

**“Caracterización de
las poblaciones de
*Fusarium
graminearum sensu
lato* de nuestro
país”**

Autor: Lic. Natalia Calero

Orientador: Dra. Dinorah Pan de la Guerra

Co-orientador: Dra. Lina Betucci

RESUMEN

La producción agropecuaria es uno de los pilares fundamentales de la economía uruguaya, siendo el trigo, la cebada y el sorgo de los principales cultivos y de mayor significancia económica. La infección de estos cultivos con especies del género *Fusarium* provoca la reducción del rendimiento, del poder germinativo y la contaminación de los granos con micotoxinas. El principal contaminante asociado a estos cultivos es el complejo de especies de *Fusarium graminearum* el cual incluye importantes especies productoras de deoxinivalenol (DON), sus derivados acetilados 3-acetildeoxinivalenol (3-AcDON), 15-acetildeoxinivalenol (15-AcDON) y nivalenol (NIV). En base a los perfiles toxicogénicos que presentan las cepas del complejo de *F. graminearum* pueden clasificarse en 3 tipos diferentes: NIV, DON/ 3-AcDON y DON/15-AcDON. Se ha observado que existe una asociación entre las distintas especies del complejo de *F. graminearum* y la capacidad toxicogénica. El objetivo de este trabajo fue caracterizar 150 aislamientos de *F. graminearum* provenientes de granos de trigo, cebada y sorgo. De todos los aislamientos analizados se determinó que el 79% corresponde a *F. graminearum sensu stricto*, el 11% a *F. cortaderiae*, el 5% a *F. meridionale* y el 5% a *F. asiaticum*. Mediante PCR múltiple y cromatografía en capa fina se determinó el potencial toxicogénico de los aislamientos. El genotipo predominante encontrado en trigo, cebada y sorgo fue DON/15-AcDON y en menor proporción NIV. Dado que un alto porcentaje de las cepas de *F. graminearum* aisladas de cereales de nuestro país son productoras de micotoxinas es de gran importancia conocer la dinámica de estas poblaciones que poseen un fuerte impacto agro-industrial.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	4
OBJETIVO GENERAL.....	20
HIPOTESIS	21
MATERIALES Y METODOS.....	21
MUESTRAS.....	21
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE <i>FUSARIUM</i>	21
DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL TOXICOGÉNICO	25
RESULTADOS	27
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE <i>FUSARIUM</i>	27
DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL TOXICOGÉNICO	29
DISCUSIÓN.....	32
ESPECIES DE <i>FUSARIUM</i>	32
GENOTIPOS.....	37
QUIMIOTIPOS.....	40
CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFÍA.....	43
ANEXO	61

INTRODUCCIÓN

La producción agropecuaria es uno de los pilares fundamentales para la economía del Uruguay, representando el 12,3 % del Producto Bruto Interno. Dentro del total de la producción agropecuaria la agricultura ocupa un 53,7%, la pecuaria un 41,0% y la silvicultura un 5,3% (DIEA, 2014).

Los cultivos cerealeros son las principales explotaciones dentro de la producción agropecuaria, destinándose para ello aproximadamente 2 millones de hectáreas del territorio nacional. Dentro de los cultivos cerealeros se encuentran los cultivos de invierno, trigo, cebada y avena (491 mil ha), y los cultivos de verano como soja, maíz y sorgo (1.3 millones de ha).

El trigo, la cebada y el sorgo son unos de los principales cultivos para el consumo humano y animal en Uruguay (DIEA, 2009; DIEA, 2016) (Figura 1).

El trigo es el principal cultivo de invierno, ocupando el 66% de la superficie total sembrada en el año 2015, mientras que la cebada se encuentra en segundo lugar con un 20% del área total sembrada. El principal destino del trigo es la alimentación humana y da lugar a dos componentes industriales diferenciados, la industria harinera y las industrias elaboradoras de productos terminados. En relación a la cebada, su principal destino es la industria cervecera y los derivados del malteo del grano para alimentación animal (DIEA, 2014).

Dentro de los cultivos de verano, en el último año, el sorgo exhibió un aumento del 8% en la superficie total cosechada alcanzando las 81,3 mil hectáreas y sigue en aumento. Es un cultivo resistente y junto a otras características lo hace un cultivo de alto rendimiento. El principal destino del sorgo es la alimentación animal como silo de grano húmedo y como materia prima para la producción de bioetanol. Esto ha posicionado al sorgo como uno de los cultivos más importantes de verano.

Uno de los factores que compromete la calidad de los granos es la contaminación fúngica, habiéndose estimado que entre el 10 al 30% de los granos cosechados se pierde debido al deterioro producido por los hongos (Chelkowski, 1991; Rice & Ross, 1994).

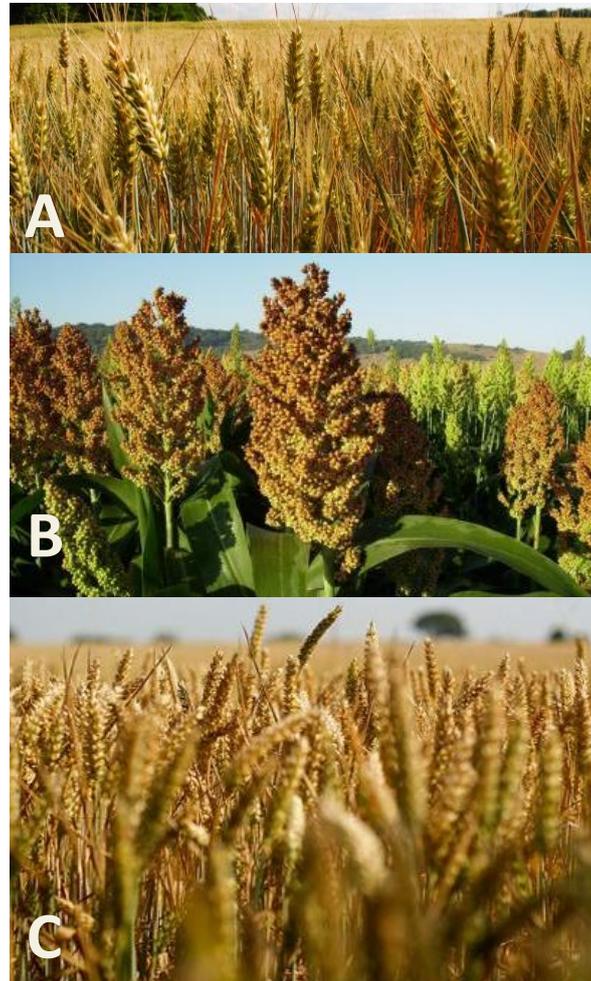


Figura 1: Cultivos de: Cebada (A), Sorgo (B) y Trigo (C)

Los hongos son los principales responsables de la contaminación de los granos tanto en el campo como en las distintas etapas de almacenamiento. Uno de los principales géneros fúngicos presentes en el campo es *Fusarium*, dentro del cual se encuentran importantes especies fitopatógenas y productoras de micotoxinas (Chulze et al., 1996; Placinta et al., 1999). El género *Fusarium* presenta una amplia distribución geográfica a nivel mundial y comprende más de 80 especies, las cuales difieren en su biología y

ecología (Leslie & Summerell, 2006). Es uno de los géneros de mayor impacto económico debido a su amplia distribución y a que presenta numerosas especies responsables de diversas enfermedades en plantas. Dentro de este género fúngico existen especies cosmopolitas, como también especies endémicas asociadas a condiciones climáticas y/u hospederos específicos (Burgess et al., 1994). Se han encontrado especies de *Fusarium* en todos los continentes y en todas las latitudes (Summerell et al., 2001). También, las distintas especies presentan variabilidad en su capacidad de infección, pudiendo infectar desde todos los órganos de las plantas hasta vertebrados, insectos, humanos e incluso otros hongos. Por el contrario, otro gran número de especies pueden vivir saprofiticamente (Burgess et al., 1994; Summerell et al., 2001; Ivic et al., 2009).

Dentro de las enfermedades que producen los hongos de este género en las plantas se encuentran las que afectan a los cultivos como el trigo, la cebada y el sorgo. Estas enfermedades tienen un importante impacto a nivel mundial ya que producen una disminución de la calidad y del rendimiento de los granos e incluso pérdidas significativas en las cosechas (McMullen et al., 1997; Windels, 2000; Goswami & Kistler, 2004).

La podredumbre del sorgo es una de las principales causas de inutilización de los granos. Dentro de las distintas especies *Fusarium* que ocasionan podredumbre de la espiga, tallo y raíz en sorgo se encuentran: *F. graminearum*, *F. proliferatum*, *F. thapsinum*, *F. verticillioides*, *F. sacchari* y *F. andiyazi* (Leonard & Bushell, 2003; Thakur et al., 2003; Sampietro et al., 2010; Sharma et al., 2011).

Por otro lado, la fusariosis de la espiga (FE) es una de las principales enfermedades de trigo y cebada y de mayor impacto a nivel mundial. La enfermedad ha ido aumentando su frecuencia a lo largo de los años y se ha transformado en la principal preocupación con respecto a la seguridad alimentaria (Leonard & Bushnell, 2003). En nuestro país se han registrado grandes pérdidas debido a esta enfermedad, registrándose en los años 2001 y 2002 pérdidas del 60% y 25% del trigo total cosechado (Souto, 2003; Pan et al., 2007). Debido a esto se establecieron niveles máximos permitidos para DON en sub-productos de trigo destinados a alimentación humana de 1000 µg/Kg y en materias

primas destinadas a la elaboración de alimentos para animales 10000 µg/Kg (Decreto Ministerio de Salud Pública, 2001; Decreto Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, 2001).

No existen niveles máximos permitidos para DON en otros granos, por esta razón es de gran importancia conocer qué especies de *Fusarium* están presentes en los cultivos de nuestro país, para así poder establecer normativas más adecuadas.

La FE se evidencia en las espiguillas, tanto en trigo como cebada, por una decoloración prematura que a veces llega a ser en toda su extensión (Figura 2. a, b, c y f).

Los granos infectados adquieren una coloración blanco-rosácea o parduzca clara y una apariencia arrugada (Figura 2. d, e y g) (McMullen et al., 1997). Además, la colonización fúngica genera cambios, en el momento de llenado del grano, que provocan una reducción en el tamaño del endosperma. Esto se traduce en una mayor proporción de enzimas y proteínas, disminuyendo la calidad del gluten y afectando tanto la panificación en trigo como la germinación y el malteo en cebada (Duijnhower et al., 1993; Vegi et al., 2011).

Uno de los principales agentes causales de la FE es el complejo de especies de *Fusarium graminearum* (FGSC). *F. graminearum* pertenece al phylum Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hyphocreales, familia Nectriaceae (Leonard & Bushnell, 2003). Estas especies se encuentran generalmente en regiones templadas particularmente asociados a granos de pequeño tamaño, no obstante se pueden encontrar en el suelo y en el rastrojo. *F. graminearum* presenta ciclo sexual conocido, siendo su teleomorfo *Gibberella zeae*. Es homotética y, como producto de la reproducción sexual, forma peritecios con ascos conteniendo ascosporas septadas. Las ascosporas son un excelente mecanismo para la dispersión aérea en climas húmedos (Figura 3) (Burgess et al., 1994). Se caracteriza además por producir macroconidios de forma recta a moderadamente curvada con la superficie ventral casi recta y la superficie dorsal levemente curvada. La célula basal tiene forma de pie y la célula apical es cónica (Figura 4. a).

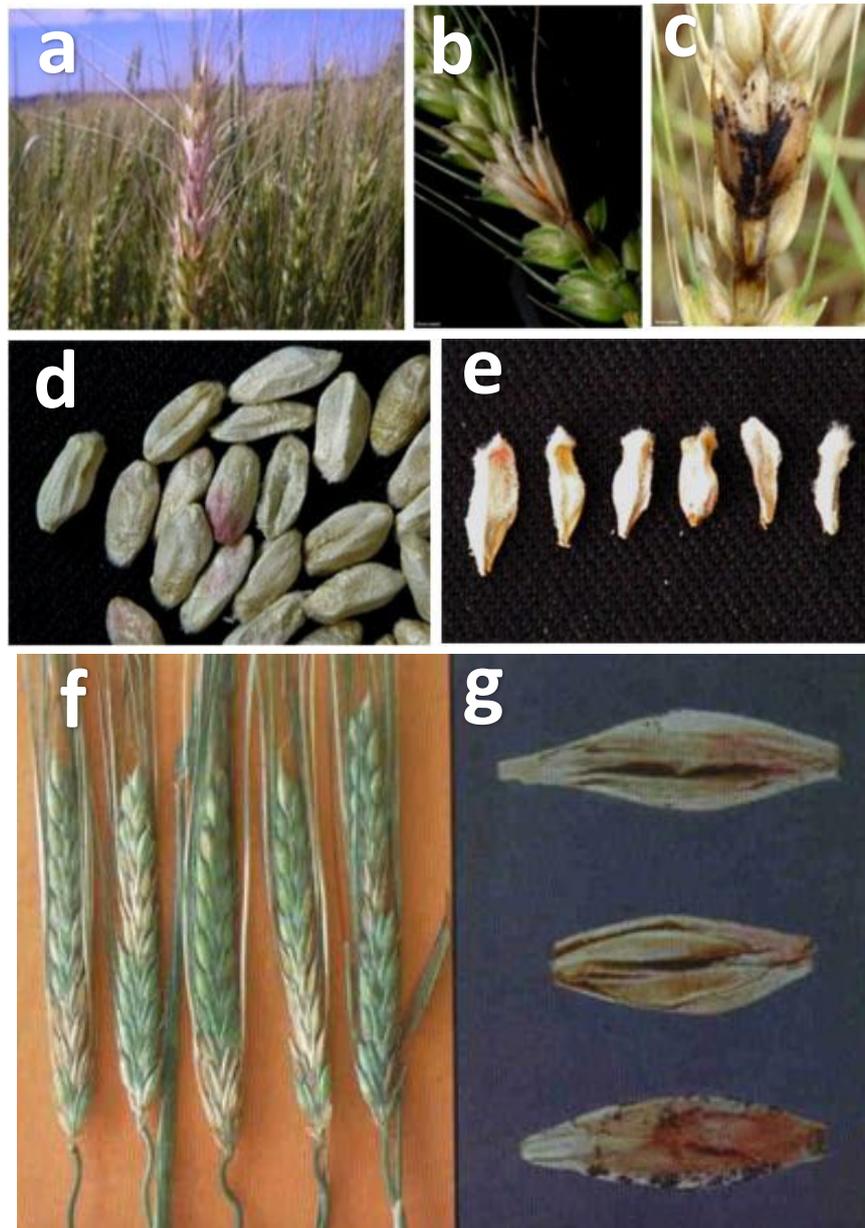


Figura 2: a, b y c. Espigas de trigo infectados por *F. graminearum*. d y e. granos de trigo infectados con *F. graminearum*. f. Espigas de cebada infectadas con *F. graminearum* g. granos de cebada infectados con *F. graminearum*.

Fuente: Bushnell et al., 2003.

Presenta monofiálides simples o ramificadas y produce células de resistencia denominadas clamidosporas que se desarrollan lentamente en los cultivos, pudiendo a veces formarse dentro de macroconidios y/o en el micelio (Figura 4. b). Presenta micelio aéreo de color amarillo o blanco y un característico color rojo carmín en el reverso de la colonia (Figura 4. c) (Nelson, 1983).

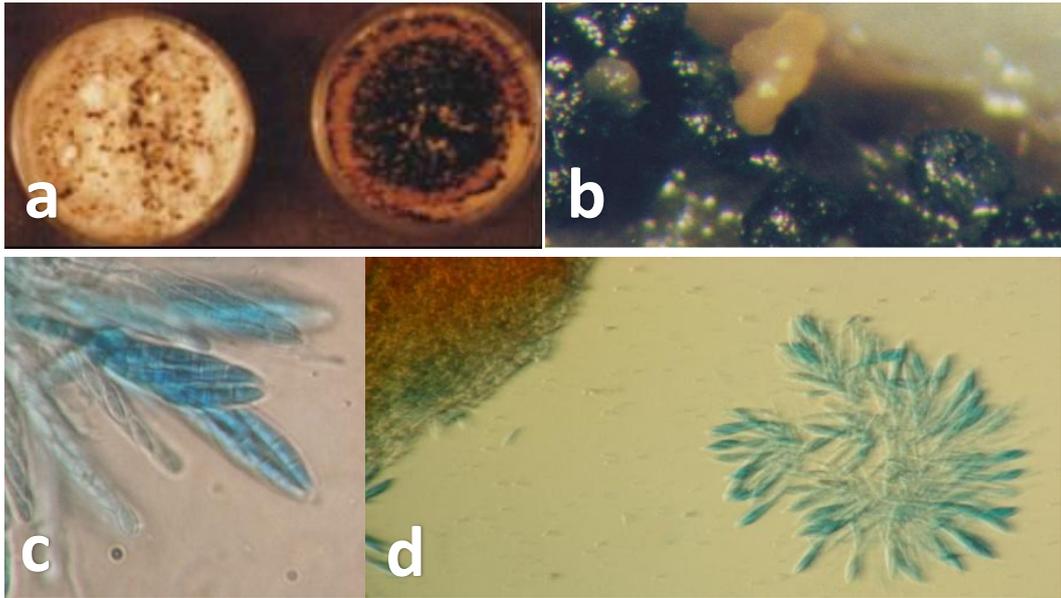


Figura 3: a y b. Observación macroscópica de peritecios formados en medio agar zanahoria de *F. graminearum*. c y d. Observación microscópica de ascos conteniendo ascosporas de *F. graminearum*.

