



**Universidad Nacional de Río Cuarto**  
**Facultad de Ciencias Exactas, Físico- Químico y Naturales**  
**Departamento de Microbiología e Inmunología**

**Estudio de las especies de *Fusarium* asociadas a pastos naturales (Flia. Poaceae)  
desarrollados en los Humedales de Chaco**

**Trabajo Final para optar por el título de Microbióloga**

**Alumna: Romero Donato, Cindy Johana**

**Directora: Ramírez, María Laura**

**Co-Directora: Cendoya, Eugenia**

**Marzo del 2018**

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico – Químicas y Naturales y se presenta como requerimiento para optar al título de Microbióloga de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

**Directora del trabajo final:**

Dra. María Laura Ramírez

**Co- Directora del trabajo final:**

Dra. Eugenia Cendoya

**Miembros del jurado:**

Dra. Claudia Raspanti

Dra. Carla Barberis

## Agradecimientos

- ❖ A mi mamá, papá, hermanas y sobrinos, por el apoyo incondicional que me brindaron por más de tenerlos muy lejos siempre confiaron y creyeron en mi para lograr llegar a esta meta.
- ❖ A mis amigos en Colombia que a lo largo de estos años me brindaron su apoyo con un mensajito o una llamada desde lejos siendo siempre incondicionales para mí.
- ❖ A mis hermosas amigas/os que la Microbiología nos unió Maru, Aldi, Ro, Julia, Georgi y peje gracias por ser acompañarme, darme consejitos, estar conmigo en las buenas y en las malas, por esas tardes de mates y risas con ustedes gracias por estos hermosos 6 años junto a ustedes y por muchos más.
- ❖ A mi amiga Caro, que me abrió las puertas de su casa y su familia, compartir conmigo tantas tardes de risa y llanto, ser esa fuerza de apoyo incondicional siempre.
- ❖ A Vianel, mi amigo rubio loco siempre sacándome una sonrisa con sus ocurrencias.
- ❖ A mis hermosos amigos que la fotocopidora Cecex que me permitió conocer a lo largo de estos años, Jose T, Jose F, Ceci, Gise, Viko, Bere, Dario, Ampí, caritos, Exe, Barbi, Vane y muchos más, a todos los llevo en el cora.
- ❖ A mis amigos de las REU Renzo, Laly, Cala, Dai que día a día me permitieron compartir con ustedes y formar parte de sus vidas.
- ❖ A todos mis compañeros de la carrera porque de alguna manera aportaron un granito de arena para esta meta.
- ❖ A los chicos del centro de estudiantes, siempre me brindaron una mano en todo lo que necesitaba.
- ❖ A todos los chicos de la sala de becarios de Micología.
- ❖ A mi Directora y CO-Directora Dra. Laura Ramírez y Dra. Eugenia Cendoya, por toda la ayuda y conocimiento brindado.
- ❖ A mis jurados del trabajo de grado por su buena disposición.
- ❖ A todos los docentes de mi carrera, que permitieron mi formación profesional.
- ❖ A la UNRC gracias totales.

## INDICE

<b>I.INTRODUCCIÓN</b>	1
I.1. Generalidades	1
I.2. Taxonomía	2
I.3. Concepto de especie en <i>Fusarium</i>	3
I.4. Métodos de clasificación en <i>Fusarium</i>	4
I.4.1. Identificación mediante criterios morfológicos	4
I.4.2. Identificación mediante técnicas moleculares	7
I.5. Complejo de especies <i>Fusarium fujikuroi</i>	9
I.6. Antecedentes en el tema	10
<b>II. HIPOTESIS</b>	12
<b>III. OBJETIVOS</b>	12
III.1. Objetivo general	12
III.2. Objetivos específicos	12
<b>I.V. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	13
IV.1. Medios de cultivo y soluciones empleadas	13
IV.2. Identificación de especies de <i>Fusarium</i>	14
IV.2.1. Aislamientos	14
IV.2.2. Marcadores morfológicos	15
IV.3. Marcadores moleculares	16
IV.3.1. Aislamientos	16
IV.3.2. Producción de biomasa fúngica	16
IV.3.3. Extracción, Purificación y Cuantificación del ADN genómico	16
IV. 3.4. Amplificación y secuenciamiento del factor de elongación	16
IV.3.5. Edición y análisis de secuencias	18
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	22
<b>VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS A FUTURO</b>	42
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	43

## INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Características morfológicas utilizadas en la identificación de especies de *Fusarium*. A-D formas típicas de macroconidios. E-H formas de la célula apical del macroconidio. I-L formas de la célula basal del Macroconidio. **5**
- Figura 2.** Formas de microconidios de diferentes especies de *Fusarium* a) fusiforme; b) ovalada; c) ovoide; d) ovoide con una base truncada, lo que indica que los microconidos se formaron en cadena; e) alantoides; f) napiforme; g) piriforme; h) cornetes. **6**
- Figura 3.** Células conidiógenas y organización de los microconidios en relación a la célula conidiógena A Y B) monofiálides, C) polifiálides, D) solitario (mesoconidios), E) falsas cabezas, F) cadenas. **6**
- Figura 4.** Clamidosporas en aumento 400x se observan clamidosporas solitarias, de a pares, en cadenas y en grupo. **7**
- Figura 5.** Mapa de la secuencia parcial del gen del factor de elongación (*EF-1 $\alpha$* ) en *Fusarium*. **8**
- Figura 6.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud de especies de *Fusarium* del complejo *Fusarium fujikuroi* basada en la información de la secuencia de los genes que codifican para el factor de elongación *EF-1 $\alpha$*  y  *$\beta$  tubulina*. (Kvas et al., 2009). **11**
- Figura 7.** Diagrama del procedimiento realizado para la identificación morfológica de las especies de *Fusarium*. **14**
- Figura 8.** Morfología de los microconidios de las cepas de *Fusarium* del CEFF desarrollados en medio CLA a 25 °C durante 15 días de incubación observados en un aumento 400X. a) microconidios ovales sin septos, piriformes y limoniformes, b) microconidios ovales sin septos y redondos, c) microconidios ovales sin septos, redondos grandes y piriformes, d) hifas en espiral. **23**
- Figura 9.** Morfología de las colonias (anverso) de los diferentes grupos clasificados; corresponden a los aislamientos: a) RC-J140 (grupo 2), b) RC-J1386 (grupo 4), c) RC-J311 (grupo 1), d) RC-J657(grupo 3) y e) RC-J 466 (grupo 1) en agar AHC durante 15 días de incubación a 25 °C. **24**
- Figura 10.** Morfología de las colonias (anverso y reverso) de los diferentes grupos clasificados; corresponden a los aislamientos: a) RC-J490 (grupo 4), b) RC-J1519 (grupo 2), c) RC-JA9 15 (grupo 3), d) RC-J459 (grupo 1) y e) RC-J408 (grupo 1), en APG durante 15 días de incubación a 25 °C. **25**
- Figura 11.** Árbol consenso de los 1868 árboles parsimoniosos encontrados a partir de los datos combinados de las secuencias de 44 cepas de *Fusarium* pertenecientes CEFF aisladas en el presente estudio (color rojo) y 66 cepas de *Fusarium* pertenecientes al CEFF disponibles en el GenBank. La cepa *F. inflexum* NRRL 20433 se utilizó como grupo externo. **34**

**Figura 12.** Árbol consenso de los 103 árboles parsimoniosos encontrados a partir de los datos combinados de las secuencias de 4 cepas de *Fusarium* pertenecientes al clado Africano del CEFF aisladas en el presente estudio (color rojo) y 27 cepas de *Fusarium* pertenecientes al mismo clado del CEFF disponibles en el GenBank. La cepa *F. inflexum* NRRL 20433 se utilizó como grupo externo. **36**

**Figura 13.** Arbol consenso de los 4 árboles parsimoniosos encontrados a partir de los datos combinados de las secuencias de 12 cepas de *Fusarium* pertenecientes al clado Americano del CEFF aisladas en el presente estudio (color rojo) y 22 cepas de *Fusarium* pertenecientes al mismo clado del CEFF disponibles en el GenBank. La cepa *F. inflexum* NRRL 20433 se utilizó como grupo externo. **38**

