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U45	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U47	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U48	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U51	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U52	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U55	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U58	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U64	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
U65	Uruguay	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B14/1^d	Brasil	NIV	<i>F. meridionale</i>	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B14/2	Brasil	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B18/1	Brasil	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B18/2^d	Brasil	NIV	<i>F. meridionale</i>	<i>Hordeum vulgare</i> L.

Tabla 9. Continuación.

B23/2	Brasil	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B26/1^a	Brasil	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B26/4	Brasil	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B26/5	Brasil	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B32/1	Brasil	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B36/1	Brasil	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B39/1	Brasil	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B39/2^d	Brasil	NIV	<i>F. asiaticum</i>	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B45/1^a	Brasil	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B45/2	Brasil	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B46/1^d	Brasil	NIV	<i>F. cortaderiae</i>	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B15/4	Brasil	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B836/3^d	Brasil	NIV	<i>F. asiaticum</i>	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B846/1^d	Brasil	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B813/2	Brasil	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B811/1^a	Brasil	NIV	<i>F. meridionale</i>	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B848/2	Brasil	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B807/2^d	Brasil	NIV	<i>F. meridionale</i>	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B827/1^d	Brasil	NIV	<i>F. meridionale</i>	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B18	Brasil	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B27	Brasil	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B6	Brasil	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B13^d	Brasil	3-ADON	<i>F. austroamericanum</i>	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B3^d	Brasil	NIV	<i>F. cortaderiae</i>	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B16^d	Brasil	NIV	<i>F. meridionale</i>	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B17^d	Brasil	NIV	<i>F. meridionale</i>	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B33	Brasil	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B20^d	Brasil	NIV	<i>F. meridionale</i>	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B23^d	Brasil	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B26	Brasil	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
B34	Brasil	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Hordeum vulgare</i> L.
17/17TG	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Triticum aestivum</i> L.
16/1TG	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Triticum aestivum</i> L.
14/14TG	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Triticum aestivum</i> L.
13/6TG	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Triticum aestivum</i> L.
5/1TG	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Triticum aestivum</i> L.
5/5TG	Argentina	15-ADON	<i>F. graminearum</i> s.s.	<i>Triticum aestivum</i> L.
13818^b	Japón	NIV	<i>F. asiaticum</i>	<i>Hordeum vulgare</i> L.
2903^b	Brasil	3-ADON	<i>F. austroamericanum</i>	Polypore
28436^b	Nueva Caledonia	NIV	<i>F. meridionale</i>	<i>Ipomoea batatas</i>
23652^b	NN	NN	<i>F. graminearum</i> s.s.	NN
F5036^a	Argentina	DON/NIV	<i>F. cortaderiae</i>	<i>Glycine max</i> L.
M14/11Fp^c	Argentina	3-ADON	<i>F. pseudograminearum</i>	<i>Hordeum vulgare</i> L.
Herrero5Fc^c	Argentina	NIV	<i>F. cerealis</i>	<i>Hordeum vulgare</i> L.

^aAislamientos previamente identificados por Astolfi et al. (2011) y Barros et al. (2012, 2014).

^bAislamientos de referencia: NRRL 13818 *F. asiaticum*; NRRL 2903 *F. austroamericanum*; NRRL 28436 *F. meridionale*; 23652 *F. graminearum* s.s.

^cGrupos externos: M14/11Fp *F. pseudograminearum*; Herrero5Fc *F. cerealis*.

^dAislamientos identificados por secuenciación (Tabla 16).

NN = Dato no disponible

4.2.2 Marcadores AFLP

4.2.2.1 Digestión y Ligación

El primer paso para llevar a cabo esta técnica consistió en digerir el ADN genómico con dos enzimas de restricción, *EcoRI* y *MseI*, y luego los adaptadores fueron ligados a los extremos de los fragmentos del ADN para generar ADN templado para la amplificación. Las mezclas de la reacción de digestión y ligación se muestran a continuación en las tablas 10 y 11, respectivamente.

Tabla 10. Componentes de la reacción de digestión mediante enzimas de restricción.

Componentes de reacción	Volumen
ADN genómico total (100 ng)	6 µL
Enzima <i>MseI</i> (2,5 U)	0,5 µL
“Buffer” CUT	2,5 µL
H ₂ O destilada estéril	6 µL
Se incuba a 37 °C durante 2:30 hs	
Enzima <i>EcoRI</i> (20 U)	1 µL
“Buffer” <i>EcoRI</i>	0,25 µL
Se incuba a 37 °C durante 2:30 hs	

Tabla 11. Componentes de la reacción de ligación con adaptadores AFLP.

Componentes de reacción	Volumen
Adaptador <i>EcoRI</i> (5 µM)	0,5 µL
Adaptador <i>MseI</i> (50 µM)	0,5 µL
T ₄ ADN ligasa	0,3 µL
“Buffer” T ₄ (100 U)	2,5 µL
H ₂ O destilada estéril	1,2 µL
Se incuba a 16 °C durante toda la noche	

4.2.2.2 Preamplificación

En este paso el ADN fue amplificado con cebadores que contenían un único nucleótido selectivo. Los componentes de reacción se muestran en la Tabla 12. Para llevar a cabo la preamplificación, se realizó una dilución 1:10 con TE de la mezcla de reacción que fue previamente digerida y ligada y luego se utilizaron

5 μL como ADN templado. Luego de realizar la mezcla de reacción, ésta se colocó en el termociclador (XP “Termal Cycler”, Life Express, Bioer Technology Co, LTD), el cual fue programado con un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 min. Luego, se realizó un ciclo de desnaturalización a 94 °C por 30 s, apareamiento a 55 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 1 min, repitiendo dicho ciclo 20 veces. Finalmente, se realizó un ciclo de extensión a 72 °C durante 5 min.

Tabla 12. Componentes de reacción de preamplificación.

Componentes de reacción	Volumen
ADN templado	5 μL
“Buffer” de reacción 10 X	2,5 μL
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 μL
dNTP (10 mM)	1 μL
Cebador <i>EcoRI</i> (10 μM)	0,6 μL
Cebador <i>MseI</i> (10 μM)	0,6 μL
<i>Taq</i> ADN polimerasa (5000 U/mL)	0,25 μL
H ₂ O destilada estéril	12,55 μL

4.2.2.3 Amplificación

En este paso, se realizó la amplificación selectiva del ADN mediante el empleo de cebadores con dos nucleótidos selectivos. Previo a realizar la amplificación, se realizó una dilución 1:20 con TE de la reacción de preamplificación y se utilizaron 5 μL como ADN templado. Los componentes de la reacción de amplificación se muestran en la Tabla 13. Se utilizaron dos combinaciones de cebadores: *EcoRI* + TG / *MseI* + TT y *EcoRI* + AC / *MseI* + CA, las

cuales fueron seleccionadas en base a la eficiencia de producir fragmentos polimórficos. Una vez realizada la mezcla de reacción, se colocó en el termociclador de gradiente (Life Express, Bioer), el cual fue programado con un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 min. Luego se realizó un ciclo de desnaturalización a 94 °C por 30 s, apareamiento a 65 °C por 30 s, con descenso de 0,7 °C por ciclo hasta llegar a 56 °C, y una extensión a 72 °C por 1 min, repitiendo este ciclo 11 veces. Luego se continuó con un ciclo de desnaturalización a 94 °C por 30 s y un ciclo de desnaturalización a 94 °C por 30 s, apareamiento a 56 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 1 min, repitiendo dicho ciclo 25 veces. Finalmente se realizó una extensión a 72 °C por 5 min.

Tabla 13. Componentes de la reacción de amplificación.

Componentes de reacción	Volumen
ADN templado	5 µL
“Buffer” de reacción 10 X	2,5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 µL
dNTP (10 mM)	1,6 µL
Cebador <i>EcoRI</i> (1 µM)	1 µL
Cebador <i>MseI</i> (5 µM)	1 µL
<i>Taq</i> ADN polimerasa (5000 U/mL)	0,25 µL
H ₂ O destilada estéril	6,15 µL

4.2.2.4 Corridas electroforéticas para la separación de los fragmentos amplificados

Los fragmentos amplificados fueron separados mediante corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida, utilizando una cuba de secuenciado (“Large Format Vertical”, Cleaver Scientific Ltd) y posterior tinción con plata. Para ello, primero se procedió al lavado de los vidrios con agua destilada, seguido de un lavado con alcohol al 95 % y finalmente con alcohol 70 %. Luego, el vidrio chico fue tratado con una solución que contenía 1 mL del alcohol 95 %, 5 μ L de ácido acético y 3 μ L de Bind Silane (Sigma-Aldrich Co. St Louis, MO) para permitir que el gel se adhiriera al vidrio. Luego de aplicar dicha solución y de haber dejado actuar 5 min, se procedió a lavar el vidrio de la misma manera descrita anteriormente. Seguidamente, se montaron los vidrios y sellaron alrededor, se procedió al llenado con la solución de poliacrilamida al 4 % (Anexo I) y se dejó polimerizar durante toda la noche.

Los vidrios con el gel polimerizado fueron montados en el soporte, se colocó la solución del “buffer” de corrida (aproximadamente 3 L de TBE 1 X) y se precalentó el gel sometiéndolo durante 30 min a 55 W constantes. Las muestras a sembrar se trataron con 10 μ L de azul de bromofenol sacarosa, se llevaron al termociclador a 95 °C durante 5 min y luego se colocaron en hielo. Posteriormente se sembraron en el gel y se realizó la corrida a 55 W constantes durante 2:30 hs. A su vez, se sembró junto a las muestras un marcador de peso molecular conocido de 100 pb (Genbiotech S.R.L., Buenos Aires, Argentina).

Una vez terminada la corrida, se desmontaron los vidrios, se despegaron los geles de los mismos y se colocaron en sendos recipientes para realizar el proceso de tinción.

4.2.3 Marcadores SRAP

Para el desarrollo de la técnica de SRAP se seleccionaron cinco combinaciones de cebadores, de nueve totales, en base a la eficiencia de producir bandas polimórficas: ME5/EM13, ME1/EM13, ME6/EM13, ME6/EM17, ME1/EM17 (Wang et al. 2010) (Tabla 14). Para las reacciones se utilizaron 10-20 ng de ADN genómico total en un volumen final de 25 μ L. Los componentes de reacción se detallan en la Tabla 15. Una vez obtenida la mezcla de reacción, se colocó en el termociclador de gradiente (Life Express, Bioer) en el cual se realizó una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguida de una desnaturalización a 94 °C por 1 min, apareamiento a 35 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 1 min, por un total de 5 ciclos. Luego la temperatura de apareamiento se elevó a 50 °C, realizándose 35 ciclos. Finalmente, se realizó una extensión a 72 °C por 10 min.

Tabla 14. Secuencias de los cebadores utilizados en las reacciones con los marcadores SRAP (Wang et al. 2010).

Cebador	Secuencia (5'-3')
ME1	TGA GTC CAA ACC GGA TA
ME6	TGA GTC CAA ACC GGT CA
EM17	GAC TGC GTA CGA ATT CCA
ME5	TGA GTC CAA ACC GGA AG
EM13	GAC TGC GTA CGA ATT GGT

Tabla 15. Componentes de reacción utilizados en las reacciones con los marcadores SRAP.

Componente de reacción	Volumen
ADN genómico 10-20 ng	1,5 µL
“Buffer” 10 X	2,5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 µL
dNTP (5 mM)	0,5 µL
Cebador directo (“Forward”)(50 µM)	0,5 µL
Cebador reverso (“Reverse”)(50 µM)	0,5 µL
<i>Taq</i> ADN polimerasa (5000 U/mL)	0,2 µL
H ₂ O destilada estéril	16,8 µL

4.2.3.1 Corridas electroforéticas para la separación de los fragmentos amplificados

Los fragmentos amplificados fueron separados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, utilizando un equipo de electroforesis vertical (“omniPAGE maxi” Cleaver Scientific Ltd), y las corridas fueron realizadas a 54 mA constantes durante aproximadamente 4 hs. El “buffer” de corrida utilizado estuvo constituido por una solución de TBE 1 X.

Los vidrios utilizados fueron lavados de la misma manera descripta para los marcadores AFLP, exceptuando el tratado de los mismos con la solución de Bind Silane. Una vez lavados los vidrios, se montaron, sellaron, se procedió al llenado de los mismos con la solución de poliacrilamida al 4 % y se dejó polimerizar toda la noche.

Previo a las corridas electroforéticas, a cada una de las muestras a sembrar se les agregó 10 μ L de azul de bromofenol sacarosa y se las desnaturalizó a 90 °C durante 2 min, y luego se las colocó en hielo. Posteriormente, se sembraron las muestras en el gel y se realizó la corrida electroforética. A su vez, se sembró junto a las muestras un marcador de peso molecular conocido de 100 pb (Genbiotech S.R.L., Buenos Aires, Argentina).

Una vez terminada la corrida, se desmontaron los vidrios, se despegaron los geles de los mismos y se colocaron en sendos recipientes para realizar el proceso de tinción.

4.2.4 Tinción y revelado de los geles de poliacrilamida

Finalizada la corrida electroforética se procedió a la tinción del gel siguiendo el protocolo de Bassan et al. (1991) modificado. Para ello, se despegaron los vidrios y, en el caso de AFLP, el vidrio chico conteniendo el gel adherido, se colocó en un recipiente adecuado con una solución de ácido acético al 10 % (Anexo I) durante 20 min con agitación constante. En el caso de SRAP, se despegó el gel del vidrio y se colocó en el recipiente respectivo, respetando las mismas condiciones que para AFLP. Transcurrido dicho período de tiempo, se recuperó la solución de ácido acético y se procedió a realizar tres lavados sucesivos con agua destilada, cada uno por un tiempo de 2 min y con agitación constante. Luego se colocó el gel en una solución de nitrato de plata 0,1 % (Anexo I) contenida en un recipiente oscuro (ya que dicha solución es fotolábil) durante 40 min, también con agitación constante. Seguidamente, se enjuagó el gel con agua destilada durante 10 s y se colocó en la solución de carbonato de sodio 3 % (Anexo I), dejándolo sumergido hasta que las bandas sean nítidas, momento en el cual se retiró el gel y se colocó 5 min en la solución de ácido acético 10 %. Finalmente, se enjuagó con agua destilada y se dejó secar en un lugar adecuado para luego proceder al análisis del mismo. Para los geles resultantes de los marcadores AFLP se analizaron los fragmentos comprendidos entre 150-450 pb, mientras que para los marcadores SRAP se analizó la totalidad de los fragmentos obtenidos.

4.2.5 Secuenciación de fragmentos generados por los marcadores SRAP

Debido a que la técnica de SRAP tiene la posibilidad de detectar marcos abiertos de lectura (“Open Reading Frames”-ORFs), se seleccionaron al azar fragmentos generados por los marcadores SRAP para determinar si estos codifican para alguna proteína de interés. Tres fragmentos monomórficos y 2 polimórficos fueron cortados, con la ayuda de un bisturí desinfectado con alcohol 95 %, de geles de poliacrilamida e introducidos en tubos Eppendorf de 2 mL. A dichos tubos se les agregó 50 μ L de agua destilada estéril y con la punta de un tip se desintegró el fragmento. Luego, los tubos Eppendorf se colocaron en un termobloque seco y se dejaron a 95 °C durante 5 min. Transcurrido dicho período de tiempo, se utilizaron 5 μ L del contenido de cada tubo como ADN templado para realizar la re-amplificación de los fragmentos, siguiendo las condiciones de la técnica de SRAP descritas anteriormente. Una vez realizada la reacción, se separaron y visualizaron los fragmentos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % con 3 μ L de GelRed™ durante 2 h a 80 V, sembrando 5 μ L del producto de reacción. En el caso de que se haya observado un único fragmento amplificado, se procedió a purificar directamente del producto de reacción. Cuando, tras la corrida electroforética, se observó la amplificación de más de un fragmento, se procedió a realizar un nuevo gel de agarosa en el cual se sembró la totalidad de la reacción, sembrando también un marcador de peso molecular conocido de 100 pb (Genbiotech S.R.L., Buenos Aires, Argentina) y se dejó separar por electroforesis aproximadamente 2 hs a 80 V. Luego, el fragmento de interés se cortó del gel, con un bisturí desinfectado

con alcohol 95 %, y se realizó la purificación de éste. La purificación de los fragmentos amplificados se realizó con el “Purelink™ Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo Kit” (Invitrogen, Löhne, Germany) siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante. Se cuantificó el producto obtenido con el fluorómetro Qubit™ (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante y se envió a secuenciar al instituto de investigación CERELA-Tucumán (Centro de referencia para Lactobacilos), en el cual se realiza la secuenciación mediante el uso de un “BigDye Terminator version 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 se compararon con las base de datos de FUSARIUM ID (Geiser et al. 2004) y fueron depositadas en la base de datos del NCBI/GenBank.

4.2.6 Análisis estadístico

Se realizó en cada caso un análisis de agrupamiento con los datos de cada uno de los marcadores utilizados. Los fragmentos amplificados de cada marcador fueron registrados manualmente en una matriz binaria, en la cual ‘1’ representa la presencia de un fragmento y ‘0’ su ausencia. Esta es una matriz $n \times t$ donde n filas representan los caracteres o variables (fragmentos AFLP y SRAP) y las t columnas representan los genotipos (OTU- Unidades Taxonómicas Operativas)(Sneath & Sokal 1973). Todos los fragmentos fueron registrados, incluyendo aquellos que fueron monomórficos. Fragmentos migrando a la misma posición fueron asumidos ser homólogos.

Para estimar la distancia genética entre los individuos se utilizaron los coeficientes de similitud Jaccard, Dice y Simple Matching (SM). Los dos primeros son coeficientes de asociación asimétricos, debido a que no consideran la doble ausencia como indicador de semejanza, mientras que SM es considerado un coeficiente de asociación simétrico, ya que utiliza la doble ausencia o doble cero para el cálculo de la matriz de similitud. Estos coeficientes quedan representados por las siguientes fórmulas:

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

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

$$DICE = \frac{2 A}{2 A + B + C}$$

Donde:

A, es el número de fragmentos observados en ambos genotipos [1,1];

B, es el número de fragmentos observados en un genotipo y que están ausentes en el otro [1,0];

C, es el número de fragmentos ausentes en el primer genotipo y presentes en el segundo [0,1];

D, son los fragmentos ausentes en ambos genotipos [0,0].

El valor de similitud de dichos coeficientes oscila entre 1 y 0, lo cual equivale a la máxima y mínima similitud, respectivamente.

Los dendogramas fueron construidos utilizando al algoritmo UPGMA en el “software” estadístico NTSYSpc versión 2.0 (Rohlf 1998). A su vez, fue realizado un análisis molecular de la varianza (AMOVA) para examinar la estructura jerárquica de la población utilizando las distancias entre haplotipos. Este análisis fue realizado para la población total del complejo *F. graminearum* así como para los aislamientos pertenecientes a *F. graminearum* s.s. La distancia elegida fue la Euclídea la cual es equivalente al número de diferencias entre dos individuos en su perfil multilocus. A su vez, se evaluó para la población total así como para la población de cada país, la diversidad genotípica (heterocigosis esperada, H) o la probabilidad promedio de que dos alelos seleccionados al azar en un locus sean diferentes, con la suposición de que dos poblaciones están en equilibrio Hardy-Weinberg (Nei 1987). Estos análisis fueron realizados con el programa Arlequin 2000 (Schneider et al. 2000). El test de Mantel (MXCOMP del NTSYSpc 2.0) fue utilizado para calcular la similitud entre las matrices generadas con ambos marcadores.

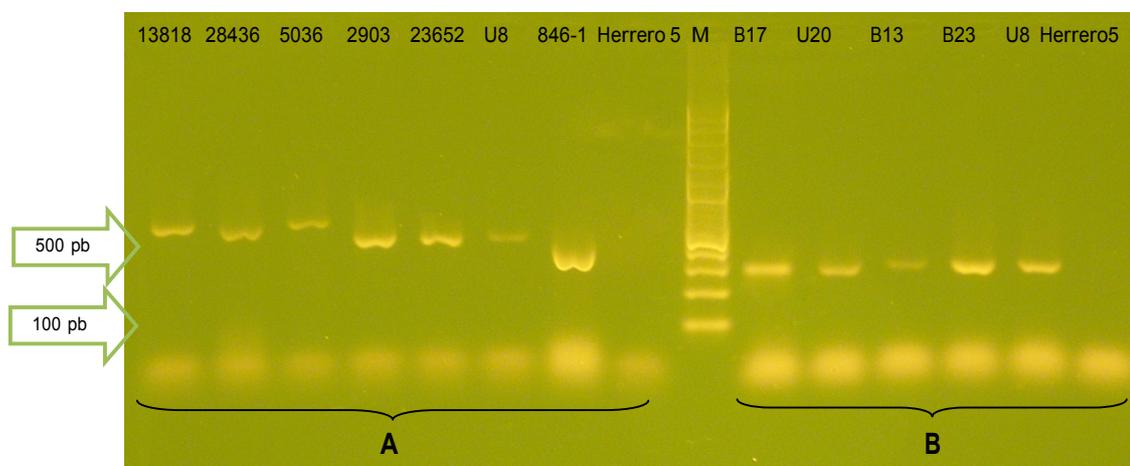
4.3 RESULTADOS

4.3.1 Identificación de los aislamientos mediante PCR

Todos los aislamientos de Brasil y Uruguay (74) amplificaron un fragmento de aproximadamente 280 pb con el par de cebadores Fg16N, confirmando de esta manera que pertenecían al complejo de *F. graminearum*.

Por otro lado, con los cebadores Fg16 se generaron fragmentos de diferentes tamaños (380 a 580 pb), sugiriendo que los aislamientos pertenecerían a diferentes especies dentro del complejo. Los dos controles utilizados, *F. pseudograminearum* y *F. cerealis*, no amplificaron para ninguno de los dos pares de cebadores (Figura 26).

Figura 26. Reacción de PCR específica con cebadores Fg16 F/R (A) y Fg16N F/R (B). Siete aislamientos del complejo *F. graminearum*, control negativo, marcador de peso molecular conocido (M), seguido de cinco aislamientos del complejo *F. graminearum* y un control negativo. Las flechas indican las bandas de 100 y 500 pb del marcador.



4.3.2 Potencial toxicogénico (Genotipo)

Mediante la reacción de PCR con los cebadores que amplifican la región del gen *TRI13*, 13 de los 74 aislamientos de Brasil y Uruguay amplificaron un fragmento de 312 pb con los cebadores Tri13NIV F/R, mientras que no se observaron amplificaciones con los cebadores Tri13DON F/R. Los restantes 61

aislamientos amplificaron un fragmento de 282 pb con los cebadores Tri13DON F/R, mientras que no se observaron amplificaciones con los cebadores Tri13NIV F/R. Todos los controles amplificaron los fragmentos esperados para los genotipos DON y NIV. Con la reacción de PCR “multiplex”, los mismos 13 aislamientos amplificaron un fragmento de 625 pb indicando genotipo NIV y el resto de los aislamientos amplificaron un fragmento de 525 pb indicando genotipo DON. Para los genotipos DON, solo un aislamiento amplificó un fragmento de 354 pb indicando genotipo 3-ADON y el resto un fragmento de 708 pb indicando genotipo 15-ADON (Tabla 9).

Todos los aislamientos de Brasil y Uruguay y el control positivo amplificaron un fragmento de 280 pb con los cebadores PKS4 F/R, indicando el potencial de los mismos de producir ZEA, mientras que no se observó amplificación para el aislamiento de *F. poae*.

4.3.3 Identificación en base a los genes *RED* y *Tri101*

Los aislamientos secuenciados mostraron alto grado de similitud con cinco miembros del complejo *F. graminearum*. Entre los 18 aislamientos de Brasil y Uruguay secuenciados, los cinco aislamientos con genotipo 15-ADON (B = 2 y U = 3) fueron asignados a *F. graminearum* s.s., además de los seis aislamientos argentinos seleccionados para este análisis previamente identificados por secuenciación (Capítulo III). El único aislamiento con genotipo 3-ADON (de Brasil) fue *F. austroamericanum*. Entre los 12 aislamientos secuenciados con genotipo NIV, tres (B = 2 y U = 1) presentaron alto grado de similitud con *F. cortaderiae*,

siete (de Brasil) con *F. meridionale* y dos (de Brasil) con *F. asiaticum* (Tabla 16). A su vez, dentro de los aislamientos utilizados en este estudio, tres de ellos habían sido previamente identificados como *F. graminearum* s.s. (B26/1 y B45/1) y *F. meridionale* (B811/1) (Tabla 9).

En las figuras 27 y 28 se muestran los alineamientos de las secuencias obtenidas de cinco especies representativas del complejo *F. graminearum* mediante la amplificación de los genes *Tri101* y *RED*, respectivamente.

Tabla 16. Números de accesoión de “GenBank” de los 24 aislamientos del complejo de especies de *F. graminearum* secuenciados utilizados en este estudio.

Aislamiento	Especie	RED	Tri101
Ass5	<i>F. graminearum</i> s.s.	KR456289	KR456313
A11/2	<i>F. graminearum</i> s.s.	KR456290	KR456314
A35/4	<i>F. graminearum</i> s.s.	KR456291	KR456315
A29/9	<i>F. graminearum</i> s.s.	KR456292	KR456316
A33/16	<i>F. graminearum</i> s.s.	KR456293	KR456317
A85/1	<i>F. graminearum</i> s.s.	KR456294	KR456318
B23	<i>F. graminearum</i> s.s.	KR456295	KR456319
U38	<i>F. graminearum</i> s.s.	KR456296	KR456320
U16	<i>F. graminearum</i> s.s.	KR456297	KR456321
U8	<i>F. graminearum</i> s.s.	KR456298	KR456322
B846/1	<i>F. graminearum</i> s.s.	KR456299	KR456323
B17	<i>F. meridionale</i>	KR456300	KR456324
B827/1	<i>F. meridionale</i>	KR456301	KR456325
B14/1	<i>F. meridionale</i>	KR456302	KR456326
B18/2	<i>F. meridionale</i>	KR456303	KR456327
B20	<i>F. meridionale</i>	KR456304	KR456328
B807/2	<i>F. meridionale</i>	KR456305	KR456329
B16	<i>F. meridionale</i>	KR456306	KR456330
B3	<i>F. cortaderiae</i>	KR456307	KR456331
U20	<i>F. cortaderiae</i>	KR456308	KR456332
B46/1	<i>F. cortaderiae</i>	KR456309	KR456333
B39/2	<i>F. asiaticum</i>	KR456310	KR456334
B836/3	<i>F. asiaticum</i>	KR456311	KR456335
B13	<i>F. austroamericanum</i>	KR456312	KR456336

Figura 27. Alineamiento de las secuencias resultantes de la amplificación del gen *Tri101* de cinco miembros del complejo *F. graminearum*. En blanco (columnas) se observan las variaciones (diferentes bases) entre las secuencias. 1: *F. graminearum* s.s.; 2: *F. meridionale*; 3: *F. cortaderiae*; 4: *F. asiaticum*; 5: *F. austroamericanum*.

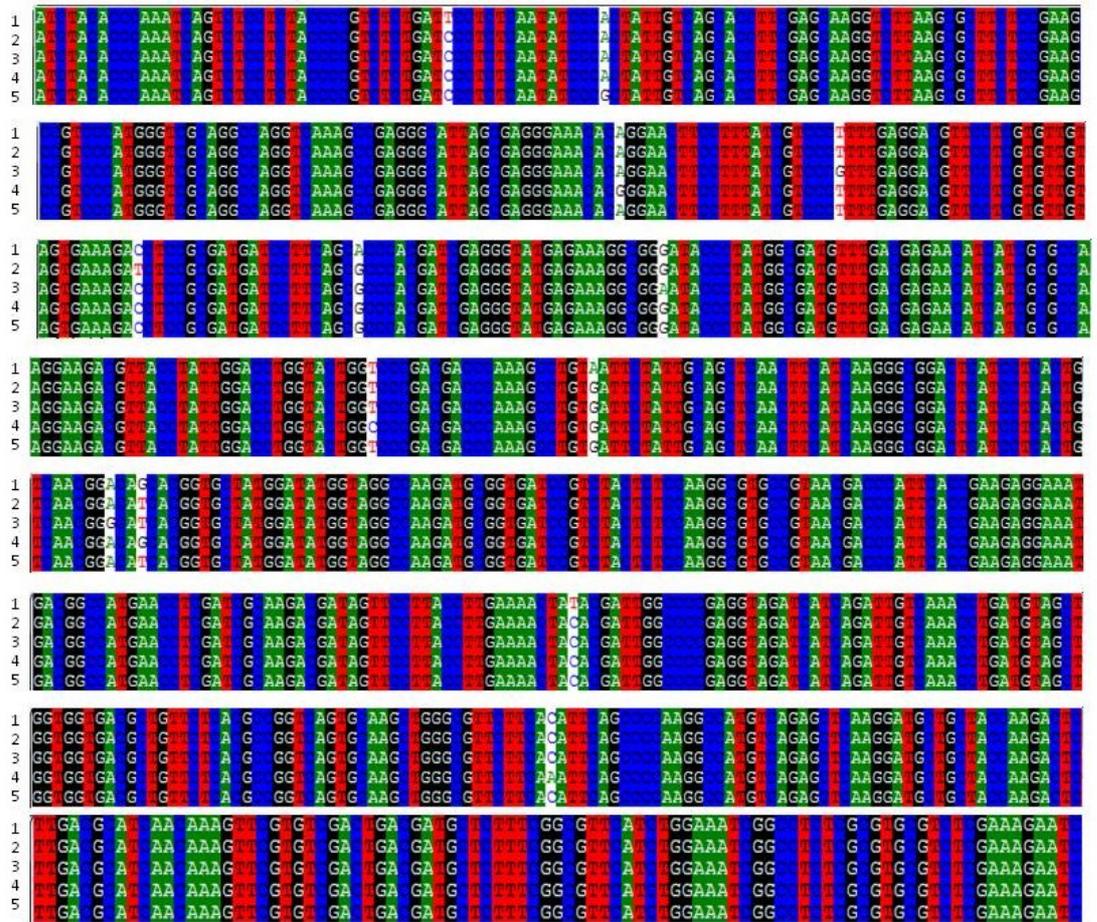
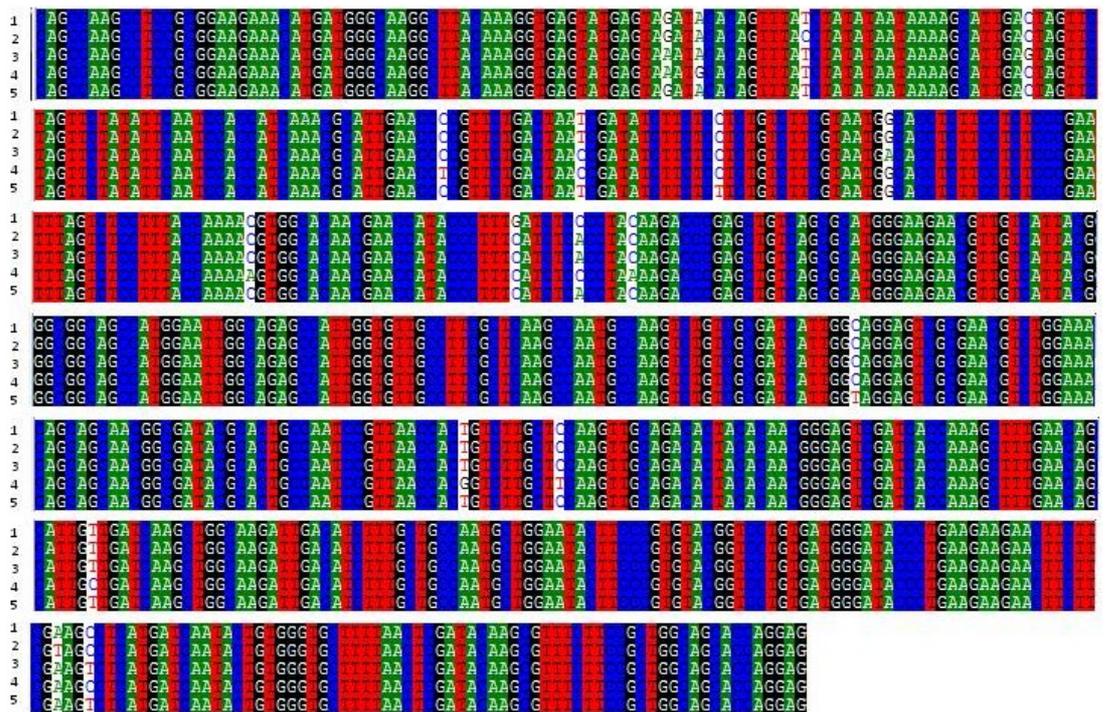


Figura 28. Alineamiento de las secuencias resultantes de la amplificación del gen *RED* de cinco miembros del complejo *F. graminearum*. En blanco (columnas) se observan las variaciones (diferentes bases) entre las secuencias. 1: *F. graminearum* s.s.; 2: *F. meridionale*; 3: *F. cortaderiae*; 4: *F. asiaticum*; 5: *F. austroamericanum*.