Fusarium graminearum crece y se reproduce satisfactoriamente en un amplio rango de temperaturas que van desde los 15°C hasta los 30°C. Es una especie que está adaptada a tolerar variaciones ambientales, encontrándose dominante en la mayoría de las regiones (Osborne et al., 2007).

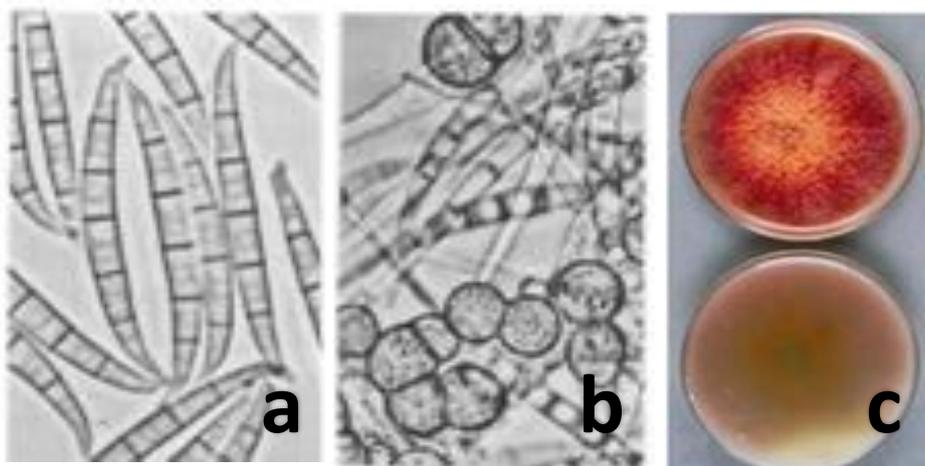


Figura 4: a y b. Macroconidios y clamidosporas de *F. graminearum* c. Anverso y reverso de una colonia de *F. graminearum* en medio agar papa dextrosa. Fuente: Nelson et al., 1983; Summerell et al., 2003.

El ciclo de vida de *F. graminearum* se caracteriza por presentar dos fases, una parasítica en la cual el patógeno se desarrolla principalmente como biótrofo/necrótrofo y una fase saprofítica donde el hongo se desarrolla sobre tejidos muertos (Figura 5) (Bushnell et al., 2003). Este ciclo comienza con la maduración de peritecios y liberación de ascosporas en el rastrojo que es la fuente de inóculo primaria (Suty & Mauler-Machnik, 1996; Trail et al., 1997). Las ascosporas y otros propágulos, como macroconidios, fragmentos hifales y clamidosporas, son arrojados al aire por medio del viento, la lluvia, insectos y otros agentes a las plantas hospederas (Leonard & Bushnell, 2003). Los factores que influyen en esta etapa de infección son la temperatura de alrededor de 25°C y la humedad relativa mayor al 90%, principalmente durante la floración y/o el llenado del grano (Figura 6). Estos factores son preponderantes a la hora de una infección exitosa y subsiguiente colonización de la planta (Bushnell et al., 2003; Doohan et al., 2003; Beyer et al., 2005; Brown et al., 2010).

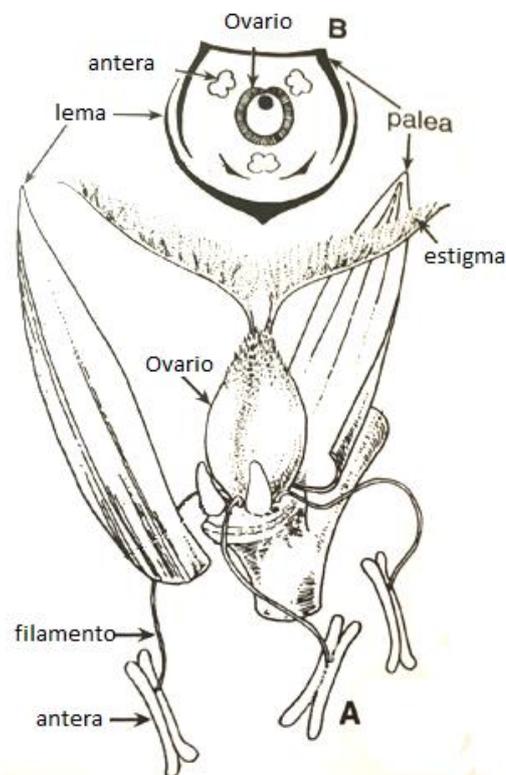


Figura 6: Anatomía floral. **A.** Flor parcialmente seccionada en la antesis. El ovario y dos estigmas conforman el pistilo. **B.** Diagrama transversal que muestra la superposición de la palea y la lema.

Fuente: Leonard & Bushnell, 2003. Cap. 3.

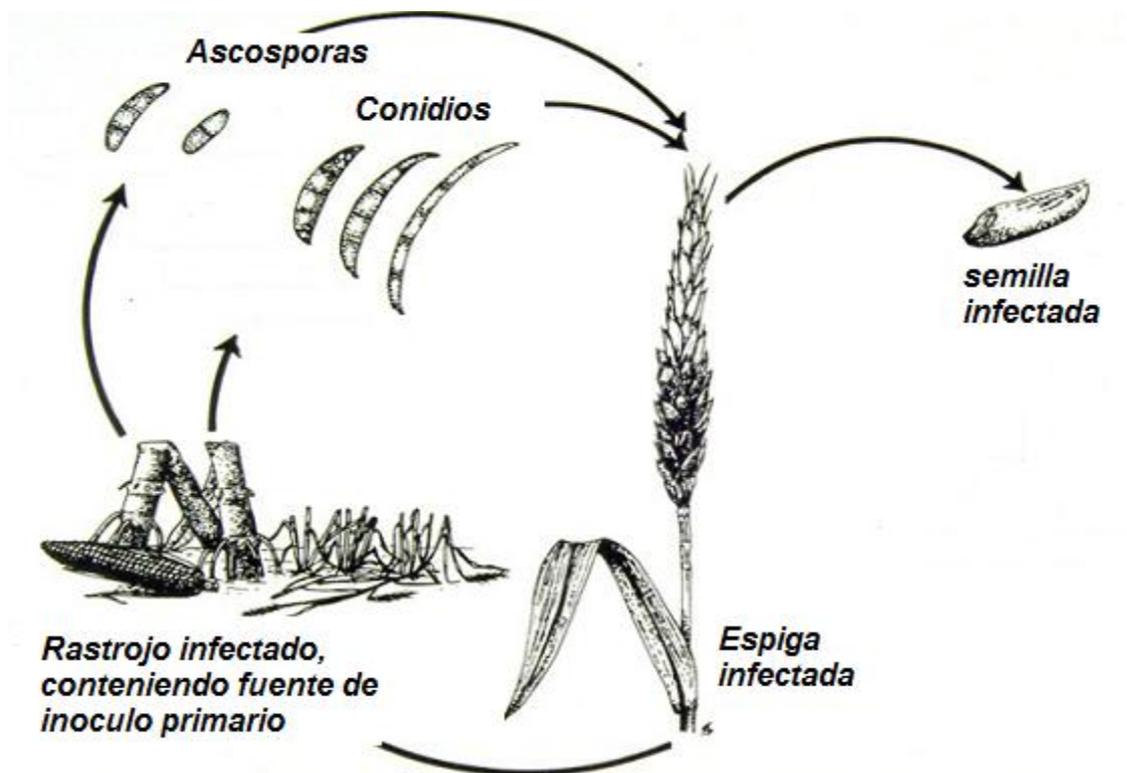


Figura 5. Ciclo de infección de *F. graminearum* en una espiga de trigo. Fuente: Schmale III & Bergstrom, 2003.

El hongo no puede penetrar directamente las células epidérmicas de la gluma, lema y patea por lo tanto utiliza otras estrategias de entrada. Una estrategia es el crecimiento hifal a partir de la germinación de los macroconidios y/o las ascosporas que son depositados en las partes aéreas de la planta. De esta manera el hongo migra hacia los estomas y a la base de las glumas donde la pared de las células epidérmicas es delgada (Lewandowski & Bushnell, 2001).

Otras vías de entrada son directamente por heridas o a través de las anteras cuando estas son expuestas (Boshoff et al., 1996). Una vez en el interior de la planta, sin importar el mecanismo de ingreso, hay una alta probabilidad de que se desarrolle la infección.

La primera relación planta-hospedero es biotrófica ya que el hongo invade los tejidos que permanecen vivos y completamente funcionales. El cambio a la fase necrotrófica donde el hongo necrosa los tejidos viene acompañada de clorosis y crecimiento intracelular (Proctor et al., 1995; Desjardins et al., 1996). Este cambio de la fase biotrófica a la necrotrófica se encuentra mediado por algunas toxinas producidas por *F. graminearum*, principalmente tricotecenos, contribuyendo así a la agresividad del hongo (Desjardins & Hohn, 1997; Dinis et al., 2007).

Los hongos pueden producir un amplio rango de metabolitos que no son necesarios para su funcionamiento normal, no obstante estos pueden conferirle al hongo ventajas ecológicas en ciertos ambientes. Dichos compuestos son denominados metabolitos secundarios y pueden ser desde reguladores del crecimiento vegetal como las giberelinas, compuestos antibióticos como la penicilina, pigmentos como los carotenoides y micotoxinas como los tricotecenos.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios fúngicos que pueden acumularse en granos infectados y así resultar tóxicos para humanos y animales cuando son ingeridos (McCormick et al., 2011). Las micotoxinas son metabolitos de bajo peso molecular y pueden variar desde compuestos simples de pocos carbonos hasta sustancias complejas (Desjardins, 2006). Las principales micotoxinas de gran importancia agroeconómica y para la salud pública son: aflatoxinas, producidas por algunas especies del género *Aspergillus*, ocratoxinas, producidas por especies del género *Aspergillus* y *Penicillium* y tricotecenos, zearalenona y fumonisinas, producidas por especies del género *Fusarium* (Zain, 2010). Todas las micotoxinas han sido clasificadas por la IARC (2002) en distintos grupos según el impacto sobre la salud humana con respecto a su capacidad de producir cáncer. Las producidas por especies de *Fusarium* van desde no carcinogénicas hasta posibles carcinógenas.

Los tricotecenos son producidos por numerosas especies de *Fusarium*, dentro de las cuales se encuentran *F. crookwellense*, *F. culmorum*, especies del complejo *F. incarnatum-equiseti*, especies del complejo *F. graminearum*, *F. poae*, y *F. sporotrichioides* (Desjardins, 2006).

Los tricotecenos pertenecen a una gran familia de sesquiterpenos de bajo peso molecular que comprenden un vasto grupo de metabolitos (alrededor de 170) con la misma estructura básica (Eriksen & Pettersson, 2004). Todos los tricotecenos poseen un grupo epóxido en los carbonos 12 y 13, el cual es responsable de la inhibición de la síntesis proteica a nivel celular (Pestka & Smolinski, 2005; Kimura et al., 2007; Alexander et al., 2009). Los tricotecenos producidos por especies de *Fusarium* se dividen en dos grupos, los tricotecenos del tipo A y los del tipo B, que se diferencian por presentar distintos grupos funcionales en el carbono 8 y un grupo hidroxilo en el carbono 7. Los del tipo A pueden presentar un hidrógeno, un hidróxido o un grupo éster en el C-8 y ausencia del hidroxilo en el C-7. Los del tipo B se caracterizan por tener un grupo carbonilo en el C-8 y un hidroxilo en el carbono 7 (Figura 7) (Ueno, 1980). Dentro de los tricotecenos del tipo A se encuentran la toxina T-2 (T-2), la toxina HT-2 (HT-2) y el diacetoxiscirpenol (DAS). Los del tipo B son el nivalenol (NIV) y el deoxinivalenol (DON) y sus correspondientes acetilados 3-acetildeoxinivalenol (3-AcDON) y 15-acetildeoxinivalenol (15-AcDON) (Pestka, 2007).

Solo un grupo hidroxilo diferencia el NIV del DON, no obstante los distintos patrones de oxigenación y acetilación pueden alterar la bioactividad y toxicidad de los tricotecenos (Kimura et al., 2007; Alexander et al., 2011).

Los genes de la ruta biosintética de los tricotecenos se encuentran ampliamente conservados entre las especies de *Fusarium* (Brown et al., 2001; Ward et al., 2002).

En la actualidad se han identificado tres regiones genómicas diferentes donde se encuentran localizados los genes de la biosíntesis de los tricotecenos que se han denominado genes "TRI". Varios de estos genes se encuentran adyacentes en una zona del genoma que se expresa coordinadamente y se denomina "cluster TRI" ya que es la zona que abarca mayor número de genes responsables de la ruta biosintética (Figura 8) (Brown et al., 2002). Otros tres genes responsables de la biosíntesis se encuentran localizados en otra región del genoma, el gen *TRI101*, que se encuentra rodeado por dos genes "house keeping" y los genes *TRI1* y *TRI16*, que se encuentran adyacentes y rodeados por genes que no participan en dicha ruta (Kimura et al., 1998; Brown et al., 2003; Meek et al., 2003).

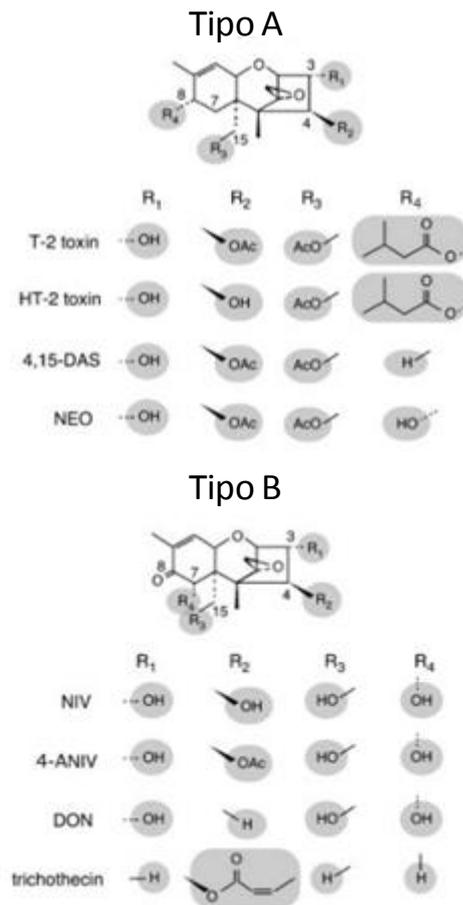


Figura 7: Tricotecenos del tipo A y B y sus grupos funcionales.
Fuente: Mc Cormick et al., 2011

La biosíntesis de tricotecenos se da a partir de la conversión de un precursor común para todos, el farnesil pirofosfato. Éste se convierte en tricodieno mediante la actividad de la tricodieno sintasa codificada por el gen *TRI5*. Los primeros pasos de la biosíntesis de los tricotecenos están regulados por los genes *TRI6* y *TRI10*. Cualquier disrupción en uno de estos genes impediría la producción de estas micotoxinas.

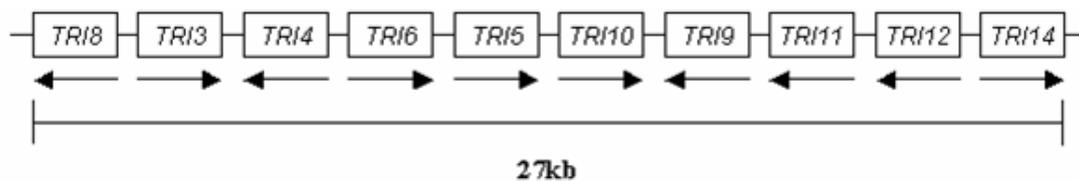


Figura 8: Composición de genes del cluster TRI de *F. graminearum*. Fuente: Hammond-Kosac et al., 2004.

