



Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales  
Universidad Nacional de La Plata

Trabajo final de la carrera Ingeniería Agronómica

## **“Fusariosis de la espiga de trigo: las malezas como fuente de inóculo.”**

Alumno: Malaissi, Tomás

Directora: Ing. Agr. Gladys A. Lori

Co-directora: Dra. Cecilia A. Mourellos

Fecha de entrega: 07 de junio de 2016

## INDICE

RESUMEN.....	3
INTRODUCCION.....	4
➤ Importancia de la FET en Argentina.....	6
➤ Taxonomía del género <i>Fusarium</i> .....	7
➤ <i>Fusarium graminearum</i> Schwabe (teleomorfo <i>Gibberella zeae</i> ).....	10
➤ Caracterización molecular de <i>Fusarium</i> spp.....	12
➤ FET, Sintomatología de la enfermedad en trigo.....	13
➤ Epidemiología de la enfermedad	
- Sobrevivencia y producción de inóculo.....	14
- Diseminación.....	16
- Infección.....	16
➤ Micotoxinas.....	17
- Efectos en humanos y animales.....	20
HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	22
MATERIALES Y METODOS.....	23
RESULTADOS.....	26
DISCUSION.....	38
CONCLUSIONES.....	40
BIBLIOGRAFIA.....	42

## RESUMEN

La fusariosis de la espiga de trigo (FET) es una enfermedad muy importante del trigo y otras gramíneas en todas las áreas trigueras del mundo. Es causada por varias especies del género *Fusarium*, siendo la principal *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch (anamorfo: *Fusarium graminearum* Schwabe).

Esta patología ocasiona abortos en las flores y achuzamiento de los granos, provocando reducción en el rendimiento, disminución del peso hectolítrico y del tenor proteico del grano, y afectando la calidad de las harinas y de los subproductos. A estos perjuicios debe sumarse la contaminación del grano con micotoxinas sintetizadas por el patógeno durante la patogénesis, como el deoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV) y zearalenona (ZEA). Estos compuestos constituyen un riesgo para la salud y comprometen la utilización del grano en la alimentación y en la comercialización internacional.

El objetivo de este trabajo consistió en identificar hospedantes alternativos tales como malezas gramíneas y no gramíneas como potenciales fuentes de inóculo de *F. graminearum*, y determinar los quimiotipos presentes. Se practicaron aislamientos a partir de inflorescencias de especies pertenecientes a distintas familias botánicas. Los aislamientos fúngicos obtenidos se identificaron mediante el estudio de sus caracteres morfológicos y culturales, como así también se llevó a cabo una caracterización molecular para confirmar la especie identificada y la caracterización del quimiotipo.

Se conformó una colección de 61 aislamientos de *Fusarium* spp. obtenidos a partir de 105 muestras de especies botánicas. Se hallaron por primera vez 10 especies vegetales como hospedantes alternativos de *F. graminearum*. Se confirmó la identidad de 39 aislamientos de *F. graminearum* mediante el uso de marcadores moleculares especie-específicos. El resto, pertenecieron a las especies *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. poae*, *F. semitectum*, *F. cerealis* y *F. chlamydosporum*. Entre los aislamientos de *F. graminearum* se identificaron 28 productores de 15-ADON, 8 de NIV y 3 no han podido ser caracterizados de acuerdo a su quimiotipo.

## INTRODUCCIÓN

El género *Triticum* pertenece a la familia de las gramíneas (*Poaceae*). El trigo pan (*Triticum aestivum*), es la especie de trigo más extensamente cultivada en el mundo. Es una planta alohexaploide, debido a su conformación de 42 cromosomas repartidos en 6 juegos de 7 cromosomas cada uno. La planta posee tres genomas idénticos, los cuales tienen información genética repetida, otorgándole a la especie en sí gran adaptabilidad a los diferentes ambientes (Simón, 2005).

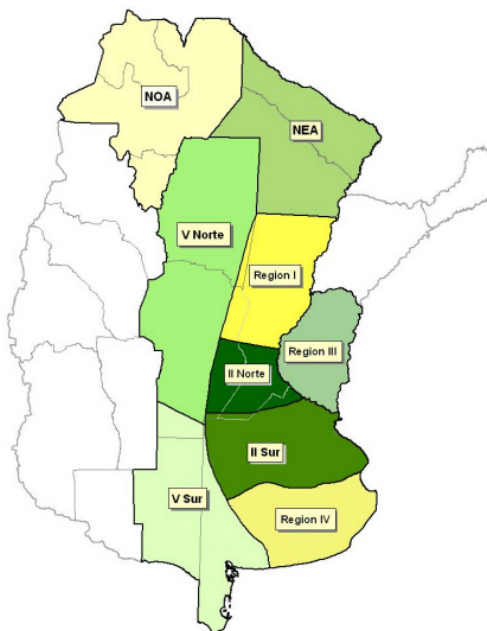
El trigo es la principal fuente de hidrato de carbono del mundo occidental. Su producción ha ido en aumento en forma permanente y constante durante las últimas décadas. Este incremento que se verifica a fines de los '60 y principios de los '70, es coincidente con el cambio de germoplasma que llevó a la difusión de variedades con mayor potencial de rinde, acompañada de técnicas de cultivos tendientes a la concreción de esos rendimientos (Chidichimo & Sempé, 2006).

Es un cereal anual de invierno, que mediante el mejoramiento genético de la especie se ha adaptado a una amplia gama de ambientes con condiciones y con climas más rigurosos que los de su origen. Crece en un rango de temperaturas entre los 3°C y 34°C, siendo el óptimo entre 20°C y 25°C, y posee requerimientos hídricos de 400-500 mm por ciclo, con las mayores exigencias a partir de la etapa de encañazón. Este cultivo crece favorablemente en suelos sueltos, profundos, fértiles y libres de inundaciones, con un pH entre 6,0 y 7,5 (Ruiz Camacho, 1981).

La producción mundial de trigo asciende a 725 millones de toneladas, de las cuales el mayor porcentaje se concentra en la Unión Europea, China, India, Rusia, EEUU, Canadá, Australia, entre otros. Esto nos da el indicio de que la producción se encuentra muy concentrada en pocos países. Aproximadamente el 50% de la producción se ubica en la Unión Europea, China e India (USDA, 2015).

En el país, el cultivo de trigo se realiza fundamentalmente en las provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba, La Pampa y Entre Ríos, y, en menor proporción, en las provincias del Noreste Argentino (NEA) y del Noroeste Argentino (NOA). Debido a la gran extensión del área y a la variabilidad en las condiciones ambientales presentes, la región de cultivo ha sido dividida en nueve subregiones agroecológicas (Figura 1). La zona triguera tradicional está limitada al norte por la isoterma de 13°C del mes de Julio, mientras que en el sur lo está por la de 7°C, valor acorde a los requerimientos invernales de este cultivo. Comprende desde los 25° de latitud Sur, incluyendo a la zona de Chaco y

Formosa, hasta los 40° latitud Sur. De este a oeste abarca de los 58° a los 66° de latitud Oeste. (Chidichimo & Sempé, 2007).



**Figura 1:** Subregiones trigueras de la República Argentina. (Fuente: Dirección de Agricultura. SAGPyA. 2006)

La producción de trigo se concentra básicamente en las subregiones II Norte, II Sur, IV y V Sur, que aportan el 76,91% del volumen obtenido a nivel nacional y el 66,3% de la superficie cosechada. La subregión V Sur es la principal productora (27,13%), con 2.471.132 toneladas en un total de 1.058.120 has cosechadas (Tabla 1).

**Tabla 1:** Superficie sembrada y cosechada, rendimientos y producción por subregiones. Elaborado en base a datos sobre producción del MAGyP. Campaña 2013-2014 ([www.trigoargentino.com.ar](http://www.trigoargentino.com.ar)).

Subregion	Superficie Sembrada (ha)	% Superficie Sembrada	Superficie Cosechada (ha)	% Superficie Cosechada	Rendimiento (tn/ha)	Produccion (tn)	% Produccion
I	403.700	11,07	360.600	10,48	1,682	606.370	6,66
II Norte	413.300	11,33	400.500	11,64	2,684	1.075.095	11,81
II Sur	382.345	10,48	371.155	10,79	3,748	1.391.245	15,28
III	284.940	7,81	280.640	8,16	2,959	830.348	9,12
IV	451.580	12,38	451.280	13,12	4,578	2.066.009	22,69
V Norte	507.610	13,91	447.790	13,01	1,347	603.280	6,62
V Sur	1.064.420	29,18	1.058.120	30,75	2,335	2.471.132	27,13
NEA	91.670	2,51	51.130	1,49	0,602	30.790	0,34
NOA	48.505	1,33	19.570	0,57	1,675	32.770	0,36
<b>Nacional</b>	<b>3.648.070</b>	<b>100</b>	<b>3.440.785</b>	<b>100</b>	<b>2,647</b>	<b>9.107.039</b>	<b>100</b>

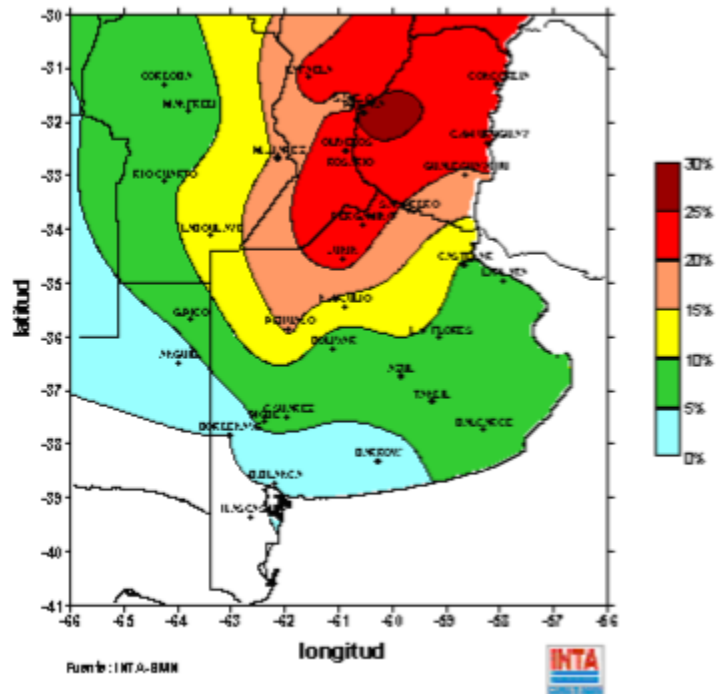
Durante la campaña 2013-2014 se visualizó un incremento en la superficie cosechada con respecto a la campaña anterior en casi 15% (3.019.403 has vs 3.440.785 has), por otro lado, se vio un incremento de la producción de 14% aproximadamente

(8.019.995 tn vs 9.107.039 tn). Con respecto a estimaciones de la campaña 2014-2015, se vislumbra un incremento de la superficie sembrada a 5 millones de has y una producción de más de 13 millones de tn (SIIA, 2015).

### **Importancia de la Fusariosis de la espiga de trigo en la Argentina**

El golpe blanco o fusariosis de la espiga de trigo (FET) fue descrita por primera vez en Inglaterra en el año 1884 (Smith, 1884) y en trigo en Estados Unidos en 1891 (Arthur, 1891). Esta patología es causada por distintas especies del género *Fusarium*, siendo el principal agente causal *Fusarium graminearum* Schwabe (teleomorfo: *Gibberella zeae* (Schwein) Petch) (Nicholson *et al.*, 2007). Es una de las enfermedades más importantes del trigo pan (*Triticum aestivum* L.) y candeal (*Triticum durum* Desf.) en todas las regiones cerealeras del mundo. La FET ocasiona abortos en las flores y achuzamiento de los granos, provocando reducción en el rendimiento, disminución del peso hectolítrico y del tenor proteico del grano, y afectando la calidad de las harinas y de los subproductos. A estos perjuicios debe sumarse la contaminación del grano con micotoxinas sintetizadas por el patógeno durante la patogénesis, como el deoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV) y zearalenona (ZEA) (Rizzo *et al.*, 1997, Lori *et al.*, 2003).

El área de cultivo de trigo en la Argentina se encuentra distribuida en nueve subregiones con diferentes condiciones ecológicas (Figura 1), entre las principales provincias encontramos a Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, Entre Ríos y La Pampa, por lo tanto, las epidemias no cubren toda la zona al mismo tiempo. La latitud, la temperatura, la susceptibilidad y rotación de los cultivos influyen en la distribución del patógeno, mientras que la frecuencia y el momento de las lluvias de primavera regulan los brotes de la enfermedad (Kikot, 2012). En el sudeste del área triguera Argentina, donde se concentra el cultivo de trigo candeal, ocurrieron graves epidemias de la FET en 1963, 1976, 1978, 1985, 1993 y 2001 (Moschini & Fortugno, 1996; de Galich, 1997; Kikot *et al.*, 2011). Las epidemias de FET, como los de muchos sistemas de otras enfermedades, están fuertemente influenciadas por el entorno local y regional, siendo la mayor incidencia de la enfermedad de noreste a sudoeste en la región pampeana (Figura 2).



**Figura 2:** Potencialidad climática de la región pampeana en relación a la incidencia de la FET (1971- 2007). De NE a SO disminuye la probabilidad de incidencia de la enfermedad (Fuente: INTA - Clima y Agua).

### **Taxonomía del género *Fusarium***

El concepto genérico de *Fusarium* spp. fue planteado por primera vez por Link (1809) de acuerdo a los caracteres primarios, presencia de conidios en forma de canoa – o banana – forma bien conocida por todos los que trabajan con el género. Tras el diagnóstico de Link, gran parte de las primeras investigaciones sobre *Fusarium* spp se centraron en el diagnóstico, la identificación y enumeración de los taxones que causaban enfermedades de las plantas. Hubo numerosas especies, numerosos caracteres propuestos y múltiples medios de cultivos que se combinaron para hacer la identificación de cepas y el diagnóstico de especies muy complicado. Este estado de confusión se mantuvo hasta mediados de la década de 1930 cuando el trabajo de Wollenweber y Reinking (1935) reformuló el concepto de especie dentro del género.

La taxonomía de *Fusarium* spp ha sufrido una serie de cambios durante los últimos 100 años. Wollenweber y Reinking proporcionaron un sistema subgenérico basado en 16 secciones, 65 especies y 77 variedades subespecíficos y formas. Utilizaban una serie de medios de cultivos (algunos bastantes complejos) en su análisis. Aunque hicieron una gran reducción en el número de especies y causaron un orden al proceso de

identificación, su concepto de especies permaneció basado en las diferencias entre las cepas en lugar de las similitudes que compartían.

En las décadas de 1940 y 1950, Snyder y Hansen (1940; 1941; 1945; 1954), redujeron el número de especies dentro del género a nueve y demostraron que solo mediante el uso de cultivos derivados de una sola especie de esporas podrían hacerse identificaciones de forma confiable. Las nueve especies reconocidas por Snyder y Hansen fueron: *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. moniliforme*, *F. roseum*, *F. lateritium*, *F. tricinctum*, *F. nivale*, *F. rigidiuscula* y *F. episphaeria*.

Gordon publicó una serie de documentos (1944; 1960) que examinan las especies de *Fusarium* spp. aisladas de diversos sustratos y condiciones ambientales. Él desarrolló un enfoque pragmático para la taxonomía de *Fusarium* spp. que utiliza aspectos de la filosofía de Wollenweber y Reinking con algunos componentes del sistema de Snyder y Hansen. También consideró los teleomorfos en sus descripciones.

Messiaen y Cassini, investigadores franceses (Messiaen, 1959; Messiaen & Cassini, 1968) desarrollaron un sistema inspirado en el de Snyder y Hansen, pero utilizando variedades botánicas en lugar de variedades a nivel de subespecie.