**Figura 14.** Unico árbol encontrado a partir de los datos combinados de las secuencias de 28 aislados de *Fusarium* pertenecientes al clado Asiático del CEFF obtenidos en el presente estudio (color rojo) y 8 cepas de *Fusarium* pertenecientes al mismo clado del CEFF disponibles en el GenBank. La cepa *F. inflexum* NRRL 20433 se utilizó como grupo externo. **40**

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación del <i>Factor de Elongación (EF1<math>\alpha</math>)</i> .	<b>17</b>
<b>Tabla 2.</b> Número de acceso del GenBank, hospedero y origen geográfico de las cepas de <i>Fusarium</i> pertenecientes al complejo de especies <i>Fusarium fujikuroi</i> utilizadas en el presente estudio.	<b>19</b>
<b>Tabla 3.</b> Características morfológicas de los aislados fúngicos y resultados de BLAST de las secuencias analizadas.	<b>26</b>

## I. Introducción

### I.1. Generalidades

El género *Fusarium* se encuentra dentro de la división Ascomycota, clase Euascomyctes, orden Hypocreales y familia Hypocreaceae. La fase sexual o perfecta (también llamada teleomórfico) se encuentra en los géneros *Albonectria*, *Gibberella* y *Haematonectria* (Leslie y Summerell, 2006). Anteriormente existían dos nombres para clasificar a las especies que presentaban tanto fase asexual (anamorfo) como fase sexual (telomorfo), por lo que se decidió unificar el nombre y solamente utilizar el nombre del estado anamorfo (Geiser et al., 2013).

*Fusarium* es considerado un género muy ubicuo, ya que comúnmente puede ser aislado de diversos climas y ecosistemas del mundo. Miembros de este género son aislados de suelo, donde pueden jugar un papel en el reciclado de la materia orgánica (Karim et al., 2016). Las especies pertenecientes a este género por lo general son saprófitas y suelen encontrarse colonizando sustratos vegetales, sin embargo, algunas cepas pueden volverse patógenos oportunistas cuando encuentran un huésped susceptible (Rep et al., 2005). Sin embargo, muchas especies pertenecientes a este género fúngico, han sido estudiadas debido a su patogenicidad en plantas, humanos y animales. Así, el estudio del género *Fusarium* ha tenido gran importancia a lo largo del tiempo. Debido a su amplia distribución en el medio ambiente, resulta razonable suponer que las formas patogénicas de *Fusarium* podrían haber evolucionado a partir de antepasados no patógenos (Alves-Santos et al., 1999). Muchas de las especies que conforman este género son consideradas patógenos destructivos de plantas de importancia económica (causa marchitamientos, podredumbres y chancros en una gran variedad de cultivos como soja, maíz y trigo), causando así graves pérdidas económicas en el sector agrícola. Se estima que de 101 cultivos de importancia económica a nivel mundial más de 80 pueden ser atacados por distintas especies de *Fusarium* (Leslie y Summerell, 2006). Por esta razón su presencia causa pérdidas anuales millonarias debido a bajas en los rendimientos y calidad de los cultivos. Sumado a esto, miembros de este género tienen la capacidad de producir micotoxinas, metabolitos secundarios tóxicos que contaminan alimentos y al ser ingeridos, causan enfermedades agudas y crónicas que resultan una amenaza para la sanidad vegetal, animal y humana (Logrieco et al., 2003).

Por otro lado, algunas especies pertenecientes a este género pueden producir enfermedades en seres humanos, ya que tienen la capacidad de colonizar ciertos tejidos, provocando enfermedades como queratitis (Chang et al., 2006) o diversas infecciones en personas inmunodeprimidas (Sutton y Brandt, 2011).

En los últimos años se han logrado obtener y describir nuevas especies a partir de ecosistemas naturales (Leslie y Summerell, 2011) entre las que se incluyen: *F. armeniacum* (Burgess et al., 1993; Burgess y Summerell, 2000), *F. aywerte* (Sangalang et al., 1995; Beyon et al., 2000), *F. babinda* (Summerell et al., 1995), *F. gaditjirii* (Phan et al., 2004), *F. konzum* (Zeller et al., 2003), *F. lyarnte* (Walsh et al., 2010), *F. nurragi* (Sangalang et al., 1995; Benyon et al., 2000) y *F. werrikimbee* (Walsh et al., 2010). Por lo general estas especies tienen baja frecuencia de aislamiento o escasa importancia agrícola y económica, con lo cual se llegó a la conclusión de que el número de especies dentro del género *Fusarium* podría ser mucho más grande del que se reconoce actualmente, ya que, como se mencionó anteriormente, los estudios generalmente se focalizan sobre especies de *Fusarium* patógenas y productoras de micotoxinas presentes en plantas de interés económico: principalmente cereales y oleaginosas.

## I.2.Taxonomía

La cantidad de especies reconocidas dentro de este género ha variado a lo largo del tiempo de menos de 10 a más de 1000, de las cuales, en la actualidad, 300 son aceptadas usando el concepto de especie filogenética y se encuentran distribuidas en 20 complejos de especies (Leslie y Summerell, 2006; O'Donnell et al., 2015).

El género *Fusarium* fue descrito por primera vez en 1809 por Link. Los primeros estudios taxonómicos se basaron en características fenotípicas del huésped, por tal motivo en esa época había una gran cantidad de especies (<1000) (Leslie y Summerell 2006). En 1930, Wollenweber y Reinking, estudiaron el género y redujeron drásticamente el número de especies: hicieron un sistema basado en 16 secciones entre las cuales se distribuían 65 especies, este sistema facilitó la identificación ya que cada sección estaba separada por características morfológicas macroscópicas como la pigmentación de las colonias y microscópicas como la forma de los conidios; así, resultaba sencillo asignar a un aislado una especie dado que cada sección contenía pocas especies (Nelson et al., 1994). Sin embargo, la identificación se dificultaba al considerar que las características morfológicas dependían mucho de las condiciones ambientales y de los medios de cultivo utilizados para la identificación. Posteriormente, Snyder y Hansen entre los años 1940 -1950 hicieron una reducción en el número de especies a 9, era muy fácil su identificación, pero los taxones eran polifiléticos lo que provocaba una gran pérdida de información (Leslie y Summerell, 2006).

Luego Railo y Bilai, entre 1950 y 1955, estudiaron la variabilidad de *Fusarium* utilizando cultivos monospóricos y encontraron que algunas características morfológicas se mantenían constantes y otras no; En 1955 Bilai, estudió la morfogénesis en aislados provenientes de conidios, teniendo en cuenta las condiciones de cultivo, donde en base a

estos resultados reviso la taxonomía del género para solamente incluir 9 secciones, 26 especies, y 29 variedades. Este sistema solamente se implementó en Rusia y no fue aceptado en otras partes del mundo. Booth en 1971 modificó el sistema de Wollenweber y Reinking proponiendo una taxonomía intermedia. Posteriormente, Gerlach y Nirenberg en 1982 ampliaron el sistema de Wollenweber y Reinking a 78 especies morfológicas diferentes (Nelson et al., 1994; Leslie y Summerell, 2006; Aoki et al., 2014).

En 1983 Nelson, Toussoun y Marasas, con la idea de que no existía un sistema taxonómico totalmente satisfactorio para la identificación, seleccionaron lo que consideraban el mejor de varios sistemas y junto con sus investigaciones desarrollaron la definición de especie basada exclusivamente en características morfológicas donde propusieron un buen sistema taxonómico para la identificación (Nelson et al., 1983).

En 2006 se realizó un trabajo de revisión del género, publicado por Leslie y Summerell "*The Fusarium laboratory manual*", el cual incluye 70 especies, y no tiene en cuenta el sistema basado en secciones. Ellos en este trabajo incluyen el concepto de especie morfológica, biológica y filogenética (Leslie y Summerell, 2006).