La conversión del tricodieno en tricotecenos más complejos requiere de una serie de oxigenaciones, isomerizaciones, ciclaciones y esterificaciones mediadas por las enzimas codificadas por los genes *TRI* (Tabla 1) (Alexander et al., 2011).

La producción de tricotecenos del tipo A o del tipo B se encuentra determinada en parte por una variación en la secuencia del gen *TRI1*. En *F. sporotrichioides* la enzima del gen *TRI1* cataliza la hidroxilación del C-8 dando a la toxina T-2 (del tipo A) que carecen de un hidroxilo en el C-7. En cambio, en *F. graminearum* esta enzima cataliza tanto la hidroxilación en el C-8 como en el C-7 dando a lugar a tricotecenos del tipo B, como DON y NIV (Figura 9) (Meek et al., 2003; McCormick et al., 2006). Por su parte la producción de NIV y DON está determinada por los genes *TRI13* y *TRI7*. Las cepas de *Fusarium* productoras de NIV tienen una citocromo P450 monooxigenasa codificada por el gen *TRI13* y una acetiltransferasa codificada por el gen *TRI7* que codifican la hidroxilación y acetilación del C-4. Por el contrario las cepas productoras de DON no poseen estos genes funcionales ya que presentan múltiples inserciones y deleciones y en consecuencia carecen de hidroxilación y acetilación en el C-4 (Brown et al., 2002; Lee et al., 2002).

Tabla 1: Genes TRI de la ruta biosintética de tricotecenos y sus funciones.

Gen	Función	Referencias
TRI8	C-3 esterasa	McCormick and Alexander (2002)
TRI3	C-15 acetiltransferasa	McCormick et al. (1996) and Kimura et al. (2003)
TRI6	Gen regulatorio	Proctor et al. (1995) and Kimura et al. (2003)
TRI5	Tricodieno sintasa	Proctor et al. (1995)
TRI12	Bomba de expulsión	Alexander et al. (1999)
TRI13 ^a	C-4 hidroxilasa	Brown et al. (2002)
TRI101	C-3 acetiltransferasa	Kimura et al. (1998)
TRI1	C-8 oxigenasa	Brown et al. (2003)
TRI16	C-8 aciltransferasa	Brown et al. (2003)

^a TRI13 es funcional en cepas de *F. graminearum* que sintetizan NIV y es no funcional en cepas que sintetizan DON.

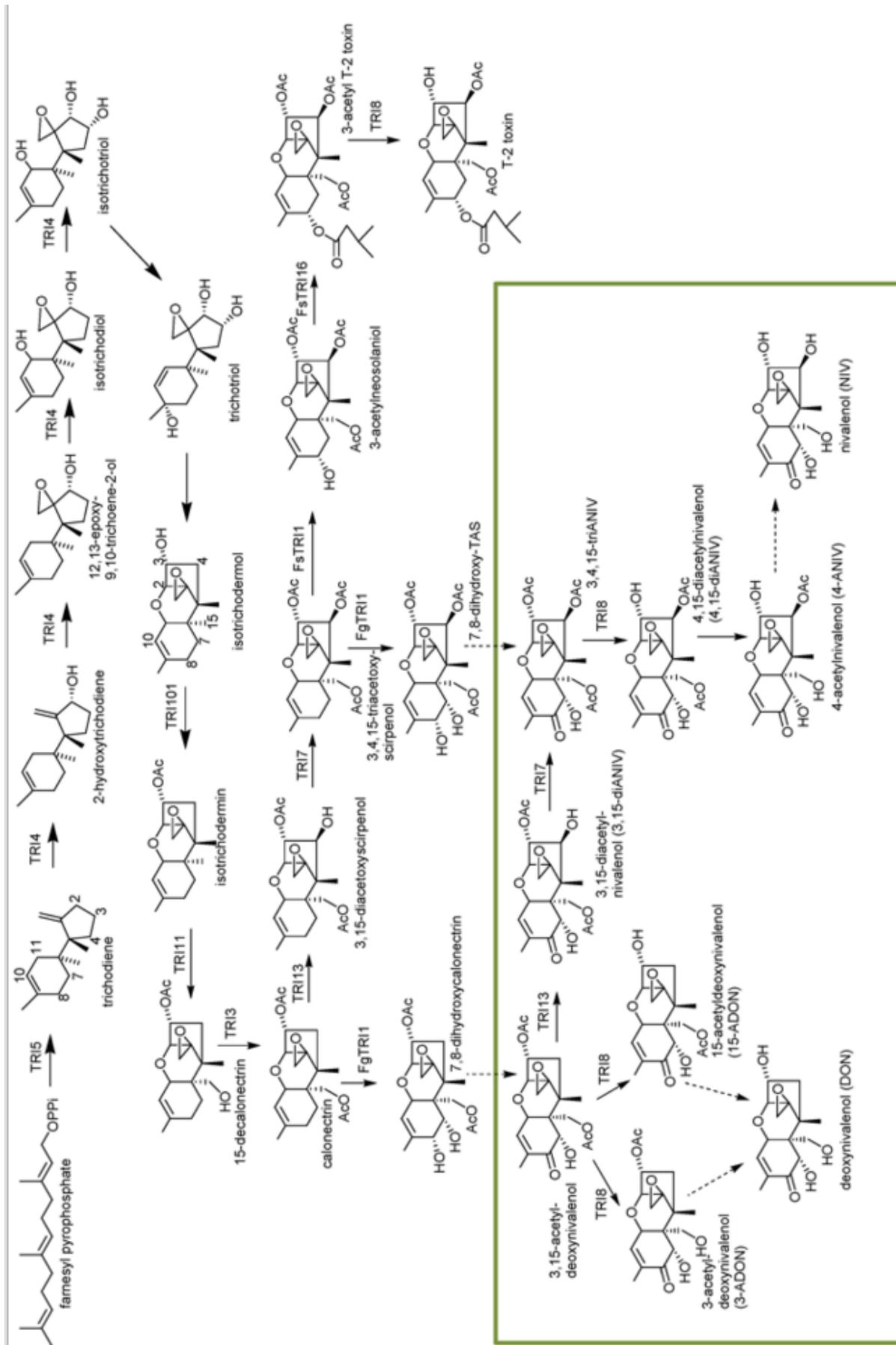


Figura 9: Ruta biosintética de tricotecenos y genes asociados . Fuente: McCormick et al. 2011

La producción de los acetilados 3-Acetil deoxinivalenol (3-AcDON) y 15-Acetil deoxinivalenol (15-AcDON) se encuentra determinada principalmente por la expresión del gen *TRI8*. Estos derivados acetilados difieren uno del otro en la presencia de acetilaciones en el C-3 y en el C-15, respectivamente. En cepas productoras de 3-AcDON, la enzima codificada por el gen *TRI8* cataliza la desacetilación del C-15 del 3,15-diADON y en cepas productoras de 15-AcDON la enzima homóloga cataliza la desacetilación del C-3. La diferencia en la actividad enzimática se debe a variaciones en la secuencia de aminoácidos de la enzima que desacetila uno u otro carbono (Alexander et al., 2011).

Se han podido determinar perfiles toxicogénicos de distintas cepas mediante el análisis molecular de los polimorfismos presentes en la región genómica *TRI*. De esta forma, se han clasificado los distintos genotipos como: NIV, si presentan los genes para la producción de nivalenol; 3-AcDON, si presentan los genes para deoxinivalenol; y 3-acetil-deoxinivalenol y 15-AcDON, si presentan los genes para deoxinivalenol y 15-acetildeoxinivalenol (Quarta et al., 2006).

A pesar de que los tricotecenos del tipo B poseen pequeñas diferencias a nivel molecular y los principales pasos de su biosíntesis son idénticos difieren ampliamente en su toxicidad (Yang et al., 2008). Para las plantas son potentes fitotoxinas que causan clorosis, necrosis y marchitamiento contribuyendo como factores de virulencia en el proceso de infección (Desjardins & Hohn, 1997). Se ha observado que mutantes de *F. graminearum* no productores de tricotecenos causan infecciones iniciales en las espigas de trigo pero son incapaces de colonizar el resto de la planta, exhibiendo entonces una agresividad reducida (Gardiner et al., 2009).

En células eucariotas el principal efecto tóxico de los tricotecenos es la inhibición de la enzima peptidil transferasa afectando la subunidad ribosomal 60S y en consecuencia inhibiendo la síntesis proteica. También inhiben enzimas mitocondriales y son responsables de pérdidas de electrolitos (McLaughlin et al., 1977; Leonard & Bushnell, 2003). La acción tóxica de los tricotecenos afecta las células en división como las del tracto intestinal, la piel y las del sistema inmune generando necrosis extensivas de la mucosa oral y de la piel que se encuentre en contacto con la toxina, como también una

disminución en la actividad de la médula espinal e inmunosupresión (Richard, 2007; Schwarzer, 2009).

El DON es comúnmente conocido como “vomitoxina”, ya que en mamíferos se ha observado que DON actúa como un inhibidor traduccional muy potente causando síntomas agudos como vómitos y rechazo del alimento y síntomas crónicos como retraso en el crecimiento, reducción de la función ovárica e inmunosupresión (Gardiner et al., 2009; Coppock & Jacobsen, 2009). Se ha determinado una alta sensibilidad a DON en cerdas en gestación provocando abortos espontáneos e incluso la muerte, mientras que en ganado lechero se ha observado disminución del crecimiento, de la producción de leche y alteraciones en el sistema digestivo e inmune (Cheeke, 1998a; Korosteleva et al., 2009).

Por otro lado NIV es un potente inhibidor de la síntesis de proteínas, ADN y ARN en mamíferos, como también causa necrosis en células proliferativas *in vivo* y es un inductor leve de aberraciones cromosómicas *in vitro*. La exposición crónica a esta toxina puede causar leucopenia y presenta una toxicidad mayor que el DON para humanos y animales domésticos (Dejardins & Hohn, 1997; Yazar & Omurtag, 2008).

A pesar de que el DON resulta menos tóxico para humanos y animales que el NIV, esta toxina presenta una fitotoxicidad mayor (Desjardins, 2006). Por otro lado, se ha reportado que cepas productoras de DON/3-AcDON exhiben mayor agresividad que cepas productoras de DON/15-AcDON como también mayor producción de micotoxinas (Ward et al., 2008; Zhang et al., 2012).

Así como se clasifican los genotipos en base a los polimorfismos presentes en el clúster *TRI* de las distintas cepas de *F. graminearum* también pueden clasificarse con respecto a las micotoxinas que producen. Los genotipos se basan en la potencialidad que tiene un aislamiento de producir cierta micotoxina, mientras que los quimiotipos se establecen por la micotoxina que producen. Se han determinado para las cepas de *F. graminearum* los siguientes quimiotipos: DON, para cepas productoras de DON únicamente, DON/3-AcDON para cepas que productoras de DON y su acetilado 3-AcDON, DON/15-AcDON para las cepas que productoras de DON y el acetilado 15-AcDON y NIV para las cepas que únicamente producen NIV (Zhang et al., 2007; Alvarez et al., 2009; Scoz et al., 2009). Por otro lado se han observado cepas capaces de

producir tanto DON como NIV y se les adjudica el quimiotipo DON/NIV, como también DON/3-15 AcDON a las que son capaces de producir los dos acetilados simultáneamente (Castañares et al., 2014).

Los distintos quimiotipos se han encontrado asociados a regiones geográficas diferentes, habiéndose registrado el quimiotipo NIV predominantemente en Asia, Europa y África, mientras que en América del Norte y del Sur se ha encontrado que predomina el quimiotipo DON (Zhang et al., 2007; Ward et al., 2008; Scoz et al., 2009; Lee et al., 2010; Nielsen et al., 2011; Prodi et al., 2011; Sampietro et al., 2011; Aoki et al., 2012; Pan et al., 2013). La presencia de los quimiotipos de DON con distintos acetilados también se ha observado en regiones geográficas particulares, predominando 3-AcDON en Asia y 15-AcDON en Sudamérica (Alvarez et al., 2009).

Fusarium graminearum es un complejo de especies (FGSC) compuesto por al menos 16 especies filogenéticamente diferentes: *F. austroamericanum*, *F. boothii*, *F. meridionale*, *F. mesoamericanum*, *F. luisianense*, *F. acaciae-mearnsii*, *F. basilicum*, *F. cortaderiae*, *F. gerlachii*, *F. nepalense*, *F. graminearum sensu stricto*, *F. asiaticum*, *F. aethiopicum*, *F. vorosii*, *F. ussurianum* y *F. graminearum* de la Costa del Golfo (Sarver et al., 2011; Aoki et al., 2012; Aoki & O'Donnell, 2014). Esta determinación ha surgido de numerosos trabajos analizando distintas combinaciones de genes y marcadores moleculares, como ser el factor de elongación de la transcripción 1- α (FET 1- α), el gen de la β tubulina y el gen de la amonio ligasa entre otros (O'Donnell et al., 2004; Qiu et al., 2014). Estas especies están distribuidas de manera diferencial a lo largo del mundo y en distintos hospederos.

Fusarium graminearum sensu stricto (*F. graminearum* s.s.) parecería ser la única especie del FGSC distribuida ampliamente en todo el mundo. En trigo y cebada de Europa predomina *F. graminearum* s.s. asociado a la producción de DON/15-AcDON, mientras que en América del Norte *F. graminearum* s.s. produce tanto DON/15-AcDON como DON/3-AcDON (Jennings et al., 2004; Gale et al., 2007; Schmale et al., 2011). Por otro lado en trigo y cebada de Sudamérica se observa una mayor variedad especies, encontrándose *F. graminearum* s.s., *F. meridionale*, *F. cortadieriae*, *F. austroamericanum* y *F. boothii* siendo *F. graminearum* s.s. el predominante y al igual

que en otras regiones del mundo asociado a la producción de DON/15-AcDON (Scoz et al., 2009; Reynoso et al., 2011; Del Ponte et al., 2013; Pan et al., 2013). En África también se ha observado una gran variedad de especies del complejo, encontrándose allí *F. graminearum s.s.*, *F. boothii*, *F. acaciae-mearnsii*, *F. aethiopicum* entre otras especies endémicas. A pesar de la variabilidad observada el quimiotipo predominante es DON/15-AcDON (Wagacha et al., 2010; Boutingny et al., 2011).

Mientras que en Asia se encuentra *F. graminearum s.s.* asociado a trigo y cebada, en arroz se ha encontrado a *F. asiaticum*. También se ha observado que cepas de *F. graminearum s.s.* en Asia suelen producir DON/3-AcDON y suelen encontrarse en regiones más frías, mientras que las de *F. asiaticum* suelen producir NIV y encontrarse en zonas más cálidas (van der Lee et al., 2015). Recientemente, en Estados Unidos, se determinó la presencia de *F. asiaticum* en trigo en regiones donde los cultivos se encuentran adyacentes a cultivos de arroz (Gale et al., 2007).

A partir de estos antecedentes el presente trabajo propone conocer las especies de FGSC presentes en cereales de nuestro país y determinar su potencial toxicogénico para poder establecer estrategias de manejo adecuadas y normativas acordes con la situación actual de nuestros cultivos.

OBJETIVO GENERAL

Caracterización molecular y determinación del perfil toxicogénico de las poblaciones de *F. graminearum sensu lato* aisladas de granos de trigo, cebada y sorgo.

Objetivos específicos

- Obtener aislamientos de *F. graminearum s.l.* de muestras de trigo, cebada y sorgo
- Identificar las especies de *F. graminearum s.l.* aisladas de los granos
- Conocer el potencial toxicogénico de los aislamientos de *F. graminearum s.l.* obtenidos.
- Determinar la producción de tricotecenos del tipo B de las cepas aisladas

HIPOTESIS

Los cultivos de trigo, cebada y sorgo de Uruguay se ven infectados principalmente por cepas de *F. graminearum* s.s., productoras de tricotecenos y pertenecientes en su mayoría al genotipo y al quimotipo DON/15-AcDON.