Raillo era una investigadora rusa, que en muchos aspectos fue pionera en el uso de los métodos de cultivos de esporas individuales. Ella publicó un sistema taxonómico a mediados de la década de 1930 (Raillo, 1935; 1936; 1950) que se basó en la forma de los macroconidios, la presencia de microconidios y clamidosporas.

Bilai inició los estudios sobre la variabilidad en caracteres culturales y fisiológicos, especialmente en respuesta a temperatura, humedad y composición media. Ella produjo su propia revisión de la taxonomía del género (Bilai, 1952; 1955; 1970; 1978). El avance significativo en la taxonomía de *Fusarium* spp fue hecha por Booth durante los años 60 y 70 y publicando una monografía "El género *Fusarium*" (Booth, 1971). Booth incluyó claves de las secciones y especies de *Fusarium* spp. en un sistema taxonómico. Booth introdujo el uso de la morfología de las células conidiógenas, especialmente aquellas que producen microconidios, como un diagnóstico a nivel especie de caracteres.

Gerlach y Nirenberg continuaron la investigación iniciada por Wollenweber y Reinking. Publicaron un tratamiento del género en 1982 (Gerlach & Nirenberg, 1982) que reconocía un gran número de especies. La obra más importante de Joffe, "*Fusarium*: su biología y toxicología", fue publicado en 1986 (Joffe, 1986). Su enfoque taxonómico siguió la de Wollenweber y Reinking (1935), y la de Gerlach y Nirenberg (1982), con la forma y caracteres culturales de macroconidios y microconidios como su base principal.



Nelson, Toussoun y Marasas produjeron un manual de identificación de *Fusarium* en 1983 (Nelson *et al.*, 1983) que tuvo un predecesor algo más simple (Toussoun & Nelson, 1976). Esta guía combinó información útil en el aislamiento y cultivo de *Fusarium* spp, fotografías en color para distinguir la variación de pigmento y excelentes fotomicrografías de muchas especies.

Tanto Gerlach y Nirenberg (1982) y Nelson *et al.* (1983) tomaron las ideas desarrolladas por Wollenweber y Reinking, Snyder y Hansen, y el trabajo de Booth y las unieron dentro de los sistemas taxonómicos con definiciones de especies basadas exclusivamente en caracteres morfológicos. La mayoría de los investigadores de *Fusarium* spp. utilizan actualmente porciones de estos sistemas como la base para identificar especies de *Fusarium* spp. y la descripción de nuevos taxones.

El género *Fusarium* comprende actualmente 70 especies descritas, que a su vez están agrupadas en 12 secciones. Cada sección es un conjunto de especies relacionadas entre sí. Más de la mitad de las especies son parásitas de plantas y entre ellas se encuentran algunos de los más importantes patógenos del mundo agrícola. Dentro del género *Fusarium* existen especies que presentan formas con reproducción sexual conocida, como *F. solani* y otras, como *F. oxysporum*, en las que no se conoce fase sexual. Este hecho dificulta la clasificación, ya que, tradicionalmente las formas sexuales de una especie se han incluido en un grupo diferente y con un nombre distinto de las que presentan las formas sin reproducción sexual. Diferentes teleomorfos se han asociado con las especies de *Fusarium*, la mayoría de los teleomorfos son miembros de los Hypocreales, ubicados en la clase Ascomycetes (Kikot, 2012). Tres teleomorfos se relacionan con los anamorfos del género *Fusarium*: *Gibberella*, *Haematonectria* y *Albonectria*. *Gibberella* es el género más comúnmente asociado a la mayoría de las especies de *Fusarium* (Samuels *et al.*, 2001) e incluye a los patógenos de plantas como *Gibberella zeae* (*F. graminearum*), *G. moniliformis* (*F. verticillioides*) y otras especies incluidas en el complejo *G. fujikuroi*. El género *Haematonectria* incluye *H. haematococca* (*F. solani*), de distribución cosmopolita, patógeno de plantas de importancia económica tales como porotos, cítricos, soja, maní, pimienta, papa, calabaza. El género *Albonectria* se asocia con un número pequeño de especies de *Fusarium*, entre ellas la más importante es *F. decemcellulare*, patógeno en regiones tropicales y subtropicales asociado a canchros de varias especies de frutales, tales como cacao, aguacate, mango y guaraná.

### ***Fusarium graminearum* Schwabe (teleomorfo *Gibberella zeae*)**

La clasificación morfológica en el género *Fusarium* se basa en las características macro y microscópicas del cultivo. El tipo de micelio aéreo, pigmentación y tasa de crecimiento de la colonia, así como la ausencia o presencia de esporodoquios, esclerocios o estroma en diferentes medios son características básicas de identificación.

El color que desarrollan depende de la especie, y puede ser blanco, crema, rojo, púrpura, etc. El micelio aéreo suele ser abundante.

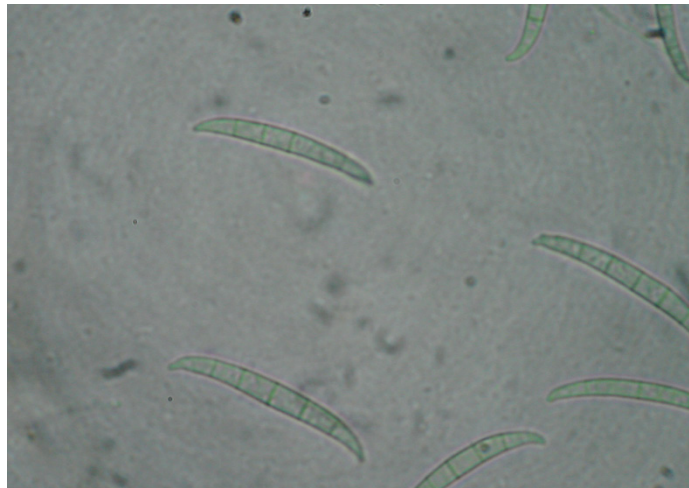
La morfología de las colonias de *F. graminearum* se caracterizan por presentar abundante micelio aéreo rosado-amarillento y pigmentación rojiza del medio de cultivo (Figura 3).

El medio de cultivo agar papa glucosado (APG) es el más utilizado en la observación de estas características. Las especies del género pueden producir tres tipos de esporas asexuales llamadas macroconidios, microconidios y clamidosporas. El macroconidio es la spora principal en la caracterización. Su forma y tamaño varían según la especie (Figura 4). Los macroconidios pueden originarse a partir de estructuras especializadas, los esporodoquios, como así también en monofiálides, polifiálides o directamente a partir del micelio aéreo. La presencia de una célula basal en forma de pie se considera característica de *Fusarium* spp. (Figura 5). El microconidio es un carácter taxonómico primario y se considera su presencia o ausencia. Si está presente, las características consideradas son forma, modo de formación, si están solos, en falsas cabezas, cabezas o cadenas.

Las principales características que presenta *F. graminearum* son los esporodoquios, a menudo escasos, pero si están presentes son de color naranja pálido. Los macroconidios son relativamente delgados en forma de hoz de 2,5 x 35-63  $\mu\text{m}$ , pueden contener entre 5 a 6 septos, se caracterizan por presentar una célula basal con forma de pie bien desarrollada. Esta especie no presenta microconidios. Las clamidosporas son globosas, midiendo entre 10 a 12  $\mu\text{m}$  de diámetro. Es un hongo homotálico (el único dentro de este género) y sus peritecios son de color negro. Los mismos, se forman a partir de un estroma de forma ovoide y papilado. La temperatura óptima para que se forme esta estructura es de 22°C-25°C, y requiere alta humedad relativa e incidencia de luz UV. El teleomorfo de esta especie es *Gibberella zeae* (Pereyra *et al.*, 2004; Leslie & Summerell, 2006).

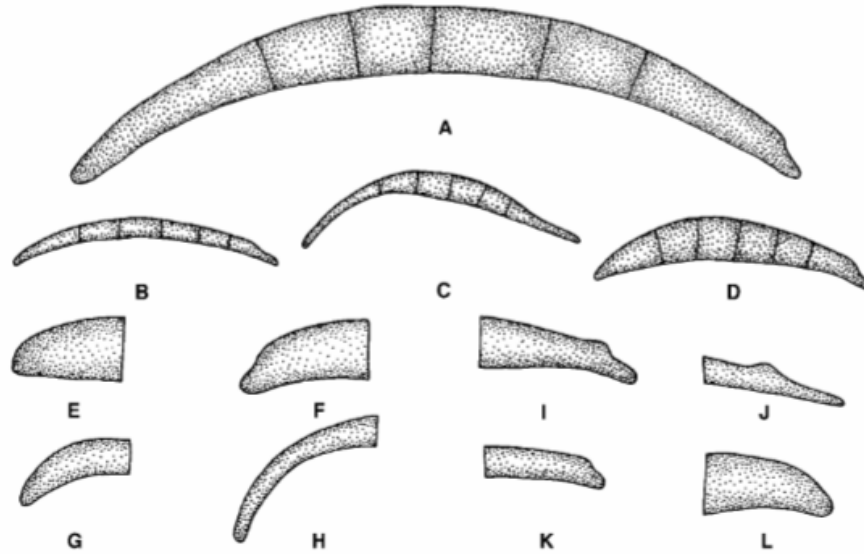


**Figura 3:** Visualización del frente y reverso de una colonia de *Fusarium graminearum* sobre medio de cultivo agar papa glucosado (APG).



**Figura 4:** Observación microscópica de macroconidios de *Fusarium graminearum*

Otros caracteres taxonómicos primarios son clamidosporas, conidióforos y mesoconidios. Para observar este tipo de características suelen usarse medios naturales como el agar hojas de clavel (CLA) y agar nutriente sintético (SNA). Este tipo de identificación requiere de una cuidadosa observación y un grado de conocimiento de taxonomía para distinguir los patógenos a nivel de especie. Esto ha llevado a un creciente interés en la obtención de métodos más sensibles para la identificación de especies de *Fusarium* en el material vegetal infectado, incluyendo las técnicas que implican el diagnóstico molecular (Kikot, 2012).



**Figura 5:** Características morfológicas utilizadas en la identificación de especies de *Fusarium*. A-D: formas típicas de macroconidios. E-H: formas de la célula apical del macroconidio. I-L: formas de la célula basal del macroconidio (Kikot, 2012).

Por muchos años *F. graminearum* fue dividida en el grupo 1 y el grupo 2, morfológicamente difícil de identificar pero con diferencias en la fertilidad y la asociación con la enfermedad. El grupo 2 mantuvo el nombre de *F. graminearum* y el grupo 1 fue denominado como *F. pseudograminearum*, el cual es heterotálico y está asociado a la podredumbre de la corona (O'Donnell *et al.*, 1998; Aoki & O'Donnell, 1999).

### **Caracterización molecular de *Fusarium* spp.**

Las pruebas convencionales de identificación y caracterización dentro del género *Fusarium* son laboriosas, requieren de experiencia y consumen demasiado tiempo. Por ello, para complementar dichas herramientas de diagnóstico, varias pruebas de diagnóstico molecular han sido desarrolladas para la detección de los hongos principales implicados en la FET (Ouellet & Siefert, 1993; Koopman *et al.*, 1994; Parry & Nicholson, 1996). La mayoría de éstas se basan en la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con *primers* específicos. La PCR ofrece una sensibilidad y especificidad como herramienta para detectar, identificar y cuantificar las especies presentes en los tejidos vegetales. Una serie de trabajos se han llevado a cabo para detectar muchos de los principales patógenos asociados a la FET. Los ensayos de PCR fueron desarrollados para *F. graminearum* (Schilling *et al.*, 1996; Niessen & Vogel, 1998; Nicholson *et al.*,

1998), *F. culmorum* (Schilling *et al.*, 1996; Nicholson *et al.*, 1998), *F. poae* (Parry & Nicholson, 1996), *F. cerealis* (Yoder & Christianson, 1998), *F. avenaceum* (Schilling *et al.*, 1996; Turner *et al.*, 1998) y *F. verticillioides* (Moeller. *et al.*, 1999).

Otras técnicas de PCR que se implementaron, consisten en estudiar patógenos por su potencial toxicogénico. El gen *TRI5* es común en todas las especies productoras de tricotecenos conocidas del género *Fusarium*. Ensayos de PCR basados en la secuencia de este gen conservado han sido desarrollados para detectar la presencia de hongos capaces de producir toxinas. Además, se realizaron ensayos basados en los genes *TRI7* y *TRI13* para permitir la detección y diferenciación de los quimiotipos DON y NIV, debido a que estos genes son no funcionales en aislamientos con quimiotipo DON, lo cual los hace incapaces de producir nivalenol (Lee *et al.*, 2001).

Análisis filogenéticos moleculares realizados con cepas de *F. graminearum* de todo el mundo, han revelado que *F. graminearum* es un complejo de al menos 15 especies biogeográficamente estructuradas (O'Donnell *et al.*, 2000; 2004; 2008; Starkey *et al.*, 2007; Yli-Mattila *et al.*, 2009; Sarver *et al.*, 2011).

Existen metodologías para obtener datos cuantitativos de la enfermedad, entre ellos se destacan los ensayos por inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA). Esta metodología utiliza anticuerpos específicos contra una especie o grupo de especies, o contra determinados antígenos fúngicos. Hill *et al.* (2006; 2008) utilizaron el anticuerpo monoclonal género específico contra *Fusarium* spp. para cuantificar la severidad de la FET en un ensayo sobre trigo realizado a campo. Por otra parte, existen kits de ELISA comerciales para determinar el contenido de micotoxinas en cereales y alimentos.

### **Fusariosis de la espiga. Sintomatología de la enfermedad en trigo**

La infección se produce cuando las espigas se encuentran en el estadio de antesis, ya que es el periodo en que las plantas de trigo son más susceptibles a la FET (Zadoks *et al.*, 1974). En particular, la infección en espiga ocurre desde la antesis hasta grano pastoso. En consecuencia, el período de susceptibilidad en la espiga queda limitado a 2 ó 3 semanas.

La infección inicial depende del tipo de inóculo (ascosporas, macroconidios, hifas), de las condiciones ambientales (temperatura y humedad relativa) y del estado de desarrollo del hospedante. La espiga del trigo es un órgano complejo y heterogéneo en el cual todos los componentes de la espiga son infectados por *F. graminearum*. Se han reportado numerosas vías de infección que incluyen colonización de caras externas e

internas de glumas, páleas y lemmas, de anteras, de ovarios durante la apertura de la flor, y la progresión de la invasión a nuevas flores y espiguillas a través de la colonización basípeta y acrópeta de la raquilla y raquis, respectivamente.

Las espiguillas afectadas pierden clorofila rápidamente y se tornan descoloridas. Posteriormente en la base y bordes de las glumas aparece una masa viscosa de coloración rojiza a salmón que corresponde a los conidios asexuales del hongo, denominados pionnotes (Müller & Loeffler, 1976). Si las condiciones ambientales son muy favorables, la infección avanza hacia las espiguillas adyacentes.

Existen múltiples vías de infección así como variadas estrategias de colonización del hongo (Bushnell *et al.*, 2003). El efecto en el desarrollo del grano depende del momento de infección. Si la infección es temprana, puede producir el aborto de las flores; si el ataque a las espiguillas es más tardío puede provocar granos con escaso desarrollo y con deformaciones; si el ataque es aún más tardío, cuando el grano ya está desarrollado, se pueden originar granos de tamaño normal pero contaminados con toxinas (Bai & Shaner, 1994). Si la infección es moderada los granos son chuzos, de bajo peso y con una coloración rosada a blanquecina. Hacia el final de ciclo se pueden observar sobre las espigas cuerpos fructíferos de coloración negra, que constituyen la fase sexual del patógeno, denominados peritecios.