4.3.4 Test de Mantel

El coeficiente de correlación obtenido para comparar la similitud de matrices obtenidas por la utilización de dos tipos de marcadores (AFLP y SRAP) mostró una correlación moderada ($r = 0,75$), sugiriendo que el análisis debe realizarse separadamente.

4.3.5 Agrupamientos obtenidos con los marcadores AFLP y SRAP

En este estudio se evaluó la variabilidad genética de una colección de aislamientos del complejo *F. graminearum* de Sudamérica con el empleo de dos marcadores moleculares AFLP y SRAP (Figura 29). De los coeficientes de similitud empleados para el análisis de agrupamiento, se seleccionó el coeficiente SM por mostrar menor grado de distorsión (AFLP $r = 0,96357$; SRAP $r = 0,96072$).

Con los marcadores AFLP, ambos grupos externos (*F. pseudograminearum* y *F. cerealis*) fueron separados de los aislamientos del complejo *F. graminearum* (Figura 30). El análisis de agrupamiento mostró que se formaron cuatro grupos principales. Seis de los ocho aislamientos de *F. meridionale* se agruparon con el aislamiento de referencia de *F. meridionale* (grupo I), los dos aislamientos de *F. asiaticum* se agruparon juntos, pero separados del aislamiento de referencia de *F. asiaticum* (grupo II), dos de los tres aislamientos de *F. cortaderiae* se agruparon con el aislamiento de referencia (grupo III) y el aislamiento de *F. austroamericanum* se agrupó con el aislamiento de referencia (grupo IV). Los restantes aislamientos de *F. meridionale* y *F. cortaderiae* fueron distribuidos a lo largo de la última porción del dendograma. Respecto de los aislamientos de *F. graminearum* s.s., la mayoría (96/102) formaron un grupo junto al aislamiento de referencia y separado de las demás especies del complejo, mientras que los demás (6/102) quedaron distribuidos a lo largo de la última porción del dendograma (Figura 30).

Con los marcadores SRAP, los grupos externos no fueron totalmente separados de los aislamientos del complejo *F. graminearum* (Figura 31). Dos

aislamientos de referencia (*F. cortaderiae* y *F. asiaticum*) fueron agrupados juntos (grupo I). Solo dos grupos comprendieron aislamientos de la misma especie, grupo II y grupo IV, los cuales agruparon los aislamientos de *F. asiaticum* y *F. graminearum* s.s., respectivamente. En el grupo III, se agruparon tres aislamientos de *F. cortaderiae*, ocho de *F. meridionale* y uno de *F. austroamericanum* (Figura 31).

En ningún caso los aislamientos fueron agrupados por su origen geográfico y con ambos marcadores los aislamientos obtenidos de trigo fueron agrupados con los aislamientos de *F. graminearum* s.s. obtenidos de cebada (Figura 30 y 31).

Figura 29. Patrones de amplificación obtenidos con marcadores AFLP (A) y SRAP (B).

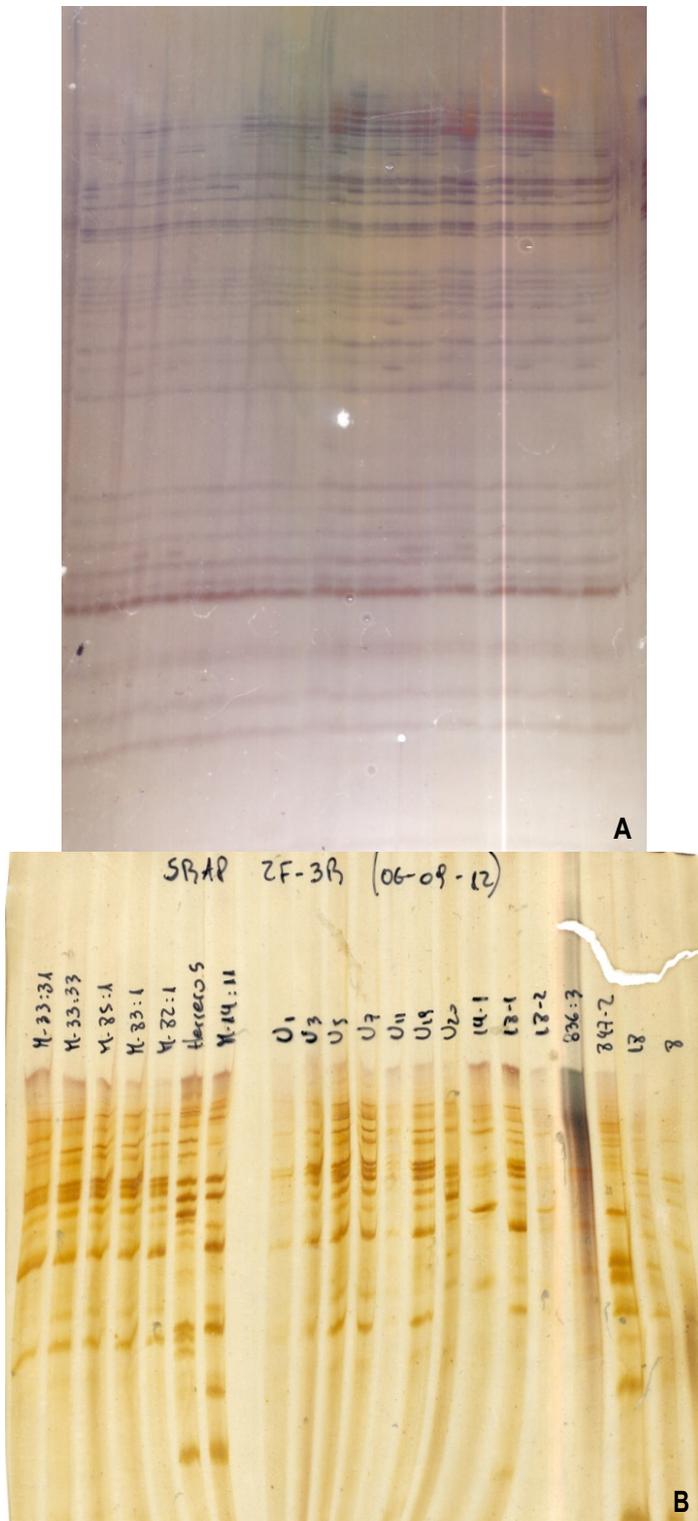


Figura 30. Dendograma obtenido con los marcadores AFLP.

A: Argentina; B: Brasil; U: Uruguay. Fgra: *F. graminearum* s.s.;

Fmer: *F. meridionale*; Faus: *F. austroamericanum*; Fasi: *F.*

asiaticum; Fcor: *F. cortaderiae*; GE: Grupo Externo.

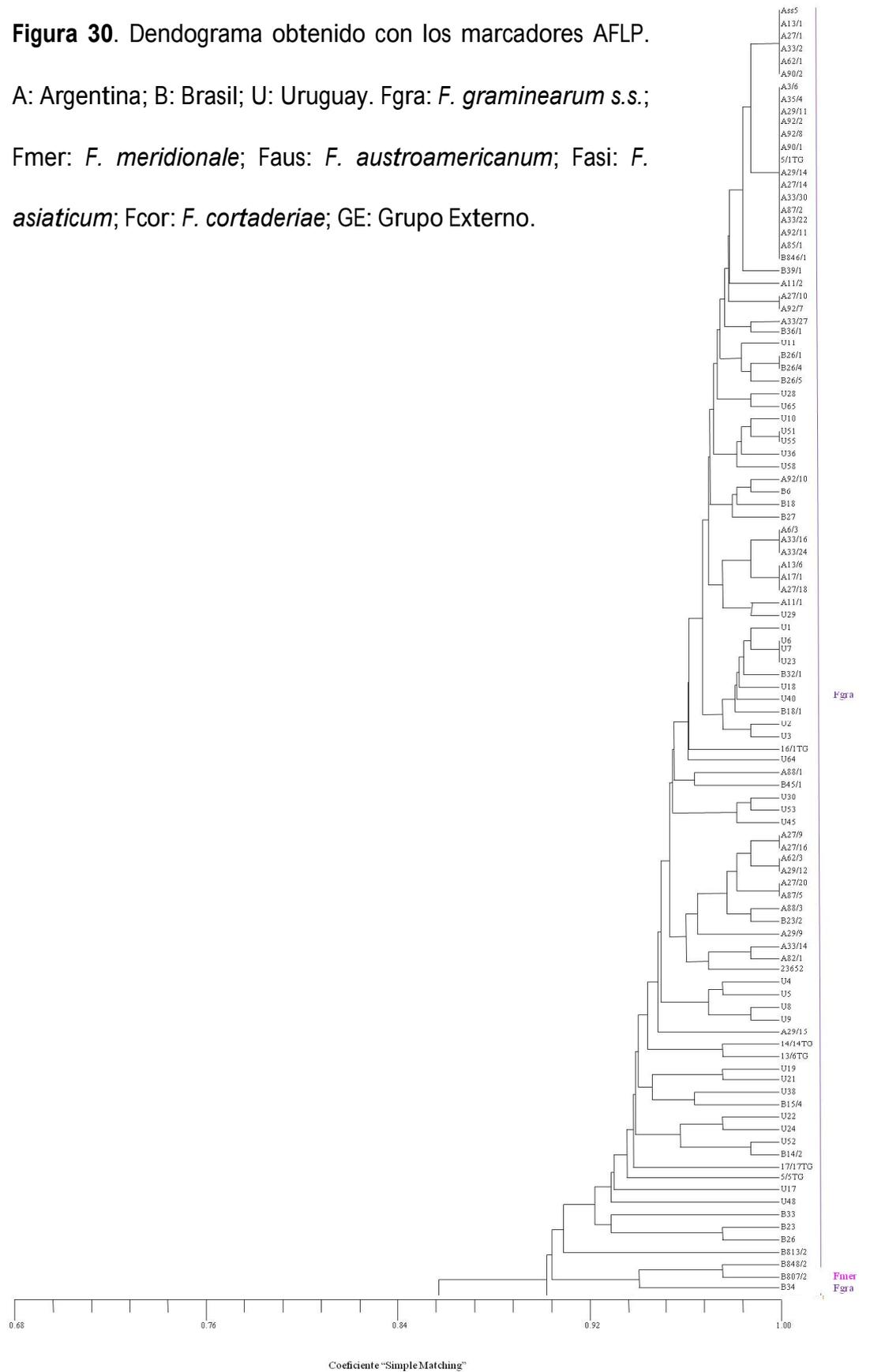
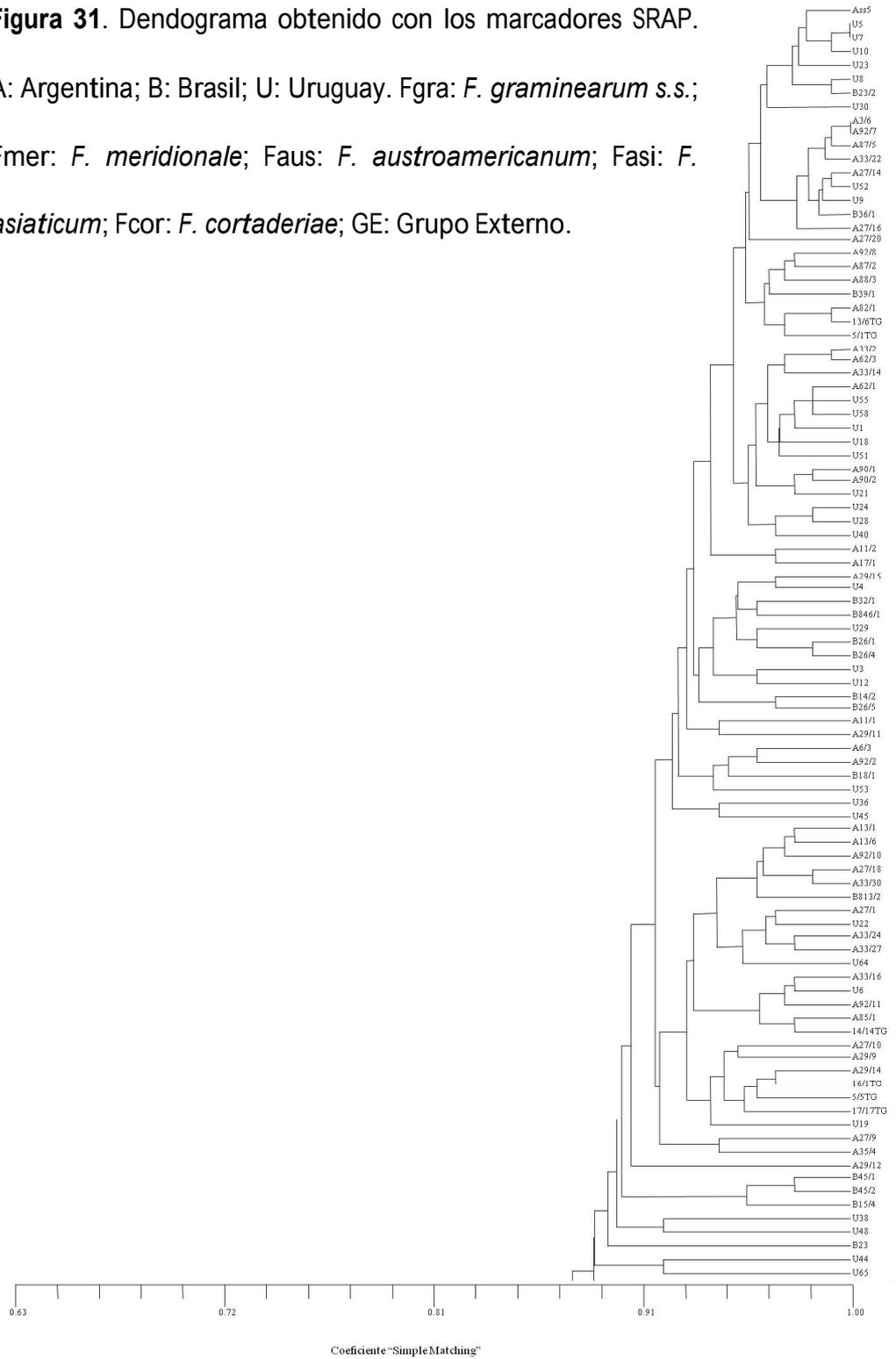


Figura 31. Dendograma obtenido con los marcadores SRAP.

A: Argentina; B: Brasil; U: Uruguay. Fgra: *F. graminearum* s.s.;

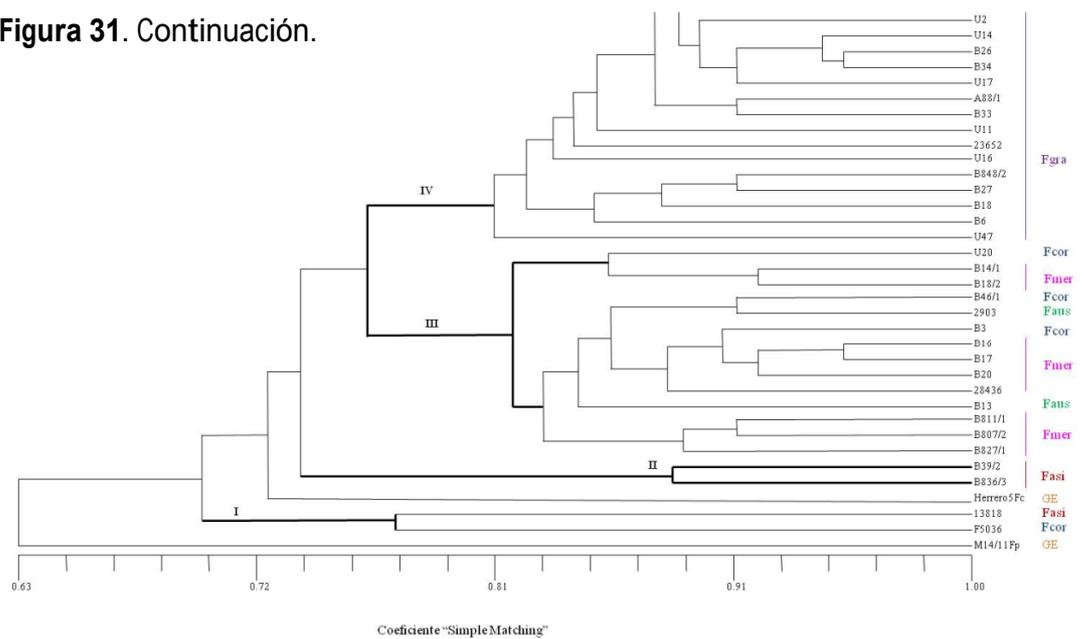
Fmer: *F. meridionale*; Faus: *F. austroamericanum*; Fasi: *F.*

asiaticum; Fcor: *F. cortaderiae*; GE: Grupo Externo.



Figura

Figura 31. Continuación.



4.3.6 Diversidad genotípica

Con ambos marcadores el número de loci polimórficos fue mayor para los aislamientos de Brasil y Uruguay que para los de Argentina (Tablas 17 y 18).

La diversidad genotípica estimada basada en los marcadores AFLP fue menor en Argentina (Nei's $H = 0,88$) y mayor en Uruguay y Brasil (Nei's $H > 0,98$), considerando todos los aislamientos o solo los aislamientos de *F. graminearum* s.s. El porcentaje de haplotipos fue mayor a 90 % en Brasil y Uruguay y de alrededor del 40 % en la Argentina (Tabla 17).

Por el contrario, con los marcadores SRAP la diversidad genotípica fue similar en Argentina, Brasil y Uruguay para ambos grupos de aislamientos (Nei's $H > 0,99$). El porcentaje de haplotipos fue mayor al 97 % para todos los países (Tabla 18).

Los resultados del AMOVA para ambos tipos de marcadores y utilizando todos los aislamientos del complejo o solo los aislamientos de *F. graminearum* s.s. mostraron mayor variabilidad para las poblaciones dentro de los países que entre países. Para AFLP, la variabilidad estimada varió entre 7,9 a 10,3 % para las poblaciones entre países y de 89,6 a 92,1 % para las poblaciones dentro de los países. Para SRAP, la variabilidad estimada varió de 7,4 a 12,6 % para las poblaciones entre países y de 87,3 a 92,5 % para las poblaciones dentro de los países (Tablas 17 y 18).

Tabla 17. Resultados de AMOVA basados en los marcadores AFLP de las poblaciones del complejo *F. graminearum* (A) y *F. graminearum* s.s. (B) de Argentina, Brasil y Uruguay.

A

Población	Población Total	Argentina	Brasil	Uruguay
Tamaño de la muestra	117	43	35	39
N° de loci polimórficos	69	14	52	55
N° de haplotipos	87	18	34	36
Diversidad genética	0.9822	0.8859	0.9983	0.9946
Porcentaje de variación				
Entre poblaciones	10.36			
Dentro de la población	89.64			

B

Población	Población Total	Argentina	Brasil	Uruguay
Tamaño de la muestra	103	43	22	38
N° de loci polimórficos	56	14	31	50
N° de haplotipos	73	18	21	35
Diversidad genética	0.9770	0.8859	0.9957	0.9943
Porcentaje de variación				
Entre poblaciones	7.90			
Dentro de la población	92.10			

Tabla 18. Resultados de AMOVA basados en los marcadores SRAP de las poblaciones del complejo *F. graminearum* (A) y *F. graminearum* s.s. (B) de Argentina, Brasil y Uruguay.

A

Población	Población Total	Argentina	Brasil	Uruguay
Tamaño de la muestra	117	43	35	39
N° de loci polimórficos	94	30	82	72
N° de haplotipos	115	42	35	38
Diversidad genética	0.9997	0.9989	1.000	0.9987
Porcentaje de variación				
Entre poblaciones	12.63			
Dentro de la población	87.37			

B

Población	Población Total	Argentina	Brasil	Uruguay
Tamaño de la muestra	103	43	22	38
N° de loci polimórficos	77	30	58	60
N° de haplotipos	101	42	22	37
Diversidad genética	0.9996	0.9989	1.000	0.9986
Porcentaje de variación				
Entre poblaciones	7.42			
Dentro de la población	92.58			

4.3.7 Secuencias de los fragmentos generados por los marcadores SRAP

Todos los fragmentos de SRAP secuenciados fueron homólogos con proteínas hipotéticas del complejo *F. graminearum* u otras especies de *Fusarium*, confirmando la eficacia de este marcador para amplificar marcos abiertos de lectura (ORFs)(Tabla 19).

Tabla 19. Secuencias de SRAP y resultados del BlastX.

Código de los fragmentos seleccionados	Combinación de cebadores	Tipo de fragmento	Número de accesoión del "GenBank"	Puntaje del BlastX (bits)	FUSARIUM ID
HM	SRAPME1/E M13	Monomórfico	AR154224	49.2914	<i>F. oxysporum</i> PHW808: FOPG_02257.1: proteína hipotética
				49.2914	<i>F. oxysporum melonis</i> : FOMG_05224.1: proteína hipotética
				49.2914	<i>F. verticillioides</i> 7600 (FV3): FVEG_08236.5: proteína hipotética
IM	SRAPME1/E M17	Monomórfico	AR154225	55.4546	<i>F. graminearum</i> PH-1 (FG3): FGSG_02271.3: proteína hipotética
				55.0694	<i>F. oxysporum</i> PHW808: FOPG_13898.1: amina oxidasa primaria
				55.0694	<i>F. oxysporum melonis</i> : FOMG_03336.1: amina oxidasa primaria
I5M	SRAPME1/E M17	Monomórfico	AR154226	58.151	<i>F. graminearum</i> PH-1 (FG3): FGSG_02271.3: proteína hipotética
				58.151	<i>F. oxysporum</i> PHW808: FOPG_13898.1: amina oxidasa primaria
				58.151	<i>F. oxysporum melonis</i> : FOMG_03336.1: amina oxidasa primaria
JP	SRAPME6/ EM13	Polimórfico	AR154227	29.261	<i>F. verticillioides</i> 7600 (FV3): FVEG_10221.5: proteína hipotética
				28.4906	<i>F. oxysporum</i> I15: FOIG_07990.1: proteína hipotética
				27.7202	<i>F. graminearum</i> PH-1 (FG3): FGSG_07469.3: miosina-2B
2F	SRAPME6/E M17	Polimórfico	AR154228	26.5646	<i>F. oxysporum</i> PHW808: FOPG_00483.1: proteína hipotética
				26.5646	<i>F. graminearum</i> PH-1 (FG3): FGSG_03906.3: proteína hipotética
				25.409	<i>F. graminearum</i> PH-1 (FG3): FGSG_09278.3: proteína hipotética

4.4 DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó la composición de especies del complejo *F. graminearum* que infectan granos de cebada en el cono sur de Sudamérica. Se realizaron ensayos moleculares incluyendo agrupamientos basados en marcadores moleculares, reacciones de PCR específicas y secuenciación de una submuestra de los aislamientos que comprendieron todos los aislamientos con genotipo NIV, el único aislamiento con genotipo 3-ADON y 11 aislamientos representativos del genotipo 15-ADON.

La composición de especies del complejo *F. graminearum* en la Argentina está representada por *F. graminearum* s.s., siendo la única especie del complejo causante de la Fusariosis de la espiga en cebada. En Uruguay, este es el primer trabajo en el que se muestra información detallada de las especies del complejo *F. graminearum* que infectan cebada y se observó que todos los aislamientos pertenecieron a *F. graminearum* s.s., excepto un aislamiento que fue identificado como *F. cortaderiae*. Estos resultados contrastan con estudios previos realizados en trigo en Uruguay, donde se observó una alta diversidad de especies del complejo *F. graminearum* mediante un ensayo de genotipado multilocus (MLGT) (Umpierrez-Failache et al. 2013). Respecto a la colección de aislamientos de Brasil, se reportaron dos nuevas especies, *F. cortaderiae* y *F. asiaticum*, las cuales no habían sido diferenciadas de *F. meridionale* en un estudio basado en los fragmentos polimórficos generados con los cebadores Fg16 F/R (Astolfi et al. 2011). Estas dos especies han sido recientemente reportadas en un ensayo molecular utilizando MLGT en el sur de Brasil, donde se observó que *F. cortaderiae* fue mucho más prevalente que *F. asiaticum* en trigo (Del Ponte et al. 2015).

La razón de la alta diversidad del complejo *F. graminearum* encontrada en Brasil comparada con la Argentina, donde la Fusariosis de la espiga es causada principalmente por *F. graminearum* s.s., no es bien conocida. Es hipotetizado que las condiciones ambientales subtropicales pueden favorecer las epifitias cada año y el alto número de hospedantes, incluyendo cultivos de verano, pueden permitir la supervivencia de múltiples especies durante todo el año. En regiones

de altas latitudes de la Argentina y en el sur de Uruguay, donde el clima es mayormente templado, las epifitias de Fusariosis de la espiga en cebada son causadas principalmente por *F. graminearum* s.s. Por ejemplo, todos los aislamientos obtenidos de trigo de la provincia de Buenos Aires fueron identificados como *F. graminearum* s.s. (Ramirez et al. 2007; Alvarez et al. 2011). Sin embargo, en el norte y centro de Uruguay, donde el clima es similar con el Sur de Brasil, otras especies del complejo *F. graminearum* han sido descritas para trigo, incluyendo *F. asiaticum* en regiones donde el arroz es el cultivo dominante (Umpierrez-Failache et al. 2013). De hecho, la alta ocurrencia y dominancia de especies de *F. asiaticum* productoras de NIV fue reportada en un trabajo donde se evaluó la diversidad de especies del complejo *F. graminearum* obtenidas de arroz en Brasil y se observó que el inóculo de *F. asiaticum*, que también infecta trigo, puede sobrevivir e incrementarse debido a su comportamiento saprofito, lo cual hace posible la producción de peritecios en los residuos de cosecha (Gomes et al. 2015).

En el presente estudio, ninguno de los aislamientos obtenidos de granos de cebada amplificó para más de un genotipo de tricotecenos. Todos los aislamientos de *F. graminearum* s.s. pertenecieron únicamente al genotipo 15-ADON, el aislamiento de *F. austroamericanum* perteneció al genotipo 3-ADON y los aislamientos de *F. asiaticum*, *F. meridionale*, *F. cortaderiae* al genotipo NIV. Hasta el momento, los resultados obtenidos indican que las especies del complejo *F. graminearum* en Sudamérica están estructuradas por el genotipo de tricotecenos y que la mayor diversidad de especies fue encontrada en Brasil

comparada con Uruguay y Argentina, donde domina *F. graminearum* s.s. La dominancia de aislamientos de *F. graminearum* s.s. con genotipo 15-ADON también ha sido reportada en previos estudios realizados en trigo en la Argentina y Uruguay. Por ejemplo, Reynoso et al. (2011) encontraron que la mayoría de los aislamientos de *F. graminearum* s.s. tuvieron genotipo 15-ADON, pero algunos amplificaron para ambos genotipos DON/NIV. Dos aislamientos con genotipo NIV también fueron detectados por Pan et al. (2013) en Uruguay, estos aislamientos fueron identificados como *F. graminearum* s.s. por el empleo de marcadores AFLP. Por otro lado, también han sido detectados en pequeña proporción aislamientos de *F. graminearum* s.s. con genotipo 3-ADON en trigo en la Argentina (Alvarez et al. 2009) y Uruguay (Umpierrez-Failache et al. 2013).

De acuerdo con previos estudios en trigo y cebada en la región, los aislamientos de *F. asiaticum*, *F. cortaderiae* y *F. meridionale* mostraron el potencial de producir NIV y *F. austroamericanum* el potencial de producir 3-ADON (Astolfi et al. 2011, 2012; Umpierrez-Failache et al. 2013; Del Ponte et al. 2015). También se observó por primera vez en la región, que todos los aislamientos, independientemente de la especie del complejo *F. graminearum*, mostraron el potencial de producir ZEA, lo cual concuerda con previos resultados de análisis químicos realizados en aislamientos del complejo *F. graminearum* (O'Donnell et al. 2000).

En la mayoría de los estudios realizados con los marcadores AFLP en el complejo *F. graminearum*, los aislamientos a analizar se agruparon con los aislamientos de referencia para las distintas especies (Qu et al. 2008; Alvarez et

al. 2011; Astolfi et al. 2012). Sin embargo, en un estudio realizado por Akinsanmi et al. (2006a) utilizando marcadores AFLP, se observó que los aislamientos representativos de las distintas especies del complejo *F. graminearum* se agruparon en un mismo grupo, lo cual dificulta el empleo de este tipo de marcador para la identificación de especies. Por otro lado, en el presente estudio, todos los aislamientos secuenciados fueron asignados a la misma especie independientemente del gen informativo utilizado (O'Donnell et al. 2000). Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron totalmente congruentes con los agrupamientos obtenidos con el empleo de los marcadores AFLP y SRAP ya que algunas especies del complejo *F. graminearum* no fueron agrupadas junto con su aislamiento de referencia. No obstante, los marcadores SRAP permitieron agrupar juntos a todos los aislamientos de *F. graminearum* s.s.

La carencia de agrupamiento por origen geográfico sugiere un posible intercambio genético entre estas regiones, con los aislamientos siendo parte de una metapoblación en la cual el hongo es capaz de dispersarse a grandes distancias (Schmale et al. 2006). A su vez, el transporte de semillas infectadas puede contribuir a dispersar los diferentes genotipos.

Con respecto al análisis de diversidad genética, los marcadores SRAP presentaron un mayor número de haplotipos (115) que los marcadores AFLP (87). Entre las poblaciones por países, la población de la Argentina tuvo el menor número de haplotipos comparado con Brasil y Uruguay utilizando los marcadores AFLP, pero se observó similar número de haplotipos con los marcadores SRAP. En otros trabajos realizados en la Argentina y Brasil con aislamientos de *F.*

graminearum s.s. empleando marcadores AFLP, se observó un mayor número de haplotipos, 96/103 (Astolfi et al. 2012), 104/113 (Ramirez et al. 2007), 183/183 (Alvarez et al. 2011), respecto del presente estudio. El alto número de haplotipos sugiere que la recombinación sexual dentro de las poblaciones de *Fusarium* es prevalente, lo cual explica el alto nivel de diversidad genética encontrada en este estudio con el empleo de estos marcadores moleculares. La diferencia encontrada con los marcadores AFLP en este y otros estudios puede estar relacionada con el número y/o el tipo de cebadores utilizados en cada estudio o debido al bajo polimorfismo genético de los aislamientos de *F. graminearum* s.s. obtenidos de granos de cebada.