Actualmente, las especies de *Fusarium* se encuentran clasificadas en complejos de especies. En muchos de estos complejos se encuentran importantes patógenos de plantas como en: Complejo de Especies de *Fusarium graminearum* (CEFG), Complejo de Especies de *Fusarium oxysporum* (CEFO), Complejo de Especies *Fusarium solani* (CEFS) y el Complejo de Especies de *Fusarium fujikuroi* (CEFF) (Aoki et al., 2014) al que nos referiremos más adelante, entre otros, pero también existen otros complejos que incluyen especies no patógenas (Munkvold 2017).

### **1.3 Concepto de especie en *Fusarium***

En la actualidad se utilizan tres conceptos básicos para definir las especies dentro del género *Fusarium*: concepto morfológico, biológico y filogenético. Desde los inicios las primeras definiciones fueron en base a la morfología de las especies: concepto de especie morfológica. Desafortunadamente las características morfológicas son limitadas en número, están sujetas a la selección y su expresión es sensible a las condiciones ambientales, además de que son fácilmente malinterpretadas. Por esta razón fue muy difícil identificar y clasificar especies dentro de este género a partir de características morfológicas (Nelson et al., 1983). Con la introducción de la biología molecular los conceptos de especie biológica y de especie filogenética han tomado mayor importancia y dan una visión acerca de la taxonomía del género *Fusarium* (Leslie, 1991; O'Donnell et al., 1998, 2000; Summerell et al., 2010).

Concepto de especie morfológica: este concepto se basa en la idea de que la morfología de un "tipo" o individuo puede representar la variación dentro de una especie

completa. Definir una especie según este concepto, depende de las diferencias en la morfología entre especies, es decir que las especies se vean diferentes (Leslie y Summerell, 2006; Summerell et al., 2010). Este fue uno de los conceptos más usados por los taxónomos fungicos por más de 200 años, y todavía sigue siendo una herramienta útil para la identificación ya que es algo rutinario y práctico (Summerell et al., 2010).

Concepto de especie biológica: Mayr (1940; 1963) considera a las especies como un grupo de poblaciones que de hecho o potencialmente se cruzan entre sí; es decir que hay un intercambio de genes en la reproducción sexual o parasexual dentro de la especie. El problema al aplicar este concepto radica en que muchas especies de *Fusarium* se reproducen casi exclusivamente de forma asexual y solo en algunas ocasiones se produce una etapa sexual. En el CEFF se ha utilizado este concepto ya que muchas de las especies que lo conforman presentan fase sexual, lo que ha permitido identificar mediante cruzamientos sexuales que ciertas cepas pertenecían a la misma especie biológica (Leslie y Summerell, 2006; Summerell et al., 2010).

Concepto de especie filogenética: Este concepto surge con la introducción a la filogenética de las nuevas técnicas de biología molecular, como lo es el análisis del ADN. Para esto se utilizan múltiples marcadores donde generalmente se determina la diferencia entre las secuencias de ADN de los genes seleccionados y también pueden dar una medida cuantitativa de la relación genética de las especies. Este concepto de especie ha resultado útil para identificar aquellas especies que no presentan fase sexual (Leslie y Summerell, 2006; Summerell et al., 2010).

## **I.4 Métodos de clasificación**

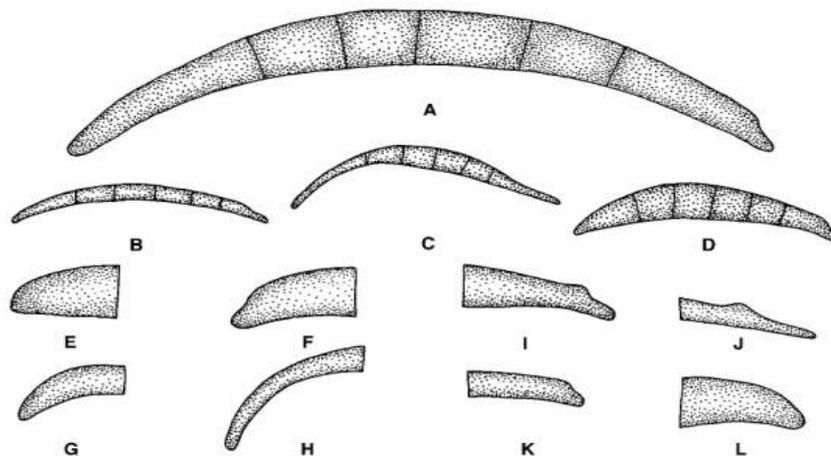
### **I.4.1 Identificación mediante criterios morfológicos**

La taxonomía de *Fusarium* se ha basado generalmente en las características morfológicas y de crecimiento del hongo en el medio de cultivo. Para esto, se debe contar con cultivos saludables obtenidos a partir de una única espora (mososporicos), medios de cultivo apropiados y condiciones de crecimiento favorables (Leslie y Summerell, 2006).

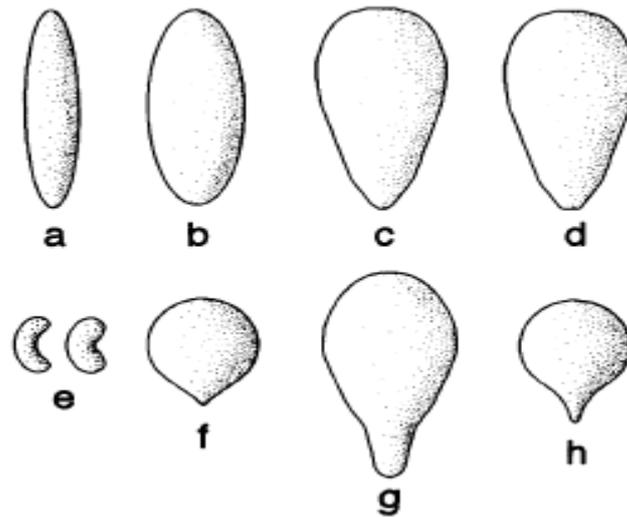
Entre los criterios morfológicos microscópicos utilizados para la identificación se tienen en cuenta diferentes estructuras como las esporas. Las especies de *Fusarium* pueden producir tres tipos diferentes de esporas: macroconidios, microconidios y clamidosporas. Algunas especies producen los tres tipos de esporas. Los macroconidios constituyen una de las características primarias para la identificación, ya que no solamente permiten identificar a nivel de especie, sino también a nivel de género. Su forma y tamaño varía según las especies. Para algunas especies es una característica constante, pero debe utilizarse cautelosamente

como criterio taxonómico ya que su tamaño puede variar dentro de una misma especie (Nelson et al., 1994; Leslie y Summerell, 2006) (Figura 1).

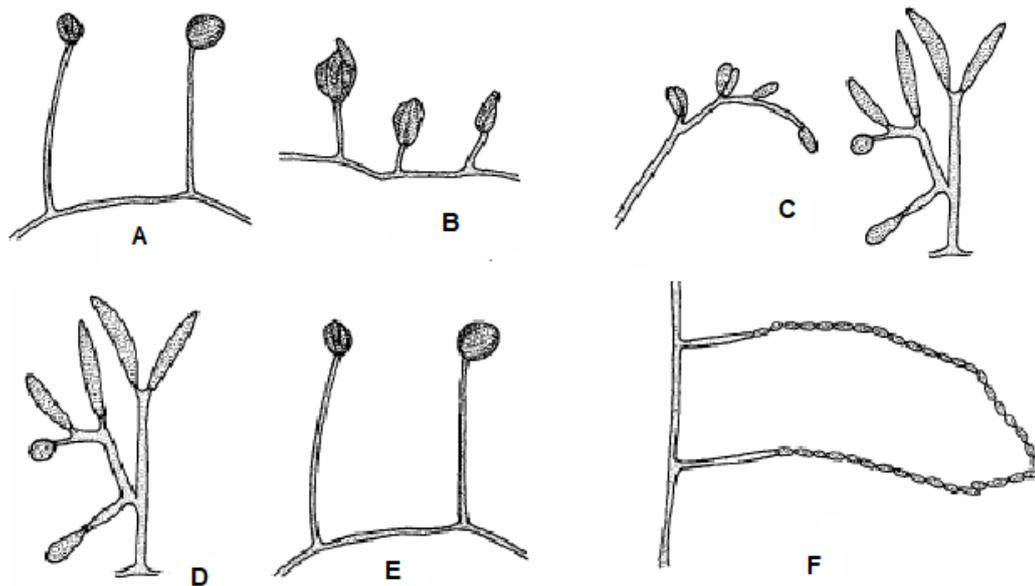
Otra característica morfológica primaria que se tiene en cuenta en la identificación morfológica, son los microconidios, que pueden estar presentes o ausentes. Si el microconidio se encuentra presente, las características consideradas son: forma (Figura 2), y el modo de formación: ya sea, solitarios, en falsas cabezas, en falsas cabezas y cadenas (Figura 3). La morfología de los conidióforos, que se forman en el micelio aéreo y contienen los microconidios, pueden ser únicamente monofiálides o contener monofiálides y polifiálides. Su producción se observa mejor en un medio que contenga un sustrato natural como agar hojas de clavel, ya que favorece la esporulación sobre el desarrollo miceliano, con producción de conidios y conidióforos en abundancia, uniformes en tamaño y forma; reduciendo así la variación fenotípica (Nelson et al., 1994; Leslie y Summerell, 2006).