MATERIALES Y METODOS

MUESTRAS

Las muestras de trigo correspondientes a la cosecha de 2009 fueron proporcionadas por productores rurales de los departamentos de San José, Colonia, Soriano y Florida. Las muestras de cebada y sorgo correspondientes a los años de cosecha 2011 y 2013 respectivamente, fueron proporcionadas por Cereoil S.A. y pertenecían a la zona de cosecha del litoral oeste del país. Las muestras consistieron en bolsas de granos de aproximadamente 500 g.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE *FUSARIUM*

Se esterilizaron superficialmente 100 granos de cada una de las muestras de cebada, trigo y sorgo con hipoclorito de sodio 0,4% durante 3 minutos, se enjuagaron 2 veces con agua destilada estéril durante 1 minuto y se secaron con papel estéril. Posteriormente se colocaron en placas de Petri conteniendo medio Agar Papa Dextrosa (APD) y se incubaron a 25°C durante 5 días con ciclos de luz-oscuridad de 12 hs. Las colonias emergentes de *Fusarium* fueron transferidas a placas de Petri conteniendo APD y Agar Hojas de Clavel (AHC) para su posterior identificación, mediante observación de las características macro y micro-morfológicas siguiendo las claves de Leslie & Summerell (2006) y Nelson et al. (1983). A los aislamientos identificados como *F. graminearum* se les realizaron cultivos monospóricos. Para ello se sembró una suspensión de esporas en agua/tween 20 0,1% en placas de Petri conteniendo medio Agar Agua 2% y se incubó durante 18-20 hs a 25°C en oscuridad. Se

realizó la transferencia de un conidio germinado a placas de Petri con APD y se incubó a 25°C en estufa con fotoperiodo de luz-oscuridad de 12 hs durante 7 días. Los aislamientos obtenidos fueron depositados en la colección del Laboratorio de Micología, Facultad de Ciencias- Facultad de Ingeniería, Universidad de la República.

Identificación molecular de *F. graminearum*

Extracción de ADN

Los aislamientos monospóricos de *F. graminearum* se cultivaron en Erlenmayer de 250 ml conteniendo medio líquido de Extracto de Levadura, Peptona y Dextrosa (ELPD) y se dejaron incubar 2 días a 25°C en agitación a 150 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación los micelios crecidos se filtraron a través de papel Whatman Nº 1 mediante embudo Büchner y se dejaron secar en papel estéril bajo campana. Luego, los micelios secos se molieron con nitrógeno líquido y se realizó la extracción del ADN genómico siguiendo la metodología propuesta por Leslie & Summerell (2006) con algunas modificaciones. Se colocó en un tubo Ependorff 1/3 de micelio pulverizado y se adicionaron 1000 µL de CTAB 10X (CTAB 10% [m/vol], Tris HCl pH 8, 100mM, NaCl 1,4M, EDTA 20Mm, β-mercaptoetanol 0,2% [vol/vol]) y 1 µL de β-mercaptoetanol y se llevó a incubación en baño seco a 60°C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se adicionaron 600 µL de solución de cloroformo-isoamílico (12:1) y se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente la fase superior fue recuperada y se precipitó el ADN mediante el agregado de 500 µL de isopropanol y 10% de acetato de sodio 3M. Luego se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos, se removió el sobrenadante, se lavó el pellet de ADN con 200 µL de etanol 70% y se centrifugó nuevamente a 12000 rpm durante 5 minutos. Finalmente el pellet se secó en termocupla a 45°C durante 30 minutos y se re-suspendió en 100 µL de agua MiliQ libre de DNasa y se adicionó 1 µL de RNasa dejándose a 37°C durante 1 h. La calidad del ADN se visualizó en geles de agarosa 1,5% conteniendo el colorante GoodView™ y la concentración y pureza (relación 260/280 nm) se determinó por espectrofotometría en NanoDrp Lite, Thermo Scientific®, EEUU.

PCR complejo-específica

Para lograr la identificación molecular de los aislamientos pertenecientes al complejo *F. graminearum* se realizó una PCR con los cebadores específicos del clado Fg16F/Fg16R según Nicholson et al 1998 (Tabla 2). Estos cebadores dan un producto de amplificación que puede ser de distinto tamaño (400-550 pb). *Fusarium graminearum* s.s da un producto de 400 pb, mientras que *F. asiaticum* da un producto de 550 pb y *F. meridionale* uno de 500 pb. Se utilizaron como control positivo las cepas de referencia *F. graminearum* s.s NRRL 23652, *F. asiaticum* NRRL 13818 y *F. meridionale* NRRL 28436. Para la reacción de amplificación se utilizaron 25 ng de ADN fúngico, 5 µL de Buffer 10x, 5 µL de MgCl₂ (25 mM), 1,5 µL de cada cebador (10 µM), 4 µL de dNTP (2,5 µM) y 0,25 µL de Taq polimerasa Thermo Scientific® (5 U/µL) en un volumen final de 50 µL. La amplificación consistió en un paso de desnaturalización a 95°C durante 1 minuto seguida por 39 ciclos de 95°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos, 72°C por 40 segundos, y uno de extensión final de 5 minutos a 72°C. La amplificación se realizó en un termociclador MultiGene Optimax, Labnet international Inc., EEUU. Los productos de amplificación se visualizaron bajo luz UV luego de una electroforesis en gel de agarosa (1,5%), conteniendo el colorante GoodView™. El tamaño de los amplicones se estimó por comparación con un marcador de peso molecular de 100 pb Thermo Scientific, Invitrogen C.O., U.S.A.

PCR del gen del factor de elongación de la transcripción (FET-1α)

Para la identificación a nivel de especie de los aislamientos obtenidos de trigo, cebada y sorgo se realizó la amplificación y secuenciación de un fragmento del gen FET-1α siguiendo la metodología propuesta por O'Donnell et al. (1998). Se utilizaron los cebadores EF1T/ EF2T (Tabla 2).

Para la reacción de amplificación se utilizaron 25 ng de ADN fúngico, 2,5 µL de Buffer 10x, 1,2 µL de MgCl (50 mM), 0,625 µL de cada cebador (10 µM), 2,5 µL de dNTP (2,5 µM) y 0,25 µL de Taq polimerasa Thermo Scientific® (5 U/µL) en un volumen final de 50 µL. La amplificación consistió en un paso de desnaturalización a 95°C durante 2

minutos seguida por 39 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto con 30 segundos, y una extensión final de 10 minutos a 72°C. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador MultiGene Optimax, Labnet international Inc., EEUU.

Los productos de amplificación se visualizaron bajo luz UV en gel de agarosa (1,5%) conteniendo el colorante GoodViewTM, y su tamaño fue estimado por comparación con un marcador de peso molecular 100 pb Thermo Scientific, Invitrogen C.O., U.S.A. Los productos de PCR se enviaron a secuenciar a MACROGEN Inc. (Seúl, Corea del Sur). Las secuencias consenso fueron obtenidas mediante el programa Seqman (Lasergene, Madison, WI) y comparadas con las secuencias almacenadas en la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) y Fusarium ID (<http://isolate.fusariumdb.org/>).

Tabla 2: Secuencia de cebadores utilizados.

Análisis de PCR	Nombre del cebador	Secuencia del cebador (5' 3')							Tamaño del producto de amplificación (pb)
Fg complejo-específica	FG 16 F	CTC	CGG	ATA	TGT	TGC	GTC	AA	~ 400-500
	FG 16 R	GGT	AGG	TAT	CCG	ACA	TGG	CAA	
Factor de transcripción 1- α	EF1T	ATG	GGT	AAG	GAG	GAC	AAG	AC	~ 750
	EF2T	GGA	AGT	ACC	AGT	GAT	CAT	GTT	
PCR múltiple basada en los genes de la biosíntesis de tricotecenos									
DON	3551H	ACT	TTC	CCA	CCG	AGT	ATT	TT	525
	4056H	CAA	AAA	CTG	TTG	TTC	CAC	TGC	
NIV	Tri7F340	ATC	GTG	TAC	AAG	GTT	TAC	G	625
	Tri7R965	TTC	AAG	TAA	CGT	TCG	ACA	AT	
15-AcDON	Tri3F971	CAT	CAT	ACT	CGC	TCT	GCT	G	708
	Tri3R1679	TT(AG)	TAG	TTT	GCA	TCA	TT(AG)	TAG	
3-AcDON	Tri3F1325	GCA	TTG	GCT	AAC	ACA	TGA	354	
	Tri3R1679	TT(AG)	TAG	TTT	GCA	TCA	TT(AG)		TAG

DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL TOXICOGÉNICO

Caracterización genotípica

Los genotipos se determinaron mediante una PCR múltiple siguiendo la metodología de Quarta et al. (2006). Todos los cebadores utilizados para determinar los genotipos DON y sus derivados acetilados están dirigidos a diferentes segmentos del gen *Tri3* y *Tri5* mientras que los cebadores utilizados para NIV se encuentran dirigidos a una región en el gen *TRI7*. Los cebadores específicos utilizados para la determinación por PCR del genotipo DON, NIV, 15-AcDON y 3-AcDON, así como los tamaños esperados de los productos de amplificación se muestran en la Tabla 2.

Como control positivo se utilizaron cepas de *F. graminearum* Cv1.2 (genotipo DON/15-AcDON), *F. graminearum* Cv 12-C (genotipo DON/3-AcDON) y *F. meridionale* Cv811.1 (genotipo NIV). Para la reacción de amplificación se utilizaron 25 ng de ADN fúngico, 2,5 µL de Buffer 10x, 2,5 µL de MgCl (25 mM), 0,25 µL de los cebadores 3551H, 4056H, Tri7F340 y Tri7R965 (10 µM), 0,5 µL de los cebadores Tri3F971, Tri3R1679 y Tri3F1325 (10 µM), 2 µL de dNTP (2,5 µM) y 0,5 µL de Taq polimerasa Thermo Scientific® (5 U/µL) en un volumen final de 25 µL. La amplificación consistió en un paso de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos seguida por 34 ciclos de 94°C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto y una extensión final de 10 minutos a 72°C. Por otro lado se verificó mediante PCR simple las cepas que presentaron genotipos NIV y DON utilizando los mismos cebadores detallados anteriormente. La amplificación se realizó en un termociclador MultiGene Optimax, Labnet international Inc., EEUU. Los productos de amplificación se visualizaron bajo luz UV en gel de agarosa (1,5%) conteniendo el colorante GoodView™, y su tamaño fue estimado por comparación con un marcador de peso molecular de 100 pb Thermo Scientific, Invitrogen C.O., U.S.A.

Caracterización quimiотípica

Se determinó la producción de micotoxinas de todos los aislamientos de trigo, cebada y sorgo siguiendo la metodología de Alvarez et al. (2009) con algunas modificaciones. Para ello se inocularon bolsas conteniendo 50 g de arroz estéril y 20ml de agua destilada con discos de 1cm de diámetro de cada aislamiento monospórico de *F. graminearum* y se incubaron a 25°C durante 21 días en oscuridad (Figura 10). Luego de transcurrido este tiempo de incubación se molió el arroz hasta la consistencia de un polvo fino y se almacenaron a -20°C hasta el momento del análisis. Para la extracción de los tricotecenos se tomaron 15 g de arroz molido, se le agregaron 40 ml de acetoniло-metanol (14:1) y se llevó a agitación durante 2 hs a 150 rpm. Esta solución se filtró a través de papel de filtro Watmann N°1 y 2 ml del filtrado se pasaron por una columna de limpieza alúmina-carbón activado (20:1). El extracto purificado se llevó a sequedad y se resuspendió en 300 µL de tolueno-acetonitrilo (90:10). Para la producción de tricotecenos se corrió una cromatografía de capa fina (TLC) utilizando placas de silica gel MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Germany. Se sembraron 10 µL de cada extracto a analizar y 10 µL de una solución de 100 mg/µL del estándar de tricotecenos (Trilogy® Analytical Laboratory, Missouri, United States). La fase móvil utilizada fue cloroformo:acetona:2-propanol (8:1:1). El revelado de los tricotecenos producidos se realizó rociando las placas con cloruro de aluminio al 20% en etanol:agua (1:1) a 121°C durante 7 minutos para observarse luego bajo luz UV.



Figura 10: a y b. Inoculación de arroz con las cepas de *F. graminearum* aisladas de trigo, cebada y sorgo.

RESULTADOS

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *FUSARIUM*

Se analizaron un total de 56 muestras de granos, siendo 20 de trigo, 25 de cebada y 11 de sorgo.

Las muestras de trigo presentaron un 57% de infección con *F. graminearum*, las de cebada un 17% y las de sorgo un 16%. También se encontraron otras especies de *Fusarium* contaminando las muestras analizadas. En trigo se encontró un 4% de infección con especies del complejo *F. incarnatum-equiseti*, *F. acuminatum*, *F. sambucinum*, *F. poae*, *F. lateritium*, *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. nygamai*, *F. sporotrichioides* y *F. tricinctum*. En cebada se observó un 5% de infección con *F. acuminatum*, especies del complejo *F. incarnatum-equiseti*, *F. nygamai*, *F. oxysporum*, *F. poae* y *F. sambucinum*. Por último en sorgo se encontró un 11% de infección con especies del complejo *F. incarnatum-equiseti* y *F. nygamai* (Tabla 3).

Tabla 3: Porcentajes de infección con especies de *Fusarium* en trigo, cebada y sorgo.

	Trigo	Cebada	Sorgo
<i>F. equiseti</i>	1,0%	0,2%	0,5%
<i>F. acuminatum</i>	0,2%	0,2%	0%
<i>F. sambucinum</i>	0,2%	0,1%	0%
<i>F. poae</i>	0,2%	3,0%	0%
<i>F. lateritium</i>	1,0%	0%	0%
<i>F. solani</i>	0,1%	0%	0%
<i>F. oxysporum</i>	0,1%	0,4%	0%
<i>F. nygamai</i>	1,0%	1,0%	10,5%
<i>F. sporotrichioides</i>	0,1%	0%	0%
<i>F. tricinctum</i>	0,2%	0%	0%
<i>F. graminearum</i>	57%	17%	16%

Se seleccionaron 150 aislamientos identificados como *F. graminearum* s.l. en base a sus características macro y micromorfológicas. Del total de los aislamientos 50 fueron provenientes de trigo, 50 de cebada y 50 de sorgo (Anexo).

PCR complejo-específica

Mediante el uso de los cebadores específicos Fg 16 se pudo determinar que los 150 aislamientos obtenidos pertenecían al complejo de especies de *F. graminearum*.

En el 98% de los aislamientos obtenidos de trigo se observó una banda de 400 pb que se correspondería con *F. graminearum* s.s., mientras que en el 2% restante se obtuvo una banda de 500 pb propia de *F. meridionale*. De los 50 aislamientos provenientes de cebada se observó que el 2% presentó la misma banda única de 500 pb que correspondería a *F. meridionale*, otro 2% una banda de 550 pb correspondiente a *F. asiaticum* y el 96% restante una banda de 400 pb correspondiente a *F. graminearum* s.s. Finalmente, el 98% de los aislamientos provenientes de las muestras de sorgo presentaron la banda correspondiente a *F. graminearum* s.s., mientras que para el 2% se obtuvo una banda de aproximadamente 500 pb que se correspondería con *F. meridionale* (Anexo).

Amplificación del gen FET 1- α

A partir del análisis de las secuencias del gen *TEF 1- α* se pudo determinar que el 96% de los aislamientos analizados correspondió a *F. graminearum* s.s., el 2% a *F. cortaderiae*, el 1% a *F. meridionale* y el 1% a *F. asiaticum* (Figura 11).

Con respecto a los aislamientos provenientes de trigo, el 98% son *F. graminearum* s.s. y el 2% correspondieron a *F. meridionale*. Los aislamientos provenientes de cebada correspondieron el 96% a *F. graminearum* s.s., el 2% a *F. cortaderiae* y otro 2% a *F. asiaticum*. Por último los aislamientos provenientes de sorgo correspondieron el 98% a *F. graminearum* s.s. y el 2% a *F. cortaderiae*.