Las diferencias de los dendogramas y los análisis de AMOVA entre los marcadores AFLP y SRAP pueden estar relacionadas con el número de combinaciones de cebadores utilizadas en cada técnica. Además, cada técnica tiene diferentes objetivos; mientras SRAP tiene una alta probabilidad de amplificar ORFs, AFLP es basada en la amplificación de fragmentos de restricción. El número de amplicones obtenidos con los marcadores AFLP es función del número de nucleótidos selectivos de los cebadores utilizados, del contenido GC y del tamaño físico y complejidad del genoma (Agarwal et al. 2008). Además, las diferencias entre las técnicas también puede explicar la moderada correlación entre las matrices observada con el Test de Mantel, aunque ambos métodos mostraron alto nivel de diversidad genética, como fue previamente reportado por otros autores para *F. graminearum* s.s. (Akinsanmi et al. 2006a; Ramirez et al. 2007; Guo et al. 2008; Astolfi et al. 2012).

Comparado con el alto costo y el tiempo que demanda el desarrollo de la técnica de AFLP, la técnica de SRAP combina simplicidad, confiabilidad, relación de rendimiento moderado, secuenciación de fragmentos seleccionados y la posibilidad de amplificar ORFs. Aunque la técnica de SRAP ha sido utilizada para evaluar la variabilidad genética en *F. graminearum* s.s. (Fernando et al. 2006; Guo et al. 2008), el empleo de estos marcadores no ha sido utilizado previamente para secuenciar fragmentos con el objetivo de amplificar ORFs. Al igual que en nuestro trabajo, Dinolfo et al. (2014) utilizaron los marcadores SRAP para estudiar la variabilidad genética de *F. poae* y secuenciaron algunos fragmentos de interés generados por estos marcadores, corroborando la eficacia de esta técnica para amplificar ORFs.

En resumen, nuestros resultados sugieren que el manejo de la Fusariosis de la espiga en cebada, e incluso las medidas regulatorias, deben considerar las variaciones regionales en las especies y la habilidad toxicogénica de las poblaciones, especialmente su potencial de producir NIV, el cual es más tóxico que DON (Minervini et al. 2004). La habilidad del patógeno de dispersarse grandes distancias por el viento (Schmale et al. 2006) y el comercio de semillas puede contribuir a diseminar los genotipos toxicogénicos a través del continente, especialmente considerando las futuras variaciones o cambios que pueden generarse por un clima cálido. Por lo tanto, es un desafío de los investigadores el reducir el impacto de *Fusarium* en los granos de cebada así como en la industria alimenticia y cervecera.

CAPÍTULO V

**Efectos de *Fusarium
graminearum* y *F.
pseudograminearum* sobre
parámetros de calidad de
cebada cervecera**

5.1 INTRODUCCIÓN

Fusarium graminearum s.s. es uno de los patógenos de mayor incidencia en granos de cereales en todo el mundo y su patogenicidad en granos de cebada ha sido evaluada (Buerstmayr et al. 2004; Choo et al. 2004; Sarlin et al. 2005). Por otra parte, *F. pseudograminearum* es el principal agente causal de pudrición de corona en trigo en muchas partes del mundo incluyendo Canadá, Nueva Zelanda, Turquía (Nicol et al. 2004; Monds et al. 2005; Mishra et al. 2006) y es el principal causante de la Fusariosis de la espiga en trigo en Australia (Burgess et al. 1987; Akinsanmi et al. 2004). A pesar de que *F. pseudograminearum* no es un patógeno común en cebada, su patogenicidad en dicho cereal ha sido demostrada (Akinsanmi et al. 2006b). En la Argentina fue aislado por primera vez de granos de cebada en el presente trabajo de tesis (Capítulo III).

En un principio, ambos patógenos fueron designados como *F. graminearum* grupo I y II, los cuales se diferenciaban en la producción de peritecios en Agar clavel o en Agar zanahoria (Leslie & Summerell 2006). Luego, Aoki & O'Donnell (1999) describieron al grupo I como *F. pseudograminearum*, el cual es heterotático y no forma peritecios en estos medios, mientras que el grupo II, denominado *F. graminearum*, es homotático y la mayoría de los aislamientos producen peritecios en ambos medios de cultivo. En trabajos posteriores realizados por Akinsanmi et al. (2004, 2006a, 2007) se determinó que estas especies son genéticamente distintas, sin embargo no difieren significativamente en cuanto a la agresividad (porcentaje de espiguillas infectadas) en trigo y presentan similar tasa de crecimiento y esporulación en APG.

Tanto *Fusarium graminearum* s.s. como *F. pseudograminearum* presentan el potencial de producir DON y ZEA, las cuales tienen un gran impacto en la comercialización, ya que para evitar inconvenientes en la calidad de los granos, las industrias malteras y cerveceras evitan comprar granos de cebada con niveles detectables de estas toxinas. La cebada constituye la principal materia prima para la elaboración de cerveza y constituye más del 70 % del costo total de la producción de malta (FAO 2009), por lo que es importante la obtención de granos inocuos y de calidad para evitar pérdidas económicas en la producción. Uno de los parámetros de calidad de relevancia para la comercialización de cebada es el porcentaje de proteína de los granos, el cual es uno de los rubros determinantes en la norma de calidad y comercialización de cebada, debiendo encontrarse entre un 9 y un 13 % para la aceptación de un lote de granos (Norma de Calidad y Comercialización de Cebada Cervecera - Resolución SENASA 27/2013). Un adecuado contenido de proteínas en los granos es crucial ya que las enzimas encargadas de liberar los sustratos requeridos por las levaduras para el proceso de fermentación son de naturaleza proteica, además de presentar importancia en aspectos físicos de la cerveza, como la estabilidad coloidal, y organolépticos, como el cuerpo y la calidad de la espuma. El contenido de proteínas de los granos, además de presentar una dependencia genética, es decir de la variedad utilizada, está principalmente influenciado por el ambiente, estando relacionado a la disponibilidad de nitrógeno proveniente de la mineralización de la materia orgánica del suelo o por el agregado de fertilizantes (Savio & Aguinaga 2011).

Por otro lado, uno de los parámetros más importantes para los productores es el rendimiento y también se ve afectado por las especies del género *Fusarium*. El rendimiento del cultivo puede ser evaluado a través de dos parámetros, el número de granos por metro cuadrado o el peso de mil granos, siendo este último ampliamente utilizado para evaluar el efecto de especies de *Fusarium* sobre parámetros de calidad en cebada (Chelkowski et al. 2000; Schwarz et al. 2006; Oliveira et al. 2012; Nielsen et al. 2014), ya que cambios en el peso de los granos pueden afectar el rendimiento final del cultivo una vez establecido el número de granos.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el impacto de un aislamiento de *F. graminearum* s.s. en parámetros de calidad de los granos de cebada y compararlo con los efectos producidos por *F. pseudograminearum*, un patógeno incipiente en cebada en la Argentina. Se evaluó la contaminación de los granos de cebada con micotoxinas, determinando si exceden los niveles sugeridos en las normas pertinentes, además del efecto en parámetros como el tenor proteico y el peso de mil granos, evaluando a su vez, si existe relación entre la contaminación de los granos con toxinas y dichos parámetros.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 Aislamientos utilizados

Para este estudio se utilizaron un aislamiento de *F. graminearum* s.s. (A3/4) y un aislamiento de *F. pseudograminearum* (M14/11) previamente caracterizados como potenciales productores de DON/15-ADON y DON/3-ADON,

respectivamente, y de ZEA (Capítulo III). El aislamiento de *F. graminearum* s.s. utilizado fue obtenido de granos de cebada de la variedad Scarlett mientras que el de *F. pseudograminearum* fue obtenido de granos de cebada de la variedad Shakira. Dichos aislamientos fueron obtenidos en la campaña 2010 en dos localidades de la provincia de Buenos Aires, Tapalqué y Tres Arroyos, respectivamente.

5.2.2 Diseño del ensayo a campo

Se emplearon para el estudio dos variedades comerciales de cebada de dos hileras ampliamente utilizadas en nuestro país: Scarlett, la cual ocupa el 70 % del área sembrada y es muy utilizada para la industria maltera por la uniformidad de los granos, y Shakira, la cual es la segunda variedad en superficie y posee un alto potencial de rendimiento (Minagri 2015; Federico Moreyra-EEA INTA Bordenave-Comunicación personal). Los tratamientos utilizados fueron inóculos constituidos por: *F. pseudograminearum* (Fpseu), *F. graminearum* s.s. (Fgra) y una mezcla constituida por partes iguales de *F. pseudograminearum* y *F. graminearum* s.s. (Fpseu/Fgra), este último para determinar si existe efecto aditivo entre estos aislamientos en relación a los parámetros a evaluar. El ensayo se llevó a cabo en la chacra experimental de la Facultad de Agronomía de Azul – UNCPBA (S 36° 49' 53'', W 59° 53' 23''). El suelo es un Argiudol típico y cada año se realizaron operaciones de labranza convencional (arado de disco y rastra hasta una profundidad de 15 cm). Se realizó un diseño en parcelas divididas con tres repeticiones donde en las parcelas principales se ubicaron las variedades de

cebada y en las subparcelas se aleatorizaron los tratamientos (inóculos), además de un testigo inoculado con agua destilada (Figura 32 y 33). Los cultivos fueron desarrollados en ausencia de cualquier estrés nutricional o maleza, pero no se utilizaron tratamientos con fungicidas. Cada parcela tenía un tamaño de 10 m de largo por 1,4 m de ancho y las variedades de cebada se sembraron utilizando una densidad de siembra de 280 granos m^{-2} (Figura 32). El ensayo se llevó a cabo durante 3 años (2011, 2012, 2013). Las fechas de siembra fueron el 19, 10 y 18 de Julio, respectivamente.

De cada año evaluado se registraron los datos de temperatura, humedad relativa y precipitación obtenidos de la estación del Servicio Meteorológico Nacional, ubicada a 100 m del sitio experimental (Tabla 20).

La inoculación se realizó por el método de aspersion hasta chorreo, cuando el 50 % de las espigas de cebada estaban emergidas, utilizando una concentración de 1×10^4 conidios mL^{-1} (Akinsanmi et al. 2004, 2007).

Una vez producida la maduración de los granos, se cosecharon las espigas de cada tratamiento y repetición, se trillaron y se mezclaron de manera homogénea (por separado). Finalmente se conservaron en la heladera (4-5 °C) hasta su utilización.

Figura 32. Diagrama del ensayo en parcelas divididas. I: Scarlett; II: Shakira. A: Fpseu; B: Fgra; A*B: Fpseu/Fgra.

1,4 m			} 10 m
A I	B I	A*B II	
A*B	A	Testigo	
Testigo	A*B	B	
B	Testigo	A	
A*B II	A II	Testigo I	
Testigo	A*B	A*B	
B	B	B	
A	Testigo	A	

Figura 33. Ensayo a campo con diseño en parcelas divididas.



Tabla 20. Datos de Temperatura, Humedad relativa (HR) promedio y Precipitación acumulada desde la fecha de inoculación a la fecha de cosecha.

Año	Temperatura (°C) (Mínimo-Máximo)			HR % (Mínimo-Máximo)	Precipitación (mm)
	Promedio	Mínima promedio	Máxima promedio		
2011	19 (12,7-24,1)	11,1 (3,3-19)	26,5 (18,6-31)	65,8 (51,8-86,8)	104,6
2012	18,8 (11,6-26)	11,4 (4-21)	25,8 (18,5-33,1)	68,6 (55-90,5)	128,2
2013	17,6 (12,8-23,7)	10,3 (4,4-17,5)	24,9 (17,6-32,2)	68 (38-97,3)	89,6

5.2.3 Producción de toxinas *in vivo*

Se realizó la cuantificación de DON y ZEA de cada tratamiento del ensayo a campo utilizando el test de ELISA, siguiendo las especificaciones del fabricante. Diversos autores han demostrado que la precisión de los resultados obtenidos por este método es comparable con los obtenidos por cromatografía gaseosa (“Gas Chromatography”-GC) y cromatografía líquida de alta resolución (“High Performance/Pressure Liquid Chromatography”-HPLC) y además posee la ventaja de ser un método rápido que requiere un simple procesamiento de las muestras (Sinha et al. 1996; Zheng et al. 2004). El límite de detección del método de ELISA es de 0,2 y 0,02 $\mu\text{g g}^{-1}$, para DON y ZEA, respectivamente. Por otro lado, el rango de cuantificación para DON es de 0,25 a 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ y para ZEA de 0,025 a 1 $\mu\text{g g}^{-1}$.

5.2.4 Producción de toxinas *in vitro* (Potencial toxicológico)

Se realizó la determinación del potencial toxicológico de los tres inóculos (Fgra, Fpseu, Fpseu/Fgra) en ambas variedades de cebada a evaluar, para determinar la potencial producción de toxinas en el sustrato del que fueron

obtenidos los aislamientos, realizando un duplicado de cada uno. Para ello, se dispusieron en recipientes adecuados 25 g de semillas, a los cuales se les agregó 10 mL de agua destilada y se esterilizó en autoclave por 30 min a 120 °C y 1,5 atm. Luego se inoculó cada frasco mediante el agregado de un fragmento de una colonia desarrollada en SNA de siete días de crecimiento y se incubó en una cámara de crecimiento en oscuridad durante 28 días a 25 °C. Transcurrido dicho periodo de tiempo, las muestras fueron secadas a 50 °C por 24 hs y almacenadas a -20 °C hasta su utilización (Figura 34) (Barros et al. 2012). La cuantificación de DON y ZEA se realizó mediante el test de ELISA, siguiendo las especificaciones del fabricante.

Figura 34. Frascos inoculados incubados en cámara de crecimiento (A) y frascos conteniendo granos de la variedad Scarlett inoculados con: Fpseu, Fgra y Fpseu/Fgra, respectivamente (B).



5.2.5 Evaluación del porcentaje de proteínas y peso de mil granos

Se evaluó el efecto de Fgra, Fpseu y Fpseu/Fgra sobre el porcentaje de proteínas y el peso de mil granos. El porcentaje de proteínas de los granos se determinó utilizando el equipo NIT con monocromador de doble haz (AgriCheck™) que determina el contenido de proteína del grano entero. Por otra parte, el peso de mil granos se realizó registrando el peso de 100 granos, realizando ocho repeticiones, aceptando como máximo un coeficiente de variación de cuatro, para que la dispersión de los datos sea aceptada.

5.2.6 Análisis estadísticos

Se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) para cada una de las variables evaluadas y sus interacciones, considerando los tres años en conjunto, utilizando el programa INFOSTAT versión 2012. A su vez, se realizó un análisis de correlación, utilizando el coeficiente de correlación de Pearson, entre las variables evaluadas en el ensayo a campo: DON-peso de mil granos y DON-porcentaje de proteínas.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Producción de toxinas *in vivo* e *in vitro*

Tanto para la producción de DON como de ZEA *in vivo*, la cuantificación de toxinas en el testigo fue menor al límite de detección y, debido a que el objetivo del presente trabajo consistía en determinar si existen diferencias en la producción de toxinas entre estos patógenos de cebada, no se tuvieron en

cuenta los testigos en los análisis estadísticos, realizando los mismos con los tratamientos inoculados (Fgra, Fpseu, Fpseu/Fgra).

Los valores de concentración de DON en las muestras del ensayo a campo variaron entre 0,20 y 0,42 $\mu\text{g g}^{-1}$ en el año 2011, entre no detectable y 0,55 $\mu\text{g g}^{-1}$ en el 2012 y entre no detectable y 0,80 $\mu\text{g g}^{-1}$ en el 2013.

En el análisis de la varianza, el contenido de DON mostró diferencias estadísticamente significativas para el año en el que fue realizado el ensayo y la variedad del cultivo (Tabla 21). La variedad Shakira en el año 2013 presentó mayor contenido de DON que la variedad Scarlett empleada en los ensayos de los años 2012 y 2013 (Tabla 22). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los inóculos evaluados (Tabla 21).

Tabla 21. Análisis de la varianza para la producción de DON.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Año	3,3.10 ⁻³	2	1,6.10 ⁻³	0,15	0,8685
Variedad	0,37	1	0,37	16,96	0,0542
Inóculo	0,02	2	0,01	0,80	0,4610
Bloques	0,06	2	0,03	2,25	0,1276
Año*Variedad	0,14	2	0,07	4,70	0,0190
Año*Inóculo	0,16	4	0,04	2,75	0,0518
Año*Bloques	0,04	4	0,01	0,77	0,5524
Variedad*Inóculo	0,05	2	0,02	1,61	0,2205
Variedad*Bloques	0,04	2	0,02	1,52	0,2383
Inóculo*Bloques	0,05	4	0,01	0,85	0,5066
Año*Variedad*Inóculo	0,08	4	0,02	1,38	0,2719

Tabla 22. Test de Tukey ($\alpha = 0,05$) para la interacción Año-Variedad.

Año	Variedad	Medias	
2013	Scarlett	0,10	A
2012	Scarlett	0,19	A B
2011	Scarlett	0,24	A B C
2011	Shakira	0,29	B C
2012	Shakira	0,34	B C
2013	Shakira	0,40	C

En cuanto a la producción de DON *in vitro*, los valores variaron entre 0,3 y 1,3 $\mu\text{g g}^{-1}$, además de tres valores que estuvieron por encima del punto más alto de la curva de calibración (5 $\mu\text{g g}^{-1}$). Debido a estos puntos que salieron del rango de cuantificación y, a su vez, superaron el límite sugerido por las normas correspondientes, se realizó un análisis de la varianza en el cual se asignó a estos valores el valor de concentración más alto de la curva de calibración. Los resultados obtenidos indican que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los inóculos evaluados ni entre las variedades.

En los tres años, la cuantificación de ZEA *in vivo* en todas las muestras estuvo por debajo del límite detectable (0,02 $\mu\text{g g}^{-1}$). Sin embargo, para los tres inóculos se observaron niveles detectables de ZEA *in vitro*, encontrándose en todos los casos niveles superiores a 0,5 $\mu\text{g g}^{-1}$. Debido a que al menos una de las repeticiones de los tres tratamientos mostró valores superiores al punto de concentración máximo de la curva de calibración (1 $\mu\text{g g}^{-1}$), es decir, superaban lo sugerido en la norma correspondiente, no se realizaron análisis estadísticos para este ensayo.

5.3.2 Porcentaje de proteínas y peso de mil granos

En los tres años evaluados, el contenido de proteína tanto de las muestras inoculadas como del testigo estuvo dentro de los límites establecidos en la norma de comercialización de cebada cervecera (9-13 %), por lo que no se realizó un análisis estadístico de estos resultados.

En cuanto al peso de mil granos, en los tres años y, tanto en los tratamientos como en el testigo, los valores estuvieron por encima de 40 g. El análisis de la varianza muestra que no se observaron diferencias significativas para los tratamientos evaluados (Tabla 23). Por otro lado, se observaron diferencias estadísticamente significativas para año y variedad (Tabla 23), siendo en el año 2013 donde se observó un mayor peso de mil de los granos y la variedad Shakira mostró mayor peso de mil que Scarlett (Tabla 24), aunque estas diferencias estarían relacionadas a las características propias de cada variedad o a las condiciones ambientales y no a la infección con dichos patógenos.

Tabla 23. Análisis de la varianza para el peso de mil granos.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Año	1203,31	2	601,65	93,27	0,0004
Variedad	753,63	1	753,63	142,54	0,0069
Inóculo	5,59	3	1,86	0,76	0,5220
Bloques	10,81	2	5,41	2,22	0,1245
Año*Variedad	5,94	2	2,97	1,22	0,3087
Año*Inóculo	11,81	6	1,97	0,81	0,5714
Año*Bloques	25,80	4	6,45	2,64	0,0504
Variedad*Inóculo	2,16	3	0,72	0,30	0,8286
Variedad*Bloques	10,57	2	5,29	2,17	0,1300
Inóculo*Bloques	12,49	6	2,08	0,85	0,5382
Año*Variedad*Inóculo	2,56	6	0,43	0,17	0,9819

Tabla 24. Test de Tukey ($\alpha = 0,05$) para las variables Año (A) y Variedad (B).

A

Año	Medias	
2011	43,88	A
2012	44,68	A
2013	52,93	B

B

Variedad	Medias	
Scarlett	43,93	A
Shakira	50,40	B

El análisis de correlación entre el contenido de DON de los granos y los parámetros porcentaje de proteína y peso de mil granos, arrojó un coeficiente de correlación bajo ($r = 0,08$ para DON-Porcentaje de proteínas y $r = 0,27$ para DON-Peso de mil granos).

5.4 DISCUSIÓN

En este estudio se realizó una evaluación del efecto de dos especies causantes de la Fusariosis de la espiga sobre parámetros de calidad de dos variedades de cebada cervecera. Los resultados obtenidos indican que *Fusarium pseudograminearum* y *F. graminearum* presentan un comportamiento similar en los parámetros evaluados, ya que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre estas especies para ninguna de las variables evaluadas estadísticamente (contenido de DON *in vivo* e *in vitro* y peso de mil granos). Por otro lado, ambas especies produjeron altos niveles de ZEA *in vitro* (mayor que $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$), superando en todos los casos el máximo permitido según reglamentaciones vigentes (Regulación EC 1881/2006). A su vez, se observaron altos niveles de DON *in vitro* (mayor que $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$), pero solo en algunas muestras se superó el límite establecido por la Comisión de las Comunidades Europeas de $1,25 \mu\text{g g}^{-1}$ (Regulación EC 1126/2007) y el límite de $2 \mu\text{g g}^{-1}$ sugerido en la Argentina en el Anteproyecto de la Comisión del Codex Alimentarius (2013). Aunque el análisis fue realizado en base a la producción de toxinas *in vitro* en el sustrato del que fueron obtenidos los aislamientos, es importante considerar, de acuerdo a los resultados obtenidos, el potencial que

presentan los aislamientos de contaminar los granos de cebada con micotoxinas. Respecto a los demás parámetros de calidad evaluados, los resultados obtenidos indican que dichos patógenos no afectaron el contenido de proteína y el peso de mil granos, ya que el contenido de proteína permaneció en todos los casos entre los límites establecidos en la Norma de Calidad y Comercialización de Cebada Cervecera y el peso de mil granos fue, en todos los casos, mayor a 40 g. Estudios realizados por Akinsanmi et al. (2004, 2007) mostraron que *F. graminearum* y *F. pseudograminearum* presentaban similar agresividad (porcentaje de espiguillas afectadas) en trigo, aunque la agresividad de los aislamientos dentro cada especie difería significativamente, además de presentar similar tasa de crecimiento y esporulación, lo cual se relaciona con el similar comportamiento de las especies obtenidos en el presente trabajo, aunque es este estudio solo se utilizó un aislamiento de cada especie.

Existe un consenso generalizado que indica que la Fusariosis de la espiga se produce de forma severa en regiones donde las condiciones ambientales cálidas y húmedas coinciden con el período de floración del cultivo. Sin embargo, no es claro porque el hongo sintetiza las micotoxinas, debido a que las mismas no son esenciales para la viabilidad de las células (Terzi et al. 2014). Datos meteorológicos indican que en el año 2012 se dieron las condiciones ambientales favorables para producir una epifitias de Fusariosis de la espiga en varias localidades de provincia de Buenos Aires, por lo que se podría haber esperado una mayor contaminación con toxinas en dicho año, como fue observado en estudios realizados en trigo donde se observó una correlación entre el nivel de

infección con *Fusarium* y el contenido de DON de los granos (Martinez et al. 2014; Palazzini et al. 2015). No obstante, no se observaron diferencias significativas para la variable “Año” en cuanto a la producción de toxinas y, a su vez, la información meteorológica de donde se realizó el ensayo indica que las condiciones climáticas en los tres años evaluados fueron similares. Sin embargo, no es claro cómo se relaciona la concentración de toxinas y la Fusariosis de la espiga en cebada. Algunos autores sugieren que existe una correlación positiva entre la severidad de la Fusariosis de la espiga y la contaminación con DON (Urrea et al. 2002; Choo et al. 2004), mientras que Salas et al. (1999) observaron una positiva pero débil correlación entre la severidad de la enfermedad y la concentración de DON. Por otro lado, Tekauz et al. (2000) en un ensayo realizado en cebada en Manitoba (Canadá), determinaron que no hubo correlación entre el índice de Fusariosis de la espiga y la concentración de DON. Sin embargo, dado que la producción de micotoxinas resulta de la adaptación del crecimiento del hongo a condiciones de estrés (Champeil et al. 2004), las condiciones ambientales predisponentes en un período pueden favorecer el desarrollo del hongo pero no la producción de toxinas. A su vez, Magan et al. (2002) sugieren que los factores de estrés ambiental, principalmente temperatura y disponibilidad de agua, pueden estimular la producción de toxinas.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la acumulación de DON *in vivo* tendió a ser mayor en la variedad Shakira respecto a Scarlett (Tabla 22). Estos resultados pueden sugerir que la variedad Scarlett posea compuestos que impiden la biosíntesis de la toxina o algún mecanismo de detoxificación, en el

cual la toxina es transformada químicamente mediante la unión a compuestos polares como glucosa, aminoácidos o sulfatos, tornándola menos tóxica para la planta (Boutigny et al. 2008; Berthiller et al. 2013). Esta hipótesis también ha sido planteada en trabajos realizados en trigo y maíz, donde se observó una reducción de la contaminación con DON en cultivos infectados natural o artificialmente (Miller et al. 1983; Scott et al. 1984; Favre et al. 2004). Por otro lado, la presencia de derivados de DON también ha sido observada en cebada, malta y cerveza (Lancova et al. 2008; Zachariasova et al. 2012).

En el presente estudio no se encontraron niveles detectables de ZEA en los ensayos a campo en los tres años de estudio, sin embargo, se observó que en el ensayo *in vitro* todos los tratamientos produjeron niveles de ZEA por encima del límite permitido. La diferencia con respecto a la producción de DON a campo puede estar asociada a que en el proceso de invasión del hongo la producción de DON ocurre antes que la producción de ZEA, la cual puede ser inhibida por condiciones ambientales desfavorables, principalmente estrés hídrico, que impidan las sucesivas etapas del crecimiento fúngico (Blaney & Dodman 2002). En otro estudio, los mismos autores observaron una tendencia de los aislamientos de *F. pseudograminearum* de producir mayor cantidad de ZEA y menor cantidad de DON que los aislamientos de *F. graminearum* (Blaney & Dodman 1998), mientras que en el presente trabajo no se observaron diferencias significativas entre los aislamientos (inóculos) en la producción de DON y ZEA *in vivo* e *in vitro*. Sin embargo, la diferencia con nuestros resultados puede ser ocasionada debido a que la producción de toxinas *in vitro* en el ensayo realizado

por dichos autores fue evaluada mediante el crecimiento del hongo en maíz, un sustrato en el que luego se evaluó que *F. pseudograminearum* podía producir mayores concentraciones de toxinas que en un sustrato conformado por trigo-cebada (Blaney & Dodman 2002). En el presente trabajo la producción de toxinas *in vitro* se evaluó mediante el crecimiento fúngico en cebada, ya que se pretendía evaluar la producción de toxinas en el sustrato del que fueron obtenidos los aislamientos de *F. graminearum* s.s. y *F. pseudograminearum*. Los diferentes sustratos utilizados para el desarrollo del hongo pueden explicar el diferente comportamiento en cuanto a la producción de toxinas. La contaminación con micotoxinas de los granos es de gran interés ya sea por los posibles efectos en la salud de los consumidores, como por el efecto que presenta sobre la calidad de los granos, afectando las etapas del procesamiento de la industria maltera y cervecera (Schwarz 2003).

El contenido de proteína en todas las muestras de cebada estuvo dentro de los límites establecidos en la norma de calidad y comercialización y mostró una baja correlación con el contenido de DON. Al igual que en el presente trabajo, Schwarz et al. (2006), en un estudio donde evaluaron la relación entre la infección con *Fusarium*, el contenido de DON y la calidad de granos y de la cebada malteada en diversas muestras de cebada comerciales, encontraron una débil asociación entre el contenido de DON de los granos de cebada y el contenido proteico. Sin embargo, Sarlin et al. (2005) demostraron un leve incremento del contenido proteico y el nitrógeno total asociado a la infección con *Fusarium*, aunque no mencionan si dichos valores exceden los niveles

considerados aceptables por la industria, requeridos para obtener un adecuado procesamiento.

En cuanto al peso de mil granos, en los tres años de ensayo, estuvo por encima de 40 g, siendo el tercer año donde se observó un mayor peso de mil granos (Tabla 23), y no se observaron diferencias significativas entre los inóculos evaluados. Además, el coeficiente de correlación entre DON-Peso de mil fue bajo. Similares resultados fueron obtenidos por Schwarz et al. (1993) en un trabajo donde se evaluó la ocurrencia natural de DON en granos de cebada. Debido a que los factores que determinan el peso de mil granos, entre ellos la acumulación de materia seca y la duración del período de llenado, dependen principalmente de las condiciones ambientales predisponentes durante el llenado del grano, es posible que el contenido de DON de las muestras no presente una fuerte influencia sobre el peso de mil granos. Otros autores observaron alto rendimiento y alta acumulación de micotoxinas en granos de cultivares susceptibles, concluyendo que el sistema que regula la acumulación de DON puede ser independiente de la reacción a la Fusariosis de la espiga (Arseniuk et al. 1999).

Actualmente, existe poca información sobre la producción de toxinas por *F. pseudograminearum* y los efectos de esta especie sobre la calidad de los granos de cebada, siendo el presente trabajo el primero desarrollado en Sudamérica. Los resultados obtenidos en este estudio indican que tanto *F. graminearum* como *F. pseudograminearum* son especies que deben ser consideradas para futuros programas de mejoramiento del cultivo y, además, es

necesario considerar la importancia que presenta la contaminación de los granos de cebada con estos microorganismos para asegurar la calidad/inocuidad del cultivo de cebada y su aptitud para la industria alimentaria.

Conclusiones y Consideraciones Finales

El presente estudio fue realizado para aportar conocimientos básicos y de aplicación sobre el complejo de especies de *Fusarium graminearum* en el cultivo de cebada, dentro de las cuales *F. graminearum* s.s. es el principal agente causal de la Fusariosis de la espiga, con interés agroalimenticio por generar mermas en los rendimientos y producir toxinas nocivas para la salud humana y animal.

Con el presente trabajo se determinó, en base a una colección de 110 aislamientos, que en la Argentina *F. graminearum* s.s. es la principal especie del complejo causante de la Fusariosis de la espiga en cebada. La evaluación del perfil de tricotecenos de los aislamientos de *F. graminearum* s.s. mediante análisis genéticos y químicos, manifestó una discrepancia entre ambos resultados, mientras que todos los aislamientos presentaron el genotipo DON/15-ADON, químicamente se detectaron los tres quimiotipos de tricotecenos: DON/15-ADON, DON/3-ADON y NIV. Los análisis químicos mostraron que DON fue producido por el 95 % de los aislamientos y, en general, fue producido en mayor cantidad que los demás tricotecenos evaluados. A su vez, todos los aislamientos tuvieron el potencial de producir ZEA. Debido a que los métodos moleculares permiten predecir el genotipo de tricotecenos que el hongo es capaz de sintetizar y que la producción real de una toxina puede estar influenciada por las condiciones de crecimiento, es importante realizar ambos ensayos para evaluar la contaminación de los granos con estas toxinas. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales sobre la influencia de los factores ambientales, el tipo de sustrato y las condiciones de cultivo en la producción de tricotecenos por parte de *F. graminearum* s.s. A su vez, surge la necesidad de

desarrollar nuevos cebadores que complementen los análisis para la identificación de los acetil derivados de DON.