**Figura 1.** Características morfológicas utilizadas en la identificación de especies de *Fusarium*. A-D formas típicas de macroconidios. E-H formas de la célula apical del macroconidio. I-L formas de la célula basal del macroconidio. (Leslie y Summerell, 2006)

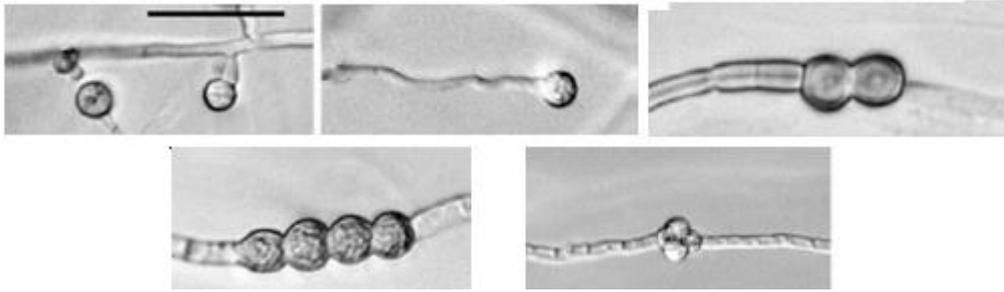


**Figura 2.** Formas de microconidios de diferentes especies de *Fusarium* a) fusiforme; b) ovalada; c) ovoide; d) ovoide con una base aplanada, lo que indica que los microconidios se formaron en cadena; e) alantoides; f) napiforme; g) piriforme; h) cornetes (Nelson et al., 1994).



**Figura 3.** Células conidiógenas y organización de los microconidios en relación a la célula conidiógena A Y B) monofiálides, C) polifiálides, D) solitario (mesoconidios), E) falsas cabezas, F) cadenas (Nelson et al., 1983; Leslie y Summerell, 2006)

Las clamidiosporas son también otra característica morfológica primaria para la clasificación taxonómica de *Fusarium*. Se observa su presencia o ausencia, y si se encuentran presentes pueden estar solitarias, de a pares, en grupos o en cadenas, y pueden poseer paredes gruesas o lisas (Figura 4) (Nelson et al., 1994; Leslie y Summerell, 2006).



**Figura 4.** Clamidosporas en aumento 400x se observan clamidosporas solitarias, de a pares, en cadenas y en grupo (Leslie y Summerell, 2016).

Existen otros tipos de estructuras que por lo general no son observadas, pero sirven para delimitar ciertas especies. Las hifas helicoidales por ejemplo son importantes para identificar algunas especies dentro del CEFF como *Fusarium circinatum*. También encontramos los mesoconidios que son un tipo de conidios producidos por algunas especies de *Fusarium*. Estos se forman a partir de polifiálides y se denominan así ya que no son considerados ni micro ni macroconidios. Por lo general se encuentran en el micelio aéreo dando una apariencia de “orejas de conejo” cuando se observan en el microscopio (Figura 3 D) (Leslie y Summerell, 2006).

También encontramos características secundarias utilizadas para describir a una especie, cuando se cultivan en condiciones adecuadas de sustratos, luz y temperatura, pero estas no deben ser tomadas como criterio taxonómico para diferenciar entre especies. Entre estas características se incluyen: la morfología y pigmentación de la colonia, la ausencia o presencia de esporodoquios, esclerocios o estromas y la velocidad de crecimiento (Nelson et al., 1994; Leslie y Summerell, 2006).

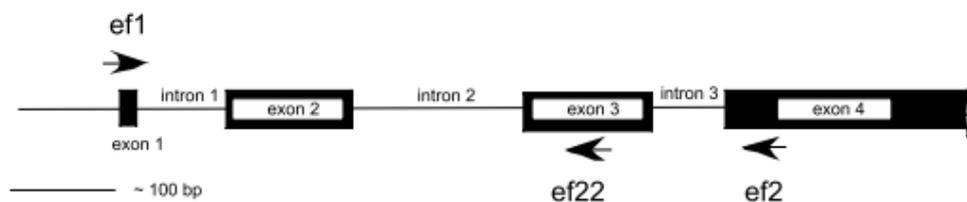
Como se mencionó anteriormente la identificación de especies dentro del género *Fusarium* es una tarea difícil, ya que estos organismos presentan una gran variación en sus caracteres morfológicos y fisiológicos debido a que muchos son afectados por las condiciones de cultivo, lo que hace difícil su identificación a nivel de especie (Leslie y Summerell, 2006).

#### **1.4.2 identificación mediante técnicas moleculares**

Las características morfológicas limitan por lo general la identificación de las especies y subestiman la verdadera diversidad del género. En las últimas décadas hubo un avance importante que ha estimulado el uso de las técnicas moleculares, como lo es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos análisis tienen diferentes objetivos y las

técnicas empleadas pueden ser: análisis filogenéticos, estudios taxonómicos a nivel de género y especies, y también para el diagnóstico (Kvas et al., 2009).

Existen muchos genes utilizados para el estudio taxonómico de los hongos, entre estos se encuentran los genes que codifican para los ARN ribosómicos (ARNr) y sus regiones espaciadoras internas (ITS), estas regiones son variables en su composición, tamaño y están presentes en múltiples copias en el genoma generalmente organizadas en tándem, esto aumenta la sensibilidad en los ensayos de PCR, lo cual permite que sean una herramienta para la identificación, diferenciación y clasificación de hongos (Taylor y Fisher, 2003). Otros genes utilizados en *Fusarium*, suelen ser genes estructurales que codifican proteínas como la  $\beta$ -tubulina (BT2, TUB), el factor de elongación de la traducción (*EF-1 $\alpha$* ) y la calmodulina (CAL). Sin embargo, la región ARNr e ITS han demostrado ser ineficaces para la diferenciación de especies dentro del género *Fusarium* ya que se encuentran dos copias divergentes y no-ortólogas de la región ITS2 en muchas de las especies de este género examinadas (Waalwijk et al., 1996; O'Donnell y Ciglenik, 1997; O'Donnell et al., 1998; kvas et al., 2009). A diferencia de ellos, el gen que codifica para el factor de elongación (*EF 1- $\alpha$* ) se convirtió en un marcador de elección debido a que: presenta una sola copia en el genoma, no se han encontrado copias no-ortólogas del gen, se han diseñado cebadores universales y además es altamente informativo entre especies estrechamente relacionadas ya que muestra un alto polimorfismo. Así, *EF-1 $\alpha$*  se ha convertido en una herramienta de identificación (Geiser et al., 2004). La región que codifica para este gen contiene un intrón y se han diseñado dos cebadores que se encuentran ubicados en los dos exones que lo flanquean (Figura 5). Este gen ha demostrado ser altamente informativo, al punto que la base de datos denominada FUSARIM-ID se fundamenta principalmente en este gen, aunque contiene también secuencias para la  $\beta$ -tubulina, *RPB1*, *RPB2 57*, *RPB2 711*, *IGS*, *ITS 1* y *2*, la información de este servidor también ha sido colocada en el servidor NCBI y *Fusarium* MSLT para tener acceso (Geiser et al., 2004).