## **Epidemiología de la enfermedad**

### Sobrevivencia y producción de inóculo

Son observadas dos fases de desarrollo de *F. graminearum* durante el ciclo de la fusariosis de la espiga (Reis & Carmona, 2002). Una fase parasítica en la cual el patógeno se desarrolla inicialmente como biótrofo donde los tejidos colonizados permanecen funcionales (Araus *et al.*, 1993; Bushnell *et al.*, 2003), y una fase saprofitica donde el hongo se desarrolla sobre tejidos muertos. Generalmente, el pasaje de la fase parasítica a la saprofitica es gradual y se encuentra estrechamente asociada a la acumulación de toxinas liberadas por el hongo durante la colonización. Micotoxinas pertenecientes al grupo de los tricotecenos, principalmente el deoxinivalenol (DON), parecen jugar un rol preponderante en este cambio de hábito de vida del patógeno (Proctor *et al.*, 1995; Desjardins *et al.*, 1996; Eudes *et al.*, 1997). Dicha fase saprofitica se prolonga hasta el momento en que las esporas generadas por el hongo infectan nuevos tejidos iniciando una nueva fase parasítica. A pesar de la capacidad de sobrevivir saprofiticamente en rastrojos infectados, *F. graminearum* tiene una escasa habilidad de

competencia microbiana y con el tiempo, otras especies saprófitas van colonizando el rastrojo y desplazándolo (Pereyra *et al.*, 2004; Pérez, 2004). A su vez, debido a su baja habilidad competitiva, *F. graminearum*, no puede sobrevivir libre en el suelo (Garret, 1970; Burgess, 1981). Una característica preponderante de *F. graminearum* es su amplio rango de huéspedes, y se ha encontrado sobreviviendo saprofiticamente en numerosas especies gramíneas (incluyendo los géneros *Avena*, *Bromus*, *Echinochloa*, *Hordeum*, *Lolium*, *Poa*, *Setaria*, *Triticum* y *Zea*), y dicotiledóneas (incluyendo los géneros *Medicago*, *Trifolium*, *Cucumis* y *Glycine*) (Farr *et al.*, 1989; Fernández & Fernández, 1990; Reis, 1990; Pioli *et al.*, 2004).

En la Argentina, se mencionaron solamente especies vegetales pertenecientes a la familia de las gramíneas como hospedantes alternativos (Carmona *et al.*, 1999), sin embargo en los últimos años se han realizado trabajos preliminares en los que se efectuaron monitoreos bimestrales de inflorescencias de malezas de diferentes familias con el objetivo de analizar su capacidad potencial como fuente de inóculo (Mourellos *et al.*, 2014).

El suelo y las semillas también son considerados fuente de inóculo (Sutton, 1982), pero las mismas no parecen cumplir un rol importante en las condiciones de producción de la Argentina. Existen referencias internacionales que indican que éste patógeno genera inóculo primario en diferentes hospedantes como trigo, cebada, maíz (Sutton, 1982), avena, arroz (Bai & Shaner, 1994), sorgo y soja (Fernández & Fernandes, 1990; Pioli *et al.*, 2004). El reporte de la soja como posible hospedante requiere mayor atención ya que se podrían estar generando importantes cantidades de inóculo en áreas de producción compartida con trigo y cebada. Los residuos de cosecha colonizados por el hongo son una de las principales fuentes de inóculo, ofreciendo un sitio para abundante esporulación durante la siguiente estación de crecimiento (Bai & Shaner, 1994; Xu, 2003; Pereyra *et al.*, 2004). Sin embargo, Markell & Francl (2003) evaluaron la importancia relativa de ascosporas y conidios, como inóculo primario, y concluyeron que ambos tipos de inóculo juegan un rol importante en el inicio de la infección. En las condiciones ambientales de la Argentina se ha detectado producción de conidios y ascosporas sobre rastrojos infectados durante todo el año. Sin embargo, las ascosporas representan el inóculo primario principal de esta enfermedad y son diseminadas por el viento a campos vecinos (Pereyra, 2003).

### Diseminación

Parry *et al.*, (1995) y Gilbert & Tekauz (2000) estudiaron la dispersión por viento y gotas de lluvia del inóculo de *Fusarium* spp. y concluyeron que la dispersión de macroconidios se da principalmente por salpicado de gotas de lluvia. En cambio las ascosporas, al ser livianas y forzadamente descargadas al aire, presentan al viento como principal vía de dispersión (Parry *et al.*, 1995; Xu, 2003). La lluvia sería suficiente para transportar conidios desde los residuos a la base del tallo y las espigas, pero la probabilidad de ocurrencia es baja, ya que generalmente existen obstáculos como, por ejemplo, las hojas. Para el caso de las ascosporas, Fernando *et al.* (1997), demostraron que se requiere alta humedad para la liberación inicial y que este tipo de inóculo usualmente es desplazado por el viento, pero se requieren períodos secos posteriores para la eficaz descarga al aire desde los peritecios (Parry *et al.*, 1995). La humedad es el factor ambiental más determinante asociado a la liberación de esporas. La alternancia de períodos secos y de lluvias aumenta la liberación de esporas. A su vez, la luz es el factor que más influye, luego de la temperatura y la humedad, pero no en la liberación sino en la maduración de las esporas (Trail *et al.*, 1998). Para *F. graminearum* se ha señalado que las infecciones son favorecidas por períodos extensos, entre 48 a 72 h, de humedad relativa mayor a 90% y temperaturas entre 15°C - 30°C (Andersen, 1948).

### Infección

El proceso de infección de *F. graminearum* en el trigo se puede iniciar con:

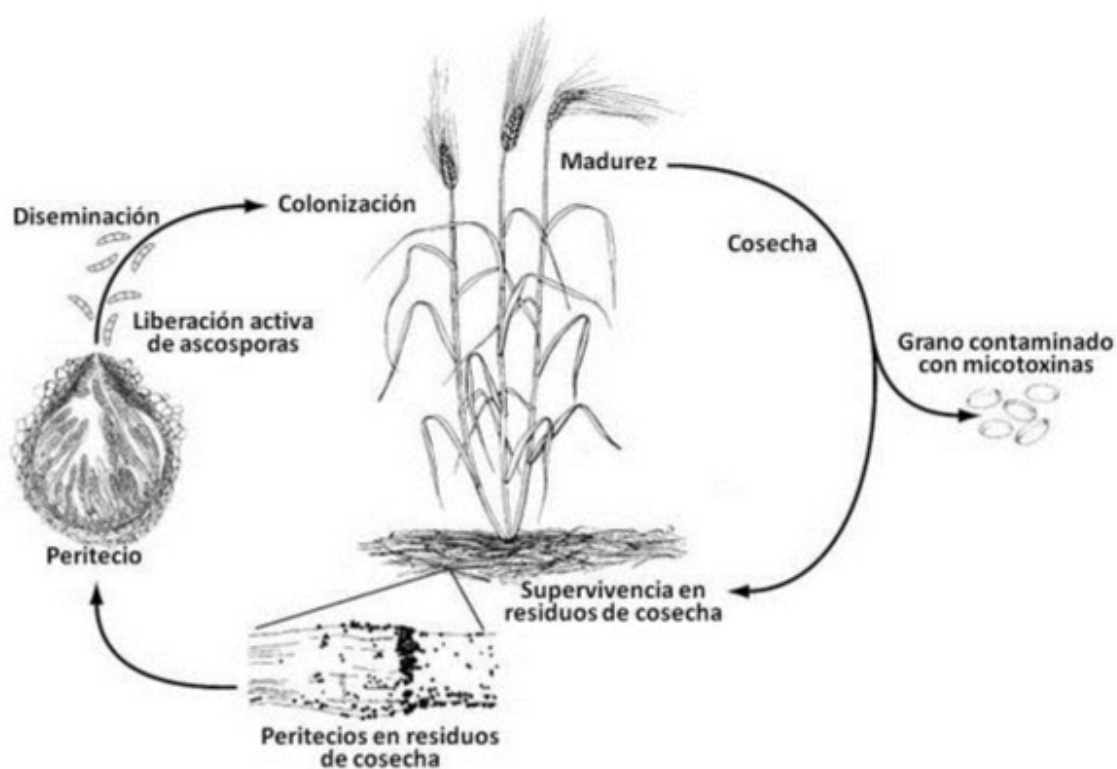
- 1) macroconidios producidos sobre esporodoquios o en forma individual,
- 2) ascosporas producidas en el interior de los peritecios de *G. zeae*,
- 3) clamidosporas que persisten en el suelo o sobre los residuos, aunque este tipo de inóculo es menos frecuente,
- 4) el micelio que sobrevive sobre los restos de maíz o trigo (Ireta & Gilchrist, 1994).

La infección ocurre en las espigas en floración a través de las anteras. Las ascosporas y conidios germinan principalmente en las anteras y a partir de ahí colonizan el ovario, otras estructuras florales y el resto de la espiga.

El crecimiento de *F. graminearum* es estimulado en las anteras debido a la alta concentración de dos compuestos (colina y betaína), importantes para el hongo. Dichos compuestos favorecen la extensión hifal, sin embargo no afectan la germinación de las esporas (Strange & Smith, 1971). Los trabajos son coincidentes en que el trigo es



principalmente susceptible desde antesis hasta grano pastoso suave (de Souza & Formento, 2003; Moschini *et al.*, 2003). El período más susceptible es la floración, donde la presencia de polen actúa como estimulante de la germinación de esporas y crecimiento del micelio. La infección del raquis lleva a la infección de toda la espiga, a la interrupción del transporte de agua y nutrientes a la espiga, y a la producción de granos arrugados, así como a la reducción del rendimiento (Sykes, 2003). El proceso de antesis puede prolongarse hasta por 4 días en una espiga, 12 días en una planta y 30 días en el cultivo, lo cual aumenta las posibilidades de que ocurra infección en un cultivo (Reis, 1989). El proceso de infección es similar tanto en variedades resistentes como en susceptibles (Figura 6).



**Figura 6:** Ciclo de la Fusariosis de la Espiga de Trigo ocasionada por *Fusarium graminearum* Schwabe (*Gibberella zeae* Schw. & Petch). Adaptado de Trail (2009).

## Micotoxinas

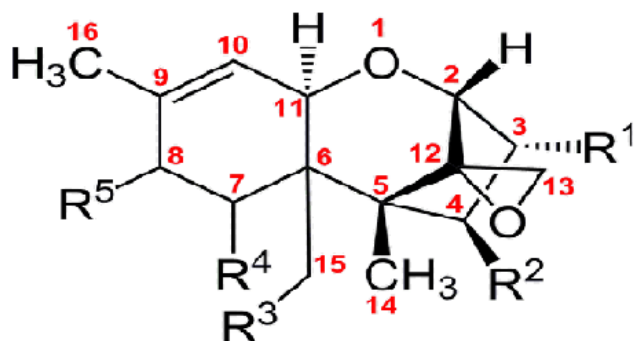
Las micotoxinas son metabolitos secundarios que tienen lugar cuando la fase de crecimiento llega a su etapa final y durante la fase estacionaria, siendo a menudo asociado con la diferenciación y la esporulación (Filtenborg *et al.*, 1983). Son moléculas relativamente pequeñas ( $P_m < 700$ ). La mayor parte de estos metabolitos secundarios se originan en la ruta policetónica. La cadena general policetónica, del tipo  $R-CO-CH_2-CO-$

$\text{CH}_2\text{-CO-CH}_2\text{-CO-CH}_2\text{-CO-SCoA}$ , es de la cual se derivan la mayoría de las micotoxinas. Estas pueden contaminar alimentos o las materias primas utilizadas para su elaboración, originando un grupo de enfermedades y trastornos, denominados “micotoxicosis”, y que resultan tóxicos para el hombre y los animales.

Se considera que *Fusarium* es el género productor de toxinas de mayor prevalencia. Dentro de las toxinas más comunes elaboradas encontramos principalmente tricotecenos, la zearalenona, la moniliformina y las fumonisinas. Una característica importante del género es que una misma micotoxina puede ser producida por diferentes especies del mismo, y que una misma especie puede producir diferentes micotoxinas a la vez, por lo que en un mismo sustrato podemos encontrar más de un metabolito. El género *Fusarium* comprende muchas especies y gran número de ellas son capaces de producir metabolitos tóxicos (Marasas *et al.*, 1984). *F. graminearum* produce distintos tipos de toxinas, entre ellas encontramos tricotecenos y zearalenona.

Los tricotecenos son los más importantes. Estos son un grupo de metabolitos secundarios de la familia de los sesquiterpenoides con una estructura básica similar, en donde posee un núcleo tetraciclo con doble ligadura en el C-9,10 y un anillo epoxi en C-12,13 (Figura 7). Se encuentran divididos en cuatro grupos (A-D) de acuerdo a los grupos sustituyentes funcionales, siendo los más importantes los grupo A y B. Así tenemos los tricotecenos tipo A, como las toxinas T-2, HT-2 y el diacetoxiescirpenol (DAS); y los del tipo B, como el deoxinivalenol (DON) y sus derivados y el nivalenol (NIV). Dentro de los principales tricotecenos producidas por *F. graminearum*, debemos mencionar el DON, T-2, HT-2 y NIV.

Los tricotecenos son translocados en el tejido de las plantas antes que se produzca el crecimiento visible del hongo. Mediante el análisis genético comparativo de cepas productoras de tricotecenos (gen *TRI5*<sup>+</sup>) y no productoras (gen *TRI5*<sup>-</sup>), pudo comprobarse que las cepas *TRI5*<sup>+</sup> eran más agresivas.



Micotoxina	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Deoxinivalenol	OH	H	OH	OH
Nivalenol	OH	OH	OH	OH
15-acetildeoxinivalenol	OH	H	O Ac	OH
3-acetildeoxinivalenol	O Ac	H	OH	OH

**Figura 7:** Estructura química básica de los tricotecenos.

La fitotoxicidad del DON se asocia a la capacidad de inhibir la síntesis proteica y de desencadenar la muerte celular debido a pérdida de electrolitos. Además, su consumo ha sido asociado con hemorragias, vómitos y anemia en animales (Marasas *et al.*, 1984). DON es soluble en agua y avanza por delante de las hifas colonizadoras. Tres días después de la infección, la toxina se localiza en los haces vasculares del raquis y a los 10 días se detecta en espiguillas aún no colonizadas, debido a su movilización basípeta y acrópeta por el floema del raquis (Pritsch *et al.*, 2000).

Los aislamientos de *F. graminearum* pueden pertenecer a diferentes quimiotipos de acuerdo al tipo de micotoxina que produzcan, los más importantes son:

**1)** Quimiotipo NIV, productores de nivalenol y su derivado acetilado fusarenona-X (FUS-X).

**2)** Quimiotipo DON, productores de deoxinivalenol y sus derivados acetilados. Este último quimiotipo mencionado, puede ser dividido en:

**a)** Quimiotipo 3-ADON (productores de DON y 3-acetilDON).

**b)** Quimiotipo 15-ADON (productores de DON y 15-acetilDON) (Ward *et al.*, 2002).

En distintos trabajos científicos se han detectado diferencias en la distribución geográfica de los aislamientos *F. graminearum* de algún quimiotipo dado (Wang *et al.*, 2011; Pasquali & Migheli, 2014) y teorías que sugieren que la especialización de un quimiotipo determinado se correspondería con el hospedante del cual procede un

aislamiento (Pasquali & Migheli, 2014). Las diferencias estructurales entre los quimiotipos podrían tener consecuencias sobre el comportamiento de las cepas, ya que los patrones específicos de oxigenación y acetilación podrían modificar la bioactividad y a menudo la fitotoxicidad de estos compuestos (Lee *et al.*, 2002; Ward *et al.*, 2002). En la Argentina en una evaluación bajo condiciones de campo se ha demostrado una gran variabilidad en la agresividad de aislamientos de *F. graminearum* procedentes de trigo (Malbrán *et al.*, 2012) y esa variabilidad también se ha detectado en la capacidad toxicogénica (Malbrán *et al.*, 2014), siendo el quimiotipo DON y su acetilado 15-ADON los encontrados. Sin embargo, en aislamientos de *F. graminearum* obtenidos de maíz la caracterización genotípica de los quimiotipos dio como resultado una mayor proporción de productores de NIV (Sampietro *et al.*, 2013). La presencia de aislamientos con genotipo de tricoteceno NIV resulta de gran relevancia, debido a que ésta toxina es más tóxica que DON en ratones y posiblemente en humanos (Yoshizawa & Morooka, 1977). Por lo tanto, la ocurrencia de NIV podría tener mayor significancia con respecto a la salud pública.