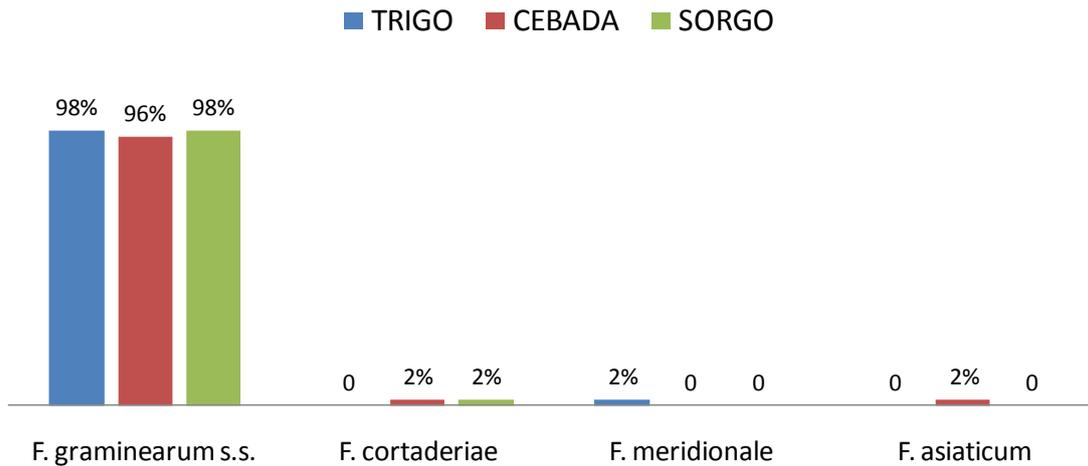


Figura 11: Especies del complejo *F. graminearum* encontradas en trigo, cebada y sorgo.

DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL TOXICOGÉNICO

Genotipos

A partir de los polimorfismos presentes en el clúster de genes *TRI* se pueden determinar los distintos genotipos presentes en *F. graminearum* mediante PCR múltiple. No obstante la presencia de determinado genotipo no significa que ocurra la producción de la micotoxina, sino el potencial que puede tener dicho aislamiento para producirla.

Todos los aislamientos de *F. graminearum* aislados de trigo, cebada y sorgo presentaron productos de amplificación entre 300 – 700 pb, lo cual indicó que todas las cepas eran potencialmente productoras de tricotecenos del tipo B (Figura 12). Con respecto a los aislamientos provenientes de trigo, el 92% presentó el genotipo DON/15-AcDON, mientras que el 6% restante presentó el genotipo DON únicamente y el 2% presentó el genotipo NIV.

EL 96% de los aislamientos provenientes de cebada correspondieron al genotipo DON/15-AcDON, mientras que el 4% restante fueron NIV. Finalmente, el 98% de los aislamientos de sorgo presentaron el genotipo DON/15-AcDON y el 2% el genotipo

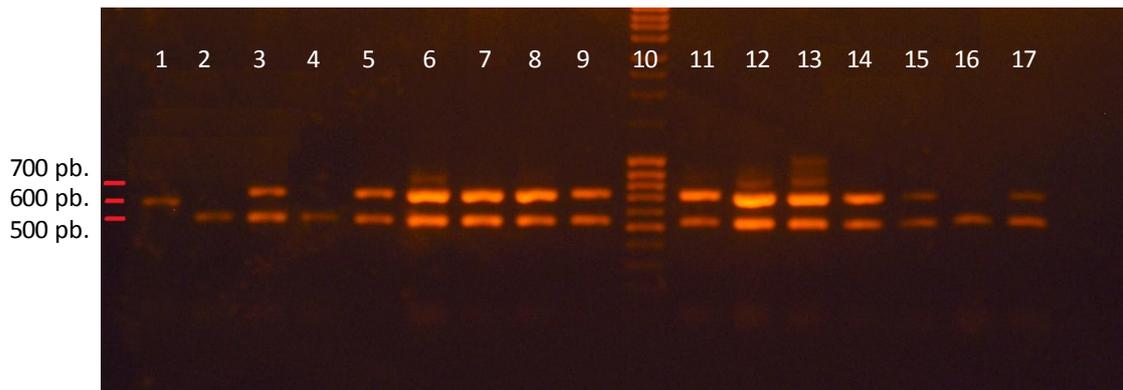


Figura 12. Productos de PCR múltiple para la determinación de genotipos en gel de agarosa. Se observa en el carril 1 el quimiotipo NIV con un fragmento de 600 pb. En los carriles 2, 4 y 16 el quimiotipo DON con un fragmento de 500 pb. En los carriles 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15 y 17 el quimiotipo DON/15-AcDON con dos fragmentos, uno de 500 pb y otro de 700 pb. En el carril 10 se observa el marcador de peso molecular de 100pb.

NIV (Tabla 4). No se observó el genotipo DON/3-AcDON para ninguno de los 150 aislamientos de trigo, cebada y sorgo.

Quimiotipos

Se determinó en granos de arroz la producción de tricotecenos de los 150 aislamientos de *F. graminearum* obtenidos de trigo, cebada y sorgo (Figura 13). El 97% de todos los aislamientos resultó ser productor de tricotecenos del tipo B mientras que el 3 % restante no produjo micotoxinas.

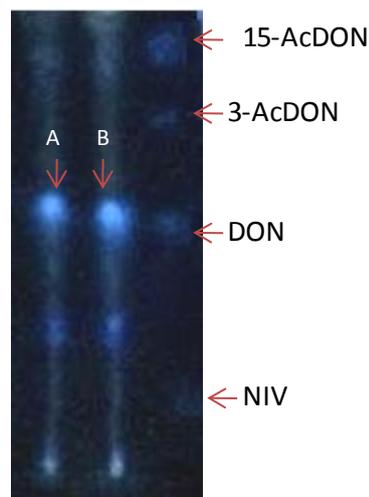


Figura 13: Producción de tricotecenos en cromatografía de capa fina. De izquierda a derecha se observan 2 muestras y el estándar. Las muestras exhiben producción de DON (A y B).

Del porcentaje total se encontró que el 55% de los aislamientos eran productores de DON únicamente, el 39% de DON/15-AcDON y el 6% restante de DON/3-AcDON y NIV. Todos los aislamientos de trigo produjeron tricotecenos, siendo el 64% productores de DON y el 36% productores de DON/15-AcDON. No se encontraron aislamientos productores de DON/3-AcDON ni de NIV. Con respecto a los aislamientos de cebada el 96% de las mismas presentaron producción de micotoxinas, siendo el 60% productor de DON. En sorgo el 94% de los aislamientos de *F. graminearum* fueron productores de tricotecenos, siendo el quimiotipo DON/15-AcDON el predominante. Tanto en cebada como en sorgo se encontraron aislamientos productores de DON/3-AcDON y NIV (Tabla 5).

Tabla 4: Genotipos encontrados en las cepas de *F. graminearum* analizadas.

Genotipos	% de aislamientos		
	CEBADA	TRIGO	SORGO
DON	0	6	0
DON/15AcDON	96	92	98
DON/3AcDON	0	0	0
NIV	4	2	2

Tabla 5: Porcentaje de aislamientos de *F. graminearum* productores de los distintos tricotecenos observados.

Tricoteceno	% de aislamientos		
	CEBADA	TRIGO	SORGO
DON	60	64	42
DON/15AcDON	34	36	46
DON/3AcDON	2	0	3
NIV	0	0	2
NO PRODUCE	4	0	6

DISCUSIÓN

Este trabajo representa el primer antecedente en Uruguay sobre la presencia de *Fusarium* en sorgo y la capacidad toxicogénica de *F. graminearum* en cebada, trigo y sorgo.

ESPECIES DE FUSARIUM

El trigo fue el grano que presentó mayor colonización por especies de *Fusarium* (61%). Promedios elevados de infección fueron también observados en el 2001 y 2002 en Uruguay siendo de 32% y 51% respectivamente (Pereyra & Dill-Macky, 2010). Se identificaron distintas especies de *Fusarium* colonizando los granos de trigo *F. lateritium*, especies del complejo *F. incarnatum-equiseti*, *F. nygamai*, *F. acuminatum*, *F. sambucinum*, *F. poae*, *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. sporotrichioides*, *F. tricinctum* y especies de FGSC, presentando estas últimas los mayores porcentajes de infección (57%). Resultados similares se observaron en trigo de las cosechas 2001-2002 en Uruguay, donde *F. graminearum* representó el 76% y 60% del total de las especies de *Fusarium* aisladas, respectivamente (Pereyra & Dill-Macky, 2010). Estos porcentajes estuvieron relacionados con condiciones ambientales propicias para la infección, como ser precipitaciones frecuentes durante los meses de setiembre, octubre y noviembre cuyos valores acumulados fueron de 681 mm y 815 mm para el 2001 y 2002 respectivamente (Pan et al., 2009; <http://www.inia.uy/gras/Clima/Banco-datos-agroclimatico>). Durante el año 2009 las precipitaciones fueron también frecuentes durante la floración y llenado del grano, alcanzando un valor acumulado de 711 mm. Esta condición podría explicar los elevados porcentajes de colonización por especies de *F. graminearum* observados en este trabajo.

En otras regiones del mundo como Europa Central y África del Sur se ha encontrado que las principales especies presentes en trigo son *F. graminearum*, *F. culmorum* y *F. poae*, siendo el primero el predominante (Krstanovic et al., 2005; Muthomi et al., 2008). En Argentina y Brasil se observa una situación similar donde *F. graminearum* es

la especie predominante aislada en trigo (Lori et al., 1992; Fernandez Pinto et al., 2008; González et al., 2008; Savi et al., 2014).

Por otro lado los porcentajes de infección de las especies de *Fusarium* encontradas en este trabajo, con excepción de *F. graminearum*, fueron muy bajos en contraposición con lo observado en otros años. En el 2001-2002 *Fusarium avenaceum* (17%), *F. poae* (10%) y *F. culmorum* (6%) presentaron porcentajes de infección considerables.

Dentro de las especies de FGSC encontradas, *F. graminearum* s.s. fue la especie predominante, siendo este resultado similar al encontrado previamente en nuestro país (Umpiérrez-Faliche et al., 2013; Pan et al., 2016). Esto indicaría que no han habido cambios importantes en la composición de especies de FGSC encontradas en trigo, manteniéndose *F. graminearum* s.s. como el principal agente causal de la FE. Por otra parte, se observó la presencia de *F. meridionale* en los granos de trigo analizados aunque en muy baja frecuencia (2%). Esto indica que a pesar de que *F. graminearum* s.s. es el principal responsable de la FE en Uruguay existen otras especies contribuyendo a la infección.

Estudios realizados en Brasil muestran la co-infección de *F. meridionale* y *F. graminearum* s.s. en trigo, al igual que lo observado en este trabajo (Scoz et al., 2009). En tanto en Argentina se ha encontrado a *F. graminearum* s.s. como única especie colonizando los granos de trigo (Sampietro et al., 2010; Alvarez et al., 2011; Reynoso et al., 2011). Una situación similar se observó en América del Norte y Europa Central donde *F. graminearum* s.s. es la especie predominante. No obstante en Estados Unidos se ha encontrado también la presencia de *F. asiaticum*. Los autores señalan que la presencia de dicha especie puede deberse a que ingresó originariamente en arroz y fue colonizando el trigo cuando las zonas de siembra se encuentran adyacentes (Ward et al., 2008; Gale et al., 2011). Mientras tanto en Asia la especie predominante en trigo es *F. asiaticum*, región de donde se considera es originaria (Suga et al., 2008; Zhang et al., 2012).

En cebada se encontraron siete especies de *Fusarium* colonizando los granos en un porcentaje de infección del 22% del cual, el complejo de especies de *F. graminearum*, es el predominante representando el 17%. Resultados similares a los encontrados en este trabajo fueron observado en muestras de cebada provenientes de Europa Central,

Estados Unidos, China y Sud América donde *F. graminearum* es el principal agente causal de la FE (Osborne & Stein, 2007; Boutigny et al., 2013; Gil-Serna et al., 2013; van der Lee et al., 2015). Pereyra & Dill-Macky (2010) encontraron en muestras de cebada nacional provenientes de los años 2001 y 2002 porcentajes de infección por *Fusarium* del 65% y 56%, respectivamente. Las especies de *Fusarium* presentes fueron *F. graminearum*, *F. acuminatum*, *F. avenaceum*, *F. equiseti*, *F. chlamydosporum*, *F. poae*, *F. sambucinum*, *F. tricinctum* y *F. semitectum*, siendo *F. graminearum* y *F. poae* los más frecuentes (60% y 20%, respectivamente).

La diferencia observada en los porcentajes de infección por *Fusarium* de un año a otro se debe principalmente a las diferentes condiciones ambientales bajo las cuales se desarrollo el cultivo, ocurriendo en el 2001 y 2002 frecuentes precipitaciones que generaron el desarrollo de severas fusariosis en cebada (681 mm y 815 mm, respectivamente). No obstante, los porcentajes de infección encontrados en el 2011 son significativos, considerando que fue un año en el que las condiciones ambientales, principalmente las precipitaciones, no fueron favorables para el desarrollo de la enfermedad (445 mm). Se podría por tanto inferir que existió un nivel de inóculo en el campo que permitió la infección de los granos aunque las condiciones no hayan sido favorables para el desarrollo de la enfermedad. *Fusarium graminearum* s.s., *F. cortaderiae* y *F. asiaticum* fueron las especies del FGSC presentes en cebada, siendo *F. graminearum* s.s. la más frecuente. La presencia de *F. cortaderiae* en granos como cebada, trigo y sorgo es esperable debido a que esta especie es originaria de América del Sur y fue aislada por primera vez de pampas grass (*Cortaderia jubata*) (O'Donnell et al., 2004).

Los resultados obtenidos en este estudio son similares a los encontrados en Brasil y Argentina, donde *F. graminearum* s.s. es el principal contaminante de los granos de cebada (Astolfi et al., 2011; Castañares et al., 2015). No obstante en Brasil se ha encontrado una mayor variedad de especies del FGSC contaminando los granos de cebada como ser *F. cortaderiae*, *F. asiaticum*, *F. austroamericanum* y *F. meridionale*. A diferencia de estos resultados, en Argentina la única especie que se ha encontrado presente en cebada ha sido *F. graminearum* s.s. (Castañares et al., 2014). También se ha encontrado a *F. graminearum* s.s. como el principal contaminante en zonas de

América del Norte y Europa donde la producción de cebada es importante (Boutigny et al., 2013; Gil-Serna et al., 2013; van der Lee et al., 2015). En China y Japón la situación es diferente, encontrándose a *F. asiaticum* como el principal contaminante de cebada en las zonas del sur y a *F. graminearum* s.s. en el norte. Esta diferencia geográfica fue explicada debido a que *F. asiaticum* se encuentra asociado a climas con temperaturas medias mayores a 15°C (región sur) y *F. graminearum* s.s. a temperaturas medias menores a 15°C (región norte) (Suga et al., 2008). También se ha correlacionado la presencia de *F. asiaticum* y *F. graminearum* s.s. con el esquema de rotación de cultivos. En regiones donde la rotación de cebada o trigo involucra al cultivo de arroz *F. asiaticum* es la especie predominante, mientras que *F. graminearum* s.s. predomina cuando la rotación no implica al cultivo de arroz (Zhang et al., 2012; van der Lee et al., 2015). Esto es debido a que *F. asiaticum* es una especie originaria de Asia y que se encuentra normalmente asociada a las cosechas de arroz (Qui et al., 2014). En base a estos antecedentes la baja presencia de *F. asiaticum* en las muestras de cebada de nuestro país podría deberse a que las temperaturas medias durante la floración son generalmente menores a los 15°C favoreciendo así la presencia de *F. graminearum* s.s. frente a *F. asiaticum*. Por otra parte, las muestras de cebada analizadas provienen del litoral oeste del país, zona donde no se cultiva arroz, lo cual indicaría que esta especie podría haber ingresado con las semillas. Mayores estudios deberían ser realizados para poder relacionar la presencia de FGSC con los factores climáticos y las variedades de cultivo con el fin de obtener un mayor conocimiento para poder explicar los resultados obtenidos.

Estudios realizados en sorgo han podido determinar que las especies de *Fusarium* más frecuentes que colonizan los granos en distintas partes del mundo pertenecen al complejo de especies de *Gibberella fujikuroi*, asociándose así como el principal agente causal de la podredumbre del sorgo (Leslie et al., 2005; Thakur et al., 2006). Dentro de las especies de este complejo, *F. verticillioides*, *F. thapsinum*, *F. proliferatum*, *F. sacchari* y *F. andiyazi* han sido las especies más frecuentes en sorgo de Argentina, Brasil e India (da Silva et al., 2006; Alves dos Reis et al., 2010; Sharma et al., 2011). Cabe destacar que las especies del complejo *G. fujikuroi* se encuentran asociadas a la producción de fumonisinas y son consideradas las responsables de la contaminación

del sorgo por estas micotoxinas. Las fumonisinas (B1 y B2) son metabolitos fúngicos altamente tóxicos para humanos y animales. Dentro de las fumonisinas la B1 es la más tóxica y se ha demostrado su capacidad para producir tumores en ratas, leucoencefalomalacia en equinos y edema pulmonar en cerdos. El consumo de alimentos contaminados con fumonisinas ha sido asociado con cáncer esofágico en humanos en varias regiones de África, América Central, Estados Unidos y Asia. También ha sido asociada a efectos en el desarrollo del tubo neural en bebés (Marasas et al., 2004; Zain, 2010). A diferencia de lo reportado por otros autores, la especie predominante dentro del complejo *G. fujikuroi* en los granos de sorgo de nuestro país fue *F. nygamai*. Esta especie ha sido encontrada en sorgo, arroz y suelo en Argentina, Australia, Malasia, Puerto Rico, Sudáfrica, Sri Lanka y Tailandia (Burgess & Trimboli, 1986; Marasas et al., 1988; Magnoli et al., 1999; Balmas et al., 2000; Sapumohotti et al., 2004). También se ha demostrado la capacidad que tiene esta especie de producir fumonisinas (Thiel et al., 1991; Nelson et al., 1992). Aunque esta especie no se encuentra usualmente contaminando los granos de cereales y no es considerada un importante productor de fumonisinas en los productos agrícolas como otras especies de *Fusarium*, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que *F. nygamai* debe ser considerado como un importante contaminante del sorgo.