**Figura 5.** Estructura del gen del factor de elongación (*EF-1 $\alpha$* ) en *Fusarium* (Geiser et al., 2004).

### **I.5 Complejo de especies *Fusarium fujikuroi* (CEFF)**

El CEFF es un taxón monofilético que se corresponde con la anteriormente denominada sección *Liseola*, pero que también incluye a otras especies que se encontraban clasificadas originalmente en otras secciones. Este complejo incluye a más de 50 especies diferentes (Figura 6). Para reconocer y definir las especies en este complejo se han debido utilizar los 3 conceptos de especie (morfológico, biológico y filogenético) los cuales han contribuido a la clasificación. El concepto de especie morfológica permitió clasificar a las especies de este complejo en base a la morfología de sus microconidios, la disposición de estos, y a su origen a partir de las células conidiógenas: monofiálides y/o polifiálides. Además, las especies miembro de este complejo no producen clamidiosporas. En base a esto se incluyeron 34 morfo-especies en este complejo, pero como se ha mencionado anteriormente hay pocas características morfológicas que permiten la separación correcta de las especies similares dentro de este complejo y tampoco permite una buena descripción de nuevas especies. Por lo tanto, si se realiza solamente una clasificación en base a las características morfológicas, se está subestimando la verdadera diversidad de especies de *Fusarium* en este complejo (Nirenberg y O'Donnell, 1998; O'Donnell et al., 1998; 2000; Aoki et al., 2001; Marasas et al., 2001; Britz et al., 2002; Zeller et al., 2003; Geiser et al., 2005; Leslie y Summerell, 2006; Kvas et al., 2009). Sin embargo, la clasificación morfológica sigue siendo importante para llegar a identificar una especie. Por otro lado, la utilización del concepto de especie biológica para definir una especie en este complejo no permite llegar a una correcta clasificación en todos los casos debido a cuatro razones importantes: solamente al 20 % de las especies de este complejo se les han encontrado estructuras que son fruto de la reproducción sexual (peritecios), en muchas especies no se produce "mating"; la aparición de cepas hermafroditas en este grupo es limitado. Además, muchas de las especies de este grupo tienen capacidad de cruzarse entre ellas por lo que este evento no es exclusivo de una especie (interbridging) (Leslie y Summerell, 2006; Kvas et al., 2009). Un ejemplo de este fenómeno es el caso de *Fusarium proliferatum* y *Fusarium fujikuroi* (Leslie et al., 2004). Por estas razones no puede utilizarse este concepto para definir una especie dentro de este complejo.

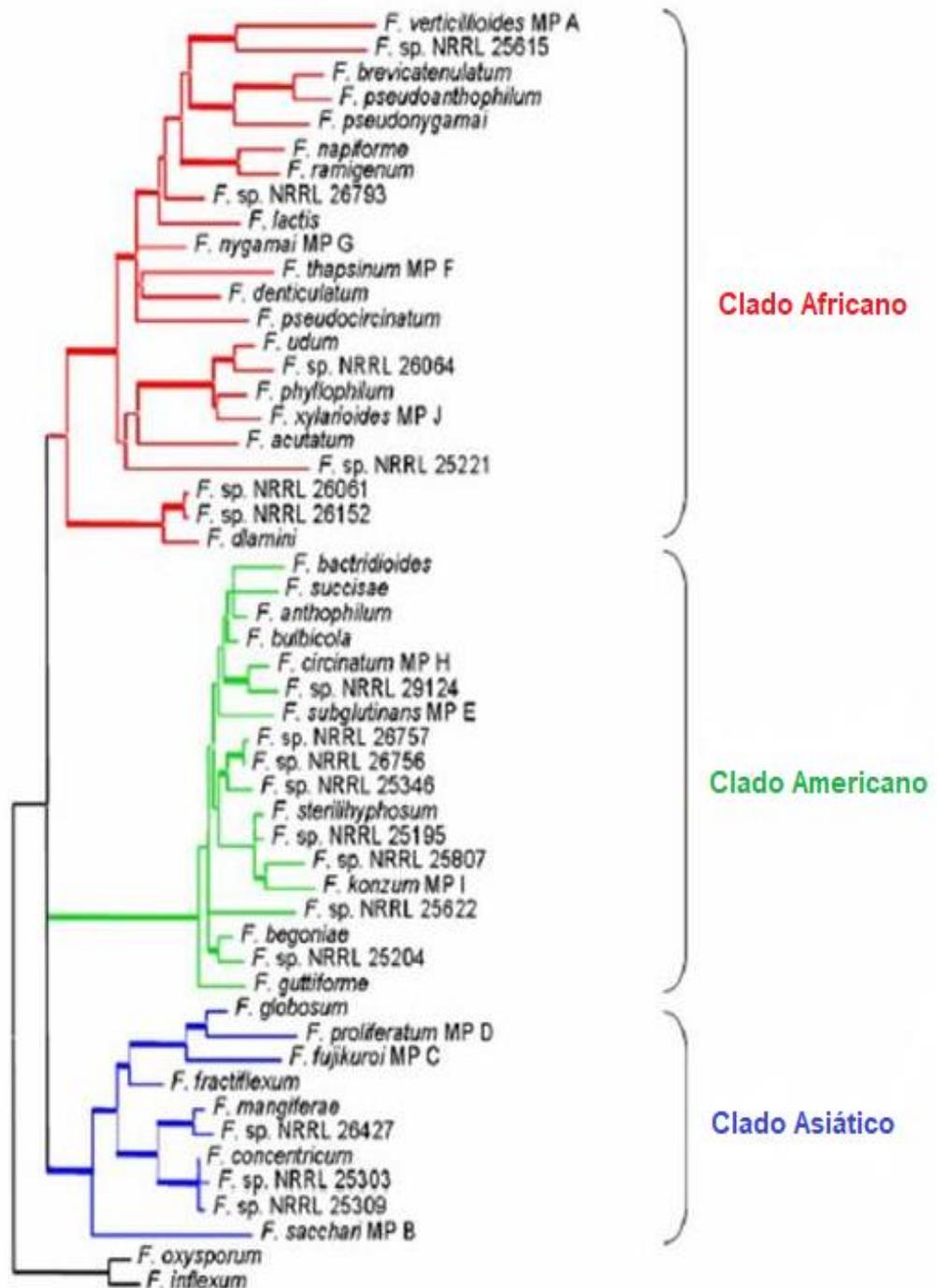
El concepto de especie filogenética es importante ya que al utilizar múltiples marcadores moleculares permite tener medidas cuantitativas de la relación evolutiva jerárquica entre las especies de este grupo. Además, es importante ya que permite identificar aquellas especies que usualmente son indistinguibles por marcadores morfológicos (especies crípticas). Pero este concepto no se debe utilizar solo ya que puede dar resultados biológicamente no significativos (Kvas et al., 2009; Dayrat, 2015). Por esta razón se usa en conjunto con las características morfológicas o biológicas (Klittich et al., 1997; Zeller et al., 2003; Kvas et al., 2009).

Las especies pertenecientes al CEFF se ha agrupado en 3 grandes clados en base a la filogenia obtenida mediante la secuenciación de múltiples genes (Figura 6). para explicar la existencia de estos clados muchos autores se han basado en los orígenes de las plantas de las cuales se aislaron originalmente las especies de *Fusarium*. Estos clados fueron nombrados como clado “Africano”, “Americano” y “Asiático” (O’Donnell et al., 1998; Kvas et al., 2009). este complejo de especies comprende más 50 especies filogenéticas siendo así uno de los grupos más grandes debido a que sus miembros provienen de diversos nichos ecológicos (O’Donnell et al., 1998; O’Donnell et al., 2000; Kvas et al., 2009; Al-Hatmi et al., 2015; O’Donnell et al., 2015; Moussa et al., 2017).