Con respecto a este quimiotipo, Pasquali & Migheli (2014) han reagrupado varias especies botánicas donde se ha podido identificar dicho quimiotipo. Entre ellas encontramos trigo, maíz, soja, avena, arroz, remolacha azucarera, papa, sorgo, centeno, banana, triticale, nogal, espárragos, *Cirsium* sp, puerro, entre otros.

#### Efectos en humanos y animales:

Los tricotecenos DON y NIV no solo son importantes por su papel en la capacidad patógena de *F. graminearum* sobre trigo y otras especies botánicas, sino que también juegan un papel muy importante en la salud animal, principalmente cerdos y pollos (Luo, 1988), provocando una amplia variedad de perjuicios incluyendo mortalidad, irritación, necrosis gastrointestinal y de piel, desórdenes hematológicos (inicialmente leucocitosis seguida de leucopenia), diarreas, vómitos, pérdida de apetito, dolores de cabeza y vértigos (Bennett & Klich, 2003). El ganado vacuno es más tolerante a la presencia de DON ya que es detoxificado por las bacterias del rumen (Charmley *et al.*, 1993).

La presencia de importantes micotoxicosis en humanos relacionadas con la contaminación de alimentos con DON, ha sido citada en Japón y en otras partes del mundo (Miller, 1990). Hasta el momento, no se ha podido probar que las toxinas tengan efectos cancerígenos (Champbeil *et al.*, 2004). A pesar de ello, como resultado de los efectos adversos que provocan las micotoxinas, muchos países han incluido límites máximos de DON en productos de consumo humano y animal. En 1982, la Administración

de Medicamentos y Alimentos (FDA) emitió un comunicado oficial de recomendación de un nivel máximo de DON de 2 ppm en el trigo destinado a molienda. Luego el límite de DON en harinas y salvado para consumo humano se redujo a 1 ppm (Jones & Mirocha, 1999).

## HIPOTESIS

Los quimiotipos de *Fusarium graminearum* presentes en los hospedantes alternativos tales como las malezas, difieren de los quimiotipos presentes en los residuos de los cereales de cultivo.

## OBJETIVOS GENERALES

- Identificar especies botánicas gramíneas y no gramíneas como potenciales fuentes de inóculo de *F. graminearum*.
- Identificar los quimiotipos de *F. graminearum* presentes en especies pertenecientes a distintas familias botánicas.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar a *Fusarium* spp. a partir de inflorescencias de especies pertenecientes a distintas familias botánicas
- Identificar mediante caracteres taxonómicos los aislamientos de *F. graminearum* y *Fusarium* spp.
- Caracterizar molecularmente a los aislamientos identificados como *F. graminearum*.
- Caracterizar molecularmente los quimiotipos de los aislamientos identificados como *F. graminearum*.

## MATERIALES Y METODOS

### **Recolección de especies vegetales y aislamiento de *Fusarium* spp.**

Se recolectaron especies botánicas en estado de floración en la zona de Carlos Casares, Tres Arroyos y La Plata (Prov. de Buenos Aires), pertenecientes a distintas familias botánicas y se identificaron las especies muestreadas de acuerdo a su morfología mediante las claves de identificación desarrolladas por Cabrera & Zardini (1993).

Se realizaron aislamientos a partir de las inflorescencias, las cuales fueron colocadas en placas de Petri con medio de cultivo Agar Papa Glucosado (APG) con el agregado de Cloranfenicol (250 mg/L) y 0,6 mg/L de Pentacloronitrobenzeno (PCNB 75% polvo mojable). Por cada placa se colocaron 5 piezas de inflorescencias, las cuales se incubaron durante 5-7 días a 25°C.

### **Identificación micológica**

Se realizó la identificación de las colonias de *Fusarium* spp. y de *F. graminearum* obtenidas, de acuerdo a las características culturales, a la morfología de las esporas y de las células conidiógenas de las especies (Booth, 1971; Nelson *et al.*, 1983; Leslie & Summerell, 2006). Se obtuvieron cultivos monospóricos de los distintos aislamientos obtenidos, para ello se provocó la producción de esporas mediante su siembra en viales con 6 ml de medio de cultivo líquido Carboximetil celulosa (CMC) en baño térmico a 23°C ± 2°C en agitación constante a 45 revoluciones min<sup>-1</sup> por 2 días (Cappellini & Peterson, 1965).

### **Caracterización Molecular**

Para la extracción de ADN se empleó un kit comercial. El micelio proveniente de cultivos monospóricos de *F. graminearum* fue congelado en nitrógeno líquido, molido en mortero y se pasó a un microtubo de 1,5 mL. Se añadieron 600 µL de solución de lisis nuclear (Promega), se mezcló brevemente en vortex para homogeneizar el tejido y se incubó a 65°C durante 30 min. Se agregaron 3 µL de solución de RNAsa (10 µg/µL; Sigma), se mezcló invirtiendo el tubo, se incubó a 37°C durante 15 min y se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente durante 5 min. Se añadieron 200 µL de solución de precipitación de proteínas (Promega), se mezcló vigorosamente, se centrifugó durante 3 min a 16.000 g y se recuperó el sobrenadante, conteniendo el ADN, el cual fue transferido

a un tubo de 1,5 mL limpio con 600 µL de isopropanol a temperatura ambiente. Se centrifugó a 16.000 g durante 1 min, se decantó el sobrenadante y el precipitado obtenido se lavó añadiendo 600 µL de etanol al 70% y centrifugando a 16.000 g por 1 min. Se secó el pellet y se rehidrató en 100 µL de buffer TE a 37°C.

La confirmación de la presencia de *F. graminearum* se realizó molecularmente mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los primers especie-específicos Fg16NF (5'-ACA GAT GAC AAG ATT CAG GCA CA-3') y Fg16NR (5'-TTC TTT GAC ATC TGT TCA ACC CA-3') (Nicholson *et al.*, 1998) de acuerdo al procedimiento descrito por Malbrán *et al.* (2012). Para ello, a partir de cultivos monospóricos, se recolectó el micelio y se efectuó la extracción de ADN genómico usando el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI).

### **Caracterización de quimiotipos**

Los aislamientos coleccionados se analizaron en cuanto a su capacidad toxicogénica con el propósito de identificar el quimiotipo de los mismos. Para ello, se realizaron reacciones de PCR múltiple utilizando *primers* específicos para cada quimiotipo posible (Starkey *et al.*, 2007). Los *primers* utilizados fueron: 12CON (5' – CAT GAG CAT GGT GAT GTC – 3') común a todos los quimiotipos, 12NF (5' - TCT CCT CGT TGT ATC TGG – 3'), 12-15F (5' - TAC AGC GGT CGC AAC TTC – 3'), y 12-3F (5' - CTT TGG CAA GCC CGT GCA – 3'). Esta reacción múltiple produce amplicones de aproximadamente 840, 670, y 410 bp con aislamientos que tienen quimiotipo NIV, 15-ADON, y 3-ADON, respectivamente. Las reacciones de amplificación se realizaron en el termociclador PTC-150 MiniCycler™ (M.J.Research, INC, EE.UU.). La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 µL, conteniendo 5-10 ng de ADN fúngico, 200 µM de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0,2 µM de cada uno de los *primers* (FAGOS/Ruralex, Argentina), 0,5 unidades de Taq polimerasa (Highway Molecular Biology-InBio-UNICEN-Tandil, Argentina), 1,5 µM Cl<sub>2</sub>Mg, y 1X buffer de reacción (50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl, 1% Triton X-100). El programa de ciclado consistió en un paso de desnaturalización inicial de 3 min a 94°C; seguido por 25 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 53°C, y 1 min a 72°C; y un paso de extensión final de 5 min a 72°C. Hasta su recuperación las reacciones fueron mantenidas a 15°C.

Los productos de PCR y la cantidad/calidad de ADN se analizaron por electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (0,2 mg/mL) junto con el marcador de peso molecular escalonado de 100 bp (Fermentas, EE.UU.).



Todas las reacciones incluyeron un control positivo, uno negativo y un control de las condiciones de reacción.

## RESULTADOS

### Recolección de especies vegetales y aislamiento de *Fusarium* spp.

A partir de la recolección de 105 muestras de plantas en estado de floración (66 recolectadas en La Plata, 26 en Carlos Casares y 13 en Tres Arroyos), se identificaron 43 especies botánicas, pertenecientes a 16 familias distintas, de acuerdo a su morfología según la clave desarrollada por Cabrera & Zardini (1993).

De los cultivos de las inflorescencias (Figura 8) se obtuvieron 61 aislamientos del género *Fusarium* (58% del total), éstas fueron aisladas de 35 especies vegetales pertenecientes a 14 familias botánicas (Tabla 2). El 34% de los aislamientos se obtuvo de la familia Poaceas. Del total, 38 aislamientos provinieron de La Plata, 14 de Carlos Casares y 9 de Tres Arroyos (Figura 9). Es importante resaltar que ninguna de las plantas muestreadas presentaron síntomas de infección fúngica.

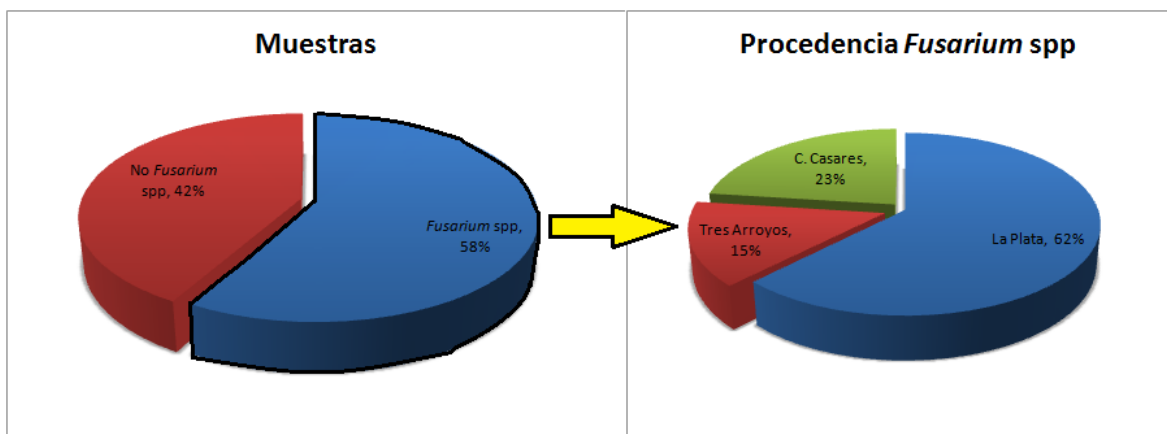


**Figura 8:** Aislamiento de *Fusarium* spp. a partir de inflorescencias de especies botánicas sobre medio de cultivo APG.

**Tabla 2:** Zona de muestreo, especies y familias de especies botánicas de las cuales se obtuvieron los aislamientos de *Fusarium* spp.

N° muestra	Especie botánica			Lugar recolección	<i>Fusarium</i> spp aislado		
	Nombre científico	Nombre vulgar	Familia				
1	<i>Alternanthera sessilis</i>	Cresta de gallo	Amarantaceas	LP	+		
2	<i>Alternanthera sessilis</i>	Cresta de gallo			+		
3	<i>Gamochaeta spicata</i>	Vira Vira	Asteraceas	LP	+		
4	<i>Gamochaeta spicata</i>	Vira Vira			-		
5	<i>Gamochaeta spicata</i>	Vira Vira			+		
6	<i>Matricaria chamomilla</i>	Manzanilla			+		
7	<i>Gamochaeta spicata</i>	Vira Vira			-		
8	<i>Sonchus oleraceus</i>	Cerraja			+		
9	<i>Sonchus oleraceus</i>	Cerraja			+		
10	<i>Taraxacum officinalis</i>	Diente de león			-		
11	<i>Matricaria chamomilla</i>	Manzanilla			+		
12	<i>Matricaria chamomilla</i>	Manzanilla			-		
13	<i>Sonchus oleraceus</i>	Cerraja		+			
14	<i>Sonchus oleraceus</i>	Cerraja		-			
15	<i>Conyza bonariensis</i>	Rama negra		+			
16	<i>Solidago chinensis</i>	Vara Amarilla		-			
17	<i>Solidago chinensis</i>	Vara Amarilla		+			
18	<i>Carduus acanthoides</i>	Cardo		-			
19	<i>Carduus acanthoides</i>	Cardo		+			
20	<i>Conyza bonariensis</i>	Rama negra		-			
21	<i>Conyza bonariensis</i>	Rama negra		+			
22	<i>Cyclosporum leptophyllum</i>	Apio cimarrón		Apiaceas	LP	+	
23	<i>Diplotaxis tenuifolia</i>	Flor Amarilla	Brassicaceas	CC	-		
24	<i>Diplotaxis tenuifolia</i>	Flor Amarilla			+		
25	<i>Cyperus rotundus</i>	Cípero	Ciperaceas	LP	-		
26	<i>Tradescantia fluminensis</i>	Flor de Sta Lucía	Commelinaceas	LP	+		
27	<i>Tradescantia fluminensis</i>	Flor de Sta Lucía			-		
28	<i>Cucurbita andreana</i>	Zapallito Amargo	Cucurbitaceas	CC	-		
29	<i>Cucurbita andreana</i>	Zapallito Amargo			-		
30	<i>Trifolium repens</i>	Trébol blanco	Fabaceas	LP	-		
31	<i>Trifolium repens</i>	Trébol blanco			-		
32	<i>Trifolium pratense</i>	Trébol rojo			-		
33	<i>Trifolium pratense</i>	Trébol rojo			-		
34	<i>Melilotus officinalis</i>	Trébol de olor amarillo			-		
35	<i>Melilotus officinalis</i>	Trébol de olor amarillo			-		
36	<i>Gleditsia triacanthos</i>	Acacia negra			+		
37	<i>Gleditsia triacanthos</i>	Acacia negra			+		
38	<i>Trifolium repens</i>	Trébol blanco			TA	+	
39	<i>Trifolium repens</i>	Trébol blanco				-	
40	<i>Trifolium pratense</i>	Trébol rojo		CC	+		
41	<i>Trifolium pratense</i>	Trébol rojo			-		
42	<i>Glycine max</i>	Soja			+		
43	<i>Glycine max</i>	Soja			+		
44	<i>Melilotus albus</i>	Trébol de olor blanco			+		
45	<i>Melilotus albus</i>	Trébol de olor blanco			-		
46	<i>Melilotus albus</i>	Trébol de olor blanco			+		
47	<i>Linum usitatissimum</i>	Lino			Linaceas	LP	-
48	<i>Linum usitatissimum</i>	Lino					-
49	<i>Linum strictum</i>	Linillo					-
50	<i>Linum strictum</i>	Linillo	+				