Se observó la presencia de dos nuevas especies que afectan los granos de cebada en la Argentina, *F. cerealis* y *F. pseudograminearum*, las cuales tienen el potencial de producir NIV y DON/3-ADON, respectivamente. Son necesarios estudios adicionales que profundicen el conocimiento de estos patógenos en diversos cereales y contemplen un seguimiento debido a la importancia que presentan como productores de micotoxinas en cebada en la Argentina.

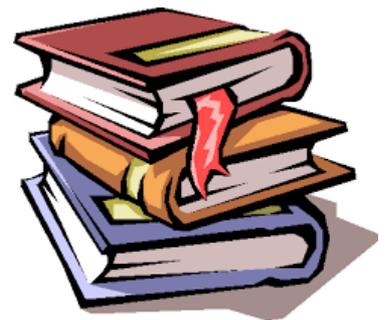
Se determinó mediante el empleo de dos tipos de marcadores moleculares que existe una alta diversidad genotípica ($H > 0,80$) en las poblaciones del complejo *F. graminearum* y de *F. graminearum* s.s. de cebada en Argentina, Brasil y Uruguay, sugiriendo que la recombinación sexual dentro del complejo *F. graminearum* es prevalente. A su vez, se determinó que, al igual que en trigo, existe diversidad de especies del complejo *F. graminearum* que afectan los granos de cebada en Sudamérica, detectándose cinco especies del complejo, y siendo mayor en la población de Brasil que en la de Argentina y Uruguay. Además, dichas especies presentan un variado potencial de producción de toxinas, lo cual debe ser considerado en programas de mejoramiento de los cultivos. Asimismo, se evidenció la eficacia de los marcadores SRAP de amplificar ORFs, lo cual es una herramienta para evaluar la expresión de diferentes proteínas, por parte de las distintas especies del complejo *F. graminearum*, mediante la amplificación de fragmentos de interés. Considerando la diversidad

de especies que afectan los granos de cebada, junto al potencial de las mismas de producir diversos tricotecenos, es necesario el desarrollo de programas que contemplen la implementación de medidas regulatorias y aseguren un manejo adecuado de la enfermedad para reducir el impacto que presentan estos patógenos en la industria alimenticia y cervecera.

Finalmente, se observó que *F. graminearum* y *F. pseudograminearum* presentan un comportamiento similar en cuanto a la contaminación de los granos de cebada con DON y ZEA (*in vivo* e *in vitro*). A su vez, en los resultados del presente estudio se observaron niveles de toxinas (*in vitro*) que superaron los límites sugeridos por las reglamentaciones vigentes, lo cual indica la importancia de la potencial contaminación de las muestras naturales de granos de cebada con toxinas. Por tal motivo, se sugiere establecer medidas de control para asegurar la inocuidad de los granos de cebada, dados los efectos adversos que implican estas toxinas para la salud humana y animal. A su vez, se observaron diferencias en las variedades de cebada empleadas en cuanto a la acumulación de toxinas, relacionadas posiblemente a una menor susceptibilidad o una capacidad de detoxificación por parte de algunas variedades, aunque son necesarios estudios adicionales para explicar el comportamiento de dichas toxinas en las diferentes variedades de cebada. Sin embargo, no se observó un efecto apreciable de estos patógenos sobre otros parámetros de calidad evaluados como el contenido de proteínas y el peso de mil granos.

La hipótesis formulada para llevar a cabo el presente estudio fue “Los aislamientos de *Fusarium graminearum* son heterogéneos a nivel genómico y poseen un variado potencial de producción de toxinas que alteran los niveles de calidad de los granos de cebada”. De acuerdo a los resultados obtenidos con el desarrollo de los objetivos específicos propuestos se aceptó la hipótesis planteada, demostrando la alta diversidad genética encontrada en el complejo de especies *F. graminearum* así como en los aislamientos de *F. graminearum* s.s., principal patógeno de cebada en Sudamérica. Por otro lado, se demostró el diverso potencial de producción de toxinas producidas por estas especies, observando la presencia de los tres genotipos de tricotecenos, además de ZEA. Los resultados obtenidos indican que las especies del complejo *F. graminearum* que afectan los granos de cebada en Sudamérica están estructuradas por el genotipo de tricotecenos, ya que cada una de las especies mostró el potencial de producir solo uno de los tres genotipos posibles.

Referencias Bibliográficas



- Agarwal M., Shrivastava N., Padh H., 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports* 27, 617-631.
- Agrios G.N., 1999. Fitopatología. Limusa S.A. México. ISBN: 968-18-5184-6.
- Akinsanmi O.A., Mitter V., Simpfendorfer S., Backhouse D., Chakraborty S., 2004. Identity and pathogenicity of *Fusarium* spp. isolated from wheat fields in Queensland and northern New South Wales. *Australian Journal of Agricultural Research* 55, 97-107.
- Akinsanmi O.A., Backhouse D., Simpfendorfer S., Chakraborty S., 2006a. Genetic diversity of Australian *Fusarium graminearum* and *F. pseudograminearum*. *Plant Pathology* 55, 494-504.
- Akinsanmi O.A., Backhouse D., Simpfendorfer S., Chakraborty S. 2006b. Pathogenic Variation of *Fusarium* Isolates Associated with Head Blight of Wheat in Australia. *Journal of Phytopathology* 154, 513–521.
- Akinsanmi O.A., Chakraborty S., Backhouse D., Simpfendorfer S., 2007. Passage through alternative hosts changes the fitness of *Fusarium graminearum* and *Fusarium pseudograminearum*. *Environmental Microbiology* 9, 512-520.
- Alexander N.J., McCormick S.P., Waalwijk C., van der Lee T., Proctor R.H., 2011. The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium*. *Fungal Genetics and Biology* 48, 485–495.

- Alvarez C.A., Azcarate M.P., Fernandez Pinto V., 2009. Toxigenic potential of *Fusarium graminearum sensu stricto* isolates from wheat in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 135, 131–135.
- Alvarez C.L., Somma S., Proctor R.H., Stea G., Mule G., Logriego A.F., Fernandez Pinto V., Logrieco A., 2011. Genetic diversity in *Fusarium graminearum* from a major wheat producing region of Argentina. *Toxins* 3, 1294-1309.
- Anuario estadístico-Bolsa de Comercio de Rosario, 2014. <https://www.bcr.com.ar/Publicaciones/Anuario%20Estad%C3%ADstico/Anuario2014.pdf>.
- Aoki T., O'Donnell K., 1999. Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp. nov., formerly recognized as the Group 1 population of *F. graminearum*. *Mycologia* 91, 597-609.
- Aoki T., Ward T.J., Kistler H.C., O'Donnell K., 2012. Systematics, phylogeny and trichothecene mycotoxin potential of *Fusarium* head blight cereal pathogens. *Mycotoxins* 62, 91-102.
- Arseniuk E., Foremska E., Goral T., Chelkowski J., 1999. Fusarium head blight and accumulation of deoxynivalenol (DON) and some of its derivatives in kernels of wheat, triticale and rye. *Journal of Phytopathology* 147, 577-590.
- Astolfi P., dos Santos J., Schneider L., Gomes L.B., Silva C.N., Tessmann D.J., Del Ponte E.M., 2011. Molecular survey of trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* species complex from barley in Southern Brazil. *International Journal of Food Microbiology* 148, 197–201.

- Astolfi P., Reynoso M.M., Ramirez M.L., Chulze S.N., Alves T.C.A., Tessmann D.J., Del Ponte E.M., 2012. Genetic population structure and trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat in southern Brazil. *Plant Pathology* 61, 289-295.
- Bakan B., Giraud-Delville C., Pinson L., Richard-Molard D., Fournier E., Brygoo Y., 2002. Identification by PCR of *Fusarium culmorum* strains producing large and small amounts of deoxynivalenol. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 5472-5479.
- 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., Alaniz Zanon M.S., Abod A., Oviedo M.S., Ramírez M.L., Reynoso M.M., Torres A., Chulze S., 2012. Natural deoxynivalenol occurrence and genotype and chemotype determination of a field population of the *Fusarium graminearum* complex associated with soybean in Argentina. *Food Additives and Contaminants* 29, 293–303.
- Barros G.G., Alaniz Zanon M.S., Chiotta M.L., Reynoso M.M., Scandiani M.M., Chulze S.N., 2014. Pathogenicity of phylogenetic species in the *Fusarium graminearum* complex on soybean seedlings in Argentina. *European Journal of Plant Pathology* 138, 215-222.
- Bassam B.J., Caetano-Anolles G., Gresshoff P.M., 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 196, 80-83.

- Berthiller F., Crews C., Dall'Asta C., De Saeger S., Haesaert G., Karlovsky P., Oswald I.P., Seefelder W., Speijers G., Stroka J., 2013. Masked mycotoxins: a review. *Molecular Nutrition & Food Research* 57, 165-186.
- Blaney B.J., Bloomfield R.C., Moore C.J., 1984. Zearalenone intoxication of pigs. *Australian Veterinary Journal* 61, 24-27.
- Blaney B.J., Dodman R.L., 1998. Production of the mycotoxins zearalenone, 4-deoxynivalenol and nivalenol by isolates of *Fusarium graminearum* Groups 1 and 2 from cereals in Queensland. *Australian Journal of Agricultural Research* 39, 21-29.
- Blaney B.J., Dodman R.L., 2002. Production of zearalenone, deoxynivalenol, nivalenol, and acetylated derivatives by Australian isolates of *Fusarium graminearum* and *F. pseudograminearum* in relation to source and culturing conditions. *Australian Journal of Agricultural Research* 53, 1317-1326.
- Boutigny A.L., Richard-Forget F., Barreau C., 2008. Natural mechanisms for cereal resistance to the accumulation of Fusarium trichothecenes. *European Journal of Plant Pathology* 121, 411-423.
- Boutigny A.-L., Ward T.J., Ballois N., Iancu G., Ios R., 2014. Diversity of the *Fusarium graminearum* species complex on French cereals. *European Journal of Plant Pathology* 138, 133–148.
- Brown D.W., McCormick S.P., Alexander N.J., Proctor R.H., Desjardins A.E., 2002. Inactivation of a cytochrome P-450 is a determinant of trichothecene diversity in *Fusarium* species. *Fungal Genetics and Biology* 36, 224–233.

- Brown D.W., Dyer J.M., McCormick S.P., Kendra D.F., Plattner R.D., 2004. Functional demarcation of the *Fusarium* core trichothecene gene cluster. *Fungal Genetics and Biology* 41, 454–462.
- Buerstmayr H., Legzdina L., Steiner B., Lemmens M., 2004. Variation for resistance to *Fusarium* head blight in spring barley. *Euphytica* 137, 279-290.
- Burgess L.W., Nelson P.E., Toussoun T.A., 1982. Characterization, geographic distribution, and ecology of *Fusarium crookwellense* sp. nov. *Transactions of the British Mycological Society* 79, 497–505.
- Burgess L.W., Klein T.A., Bryden W.L., Tobin N.F., 1987. Head blight of wheat caused by *Fusarium graminearum* Group 1 in New South Wales in 1983. *Australasian Plant Pathology* 16, 72-78.
- Bushnell W.R., Hazen B.E., Pritsch C., 2003. Histology and Physiology of *Fusarium* Head Blight. En: *Fusarium* head blight of wheat and barley. Eds: Kurt J.L., Bushnell W.R. APS Press. ISBN: 0-89054-302-X.
- Cattáneo M., 2011. Los mercados de cebada cervecera en la Argentina y en el mundo. En: Cebada cervecera. Eds: Miralles D.J., Benech-Arnold R.L., Abeledo G.L. Facultad Agronomía, Universidad de Buenos Aires. ISBN: 978-987-9260-84-5.
- Champeil A., Doré T., Fourbet J.F., 2004. *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. *Plant Science* 166, 1389-1415.

- Chandler E., Simpson D., Thomsett M., Nicholson P., 2003. Development of a PCR assays to *Tri7* and *Tri13* trichothecene biosynthetic genes, and characterisation of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62, 355–367.
- Chelkowski J., Wisniewska H., Adamski T., Golinski P., Kaczmarek Z., Kostecki M., Perkowski J., Surma M., 2000. Effects of *Fusarium culmorum* head blight on mycotoxin accumulation and yield traits in barley doubled haploids. *Journal of Phytopathology* 148, 541-545.
- Choo T.M., Martin R.A., Ho K.M., Shen Q., Fedak G., Savard M., Voldeng H., Falk D.E., Etienne M., Sparry E., 2004. *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation of barley in eastern Canada: cultivar response and correlation analysis. *Plant Disease* 88, 837-844.
- Clear R.M., Tucker J.R., Gaba D., Patrick S.K., Lee S.J., Demeke T., Tittlemier S.A., Legge W.G., Gräfenhan T., 2013. Deoxynivalenol levels and chemotype frequency in barley cultivars inoculated with two chemotypes of *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 35, 37-45.
- Comisión del Codex Alimentarius, 2013. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. Comité del codex sobre contaminantes de los alimentos. Séptima reunión, 8-12 de Abril del 2013. ftp://ftp.fao.org/codex/Meetings/cccf/cccf7/cf07_07_Add1s.pdf.
- Covarelli L., Beccari G., Prodi A., Generotti S., Etruschi F., Juan C., Ferrer E., Mañes J., 2015. *Fusarium* species, chemotype characterisation and

- trichothecene contamination of durum and soft wheat in an area of central Italy. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95, 540–551.
- Dacasto M., Rolando P., Nachtmann C., Ceppa L., Nebbia C., 1995. Zearalenone mycotoxicosis in piglet suckling sows feed contaminated grain. *Veterinary and Human Toxicology* 37, 359-361.
 - Del Ponte E.M., Spolti P., Ward T.J., Gomes L.B., Nicolli C.P., Kuhnem P.R., Silva C.N., Tessmann D.J., 2015. Regional and field-specific factors affect the composition of *Fusarium* head blight pathogens in subtropical no-till wheat agroecosystem of Brazil. *Phytopathology* 105, 246-254.
 - Desjardins A., 2006. *Fusarium* Mycotoxins: Chemistry, Genetics, and Biology. APS Press, St. Paul, MN. ISBN: 978-0-89054-335-1.
 - Desjardins A.E., Proctor R.H., 2007. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology* 119, 47-50.
 - Desjardins A.E., 2008. Natural product chemistry meets genetics: when is a genotype a chemotype? *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 56, 7587–7592.
 - di Menna M.E., Lauren D.R., Smith W.A., 1991. Effect of incubation temperature on zearalenone production by strains of *Fusarium crookwellense*. *Mycopathologia* 116, 81–86.
 - Dinolfo M.I., Castañares E., Stenglein S.A., 2014. SRAP as an informative molecular marker to study the *Fusarium poae* genetic variability. *Journal of Phytopathology* 163, 657–663.

- Dirección de Mercados Agrícolas, 2015. Gacetilla informativa del sector agrícola –Newsletter N° 81 Febrero 2015. http://www.minagri.gob.ar/dimeagro/newsletters/nro81/nl_cebada.php.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), 2004. Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003. <http://www.fao.org/3/a-y5499s.pdf>.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), 2009. FAO Agribusiness Handbook Barley-Malt-Beer. http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/tci/docs/AH3_BarleyMaltBeer.pdf.
- FAO/WHO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud), 2015. <http://www.fao.org/news/story/en/item/296415/icode/>.
- Favre L., Verdal-Bonnin M.N., Pansion-Gadais L., Roumet P., Barreau C., Richard-Forget F., 2004. Does biochemical composition of durum wheat kernels influence the trichothecenes B contamination levels? Proceedings of the 2nd International Symposium on Fusarium head blight. Pag. 401.
- Fernandez Pinto V.E., Terminello L.A., Basílico J.C., Ritieni A., 2008. Natural occurrence of nivalenol and mycotoxigenic potential of *Fusarium graminearum* in wheat affected by head blight in Argentina. *Brazilian Journal of Microbiology* 39, 157–162.

- Fernando W.G.D., Zhang J.X., Dusabenyagasani M., Guo X.W., Ahmed H., McCallum B., 2006. Genetic diversity of *Gibberella zeae* isolates from Manitoba. *Plant Disease* 90, 1337-1342.
- Fink-Gremmels J., 1999. Mycotoxins: their implications for human and animal health. *Veterinary Quarterly* 21, 115-120.
- 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. Kolhi M.M. CIMMYT.
- Geiser D.M., del Mar Jimenez-Casco M., Kang S., Makalowska I., Veeraghavan N., Ward T.J., Zhang N., Kuldau G.N., O'Donnell K., 2004. FUSARIUM-ID v.1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 110, 473-480.
- Gomes L.B., Ward T.J., Badiale-Furlong E., Del Ponte E.M., 2015. Species composition, toxigenic potential and pathogenicity of *Fusarium graminearum* species complex isolates from southern Brazilian rice. *Plant Pathology* 64, 980-987.
- Guo X.W., Fernando W.G.D., Seow-Brock H.Y., 2008. Population structure, chemotype diversity, and potential chemotype shifting of *Fusarium graminearum* in wheat fields of Manitoba. *Plant Disease* 92, 756-762.
- Gyllang H., Kjellén K., Haikara A., Sigsgaard P., 1981. Evaluation of fungal contamination on barley and malt. *Journal of the Institute of Brewing* 87, 248-251.

- Hazel C.M., Patel S., 2004. Influence of processing on trichothecene levels. *Toxicology Letters* 153, 51-59.
- Hohn T.M., VanMiddlesworth F., 1986. Purification and characterization of the sesquiterpene cyclase trichodiene synthase from *Fusarium sporotrichioides*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 251, 756-761.
- Hohn T.M., Beremand P.D., 1989. Isolation and nucleotide sequence of a sesquiterpene cyclase gene from the trichothecene-producing fungus *Fusarium sporotrichioides*. *Gene* 79, 131-138.
- Joffe A.Z., 1974. Toxicity of *Fusarium poae* and *F. sporotrichioides* and its relation to alimentary toxic aleukia. En: Mycotoxins. Eds: Purchase I.F.H. Elsevier, Amsterdam. ISBN: 0444412549.
- Joffe A.Z., 1978. *Fusarium poae* and *F. sporotrichioides* as principal agents of alimentary toxic aleukia. En: Mycotoxic Fungi, Mycotoxins Mycotoxicoses. An Encyclopedic Handbook. Mycotoxicoses of Man and Plants: Mycotoxin and Control and Regulatory Aspects, vol. 3. Eds: Wyllie T.D., Morehouse L.G. Marcel Dekker, New York, Basel.
- Johnson A.G., Dickson J.G., Johann H., 1920. An epidemic of *Fusarium* head blight (Scab) of wheat and other cereals. *Phytopathology* 10, 51.
- Kimura M., Matsumoto G., Shingu Y., Yoneyama K., Yamaguchi I., 1998. The mystery of the *trichothecene 3-O-acetyltransferase* gene analysis of the region around *Tri101* and characterization of its homologue from *Fusarium sporotrichioides*. *FEBS Letters* 435, 163–168.

- Kimura M., Tokai T., O'Donnell K., Ward T.J., Fujimura M., Hamamoto H., Shibata T., Yamaguchi I., 2003. The trichothecen biosynthesis gene cluster of *Fusarium graminearum* F15 contains a limited number of essential pathway genes and expressed non-essential genes. *FEBS Letters* 359, 105-110.
- Krcmery V.Jr., Jesenska Z., Spanik S., Gyarfaz J., Nogova J., Botek R., Mardiak J., Sufliarsky J., Sisolakova J., Vanickova M., Kunova A., Studena M., Trupl A., 1997. Fungaemia due to *Fusarium* spp. in cancer patients. *Journal of Hospital Infection* 36, 223-228.
- Kuiper G.G.J.M., Carlsson B., Grandien K., Enmark E., Haggblad J., Nilsson S., Gustafsson J.A., 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology* 138, 863-870.
- Lancova K., Hajslova J., Poustka J., Krplova A., Zachariasova M., Dostalek P., Sachambula L., 2008. Transfer of *Fusarium* mycotoxins and “masked” deoxynivalenol (deoxynivalnol-3-glucoside) from field barley through malt to beer. *Food Additives and Contaminants* 25, 732-744.
- Langevin F., Eudes F., Comeau A., 2004. Effect of trichothecenes produced by *Fusarium graminearum* during *Fusarium* head blight development in six cereal species. *European Journal of Plant Pathology* 110, 735-746.
- Larsen J.C., Hunt J., Perrin I., Ruckenbauer P., 2004. Workshop on trichothecenes with a focus on DON: summary report. *Toxicology Letters* 153, 1-22.

- Lauren D.R., Sayer S.T., Menna M.E., 1992. Trichothecene production by *Fusarium* species isolated from grain and pasture throughout New Zealand. *Mycopathologia* 120, 167–176.
- Lauren D.R., Smith W.A., 2001. Stability of *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in ground maize under typical cooking conditions. *Food Additives and Contaminants* 18, 1011-1016.
- 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* by using PCR. *Applied Environmental and 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 zeae*. *Applied Environmental and Microbiology* 68, 2148–2154.
- Lee J., Chang I., Kim H., Yun S., Leslie J.F., Lee Y., 2009. Genetic diversity and fitness of *Fusarium graminearum* populations from rice in Korea. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 3289-3295.
- Leslie J.F., Summerell B.A., 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA.
- Lewandowski S.M., Bushnell W.R., Evans C.K., 2006. Distribution of mycelial colonies and lesions in field-grown barley inoculated with *Fusarium graminearum*. *Phytopathology* 96, 567-581.
- 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.
- Lopez T.A., Escande A., Chayer R., Dosanto M., Gerpe O., Salomon M.L., 1997. *Fusarium crookwellense* produced zearalenone in maize stubble in the field. *New Zealand Veterinary Journal* 45:251–253.
 - Lysøe E., Klemsdal S.S., Bone K.R., Frandsen R.J.N., Johansen T., Thrane U., Giese H., 2006. The *PKS4* gene of *Fusarium graminearum* is essential for zearalenone production. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 3924-3932.
 - Ma H., Ge H., Zhang X., Lu W., Yu D., Chen H., Chen J., 2009. Resistance to *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in Chinese barley. *Journal of Phytopathology* 157, 166-171.
 - Magan N., Hope R., Colleate A., Baxter E.S., 2002. Relationship between growth and mycotoxin production by *Fusarium* species, biocides and environment. *European Journal of Plant Pathology* 108, 685-690.
 - McCallum B.D., Tekauz A., 2002. Influence of inoculation method and growth stage of *Fusarium* head blight in barley. *Canadian Journal of Plant Pathology* 24, 77-80.
 - McCormick S.P., Stanley A.M., Stover N.A., Alexander N.J., 2011. Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins* 3, 802-814.
 - McCormick S.P., Alexander N.J., 2014. Co-production of 3-ADON and 15-ADON by cultures of *Fusarium graminearum* 15-ADON strains, but not 3-ADON strains, is due to differences in acetyltransferase activity and substrate

- specificity. *Pathogen Biology and Genetics*. National *Fusarium* Head Blight Forum. Pag. 66.
- McMullen M., Jones R., Gallenberg D., 1997. Scab of wheat and barley: a reemerging disease of devastating impact. *Plant disease* 81, 1340-1348.
 - Meek I.B., Peplow A.W., Ake C., Phillips T.D., Beremand M.N., 2003. *Tri1* encodes the cytochrome P450 monooxygenase for C-8 hydroxylation during trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides* and resides upstream of another new *Tri* gene. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1607-1613.
 - Meng K., Wang Y., Yang P., Luo H., Bai Y., Shi P., Yuan T., Ma R., Yao B., 2010. Rapid detection and quantification of zearalenone-producing *Fusarium* species by targeting the zearalenone synthase gene *PKS4*. *Food Control* 21, 207-211.
 - Miedaner T., Cumagun C.J.R., Chakraborty S., 2008. Population genetics of three important head blight pathogens *Fusarium graminearum*, *F. pseudograminearum* and *F. culmorum*. *Journal of Phytopathology* 156, 129-139.
 - Miles C.O., Erasmuson A.F., Wilkins A.L., 1996. Ovine metabolism of zearalenone to α -zearalenol (zeranol). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 3244-3250.
 - Miller J.D., Young J.C., Trenholm H.L., 1983. *Fusarium* toxins in field corn. I. Time course of fungal growth and production of deoxynivalenol and other mycotoxins. *Canadian Journal of Botany* 61, 3080-3087.

- Miller J.D., Greenhalgh Y., Wang Y., Lu M., 1991. Trichothecene chemotypes of three *Fusarium* species. *Mycologia* 83, 121–130.
- Minagri (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca), 2015. Gacetilla Informativa del Sector Agrícola. http://www.minagri.gob.ar/dimeagro/newsletters/nro81/nl_cebada.php.
- Minervini F., Fornelli F., Flynn K.M., 2004. Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and fumonisin B1 in a human erythroleukemia cell line. *Toxicology in Vitro* 18, 21-28.
- Mirocha C.J., Schauerhamer B., Pathre S.V., 1974. Isolation, detection and quantification of zearalenone in maize and barley. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 57, 1104-1110.
- Mishra P.K., Tewari J.P., Clear R.M., Turkington T.K., 2006. Genetic diversity and recombination within populations of *Fusarium pseudograminearum* from western Canada. *International Microbiology* 9, 65-68.
- Monds R.D., Cromey M.G., Lauren D.R., di Menna M., Marshall J., 2005. *F. graminearum*, *F. cortaderiae* and *F. pseudograminearum* in New Zealand: molecular phylogenetic analysis, mycotoxin chemotypes and co-existence of species. *Mycological Research* 109, 410-420.
- Mugrabi de Kuppler A.L., Steiner U., Sulyok M., Krska R., Oerke E.-C., 2011. Genotyping and phenotyping of *Fusarium graminearum* isolates from Germany related to their mycotoxin biosynthesis. *International Journal of Food Microbiology* 151, 78–86.

- Nei M., 1987. *Molecular evolutionary genetics*. New York, USA: Columbia University Press.
- 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., 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 by using PCR assays. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 53, 17–37.
- Nicol J.M., Bagci A., Hekimhan H., Bolat N., Braun H.J., Trethowan R., 2004. Strategy for the identification and breeding of resistance to dryland root rot complex for international spring and winter wheat breeding programs. En: *Proceedings of the 4th International Crop Science Congress, 2004, Brisbane, Australia. New Directions for a Diverse Planet*. Eds: Fischer T., Turner N., Angus J., McIntyre L., Roberston M., Borrell A., Lloyd D.
- Nielsen L.K., Cook D.J., Edwards S.G., Ray R.V., 2014. The prevalence and impact of *Fusarium* head blight pathogens and mycotoxins on malting barley quality in UK. *International Journal of Food Microbiology* 179, 38-49.
- *Nuevo Diccionario Ilustrado de Micología* 2006. Eds: Ulloa M., Hanlin R.T. The American Phytopathological Society. ISBN: 978-0-89054-341-2.
- O'Donnell K., Kistler H.C., Tacke B.K., Casper H.H., 2000. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among

- lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 7905-7910.
- Oliveira P.M., Mauch A., Jacob F., Waters D.M., Arendt E.K., 2012. Fundamental study of the influence of *Fusarium* infection on quality and ultrastructure of barley malt. *International Journal of Food Microbiology* 156, 32-43.
 - Pan D., Calero N., Mionetto A., Bettucci L., 2013. Trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* from wheat in Uruguay. *International journal of Food Microbiology* 162, 120-123.
 - Parry D.W., Jenkinson P., McLeod L., 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals. *Plant Pathology* 44, 207-238.
 - Paulitz T.C., 1996. Diurnal release of ascospores by *Gibberella zeae* in inoculated wheat plots. *Plant Disease* 80, 674-678.
 - Peplow A.W., Meek I.B., Wiles M.C., Phillips T.D., Beremand M.N., 2003. *Tri16* is required for esterification of position C-8 during trichothecene mycotoxin production by *Fusarium sporotrichioides*. *Applied Environmental and Microbiology* 69, 5935-5940.
 - Pereyra S., Lori G.A., 2013. Crop residues and their management of *Fusarium* Head Blight. En: *Fusarium* head blight in Latin America. Eds: Alconada Magliano T.M., Chulze S.N. Springer. ISBN: 978-94-007-7090-4.
 - Placinta C.M., D'Mello J.P.F., Macdonald A.M.C., 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 78, 21-37.

- 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., Giovanni M., Haidukowski M., Logrieco A., Mule G., Visconti A., 2006. Multiplex PCR assay for the identification of nivalenol, 3- and 15-acetyl-deoxynivalenol chemotypes in *Fusarium*. *FEMS Microbiology Letters* 259, 7–13.
- Ramirez M.L., Reynoso M.M., Farnochi M.C., Torres A.M., Leslie J.F., Chulze S.N., 2007. Population genetic structure of *Gibberella zeae* isolated from wheat in Argentina. *Food Additives and Contaminants* 24, 1115-1120.
- Rebell G., 1981. *Fusarium* infections in human and veterinary medicine. En: *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*. Eds: Nelson P.E., Toussoun T.A., Cook R.J. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania. ISBN: 027100293X.
- Reis E., Carmona M., 2002. Fusariosis del trigo: Biología, epidemiología y estrategias para su manejo. BASF Argentina S.A. Buenos Aires.
- Reis E.M., Carmona M.A., 2013. Integrated disease management of *Fusarium* Head Blight. En: *Fusarium head blight in Latin America*. Eds: Alconada Magliano T.M., Chulze S.N. Springer. ISBN: 978-94-007-7090-4.
- Reynoso M.M., Ramirez M.L., Torres A.M., Chulze S.N., 2011. Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* strains isolated from wheat in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 145, 444–448.

- Riley R.T., Norred W.P., 1996. Mechanisms of Mycotoxicity. En: The Mycota VI. Human and Animal Relationships. Eds: Howard D.H., Miller J.D. Springer-Verlag: New York, NY, USA. ISBN: 978-3-662-10375-3.
- Rohlf F.I., 1998. NTSYSpc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.0. Applied biostatistics. New York, USA: Exeter Software.
- Rotter B., Prelusky D.B., Pestka J.J., 1996. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *Journal of Toxicology and Environmental Health* 48, 1-34.
- Saccardo P.A., 1886. Sylloge Fungorum Omnium Hucusque Cognitorum, Vol. 4. Edwards Brothers, Ann Arbor, MI.
- SAGPyA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos), 2009. [www.sagpya.mecon.gov.ar/informes por cultivos/cebada cervecera](http://www.sagpya.mecon.gov.ar/informes%20por%20cultivos/cebada%20cervecera).
- Salas B., Steffenson B.J., Casper H.H., Tacke B., Prom L.K., Fetch T.G., Schwarz P.B., 1999. *Fusarium* species pathogenic to barley and their associated mycotoxins. *Plant Disease* 83, 667-674.
- Sampietro D.A., Díaz C.G., Gonzalez V., Vattuone M.A., Ploper L.D., Catalan C.A.N., Ward T.J., 2011. Species diversity and toxicogenic potential of *Fusarium graminearum* complex isolates from maize fields in northwest Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 145, 359-64.
- Sarlin T., Laitila A., Pekkarinen A., Haikara A., 2005. Effects of three *Fusarium* species on the quality of barley and malt. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 63, 43-49.
- Sarver B.A.J., Ward T.J., Gale L.R., Broz K., Kistler H.C., Aoki T., Nicholson P., Carter J., O'Donnell K., 2011. Novel *Fusarium* head blight pathogens from

- Nepal and Louisiana revealed by multilocus genealogical concordance. *Fungal Genetics and Biology* 48, 1096-1107.
- Satorre E.H., Benech R.L.A., Slafer G.A., de la Fuente E.B., Miralles D.J., Otegui M.E., Savin R., 2003. Sobre la Orientación y los alcances del libro. En: Producción de granos. Bases funcionales para su manejo. Eds.: Satorre E.H., Benech R.L.A., Slafer G.A., de la Fuente E.B., Miralles D.J., Otegui M.E., Savin R. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Buenos Aires. ISBN: 950-29-0713-2.
 - Savin R., Aguinaga A.A., 2011. Los requerimientos de la industria: calidad comercial e industrial y sus determinantes. En: Cebada cervecera. Eds: Miralles D.J., Benech-Arnold R.L., Abeledo G.L. Facultad Agronomía, Universidad de Buenos Aires. ISBN: 978-987-9260-84-5.
 - Savio H.N., Aguinaga A.A., 2011. Mejoramiento genético de cebada cervecera. En: Cebada cervecera. Eds: Miralles D.J., Benech-Arnold R.L., Abeledo G.L. Editorial Facultad Agronomía, Universidad de Buenos Aires. ISBN 978-987-9260-84-5.
 - Schmale D.G., Leslie J.F., Zeller K.A., Saleh A.A., Shields E.J., Bergstrom G.C., 2006. Genetic structure of atmospheric populations of *Gibberella zeae*. *Phytopathology* 96, 1021-1026.
 - Schmale D.G., Wood-Jones A.K., Cowger C., Bergstrom G.C., Arellano C., 2011. Trichothecene genotypes of *Gibberella zeae* from winter wheat fields in the eastern USA. *Plant Pathology* 60, 909–917.