En la actualidad, los ecosistemas naturales se han convertido en una gran fuente de nuevas especies de *Fusarium* ya que a partir de estos se han descrito más de 10 especies dentro del CEFF. A partir de chancros de tallo y ramas de pino se añadieron 5 especies nuevas: *Fusarium fracticaudum*, *Fusarium marasasianum*, *Fusarium parvisorum*, *Fusarium pininemorale* y *Fusarium sororula* (Herron et al., 2015). Otros investigadores añadieron 3 especies *Fusarium tjaetaba* aislada de *Sorghum interjectum*, *Fusarium coicis* aislada de *Coix gasteennii* y *Fusarium mundagurra* aislada a partir de suelos del parque Nacional Gorge Carnavon en Australia (Laurence et al., 2016). Otras 2 nuevas especies: *Fusarium terrícola* aislada a partir de suelos desérticos y *Fusarium sudanense* aislada a partir de restos de plantas *Striga hermonthica* en Australia (Moussa et al., 2017).

## 1.6 Antecedentes en el tema

En estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio hemos evaluado la presencia de *Fusarium* y sus micotoxinas en pastos naturales pertenecientes a la flia. Poaceae (asintomáticos) muestreados en los humedales de Chaco durante dos años diferentes (2011 y 2014). Hemos encontrado que todas las plantas presentaban contaminación con *Fusarium* y sus micotoxinas (Nichea et al., 2015 a y b). Como resultado de este trabajo contamos con una colección aproximada de 1500 aislados de *Fusarium*, entre los cuales hemos encontrado y descrito una nueva especie: *F. chaquense*. Esta nueva especie comparte algunas características morfológicas con *F. acuminatum* y *F. armeniacum*, aunque los estudios filogenéticos multi locus posteriores demostraron que forma un clado monofilético (100 % bootstrap). El hecho de que se haya descrito una nueva especie en este ecosistema natural, sugiere que la diversidad de especies en Argentina y de hecho en todo el mundo, aún no se ha determinado completamente. Considerando que los humedales de Chaco constituyen unos de los 3 biomas de Argentina que presentan mayor biodiversidad, consideramos que muchas especies nuevas de *Fusarium* esperan aún ser identificadas y descritas a partir de este ecosistema natural (y también de otros) con escasa actividad antropogénica.



**Figura 6.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud de especies de *Fusarium* del complejo *Fusarium fujikuroi* basada en la información de la secuencia de los genes que codifican para el factor de elongación *EF-1 $\alpha$*  y  *$\beta$  tubulina*. (Kvas et al., 2009).

## II. Hipótesis

Existe una gran diversidad de especies de *Fusarium* pertenecientes CEFF en ecosistemas naturales con mínima actividad antropogénica, que podría incluir especies que hasta el momento no han sido descritas; por lo cual el número de especies totales de este género sería superior al conocido en la actualidad.

### III.1. Objetivo general

- ❖ Caracterizar a través del uso de marcadores morfológicos y moleculares un conjunto de aislados de *Fusarium* pertenecientes al CEFF obtenidos a partir de pastos naturales (no cultivados) desarrollados en los humedales de Chaco.

### III.2 Objetivos específicos

- ❖ Estudiar mediante marcadores morfológicos aislados de *Fusarium* pertenecientes al CEFF.
- ❖ Confirmar la identificación morfológica a través de la secuenciación de un gen conservado (factor de elongación) que permita la resolución taxonómica de *Fusarium* basada en la filogenia de los mismos.

## IV. Materiales y métodos

### IV.1. Medios de cultivo y soluciones empleadas

- **Agar Spezieller Nährstoffmarmmer (ASN):**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,0 g,  $\text{KNO}_3$  1,0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g, KCl 0,5 g, glucosa 0,2 g, sacarosa 0,2 g, agar 20,0 g, y agua destilada 1000 ml. Se esterilizó durante 15 minutos a 121 °C en autoclave.
- **Agar agua (AA):** agar 20,0 g y agua destilada 1000 ml. Se esterilizó durante 15 minutos a 121 °C en autoclave.
- **Agar hojas de clavel (AHC):** agar 20,0 g y agua destilada 1000 ml. Se preparó el medio colocando 1 a 5 hojas de clavel estériles en placa Petri de 6 cm por 15 mm y se agregó agar agua al 1,5% enfriado a 45 °C. Se almacenó tres o cuatro días previo a su uso para determinar posibles contaminantes provenientes de las hojas.
- **Agar papa glucosado (APG):** papa 250 g; glucosa 20 g; agar 20 g y agua destilada 1000 ml.  
Se cortaron en trozos papas lavadas sin pelar, se hidrataron con 500 ml de agua y se cocinaron a vapor fluente durante 45 min. Por otro lado, se esterilizó el agar en 500 ml de agua destilada. Se filtró el caldo con las papas a través de gasa y se adicionó al agar disuelto. La pulpa de la papa restante se homogeneizó para obtener un puré y la mitad de éste se adicionó al agar junto con la glucosa, luego se llevó a volumen con agua destilada (1000 ml). Se fraccionó el medio en tubos de ensayo y se esterilizó en autoclave a 115 °C durante 20 minutos y se dejó solidificar inclinado.
- **Medio completo (MC):**  $\text{NO}_2\text{Na}$  2 g; N-Z Amine 2,5 g; extracto de levadura 1 g; sacarosa 30 g;  $\text{PO}_4\text{KH}_2$  1 g;  $\text{SO}_4\text{Mg} 7 \text{H}_2\text{O}$  0,5 g; ClK 0,5 g; solución stock de vitaminas 10 ml; solución de elementos trazas 0,2 ml; agua destilada 1.000 ml.
- **Solución stock de vitaminas:** tiamina ( $\text{B}_1$ ) 100 mg; riboflavina ( $\text{B}_2$ ) 30 mg; piridoxina ( $\text{B}_6$ ) 75 mg; pantotenato de Ca ( $\text{B}_3$ ) 200 mg; nicotinamida ( $\text{B}_5$ ) 75 mg; ácido ascórbico (C) 50 mg; ácido p-amino benzoico 5 mg; colina 200 mg; ácido fólico 5 mg; biotina 5 mg; inositol 4 mg; etanol al 50% 1 litro
- **Solución de elementos trazas:** (para 100 ml) ácido cítrico 5 g;  $\text{SO}_4\text{Zn}6\text{H}_2\text{O}$  5 g;  $(\text{SO}_4)_2\text{Fe}(\text{HN}_4)_26\text{H}_2\text{O}$  1 g;  $\text{SO}_4\text{Cu}5\text{H}_2\text{O}$  250 mg;  $\text{SO}_4\text{Mn}$  50 mg; ácido bórico 50 mg;  $\text{MoO}_4\text{Na}_22\text{H}_2\text{O}$  50 mg; agua destilada 95 ml.
- **Buffer CTAB al 2%:** 2% CTAB, 100 mM Tris-ClH (pH 8), 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl.
- **2-mercaptoetanol.**
- **Buffer TE 1X:** 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.

- **Solución de cloroformo-isoamilalcohol (24:1, v/v).**
- **Isopropanol (2-propanol).**
- **Etanol al 70% v/v.**
- **Bromuro de etidio:** solución stock 10 mg/ml.
- **Buffer TAE (50X):** 242 g Tris base; 57,1 ml ácido acético glacial; 0,5 M EDTA (pH 8).