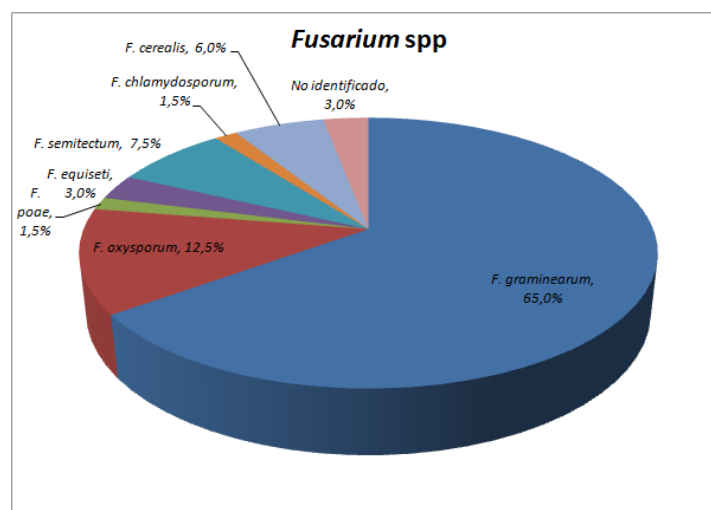
51	<i>Oxalis corniculata</i>	Oca	Oxalidaceas	LP	+	
52	<i>Oxalis corniculata</i>	Oca			+	
53	<i>Oxalis violacea</i>	Oca violeta			+	
54	<i>Oxalis violacea</i>	Oca violeta			+	
55	<i>Fumaria capreolata</i>	Fumaria	Papaveraceas	LP	+	
56	<i>Fumaria capreolata</i>	Flor de pajarito			+	
57	<i>Fumaria capreolata</i>	Flor de pajarito			-	
58	<i>Fumaria capreolata</i>	Flor de pajarito			+	
59	<i>Veronica persica</i>	Veronica	Plantaginaceas	LP	+	
60	<i>Veronica persica</i>	Veronica			+	
61	<i>Echinochloa crusgalli</i>	Capin	Poaceas	LP	-	
62	<i>Echinochloa crusgalli</i>	Capin			+	
63	<i>Bromus catharticus</i>	Cebadilla			+	
64	<i>Paspalum vaginatum</i>	Pasto horqueta			+	
65	<i>Paspalum vaginatum</i>	Pasto horqueta			-	
66	<i>Digitaria sanguinalis</i>	Pasto cuaresma			-	
67	<i>Digitaria sanguinalis</i>	Pasto cuaresma			+	
68	<i>Phalaris tuberosa</i>	Falaris			-	
69	<i>Phalaris tuberosa</i>	Falaris			+	
70	<i>Lolium multiflorum</i>	Raigrás anual			+	
71	<i>Lolium multiflorum</i>	Raigrás anual			+	
72	<i>Dactylis glomerata</i>	Pasto Ovillo			+	
73	<i>Dactylis glomerata</i>	Pasto Ovillo			-	
74	<i>Bromus catharticus</i>	Cebadilla			-	
75	<i>Bromus catharticus</i>	Cebadilla			-	
76	<i>Panicum dichotomiflorum</i>	Panicum			-	
77	<i>Panicum dichotomiflorum</i>	Panicum			-	
78	<i>Cenchrus echinatus</i>	Ojo de hormiga			+	
79	<i>Cenchrus echinatus</i>	Ojo de hormiga			+	
80	<i>Sorghum halepense</i>	Sorgo de Alepo			+	
81	<i>Sorghum halepense</i>	Sorgo de Alepo			-	
82	<i>Lolium perenne</i>	Raigrás perenne			CC	+
83	<i>Lolium perenne</i>	Raigrás perenne				+
84	<i>Sorghum halepense</i>	Sorgo de Alepo				-
85	<i>Sorghum halepense</i>	Sorgo de Alepo				-
86	<i>Bromus catharticus</i>	Cebadilla				+
87	<i>Bromus catharticus</i>	Cebadilla			-	
88	<i>Paspalum dilatatum</i>	Pasto miel			TA	+
89	<i>Paspalum dilatatum</i>	Pasto miel				-
90	<i>Paspalum dilatatum</i>	Pasto miel				+
91	<i>Cynodon dactylon</i>	Gramilla				+
92	<i>Zea mays</i>	Maíz				-
93	<i>Zea mays</i>	Maíz				+
94	<i>Echinochloa crusgalli</i>	Capin				+
95	<i>Bromus catharticus</i>	Cebadilla	+			
96	<i>Bromus catharticus</i>	Cebadilla	+			
97	<i>Rumex crispus</i>	Lengua de vaca	Polygonaceas	LP		+
98	<i>Rumex crispus</i>	Lengua de vaca			+	
99	<i>Solanum mauritianum</i>	Fumo bravo	Solanaceas	LP	-	
100	<i>Solanum mauritianum</i>	Fumo bravo			+	
101	<i>Solanum mauritianum</i>	Fumo bravo			-	
102	<i>Datura ferox</i>	Chamico		CC	+	
103	<i>Datura ferox</i>	Chamico			-	
104	<i>Urtica sp.</i>	Ortiga		Urticaceas	LP	+
105	<i>Urtica sp.</i>	Ortiga	+			



**Figura 9:** Porcentajes de aislamientos de *Fusarium* spp. obtenidos. Izquierda- Porcentaje total de *Fusarium* spp. en el total de muestreos realizados. Derecha- Porcentaje de aislamientos correspondientes al género *Fusarium* de acuerdo a su procedencia.

### Caracterización morfológica y cultural

De acuerdo a las características culturales y morfológicas de cada aislamiento, se encontró a *F. graminearum* como la especie predominante colonizando las inflorescencias de malezas y otras especies vegetales (Tabla 3). Sin embargo también se identificaron: un aislamiento de *F. poae*, 7 de *F. oxysporum*, 4 de *F. cerealis*, 5 de *F. semitectum*, 2 de *F. equiseti* y uno de *F. chlamyosporum* (Figura 10, 11, 12 y 13). Hubieron dos aislamientos que fueron identificados dentro del género *Fusarium* pero no se pudo confirmar a que especie pertenecían (aislamientos 13 y 102). Las características de las especies encontradas se presentan en la tabla 4, y coinciden con los caracteres descriptos por Booth (1971) y Leslie & Summerell (2006).



**Figura 10:** Especies del género *Fusarium* encontradas colonizando inflorescencias de especies botánicas.

Se encontraron por primera vez a 10 especies vegetales como hospedantes alternativos de *F. graminearum*. Las mismas correspondieron a las siguientes especies: *Alternanthera sessilis*, *Matricaria chamomilla*, *Carduus acanthoides*, *Diplotaxis tenuifolia*, *Gleditsia triacanthos*, *Melilotus albus*, *Oxalis corniculata*, *Cenchrus echinatus*, *Lolium perenne* y *Solanum mauritianum*.

**Tabla 3:** Especies botánicas y de *Fusarium*, muestreadas y obtenidas en este estudio de acuerdo a la caracterización morfocultural.

N° muestra	Especie botánica	<i>Fusarium</i> spp aislado
	Nombre científico	
1	<i>Alternanthera sessilis</i>	<i>F. graminearum</i>
2	<i>Alternanthera sessilis</i>	<i>F. oxysporum</i>
3	<i>Gamochoaeta spicata</i>	<i>F. graminearum</i>
5	<i>Gamochoaeta spicata</i>	<i>F. chlamydosporum</i>
6	<i>Matricaria chamomilla</i>	<i>F. graminearum</i>
8	<i>Sonchus oleraceus</i>	<i>F. oxysporum</i>
9	<i>Sonchus oleraceus</i>	<i>F. oxysporum</i>
11	<i>Matricaria chamomilla</i>	<i>F. equiseti</i>
13	<i>Sonchus oleraceus</i>	N/D
15	<i>Conyza bonariensis</i>	<i>F. equiseti</i>
17	<i>Solidago chinensis</i>	<i>F. graminearum</i>
19	<i>Carduus acanthoides</i>	<i>F. graminearum</i>
21	<i>Conyza bonariensis</i>	<i>F. graminearum</i>
22	<i>Cyclosporum leptophyllum</i>	<i>F. graminearum</i>
24	<i>Diplotaxis tenuifolia</i>	<i>F. graminearum</i>
26	<i>Tradescantia fluminensis</i>	<i>F. semitectum</i>
36	<i>Gleditsia triacanthos</i>	<i>F. graminearum</i>
37	<i>Gleditsia triacanthos</i>	<i>F. oxysporum</i>
38	<i>Trifolium repens</i>	<i>F. graminearum</i>
40	<i>Trifolium pratense</i>	<i>F. graminearum</i>
42	<i>Glycine max</i>	<i>F. graminearum</i>
43	<i>Glycine max</i>	<i>F. graminearum</i>
44	<i>Melilotus albus</i>	<i>F. graminearum</i>
46	<i>Melilotus albus</i>	<i>F. graminearum</i>
50	<i>Linum strictum</i>	<i>F. oxysporum</i>
51	<i>Oxalis corniculata</i>	<i>F. graminearum</i>
52	<i>Oxalis corniculata</i>	<i>F. graminearum</i>
53	<i>Oxalis violacea</i>	<i>F. cerealis</i>
54	<i>Oxalis violacea</i>	<i>F. cerealis</i>
55	<i>Fumaria capreolata</i>	<i>F. graminearum</i>
56	<i>Fumaria capreolata</i>	<i>F. graminearum</i>
58	<i>Fumaria capreolata</i>	<i>F. semitectum</i>
59	<i>Veronica persica</i>	<i>F. cerealis</i>
60	<i>Veronica persica</i>	<i>F. cerealis</i>

62	<i>Echinochloa crusgalli</i>	<i>F. graminearum</i>
63	<i>Bromus catharticus</i>	<i>F. graminearum</i>
64	<i>Paspalum vaginatum</i>	<i>F. oxysporum</i>
67	<i>Digitaria sanguinalis</i>	<i>F. oxysporum</i>
69	<i>Phalaris tuberosa</i>	<i>F. semitectum</i>
70	<i>Lolium multiflorum</i>	<i>F. graminearum</i>
71	<i>Lolium multiflorum</i>	<i>F. graminearum</i>
72	<i>Dactylis glomerata</i>	<i>F. graminearum</i>
78	<i>Cenchrus echinatus</i>	<i>F. graminearum</i>
79	<i>Cenchrus echinatus</i>	<i>F. graminearum</i>
80	<i>Sorghum halepense</i>	<i>F. graminearum</i>
82	<i>Lolium perenne</i>	<i>F. graminearum</i>
83	<i>Lolium perenne</i>	<i>F. graminearum</i>
86	<i>Bromus catharticus</i>	<i>F. poae</i>
88	<i>Paspalum dilatatum</i>	<i>F. graminearum</i>
90	<i>Paspalum dilatatum</i>	<i>F. graminearum</i>
91	<i>Cynodon dactylon</i>	<i>F. graminearum</i>
93	<i>Zea mays</i>	<i>F. graminearum</i>
94	<i>Echinochloa crusgalli</i>	<i>F. graminearum</i>
95	<i>Bromus catharticus</i>	<i>F. graminearum</i>
96	<i>Bromus catharticus</i>	<i>F. graminearum</i>
97	<i>Rumex crispus</i>	<i>F. graminearum</i>
98	<i>Rumex crispus</i>	<i>F. graminearum</i>
100	<i>Solanum mauritianum</i>	<i>F. graminearum</i>
102	<i>Datura ferox</i>	N/D
104	<i>Urtica</i> sp.	<i>F. semitectum</i>
105	<i>Urtica</i> sp.	<i>F. semitectum</i>

N/D = No Determinada

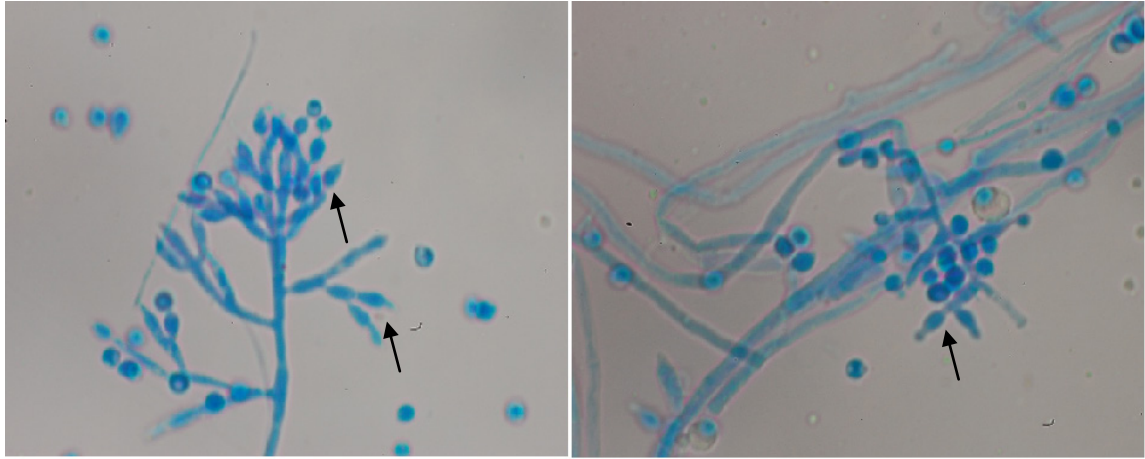
**Tabla 4:** Observación de las características morfoculturales de las diferentes especies de *Fusarium* aisladas. Características culturales y morfología de los conidios.