En este estudio los granos de sorgo se encontraron además de *F. nygamai*, contaminados con *F. graminearum* y especies del complejo *F. incarnatum-equiseti* alcanzando porcentajes de infección de 16%, y 0,5% respectivamente. Especies del complejo *F. incarnatum-equiseti* también han sido encontradas contaminando los granos de sorgo en la India, Egipto, Tunes y Argentina (Divakara et al., 2014; Lahouar et al., 2015). Sin embargo, la alta presencia de FGSC resulta novedosa ya que en otras partes del mundo no han sido observadas especies de este complejo en tan alta frecuencia. Una explicación a esto podría deberse a que en nuestro país es muy frecuente la rotación de cultivos de invierno como trigo o cebada con sorgo, permitiendo así que especies presentes en estos cultivos puedan colonizar al sorgo.

Dentro de las especies de FGSC que se encontraron presentes en los granos de sorgo se encuentran *F. graminearum* s.s. y *F. cortaderiae*, siendo la primera la predominante

al igual que en trigo y en cebada. Como ha sido mencionado anteriormente *F. cortaderiae* es una especie originaria de América del Sur y se ha encontrado anteriormente en trigo de Uruguay por Umpiérrez-Failache et al. (2013) y en cebada en el presente trabajo.

Debido a que no hay antecedentes de la presencia de *Fusarium* en sorgo de Uruguay, estos resultados son de gran importancia para poder establecer estrategias para el manejo de este cultivo.

GENOTIPOS

A nivel mundial el perfil toxicogénico de *F. graminearum* predominante en cultivos es DON/15-AcDON. También se han encontrado aislamientos DON/3-AcDON pero en menor proporción y comúnmente asociados a Asia y Estados Unidos (van der Lee et al., 2015). Los aislamientos del FGSC provenientes de trigo analizado en el presente trabajo presentaron como genotipo predominante DON/15-AcDON. Este resultado es concordante con lo encontrado en estudios previos en granos de trigo de Uruguay (Pan et al., 2013; Umpiérrez-Faliche et al., 2013). Sin embargo, Umpiérrez-Faliche et al. (2013) determinaron la presencia del genotipo NIV en mayor frecuencia a la encontrada en este trabajo como así también cepas del genotipo DON/3-AcDON. Estas diferencias pueden deberse a que las muestras analizadas por estos autores provenían de regiones de cultivo de trigo ubicadas al este del país, donde el cultivo de arroz es frecuente.

La presencia de aislamientos capaces de producir NIV es de gran importancia ya que esta toxina resulta más tóxica para el consumo que DON (Desjardins, 2006). Sin embargo, su baja frecuencia puede deberse a que las cepas productoras de DON son más virulentas que las anteriores y por ello presentan una considerable ventaja adaptativa (Desjardins & Proctor, 2011). Se observó una diferenciación de los genotipos a nivel de especie, presentando todos los aislamientos de *F. graminearum* s.s. el genotipo DON/15-AcDON y los aislamientos de *F. meridionale* el genotipo NIV. Resultados similares fueron observados en trigo brasileño donde el genotipo DON/15-AcDON se encuentra asociado a *F. graminearum* s.s. y *F. meridionale* al genotipo NIV al

igual que *F. asiaticum*, mientras que *F. cortaderiae* y *F. austroamericanum* presentan tanto el genotipo NIV como el DON/3-AcDON (Scoz et al., 2008; Del Ponte et al., 2015). En Argentina, como en otras partes del mundo como ser Asia y algunas regiones de Europa, también se encontró que todos los aislamientos de *F. graminearum* s.s. pertenecen al genotipo DON/15-AcDON (Reynoso et al., 2011; van der Lee et al., 2015). No obstante una situación diferente se observa en Canadá, Estados Unidos, el norte de Rusia y Finlandia donde se asocia a *F. graminearum* s.s. con la producción de DON/3-AcDON (Jennings et al., 2004; Gale et al., 2007; Waalwijk et al., 2008; Yli-Mattila et al., 2009; Reynoso et al., 2011; Talas et al., 2011; Zhang et al., 2012; Boutigny et al; 2014; Somma et al., 2014). Aislamientos con este genotipo representan un mayor riesgo para los cultivos ya que presentan mayores ventajas adaptativas en tanto son capaces de producir más conidios y también mayor cantidad de toxinas (Ward et al., 2008; Puri & Zhong, 2010). En base a estos antecedentes la ausencia de cepas DON/3-AcDON de trigo de nuestro país es un aspecto importante para la elaboración de estrategias de manejo del cultivo. Por otro lado la presencia de aislamientos de *F. graminearum* s.s. con el genotipo DON ha sido previamente observada en estudios realizados en trigo uruguayo y argentino (Alvarez et al., 2009; Pan et al., 2013). Este genotipo sugiere que dichas cepas serían capaces de producir únicamente DON y no los derivados acetilados. Los tricotecenos son conocidos factores de virulencia para el hongo y la presencia de DON y los derivados acetilados les confiere ventajas a la hora de colonizar los distintos tejidos de las plantas (Desjardins, 2006). Por lo tanto cepas incapaces de producir los derivados acetilados podrían ser menos virulentas que las que sí lo son. Sería de interés poder evaluar la virulencia de estas cepas y compararlas con las que sí son potencialmente productoras de los derivados acetilados.

Los aislamientos de *F. graminearum* obtenidos de cebada pertenecieron principalmente al genotipo DON/15AcDON y en muy baja proporción al genotipo NIV (4%). Al igual que en trigo, todos los aislamientos de cebada identificados como *F. graminearum* s.s. correspondieron al genotipo DON/15AcDON y los identificados con *F. cortaderiae* y *F. asiaticum* al genotipo NIV. Tanto *F. cortaderiae* como *F. asiaticum* son especies del FGSC comúnmente asociadas a este genotipo. Los resultados

obtenidos en este trabajo son similares a los encontrados en cebada de Argentina, Brasil y Europa Central, donde la especie predominante es *F. graminearum* s.s. con el genotipo DON/15AcDON (Astolfi et al., 2011; Bouytigny et al.; 2014; Castañares et al., 2015). En cambio en China la situación es diferente ya que se ha encontrado que el genotipo predominante es NIV asociado a *F. asiaticum*. No obstante los pocos aislamientos de *F. graminearum* s.s. obtenidos de cebada en China presentaron el genotipo DON (Yang et al., 2008). Las razones por las cuales existe esta separación aparente entre especies y genotipos en China no están claras, como tampoco la regionalización de genotipos de una misma especie como ser el genotipo 15-AcDON en regiones del Sur y el 3-AcDON en regiones del Norte. Algunos autores señalan que esto puede deberse a diferencias en las condiciones climáticas tales como temperatura y humedad. En regiones donde la temperatura media es mayor a 15°C se encuentra principalmente 15-AcDON mientras que en regiones donde la media es menor a 15 °C se encuentra 3-AcDON (van der Lee et al., 2015).

Los aislamientos de FGSC obtenidos de sorgo presentaron un potencial toxicogénico similar a los de trigo y cebada, siendo DON/15AcDON el genotipo predominante. Al igual que en trigo y cebada todos los aislamientos identificados como *F. graminearum* s.s. y *F. cortadieriae* presentaron el genotipo DON/15Ac-DON y NIV, respectivamente. La presencia, aunque en baja frecuencia, de cepas con el genotipo NIV en los cultivos estudiados es de gran importancia ya que esta toxina es más tóxica para humanos y animales que DON (van der Lee et al., 2015). Sin embargo, NIV es menos fitotóxico que DON y esto puede ejercer cierta presión selectiva en las poblaciones de *F. graminearum* (Desjardins, 2006). Por otra parte estudios recientes han demostrado que las poblaciones de *F. graminearum* s.s. aisladas de trigo de Uruguay presentan una frecuente recombinación genética y un elevado flujo de genes lo que implica que cepas con diferente perfil toxicogénico pueden difundir rápidamente a través del país y desplazar así a las cepas nativas (Pan et al., 2016).

QUIMIOTIPOS

Debido a que se ha observado frecuentemente diferencias entre el genotipo y el quimiotipo que presentan las cepas de FGSC, la validación de los genotipos mediante análisis químico es necesaria para proveer datos más confiables sobre los posibles riesgos de contaminación que pueden presentar los granos (Mugrabi de Kuppler et al., 2011; Somma et al., 2014). En Uruguay no existen estudios acerca de los perfiles de producción química de especies de *Fusarium*, por lo que los resultados obtenidos en este trabajo representan el primer antecedente para nuestro país. Todos los aislamientos de FGSC obtenidos de trigo resultaron ser productores de micotoxinas siendo 64% de los aislamientos productores de DON únicamente y el resto productores de DON y su derivado acetilado 15AcDON. A partir de estos resultados se puede comprobar que los aislamientos de FGSC de trigo uruguayo presentan diferencias entre el genotipo y la producción de tricotecenos, ya que solo el 30% de las cepas que presentaron el genotipo DON/15-AcDON fueron productoras de dicho compuesto acetilado. Resultados similares fueron obtenidos en Italia donde solo el 23% de los aislamientos con genotipo DON/15AcDON produjeron el derivado acetilado (Somma et al., 2014).

El 96% de los aislamientos de FGSC obtenidos de cebada produjeron tricotecenos siendo DON el tricoteceno predominante (60%) seguido por DON/15AcDON. Se observaron también cepas productoras de DON/3AcDON pero no así de NIV. La presencia de cepas de *F. graminearum* del quimiotipo DON/3AcDON en nuestra población tiene una gran implicancia epidemiológica debido a que estudios realizados en USA y Canadá demostraron que cepas 3AcDON fueron más agresivas que las 15AcDON frente a genotipos de trigo tanto susceptibles como resistentes y produjeron *in vitro* mayor cantidad de DON que las cepas 15AcDON (Puri & Zhong, 2010; von der Ohe et al., 2010). Esto ha generado en estos países cambios en las poblaciones de *F. graminearum* tendiendo a aparecer con mayor frecuencia aislamientos con el genotipo 3AcDON (van der Lee et al., 2015). Sin embargo, este estudio muestra que las poblaciones de FGSC de nuestro país están caracterizadas por una alta homogeneidad

en el perfil de tricotecenos (DON/15AcDON) y no se han observado cambios importantes en la población en base a estudios previos realizados en Uruguay.

Por otro lado se observó que de los aislamientos con el genotipo NIV sólo uno resultó productor de micotoxinas y al igual que en trigo produjo DON/15AcDON. Esto podría deberse a que existen enzimas que participan en la generación de los tricotecenos que no han sido evaluadas y que podrían estar actuando post-biosíntesis convirtiendo NIV en DON y viceversa (Mugrabi de Kuppler et al., 2011).

Los aislamientos provenientes de sorgo presentaron la mayor variabilidad de quimiotipos respecto a los tres granos analizados. No obstante fue el sustrato que presentó el mayor número de cepas no productoras de tricotecenos y a diferencia de lo encontrado en trigo y cebada, el quimiotipo predominante fue DON/15AcDON (46%) seguido por DON (42%). También en este sustrato las cepas de FGSC estudiadas presentaron diferencias entre el genotipo y la producción de tricotecenos. El 46% de los aislamientos con genotipo DON/15AcDON fueron productores de dicho derivado acetilado, mientras que el 54% restante solo produjeron DON, NIV o DON/3AcDON.

Hasta la fecha no existen estudios realizados en sorgo a cerca de la presencia de FGSC y su caracterización toxicogénica y son muy pocos los realizados en cebada en comparación con los datos existentes de trigo. Por este motivo, los resultados obtenidos constituyen un aporte importante en tanto permiten conocer la biodiversidad de especies de *F. graminearum* y su potencial toxicogénico en cebada y sorgo de nuestro país. La información generada permitirá así aportar al conocimiento de este patógeno en cultivos antes no estudiados y poder definir estrategias adecuadas de prevención y control de la fusariosis.

Por otra parte se ha señalado a nivel mundial la importancia de realizar una vigilancia respecto a las especies de FGSC presentes en los cultivos para reducir el riesgo de que nuevas cepas con distintos potenciales se expandan globalmente (Ward et al., 2002). Esto plantea la necesidad de realizar de manera continua este monitoreo en los cereales de nuestro país. Al mismo tiempo, la presencia de especies toxicogénicas en cebada y sorgo hace necesario la elaboración de normativas adecuadas para el control de estas toxinas en estos cereales.

CONCLUSIONES

- *F. graminearum s.s.*, *F. cortaderiae*, *F. meridionale* y *F. asiaticum* fueron las especies del complejo encontradas en los granos analizados.
- La principal especie de *Fusarium* presente en los granos de trigo, cebada y sorgo fue *F. graminearum s.s.*
- El principal genotipo encontrado en los aislamientos analizados fue DON/15-AcDON.
- Todos los aislamientos del FGSC son productores de tricotecenos del tipo B, siendo DON la principal toxina.
- No se encontraron diferencias entre los granos analizados a nivel de las especies del FGSC y su capacidad toxicogénica.

BIBLIOGRAFÍA

Alexander N, McCormick S, Hohn T. 1999. TRI12, a trichothecene efflux pump from *Fusarium sporotrichioides*: gene isolation and expression in yeast. *Molecular & General Genetics* 261, 977–984.

Alexander N, McCormick S, Waalwijk C, van der Lee T, Proctor R. 2011. The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium*. *Fungal Genetics and Biology* 48, 485-495.

Alexander N, Proctor R, McCormick S. 2009. Gene, gene clusters and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. *Toxin Reviews* 28, 198-215.

Alvarez C, Azcarate M, Fernandez Pinto V. 2009. Toxigenic potential of *Fusarium graminearum sensu stricto* isolates from wheat in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 135, 131-135.

Alvarez C, Somma S, Proctor R, Stea G, Mulè G, Logrieco A, Pinto V, Moretti A. 2011. Genetic diversity in *Fusarium graminearum* from a major wheat-producing region of Argentina. *Toxins (Basel)* 3, 1294-1309.

Alves dos Reis T, Zorzete P, Pozzi CR, Nascimento da Silva V, Ortega E, Corrêa B. 2009. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian sorghum from sowing to harvest. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, 1445-1451.

Aoki T, O'Donnell K. 2014. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *Journal of General Plant Pathology* 80, 189-201.

Aoki T, Ward T, Kistler H, O'Donnell K. 2012. Systematics phylogeny and trichothecene Mycotoxin potential of *Fusarium* head blight cereal pathogens. *Mycotoxins* 62, 91-102.

Astolfi P, dos Santos J, Schneider L, Gomes L, Silva C, Tessmann D, Del Ponte E. 2011. Molecular survey of trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* species complex from barley in southern Brasil. *International Journal of Food Microbiology* 148, 197-201.

Backhouse D, Burgess L, Summerell B. 2001. Biogeography of *Fusarium*. En: *Fusarium* Paul E. Nelson Memorial Symposium. B. A. Summerell, J. F. Leslie, D. Backhouse, P. Bryden, and L. W. Burgess, eds. The American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN, pp. 122-136.

Balmas V, Santori A, Corazza L. 2000. Ruolo di alcune specie di *Fusarium* nel determinare sintomi di "mal del piede" del frumento duro. *Atti Giornate Fitopatologiche* 2, 247-252.

Barros G, Alaniz M, Chiotta M, Reynoso M, Scandiani M, Chulze S. 2014. Pathogenicity of phylogenetic species in the *Fusarium graminearum* complex on soybean seedlings in Argentina. *European Journal of Plant Pathology* 138 (2), 215-222.