- Schneider S., Roessli D., Excoffier L., 2000. Arlequin. Version 2.0: A software for populations genetic data analysis. Switzerland: University of Geneva.
- Schwarz P.B., Casper H.H., Barr J.M., 1993. Survey of the natural occurrence of deoxynivalenol (vomitoxin) in barley grown in Minnesota, North Dakota and South Dakota during 1993. *Technical Quarterly Master Brewers Association of the Americas* 32, 190-194.
- Schwarz P.B., Casper H.H., Beattie S., 1995. Fate and development of naturally occurring *Fusarium* mycotoxins during malting and brewing. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 53, 121-127.
- Schwarz P.B., Beattie S., Casper H.H., 1996. Relationship between *Fusarium* infestation of barley and the gushing potential of malt. *Journal of the Institute of Brewing* 102, 93-96.
- Schwarz P.B., 2003. Impact of *Fusarium* Head Blight on Malting and Brewing Quality of Barley. En: *Fusarium* head blight of wheat and barley. Eds. Kurt J.L., Bushnell W.R. APS Press. ISBN: 0-89054-302-X.
- Schwarz P.B., Horsley R.D., Steffenson B.J., Salas B., Barr J.M., 2006. Quality risks associated with the utilization of *Fusarium* head blight infected malting barley. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 64, 1-7.
- Scott P.M., 1984. Effects of food processing on mycotoxins. *Journal of Food Protection* 47, 489-499.
- Scott P.M., 1991. Possibilities of reduction or elimination of mycotoxins present in cereal grains. En: *Cereal grain. Mycotoxin, Fungi and Quality in Dying and Storage*. Eds: Chelkowski J. Elsevier, Amsterdam.

- Scoz L.B., Astolfi P., Reartes D.S., Schmale III D.G., Morales M.G., Del Ponte E.M., 2009. Trichothecene mycotoxin genotypes of *Fusarium graminearum sensu stricto* and *Fusarium meridionale* in wheat from southern Brazil. *Plant Pathology* 58, 344–351.
- SIIA (Sistema Integrado de Información Agropecuaria), 2015. http://www.siiia.gov.ar/_apps/siia/estimaciones/estima2.php.
- Silvestro L.B., Stenglein S.A., Forjan H., Dinolfo M.I., Arambarri A.M., Manso L., Moreno M.V., 2013. Occurrence and distribution of soil *Fusarium* species under wheat crop in zero tillage. *Spanish Journal of Agricultural Research* 11, 72-79.
- Sinha R.C., Savard M.E., 1996. Comparison of immunoassay and gas chromatography methods for the detection of the mycotoxin deoxynivalenol in grain samples. *Canadian Journal of Plant Pathology* 18, 233-236.
- Smiley R.W., Gourlie J.A., Easley S.A., Patterson L.M., Whittaker R.G., 2005. Crop damage estimates for crown rot of wheat and barley in the Pacific Northwest. *Plant Disease* 89, 595-604.
- Sneath P.H., Sokal R.R., 1973. Numerical taxonomy. Freeman. San Francisco.
- Somma S., Petruzzella A.L., Logrieco A.F., Meca G., Cacciola O.S., Moretti A., 2014. Phylogenetic analyses of *Fusarium graminearum* strains from cereals in Italy, and characterization of their molecular and chemical chemotypes. *Crop Pasture Science* 65, 52–60.
- Starkey D.E., Ward T.J., Aoki T., Gale L.R., Kistler H.C., Geiser D.M., Suga H., Tóth B., Varga J., O'Donnell K., 2007. Global molecular surveillance reveals

- novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity. *Fungal Genetics and Biology* 44, 1191–1204.
- Steffenson B.J., 2003. *Fusarium* Head Blight of barley: impact, epidemics, management and strategies for identifying and utilizing genetic resistance. En: *Fusarium* head blight of wheat and barley. Eds: Kurt J.L., Bushnell W.R. APS Press. ISBN: 0-89054-302-X.
 - 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.
 - Suga H., Karugia G.W., Ward T.J., Gale L.R., Tomimura K., Nakajima T., Miyasaka A., Koizumi S., Kageyama K., Hyakumachi M., 2008. Molecular characterization of the *Fusarium graminearum* species complex in Japan. *Phytopathology* 98, 159-166.
 - Sugiura Y., Watanabe Y., Tanaka T., Yamamoto S., Ueno Y., 1990. Occurrence of *Gibberella zeae* strains that produce both nivalenol and deoxynivalenol. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 3047–3051.
 - Sugiura Y., 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., Laurence M.H., Liew E.C.Y., Leslie J.F., 2010. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. *Fungal Diversity* 44, 3-13.
- Szécsi Á., Bartók T., Varga M., Magyar D., Mesterházy Á., 2005. Determination of trichothecene chemotypes of *Fusarium graminearum* strains isolated in Hungary. *Journal of Phytopathology* 153, 445–448.
- Tekauz A., McCallum B.D., Gilbert J., 2000. Fusarium head blight of barley in western Canada: a review. *Canadian Journal of Plant Pathology* 22, 9-16.
- Terzi V., Tumino G., Stanca A.M., Morcia C., 2014. Reducing the incidence of cereal head infection and mycotoxins in small grain cereal species. *Journal of Cereal Science* 59, 284-293.
- Trenholm H.L., Thompson B.K., Foster B.C., Charmley L.L., Hartin K.E., Coppock R.W., Albassam M.A., 1994. Effects of feeding diets containing *Fusarium* (naturally) contaminated wheat or pure deoxynivalenol (DON) in growing pigs. *Canadian Journal of Animal Science* 4, 361-369.
- Ueno Y., 1977. Mode of action of trichothecenes. *Pure and Applied Chemistry* 49, 1737-1745.
- Umpierrez-Failache M., Garmendia G., Pereyra S., Rodríguez-Haralambides A., Ward T.J., Vero S., 2013. Regional differences in species composition and toxicogenic potential among *Fusarium* head blight isolates from Uruguay indicate a risk of nivalenol contamination in new wheat production areas. *International Journal of Food Microbiology* 166, 135-140.

- Urrea C.A., Horsley R.D., Steffenson B.J., 2002. Heritability of Fusarium head blight resistance and deoxynivalenol accumulation from barley accession Clho 4196. *Crop Science* 42, 1404-1408.
- van der Lee T., Zhang H., van Diepeningen A., Waalwijk C., 2015. Biogeography of Fusarium graminearum species complex and chemotypes: a review. *Food Additives & Contaminants* 32, 453-460.
- Vismer H.F., Marasas W.F.O, Rheeder J.P., Joubert J.J., 2002. *Fusarium dimerum* as a cause of human eye infections. *Medical Mycology* 40, 399-406.
- 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 fringerprinting. *Nucleic Acids Researchs* 23, 4407-4414.
- Waalwijk C., Kastelein P., de Vries I., Kerényi Z., van der Lee T., Hesselink T., Köhl J., Kema G., 2003. Major changes in *Fusarium* spp. In wheat in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology* 109, 743-754.
- Wang Y., Sun X., Tan B., Zhang B., Xu L., Huang M., Wang M., 2010. A genetic linkage map of *Populus adenopoda* Maxim. X *P. alba* L. hybrid based on SSR and SRAP markers. *Euphytica* 173, 193-205.
- Wang J.H., Ndoye M., Zhang J.B., Li H.P., Liao Y.C., 2011. Population structure and genetic diversity of the *Fusarium graminearum* species complex. *Toxins* 3, 1020-103.
- 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 Academy of Sciences U.S.A.* 99, 9278-9283.
- Ward T.J., Clear R.M., Rooney A.P., O'Donnell K., Gaba D., Patrick S., Starkey D.E., Gilbert J., Geiser D.M., Nowicki T.W., 2008. An adaptative evolutionary shift in *Fusarium* head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America. *Fungal Genetics and Biology* 45, 473–484.
 - Watkins J.E., Boosalis M.G., 1994. Plant disease incidence as influenced by conservation tillage systems. En: *Managing agricultural residues*. Eds: Unger P.W. CRC Press, Boca Raton. ISBN: 0-87371-730-9.
 - Williams K.C., Blaney B.J., Magee M.H., 1989. Responses of pigs fed wheat naturally infected with *Fusarium graminearum* and containing the mycotoxins 4-deoxynivalenol and zearalenone. *Australian Journal of Agricultural Research* 40, 1095-1105.
 - Wollenweber H.W., Reinking O.A., 1935. *Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung*. Verlag Paul Parey, Berlin, Germany.
 - Yang, L., Lee, T.V.D., Yang, X., Yu, D., Waalwijk, C., 2008. *Fusarium* populations on Chinese barley show a dramatic gradient in mycotoxin profiles. *Phytopathology* 98, 719–727.
 - Yli-Mattila T., Gagkaeva T., Ward T.J., Aoki T., Kistler H.C., O'Donnell K., 2009. A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East. *Mycologia* 101, 841-852.

- Zachariasova M., Vaclavikova M., Lacina O., Vaclavik L., Hajslova J., 2012. Deoxynivalenol oligoglycosides: new “masked” Fusarium toxins occurring in malt, beer, and breadstuff. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 9280-9291.
- Zhang J.B., Li H.P., Dang F.J., Qu B., Xu Y.B., Zhao C.S., Liao Y.C., 2007. Determination of the trichothecene mycotoxin chemotypes and associated geographical distribution and phylogenetic species of the *Fusarium graminearum* clade from China. *Mycological Research* 111, 967-975.
- Zhang H., Chen W.Q., Xu J., Xu J.S., Feng J., 2011. First report of *Fusarium cerealis* causing *Fusarium* head blight on barley in China. *Plant Disease* 95, 774.
- Zheng Z., Houchins D., Ung J., Richard J.L., 2004. Validation of an ELISA test kit for the detection of deoxynivalenol in several food commodities. New Horizon of Mycotoxicology for Assuring Food Safety (Proceedings of ISMYCO Kagawa '03).
- Zinedine A., Soriano J.M., Moltó J.C., Mañes J., 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology* 45, 1-18.

ANEXO I

Medios de cultivo y Soluciones

❖ Medios de cultivo

- APG 2 %: 20 g de agar; 20 g de glucosa; extracto de 250 g de papa; en un volumen final de 1 L.
- CLA: 20 g de agar en 1 L de agua. Luego de colocar el medio de cultivo autoclavado en las placa de Petri, se le agregan trozos de hojas de clavel desinfectadas con alcohol 70 % y colocadas 30 s al microondas.
- SNA: 20 g de agar, 1 g de KH_2PO_4 ; 1 g de KNO_3 ; 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g de KCl; 0,2 g de glucosa; 0,2 g de sacarosa en un 1 L de agua.
- CMC: 1 g de NH_4NO_3 , 1 g de KH_2PO_4 ; 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 g de extracto de levadura; 15 g de carboximetil celulosa en 1 L de agua. Una vez que el medio sea autoclavado y se enfríe a 50 °C se agregan 0,2 g de estreptomicina.

❖ Solución de Cresol: 5 mL de Cresol; 5 mL de glicerol; 4 mL de agua destilada.

❖ “Buffer” TE (1 X): 10 mL de Tris-HCl 1 M (pH = 8); 2 mL EDTA 0,5 M (pH = 8); en un volumen final de 1 L. pH = 8.

❖ “Buffer” TBE (5 X): 54 g de Tris-base; 27,5 g de ácido bórico; 20 mL de EDTA 0,5 M (pH = 8); en un volumen final de 1 L.

❖ “Buffer” CTAB: 8 mL de Tris-HCl 100 mM; 3,2 mL de EDTA 20 mM; 22,4 mL NaCl 1,4 mM; completar 80 mL finales con agua destilada.

❖ CTAB 10%: 10 ml de “buffer” CTAB y se le adicionan agua destilada hasta un volumen final de 100 mL.

- ❖ Gel de Agarosa 1,5 %: 1,5 g de agarosa; 20 mL de TBE 5X; 80 mL de agua destilada, 5 µL de GelRed.
- ❖ Gel de Agarosa 0,8 %: 0,8 g de agarosa; 20 mL de TBE 5X; 80 mL de agua destilada, 5 µL de GelRed.
- ❖ Azul de bromofenol sacarosa: 0,25 mg de azul de bromofenol (colorante), 40 mg de sacarosa (la cual otorga la densidad) y se le adiciona agua destilada hasta un volumen final de 100 ml.
- ❖ Gel de poliacrilamida:
 - AFLP: 80 mL de solución de poliacrilamida al 4 %; 80 µL de TEMED (tetrametil etilendiamina); 160 µL de persulfato de amonio al 25 %.
 - SRAP: 75 mL de solución de poliacrilamida al 4 %, 75 µL de TEMED (tetrametil etilendiamina) y 150 µL de persulfato de amonio al 25 %.
- ❖ Solución de Ácido acético ($C_2H_4O_2$) 10 %: 50 mL de ácido acético en 500 mL finales de solución.
- ❖ Solución de Nitrato de plata ($AgNO_3$) 0,1 %: 1 g de nitrato de plata; 1280 µL de formaldehido; completar volumen final de 1 L de agua destilada.
- ❖ Solución de Carbonato de sodio (Na_2CO_3) 3 %: 15 g de carbonato de sodio; 92,85 µL de tiosulfato de sodio al 10 %; 640 µL de formaldehido; completar volumen final de 500 mL con agua destilada.

ANEXO II

Artículos Publicados



Trichothecene genotypes and production profiles of *Fusarium graminearum* isolates obtained from barley cultivated in Argentina



Eliana Castañares^a, Diana Ramirez Albuquerque^b, María Inés Dinolfo^a, Virginia Fernandez Pinto^b, Andrea Patriarca^b, Sebastián Alberto Stenglein^{a,c,*}

^a Laboratorio de Biología Funcional y Biotecnología (BIOLAB)-CICBA-INBIOTEC, Facultad de Agronomía de Azul-UNCPBA, Av. República de Italia 780, 7300 Azul, Buenos Aires, Argentina

^b Laboratorio de Microbiología de Alimentos, PROPLAME-PRHIDEB, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, C1428EGA Buenos Aires, Argentina

^c Cátedra de Microbiología, Facultad de Agronomía de Azul-UNCPBA, Av. República de Italia 780, 7300, Azul, Buenos Aires, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 October 2013

Received in revised form 13 March 2014

Accepted 19 March 2014

Available online 28 March 2014

Keywords:

Fusarium graminearum

Hordeum vulgare

Trichothecenes

Genotype

Chemical production profiles

ABSTRACT

Fusarium graminearum is one of the most important pathogens isolated from small cereal grains with Fusarium Head Blight symptoms. The presence of this fungus is often linked to the occurrence of several mycotoxins in barley and wheat. The aim of our study was to characterize trichothecene genotypes and production profiles of *F. graminearum sensu stricto* isolates obtained from barley grains in Argentina. A total of 110 *F. graminearum s.s.* isolates were analyzed by PCR assays to predict deoxynivalenol (DON), 15-acetyldeoxynivalenol (15-ADON), 3-acetyldeoxynivalenol (3-ADON) and nivalenol (NIV) production, and all isolates were found to belong to the same molecular 15-ADON genotype. Trichothecene production in autoclaved rice was analyzed by using gas chromatography (GC) and confirmed by GC-MS. Of the 110 isolates, 95% were able to produce DON, 71% produced 15-ADON, 63% 3-ADON and 52% NIV. With the exception of a single isolate, all isolates that produced NIV, also produced DON. However, the NIV production was very low, ranging from 0.13 to 0.30 µg/g. Six different production profiles of DON and its acetyl-derivatives were detected, the predominant being simultaneous production of DON, 3-ADON and 15-ADON, followed by DON production, and DON and 15-ADON co-production. This work is the first attempt to characterize the trichothecene genotypes and production profiles of *F. graminearum s.s.* isolates from Argentinean barley.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Barley (*Hordeum vulgare* L.) is the second main winter crop in Argentina, where its cropping area has increased to 1.5 million ha in the last growing season (2012–2013), with a production of ±5 million tons. The principal use of this crop is for malt production, although substandard grains are used for animal feed. *Fusarium graminearum* (syn. *Gibberella zeae*) is the principal causal agent of *Fusarium* Head Blight (FHB) on small cereal grains worldwide. Even though the main problem of the infection is yield loss, a cause of great concern is the ability of *F. graminearum* to contaminate the barley kernels with type B trichothecenes such as nivalenol (NIV) and its acetylated derivatives, and deoxynivalenol (DON), 15-acetyldeoxynivalenol (15-ADON) or 3-acetyldeoxynivalenol (3-ADON) (Desjardins, 2006). In general, DON is associated with vomiting, feed refusal and also quality loss of malt and beer gushing (Schwarz et al., 1996; Oliveira et al.,

2012), whereas NIV is more toxic to humans and animals than DON (Minervini et al., 2004).

In recent years, several PCR assays have been developed to predict *F. graminearum/F. culmorum* chemotypes based on the sequences of the trichothecene biosynthesis pathway genes. For example, primers to differentiate DON from NIV producers based on sequence alleles at *Tri7* and *Tri13* were developed by Lee et al. (2001, 2002) and Chandler et al. (2003), primers based on *Tri5* and *Tri6* gene sequences were developed to differentiate high or low DON producers (Bakan et al., 2002); *Tri3*, *Tri5*, and *Tri7* gene sequences were used to design primers used to differentiate 15-ADON, 3-ADON and NIV producers, respectively (Quarta et al., 2006). Three different chemotypes have been described in *F. graminearum* corresponding to different trichothecene profiles: NIV chemotype, when NIV is produced; 15-ADON chemotype, when DON and 15-ADON are produced; 3-ADON chemotype, when DON and 3-ADON are produced (Desjardins, 2006). On the other hand, such classification should be correctly referred to genotypes since it is based on DNA sequences (Desjardins, 2008). Trichothecene chemotype definition should only be used when the chemical phenotype is expressed and detected by chemical analyses, because the detection of a given trichothecene genotype does not always predict the presence

* Corresponding author at: Laboratorio de Biología Funcional y Biotecnología (BIOLAB)-CICBA-INBIOTEC. Facultad de Agronomía de Azul-UNCPBA. Av. República de Italia 780, 7300, Azul, Buenos Aires, Argentina. Tel./fax: +54 2281 433291.

E-mail address: stenglein@faa.unicen.edu.ar (S.A. Stenglein).

of the corresponding metabolites (Desjardins, 2008). Genotyping results are usually well in accordance with chemotypes (e.g. Ward et al., 2002; Quarta et al., 2006; Yli-Mattila et al., 2009; Reynoso et al., 2011).

The toxigenic potential of *F. graminearum sensu stricto* strains varies around the world. In France, Germany, Italy, Luxembourg, and Turkey, 15-ADON producers were higher in frequency than those of NIV or 3-ADON (Pasquali et al., 2010; Mugarib de Kuppler et al., 2011; Yörük and Albayrak, 2012; Boutigny et al., 2014; Somma et al., 2014). However, studies made in different regions of Russia and adjacent countries showed that 3-ADON producing isolates of *F. graminearum* are dominant in northern Europe. The 3-ADON chemotype was found to be prevalent in Scandinavia, Finland and north-western Russia, whereas the 15-ADON chemotype was more common in southern Europe and China. Both 3-ADON and 15-ADON chemotypes are common in the Russian Far East (Jestoi et al., 2008; Yli-Mattila et al., 2009; Yli-Mattila, 2010). *F. graminearum* isolates with the 15-ADON genotype were found in previous studies as largely responsible for FHB in North America. More recent studies indicated localized heterogeneity among *F. graminearum* populations (Ward et al., 2008). Gale et al. (2011) observed that NIV, 15-ADON and 3-ADON genotype populations obtained from wheat varied according to the geographic origin in the USA. In South America (Uruguay and Brazil) *F. graminearum* isolates of the 15-ADON genotype were reported to predominate in wheat (Scoz et al., 2009; Pan et al., 2013).

In Argentina *F. graminearum* s.s. studies regarding the genotype and/or the production of trichothecenes NIV, DON, 15-ADON, 3-ADON have focused on wheat. Reynoso et al. (2011) using a multiplex PCR assay found that the 92% of the *F. graminearum* isolates evaluated had the 15-ADON genotype. Fernandez Pinto et al. (2008), Alvarez et al. (2009) and Reynoso et al. (2011) revealed that the most common profile of trichothecene production was DON + 15-ADON, although 3-ADON and NIV producers were also detected.

Genotype and chemical profile surveys of *F. graminearum* s.s. isolated from barley have not been previously carried out in Argentina. There have been few studies analyzing *F. graminearum* isolates obtained from barley around the world. Yang et al. (2008) found that most of the isolates from Chinese barley belonged to the DON molecular chemotype (genotype). Astolfi et al. (2011) and Boutigny et al. (2014) reported that 15-ADON genotype was predominant in barley from Southern Brazil and France, respectively.

The aim of our study was to characterize trichothecene genotypes and chemical profiles of *F. graminearum* s.s. isolates obtained from barley grains from different fields in the main production region of Argentina.

2. Materials and methods

2.1. Fungal isolation

F. graminearum isolates were obtained from different barley grain samples collected from commercial fields of Argentina during the 2010, 2011 and 2012 growing seasons (Table 1). Grain samples (200 g) were reduced to 400 grains with a grain divider, surface-disinfected, placed onto potato dextrose agar (PDA) with 0.25 g chloramphenicol/L and incubated for 4–7 days at 25 ± 2 °C under a 12 h light/dark cycle. Single spore *F. graminearum* isolates were morphologically identified on PDA and on Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) according to Leslie and Summerell (2006).

2.2. DNA isolation

Genomic DNA from a total of 110 monosporic *F. graminearum* isolates (Table 1) was extracted using the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method according to Stenglein and Balatti (2006). The quality of fungal DNA was examined by electrophoresis in 0.8% (w/v) agarose gels containing GelRed™ (Biotium, Hayward, USA) at 80 V in

1 × Trisborate-EDTA buffer for 3 h at room temperature. The DNA was visualized under UV light. The DNA concentration was estimated with a fluorometer (Qubit™-Invitrogen, Buenos Aires, Argentina).

2.3. Polymerase chain reaction assays

2.3.1. *Fusarium graminearum sensu stricto* identification

To confirm morphological identifications a *F. graminearum*-specific PCR was performed for the 110 isolates using primers Fg16F and Fg16R according to Nicholson et al. (1998). These primers are not completely specific to *F. graminearum* s.s., but they give products of different size. *F. graminearum* gives a product of about 400 bp, while *F. asiaticum* (NRRL 13818, used as control) gives a PCR product of about 550 bp and *F. meridionale* (NRRL 28436, used as control) gives a product of about 500 bp.

PCR assays were carried out using 10–20 ng of DNA in a total volume of 25 µL containing 10× reaction buffer, 0.5 µM of each primer, 200 µM of each dNTP (Genbiotech S.R.L.), 2.5 mM MgCl₂, and 1.25 U of *Taq* DNA polymerase (Inbio-Highway, Tandil, Argentina). DNA amplifications were performed in a XP thermal cycler (Bioer Technology Co.).

2.3.2. Genotype determination

PCR-trichothecene genotypes were classified into NIV or DON with primers Tri13NIVF/Tri13R and Tri13DONF/Tri13R, respectively, according to Chandler et al. (2003). NIV, DON, 15-ADON, and 3-ADON were also determined by a multiplex-PCR for all isolates with primers Tri7F340/Tri7R965, 3551H/4056H, Tri3F971/Tri3R1679 and Tri3F1325/Tri3R1679, respectively (Quarta et al., 2006).

F. graminearum Cv1.2 (15-ADON genotype), *F. graminearum* Cv12-C (3-ADON), and *F. meridionale* Cv811.1 (NIV) were used as DNA positive controls for trichothecene genotypes (Astolfi et al., 2011). The DNA of the isolates was kindly provided by PhD. Del Ponte, Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brazil.

PCR products were examined by electrophoresis in 1.5% (w/v) agarose gels containing GelRed™ (Biotium, Hayward, USA) at 80 V in 1 × Trisborate-EDTA buffer for 2 h. Fragments were visualized under UV light. Each PCR reaction was performed at least twice, running positive controls, plus the DNA ladder (100 bp) and the negative control in one gel, simultaneously.

2.4. Trichothecene analysis

Toxin analysis was performed according to Alvarez et al. (2009). Briefly, 250-mL Erlenmeyer flasks containing 25 g of sterilized rice and 15 mL of sterile distilled water were inoculated with each monosporic isolate. To determine the absence of trichothecenes in the rice, negative controls (triplicate) were prepared in the same way without inoculation. The inoculated flasks as well as the controls were incubated at 25 °C for 14 days and at 10 °C for 14 days in the dark.

Trichothecenes were extracted for 1 h at 300 rpm with 125 mL of acetonitrile:acetylacetate:water (50:41:9). The clean-up was performed with a column packed with charcoal:alumina:celite (0.7:0.5:0.3) and dried in Rotavap®. Gas chromatography, with ⁶³Ni electron capture detection Shimadzu Model GC17 equipped with split/splitless injector and fitted with RX-5MS capillary column (25 m × 0.2 mm id), were used to detect and quantify trichothecenes. The detection limits were 0.02 µg g⁻¹ for DON and its acetyl derivatives, and 0.05 µg/g for NIV. Standards of DON, 15-ADON, 3-ADON and NIV were purchased from SIGMA Chemical Company (St Louis, MO, USA).

The presence of compounds was confirmed by Gas Chromatography-Mass spectrometer system (GC-MS QP 5050A, Shimadzu®) with Electron Impact (EI) mode (70 eV) as described by Alvarez et al. (2009).

Table 1
Origin and mycotoxin production of *Fusarium graminearum* isolates.

Isolate ^a	Year/locality	Barley variety	NIV µg/g	DON µg/g	3-ADON µg/g	15-ADON µg/g
1-1	2010/S.Spiritu	Scarlett	n.d.	4.22	0.37	2.11
3-4	2010/Tapalqué	Scarlett	0.14	88.85	3.80	n.d.
3-6	2010/Tapalqué	Scarlett	n.d.	17.90	7.15	1.30
6-2	2010/Azul	Shakira	n.d.	0.23	n.d.	n.d.
6-3	2010/Azul	Shakira	n.d.	66.48	1.25	8.04
11-1	2010/Azul	Scarlett	0.14	5.25	0.30	0.20
11-2	2010/Azul	Scarlett	n.d.	45.60	1.00	1.10
13-1	2010/Azul	Scarlett	0.14	14.30	1.00	n.d.
13-2	2010/Azul	Scarlett	0.13	9.65	1.00	0.60
13-3	2010/Azul	Scarlett	0.14	363.50	8.60	21.50
13-4	2010/Azul	Scarlett	0.27	701.30	3.20	n.d.
13-5	2010/Azul	Scarlett	0.14	12.45	0.30	3.05
13-6	2010/Azul	Scarlett	n.d.	43.02	3.90	1.94
17-1	2010/Olavarría	Scarlett	n.d.	19.27	5.52	3.11
23-4	2011/T.Lauquen	Scarlett	n.d.	58.10	4.73	0.76
27-3	2011/Azul	Shakira	0.13	8.90	n.d.	n.d.
27-1	2011/Azul	Shakira	n.d.	2.25	4.55	0.60
27-2	2011/Azul	Shakira	n.d.	4.97	n.d.	0.36
27-5	2011/Azul	Shakira	0.14	13.00	0.75	0.35
27-9	2011/Azul	Shakira	0.14	18.55	0.75	1.25
27-10	2011/Azul	Shakira	0.30	34.20	2.42	0.58
27-14	2011/Azul	Shakira	0.14	21.65	0.28	0.10
27-16	2011/Azul	Shakira	0.16	25.25	4.40	0.55
27-17	2011/Azul	Shakira	0.14	5.37	3.75	5.40
27-18	2011/Azul	Shakira	0.14	4.97	4.80	0.75
27-20	2011/Azul	Shakira	0.16	49.14	n.d.	0.80
29-5	2011/Azul	Scarlett	n.d.	83.23	2.33	0.79
29-7	2011/Azul	Scarlett	0.15	18.21	0.15	7.90
29-9	2011/Azul	Scarlett	n.d.	6.25	n.d.	n.d.
29-11	2011/Azul	Scarlett	n.d.	22.20	0.20	n.d.
29-12	2011/Azul	Scarlett	0.14	2.72	n.d.	5.35
29-14	2011/Azul	Scarlett	0.27	21.80	0.70	n.d.
29-15	2011/Azul	Scarlett	0.15	205.60	1.15	5.50
32-4	2011/Chillar	Scarlett	0.14	29.80	0.10	0.30
33-2	2011/Tandil	Scarlett	0.14	27.80	n.d.	3.65
33-4	2011/Tandil	Scarlett	0.13	1.20	n.d.	10.85
33-9	2011/Tandil	Scarlett	n.d.	6.84	1.66	0.14
33-10	2011/Tandil	Scarlett	n.d.	11.42	1.18	0.20
33-11	2011/Tandil	Scarlett	0.14	19.80	0.85	0.80
33-14	2011/Tandil	Scarlett	n.d.	1.18	0.63	n.d.
33-16	2011/Tandil	Scarlett	n.d.	n.d.	0.12	n.d.
33-17	2011/Tandil	Scarlett	0.14	5.86	1.15	2.25
33-20	2011/Tandil	Scarlett	0.28	3.90	n.d.	0.09
33-22	2011/Tandil	Scarlett	n.d.	4.08	n.d.	2.04
33-24	2011/Tandil	Scarlett	0.27	5.50	n.d.	n.d.
33-27	2011/Tandil	Scarlett	0.27	1.95	n.d.	n.d.
33-28	2011/Tandil	Scarlett	n.d.	16.92	n.d.	n.d.
33-29	2011/Tandil	Scarlett	0.14	4.35	2.45	0.10
33-30	2011/Tandil	Scarlett	n.d.	75.40	n.d.	1.18
33-31	2011/Tandil	Scarlett	0.27	4.02	n.d.	n.d.
33-33	2011/Tandil	Scarlett	n.d.	n.d.	n.d.	0.18
35-4	2011/La Madrid	Scarlett	n.d.	n.d.	n.d.	0.33
62-1	2011/Azul	Scarlett	0.14	2.45	5.50	0.05
62-3	2011/Azul	Scarlett	n.d.	2.70	n.d.	0.11
62-9	2011/Azul	Scarlett	0.16	18.91	0.22	15.05
62-10	2011/Azul	Scarlett	0.14	94.75	0.22	24.54
68-1	2011/Tandil	Scarlett	n.d.	55.80	0.32	0.38
68-3	2011/Tandil	Scarlett	n.d.	9.45	0.55	n.d.
68-5	2011/Tandil	Scarlett	n.d.	60.73	0.99	0.23
68-6	2011/Tandil	Scarlett	0.14	87.72	n.d.	0.15
68-9	2011/Tandil	Scarlett	0.14	10.30	n.d.	0.80
68-10	2011/Tandil	Scarlett	0.29	3.39	11.20	4.90
68-4	2011/Tandil	Scarlett	0.27	6.45	n.d.	n.d.
68-8	2011/Tandil	Scarlett	0.15	202.51	n.d.	5.05
82-1	2011/Azul	Scarlett	0.14	7.17	3.55	7.55
83-1	2011/Azul	Scarlett	n.d.	n.d.	0.52	n.d.
85-1	2011/Azul	Scarlett	0.27	n.d.	n.d.	n.d.
87-2	2011/Azul	Scarlett	0.27	1.40	n.d.	n.d.
87-3	2011/Azul	Scarlett	0.14	6.39	2.00	2.10
87-4	2011/Azul	Scarlett	0.15	64.80	2.50	2.75
87-5	2011/Azul	Scarlett	n.d.	7.27	0.79	0.13
87-1	2011/Azul	Scarlett	0.30	7.38	n.d.	n.d.
87-7	2011/Azul	Scarlett	n.d.	5.08	n.d.	n.d.
88-1	2011/Azul	Scarlett	n.d.	421.93	15.90	2.10

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Isolate ^a	Year/locality	Barley variety	NIV µg/g	DON µg/g	3-ADON µg/g	15-ADON µg/g
88-2	2011/Azul	Scarlett	0.14	431.50	n.d.	4.70
88-3	2011/Azul	Scarlett	n.d.	158.90	n.d.	n.d.
90-1	2011/Azul	Scarlett	n.d.	136.90	1.29	4.44
90-2	2011/Azul	Scarlett	n.d.	149.70	1.33	0.13
92-1	2011/Olavarría	Scarlett	n.d.	28.65	n.d.	n.d.
92-2	2011/Olavarría	Scarlett	n.d.	914.00	3.28	2.55
92-8	2011/Olavarría	Scarlett	n.d.	24.22	0.74	0.67
92-10	2011/Olavarría	Scarlett	0.14	31.04	1.40	4.20
92-11	2011/Olavarría	Scarlett	0.28	22.10	1.27	1.80
92-7	2011/Olavarría	Scarlett	0.14	22.40	7.20	6.95
92-6	2011/Olavarría	Scarlett	n.d.	30.49	n.d.	0.10
114-1	2012/Lobería	NN	n.d.	104.05	2.50	2.10
114-2	2012/Lobería	NN	n.d.	68.32	n.d.	0.20
116-1	2012/Necochea	NN	n.d.	8.11	4.61	0.62
119-6	2012/San Cayetano	NN	n.d.	17.43	5.07	0.61
119-8	2012/San Cayetano	NN	n.d.	228.46	0.67	0.22
119-9	2012/San Cayetano	NN	n.d.	20.40	0.63	0.09
119-12	2012/San Cayetano	NN	n.d.	0.41	n.d.	n.d.
119-14	2012/San Cayetano	NN	0.27	0.86	n.d.	n.d.
119-17	2012/San Cayetano	NN	n.d.	0.54	4.45	0.65
119-18	2012/San Cayetano	NN	n.d.	50.30	3.36	1.21
119-2	2012/San Cayetano	NN	n.d.	10.49	n.d.	n.d.
119-30	2012/San Cayetano	NN	n.d.	41.05	4.33	0.88
119-32	2012/San Cayetano	NN	n.d.	2.63	n.d.	n.d.
119-33	2012/San Cayetano	NN	0.27	2.16	n.d.	n.d.
119-39	2012/San Cayetano	NN	0.13	7.75	n.d.	0.50
119-36	2012/San Cayetano	NN	n.d.	6.12	1.25	0.12
120-1	2012/Tres Arroyos	NN	0.14	9.37	20.00	17.25
120-2	2012/Tres Arroyos	NN	0.27	0.45	n.d.	n.d.
129-1	2012/Azul	Scarlett	n.d.	642.86	5.72	1.33
129-2	2012/Azul	Scarlett	0.14	20.46	4.85	15.40
129-3	2012/Azul	Scarlett	0.27	1.74	n.d.	n.d.
129-4	2012/Azul	Scarlett	0.27	4.75	n.d.	n.d.
129-5	2012/Azul	Scarlett	n.d.	34.75	3.61	0.44
129-6	2012/Azul	Scarlett	n.d.	3.44	3.56	1.45
130-1	2012/Azul	B1215	0.27	7.40	1.60	n.d.