	Características Culturales			
	Diámetro colonia en 4 días	Pigmento en agar	Coloración micelio	Esporoquios o pionnotes
<i>F. oxysporum</i> (Snyder & Hansen)	4.5 cm	Violeta o magenta oscuro	Blanco o violeta pálido	Naranja pálido
<i>F. chlamydosporum</i> (sin. <i>F. fusarioides</i> ) (Wollenweber & Reinking)	4.5 cm	Rosa pálido a bordo	Marrón pálido	No siempre produce
<i>F. equiseti</i> (Saccardo)	5.9 cm	Marrón pálido a oscuro	Primero blanco, luego marrón	Naranja
<i>F. poae</i> (Wollenweber)	7.6 cm	De rojo a amarillo	De pálido a marrón rojizo	No siempre produce
<i>F. semitectum</i> (sin. <i>F. pallidroseum</i> ) (Berkeley & Ravenel)	6.1 cm	Marrón	Primero blanco, luego beige o marrón	No siempre produce
<i>F. cerealis</i> (sin. <i>F. crookwellense</i> ) (Burgess, Nelson & Toussoun)	9.0 cm	Rojo	Marrón	Naranja pálido a marrón oscuro

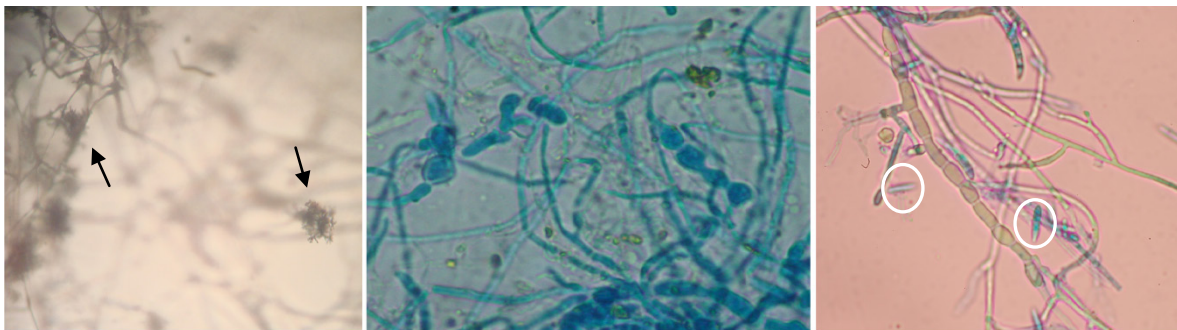
	Características morfológicas - MACROCONIDIOS				
	Morfología	Célula apical	Célula basal	Número septos	Presencia
<i>F. oxysporum</i> (Snyder & Hansen)	Cortas. Recta o ligeramente curvada.	Cónica y curva	En forma de pie	3	Abundantes
<i>F. chlamydosporum</i> (sin. <i>F. fusarioides</i> ) (Wollenweber & Reinking)	Paredes gruesas	Corta, curva y puntiaguda	En forma de pie	3 a 5	Escasos
<i>F. equiseti</i> (Saccardo)	Largas y delgadas	Cónica y alargada	Forma de pie pronunciada	5 a 7	Abundantes
<i>F. poae</i> (Wollenweber)	Robustas y cortas	Curva y estrechándose	Forma de pie pronunciada	3 a 5	Escasos
<i>F. semitectum</i> (sin. <i>F. pallidroseum</i> ) (Berkeley & Ravenel)	Delgada y algo curvada	Curva y estrechándose	En forma de pie	3 a 5	Escasos
<i>F. cerealis</i> (sin. <i>F. crookwellense</i> ) (Burgess, Nelson & Toussoun)	Robustas. Zona dorsal curva y ventral recta	Curva y estrechándose	Forma de pie pronunciada	5	Abundantes

	Características morfológicas					
	MICRO / MESOCONIDIOS				CLAMIDOSPORAS	
	Forma	Presentación	Células conidiógenas	Presencia	Presencia	Apariencia
<i>F. oxysporum</i> (Snyder & Hansen)	Óvalo, elíptico. No septado	Dispuestos en falsas cabezas	Monofiálides cortas	Abundante	Abundantes	Solitarias o agrupadas. Pared lisa o rugosa
<i>F. chlamydosporum</i> (sin. <i>F. fusarioides</i> ) (Wollenweber & Reinking)	Recto o curvado. No septado.	Individuales	Polifiálides ramificada	Abundante	Abundantes	En cadenas o agrupadas. Pared rugosa.
<i>F. equiseti</i> (Saccardo)	Ausentes				Abundantes	Solitarias, en cadenas o agrupadas. Pared rugosa
<i>F. poae</i> (Wollenweber)	Globosa. No septada.	En grupos, en "racimos de uva"	Monofiálides en forma de botella	Abundante	Escasa	Forma globosa y pared lisa.
<i>F. semitectum</i> (sin. <i>F. pallidroseum</i> ) (Berkeley & Ravenel)	Microconidios con un septo. Mesoconidios con 3 a 5 septos.	Individuales. A menudo dan apariencia de "oreja de conejo"	Mono y polifiálides	Microconidios escasos. Mesoconidios abundantes.	Escasa	Forma globosa y pared lisa.
<i>F. cerealis</i> (sin. <i>F. crookwellense</i> ) (Burgess, Nelson & Toussoun)	Ausentes				Abundantes	En cadenas o agrupadas. Pared lisa

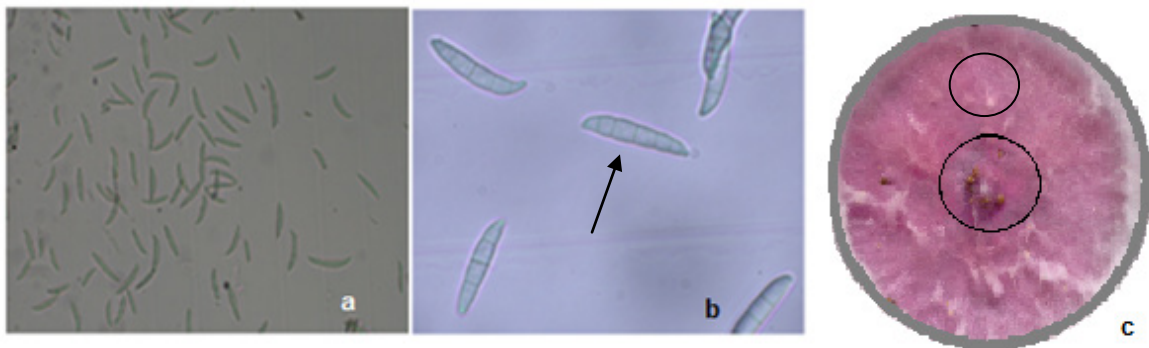




**Figura 11:** *Fusarium poae*. Microfotografía de microconidios y células conidiógenas en forma de botella.



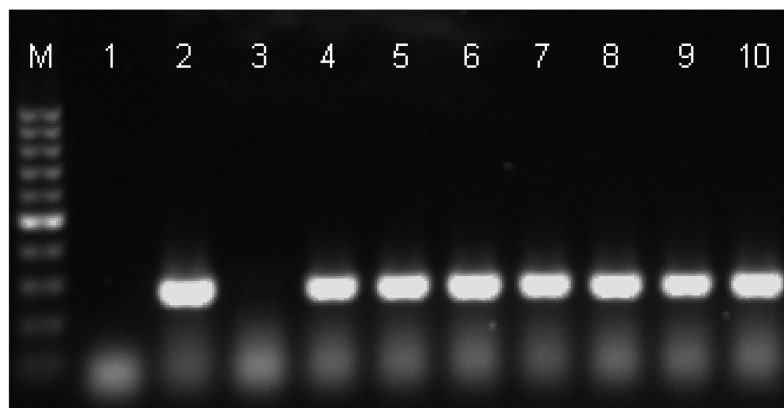
**Figura 12:** *Fusarium chlamydosporum*. Microfotografía de células conidiógenas, clamidosporas abundantes y en cadena, y microconidios rectos.



**Figura 13:** *Fusarium cerealis*. Microfotografía de macroconidios (a y b). Pionnotes en APG (c).

### Caracterización molecular

Las amplificaciones realizadas permitieron observar la banda específica esperada de 280 bp, correspondiente a aislamientos de *F. graminearum* (Figura 14 y Tabla 5).



**Figura 14:** Gel de electroforesis de los productos de PCR amplificados con los *primers* Fg16N. Líneas: M= Marcador de peso molecular; 1= Control negativo (Agua); 2= Control positivo (Aislamiento IV<sub>13</sub> de *F. graminearum*); 3= Control negativo (Aislamiento de *F. poae*); 4-10= Aislamientos de malezas.

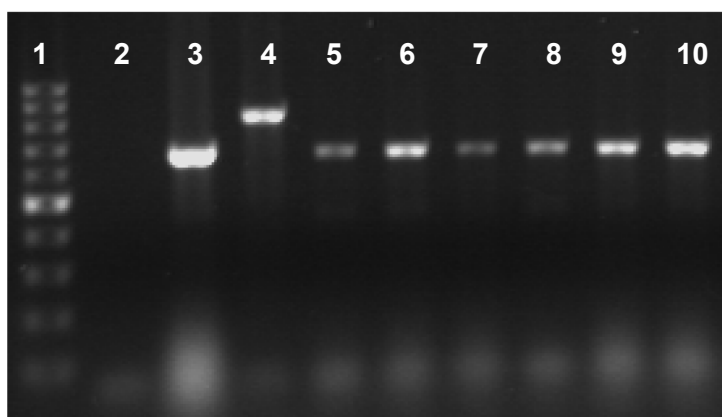
**Tabla 5:** Aislamientos de *Fusarium graminearum* identificados morfoculturalmente y mediante PCR obtenidos a partir de inflorescencias de las especies botánicas muestreadas.

N° muestra	Especie botánica	PCR Fg16N
	Nombre científico	
1	<i>Alternanthera sessilis</i>	+
3	<i>Gamochaeta spicata</i>	+
6	<i>Matricaria chamomilla</i>	+
17	<i>Solidago chinensis</i>	+
19	<i>Carduus acanthoides</i>	+
21	<i>Conyza bonariensis</i>	+
22	<i>Cyclosporum leptophyllum</i>	+
24	<i>Diploaxis tenuifolia</i>	+
36	<i>Gleditsia triacanthos</i>	+
38	<i>Trifolium repens</i>	+
40	<i>Trifolium pratense</i>	+
42	<i>Glycine max</i>	+
43	<i>Glycine max</i>	+
44	<i>Melilotus albus</i>	+
46	<i>Melilotus albus</i>	+
51	<i>Oxalis corniculata</i>	+
52	<i>Oxalis corniculata</i>	+
55	<i>Fumaria capreolata</i>	+
56	<i>Fumaria capreolata</i>	+
62	<i>Echinochloa crusgalli</i>	+
63	<i>Bromus catharticus</i>	+
70	<i>Lolium multiflorum</i>	+
71	<i>Lolium multiflorum</i>	+
72	<i>Dactylis glomerata</i>	+

78	<i>Cenchrus echinatus</i>	+
79	<i>Cenchrus echinatus</i>	+
80	<i>Sorghum halepense</i>	+
82	<i>Lolium perenne</i>	+
83	<i>Lolium perenne</i>	+
88	<i>Paspalum dilatatum</i>	+
90	<i>Paspalum dilatatum</i>	+
91	<i>Cynodon dactylon</i>	+
93	<i>Zea mays</i>	+
94	<i>Echinochloa crusgalli</i>	+
95	<i>Bromus catharticus</i>	+
96	<i>Bromus catharticus</i>	+
97	<i>Rumex crispus</i>	+
98	<i>Rumex crispus</i>	+
100	<i>Solanum mauritianum</i>	+

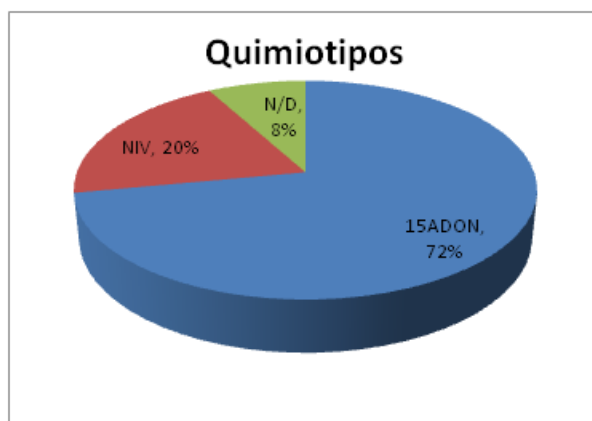
### Caracterización de quimiotipos

A partir de la realización de reacciones de PCR múltiple utilizando *primers* específicos se analizó la capacidad toxicogénica potencial de los aislamientos identificados como *F. graminearum*. Esta reacción de amplificación produjo bandas de 840 bp y 670 bp para los aislamientos con quimiotipo NIV y 15-ADON, respectivamente (Figura 15). No se encontraron aislamientos con quimiotipo 3-ADON. La mayor proporción de aislamientos (28) correspondieron al quimiotipo 15-ADON, y solo 8 aislamientos se identificaron de acuerdo a su genotipo como productores de NIV (Tabla 6). La mayoría de estos aislamientos fueron provenientes de muestras recolectadas en La Plata. Hubieron 3 aislamientos en los cuales no se pudo determinar el quimiotipo (aislamientos 43, 83 y 95) (Figura 16).



**Figura 15:** Gel de Agarosa (1,5%) sembrado con los productos de reacción de la PCR múltiple de caracterización genotípica de los quimiotipos de aislamientos de *Fusarium graminearum* obtenidos de malezas. Líneas: 1-Marcador de PM; 2-Control negativo (Agua); 3-Control positivo aislamiento 15-ADON; 4-

Control positivo aislamiento NIV; 5-10-Aislamientos obtenidos de hospedantes alternativos con quimiotipo 15-ADON.



**Figura 16:** Porcentaje de los quimiotipos obtenidos mediante la PCR múltiple desarrollada por Starkey *et al.* (2007) de los aislamientos de *Fusarium graminearum* provenientes de distintas especies botánicas.

Las especies botánicas que se comportaron como hospedantes alternativos de quimiotipos NIV fueron *Gamochaeta spicata* (Asteraceas), *Oxalis corniculata* (Oxalidaceas), *Fumaria capreolata* (Papaveraceas), y *Brumus catharticus*, *Dactylis glomerata*, *Sorghum halepense*, *Lolium perenne* (Poaceas).

**Tabla 6:** Caracterización genotípica de los quimiotipos de cada uno de los aislamientos identificados como *Fusarium graminearum*.

N° muestra	Especie botánica	Quimiotipo
	Nombre Científico	
1	<i>Alternanthera sessilis</i>	15-ADON
3	<i>Gamochaeta spicata</i>	NIV
6	<i>Matricaria chamomilla</i>	15-ADON
17	<i>Solidago chinensis</i>	15-ADON
19	<i>Carduus acanthoides</i>	15-ADON
21	<i>Conyza bonariensis</i>	15-ADON
22	<i>Cyclosporum leptophyllum</i>	15-ADON
24	<i>Diploaxis tenuifolia</i>	15-ADON
36	<i>Gleditsia triacanthos</i>	15-ADON
38	<i>Trifolium repens</i>	15-ADON
40	<i>Trifolium pratense</i>	15-ADON
42	<i>Glycine max</i>	15-ADON
43	<i>Glycine max</i>	N/D
44	<i>Melilotus albus</i>	15-ADON
46	<i>Melilotus albus</i>	15-ADON
51	<i>Oxalis corniculata</i>	NIV
52	<i>Oxalis corniculata</i>	15-ADON

55	<i>Fumaria capreolata</i>	NIV
56	<i>Fumaria capreolata</i>	NIV
62	<i>Echinochloa crusgalli</i>	15-ADON
63	<i>Bromus catharticus</i>	NIV
70	<i>Lolium multiflorum</i>	15-ADON
71	<i>Lolium multiflorum</i>	15-ADON
72	<i>Dactylis glomerata</i>	NIV
78	<i>Cenchrus echinatus</i>	15-ADON
79	<i>Cenchrus echinatus</i>	15-ADON
80	<i>Sorghum halepense</i>	NIV
82	<i>Lolium perenne</i>	NIV
83	<i>Lolium perenne</i>	N/D
88	<i>Paspalum dilatatum</i>	15-ADON
90	<i>Paspalum dilatatum</i>	15-ADON
91	<i>Cynodon dactylon</i>	15-ADON
93	<i>Zea mays</i>	15-ADON
94	<i>Echinochloa crusgalli</i>	15-ADON
95	<i>Bromus catharticus</i>	N/D
96	<i>Bromus catharticus</i>	15-ADON
97	<i>Rumex crispus</i>	15-ADON
98	<i>Rumex crispus</i>	15-ADON
100	<i>Solanum mauritianum</i>	15-ADON

N/D = No Determinada

## DISCUSION

En los países productores de trigo de América del Sur, se ha postulado que las malezas podrían actuar como una importante fuente de inóculo para el desarrollo de las epidemias de la FET (Reis, 1989). El comportamiento de aquellas en el Hemisferio Sur, difiere considerablemente del que puede presentarse en el Hemisferio Norte, principalmente en los países donde las condiciones climáticas extremas tales como las temperaturas bajo cero y la caída de nevadas durante el periodo invernal, no permiten la supervivencia del patógeno en hospedantes alternativos, durante todo el año. Los trabajos realizados *in vitro* en Uruguay (Pereyra & Dill Macky, 2008) han demostrado que si bien *Fusarium graminearum* cuando está presente en las malezas gramíneas produce menor cantidad de ascosporas que sobre otros restos vegetales tales como la cebada, maíz y trigo, es importante destacar que su producción en el Hemisferio Sur es continua. También mencionan que las malezas con hábito de crecimiento estival, que permanecen secas durante el invierno y la primavera, podrían tener un rol epidemiológico en los sistemas de producción de América del Sur.