## IV.2. Identificación de especies de *Fusarium*

### IV.2.1. Aislamientos

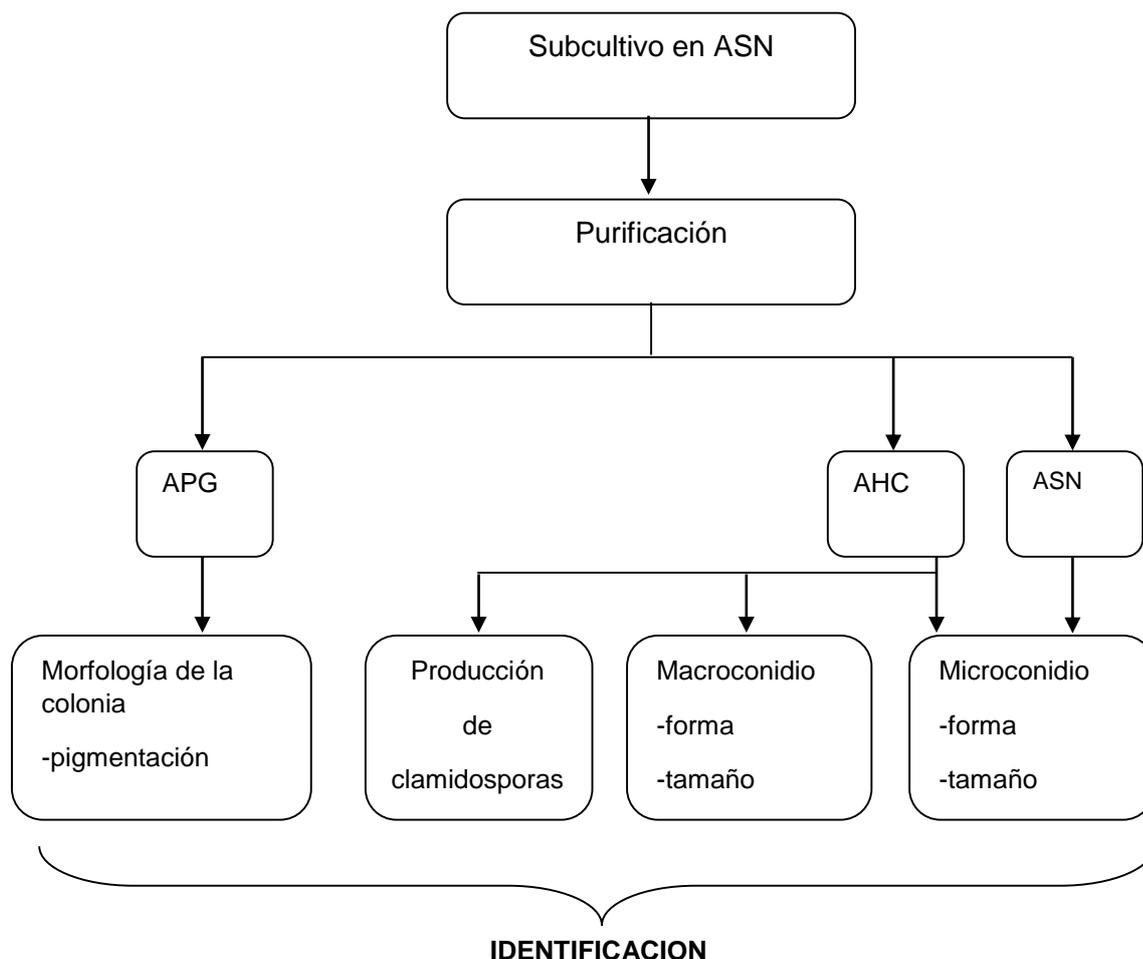
Se utilizaron 84 aislamientos de *Fusarium* pertenecientes al CEFF previamente aislados de pastos pertenecientes a la Familia Poaceae. Los aislamientos se encontraban conservados como suspensiones de esporas en glicerol 15% a -80 °C en el laboratorio de Micología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Universidad Nacional de Río Cuarto. La zona de muestreo estuvo localizada en el humedal de la región del Chaco (Sitio Ramsar 1366), Argentina. Esta región abarca la totalidad de la llanura aluvial de los ríos Paraná y Paraguay en el territorio chaqueño. Los regímenes hidrológicos de cada río dan lugar a diferentes pulsos de inundación y sequía en estos humedales. El paisaje está compuesto de vegetación acuática, pastizales y bosques de galería. La temperatura anual oscila entre 20 y 24 °C. Las temperaturas máximas absolutas pueden alcanzar su punto máximo de 46,5 °C. La precipitación media anual es de 1300 mm, concentradas en primavera y verano. Se realizaron dos muestreos, uno en el año 2011 y otro en 2014. Se delimitaron 5 zonas de muestreos de 25 x 25 m, cuatro en los extremos del lote y uno en la zona central. Para el muestreo de cada zona se determinó un área de 100 m x 100 m, en la misma se trazaron dos diagonales que se extendían a partir de ambas esquinas y de cada diagonal se tomaron 5 puntos equidistantes (se distribuyeron 5 muestras en la diagonal). Una vez determinados los puntos de muestreo, se procedió a cortar cada planta 10 mm por encima del nivel del suelo (1 planta de cada sitio de muestreo). Cada planta se colocó en bolsa de papel cada una debidamente marcadas y se transportaron al laboratorio. Las partes aéreas de las plantas, incluyendo hojas y tallos, fueron inmediatamente secadas en estufa de aire forzado a 60 °C por 48 horas, o hasta peso constante. Las plantas fueron identificadas a nivel de género y cuando fue posible a nivel de especie. Además de las muestras para el análisis se recolectaron individuos para su conservación en herbario. Para esta actividad se contó con la colaboración del Dr. Mario Urbani (Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste). Es importante señalar que ninguna de las muestras de pastos no presentaba signos de enfermedad y esto se utilizó como criterio de selección aquellos pastos, todos pertenecientes a la Flia. Poaceae, que eran más palatales para el ganado bovino. Todas las plantas fueron georreferenciadas.

#### IV.2.2. Marcadores morfológicos

A partir de las suspensiones de esporas en glicerol 15% conservadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se recuperaron los 84 aislamientos de *Fusarium* en placas con medio ASN. De las colonias desarrolladas en ese medio se realizaron aislamientos monospóricos. Para ello, se tomó una pequeña cantidad de micelio fúngico y se realizó una suspensión de esporas en 5 ml agua estéril. Luego de homogenizar la suspensión, la misma se transfirió a placas de Petri conteniendo AA, se diseminó por rotación y se descartó el excedente. Las placas se incubaron inclinadas durante 16 a 18 h a  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para permitir la germinación de las esporas.

Transcurrido el período de incubación se procedió a la obtención de conidios germinados bajo lupa (40x) mediante el uso de una aguja histológica. Un conidio germinado se transfirió en el punto medio de placas de Petri que contenían AHC y otro conidio germinado se transfirió a un tubo con APG.

Los cultivos se incubaron durante dos semanas en cámara con ciclos alternados de luz blanca/luz negra de 12 h a  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para su posterior identificación macroscópica y microscópica. La identificación morfológica se realizó siguiendo la metodología propuesta por Leslie y Summerell (2006). Ver diagrama a continuación (Figura 7).



**Figura 7.** Diagrama del procedimiento realizado para la identificación morfológica de las especies de *Fusarium*.

### IV.3. Marcadores moleculares

#### IV.3.1. Producción de biomasa fúngica

A partir de los aislamientos desarrollados en AHC se tomó un trozo de agar y se transfirió a frascos Erlenmeyer de 250 ml, que contenían 50 ml de MC. Los cultivos se incubaron a 28 °C durante 3 días en un agitador rotatorio (150 rpm), y el micelio fue cosechado por filtración, luego lavado con agua estéril y secado con papel absorbente. Las muestras de micelio fueron almacenadas a -20 °C hasta el momento de realizar la extracción del ADN.

#### IV.3.3. Extracción, purificación y cuantificación del ADN genómico

El micelio congelado se pulverizó con nitrógeno líquido en morteros y se distribuyó en microtubos de 1,5 ml estériles, los cuales fueron almacenados a -20 °C. La extracción de ADN genómico se realizó siguiendo la metodología propuesta por Leslie y Summerell (2006) con algunas modificaciones. A los microtubos que contenían el micelio pulverizado se les añadió 700 µl de buffer CTAB (bromuro de cetiltrimetil amonio) calentado previamente a 65 °C, y 15 µl de 2-mercaptoetanol, cada microtubo se agitó durante 2 minutos en vortex y luego se incubó a 65 °C durante 15 min. Este procedimiento se realizó dos veces consecutivas. Transcurrido el período de incubación se agregó 500 µl de una solución de cloroformo-isoamilalcohol (24:1, v/v) a cada microtubo, y a continuación, los tubos se agitaron durante 1 min para homogenizar las fases y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 min. Se tomaron aproximadamente 600 µl de la fase acuosa del centrifugado y se transfirieron a un nuevo microtubo de 1,5 ml estéril, al que se adicionó a cada microtubo igual volumen de isopropanol y se mezcló por inversión. La mezcla se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. Con la finalidad de lavar el ADN genómico, se le añadió a cada microtubo 500 µl de etanol frío al (70% v/v), que fue descartado luego de un centrifugado a 10.000 rpm durante 4 min. Este procedimiento de lavado se realizó dos veces consecutivas, y a continuación los tubos fueron secados a temperatura ambiente invertidos en papel absorbente. Por último, el ADN genómico se resuspendió en 100 µl de buffer TE 1X.