NN = data not available.

n.d. = not detected.

^a The first number identify different samples and the number next to the dash identify different isolates of a sample.

2.5. Statistical analysis

Exploratory statistical analysis, histograms and Shapiro Wilk test were done with Statistica software v 8.0 (StatSoft, Inc., 1984–2007, Tulsa, OK, USA).

3. Results

3.1. Trichothecene genotype analyses by PCR

All *F. graminearum* isolates produced a fragment of ≈ 400 bp characteristic of the species, confirming morphological identifications.

All positive controls amplified the specific fragment according to the primers used in the PCR assays. The 110 *F. graminearum* isolates used for this study amplified a fragment of 282 bp with primers Tri13F/Tri13DONR and no amplifications were observed for primers Tri13NIVF/Tri13R, and were classified as representatives of the DON genotype. All isolates amplified fragments of 525 bp and 708 bp in the multiplex-PCR reactions and were classified as 15-ADON genotype.

3.2. Trichothecene chemical analyses

The chemical analysis of the *F. graminearum* isolates obtained from barley grains demonstrated their capacity to produce high amounts of the evaluated toxins, especially DON (Table 1). DON was produced by 95% of the isolates, 71% produced 15-ADON, 63% 3-ADON, and 52% NIV. NIV was found simultaneously with DON, but in much lower quantities, except for isolate 85-1 that produced only NIV, also in low amount (Table 1). Except for a low number of isolates (10 of 96), DON was

always produced in larger amounts than the other analyzed trichothecenes. Table 2 shows the average amount and range of production for each toxin.

3.3. Statistical analyses

According to the chemical analysis of the isolates, the results of the present work suggest that DON is the main trichothecene to be found in Argentinean barley grains, and it is expected to be present in high concentrations. However, it is also probable to find both 3-ADON and 15-ADON in lower quantities. The production of both DON acetyl-derivatives by all *F. graminearum* isolates followed a similar non-Gaussian distribution (Fig. 1) with close means and standard deviations (3-ADON, Shapiro Wilk test $p < 0.0001$, $n = 110$, mean = 1.85, SD = 3.10; 15-ADON, Shapiro Wilk test $p < 0.0001$, $n = 110$, mean = 2.10, SD = 4.27). The maximum levels of production were also similar for both 3-ADON and 15-ADON (20.0 and 24.5 µg/g respectively), which suggest that the isolates able of producing any of the acetyl-derivatives are alike in their biosynthesis capacity.

Table 2

Maximum, minimum and mean concentrations of trichothecenes produced by *Fusarium graminearum* isolated from barley.

	NIV (µg/g)	DON (µg/g)	3-ADON (µg/g)	15-ADON (µg/g)
Maximum	0.30	914.00	20.00	24.54
Minimum	0.13	0.23	0.10	0.05
Average	0.19	62.28	2.91	2.96

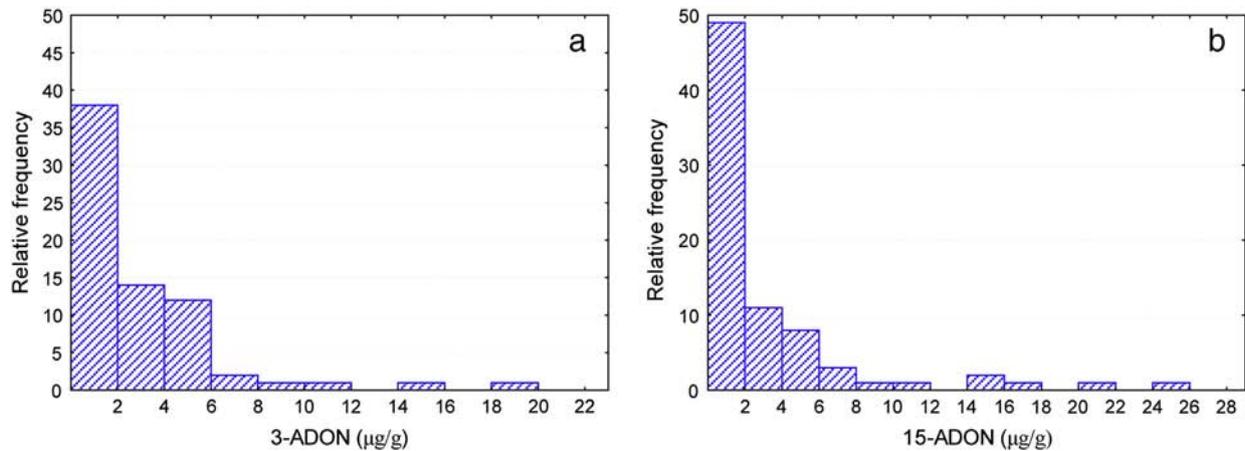


Fig. 1. Relative frequency of a) 3-acetyldeoxynivalenol and b) 15-acetyldeoxynivalenol concentration produced by *Fusarium graminearum* isolated from barley.

3.4. Profiles of production of DON and acetyl-derivatives by *F. graminearum sensu stricto* isolated from barley

According to DON and their acetyl-derivatives biosynthesis, six different profiles of production were detected among the *F. graminearum s.s.* isolates from barley (Table 3). The predominant one was characterized by the production of DON + 3-ADON + 15-ADON. In much lower quantities, the second and third in proportion were the DON and DON + 15-ADON. Simultaneous production of DON + 3-ADON was also observed, although in lower frequency. Only two out of 110 isolates were producers of 15-ADON or 3-ADON alone.

Although different barley varieties (Scarlett, Shakira and B1215), years and/or geographical localities were sampled, the *F. graminearum* isolates analyzed did not present a clear pattern of mycotoxin production related to any of these variables. Moreover, in a single sample we found *F. graminearum* isolates with a different pattern of trichothecene production (e.g., samples 33, 92) (Table 1).

4. Discussion

All 110 isolates of *F. graminearum sensu stricto* isolated from barley analyzed in the present study belonged to the 15-ADON genotype. Different studies around the world have been published in relation to the capacity (genotype level) of isolates of *F. graminearum s.s.* from small cereals to produce trichothecenes. Little is known about *Fusarium* populations isolated from barley grains. In China, *F. asiaticum* was reported as the predominant species causing FHB on barley, and the NIV genotype was the most abundant. However, the *F. graminearum s.s.* isolates isolated from barley, present in lower proportion, belonged to the DON molecular chemotype (Yang et al., 2008). In recent surveys of *Fusarium* trichothecene genotype from barley grains in France and Brazil, the 15-ADON genotype was the most frequent among *F. graminearum s.s.* isolates, but 3-ADON genotype was also present (Astolfi et al.,

2011; Boutigny et al., 2014). Our results agree with the prevalence of 15-ADON genotype in barley grains in South America.

There is no information on *F. graminearum* genotypes/chemical production profiles of isolates from barley in Argentina. With respect to *Fusarium* populations from different small cereal crops in Argentina, studies in the wheat cropping area reported that *F. graminearum* isolates were predominantly 15-ADON producers (Fernandez Pinto et al., 2008; Alvarez et al., 2009; Reynoso et al., 2011). The 15-ADON chemotype was also predominant in *F. graminearum* isolates from soybean (Barros et al., 2012).

Chemical analysis of the *F. graminearum s.s.* isolates demonstrated differences with our PCR-genotype results. All isolates showed a positive PCR reaction for DON and the chemical results showed that the 95% produced DON in different concentrations. This discrepancy between genotype and chemical analyses has also been reported in the literature (Desjardins, 2008; Somma et al., 2014) and could be explained by the fact that PCR assays determine the potential to produce a mycotoxin at the genome level, but the in vitro production of a toxin could change with growth conditions.

A considerable number of isolates that amplified and produced DON were able to produce low quantities of NIV, but no PCR reaction for NIV was detected in our PCR assays. This result was also reported by Mugrabi de Kuppler et al. (2011), who found that DON genotype isolates tended to produce low amounts of NIV, and that DON was produced by isolates of the NIV genotype, although this characteristic could not be detected by the existing molecular assays. Alvarez et al. (2009) and Fernandez Pinto et al. (2008) also detected by chemical analysis that some of the isolates producing DON could produce low levels of NIV. Mugrabi de Kuppler et al. (2011) suggested that this situation could be attributed to the enzymatic conversion step of DON to NIV and vice versa or as a by-product of the biosynthesis.

In the present study, DON, 15-ADON and 3-ADON were produced simultaneously by 60 (54.5%) isolates. Moreover, 30 of these 60 isolates produced both acetyl-derivatives in similar amounts. Surprisingly, 22/110 isolates produced 3-ADON in a relationship of 4:1 or more than 15-ADON, and 10/110 produced 3-ADON and not 15-ADON, even though the 110 isolates were characterized molecularly as 15-ADON genotype. The discrepancy found between genotype and chemical data confirms that genotyping alone is not sufficient to predict the total profile of trichothecenes that isolates could synthesize, as was also found by Mugrabi de Kuppler et al. (2011).

The multiplex-PCR used for the differentiation of 3-ADON and 15-ADON genotypes used primers that amplified the *Tri3* region. Recently, Alexander et al. (2011) postulated that *Tri3* is not a determinant region to discriminate between 3-ADON and 15-ADON genotypes, and that *Tri8* was responsible for this differentiation. *Tri8* is required for

Table 3
Profiles of deoxynivalenol and acetyl-derivative production by *Fusarium graminearum* isolated from barley.

Trichothecene profile	DON	3-ADON	15-ADON	No. of isolates	Percentage of isolates
I	+	+	+	60	54.5
II	+	–	–	21	19.1
III	+	–	+	16	14.5
IV	+	+	–	8	7.3
V	–	+	–	2	1.8
VI	–	–	+	2	1.8

conversion of 3,15-diADON to either 3-ADON or 15ADON; in 3-ADON isolates, the *Tri8* enzyme is a trichothecene C-15 esterase (deacetylase), whereas in 15-ADON isolates is a C-3 esterase. According to their results, the differential activity of *Tri8* rather than lack of *Tri3* or *Tri8* activity in some isolates is determinant of 3-ADON or 15-ADON chemotypes. The authors suggest that low production of 3-ADON in an isolate genetically characterized as 15-ADON producer is most likely due to the activity of *Tri101*, a C-3 acetyltransferase acting on DON. As DON is not the preferred substrate of *Tri101*, the conversion to 3-ADON is slow. On the other hand, the production of low amounts of 15-ADON by 3-ADON genetically characterized isolates could be explained by *Tri3* acetylation of DON at C-15. DON is again a poor substrate for *Tri3*, and this would justify the low production. According to their results, *Tri8* is specific for deacetylation at C3 or C-15 in 15-ADON or 3-ADON isolates, respectively. It still remains to investigate if the *Tri8* activity is the basis for isolates producing both 3-ADON and 15-ADON in relatively similar amounts. If *Tri8* could have both activities, i.e. catalyze C-3 and C-15 deacetylation of 3,15-ADON, it seems possible that an isolate that can produce DON could also produce both acetyl derivatives if *Tri8* activity is interrupted or the enzyme does not completely catalyze both reactions.

The simultaneous production of 3-ADON and 15-ADON in comparable amounts by *F. graminearum* s.s. was also reported by Szécsi et al. (2005), Fernandez Pinto et al. (2008) and Alvarez et al. (2009). Previously, Sugiura et al. (1990) had reported the co-production of both DON acetyl-derivatives by *G. zeae* isolates isolated from barley and wheat from Japan. Interestingly, all these studies have in common that the incubation of the isolates for trichothecene production was made at two different temperatures. Sugiura et al. (1990) found differences in the DON acetyl-derivatives production pattern when the cultures were incubated at 25 °C for 21 days in comparison with incubating 2 weeks at 25 °C followed by two weeks at 4 °C. The first incubation conditions yielded DON and both acetyl-derivatives in similar amounts, while no 3-ADON was detected at the second set of conditions. The incubation pattern for the rest of the above mentioned studies was 2 weeks at 10 °C followed by 2 weeks at 25 °C, and all of them found a representative number of isolates that could accumulate similar quantities of both acetyl-derivatives. As environmental conditions have the potential to dramatically affect secondary metabolite biosynthesis, this could be a possible explanation for the results observed in these studies, as well as what was observed with the isolates from Argentinean barley in the present work, since the incubation conditions are the same. Sugiura et al. (1990) proposed an enzymatic activity that catalyzes the conversion of 3-ADON to 15-ADON regulated by temperature. It is also possible that, if *Tri8* could have the dual activity of catalyzing C-3 and C-15 deacetylation of 3,15-ADON, to yield 15-ADON and 3-ADON respectively, it was regulated by temperature or other environmental conditions. Accordingly, the discrepancy between genotype and chemical analyses in the present work could be explained by the dependence on growing conditions. Therefore, both types of analysis are necessary to reflect the potential contamination with trichothecenes in barley grains. Further studies on the relationship between environmental factors, substrate, culture conditions, etc. and DON acetyl-derivatives formation are needed. However, the development of new primer sets could be necessary to differentiate these acetyl-derivatives genotypes based on the *Tri8* region.

Different production profiles of *F. graminearum* isolates were found at the same location, and even in a single barley grain sample. This observation is important in relation with the type/s and amount of mycotoxins that could be found in the same or different samples. This work revealed for the first time the potential (genotype) and production profile of trichothecenes of *F. graminearum* s.s. isolates obtained from barley grains in Argentina. Knowledge of the mycotoxin potential and production of this important fungus on this economically relevant crop is necessary for risk assessments. Furthermore, continuous monitoring is required to understand and predict future changes in the toxigenic potential of *Fusarium* populations.

Acknowledgments

This work was supported by FONCYT-SECYT PICT 030/2011, CONICET, UNCPBA and UBA.

References

- Alexander, N.J., McCormick, S.P., Waalwijk, C., van der Lee, T., Proctor, R.H., 2011. The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium*. *Fungal Genet. Biol.* 48, 485–495.
- Alvarez, C.A., Azcarate, M.P., Fernandez Pinto, V., 2009. Toxigenic potential of *Fusarium graminearum sensu stricto* isolates from wheat in Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* 135, 131–135.
- Astolfi, P., dos Santos, J., Schneider, L., Gomes, L.B., Silva, C.N., Tessmann, D.J., Del Ponte, E.M., 2011. Molecular survey of trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* species complex from barley in Southern Brazil. *Int. J. Food Microbiol.* 148, 197–201.
- Bakan, B., Giraud-Delville, C., Pinson, L., Richard-Molard, D., Fournier, E., Brygoo, Y., 2002. Identification by PCR of *Fusarium culmorum* strains producing large and small amounts of deoxynivalenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5472–5479.
- Barros, G., Alaniz Zanon, M.S., Abod, A., Oviedo, M.S., Ramirez, M.L., Reynoso, M.M., Torres, A., Chulze, S., 2012. Natural deoxynivalenol occurrence and genotype and chemotype determination of a field population of the *Fusarium graminearum* complex associated with soybean in Argentina. *Food Addit. Contam.* 29, 293–303.
- Boutigny, A.-L., Ward, T.J., Ballois, N., Iancu, G., Ios, R., 2014. Diversity of the *Fusarium graminearum* species complex on French cereals. *Eur. J. Plant Pathol.* 138, 133–148.
- Chandler, E., Simpson, D., Thomsett, M., Nicholson, P., 2003. Development of a 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.
- Desjardins, A., 2006. *Fusarium* Mycotoxins: Chemistry, Genetics, and Biology. APS Press, St. Paul, MN.
- Desjardins, A.E., 2008. Natural product chemistry meets genetics: when is a genotype a chemotype? *J. Agric. Food Chem.* 56, 7587–7592.
- Fernandez Pinto, V.E., Terminello, L.A., Basilio, J.C., Ritieni, A., 2008. Natural occurrence of nivalenol and mycotoxigenic potential of *Fusarium graminearum* in wheat affected by head blight in Argentina. *Braz. J. Microbiol.* 39, 157–162.
- Gale, L.R., Harrison, S.A., Ward, T.J., O'Donnell, K., Milus, E., Gale, S.W., Kistler, H.C., 2011. Nivalenol-type populations of *Fusarium graminearum* and *F. asiaticum* are prevalent on wheat in southern Louisiana. *Phytopathology* 101, 124–134.
- Jestoi, M.N., Paavanen-Huhtala, S., Parikka, P., Yli-Mattila, Y., 2008. *In vitro* and *in vivo* mycotoxin production of *Fusarium* species isolated from Finnish grains. *Arch. Phytopathol. Plant Protect.* 41, 545–558.
- 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, T., Han, Y., Kim, K., Yun, S., Lee, Y., 2002. *Tri13* and *Tri7* determine deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2148–2154.
- Leslie, J.F., Summerell, B.A., 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA.
- Minervini, F., Fornelli, F., Flynn, K.M., 2004. Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and fumonisin B1 in a human erythroleukemia cell line. *Toxicol. in Vitro* 18, 21–28.
- Mugrabi de Kuppler, A.L., Steiner, U., Sulyok, M., Krška, R., Oerke, E.-C., 2011. Genotyping and phenotyping of *Fusarium graminearum* isolates from Germany related to their mycotoxin biosynthesis. *Int. J. Food Microbiol.* 151, 78–86.
- 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 by using PCR assays. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 53, 17–37.
- Oliveira, P.M., Mauch, A., Jacob, F., Waters, D.M., Arendt, E.K., 2012. Fundamental study on the influence of *Fusarium* infection on quality and ultrastructure of barley malt. *Int. J. Food Microbiol.* 156, 32–43.
- Pan, D., Calero, N., Mionetto, A., Bettucci, L., 2013. Trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* from wheat in Uruguay. *Int. J. Food Microbiol.* 162, 120–123.
- Pasquali, M.F., Brochot, C., Cocco, E., Hoffmann, L., Bohn, T., 2010. Genetic *Fusarium* chemotyping as a useful tool for predicting nivalenol contamination in winter wheat. *Int. J. Food Microbiol.* 137, 246–253.
- Quarta, A., Giovanni, M., Haidukowski, M., Logrieco, A., Mule, 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, M.M., Ramirez, M.L., Torres, A.M., Chulze, S.N., 2011. Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* strains isolated from wheat in Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 444–448.
- Schwarz, P.B., Beattie, S., Casper, H.H., 1996. Relationship between *Fusarium* infestation of barley and the gushing potential of malt. *J. Inst. Brew.* 102, 93–96.
- Sczo, L.B., Astolfi, P., Reartes, D.S., Schmale III, D.G., Moraes, M.G., Del Ponte, E.M., 2009. Trichothecene mycotoxin genotypes of *Fusarium graminearum sensu stricto* and *Fusarium meridionale* in wheat from southern Brazil. *Plant Pathol.* 58, 344–351.
- Somma, S., Petruzzella, A.L., Logrieco, A.F., Meca, G., Cacciola, O.S., Moretti, A., 2014. Phylogenetic analyses of *Fusarium graminearum* strains from cereals in Italy, and characterisation of their molecular and chemical chemotypes. *Crop Pasture Sci.* 65, 52–60.
- Stenglein, S.A., Balatti, P.A., 2006. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Argentina as revealed by pathogenic and molecular markers. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 68, 158–167.

- Sugiura, Y., Watanabe, Y., Tanaka, T., Yamamoto, S., Ueno, Y., 1990. Occurrence of *Gibberella zeae* strains that produce both nivalenol and deoxynivalenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3047–3051.
- Szécsi, Á., Bartók, T., Varga, M., Magyar, D., Mesterházy, Á., 2005. Determination of trichothecene chemotypes of *Fusarium graminearum* strains isolated in Hungary. *J. Phytopathol.* 153, 445–448.
- Ward, T.J., Bielawski, J.P., Kistler, H.C., Sullivan, E., O'Donnell, K., 2002. Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 9278–9283.
- Ward, T.J., Clear, R.M., Rooney, A.P., O'Donnell, K., Gaba, D., Patrick, S., Starkey, D.E., Gilbert, J., Geiser, D.M., Nowicki, T.W., 2008. An adaptive evolutionary shift in *Fusarium* head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America. *Fungal Genet. Biol.* 45, 473–484.
- Yang, L., Lee, T.V.D., Yang, X., Yu, D., Waalwijk, C., 2008. *Fusarium* populations on Chinese barley show a dramatic gradient in mycotoxin profiles. *Phytopathology* 98, 719–727.
- Yli-Mattila, T., 2010. Ecology and evolution of toxigenic *Fusarium* species in cereals in Northern Europe and Asia. *J. Plant Pathol.* 92, 7–18.
- Yli-Mattila, T., Gagkaeva, T., Ward, T.J., Aoki, T., Kistler, H.C., O'Donnell, K., 2009. A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East. *Mycologia* 101, 841–852.
- Yörük, E., Albayrak, G., 2012. Chemotyping of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates from Turkey by PCR assay. *Mycopathologia* 173, 53–61.

SHORT COMMUNICATION

***Fusarium cerealis* Associated with Barley Seeds in Argentina**Eliana Castañares¹, María Inés Dinolfo¹, María Virginia Moreno^{1,2}, Corina Berón³ and Sebastián Alberto Stenglein^{1,2}

1 Laboratorio de Biología Funcional y Biotecnología (BIOLAB-Azul), INBIOTEC-Facultad de Agronomía de Azul-UNCPBA, CC 47, 7300, Azul, Buenos Aires, Argentina

2 Cátedra de Microbiología, Facultad de Agronomía de Azul, UNCPBA, CC 47, 7300, Azul, Buenos Aires, Argentina

3 INBIOTEC-CONICET, Vieytes 3103, 7600, Mar del Plata, Argentina

Keywords

Fusarium cerealis, *Hordeum vulgare*, nivalenol, zearalenone

Correspondence

S. A. Stenglein, Laboratorio de Biología Funcional y Biotecnología (BIOLAB-Azul), INBIOTEC-Facultad de Agronomía de Azul-UNCPBA, Buenos Aires, Argentina.
E-mail: stenglein@faa.unicen.edu.ar

Received: November 22, 2012; accepted: February 17, 2013.

doi: 10.1111/jph.12097

Abstract

Fusarium head blight is a fungal disease caused by a complex of *Fusarium* species on cereals, such as barley and wheat. It has economic impacts due to yield reductions and mycotoxin contamination. As barley production has increased considerably in the last 5 years in Argentina, a survey was conducted for identifying *Fusarium* species associated with barley grains. *Fusarium cerealis* was isolated and identified based on morphological and molecular analysis. The potential production of nivalenol and zearalenone was assessed using specific PCR assays. Koch's postulates were carried out to confirm the pathogenicity of the fungus.

Introduction

Fusarium head blight (FHB) is a major disease of wheat, barley and other small grain cereals, caused by a complex of *Fusarium* species. This disease reduces grain yield and can also produce (depending on the associated *Fusarium* species) different mycotoxins, especially trichothecenes, a group that can cause a wide range of acute and chronic effects in humans and animals (D'Mello et al. 1999). Deoxynivalenol (DON) and nivalenol (NIV) are considered the most widespread type B trichothecenes produced by *Fusarium* species isolated from small grain cereals. DON and NIV can be produced by several *Fusarium* species, such as *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae* and *F. cerealis*, among others (Desjardins 2006). Zearalenone (ZEA) is a polyketide mycotoxin produced by some *Fusarium* species that has an oestrogenic effect on mammals affecting their reproductive systems (Desjardins 2006).

Barley (*Hordeum vulgare* L.) is one of the most widely grown winter cereal crops in Argentina (1.5 M ha in 2012) and is primarily grown for use as malted

barley. However, barley grain of insufficient quality for the brewing process is used as source of energy and protein for farm livestock.

Fusarium head blight symptoms on barley include premature necrosis and a brown/grey discolouration of the spike (Boddu et al. 2006), and the presence of *Fusarium* species in barley grain poses a risk to consumers because of the associated mycotoxins.

Fusarium cerealis (synonym of *F. crookwellense*, see www.mycobank.org) has been isolated from wheat-growing areas at low frequencies (Gale 2003; Alvarez et al. 2011; Schmale et al. 2011). However, less extensive surveys of the incidence of *Fusarium* spp. in barley grains have been undertaken to date. To our knowledge, little is known (Barreto et al. 2004; Castañares et al. 2012) about the occurrence and distribution of *Fusarium* species in barley grains in Argentina; hence, the aim of this study was to report the occurrence of *F. cerealis* on barley grains based on both morphological and molecular methods. As *F. cerealis* was reported to produce NIV and ZEA (di Menna et al. 1991; Miller et al. 1991), the potential ability to produce these toxins was tested using specific PCR assays.

Material and Methods

A survey of fungi in a barley (cv. Shakira) seed lot from a field located at Treinta de Agosto (36°16'0" S, 62°33'0" W), Buenos Aires, Argentina, in the 2011 growing season, was conducted. Four-hundred seeds were surface sterilized (70% EtOH for 2 min; 5% NaClO for 2 min), rinsed twice in sterilized distilled water, plated on 2% potato dextrose agar (PDA) and incubated at $24 \pm 2^\circ\text{C}$ in a 12-h dark/light cycle. Ten fungal colonies morphologically similar to *Fusarium* were observed after 6 days of incubation. For identification, all isolates were taken and purified through monosporic culture and transferred onto PDA and carnation leaf agar (CLA) to grow in the same conditions as described above. Identification to species based on morphological traits was carried out for all the isolates according to Leslie and Summerell (2006).

For Koch's postulates, a pathogenicity test was conducted using a hand sprayer to inoculate 30 barley (cv. Shakira) heads selected at random in potted plants (one plant per pot with ± 5 heads per plant) with a 5-ml spore suspension (8×10^4 conidia/ml). Ten heads selected at random from different potted barley plants were sprayed with sterile distilled water as a control. The whole plants were covered with polyethylene bags and incubated for 3 days in a growth chamber under a 12-h light/dark cycle at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Plants were unbagged and moved into a greenhouse. Twenty days after inoculation, the spikelets were visually evaluated for disease symptoms.

DNA of the monosporic fungus morphologically identified as *F. cerealis* was extracted as described previously (Stenglein and Balatti 2006) and identified to species level by sequencing portions of the reductase (*RED*), trichothecene 3-*O*-acetyltransferase (*tri101*) and translation elongation factor (*TEF*) genes (Ward et al. 2008). PCR products were purified with the aid of a PureLink PCR purification kit (Invitrogen, Löhne, Germany). 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, Foster City, CA, USA) in an Applied Biosystems Sequencer (ABI/Hitachi Genetic Analyzer 3130). Similarities of the fragments with previously published sequences were examined with BLAST_N (Altschul et al. 1990) on the NCBI website. The sequences generated in this study were submitted to GenBank.

Additionally, the isolate was tested for the potential to produce NIV based on the *Tri7* gene and ZEA based on the *PKS4* gene, using specific PCR primers accord-

ing to Quarta et al. (2006) and Meng et al. (2010), respectively.