Bennett F. 1931. *Gibberella saubinetii* (Mont.) Sacc. On British cereals. II. Physiological and pathological studies. *Annals of Applied Biology* 18, 158-177.

Beyer M, Verreet J, Ragab S. 2005. Effect of relative humidity on germination of ascospores and macroconidia of *Gibberella zeae* and deoxynivalenol production. *International Journal of Food Microbiology* 98, 233-240.

Boshoff W, Pretorius Z, Swart W, Jacobs A. 1996. A comparison of scab development in wheat infected by *Fusarium graminearum* and *Fusarium crookwellense*. *Phytopathology* 86, S 58.

Bottalico A & Perrone G. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 108, 611-624.

Boutigny A, Ward T, Ballois N, Iancu G, Loos R. 2014. Diversity of the *Fusarium graminearum* species complex on French cereals. *European Journal of Plant Pathology* 138, 133-148.

Boutigny A, Ward T, Van Coller G, Flett B, Lamprecht S, O'Donnell K, Viljoen A. 2011. Analysis of *Fusarium graminearum* species complex from wheat, barley and maize in South Africa provides evidence of species-specific differences in host preference. *Fungal Genetics and Biology* 48, 914-920.

Brown D, McCormick S, Alexander N, Proctor R, Desjardins A. 2001. A genetic and biochemical approach to study trichothecene diversity in *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology* 32, 121-133.

Brown D, McCormick S, Alexander N, Proctor R, Desjardins A. 2002. Inactivation of a cytochrome P-450 is a determinant of trichothecene diversity in *Fusarium* species. *Fungal Genetics and Biology* 36, 224-233.

Brown D, Proctor R, Dyer R, Plattner R. 2003. Characterization of a *Fusarium* 2-gene cluster involved in trichothecene C-8 modification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 31, 7936-7944.

Brown N, Urban M, Van De Meene, Allison M, Hammond-Kosack K. 2010. The infection biology of *Fusarium graminearum*: Defining the pathways of spikelet to spikelet colonisation in wheat ears. *Fungal Biology* 114, 555-571.

Burgess L & Trimboli D. 1986. Characterization and distribution of *Fusarium nygamai* sp. Nov. *Micologia* 78, 223-229.

Burgess L, Summerell B, Bullock S, Gott K, Backhouse D. 1994. Laboratory manual for *Fusarium* research. 3rd Edition. University of Sydney. pp 156.

Burlakoti R, Shaukat A, Secor A, Neate S, McMullen M, Adhikari T. 2008. Comparative Mycotoxin profiles of *Gibberella zeae* populations from barley, wheat, potatoes and sugar beets. *Applied Environmental Microbiology* 74, 6513-6520.

Bushnell W, Hazen B, Pritsch C. 2003. Histology and Physiology of *Fusarium* Head Blight. En: *Fusarium* Head Blight of wheat and barley. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. pp 44-83.

Castañares E, Ramirez Albuquerque D, Dinolfo M, Fernandez Pinto V, Patriarca A, Stenglein A. 2014. Trichothecene genotypes production profiles of *Fusarium graminearum* isolates obtained from barley cultivated in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 179, 57-63.

Castañares E, Dinolfo M, Del Ponte E, Pan D, Stenglein S. 2016. Species composition and genetic structure of *Fusarium graminearum* species complex populations affecting the main barley growing regions of South America. *Plant Pathology*, 65, 930-939.

Champeil 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.

Cheeke P. 1998a. Mycotoxins in cereal grains and supplements. En *Natural Toxicants in Feeds, Forages, and Poisonous Plants*. Cheeke P (Ed). Interstate Publishers, Inc., Danville, IL, pp 87-136.

Chelkowski J. 1991. Preface. En: *Cereal grain. Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage*. J.Chelkowski (Ed). Amsterdam: Elsevier, pp 77-118.

Chulze S, Ramirez M, Farnochi M, Pascale M, Visconti A, March G. 1996. *Fusarium* and fumonisin occurrence in Argentinian corn at different ear maturity stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 2797-2801.

Copock R & Jacobsen B. 2009. Mycotoxins in animals and human patients. *Toxicology and Industrial Health* 25, 637-655.

Cosette F & Miller J. 1995. Phytotoxic effect of deoxynivalenol and *Gibberella zeae* ear rot resistance of corn. *Natural Toxins* 3, 383-388.

da Silva V, Campos FM, Cortez A, Baggio D, de Almeida A, Hiroko R, Corrêa B. 2006. Characterization and genetic variability of *Fusarium verticillioides* strains isolated from corn and sorghum in Brazil based on fumonisins production, microsatellites, mating type locus, and mating crosses. *Canadian Journal of Microbiology* 52, 798-804.

da Silva J, Pozzi C, Malozzi M, Ortega E, Corrêa B. 2000. Mycoflora and occurrence of aflatoxin and fumonisin in freshly harvested and storage Brazilian sorghum. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 48, 4352-4356.

Decreto del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. 2001. República Oriental del Uruguay Decreto 26/12/01.

Decreto del Ministerio de Salud Pública. 2001. República Oriental del Uruguay Decreto 470/02.

Del Ponte E, Spolti P, Ward T, Gomes L, Nicolli C, Kuhnem P, Silva C, Tessmann D. 2015. Regional and Field-Specific Factors Affect the Composition of *Fusarium* Head Blight Pathogens in Subtropical No-Till Wheat Agroecosystem of Brazil. *Phytopathology* 105, 246-254.

Del Ponte E, Tessmann D, Spolti P, Kuhnem P, da Silva C. 2013. Species identification genetic diversity and phenotypic variation studies on *Fusarium graminearum* complex populations from Brazil. En: Magliano T, Chulze S. Ed. *Fusarium head blight in Latin America*. Dordrecht: Springer Science + Business Media, pp. 15-30.

Desjardins A. 2006. *Fusarium* mycotoxins: Chemistry, genetics and biology. APS Press. St. Paul, Minnesota, USA.

Desjardins A. 2008. Natural product chemistry meets genetics: when is a genotype a chemotype? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 7587–7592.

Desjardins A & Hohn T. 1997. Mycotoxins in plant pathogenesis. *Molecular Plant – Microbe Interactions* 10, 147-152.

Desjardins A & Proctor R. 2011. Genetic diversity and trichothecene chemotypes of the *Fusarium graminearum* clade isolated from maize in Nepal and identification of a putative new lineage. *Fungal Biology* 115, 38-48.

Desjardins A, Proctor R, Bai G, McCormick S, Shaner G, Buechley G, Hohon T. 1996. Reduced virulence of trichothecene-nonproducing mutants of *Gibberella zeae* in wheat field tests. *Molecular Plant - Microbe Interactions* 9, 775-781.

DIEA. 2016. Anuario Estadístico Agropecuarias, Uruguay.

DIEA. 2014. Anuario Estadístico Agropecuario, Uruguay.

DIEA 2009. La producción lechera en el Uruguay Año 2007. Serie Encuestas, Agosto. N° 278. Uruguay.

Dinis A, Lino C, Pena A. 2007. Ochratoxin A in nephropathic patients from two cities of central zone in Portugal. *Journal of Pharmaceutical Biomedics* 44, 553-557

Divakara S, Santosh P, Aiyaz M, Venkata Ramana M, Hariprasad P, Chandra Nayakaa S, Ramachandrappa Niranjanaa S. 2014. Molecular identification and characterization of *Fusarium* spp. associated with sorghum sedes. *Journal of Science and Food Agriculture* 94, 1132-1139.

Doohan F, Brennan J, Cooke B. 2003. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology* 109, 755-768.

Duijnhouwer I, Grasshoff C, Angelino S. 1993. Kernel filling and malting barley quality. *European Brewery Convention: Proceedings of the 24th Congress*, 121–128. Oslo, Norway.

Eriksen G, Pettersson H. 2004. Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Animal Feed Science and Technology* 114, 205-239.

Fernandez Pinto V, Terminiello L, Basílico J, Ritieni A. 2008. Natural occurrence of nivalenol and mycotoxigenic potential of *Fusarium graminearum* strains in wheat affected by head blight in Argentina. *Brazilian Journal of Microbiology* 39, 157-162.

Gale L, Harrison S, Ward T, O'Donnell K, Milus E, Gale S, Kistler H. 2011. Nivalenol-type populations of *Fusarium graminearum* and *F. asiaticum* are prevalent on wheat in southern Louisiana. *Phytopathology* 101, 124-134.

Gale L, Ward T, Balmas V, Kistler H. 2007. Population subdivision of *Fusarium graminearum sensu stricto* in the upper Midwestern United States. *Phytopathology* 97, 1434-1439.

Gardiner D, Kemal K, Manners J. 2009. Nutrient profiling reveals potent inducers of trichothecene biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology* 46, 604-613

Gil-Serna J, Mateo E, González-Jaén M, Jiménez M, Vázquez C, Patiño B. 2013. Contamination of barley seeds with *Fusarium* species and their toxins in Spain: an integrated approach. *Food Additives & Contaminants: Part A* 30, 372-380.

González H, Molto G, Pacin A, Resnik S, Zelaya M, Masana M, Martínez E. 2008. Trichothecenes and Mycoflora in Wheat Harvested in Nine Locations in Buenos Aires Province, Argentina. *Mycopathologia* 165, 105–114.

Goswami R & Kistler H. 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology* 5, 515-525.

IARC (International Agency for Research on Cancer). 2002. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* 82, 1-590.

Ivic D, Domijan A-M, Peraica M, Milicevic T, Cvjetkovic B. 2009. *Fusarium* spp. Contamination of wheat, maize, soybean, and pea in Croatia. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 60, 435-442.

Jennings P, Coates M, Walsh K, Turner J, Nicholson P. 2004. Determination of deoxynivalenol- and nivalenol- producing chemotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat crops in England and Wales. *Plant Pathology* 53, 643-652.

Kimura M, Matsumoto G, Shingu Y, Yoneyama K, Yamaguchi I. 1998. The mystery of the trichothecene 3-O-acetyltransferase gene. Analysis of the region around Tri101 and characterization of its homologue from *Fusarium sporotrichioides*. *FEBS Letters* 435, 163–168.

Kimura M, Tokai T, O'Donnell K, Ward T, Fujimura M, Hamamota H, Shibata T, Yamaguchi I. 2003. The trichothecene biosynthesis gene cluster of *Fusarium graminearum* F15 contains a limited number of essential pathway genes and expressed non-essential genes. *FEBS Letters* 539, 105–110.

Kimura M, Tokai T, Takahashi-Ando N, Oshato S, Fujimura M. 2007. Molecular and genetic studies of *Fusarium* trichothecene biosynthesis: pathways, genes, and evolution. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 71, 2105-2123.

Korosteleva S, Smith T, Boermans H. 2009. Effects of feed naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on metabolism and immunity of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 92, 1585–1593.

Krstanovic V, Klapec T, Velic N, Milakovic Z. 2005. Contamination of malt barley and wheat by *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* from the crop years 2001-2003 in eastern Croatia. *Microbiological Research* 160, 353-359.

Lahouar A, Crespo-Sempere A, Marín S, Saïd S, Sanchis V. 2015. Toxigenic molds in Tunisian and Egyptian sorghum for human consumption. *Journal of Stored Products Research* 63, 57-62.

Lee T, Han Y, Kim K, Yun S, Lee Y. 2002. Tri 13 and Tri 7 determine deoxynivalenol- and nivalenol- producing chemotypes of *Gibberella zeae*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2148-2154.

Leonard K & Bushnell W. 2003. *Fusarium* head blight of wheat and barley. The American Phytopathological Society. APS press, Minnesota, USA.

Leslie J & Summerell B. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell publishing, Iowa, USA.

Leslie J, Zeller K, Lamprecht S, Rheeder J, Marasas W. 2005. Toxicity, pathogenicity, and genetic differentiation of five species of *Fusarium* from sorghum and millet. *Phytopathology* 95, 275–283

Lewandowski S & Bushnell W. 2001. Development of *Fusarium graminearum* on floret surfaces of field-grown barley. National *Fusarium* Head Blight Forum, December page 128. Eelanger, KY.

Lori G, Carranza M, Violante A, Rizzo I, Alippi H. 1992. *Fusarium* spp en trigo, capacidad toxicogenica y quimiotaxonomia de las cepas aisladas en la Argentina. *Agronomie* 12, 459-467.

Magnoli C, Saenz M, Chiacchiera S, Dalcerro M. 1999. Natural occurrence *Fusarium* species and fumonisin-production by toxigenic strains isolated from poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia* 145, 35-41.

Marasas W, Kellerman T, Gelderblom W, Coetzer J, Thiel P, van der Lugt J. 1988. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moliniforme*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 55, 197-203.

Marasas W, Riley R, Hendricks K, Stevens V, Sadler T, Gelineau-van Waes J, Missmer S, Cabrera J, Torres O, Gelderblom W, Allegood J, Martinez C, Maddox J, Miller J, Starr L, Sullards M, Roman A, Voss K, Wang E, Merrill A. 2004. Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in

vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin contaminated maize. *Journal of Nutrition* 134, 711–716.

Marroquín-Cardona A, Johnson N, Phillips T, Hayes A. 2014. Mycotoxins in a changing global environment- A review. *Food and Chemical Toxicology* 69, 220-230.

McCormick S & Alexander N. 2002. *Fusarium* Tri8 encodes a trichothecene C-3 esterase. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2959–2964.

McCormick S, Alexander N, Proctor R. 2006. Heterologous expression of two trichothecene P450 genes in *Fusarium verticillioides*. *Canadian Journal of Microbiology* 52, 220-226.

McCormick S, Hohn T, Desjardins A. 1996. Isolation and characterization of Tri3, a gene encoding 15-O- acetyltransferase from *Fusarium sporotrichioides*. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 353–359.

McCormick S, Stanley A, Stiver N, Alexander N. 2011. Trichothecenes: From simple to complex mycotoxins. *Toxins* 3, 802-814.

McMullen M, Jones R, Gallenberg D. 1997. Scab of wheat and barley: a reemerging disease of devastating impact. *Plant Disease* 81, 1340-1348.

McLaughlin C, Vaughn M, Campbell J, Wei C, Stafford M, Hansin B. 1977. Inhibition of protein synthesis by trichothecenes. En: *Micotoxins in Humans and Animal Health*. Rodricks H, Hesseltine C, Mehlman eds. Oathotoxin Publishers, Park Forest South, IL.

Meek I, Peplow A, Ake C, Phillips T, Beremand M. 2003. Tri1 encodes the cytochrome P450 monooxygenase for C-8 hydroxylation during trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides* and resides upstream of another new Tri gene. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1607-1613.

Mugrabi de Kuppler A, Steiner U, Sulyok M, Krska R, Oerke E. 2011. Genotyping and phenotyping of *Fusarium graminearum* isolates from Germany related to their Mycotoxin biosynthesis. *International Journal of Food Microbiology* 151, 78-86.

Muthomi J, Ndung'u J, Gathumbi J, Mutitu E, Wagacha J. 2008. The occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in Kenyan wheat. *Crop Protection* 27, 1215-1219.

Nelson P, Plattner R, Shackelford D, Desjardins A. 1992. Fumonisin B1 production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section Liseola and by some related species. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 984–989.

Nelson P, Toussoun T, Marasas W. 1983. *Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification*. Pennsylvania State University Press, Pennsylvania, USA.

Nicholson P, Simpson D, Weston G, Rezanoor H, Lees A, Parry D, Joyce D. 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals by using PCR assays. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 53, 17-37.

Nielsen L, Cook D, Edwards S, Ray R. 2014. The prevalence and impact of *Fusarium* Head Blight pathogens and mycotoxins on maltin barley quality in UK. *International Journal of Food Microbiology* 179, 38-49.

Nielsen L, Jensen JD, Nielsen G, Jensen JE, Spliid N, Thomsen I, Justensen A, Collinge D, Jorgensen L. 2011. *Fusarium* head blight of cereals in Denmark: species complex and related mycotoxins. *Plant Pathology* 101, 960-969.

O'Donnell K, Kistler H, Cigelnik E, Ploetz R. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 2044-2049.

O'Donnell K, Ward T, Geiser D, Kistler H, 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.

Osborne L & Stein J. 2007. Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. *International Journal of Food Microbiology* 119, 103-108.

Pan D, Bonsignore F, Rivas F, Perera G, Bettucci L. 2007. Deoxynivalenol in barley samples from Uruguay. *International Journal of Food Microbiology* 114, 149-152.

Pan D, Calero N, Mionetto A, Bettucci L. 2013. Trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* from wheat in Uruguay. *International Journal of Food Microbiology* 162, 120-123.