En el presente trabajo se identificaron especies botánicas gramíneas y no gramíneas como potenciales fuentes de inóculo de *F. graminearum* y de otras especies del género *Fusarium*, algunas de ellas de importancia toxicogénica tales como *F. poae*, especie productora de tricotecenos del Grupo A (Desjardins, 2006; Leslie & Summerell, 2006). Por otro lado, se identificaron los quimiotipos de aislamientos de *F. graminearum* presentes en ellas y pertenecientes a distintas familias botánicas.

Al igual que lo ha citado por Farr *et al.* (1989), Fernández & Fernández (1990), Reis (1990) y Pioli *et al.* (2004), se logró visualizar la presencia de *F. graminearum* en un amplio número de familias botánicas, dando el indicio que es una especie con un extenso rango de huéspedes. En este trabajo, de las 105 muestras de inflorescencias de especies vegetales obtenidas de La Plata (66), Carlos Casares (26) y Tres Arroyos (13), provenientes de 43 especies distintas de 16 familias botánicas, se lograron identificar 61 aislamientos pertenecientes a especies del género *Fusarium*. Esos aislamientos correspondieron a 35 especies botánicas y a 14 familias. Si bien más del 34% de ellas pertenecieron a la familia Poaceas, es notable destacar el hallazgo de este patógeno en diferentes familias tales como Amarantaceas, Asteraceas, Fabaceas, Papaveraceas, Solanaceas, entre otras. Estos resultados difieren de los hallados por Carmona *et al.*

(1999) y Pereyra & Dill-Macky (2008) donde mencionan solamente especies del género Poaceas como hospedantes alternativos de *F. graminearum*. Según los resultados obtenidos en este estudio, ninguna de las especies botánicas analizadas presentó síntomas de infección por *Fusarium* spp. o *F. graminearum*, lo cual está en concordancia con reportes previos (Jenkinson y Parry, 1994; Inch y Gilbert, 2003).

Si bien morfo culturalmente se pudieron identificar varias especies de *Fusarium*, la predominante fue *F. graminearum*, en un 65% del total, mientras que las especies tales como *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. equiseti*, *F. chlamydosporum*, *F. semitectum* y *F. cerealis* se aislaron en menor proporción. En cuanto a la localización, la mayor proporción de aislamientos de *F. graminearum* se aisló de hospedantes de la familia Poaceas, de la zona de La Plata, dato que podría coincidir con las condiciones climáticas que se dieron en dicha localidad, ya que *F. graminearum* es comúnmente encontrado en climas más húmedos, como describe Kikot, (2012). Es importante resaltar que en las tres zonas productivas se encontraron inflorescencias asintomáticas con presencia de especies *Fusarium*. Para dar continuidad al trabajo de Mourellos *et al.* (2014), en el presente estudio se amplió el número de especies vegetales citadas por primera vez como posibles fuentes de inóculo de *F. graminearum*, entre ellas *Matricaria chamomilla*, *Carduus acanthoides*, *Gleditsia triacanthos*, *Melilotus albus*, *Lolium perenne*, *Solanum mauritianum*, entre otras.

La identificación molecular se realizó únicamente con los aislamientos identificados *a priori* como *F. graminearum*, básicamente por la ausencia de *primers* especie-específicos para la caracterización de las demás especies. Sería recomendable continuar con estos estudios para poder afirmar de forma concreta la presencia de las demás especies, ya que existen PCR desarrolladas para otras como *F. poae* (Parry & Nicholson, 1996), *F. cerealis* (Yoder & Christianson, 1998), entre otros.

Se realizaron identificaciones genotípicas de quimiotipos de los 39 aislamientos que fueron identificados como *F. graminearum*, del total, 36 pudieron identificarse sus genotipos toxicogénicos, siendo el quimiotipo 15-ADON el predominante, encontrándose en 28 muestras, mientras que las 8 restantes resultaron poseer genotipo NIV. Ramírez *et al.*, (2006) al trabajar con aislamientos de *F. graminearum* obtenidos de muestras de trigo *in vivo*, encontraron que el 90% produjeron exclusivamente DON, mientras que el 10% restante produjeron DON y 3-ADON. Por su parte, Reynoso *et al.*, (2011), a partir de un grupo de 116 aislamientos de *F. graminearum* al analizar su capacidad de producción de micotoxinas *in vitro*, hallaron que 107 fueron capaces de producir DON y 15-ADON, mientras que los 9 aislamientos restantes produjeron exclusivamente DON. La presencia

de aislamientos con genotipo de tricoteceno NIV resulta de gran relevancia, debido a que esta micotoxina al evaluarla en animales de laboratorio es más tóxica que DON y posiblemente la misma respuesta se dé en humanos (Yoshizawa y Morooka, 1977). Por lo tanto, la ocurrencia de quimiotipos NIV en la población de *F. graminearum* podría ser de gran significancia con respecto a la salud pública. Aunque en el país no exista un gran número de estudios de caracterización genotípica de quimiotipos de *F. graminearum* procedentes de distintas especies vegetales, tales como las malezas, Mourellos *et al.* (2014) encontró aislamientos con quimiotipo NIV únicamente en plantas sin importancia económica, y en Nepal (Desjardins *et al.*, 2004) hallaron que el 68% de 31 aislamientos tomados de malezas se identificaron como productores de NIV.

Los aislamientos con quimiotipo NIV se obtuvieron de las malezas y especies forrajeras *Gamochaeta spicata*, *Oxalis corniculata*, *Fumaria capreolata*, *Bromus catharticus*, *Dactylis glomerata*, *Sorghum halepense* y *Lolium perenne*. Estos datos aunque son preliminares podrían demostrar una posible especificidad de un quimiotipo dado con respecto a un hospedante, tal como lo sugieren Pasquali & Migheli (2014).

A partir de la información brindada en este trabajo y a pesar de que los residuos de cultivos previos son la principal fuente de inóculo de la FET, sería clave para prevenir el desarrollo de esta patología, el manejo de las malezas durante todo el año en los campos de cultivo de especies gramíneas, en especial del trigo. Ya que quedó demostrado que las mismas actúan como hospedantes alternativos de *F. graminearum*. Esta información resulta valiosa para comprender mejor la epidemiología de *F. graminearum* y para llevar a cabo prácticas de manejo tendientes a reducir la cantidad de inóculo disponible para el desarrollo de epidemias de la FET.

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo se obtuvieron 61 aislamientos de *Fusarium* spp. a partir de inflorescencias de 105 muestras de especies vegetales.

A partir de una caracterización morfo-cultural, se logró identificar a *F. graminearum* en 39 muestras.

Además se pudieron identificar aislamientos de otras especies tales como *F. poae*, *F. semitectum*, *F. chlamydosporum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum* y *F. cerealis*, siendo en varios casos especies citadas como productoras de tricotecenos del grupo A.



En relación a la especie principalmente estudiada, por primera vez se citaron 10 hospedantes alternativos de *F. graminearum*.

A través de este estudio, el patógeno se detectó en distintos hospedantes alternativos en distintas zonas,

Se obtuvieron aislamientos de *F. graminearum* con quimiotipo 15-ADON, como también NIV a partir de fuentes de inóculo poco estudiadas, tales como las malezas y especies forrajeras.

## BIBLIOGRAFIA

- **Andersen, A.** 1948. The development of *Giberella zea* headblight of wheat. *Phytopathology*. 38: 595-611.
- **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.
- **Araus, J., Brown, H., Febrero, A., Bort, J. & Serret, M.** 1993. Ear photosynthesis, carbon isotope discrimination and the contribution of respiratory carbon dioxide to differences in grain mass in durum wheat. *Plant, Cell and Environment*. 16: 383-392.
- **Arthur, J.C.** 1891. Wheat scab. *Indiana Agricultural Experiment Station Bulletin*. 36: 192-32.
- **Bai, G.H. & Shaner, G.** 1994. Scab of wheat: prospects for control. *Plant Disease*. 78: 760-766.
- **Bennett, J.W. & Klich, M.** 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16: 497-516.
- **Bilal, V.I.** 1952. Taxonomy of the *Sporotrichiella* section of the genus *Fusarium*. *Doklady Akademii Nauk Ukrainskoj SSR*. 5: 415-419.
- **Bilal, V.I.** 1955. The Fusaria. *Biology and Systematics*. National Academy of Sciences of Ukraine. Kiev, URSS. 319 pp.
- **Bilal, V.I.** 1970. Experimental morphogenesis in the fungi of the genus *Fusarium* and their taxonomy. *Annales Academiae Scientiarum Fennicae. Serie A, IV: Biologica* 168: 7-18.
- **Bilal, V.I.** 1978. Principles of systematics and structure of phytopathogenic species of the genus *Fusarium*. *Mikrobiologicheskii Zhurnal* 40: 148-156.
- **Booth, C.** 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, UK. 237 pp.
- **Burgess, L.W.** 1981. General ecology of the fusaria. En: Nelson, P.E, Toussoun, T.A, & Cook, R.J., editores. *Fusarium: Diseases, biology and taxonomy*. University Park: The Pennsylvania State University Press. Pp. 225-235.
- **Bushnell, W.R., Hazen, B.E. & Pritsch, C.** 2003. Histology and physiology of *Fusarium* head blight. En: Leonard, K.J. & Bushnell, W.R., editores. *Fusarium Head Blight of wheat and barley*. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. Pp. 44-83.
- **Cabrera, A.L. & Zardini, E.M.** 1993. Manual de la flora de los alrededores de Buenos Aires. Editorial ACME, Buenos Aires, Argentina. 755 pp.
- **Cappellini, R.A. & Peterson, J.L.** 1965. Macroconidium formation in submerged cultures by a non-sporulating strain of *Gibberella zea*. *Mycologia*, 57: 962-966.
- **Carmona, M.A., Pioli, R. & Melo Reis, E.** 1999. Malezas hospedantes de hongos necrotrofos causantes de enfermedades en trigo y cebada cervecera en la región pampeana. *Revista de la Facultad de Agronomía, UBA*, 19: 105-110.
- **Champbeil, A.; Doré, T. & Fourbet, J.** 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.

- **Charmley, E., Trenholm, H.L., Thompson, B.K., Vudathala, D., Nicholson, J.W.G., Prelusky, D.B. & Charmley, L.L.** 1993. Influence of level of deoxynivalenol in the diet of dairy cows on feed intake, milk production, and its composition. *Journal of Dairy Science*. 76: 3580-3587.
- **Chidichimo, H. & Sempé, M.E.** 2006. Origen y Sistemática del trigo. Guía de Trabajos Prácticos de la Cátedra de Cerealicultura. FCAyF, U.N.L.P.
- **Chidichimo, H. & Sempé, M.E.** 2007. Ecología de trigo. Guía de Trabajos Prácticos de la Cátedra de Cerealicultura. FCAyF, U.N.L.P.
- **De Galich, M.T.V.** 1997. Fusarium head blight in Argentina. En: Dubin, H.J., Gilchrist, L., Reeves, J. & McNab, A., editores. *Fusarium Head Scab: global status and future prospects*. Proceedings of a Workshop held at CIMMYT, El Batán, Mexico. CIMMYT, Mexico D.F., Mexico. Pp. 19–26.
- **Desjardins, A.E.** 2006. *Fusarium* Mycotoxins Chemistry, Genetics and Biology. APS Press, St. Paul, Pp. 1–260.
- **Desjardins, A.E., Proctor, R.H., Bai, G.H., McCormick, S.P., Shaner, G., Buechley, G. & Hohn, T.H.** 1996. Reduced virulence of trichothecene-nonproducing mutants of *Gibberella zeae* in wheat field tests. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 9: 775-781.
- **Desjardins, A.E., Jarosz, A.M., Plattner, R.D., Alexander, N.J., Brown, D.W. & Jurgenson, J.E.** 2004. Patterns of trichothecene production, genetic variability, and virulence to wheat of *Fusarium graminearum* from smallholder farms in Nepal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 6341–6346.
- **De Souza, J. & Formento, N.** 2003. Estudios de antesis en trigo y su relación con la Fusariosis de Espiga (*Fusarium graminearum* y *Fusarium* spp.). INTA Parana. 2 pp.
- **Eudes, F., Collin, J., Rioux, S. & Comeau, A.** 1997. The trichothecenes, a major component of wheat scab pathogenesis. *Cereal Research Communications*. 25: 495-496
- **Farr, D., Bill, G., Chamuris, G. & Rossman, A.** 1989. Fungi on plants and plant products in the United States. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. 1252 pp.
- **Fernández, M. & Fernández, J.** 1990. Survival of wheat pathogens in wheat and soybean crop residues in southern and central Brazil. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 12: 289-294
- **Fernando, W., Paulitz, T., Seaman, W., Dutilleul, P. & Millar, J.** 1997. Head blight gradients caused by *Gibberella zeae* from area sources of inoculum in wheat field plots. *Phytopathology*. 87: 414-421.
- **Filtborg, O., Frisvad, J.C. & Svendsen, J.A.** 1983. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. 45: 581–585.
- **Garret, S.** 1970. Pathogenic root-infecting fungi. Cambridge University Press. Cambridge, UK. 294 pp.
- **Gerlach, W., & Nirenberg, H.** 1982. The genus *Fusarium* – A pictorial atlas. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt Für Landund Forstwirtschaft*. Berlin, Germany. 209: 1-405.
- **Gilbert, J. & Tekauz, A.** 2000. Recent developments in research on *Fusarium* head blight of wheat in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 22: 1-8.
- **Gordon, W.L.** 1944. The occurrence of *Fusarium* species in Canada. I. Species of *Fusarium* isolated from farm samples of cereal seed in Manitoba. *Canadian Journal of Research*. 22: 282-286.
- **Gordon, W.L.** 1960. The taxonomy and habitats of *Fusarium* species from tropical and temperate regions. *Canadian Journal of Botany*. 38: 643-658.