All PCRs were carried out in a 25- μl final volume containing 12–15 ng of genomic DNA, 10 \times reaction buffer [2 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM KCl, 0.01 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% (v/v) glycerol, 0.5% (v/v) Tween[®] 20, 0.5% (v/v) Nonidet[®]P40], 0.5 μM of each primer, 200 μM of each dNTP (Genbiotech S.R.L., Buenos Aires, Argentina), 2.5 mM MgCl₂ and 1.25 units of Taq DNA polymerase (InbioHighway, Tandil, Argentina). DNA amplifications were performed in an XP thermal cycler (Bioer Technology Co, Hangzhou, China) with an initial denaturing step at 95°C for 2 min; followed by 29 cycles at 95°C for 30 s, 57°C (for *RED* and *tri101* primers) for 35 s and 72°C for 45 s; and a final extension cycle at 72°C for 2 min. The annealing temperature was modified according to the primers used: 54°C (*TEF*), 53°C (*NIV*) and 60°C (*ZEA*). Each reaction was performed twice. Products were examined by electrophoresis in 1.5% (w/v) agarose gels containing GelRed[™] (Biotium, Hayward, CA, USA) at 80 V in 1 \times Trisborate-EDTA buffer for 2 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.). Gel images were photographed with a digital DOC 6490 system (Biodynamics S.R.L., Buenos Aires, Argentina).

Results and Discussion

One isolate, when growing on PDA, produced abundant white aerial mycelium and formed red pigments in the medium. Abundant sporodochia were observed. On CLA, macroconidia were abundant and formed monophialides in pale orange sporodochia, falcate with the dorsal side more curved than the ven-

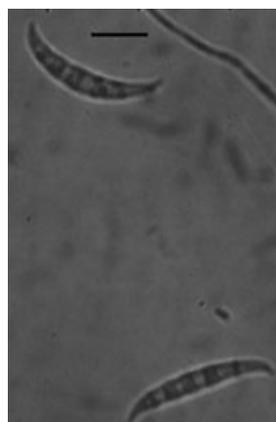


Fig. 1 *Fusarium cerealis* macroconidia. Scale bar 25 μm .

tral, commonly five septate (Fig. 1). Microconidia were not observed. Chlamydospores in aerial hyphae and in macroconidia were observed after 4 weeks in chains and clusters. The fungus was identified as *F. cerealis* (Cooke) Sacc. (synonym *F. crookwellense* Burgess, Nelson & Toussoun) on the basis of morphological characters.

Twenty days after inoculation, control spikelets were asymptomatic, and inoculated spikelets showed discoloration and/or a tan to dark brown necrosis (Fig. 2). Portions of the rachis were brown to dark brown. The fungus was re-isolated from symptomatic kernels and identified based on morphological traits, demonstrating the pathogenicity on barley spikes.

The *RED* (accession no. JX682529), *tri101* (accession no. JX682530) and *TEF* (accession no. JX682531) sequences showed 100% similarity with several *F. cerealis* sequences, confirming the morphological identification (Table 1).

Fusarium cerealis was first isolated from potato tubers in Australia in 1971 (Burgess et al. 1982) and is frequently found in temperate regions being reported in Australia, Canada, Japan, New Zealand, South Africa, the USA and different parts of Europe (Chandler et al. 2003; Lauren et al. 1992; Leslie and Summerell 2006; Schmale et al. 2011; Sugiura et al. 1993). López et al. (1997) isolated *F. cerealis* from maize, and Alvarez et al. (2011) recovered two isolates of this *Fusarium* species from wheat grains in Argentina. Moreover, Zhang et al. (2011) reported

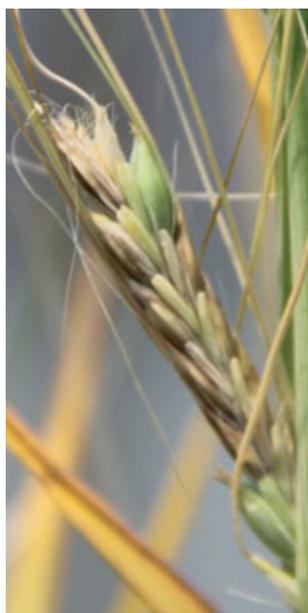


Fig. 2 *Fusarium cerealis* symptoms on barley.

Table 1 *Fusarium cerealis* sequences identity compared with published GenBank accessions

<i>F. cerealis</i> sequence	e-Value	Identity (%)	GenBank accession no.
<i>RED</i>	0.0	100	EF428900
JX682529	0.0	100	DQ382043
	0.0	100	AF212576
<i>tri101</i>	0.0	100	AF212612
JX682530	0.0	100	HQ149735
	0.0	100	JF911476
<i>TEF</i>	0.0	100	GQ915505
JX682531	0.0	100	FJ939661
	0.0	99	FJ939660

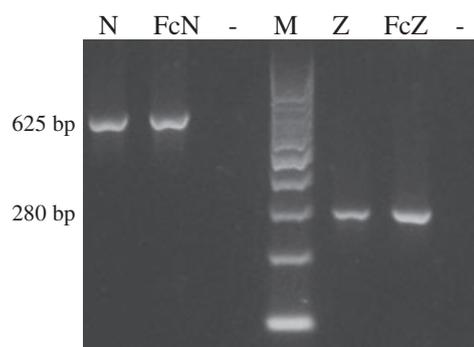


Fig. 3 Amplification of the NIV- and ZEA-specific fragments of *Fusarium cerealis*. (N) positive NIV control (*F. austroamericanum* NRRL 2903), (FcN) *F. cerealis* NIV reaction, (–) negative control, (M) molecular 100-bp marker, (Z) positive ZEA control (*F. graminearum sensu stricto* NRRL 31084), (FcZ) *F. cerealis* ZEA reaction, (–) negative control. NRRL isolates were kindly provided by the ARS Culture Collection.

the first occurrence of *F. cerealis* causing FHB on barley in China.

Fusarium cerealis is considered a minor component of the FHB species complex with the ability to produce NIV and ZEA *in vitro* (di Menna et al. 1991; Miller et al. 1991) and was suggested to be one of the *Fusarium* species responsible for NIV/ZEA contamination of wheat grains in Hokkaido, Japan (Sugiura et al. 1993). Our results based on PCR assays confirmed the potential of this species to produce NIV and ZEA based on the amplification of a 625- and 280-bp product (Fig. 3), respectively (Quarta et al. 2006; Meng et al. 2010).

To our knowledge, this is the first report of *F. cerealis* associated with barley kernels in Argentina. Considering the increasing importance of barley in Argentina and the potential of this fungus to cause head blight and mycotoxins, a large-scale survey of *F. cerealis* on barley crops in Argentina is underway.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Paul Nicholson for reading the manuscript and anonymous reviewers for critical comments and suggestions. This research was supported by FONCYT/PICT, CONICET and UNCPBA.

References

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410.
- Alvarez CL, Somma S, Proctor RH, Stea G, Mulé G, Logrieco AF, Fernandez Pinto V, Moretti A. (2011) Genetic diversity in *Fusarium graminearum* from a major wheat-producing region of Argentina. *Toxins* 3:1249–1309.
- Barreto D, Carmona M, Ferrazini M, Zanelli M, Perez BA. (2004) Occurrence and pathogenicity of *Fusarium poae* in barley in Argentina. *Cereal Res Commun* 32:53–60.
- Boddu J, Cho S, Kruger WM, Muehlbauer GJ. (2006) Transcriptome analysis of the barley-*Fusarium graminearum* interaction. *Mol Plant Microbe Interact* 19:407–417.
- Burgess LW, Nelson PE, Toussoun TA. (1982) Characterization, geographic distribution, and ecology of *Fusarium crookwellense* sp. nov. *Trans Brit Mycol Soc* 79:497–505.
- Castañares E, Wehrhahne L, Stenglein SA. (2012) *Fusarium pseudograminearum* associated with barley kernels in Argentina. *Plant Dis* 96:763.
- Chandler EA, Duncan RS, Thomsett MA, Nicholson P. (2003) Development of PCR assays to *Tri7* and *Tri13* and characterisation of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*. *Physiol Mol Plant Pathol* 62:355–367.
- Desjardins AE. (2006) *Fusarium* Mycotoxins: Chemistry, Genetics, and Biology. St Paul, MN, USA, APS Press.
- D’Mello JPF, Placinta CM, McDonald AMC. (1999) *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Anim Feed Sci Technol* 80:183–205.
- Gale LR. (2003) Population biology of *Fusarium* species causing head blight of grain crops. In: Leonard KJ, Bushnell WR (eds) *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*. St Paul, MN, USA, APS Press, pp 120–143.
- Lauren DR, Sayer ST, Menna ME. (1992) Trichothecene production by *Fusarium* species isolated from grain and pasture throughout New Zealand. *Mycopathologia* 120:167–176.
- Leslie JF, Summerell BA. (2006) *The Fusarium Laboratory Manual*. Oxford, UK, Blackwell Publishing.
- López TA, Escande A, Chayer R, Dosanto M, Gerpe O, Salomón ML. (1997) *Fusarium crookwellense* produced zearalenone in maize stubble in the field. *N Z Vet J* 45:251–253.
- Meng K, Wang Y, Yang P, Luo H, Bai Y, Shi P, Yuan T, Ma R, Yao B. (2010) Rapid detection and quantification of zearalenone-producing *Fusarium* species by targeting the zearalenone synthase gene *PKS4*. *Food Control* 21:207–211.
- di Menna ME, Lauren DR, Smith WA. (1991) Effect of incubation temperature on zearalenone production by strains of *Fusarium crookwellense*. *Mycopathologia* 116:81–86.
- Miller JD, Greenhalgh Y, Wang Y, Lu M. (1991) Trichothecene chemotypes of three *Fusarium* species. *Mycologia* 83:121–130.
- Quarta A, Mita G, Haidukowski M, Logrieco A, Mule G, Visconti A. (2006) Multiplex PCR for the identification of nivalenol, 3- and 15-acetyl-deoxynivalenol chemotypes in *Fusarium*. *FEMS Microbiol Lett* 259:7–13.
- Schmale DG, Wood-Jones AK, Cowger C, Bergstrom GC, Arellano C. (2011) Trichothecene genotypes of *Gibberella zeae* from winter wheat fields in the eastern USA. *Plant Pathol* 60:909–917.
- Stenglein SA, Balatti PA. (2006) Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Argentina as revealed by virulence and molecular markers. *Physiol Mol Plant Pathol* 68:158–167.
- Sugiura Y, Fukasaku K, Tanaka T, Matsui Y, Ueno Y. (1993) *Fusarium poae* and *Fusarium crookwellense*, fungi responsible for the natural occurrence of nivalenol in Hokkaido. *Appl Environ Microbiol* 59:3334–3338.
- Ward TJ, Clear RM, Rooney AP, O’Donnell K, Gaba D, Patrick S, Starkey DE, Gilbert J, Geiser DM, Nowicki TW. (2008) An adaptive evolutionary shift in *Fusarium* head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America. *Fungal Gen Biol* 45:473–484.
- Zhang H, Chen WQ, Xu J, Xu JS, Feng J. (2011) First report of *Fusarium cerealis* causing *Fusarium* head blight on barley in China. *Plant Dis* 95:774.



Journals Home APSnet IS-MPMInet My Profile Help Subscribe Search Advan



About the cover for May 2012

[Subscribe](#) [Free alert](#)

plant disease

ISSN: 0191-2917

SEARCH

- Phytopathology
 Plant Disease
 MPMI

search

[Advanced Search](#)

Inside the Journal

BACK ISSUES

(Issues before 1997)

[First Look](#)

[View Most Downloaded Articles](#)

[About Plant Disease](#)

[Editorial Board](#)

[Submit a Manuscript](#)

[Author Instructions](#)

[Policies/Procedures](#)

[Online e-Xtras](#)

= "Open" Access

Editor-in-Chief: R. Michael Davis
 Published by The American Phytopathological Society

[Home](#) > [Plant Disease](#) > [Table of Contents](#) > [Abstract](#)
[Previous Article](#) | [Next Article](#)

May 2012, Volume 96, Number 5
 Page 763
<http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-01-12-0050-PDN>

Disease Notes

***Fusarium pseudograminearum* Associated with Barley Kernels in Argentina**

E. Castañares, BIOLAB-CEBB, Facultad de Agronomía, UNCPBA, CC 47-CP 7300, Azul, CONICET, Buenos Aires, Argentina; **L. Wehrhahne**, Chacra Experimental Integrada Barrow, CC 50 (B7500WAA) Tres Arroyos, Buenos Aires, Argentina; **S. A. Stenglein**, BIOLAB-CEBB, Facultad de Agronomía-Cátedra Microbiología, UNCPBA, CC 47-CP 7300, Azul, CONICET, Buenos Aires, Argentina

Barley (*Hordeum vulgare* L.), one of the most widely grown winter cereal crops in Argentina, is primarily grown for use as malted barley for the beer industry. In December 2010, a survey of fungi was conducted in a barley (cv. Shakira) seed lot in a field located in Tres Arroyos, Buenos Aires, Argentina. A sample of 400 seeds was surface sterilized (70% EtOH for 2 min and 5% NaClO for 2 min), rinsed twice in sterilized distilled water, plated on potato dextrose agar (PDA), and incubated at $24 \pm 2^\circ\text{C}$ in a 12-h dark/light cycle. One isolate that was morphologically similar to *Fusarium graminearum* was observed after 6 days of incubation. The isolate was transferred onto PDA and carnation leaf agar (CLA) substrates and grown with the same conditions as described above. On PDA, the isolate produced abundant, white-to-yellow-to-red, aerial mycelium and formed red pigments in the medium. On CLA, macroconidia were abundant, relatively slender and almost straight to moderately curved, and commonly five to six septate. Microconidia were not observed. Chlamydozoospores were observed after 3 weeks. The fungus was initially identified as *F. graminearum* on the basis of morphology of the asexual stage (1). Pathogenicity was conducted using a hand sprayer to inoculate five barley (cv. Shakira) heads in potted plants with a 5-ml asexual spore suspension (1×10^4 conidia per ml). Two heads were sprayed with sterile distilled water as a control. Plants were covered with polyethylene bags and incubated for 3 days in a growth chamber under a 12-h day/dark cycle at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Plants were unbagged and moved into a greenhouse. Noninoculated spikelets were asymptomatic and inoculated spikelets showed discoloration or a tan-to-dark brown necrosis. The fungus was reisolated from symptomatic kernels. DNA of the isolate was extracted

Quick Link

[Add to fav](#)

[E-mail to .](#)

[Alert me v articles cit](#)

[Download manager](#)

[Related ar found in A](#)

(3) and the isolate was identified to species by sequencing the reductase (RED), trichothecene 3-O-acetyltransferase (tri101), and translation elongation factor (TEF) regions (4). The sequences were compared with those in GenBank. The RED sequence (Accession No. JQ350697) showed 100% similarity, the tri101 (Accession No. JQ350698) showed 99% similarity, and the TEF (Accession No. JQ350699) showed 100% similarity with several *F. pseudograminearum* sequences. Additionally, the isolate was tested for the potential to produce deoxynivalenol (DON) using a PCR approach that allows identification of two acetylated forms of DON: 15-acetyl-DON (15-ADON) and 3-ADON (2). A PCR product indicative of a 3-ADON genotype was obtained. To our knowledge, this is the first report of *F. pseudograminearum* associated with barley kernels in Argentina. Considering its potential to cause head blight and produce mycotoxins, a large-scale survey of *F. pseudograminearum* on barley crops in Argentina is underway. A voucher culture (No. 1154) has been deposited in the Culture Collection of the La Plata Spegazzini Institute.

References: (1) J. F. Leslie and B. A. Summerell. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing, Oxford, UK. 2006. (2) A. Quarta et al. Food Addit. Contam. 22:309, 2005. (3) S. A. Stenglein and P. A. Balatti. Physiol. Mol. Plant Pathol. 68:158, 2006. (4) T. J. Ward et al. Fungal Genet. Biol. 45:473, 2008.

[Journals Home](#) | [APSnet](#) | [IS-MPMInet](#) | [Contact Us](#) | [Privacy](#) | [Copyright The American Phytopathological Society](#)

Species composition and genetic structure of *Fusarium graminearum* species complex populations affecting the main barley growing regions of South America

E. Castañares^{ab}, M. I. Dinolfo^{ab}, E. M. Del Ponte^c, D. Pan^d and S. A. Stenglein^{abe*}

^aLaboratorio de Biología Funcional y Biotecnología (BIOLAB)-INBIOTEC-CICBA, Facultad de Agronomía de Azul, UNCPBA, Av. República de Italia # 780, 7300 Azul, Buenos Aires, Argentina; ^bConsejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina; ^cDepartamento de Fitopatología, Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário s/n, Viçosa, 36570-000 MG, Brazil; ^dLaboratorio de Micología, Facultad de Ciencias-Facultad de Ingeniería, UdelaR, Julio Herrera y Reissig 565, 11200 Montevideo, Uruguay; and ^eCátedra de Microbiología, Facultad de Agronomía de Azul, UNCPBA, Av. de Italia # 780, 7300 Azul, Buenos Aires, Argentina

Members of the *Fusarium graminearum* species complex (FGSC), such as *F. graminearum* and *F. asiaticum*, are the main cause of fusarium head blight (FHB) of wheat and barley worldwide. In this study, 117 FGSC isolates obtained from commercial barley grain produced in Argentina ($n = 43$ isolates), Brazil ($n = 35$), and Uruguay ($n = 39$) were identified to species and trichothecene genotypes, and analysed using amplified fragment length polymorphism (AFLP) and sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers. In addition, reductase (*RED*) and trichothecene 3-O-acetyltransferase (*Tri101*) were sequenced for a subset of 24 isolates. The majority of the isolates ($n = 103$) were identified as *F. graminearum*, which was the only species found in Argentina. In Uruguay, only one *F. cortaderiae* isolate was found among *F. graminearum* isolates. In Brazil, *F. graminearum* also dominated the collection (22/35), followed by *F. meridionale* (8/35), *F. asiaticum* (2/35), *F. cortaderiae* (2/35) and *F. austroamericanum* (1/35). Species were structured by trichothecene genotype: all *F. graminearum* were of the 15-acetyldeoxynivalenol (ADON), *F. meridionale*, *F. asiaticum* and *F. cortaderiae* were of the nivalenol (NIV), and *F. austroamericanum* was of the 3-ADON genotype. Both AFLP and SRAP data showed high levels of genetic variability, which was higher within than among countries. Isolates were not structured by country of origin. SRAP analysis grouped *F. graminearum* in a separate cluster from the other species within the complex. However, AFLP analysis failed to resolve the species into distinct clades with partial clustering of *F. meridionale*, *F. austroamericanum*, *F. asiaticum* and *F. graminearum* isolates.

Keywords: AFLP, FGSC, *Hordeum vulgare*, SRAP, trichothecene genotype

Introduction

Fusarium head blight (FHB) is amongst the most damaging fungal diseases of wheat and barley worldwide. *Fusarium graminearum* species complex (FGSC) comprises 16 phylogenetic species but FHB is caused mainly by *F. graminearum sensu stricto* (hereafter *F. graminearum*) or *F. asiaticum*, depending on the region (Aoki *et al.*, 2012). In barley, FHB significantly reduces grain yield and affects grain quality due to contamination with mycotoxins and association with quality defects (gushing) of beer (Minervini *et al.*, 2004; Desjardins, 2006). Among the various mycotoxins produced by FGSC members, special attention has been given to deoxynivalenol (DON), a type B trichothecene, for which maximum tolerated limits have been established in several countries, including Brazil and Uruguay. Species of this complex also produce zearalenone (ZEA), a non-steroidal oestro-

genic mycotoxin associated with numerous mycotoxicoses in swine (Desjardins, 2006).

Fusarium graminearum is the dominant FGSC member causing FHB of wheat in the Americas. However, surveys on wheat and barley crops grown in South America identified five other species affecting these crops: *F. asiaticum*, *F. austroamericanum*, *F. brasilicum*, *F. cortaderiae* and *F. meridionale*. While in Argentina FHB in wheat seems to be caused exclusively by *F. graminearum* (Alvarez *et al.*, 2009; Reynoso *et al.*, 2011), other species of the complex occur in Brazil and Uruguay in a relatively small proportion (Scoz *et al.*, 2009; Astolfi *et al.*, 2011, 2012; Pan *et al.*, 2013; Umpiérrez-Failache *et al.*, 2013; Del Ponte *et al.*, 2015).

FGSC isolates are known to possess three specific profiles of trichothecene production (chemotypes) including: nivalenol (NIV) and its acetyl derivatives, DON and primarily 3-acetyldeoxynivalenol (ADON), and DON and primarily 15-ADON (Desjardins, 2008). PCR-based assays targeting portions of genes predictive of trichothecene synthesis have been used to determine the

*E-mail: stenglein@faa.unicen.edu.ar

trichothecene genotype as predictive of the chemotype (Desjardins, 2008). While a few FGSC members appear to comprise only one trichothecene genotype (e.g. *F. meridionale*) others may possess two or three different genotypes, depending on the geographic origin (e.g. *F. graminearum* and *F. asiaticum*) (Aoki *et al.*, 2012).

An earlier review on the population structure of FGSC showed that: (i) a larger amount of variation (haplotype diversity ranging from 60 to 100%) is present within population than among the populations, (ii) population subdivision within a population is negligible, and (iii) gene flow is high (Miedaner *et al.*, 2008). In more recent studies conducted in South America, these results were confirmed with *F. graminearum* populations from Brazilian wheat (Astolfi *et al.*, 2012) and maize (Sampietro *et al.*, 2011). As reviewed recently, the several studies conducted thus far have employed a large set of different molecular markers, including random amplified polymorphic DNA (RAPD), restriction fragment length polymorphism (RFLP), amplified fragment length polymorphism (AFLP), sequence-related amplified polymorphism (SRAP), variable number of tandem repeats (VNTR) and single nucleotide polymorphism (SNP) (Wang *et al.*, 2011). The marker choice seems to be a matter of availability, knowledge or preference by the researcher. AFLP is the most commonly used marker in genetic diversity and population structure studies in FGSC (Akinsanmi *et al.*, 2006; Ramirez *et al.*, 2007; Qu *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009; Alvarez *et al.*, 2011; Astolfi *et al.*, 2012). Although there are some advantages such as that multiple bands can be derived from across the entire genome, AFLP is relatively costly and time-consuming compared to other marker systems, and is not highly reproducible (Wang *et al.*, 2011). Although less used to study variability for *F. graminearum* (Fernando *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2008) and *F. poae* (Dinolfo *et al.*, 2015), SRAP is a simple, reliable and cost-effective PCR-based assay. SRAP was developed to target open reading frames (ORFs) that encode proteins of interest and, as AFLP, requires no knowledge of nucleotide sequence (Li & Quiros, 2001). Studies comparing results of these different markers for the analysis of the FGSC populations have not been reported to date.

Studies on the species diversity of FGSC affecting barley in the main producing regions of South America, such as Argentina, Brazil and Uruguay, are scarce. In Brazil, 92 isolates associated with infected barley grain were identified to trichothecene genotypes using PCR assays, but only nine isolates representative of distinct trichothecene genotypes were identified to species by sequencing informative genes (Astolfi *et al.*, 2011). In Argentina, *F. graminearum* isolates were also identified to trichothecene genotypes and assessed for their *in vitro* mycotoxin production (Castañares *et al.*, 2014). Thus far, the genetic structure of FGSC populations in South America has been assessed only for isolates from wheat using AFLP (Ramirez *et al.*, 2007; Astolfi *et al.*, 2012) and from maize using VNTR markers (Sampietro *et al.*, 2011). Based on previous knowledge of the populations

from wheat, it can be hypothesized that populations from barley in South America are structured by species, which can be revealed in a consistent manner by two molecular marker systems. The aim of this study was to test this hypothesis using a collection of over 100 isolates obtained from barley grains produced in the main barley growing regions of South America. In addition, the isolates were assessed for their potential to produce trichothecenes and ZEA using a range of PCR assays. Finally, a sample of isolates representative of different trichothecene genotypes were sequenced for reductase (*RED*) and trichothecene 3-O-acetyltransferase (*Tri101*) genes to confirm and compare their species assignment by the molecular marker data of reference isolates.

Materials and methods

Study region, isolation and PCR-based clade identification

A collection of 117 monosporic FGSC isolates was obtained from barley fields located in the main barley growing areas of Argentina (A, *n* = 43 isolates), Brazil (B, *n* = 35) and Uruguay (U, *n* = 39). The Argentinian isolates were obtained from six locations during two seasons (2010 and 2011); the Brazilian isolates were obtained from 19 locations during three seasons (2007, 2008 and 2009); and the Uruguayan isolates were obtained from one location during 2011 (Table S1). Argentinian and Brazilian isolates have been identified previously to the complex level (FGSC) and had their trichothecene genotype determined based on *Tri3*, *Tri7* and *Tri12* gene portions (Astolfi *et al.*, 2011; Castañares *et al.*, 2014). In addition, six previously identified *F. graminearum* isolates from wheat in Argentina were included in this study for comparison.

All isolates were stored on synthetic nutrient-poor agar (SNA) (Leslie & Summerell, 2006) and further grown on potato dextrose agar (PDA) media for mycelial production. Genomic DNA of 7-day-old cultures was extracted with a CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) method as described elsewhere (Stenglein & Balatti, 2006). All isolates were identified using the clade-specific (*F. graminearum sensu lato*) Fg16N and polymorphic Fg16 primer set (Table 1; Nicholson *et al.*, 1998; Waalwijk *et al.*, 2003; Castañares *et al.*, 2014). Reference isolates for six species of the complex (*F. graminearum*, *F. meridionale*, *F. asiaticum*, *F. austroamericanum* and *F. cortaderiae*) were included as positive controls (Table S1). One *F. pseudograminearum* and one *F. cerealis* isolate from Argentinian barley were used as PCR negative controls.

Potential for DON, NIV and ZEA production

The potential to produce the main type B trichothecenes was determined for all isolates based on two PCR assays. First, NIV and DON genotypes were differentiated based on a PCR assay targeting portions of *Tri13* genes (primers Tri13NIVF, Tri13-NIVR, Tri13DONF, Tri13DONR; Table 1; Chandler *et al.*, 2003). Secondly, the genotypes NIV, DON and the two DON acetylates, 3-ADON and 15-ADON, were differentiated based on a multiplex PCR assay targeting portions of the *Tri7* and *Tri3* genes (primers Tri7F340, Tri7R965, 3551H, 4056H, Tri3F971, Tri3R1679, Tri3F325, Tri3R1679; Table 1; Quarta *et al.*, 2006). One NIV *F. meridionale* isolate (NRRL 28436),

Table 1 Primer sequences used in the present study

Primer name	Primer sequence (5'–3')	Reference
Fg16NF	ACAGATGACAAGATTCAGGCACA	Nicholson
Fg16NR	TTCTTTGACATCTGTTCAACCCA	<i>et al.</i> (1998)
Fg16F	CTCCGGATATGTTGCGTCAA	
Fg16R	GGTAGGTATCCGACATGGCAA	
Tri13NIVF	CCAAATCCGAAAACCGCAG	Chandler
Tri13NIVR	TTGAAAGCTCCAATGTCGTG	<i>et al.</i> (2003)
Tri13DONF	CATCATGAGACTTGTCKRAGTTGGG	
Tri13DONR	GCTAGATCGATTGTTGCATTGAG	
Tri7F340	ATCGTGTACAAGGTTTACG	Quarta
Tri7R965	TTCAAGTAACGTTCCGACAAT	<i>et al.</i> (2006)
3551H	ACTTTCCACCGAGTATTTT	
4056H	CAAAAACGTGTTTCCACTGCC	
Tri3F971	CATCATACTCGTCTGCTG	
Tri3R1679	TTRTAGTTTGCATCATTRTAG	
Tri3F325	GCATTGGCTAACACATGA	
Tri3R1679	TTRTAGTTTGCATCATTRTAG	
PKS4F	CGTCTTCGAGAAGATGACAT	Meng <i>et al.</i>
PKS4R	TGTTCTGCAAGCACTCCG A	(2010)
REDF	AGACTCATTCCAGCCAAG	O'Donnell
REDR	TCGTGTTGAAGAGTTTGG	<i>et al.</i> (2000)
Tri101F	CAAGATACAGCTCGACACC	
Tri101R	CTGGGTAGTGTTCGAGA	
ME1	TGAGTCCAAACCGGATA	This study
ME6	TGAGTCCAAACCGGTC A	
EM17	GACTGCGTACGAATTCCA	
ME5	TGAGTCCAAACCGGAAG	
EM13	GACTGCGTACGAATTGGT	

one 3-ADON *F. austroamericanum* isolate (NRRL 2903) and one 15-ADON *F. graminearum* isolate (B26.1) were used as positive controls (Table S1). In addition, the potential of the isolates to produce ZEA was determined using the PKS4 primer set (PKS4F, PKS4R; Table 1) according to Meng *et al.* (2010). DNA of a ZEA-producer *F. cerealis* isolate and a ZEA-non-producer *F. poae* isolate were used as controls.

Sequence-based identification

Twenty-four isolates, selected from the overall collection based on their trichothecene genotype, were assigned to species based on their sequences of the *RED* and *Tri101* genes using primers REDF, REDR, Tri101F and Tri101R (Table 1; O'Donnell *et al.*, 2000). Among them, there were 12 NIV ($B = 11$ and $U = 1$), one 3-ADON ($B = 1$) and 11 15-ADON isolates selected at random ($A = 6$, $B = 2$, $U = 3$). PCR products were purified using the Purelink Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo kit (Invitrogen) and sequenced in a BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems) in a 3130 Hitachi Genetic Analyzer Sequencer (ABI). The sequences were compared and deposited in the GenBank database (accession numbers KR456289–KR456336; Table S2).

AFLP and SRAP analyses

Genomic DNA was completely digested with two restriction enzymes, *EcoRI* and *MseI*, and ligated to AFLP adapters at 16°C overnight. After a preselective amplification, the selective

amplification was carried out with two combinations of primers: *EcoRI* + *TG/MseI* + TT and *EcoRI* + *AC/MseI* + CA. The AFLP-PCR was performed according to Leslie & Summerell (2006). Amplified fragments were separated by vertical electrophoresis in polyacrylamide gels and then revealed by silver staining according to Bassam *et al.* (1991). AFLP fragments ranging from 150 to 450 bp were analysed.

Five of nine combinations of SRAP primers (Wang *et al.*, 2010) were selected based on efficiency to produce polymorphic fragments: ME1, ME5, ME6, EM13 and EM17 (Table 1). PCR conditions were as described elsewhere (Li & Quiros, 2001). Amplified fragments were separated and revealed as described for AFLP markers and all generated fragments were analysed. Some fragments were randomly selected to evaluate the primers' capacity to amplify ORFs and determine whether these fragments encoded part of any *Fusarium* protein. For this, two polymorphic and three monomorphic fragments were cut from a polyacrylamide gel and each transferred to a 1.5 µL Eppendorf. Then, 50 µL distilled water was added and the tubes were placed in a dry heat block at 95°C for 5 min. Finally, a new PCR-SRAP was performed using 5 µL of this final solution as DNA template. PCR fragments were purified and sequenced as described earlier. The sequences were compared with the FUSARIUM ID (Geiser *et al.*, 2004) database and were deposited in GenBank (Table 2).

All AFLP and SRAP reactions were repeated independently at least twice.

Analysis of genetic marker data

Amplified fragments of each of the markers were scored manually in a binary matrix (1 = presence, 0 = absence of fragment). All fragments were scored, including those that were monomorphic. Fragments migrating at the same position were assumed to be homologous. Unresolved data and missing data were treated as missing data. The genetic distance between individuals was estimated based on the simple matching similarity coefficient. Dendrograms were constructed using the UPGMA algorithm in statistical software NTSYSpc v. 2.0 (Rohlf, 1998). An analysis of molecular variance (AMOVA) was conducted to examine hierarchical population structure using distances among haplotypes. The distance chosen was a Euclidean metric equivalent to the number of differences between two individuals in their multilocus profile. Genotypic 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 populations of each country and considering all FGSC isolates or only *F. graminearum* isolates, with the assumption that the populations are in Hardy–Weinberg equilibrium. These analyses were performed in ARLEQUIN 2000 (Schneider *et al.*, 2000). The Mantel test (MXCOMP program of the NTSYSpc v. 2.0) was used to calculate the similarity between the matrices generated by both markers.