Pan D, Graneri J, Bettucci L. 2009. Correlation of rainfall and levels of deoxynivalenol in wheat from Uruguay, 1997–2003. *Food Additives and Contaminants: Part B* 2, 162–165.

Pan D, Mionetto A, Calero N, Reynoso MM, Torres A, Bettucci L. 2016. Population genetic analysis and trichothecene profiling of *Fusarium graminearum* from wheat in Uruguay. *Genetics and Molecular Research* 15, 1-11.

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

Pereyra S, Dill-Macky R. 2010. *Fusarium* species recovered from wheat and barley grains in Uruguay, pathogenicity and deoxynivalenol content. *Agrociencia Uruguay* 14, 33-44.

Pestka J. 2007. Deoxynivalenol: toxicity, mechanisms and animal health risks. *Animal Feed Science and Technology* 137, 283-298.

Pestka J & Smolinski A. 2005. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *Journal of Toxicol. Journal of Environmental Health, Part B, Critical Reviews* 8, 39-69.

Placinta C, D'Mello J, Macdonald A. 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 78, 21-37.

Proctor R, Hohn T, McCormick S. 1995. Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxic biosynthetic gene. *Molecular Plant Microbe Interaction* 8, 593-601.

Prodi A, Purahong W, Tonti S, Salomoni D, Nipoti P, Covarelli L, Pisi A. 2011. Difference in chemotype composition of *Fusarium graminearum* populations isolated from durum wheat in adjacent areas separated by the Apennines in Northern-Central Italy. *Plant Pathology* 91, 727-731.

Puri K & Zhong S. 2010. The 3ADON population of *Fusarium graminearum* found in North Dakota is more aggressive and produces higher level of DON than the prevalent 15ADON population in spring wheat. *Phytopathology* 100, 1007-1014.

Qiu J, Xu J, Shi J. 2014. Molecular characterization of the *Fusarium graminearum* species complex in eastern China. *European Journal of Plant Pathology*, 139, 811-823.

Quarta A, Mita G, Haidukowski M, Logrieco A, Mulè G, Visconti A. 2006. Multiplex PCR assay for the identification of nivalenol, 3- and 15-acetyl-deoxynivalenol chemotypes in *Fusarium*. *Microbiology Letters* 259, 7-13.

Reynoso M, Ramirez M, Torres A, Chulze S. 2011. Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* strains from wheat in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 145, 444-448.

Rice L & Ross P. 1994. Methods for detection and quantification of fumonisins in corn, cereal products and animal excreta. *Journal of Food Protection* 87, 536-540.

Richard, J. 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses- an overview. *International Journal of Food Microbiology* 119, 3-10.

Sampietro D, Díaz C, Gonzalez M, Vattuone L, Ploper L, Catalan C, Ward T. 2011. Species diversity and toxigenic potential of *Fusarium graminearum* complex isolates from maize fields in northwest Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 145, 350-364.

Sampietro D, Marín P, Iglesias J, Presello D, Vattuone M, Catalan C, Gonzalez Jaen M. 2010. A molecular based strategy for rapid diagnosis of toxigenic *Fusarium* species associated to cereal grains from Argentina. *Fungal Biology* 114, 74-81.

Sapumohotti W. 2004. Existence of *Fusarium nygamai* in the southern region of Sri Lanka and key for their characterization. *Tropical Agricultural Research and Extension* 7, 150-153.

Sarver B, Ward T, Gale L, Broz K, Kistler H, 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.

Savi G, Piacentini K, Tibola C, Scussel V. 2014. Mycoflora and deoxynivalenol in whole wheat grains (*Triticum aestivum* L.) from Southern Brazil. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 7 232–237.

Schmale D, Wood-Jones A, Cowger C, Bergstrom G, Arellano C. 2011. Trichothecene genotypes of *Gibberella zeae* from winter wheat fields in the eastern USA. *Plant Pathology* 60, 909-917.

Schmale III & Bergstrom G. 2003. *Fusarium* head blight (FHB) in wheat. *The Plant Health Instructor*.

<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/Fusarium.aspx>

Schwarzer K. 2009. Harmful effects of mycotoxins on animal physiology. In: 17th Annual ASAIM SEA Feed Technology and Nutrition Workshop, Hue, Vietnam.

Scorz L, Astolifi P, Reartes D, Schmale III D, Moraes M, Del Ponte E. 2009. Trichothecene mycotoxin genotypes of *Fusarium graminearum sensu stricto* and *Fusarium meridionale* in wheat from southern Brazil. *Plant Pathology* 58, 344-351.

Sharma R, Thakur R, Senthilvel S, Nayak S, Reddy S, Panduranga Rao V, Varshney R. 2011. Identification and Characterization of Toxigenic Fusaria Associated with Sorghum Grain Mold Complex in India. *Mycopathologia* 171, 223–230.

Soley W & Prentice N. 1962. Effects of *Fusarium* isolates applied during malting on the properties of malt. American Society of Brewing Chemists, Proceedings 24–28, USA.

Somma S, Petruzzella A, Logrieco A, Meca G, Cacciola O, Moretti A. 2014. Phylogenetic analyses of *Fusarium graminearum* strains from cereals in Italy, and characterization of their molecular and chemical chemotypes. *Crop Pasture Science* 62, 52-60.

Souto G. 2003. Fusariosis en granos y contaminación de cosechas: diseño de una estrategia para su prevención y control. Anuario OPYPA 2003.

Suga H, Karugia G, Ward T, Gale L, Tomimura K, Nakajima T, Miyasaka A, Koizumi S, Kageyama K, Hyakumachi M. 2008. Molecular characterization of the *Fusarium graminearum* species complex in Japan. *Phytopathology* 98, 159-166.

Sugiura Y, Watanabe Y, Tanaka T, Yamamoto S, Ueno Y. 1990. Occurrence of *Gibberella zeae* stains that produce both nivalenol and deoxynivalenol. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 3047-3051.

Summerell B, Leslie J, Backhouse D, Bryden W, Burgess L. 2001. *Fusarium* Paul E. Nelson Memorial Symposium. The American Phytopathological Society. APS press, Minnesota, USA.

Summerell B, Salleh B, Leslie J. 2003. A Utilitarian Approach to *Fusarium* Identification. *Plant Disease* 87, 117-126.

Suty A & Mauler-Machnik. 1996. *Fusarium* head blight on wheat- new findings on the epidemiology and control of *Gibberella zeae* the teleomorph of *Fusarium graminearum* with Folicur®. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer 49, 55-70.

Talas F, Parzies H, Miedaner T. 2011. Diversity in genetic structure and chemotype composition of *Fusarium graminearum sensu strict* populations causing wheat head blight in individual fields in Germany. European Journal of Plant Pathology 131, 39-48.

Thakur R, Rao V, Navi S, Garud T, Agarkar G, Bharati B. 2003. Sorghum grain mold: variability in fungal complex. Int Sorg Mill Newsl. 4, 104–8.

Thakur R, Reddy B, Indira S, Rao V, Navi S, Yang X, Ramesh S. 2006. Sorghum Grain Mold. Information Bulletin No. 72. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, Patancheru 502324, Andhra Pradesh, India.

Thiel P, Marasas W, Sydenham E, Shephard G, Gelderblom W, Nieuwenhuis J. 1991a Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. Applied and Environmental Microbiology 57, 1089–1093.

Trail F, Schaupp J, Platt C, Jarosz A. 1997. Spatio-temporal aspects of inoculum development of wheat head scab caused by *Fusarium graminearum*. National *Fusarium* Head Blight Forum, November page 64, St. Paul, MN.

Ueno Y. 1980. Trichothecene Mycotoxin, mycology, chemistry and toxicology. Advance Nutrition Science 3, 301-353.

Umpiérrez-Faliche M, Garmendia G, Pereyra S, Rodríguez-Haralambides A, Ward T, Vero S. 2013. Regional differences in species composition and toxigenic potential among *Fusarium* head blight isolates from Uruguay indicate a risk of nivalenol contamination in new wheat production areas. International Journal of Food Microbiology 166, 135-140.

van der Lee T, Zhang H, Diepeningen A, Waalwijk C. 2015. Biogeography of *Fusarium graminearum* species complex and chemotypes: a review. *Food Additives & Contaminants: Part A* 32, 453-460.

Vegi A, Schwarz P, Wolf-Hall C. 2011. Quantification of Tri5 gene expression, and deoxynivalenol production during the malting of barley. *International Journal of Food Microbiology* 150, 150-156.

von der Ohe C, Gauthier V, Tamburic-Ilincic L, Brule-Babel A, Fernando W, Clear R, Ward T, Miedaner T. 2010. A comparison of aggressiveness and deoxynivalenol production between Canadian *Fusarium graminearum* isolates with 3-acetyl and 15-acetyldeoxynivalenol chemotypes in field-grown wheat. *European Journal of Plant Pathology* 127, 407-417.

Waalwijk C, de Vries P, Kohl J, Xu X, van der Lee T, Kema G. 2008. Development of quantitative detection methods for *Fusarium* in cereals and their application. En: Leslie J, Bandyopadhyay R, Visconti A Eds. *Mycotoxins: detection methods, management, public health and agricultural trade*. Wallingford: CAB International, pp. 195-205.

Wagacha J, Steiner U, Dehne H, Spiteller M, Muthomi J, Oerke E. 2010. Diversity in mycotoxins and fungal species infecting wheat in Nakuru District, Kenya. *Journal of Phytopathology* 158, 527-535.

Ward T, Bielawski J, Kistler H, 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* 99, 17-21

Ward T, Clear R, Rooney A, O'Donnell D, Gaba D, Patrick S, Starkey D, Gilbert J, Geiser D, Nowicki T. 2008. An adaptive evolutionary shift in *Fusarium* head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America. *Fungal and Genetics Biology* 45, 473-484.

Windels, C. 2000. Economic and social impact of *Fusarium* head blight. Changing farms and rural communities in the northern Great Plains. *Phytopathology* 90, 17-21.

Yang L, van der Lee T, Yang X, Yu D, Waalwijk C. 2008. *Fusarium* populations on Chinese barley show a dramatic gradient in Mycotoxin profiles. *The American Phytopathological Society* 98, 719-727.

Yazar S & Omurtag G. 2008. Fumonisin, Trichothecenes and Zearalenone in Cereals. *International Journal of Molecular Sciences* 9, 2062-2090.

Yli-Mattila T, Gagkaeva T, Ward T, Aoki T, Kistler H, 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.

Zain M. 2010. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society* 15, 129–144.

Zhang J, Li H, Dang F, Qu B, Xu Y, Zhao C, Liao Y. 2007. Determination of the trichothecene Mycotoxin chemotypes and associated geographical distribution and phylogenetic species of the *Fusarium graminearum* clade from China. *Mycological Research* 3, 967-975.

Zhang H, Van der Lee T, Waalwijk C, Chen W, Xu Jin, Xu Jinsheng, Zhang Y, Feng J. 2012. Population analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat in China show a shift to more aggressive isolates. En linea en Plos one: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0031722>

ANEXO

Código del aislamiento	Sustrato	Año de cosecha	Tamaño de banda para la PCR complejo-específica
T1	Trigo	2009	400
T2	Trigo	2009	400
T3	Trigo	2009	400
T4	Trigo	2009	400
T5	Trigo	2009	400
T6	Trigo	2009	400
T7	Trigo	2009	400
T8	Trigo	2009	400
T9	Trigo	2009	400
T10	Trigo	2009	400
T11	Trigo	2009	400
T12	Trigo	2009	400
T13	Trigo	2009	400
T14	Trigo	2009	400
T15	Trigo	2009	400
T16	Trigo	2009	400
T17	Trigo	2009	400
T18	Trigo	2009	400
T19	Trigo	2009	400
T20	Trigo	2009	400
T21	Trigo	2009	400
T22	Trigo	2009	400
T23	Trigo	2009	400
T24	Trigo	2009	400
T25	Trigo	2009	400
T26	Trigo	2009	400
T27	Trigo	2009	400
T28	Trigo	2009	400
T29	Trigo	2009	400
T30	Trigo	2009	400
T31	Trigo	2009	400
T32	Trigo	2009	400
T33	Trigo	2009	400
T34	Trigo	2009	400
T35	Trigo	2009	400

Código del aislamiento	Sustrato	Año de cosecha	Tamaño de banda para la PCR complejo-específica
T36	Trigo	2009	400
T37	Trigo	2009	400
T38	Trigo	2009	500
T39	Trigo	2009	400
T40	Trigo	2009	400
T41	Trigo	2009	400
T42	Trigo	2009	400
T43	Trigo	2009	400
T44	Trigo	2009	400
T45	Trigo	2009	400
T46	Trigo	2009	400
T47	Trigo	2009	400
T48	Trigo	2009	400
T49	Trigo	2009	400
T50	Trigo	2009	400
C 01	Cebada	2011	400
C 02	Cebada	2011	400
C 03	Cebada	2011	400
C 04	Cebada	2011	400
C 05	Cebada	2011	400
C R1	Cebada	2011	400
C R2	Cebada	2011	400
C R3	Cebada	2011	400
C R4	Cebada	2011	400
C R5	Cebada	2011	400
C 1	Cebada	2011	400
C 2	Cebada	2011	400
C 3	Cebada	2011	400
C 4	Cebada	2011	400
C 5	Cebada	2011	400
C 6	Cebada	2011	400
C 7	Cebada	2011	400
C 8	Cebada	2011	400
C 9	Cebada	2011	400
C 10	Cebada	2011	500
C 11	Cebada	2011	400
C 12	Cebada	2011	400
C 13	Cebada	2011	400
C 14	Cebada	2011	400
C 17	Cebada	2011	400
C 18	Cebada	2011	400

Código del aislamiento	Sustrato	Año de cosecha	Tamaño de banda para la PCR complejo-específica
C 19	Cebada	2011	400
C 20	Cebada	2011	400
C 23	Cebada	2011	550
C 26	Cebada	2011	400
C 28	Cebada	2011	400
C 30	Cebada	2011	400
C 33	Cebada	2011	400
C 34	Cebada	2011	400
C 35	Cebada	2011	400
C 37	Cebada	2011	400
C 38	Cebada	2011	400
C 39	Cebada	2011	400
C 40	Cebada	2011	400
C 41	Cebada	2011	400
C 42	Cebada	2011	400
C 43	Cebada	2011	400
C 45	Cebada	2011	400
C 46	Cebada	2011	400
C 48	Cebada	2011	400
C 49	Cebada	2011	400
C 50	Cebada	2011	400
C 53	Cebada	2011	400
C 54	Cebada	2011	400
C 55	Cebada	2011	400
SM 1	Sorgo	2013	400
SM 8	Sorgo	2013	400
SM 18	Sorgo	2013	400
SM 23	Sorgo	2013	400
SM 50	Sorgo	2013	400
SM 84	Sorgo	2013	400
SM 89	Sorgo	2013	400
SM 128	Sorgo	2013	400
S T2	Sorgo	2013	400
S 2,1	Sorgo	2013	400
S 3	Sorgo	2013	400
S 4	Sorgo	2013	400
S 5	Sorgo	2013	400
S 6	Sorgo	2013	400
S 7	Sorgo	2013	400
S 8	Sorgo	2013	400
S 9	Sorgo	2013	400

Código del aislamiento	Sustrato	Año de cosecha	Tamaño de banda para la PCR complejo- específica
S 10	Sorgo	2013	400
S 11	Sorgo	2013	500
S 12	Sorgo	2013	400
S 13	Sorgo	2013	400
S 14	Sorgo	2013	400
S 16	Sorgo	2013	400
S 17	Sorgo	2013	400
S 18	Sorgo	2013	400
S 20	Sorgo	2013	400
S 21	Sorgo	2013	400
S 22	Sorgo	2013	400
S 23	Sorgo	2013	400
S 24	Sorgo	2013	400
S 26	Sorgo	2013	400
S 27	Sorgo	2013	400
S 28	Sorgo	2013	400
S 29	Sorgo	2013	400
S 31	Sorgo	2013	400
S 32	Sorgo	2013	400
S 33	Sorgo	2013	400
S 35	Sorgo	2013	400
S 37	Sorgo	2013	400
S 38	Sorgo	2013	400
S 39	Sorgo	2013	400
S 40	Sorgo	2013	400
S 41	Sorgo	2013	400
S 42	Sorgo	2013	400
S 44	Sorgo	2013	400
S 46	Sorgo	2013	400
S 47	Sorgo	2013	400
S 48	Sorgo	2013	400
S 49	Sorgo	2013	400
S 50	Sorgo	2013	400