- Hill, N.S., Schwarz, P., Dahleen, L.S., Neate, S.M., Horsley, R., Gleen, A.E. & O'Donnell, K. 2006. ELISA Analysis for *Fusarium* in barley: Development of methodology and field assessment. *Crop Science*. 46: 2636-2642.
- Hill, N.S., Neate, S.M., Cooper, B., Horsley, R., Schwarz, P., Dahleen, L.S., Smith, K.P., O'Donnell, K. & Reeves, J. 2008. Comparison of ELISA for *Fusarium*, visual screening, and deoxynivalenol analysis of *Fusarium* head blight for barley field nurseries. *Crop Science*. 48: 1389-1398.
- Inch, S.A & Gilbert, J. 2003. Survival of *Gibberella zea* in *Fusarium*-Damage Wheat Kernels. *Plant Disease*. 87: 282-287.
- Ireta, J. & Gilchrist, L. 1994. *Fusarium* head scab of wheat (*Fusarium graminearum* Schwabe). Wheat special report N° 21b. México D.F. CIMMYT. 31 pp.
- Jenkinson, P. & Parry, D.W. 1994. Isolation of *Fusarium* spp. form common broad-leaved weeds and their pathogenicity to winter wheat. *Mycological Research*. 98: 776-780.
- Joffe, A.Z. 1986. *Fusarium* Species: Their Biology and Toxicology. John Wiley and Sons, New York City. USA. 588 pp.
- Jones, R.K. & Mirocha, C.J. 1999. Quality parameters in small grains from Minnesota affected by *Fusarium* head blight. *Plant Disease*. 83: 506–511.
- Kikot, G.E. 2012. Caracterización bioquímica, fenotípica y molecular de aislamientos de *Fusarium graminearum* provenientes de la región pampeana en relación a la patogenicidad. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP. 184 pp.
- Kikot, G.E., Moschini, R.C., Consolo, V.F., Rojo, R., Salerno, G., Hours, R.A., Gasoni, L., Arambarri, A.M. & Alconada, T.M. 2011. Occurrence of different species of *Fusarium* from wheat in relation to disease levels predicted by a weather- based model in Argentina pampas region. *Mycopathologia*. 171: 139-149.
- Koopmann, B., Karlovsky, P. & Wolf, G. 1994. Differentiation between *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* by RFLP and with species-specific DNA probes. En: Schots A., Dewey, F.M. & Oliver, R., Editores. *Modern Assays for Plant Pathogenic Fungi, Identification, Detection and Quantification*. Wallingford, UK. Centre for Agricultural Bioscience International. Pp 37–46.
- 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 and Environmental Microbiology*. 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*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 2148–2154.
- Leslie, J.F. & Summerell, B.A. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. 1st edition, Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA. 388 pp.
- Link, H.F. 1809. Observaciones in ordines plantarum naturalis. Dissetatio I. Magazin der Gesellschaft Naturforschenden. Freunde, Berlin, Germany. 3: 3-42.
- Lori, G.A., Sisterna, M.N., Haidukowski, M. & Rizzo, I. 2003. *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol contamination in the durum wheat area of Argentina. *Microbiological Research*, 158: 29-35.
- Luo, X.Y. 1988. Outbreaks of moldy cereals poisoning in China. En: *Issues in Food Safety*, Washington DC: Toxicology Forum. Pp. 56-63.

- **Malbrán, I., Mourellos, C.A., Girotti, J.R., Aulicino, M.B., Balatti, P.A. & Lori, G.A.** 2012. Aggressiveness variation of *Fusarium graminearum* isolates from Argentina following point inoculation of field grown wheat spikes. *Crop Protection*. 42: 234–243.
- **Malbrán, I., Mourellos, C.A., Girotti, J.R., Balatti, P.A. & Lori, G.A.** 2014. Toxigenic capacity and trichothecene production of *Fusarium graminearum* isolates from Argentina and its relationship with aggressiveness and fungal expansion in the wheat spike. *Phytopathology*. 104: 357–364.
- **Marasas, W.F.O., Nelson, P.E. & Tousson, T.A.** 1984. Toxigenic *Fusarium* species. Identity and mycotoxicology. Pennsylvania State University Press. 320 pp.
- **Markell, S. & Francl, L.** 2003. *Fusarium* head blight inoculum: species prevalence and *Gibberella zeae* spore type. *Plant Disease*. 87: 814-820.
- **Messiaen, C.M.** 1959. La systématique du genre *Fusarium* selon Snyder et Hansen. *Revue de Pathologie Vegetale et Entomologia Agricola*. France. 38: 253-266.
- **Messiaen, C.M. & Cassini, R.** 1968. Recherches sur la fusarioses. IV. La systématique des *Fusarium*. *Annals des Epiphyties*. 19: 387-454.
- **Miller, J.D.** 1990. Contamination of food by *Fusarium* toxins: studies from Austria-Asia Proceeding. Japanese Association of Mycotoxicology. 32: 17-24.
- **Möller, E.M., Chelkowski, J. & Geiger, H.H.** 1999. Species-specific PCR assays for the fungal pathogens *Fusarium moniliforme* and *Fusarium subglutinans* and their application to diagnose maize ear rot disease. *Journal of Phytopathology*, 147: 497-508.
- **Moschini, R. & Fortugno, C.** 1996. Predicting wheat head blight incidence using models based on meteorological factors in Pergamino, Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, 102: 211–218.
- **Moschini, R., De Galich, M., Annone, J. & Polidoro, O.** 2003. Enfoque fundamental-empírico para estimar la evolución del índice de *Fusarium* en trigo. *Revista RIA*. 31: 39-53.
- **Mourellos, C.A., Malbrán, I., Balatti, P.A., Ghiringhelli, P.D. & Lori, G.A.** 2014. Gramineous and non-gramineous weed species as alternative hosts of *Fusarium graminearum*, causal agent of *Fusarium* head blight of wheat, in Argentina. *Crop Protection*. 65: 100-104
- **Müller, E. & Loeffler, W.** 1976. *Mycology. An outline for science and medical students*. Stuttgart, Germany. Thieme Publishers. 15 pp.
- **Nelson, P.E., Tousson, T.A. & Marasas, W.F.O.** 1983. *Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University, University Park. 193 pp.
- **Nicholson, P., Simpson, D.R., Weston, G., Rezanoor, H.N., Lees, A.K., Parry, D.W. & Joyce, D.** 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 53: 17-37.
- **Nicholson, P., Gosman, N., Draeger, R., Thomsett, M., Chandler, E. & Steed, A.** 2007. The *Fusarium* head blight pathosystem: Status and knowledge of its components. En: Buck, H.T., Nisi, J.E. & Salomon, N., Editores. *Wheat Production in Stressed Environments*. Springer. Dordrecht, Netherlands. Pp 23-26.
- **Niessen, M.L. & Vogel, R.F.** 1998. Group specific PCR-detection of potential trichothecene-producing *Fusarium* spp in pure cultures and cereal samples. *Systematics and Applied Microbiology*. 21: 628–631.
- **O'Donnell, K., Cigelnik, E. & Nirenberg, H.I.** 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90: 465-493.

- **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. National Academy of Sciences. USA. 97: 7905-7910.
- **O'Donnell, K., Ward, T.J., Geiser, H.C., Kistler & Aoki, T.** 2004. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. Fungal Genetics and Biology, 41: 600-623.
- **O'Donnell, K., Ward, T.J., Aberra, D., Kistler, H.C., Aoki, T., Orwig, N., Kimura, M., Bjørnstad, Å. & Klemsdal, S.S.** 2008. Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. Fungal Genetics and Biology Journal. 45: 1514-1522.
- **Ouellet, T. & Siefert, K.A.** 1993. Genetic characterisation of *Fusarium* strains using RAPD and PCR amplification. Phytopathology, 83: 1003–1007.
- **Parry, D.W. & Nicholson, P.** 1996. Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. Plant Pathology. 45: 383-391.
- **Parry, D.W., Jenkinson, P. & Mcleod, L.** 1995. Fusarium ear blight (scab) in small-grain cereals – a review. Plant Pathology. 44: 207-238.
- **Pasquali, M. & Migheli, Q.** 2014. Genetic approaches to chemotype determination in type B-trichothecene producing Fusaria. International Journal of Food Microbiology, 189: 164–182.
- **Pereyra, S.A.** 2003. Prácticas culturales para el manejo de la fusariosis de la espiga. En Jornada Técnica de cultivos de invierno. INIA Mercedes. Actividades de difusión. 312: 1-9.
- **Pereyra, S.A. & Dill-Macky, R.** 2008. Colonization of the Residues of Diverse Plant Species by *Gibberella zeae* and their contribution to Fusarium Head Blight Inoculum. Plant Disease, 92: 800–807.
- **Pereyra, S.A., Dill-Macky, R. & Sims, A.L.** 2004. Survival and inoculum production of *Gibberella zeae* in wheat residue. Plant Disease, 88: 724-730.
- **Pérez, C.** 2004. Manejo sanitario de cereales de invierno: Algunas consideraciones epidemiológicas. Cangüé. 25: 34-38
- **Pioli, R.N., Mozzoni, L. & Morandi, E.N.** 2004. First report about pathogenic association between *Fusarium graminearum* and Soybean. Plant Disease. 88: 220.
- **Pritsch, C., Muehlbauer, G., Bushnell, W., Sommers, D. & Vance, C.** 2000. Fungal development and induction of defense response genes during early infection of wheat spikes by *Fusarium graminearum*. Molecular Plant Microbe Interactions. 13: 159-169.
- **Proctor, R.H., Hohn, T.M. & McCormick, S.P.** 1995. Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. Molecular Plant Microbe Interactions. 8: 93–601.
- **Raillo, A.** 1935. The diagnostic estimation of morphological and cultural characters of the species of the genus *Fusarium*. Government All-Union Academic of Agricultural Sciences. Leningrad, USSR. 7: 1-98.
- **Raillo, A.** 1936. Systematics and methods for the determination of the species of the genus *Fusarium*. Acta Botanic Institute. Academy of Sciences of the USSR. Leningrad, USSR. 3: 803-857.
- **Raillo, A.** 1950. Fungi of the genus *Fusarium*. Government Publishers of Agricultural Literature. Moscow, USSR. 415 pp.

- **Ramírez, M.L., Reynoso, M.M., Farnochi, M.C. & Chulze, S.** 2006. Vegetative compatibility and mycotoxin chemotypes among *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) isolates from wheat in Argentina. *European Journal of Plant Pathology*. 115: 139-148.
- **Reis, E.M.** 1989. Fusariosis: Biología y epidemiología de *Gibberella zeae* en trigo. Taller sobre Fusariosis de la espiga en América del Sur, Mexico. CIMMYT. Pp. 97-102.
- **Reis, E.M.** 1990. Survival of perithecia of *Gibberella zeae* on naturally infected wheat kernels under field conditions. *Fitopatología Brasileira*. 15: 254-255.
- **Reis, E.M. & Carmona, M.** 2002. Fusariosis del trigo. Biología, epidemiología y estrategias para su manejo. BASF. Bs As. Argentina, Pp 1-25.
- **Reynoso, M.M., Ramírez, 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.
- **Rizzo, I., Lori, G.A., Vedoya, G., Carranza, M., Haidukowski, M., Varsavsky, E., Frade, H., Chiale, C. & Alippi, H.** 1997. Sanitary factors and mycotoxin contamination in the argentinian wheat crop 1993/94. *Mycotoxin Research*. 13: 67-72.
- **Ruiz Camacho, R.** 1981. Cultivo del Trigo y la Cebada. Temas de Orientación Agropecuaria. Bogotá, Colombia. Pp. 19-20.
- **SAGPyA.** 2006. Programa Nacional de Calidad de Trigo. ([www.minagri.gov.ar/dimeagro/calidad\\_trigo/publicaciones/encuesta\\_variedades\\_2006-07.pdf](http://www.minagri.gov.ar/dimeagro/calidad_trigo/publicaciones/encuesta_variedades_2006-07.pdf))
- **Sampietro, D.A., Aristimuño Ficooseco, M., Jimenez, C., Vattuoe, M.A. & Catalán, C.A.** 2013. Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* complex strains isolated from maize fields of northwest Argentina. *International journal of food microbiology*. 153: 229-233.
- **Samuels, G.J., Nirenberg, H.I. & Seifert, K.A.** 2001. Perithecial species of *Fusarium*. En: Summerell, B. A., Leslie, J. F., Backhouse, D., Bryden, W. L. and Burgess, L.W., Editores, *Fusarium*: Paul E. Nelson Memorial Symposium. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota. Pp 1-14.
- **Sarver, B.A., 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
- **Schilling, A.G., Möller, E.M. & Geiger, H.H.** 1996. Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* and *F. avenaceum*. *Phytopathology*. 86: 515-522.
- **Simón M.R.** 2005. Mejoramiento de trigo. Guía de Trabajos Prácticos de la Cátedra de Cerealicultura. FCAyF. U.N.L.P.
- **SIIA.** Sistema integrado de información agropecuaria. ([www.siiia.gov.ar/informes](http://www.siiia.gov.ar/informes)). Último acceso: Noviembre de 2015.
- **SINAVIMO-SENASA.** Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de Plagas, 2008. Sistema de Vigilancia en el Cultivo de Trigo. ([www.sinavimo.gov.ar/articulo/sistema-de-vigilancia-en-el-cultivo-de-trigo](http://www.sinavimo.gov.ar/articulo/sistema-de-vigilancia-en-el-cultivo-de-trigo)). Último acceso: Noviembre 2015.
- **Smith, W.G.** 1884. Diseases of field and garden crops. Macmillan, London, Pp 208–213.
- **Snyder, W.C. & Hansen, H.N.** 1940. The species concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany*. 27: 64-67.

- **Snyder, W.C. & Hansen, H.N.** 1941. The species concept in *Fusarium* with reference to section Martiella. *American Journal of Botany* 28: 738-742.
- **Snyder, W.C. & Hansen, H.N.** 1945. The species concept in *Fusarium* with reference to Discolor and other sections. *American Journal of Botany*. 32: 657-666.
- **Snyder, W.C. & Hansen, H.N.** 1954. Variation and speciation in the genus *Fusarium*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 60: 16-23.
- **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 Genetic Biology*. 44: 1191–1204.
- **Strange, R. & Smith, H.** 1971. A fungal growth stimulant in anthers which predisposes wheat to attack by *Fusarium graminearum*. *Physiological Plant Pathology*. 1:141-150.
- **Sutton, J.** 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 4: 175-209.
- **Sykes, J.** 2003. *Fusarium* Ear Blight and Mycotoxins in Wheat. *The Agronomist*. 1/2003: 19-23.
- **Toussoun, T.A. & Nelson, P.E.** 1976. *A Pictorial Guide to the Identification of Fusarium Species*, 2nd ed. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania.
- **Trail, F.** 2009. For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era. *Plant Physiology*. 149: 103-110.
- **Trail, F., Gadoury, D. & Loranger, R.** 1998. Environmental parameters of ascospore discharge in *Gibberella zeae*. The 1998 *Fusarium* head blight Forum. Chapter 1. Epidemiology and disease management. Michigan State University. USA. Pp. 11-13.
- **Trigo Argentino.** 2013-2014. Disponible en: [www.trigoargentino.com.ar/2014/ESP/texts/TRIGOPAN\\_ORGYMETOD\\_2014ESP.HTML](http://www.trigoargentino.com.ar/2014/ESP/texts/TRIGOPAN_ORGYMETOD_2014ESP.HTML). Último acceso: Noviembre 2015.
- **Turner, A.S., Lees, A.K., Rezanoor, H.N. & Nicholson, P.** 1998. Refinement of PCR-based detection of *Fusarium avenaceum* and evidence for phenetic relatedness to *Fusarium tricinctum*. *Plant Pathology*, 47: 278–288.
- **USDA.** 2015. [www.produccionmundialtrigo.com/](http://www.produccionmundialtrigo.com/). Ultimo acceso: Noviembre 2015.
- **Wang, Y., Liu, W., Hou, Z., Wang, C., Zhou, X., Jonkers, W., Ding, S., Kistler, H.C. & Xu, J.R.** 2011. A novel transcriptional factor important for pathogenesis and ascosporeogenesis in *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 24: 118–128.
- **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*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. U.S.A. 99: 9278–9283.
- **Wollenweber, H.W. & Reinking, O.A.** 1935. *Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung*. Verlag Paul Parey, Berlin, Germany.
- **Xu, X.** 2003. Effects of environmental conditions on the development of *Fusarium* ear blight. *European Journal of Plant Pathology*. 109: 683-689.
- **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.



- **Yoder, W.T. & Christianson, L.M.** 1998. Species-specific *primers* resolve members of *Fusarium* section *Fusarium*. Taxonomic status of the edible “Quorn” fungus reevaluated. *Fungal Genetics and Biology*. 23: 68-80.
- **Yoshizawa, T. & Morooka, N.** 1973. Deoxynivalenol and its monoacetate: new mycotoxins from *Fusarium roseum* and moldy barley. *Agricultural and Biological Chemistry*. 37: 2933-2934.
- **Zadoks, J.C., Cheng, T.T. & Konzak, C.F.** 1974. A decimal code for the growth stage of cereals. *Weed Research*. 14: 415-421.