Results

PCR-based identification

All isolates amplified a single fragment of *c.* 280 bp with Fg16N, thus confirming that they belong to *F. graminearum sensu lato*. The differences in fragments sizes (from *c.* 380 to 580 bp) using the Fg16 primer set among the isolates suggest they belong to different spe-

Table 2 SRAP sequences and BLAST results

Selected fragment code	Primer combination	Type of fragment	GenBank accession number	BLASTX score (bits)	FUSARIUM ID
HM	SRAPME1/ EM13	Monomorphic	AR154224	49-2914	<i>F. oxysporum</i> PHW808: FOPG_02257.1: hypothetical protein
				49-2914	<i>F. oxysporum melonis</i> : FOMG_05224.1: hypothetical protein
				49-2914	<i>F. verticillioides</i> 7600 (FV3): FVEG_08236.5: hypothetical protein
IM	SRAPME1/ EM17	Monomorphic	AR154225	55-4546	<i>F. graminearum</i> PH-1 (FG3): FGSG_02271.3: hypothetical protein
				55-0694	<i>F. oxysporum</i> PHW808: FOPG_13898.1: primary-amine oxidase
				55-0694	<i>F. oxysporum melonis</i> : FOMG_03336.1: primary-amine oxidase
I5M	SRAPME1/ EM17	Monomorphic	AR154226	58-151	<i>F. graminearum</i> PH-1 (FG3): FGSG_02271.3: hypothetical protein
				58-151	<i>F. oxysporum</i> PHW808: FOPG_13898.1: primary-amine oxidase
				58-151	<i>F. oxysporum melonis</i> : FOMG_03336.1: primary-amine oxidase
JP	SRAPME6/ EM13	Polymorphic	AR154227	29-261	<i>F. verticillioides</i> 7600 (FV3): FVEG_10221.5: hypothetical protein
				28-4906	<i>F. oxysporum</i> I15: FOIG_07990.1: hypothetical protein
				27-7202	<i>F. graminearum</i> PH-1 (FG3): FGSG_07469.3: myosin-2B
2F	SRAPME6/ EM17	Polymorphic	AR154228	26-5646	<i>F. oxysporum</i> PHW808: FOPG_00483.1: hypothetical protein
				26-5646	<i>F. graminearum</i> PH-1 (FG3): FGSG_03906.3: hypothetical protein
				25-409	<i>F. graminearum</i> PH-1 (FG3): FGSG_09278.3: hypothetical protein

cies within FGSC. The two controls, *F. pseudograminearum* and *F. cerealis* showed no amplification.

Toxicogenic potential

Using the singleplex PCR assay targeting *Tri13* gene portions, 13 isolates amplified a fragment of 312 bp with Tri13NIV primers, and did not amplify with the Tri13DON primers. The remaining 104 isolates amplified a fragment of 282 bp with primers Tri13DON and did not amplify with the Tri13NIV primer set. All controls amplified the expected fragments for the DON and NIV genotypes. Using the multiplex PCR assay targeting *Tri7* and *Tri3*, the same 13 isolates amplified a fragment of 625 bp, predictive of the NIV genotype, and the remaining isolates amplified a fragment of 525 bp, predictive of the DON genotype. For the DON genotypes, only one isolate amplified the 354 bp predictive of the 3-ADON genotype and the remainder amplified the fragment of 708 bp predictive of the 15-ADON genotype (Table S1). All surveyed isolates and the positive control amplified the fragment of 280 bp predictive of their potential to produce ZEA, while no amplification was observed for the *F. poae* isolate used as negative control.

RED and *Tri101*-based identification

The subsample of 24 sequenced isolates showed the highest percentage of similarity with five members of the FGSC from the GenBank database. Among them, all ($n = 11$) 15-ADON genotypes were assigned to *F. graminearum* (A = 6, B = 2, U = 3) and the only 3-ADON genotype (B = 1) was assigned to *F. austroamericanum*. Among the 12 NIV isolates, three species were identified: three *F. cortaderiae* (B = 2, U = 1), seven *F. meridionale* (B = 7) and two *F. asiaticum* (B = 2) (Tables S1 & S2).

AFLP and SRAP clustering

The out-groups *F. pseudograminearum* and *F. cerealis* were separated from FGSC isolates by AFLP markers (Fig. 1). Four main clusters were formed. Six *F. meridionale* isolates grouped with the reference *F. meridionale* isolate (cluster I), two *F. asiaticum* clustered together but not with the reference *F. asiaticum* isolate (cluster II), two *F. cortaderiae* clustered with the reference isolate (cluster III), and one isolate plus the reference formed the *F. austroamericanum* cluster (cluster IV). The remaining two *F. meridionale* and *F. cortaderiae* isolates, which were identified through sequencing, were distributed along the last portion of the dendrogram. The *F. graminearum* isolates were not clearly clustered (Fig. 1).

Using SRAP markers, the out-groups were not totally separated from FGSC isolates (Fig. 2). Two reference isolates (*F. cortaderiae* and *F. asiaticum*) were grouped together (cluster I). Only clusters II and IV comprised isolates from a single species, grouping two *F. asiaticum* and all *F. graminearum* isolates, respectively. In cluster III, there were three *F. cortaderiae*, eight *F. meridionale* and one *F. austroamericanum*, all identified by sequencing (Fig. 2).

The FGSC isolates were not structured by country of origin (Figs 1 & 2).

Genotypic diversity

The number of polymorphic loci was always higher for isolates from Brazil and Uruguay than those from Argentina for both molecular markers.

The estimated genotypic diversity based on AFLP markers was lower in Argentina (Nei's $H = 0.88$) and higher in Uruguay and Brazil (Nei's $H > 0.98$) whether considering all isolates or only *F. graminearum* isolates. The percentage of haplotypes was >90% in Brazil and Uruguay and around 40% in Argentina (Table 3).

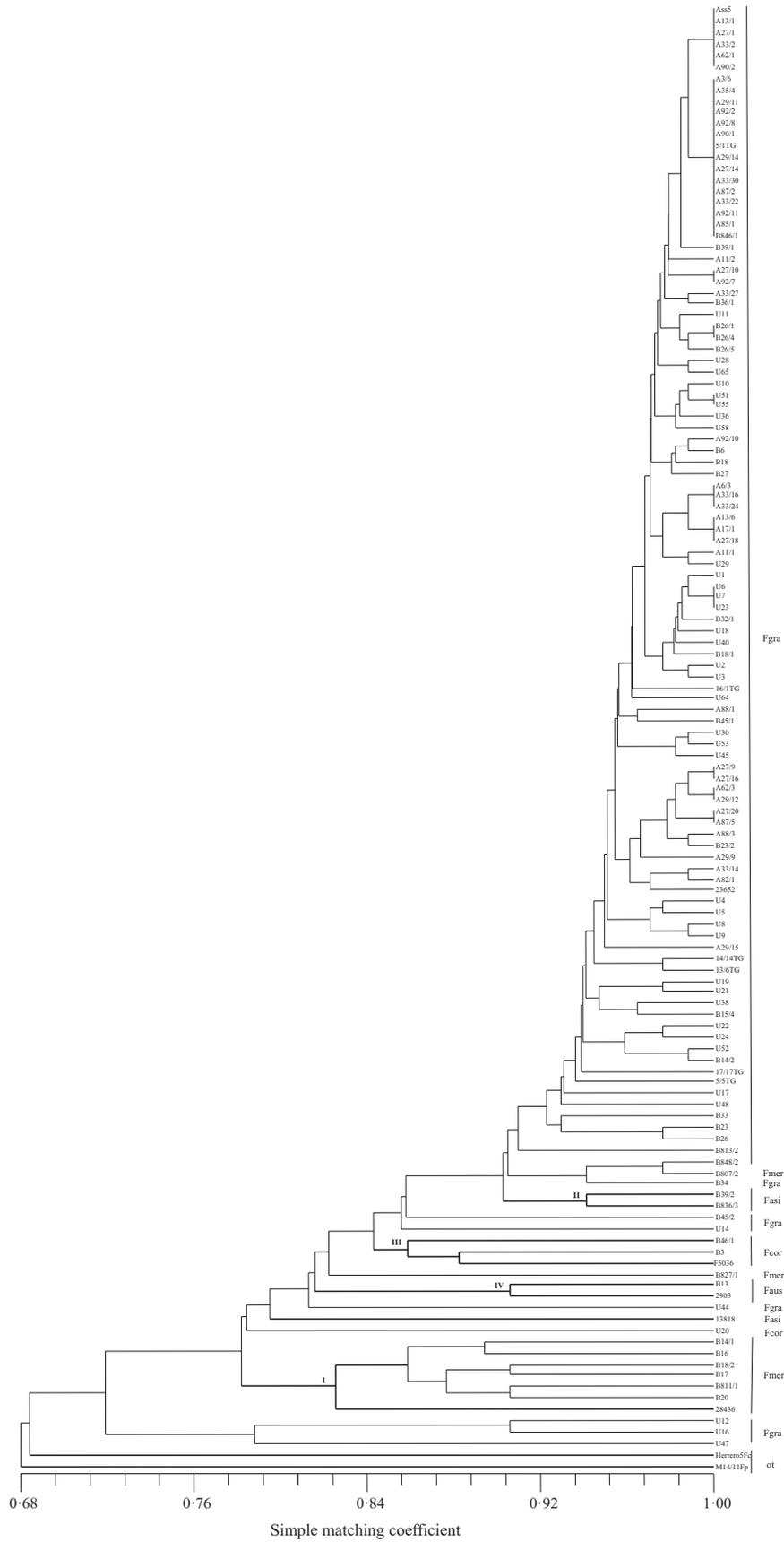


Figure 1 Dendrogram obtained from AFLP marker data, showing clustering of *Fusarium graminearum* species complex (FGSC) isolates from barley grown in Argentina (A), Brazil (B) and Uruguay (U). The genetic distance between individuals was estimated based on the simple matching similarity coefficient. Fgra, *F. graminearum*; Fcor, *F. cortaderiae*; Faus, *F. austroamericanum*; Fmer, *F. meridionale*; Fasi, *F. asiaticum*; ot, out-group.

Conversely, the SRAP markers indicated that the genotypic diversity in Argentina, Uruguay and Brazil was similar (Nei's $H \geq 0.99$). The percentage of haplotypes was $\geq 97\%$ for all countries (Table 3).

The AMOVA results for both types of marker showed higher variability for populations within countries than among countries, whether using all isolates or only *F. graminearum* isolates. For AFLP, the estimated variability ranged from 7.9 to 10.3% for populations among countries and from 89.6 to 92.1% for populations within countries. For SRAP the estimated variability ranged from 7.4 to 12.6% for populations among countries and 87.3 to 92.5% for populations within countries.

Mantel test and SRAP sequences

The correlation coefficient obtained by the Mantel correspondence test to compare similarity matrices for different marker types showed a moderate correspondence ($r = 0.75$), suggesting that the analysis should be made separately. All sequenced SRAP fragments were homologous with hypothetical proteins of *F. graminearum* or other *Fusarium* species, confirming the efficacy of this marker to amplify ORFs (Table 2).

Discussion

In this study, knowledge of the species composition of the FGSC pathogens infecting barley grains in the southern cone of South America has been expanded.

The results confirm the hypothesis from previous work, based on Fg16 amplifications, that *F. graminearum* is the only FGSC member causing FHB in barley in Argentina (Castañares et al., 2014). In addition, this is the first detailed information on the FGSC members associated with barley in Uruguay, which showed that all but one (*F. cortaderiae*) isolate belonged to *F. graminearum*. This result contrasts with the higher diversity of FGSC members found in Uruguayan wheat, based on a multilocus genotyping (MLGT) assay (Umpiérrez-Failache et al., 2013). In the Brazilian collection, two additional species, *F. cortaderiae* and *F. asiaticum*, are reported; in a previous study based on the polymorphism in Fg16 amplification, these same isolates could not be differentiated from *F. meridionale* (Astolfi et al., 2011). These two species have been recently reported on wheat in southern Brazil during a large molecular survey based on a MLGT assay where *F. cortaderiae* was found to be much more prevalent than *F. asiaticum* (Del Ponte et al., 2015).

The reasons for the higher diversity of FGSC found in Brazil compared, for example, to Argentina, where FHB is caused mainly by *F. graminearum*, is not well

known. It is hypothesized that the subtropical environment may favour epidemics almost every year and the high number of hosts, including summer crops, may allow the survival of multiple species throughout the year. In the higher latitudes of Argentina and southern Uruguay, where the climate is mostly temperate, FHB epidemics are caused mainly by *F. graminearum*. For example, all isolates from wheat samples from Buenos Aires province, Argentina, were identified as *F. graminearum* (Ramirez et al., 2007; Alvarez et al., 2011). However, in the northern and central regions of Uruguay, where the climate is more similar to southern Brazil, other FGSC species have been described for wheat, including *F. asiaticum* in regions where rice is the dominant crop (Umpiérrez-Failache et al., 2013). In fact, the widespread occurrence and dominance of NIV-producing *F. asiaticum* was also reported in a sampling of FGSC isolates from Brazilian rice, where *F. asiaticum* inoculum that could also infect wheat may survive and build up (Gomes et al., 2015).

In the present study, none of the barley isolates segregated for trichothecene genotypes. *Fusarium graminearum* isolates were solely of the 15-ADON genotype, *F. austroamericanum* of the 3-ADON and *F. asiaticum*, *F. cortaderiae*, *F. meridionale* of the NIV genotype. Thus far, evidence indicates that FGSC members in South America are structured by trichothecene genotype and that higher diversity is found in Brazil (due to prevalence of multiple species) than in Uruguay and Argentina, where *F. graminearum* dominates. The dominance of 15-ADON isolates has been reported in previous studies with populations from wheat in Argentina and Uruguay. For example, Reynoso et al. (2011) found that most *F. graminearum* isolates in Argentina were of the 15-ADON genotype, although some amplified for both DON/NIV genotypes. Two NIV isolates were also detected by Pan et al. (2013) in Uruguay, but these isolates were identified as *F. graminearum* by AFLP analysis. Isolates with the 3-ADON genotype have also been identified in a small proportion of FGSC isolates from wheat produced in Argentina (Alvarez et al., 2009) and Uruguay (Umpiérrez-Failache et al., 2013).

In the present study, *F. asiaticum*, *F. cortaderiae* and *F. meridionale* showed potential to produce NIV and *F. austroamericanum* to produce 3-ADON, agreeing with previous studies of wheat and barley in the region (Astolfi et al., 2011, 2012; Umpiérrez-Failache et al., 2013; Del Ponte et al., 2015). The current investigation also showed, for the first time in the region, that all isolates, irrespectively of the FGSC assignment, had the genetic potential to produce ZEA, which agrees with previous results of chemical analysis conducted with FGSC isolates (O'Donnell et al., 2000).

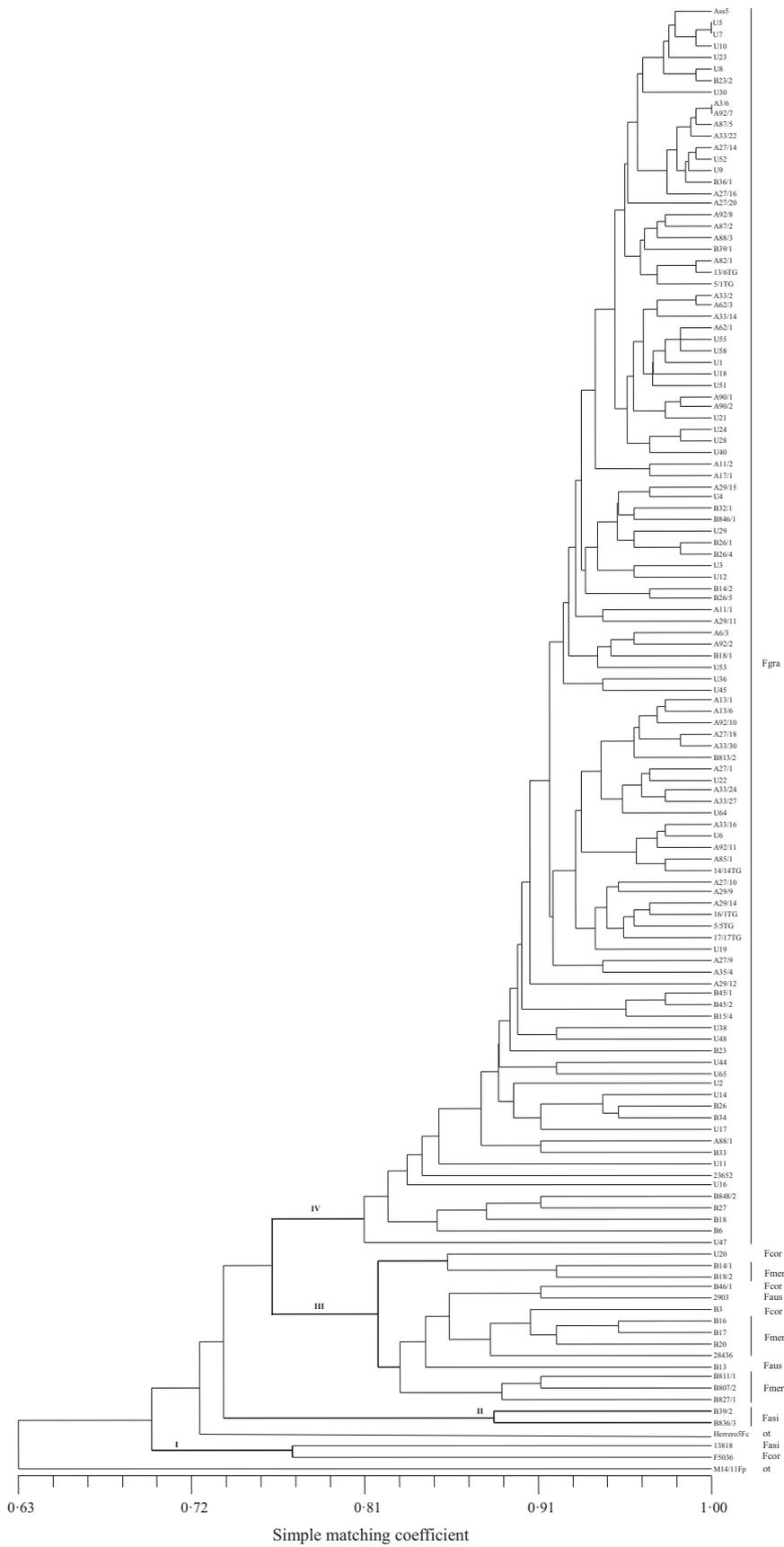


Figure 2 Dendrogram obtained from SRAP marker data, showing clustering of *Fusarium graminearum* species complex (FGSC) isolates from barley grown in Argentina (A), Brazil (B) and Uruguay (U). The genetic distance between individuals was estimated based on the simple matching similarity coefficient. Fgra, *F. graminearum*; Foor, *F. cortaderiae*; Faus, *F. austroamericanum*; Fmer, *F. meridionale*; Fasi, *F. asiaticum*; ot, out-group.

Table 3 Comparison of estimates of genotypic diversity based on AFLP and SRAP loci for three populations comprising isolates of all five species within *Fusarium graminearum* species complex or only for *F. graminearum* isolates (within parentheses) obtained from barley grains produced in Argentina, Brazil and Uruguay

Population	No. isolates	AFLP			SRAP		
		No. polymorphic loci	% haplotypes	Nei's <i>H</i>	No. polymorphic loci	% haplotypes	Nei's <i>H</i>
Argentina	43 (43)	14 (14)	41.8 (41.8)	0.88 (0.88)	30 (30)	97.7 (97.7)	0.99 (0.99)
Brazil	35 (22)	52 (31)	97.1 (95.4)	0.99 (0.99)	82 (58)	100 (100)	1 (1)
Uruguay	39 (38)	55 (50)	92.3 (92.1)	0.99 (0.99)	72 (60)	97.4 (97.4)	0.99 (0.99)
Overall	117 (103)	69 (56)	74.3 (70.8)	0.98 (0.97)	94 (77)	98.3 (98.0)	0.99 (0.99)

In most AFLP studies on FGSC, isolates have been successfully clustered with reference isolates for the different species (Qu *et al.*, 2008; Alvarez *et al.*, 2011; Astolfi *et al.*, 2012). However, in one study, isolates representative of different FGSC species grouped in the same AFLP cluster, which discouraged the use of this marker for species identification (Akinsanmi *et al.*, 2006). In the present study, the species to which sequenced isolates were assigned was the same regardless of which of the two informative genes were used (O'Donnell *et al.*, 2000). The results were partially, but not totally, congruent with AFLP and SRAP clustering, as some species of the complex were not grouped together with their representative reference isolate. For instance, SRAP markers were able to cluster all *F. graminearum* isolates together.

The lack of clustering by geographic region suggests a possible genetic exchange among these regions, with the isolate being part of a metapopulation in which the fungus is capable of dispersing over long distances (Schmale *et al.*, 2006). Transport of infected seed may contribute to dispersal of toxigenic genotypes.

Analysis of the genetic diversity using SRAP markers showed a higher number of haplotypes (115) than using AFLP (87). Among the countries, the Argentinian populations had a lower number of unique haplotypes than Brazil or Uruguay using AFLP, but a similar haplotype number was found between them using SRAP. In contrast, a higher proportion of haplotypes in relation to total isolates was reported in previous studies using AFLP in Argentina and Brazil: 96/103 (Astolfi *et al.*, 2012), 104/113 (Ramirez *et al.* (2007) and 183/183 (Alvarez *et al.*, 2011). The high number of haplotypes suggests that sexual recombination is prevalent within *Fusarium* populations, explaining the high level of genetic diversity found in the present study with both molecular markers. The difference between results from the present and previous studies for AFLP analysis may be related to the different number and/or type of primers used in each study or to a lower genetic polymorphism for *F. graminearum* isolates obtained from barley grains.

Differences in dendrograms and AMOVA analyses between AFLP and SRAP markers may be related to the

number of primer combinations used in each technique. In addition, each technique has different aims; while SRAP is targeted to amplify ORFs, AFLP is based on the amplification of restriction fragments. The number of amplicons per AFLP assay is a function of the number of selective nucleotides in the AFLP primer combination, the selective nucleotide motif, GC content, and physical genome size and complexity (Agarwal *et al.*, 2008). Moreover, the differences among techniques may also explain the moderate, rather than high, correlation among matrices obtained with Mantel test, although both methods showed a high level of genetic diversity, as previously reported for *F. graminearum* (Akinsanmi *et al.*, 2006; Ramirez *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2008; Astolfi *et al.*, 2012).

Compared to the expensive and time-consuming AFLP technique, SRAP combines simplicity, reliability, moderate throughput ratio, sequencing of selected fragments and the possibility of targeting ORFs. The SRAP technique has been used to evaluate genetic variability in *F. graminearum* in previous studies (Fernando *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2008), although the fragments were not sequenced to identify ORFs. Dinolfo *et al.* (2015) used SRAP markers to study genetic variability of *F. poae* and, as in the present investigation, sequenced many fragments of interest generated by this marker, corroborating the efficacy of this technique to amplify ORFs.

In summary, the results of this investigation suggest that FHB management in barley, including regulatory measures, should consider regional variations in the species and the toxigenic ability of the populations, especially their potential to produce NIV, which is much more toxic than DON (Minervini *et al.*, 2004). The ability of the pathogen to disperse long distance by wind (Schmale *et al.*, 2006) and seeds may contribute to dissemination of toxigenic genotypes across the continent, especially considering future variations or changes that may lead to a warmer climate. This, therefore, poses a challenge to researchers and growers to reduce the impact of *Fusarium* on the food and beer industry.

Acknowledgements

The authors thank Dr Paul Nicholson for critically reading the manuscript and W. G. Pacheco for technical assistance. This research was supported by FONCYT/PICT 030/11, CONICET PIP 0551 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**, 617–31.
- Akinsanmi OA, Backhouse D, Simpfendorfer S, Chakraborty S, 2006. Genetic diversity of Australian *Fusarium graminearum* and *F. pseudograminearum*. *Plant Pathology* **55**, 494–504.
- Alvarez CL, Azcarate MP, Fernández Pinto V, 2009. Toxicogenic potential of *Fusarium graminearum sensu stricto* isolates from wheat in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* **135**, 131–5.
- Alvarez CL, Somma S, Proctor RH *et al.*, 2011. Genetic diversity in *Fusarium graminearum* from a major wheat-producing region of Argentina. *Toxins* **3**, 1294–309.
- Aoki T, Ward TJ, Kistler HC, O'Donnell K, 2012. Systematics, phylogeny and trichothecene mycotoxin potential of *Fusarium* head blight cereal pathogens. *Mycotoxins* **62**, 91–102.
- Astolfi P, dos Santos J, Schneider L *et al.*, 2011. Molecular survey of trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* species complex from barley in southern Brazil. *International Journal of Food Microbiology* **148**, 197–201.
- Astolfi P, Reynoso MM, Ramirez ML *et al.*, 2012. Genetic population structure and trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat in southern Brazil. *Plant Pathology* **61**, 289–95.
- Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM, 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **196**, 80–3.
- Castañares E, Ramirez Albuquerque D, Dinolfo MI, Fernandez Pinto V, Patriarca A, Stenglein SA, 2014. Trichothecene genotypes and production profiles of *Fusarium graminearum* isolates obtained from barley cultivated in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* **179**, 57–63.
- Chandler E, Simpson D, Thomsett M, 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*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **62**, 355–67.
- Del Ponte EM, Spolti P, Ward TJ *et al.*, 2015. Regional and field-specific factors affect the composition of *Fusarium* head blight pathogens in subtropical no-till wheat agroecosystem of Brazil. *Phytopathology* **105**, 246–54.
- Desjardins AE, 2006. *Fusarium Mycotoxins: Chemistry, Genetics and Biology*. St Paul, MN, USA: APS Press.
- Desjardins AE, 2008. Natural product chemistry meets genetics: when is a genotype a chemotype? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 7587–92.
- Dinolfo MI, Castañares E, Stenglein SA, 2015. SRAP as an informative molecular marker to study the *Fusarium poae* genetic variability. *Journal of Phytopathology* **163**, 657–63.
- Fernando WGD, Zhang JX, Dusabenyagasani M, Guo XW, Ahmed H, McCallum B, 2006. Genetic diversity of *Gibberella zeae* isolates from Manitoba. *Plant Disease* **90**, 1337–42.
- Geiser DM, del Mar Jimenez-Casco M, Kang S *et al.*, 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* **110**, 473–80.
- Gomes LB, Ward TJ, Badiale-Furlong E, Del Ponte EM, 2015. Species composition, toxigenic potential and pathogenicity of *Fusarium graminearum* species complex isolates from southern Brazilian rice. *Plant Pathology* **64**, 980–7.
- Guo XW, Fernando WGD, Seow-Brock HY, 2008. Population structure, chemotype diversity, and potential chemotype shifting of *Fusarium graminearum* in wheat fields of Manitoba. *Plant Disease* **92**, 756–62.
- Lee J, Chang I, Kim H, Yun S, Leslie JF, Lee Y, 2009. Genetic diversity and fitness of *Fusarium graminearum* populations from rice in Korea. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 3289–95.
- Leslie JF, Summerell BA, 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Ames, IA, USA: Blackwell.
- Li G, Quiros CF, 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**, 455–61.
- Meng K, Wang Y, Yang P *et al.*, 2010. Rapid detection and quantification of zearalenone-producing *Fusarium* species by targeting the zearalenone synthase gene *PKS4*. *Food Control* **21**, 207–11.
- Miedaner T, Cumagun CJR, Chakraborty S, 2008. Population genetics of three important head blight pathogens *Fusarium graminearum*, *F. pseudograminearum* and *F. culmorum*. *Journal of Phytopathology* **156**, 129–39.
- Minervini F, Fornelli F, Flynn KM, 2004. Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and fumonisin B1 in a human erythroleukemia cell line. *Toxicology in Vitro* **18**, 21–8.
- Nei M, 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York, NY, USA: Columbia University Press.
- Nicholson P, Simpson DR, Weston G *et al.*, 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals by using PCR assays. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **53**, 17–37.
- O'Donnell K, Kistler HC, Tacke BK, Casper HH, 2000. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **97**, 7905–10.
- Pan D, Calero N, Mionetto A, Bettucci L, 2013. Trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* from wheat in Uruguay. *International Journal of Food Microbiology* **162**, 120–3.
- Qu B, Li HP, Zhang JB *et al.*, 2008. Geographic distribution and genetic diversity of *Fusarium graminearum* and *F. asiaticum* on wheat spikes throughout China. *Plant Pathology* **57**, 15–24.
- Quarta A, Giovanni M, Haidukowski M, Logrieco A, Mule G, Visconti A, 2006. Multiplex PCR assay for the identification of nivalenol, 3- and 15-acetyl-deoxynivalenol chemotypes in *Fusarium*. *FEMS Microbiology Letters* **259**, 7–13.
- Ramirez ML, Reynoso MM, Farnochi MC, Torres AM, Leslie JF, Chulze SN, 2007. Population genetic structure of *Gibberella zeae* isolated from wheat in Argentina. *Food Additives and Contaminants* **24**, 1115–20.
- Reynoso MM, Ramirez ML, Torres AM, Chulze SM, 2011. Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* strains isolated from wheat in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* **145**, 444–8.
- Rohlf FI, 1998. *NTSYSpc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.0. Applied Biostatistics*. New York, NY, USA: Exeter Software.
- Sampietro DA, Díaz CG, Gonzalez V *et al.*, 2011. Species diversity and toxicogenic potential of *Fusarium graminearum* complex isolates from maize fields in northwest Argentina. *International Journal of Food Microbiology* **145**, 359–64.
- Schmale DG, Leslie JF, Zeller KA, Saleh AA, Shields EJ, Bergstrom GC, 2006. Genetic structure of atmospheric populations of *Gibberella zeae*. *Phytopathology* **96**, 1021–6.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L, 2000. *ARLEQUIN. Version 2.0: A Software for Populations Genetic Data Analysis*. Geneva, Switzerland: University of Geneva.

- Scorz LB, Astolfi P, Reartes DS, Schmale DG III, Morales MG, Del Ponte EM, 2009. Trichothecene mycotoxin genotypes of *Fusarium graminearum sensu stricto* and *Fusarium meridionale* in wheat from southern Brazil. *Plant Pathology* 58, 344–51.
- Stenglein SA, Balatti PA, 2006. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Argentina as revealed by pathogenic and molecular markers. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 68, 158–67.
- Umpiérrez-Failache M, Garmendia G, Pereyra S, Rodríguez-Haralambides A, Ward TJ, Vero S, 2013. Regional differences in species composition and toxicogenic potential among *Fusarium* head blight isolates from Uruguay indicate a risk of nivalenol contamination in new wheat production areas. *International Journal of Food Microbiology* 166, 135–40.
- Waalwijk C, Kastelein P, de Vries I *et al.*, 2003. Major changes in *Fusarium* spp. in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology* 109, 743–54.
- Wang JH, Ndoye M, Zhang JB, Li HP, Liao YC, 2011. Population structure and genetic diversity of the *Fusarium graminearum* species complex. *Toxins* 3, 1020–37.
- Wang Y, Sun X, Tan B *et al.*, 2010. A genetic linkage map of *Populus adenopoda* Maxim. x *P. alba* L. hybrid based on SSR and SRAP markers. *Euphytica* 173, 193–205.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

Table S1. Country of origin, locality, trichothecene genotype, species and host of the *Fusarium graminearum* species complex isolates used in this study.

Table S2. GenBank accession numbers of 24 *Fusarium graminearum* species complex isolates.