El ADN genómico fue diluido y luego cuantificado a 260 nm en un espectrofotómetro (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific). Una vez conocida la concentración de ADN en cada tubo, se realizaron diluciones correspondientes para obtener una concentración aproximada de 10-20 ng/µl y poder usar como ADN molde en las reacciones de PCR.

#### IV.3.4. Amplificación y secuenciamiento del factor de elongación

Se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) una porción del correspondiente al factor de elongación *EF-1α* (O'Donnell et al., 2010) para identificar las

distintas especies de *Fusarium* pertenecientes al CEFF. Se usaron los cebadores que se describen en la tabla 1 y las condiciones de PCR descritas por O'Donnell et al. (1998), que se listan a continuación. En cada experimento se incluyó un control negativo que no contenía ADN templado. La amplificación se realizó en un Termociclador MJ Research PTC-200 (MJ Research Inc., Watertown, MA) con el programa descrito a continuación.

**Tabla 1.** Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación del *Factor de Elongación (EF1 $\alpha$ )*.

Cebadores	Secuencia
EF-1	5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3'
EF-2	5'-GGAGGTACCAGTGCATCATGTT-3'

Condiciones de PCR:

Mezcla de reacción de PCR optimizada (para una reacción):

- 0,2 mM dNTPs (Promega)
- Buffer PCR 1X (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl a pH 8,3)
- 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 1 U *Taq* DNA polimerasa (Promega)
- 0,3  $\mu$ M de cada cebador (E1/E2)
- 5  $\mu$ l de ADN templado (aproximadamente 10 ng/ $\mu$ l)
- Agua hasta alcanzar volumen final de reacción: 50  $\mu$ l.

Programa de termociclador para PCR:

1. 1 ciclo a 94 °C por 5 min, para la desnaturalización del ADN.
2. 34 ciclos: 94 °C por 30 seg para la desnaturalización, 54 °C por 45 seg para la hibridación y 72 °C por 1 min para la extensión.
3. Extensión final de 7 min a 72 °C.
4. 1 ciclo a 4 °C por 5 min.

Los productos de la amplificación se examinaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio (0,5  $\mu$ g/ml) y fueron visualizados con un digitalizador MiniBis Pro (DNR), para ver la integridad del ADN y el tamaño de los fragmentos, este último se estimó por comparación con ADN testigo (New England Biolabs, 100pb Ladder) con bandas de referencia que se encuentran entre 1000 – 100 pb. Una vez verificada la calidad e integridad de los productos de PCR, se determinó su concentración y fueron

enviados a Macrogen Korea para su purificación y posterior secuenciación por el método de Sanger.

#### IV.3.5. Edición y análisis de secuencias

La edición de las secuencias para el gen *EF-1 $\alpha$*  se realizó con el programa BioEdit versión 7 (Hall, 1999). Durante este procedimiento se realizó el alineamiento de las secuencias de ambas cadenas de ADN de los productos de PCR. Una vez editadas las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos en el GenBank (NCBI o National Center for Biotechnology Information) y con la base de datos del *Fusarium* MLST para determinar su homología con otras especies. Una vez analizada la similitud de nuestras secuencias con aquellas depositadas en los bancos de datos de referencia, se descargó al menos una secuencia de cada una de las especies pertenecientes al CEFF (Tabla 2). A continuación las secuencias de referencia y editadas en este trabajo se alinearon con el programa *on-line* MAFFT versión 7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software>) (Katoh y Standley, 2013). El análisis filogenético se realizó con el principio de máxima parsimonia, utilizando el programa TNT 1.1 (Tree Analysis Using New Technology) (Goloboff et al., 2008). La creación de los árboles se realizó con 100 secuencias de adicción al azar de los taxos o RAS (*Random Addition Sequences*), con combinación de permutación de ramas tipo TBR (Tree Bisection Reconnection), guardando 10 árboles por réplica y una ronda final de TBR sobre los árboles parsimoniosos encontrados en las réplicas utilizando una memoria total de 1000 árboles. Los índices de consistencia (grado de homoplasia) y retención (grado de sinapomorfía aparente) se calcularon para todos los árboles parsimoniosos a través del scrip del software TNT, STATS.RUN (Goloboff et al., 2008). Se realizó el consenso estricto para resumir la información no contradictoria de los grupos monofiléticos presentes. Para evaluar el soporte de los grupos identificados se llevó a cabo un análisis de bootstrap con 1000 réplicas. En todos los casos *Fusarium inflexum* NRRL 20433 (AF008479.1) se utilizó como grupo externo.

Se realizó en una primera instancia un análisis involucrando a todas las secuencias, y luego se realizaron 3 análisis separados, clasificando las cepas en los tres clados que conforman el CEFF: africano, americano y asiático.

**Tabla 2.** Número de acceso del GenBank, hospedero y origen geográfico de las cepas de *Fusarium* pertenecientes al complejo de especies *Fusarium fujikuroi* utilizadas en el presente estudio.

Especie	Cepa	N° Acceso GenBank TEF	Fuente de aislamiento	País de origen
<i>F. acutatum</i>	NRRL 13308	AF160276.1	desconocido	India
<i>F. agapanthi</i>	NRRL 54464	KU900632.1	<i>Agapanthus praecox</i>	Italia-Australia
<i>F. ananatum</i>	CMW 28597	EU668312.1	<i>Ananas comosus</i>	Sudáfrica
<i>F. andiyazi</i>	CBS 119857	KP662901	<i>Ficus carica</i>	Irán
<i>F. anthophilum</i>	NRRL 13602	AF160292.1	<i>Hippeastrum sp.</i>	Alemania
<i>F. bactridioides</i>	NRRL 20476	AF160290.1	<i>Cronartium conigenum</i>	Estados Unidos
<i>F. begoniae</i>	NRRL 25300	AF160293.1	<i>Begonia elatior</i>	Alemania
<i>F. brevicatenuatum</i>	NRRL 25446	AF160265.1	<i>Striga asiatica</i>	Madagascar
<i>F. bulbicola</i>	NRRL 13618	AF160294.1	<i>Nerine bowdenii</i>	Holanda
<i>F. circinatum</i>	NRRL 25331	AF160295.1	<i>Pinus radiata</i>	Estados Unidos
<i>F. coicis</i>	RBG 5368	KP083251.1	<i>Coix gasteenii</i>	Australia
<i>F. concentricum</i>	NRRL 25181	AF160282.1	<i>Musa sapientum</i>	Costa Rica
<i>F. denticulatum</i>	NRRL 25302	AF160269.1	<i>Ipomoea batatas</i>	Estados Unidos
<i>F. dlamini</i>	NRRL 13164	AF160277	<i>Zea mays</i>	Sudáfrica
<i>F. fractiflexum</i>	NRRL 28852	AF160288	<i>Cymbidium sp.</i>	Japón
<i>F. ficicrescens</i>	CBS 125178	KP662899	<i>figs</i>	Irán
<i>F. fracticaudum</i>	CMW 25245	KJ541059.1.	<i>Pinus maximinoi</i>	Colombia
<i>F. fujikuroi</i>	NRRL 13566	AF160279.1	<i>Oryza sativa</i>	Taiwán
<i>F. globosum</i>	NRRL 26131	AF160285.1	<i>Zea mays</i>	América central
<i>F. guttiforme</i>	NRRL 22945	AF160297.1	<i>Ananas comosus</i>	Inglaterra
<i>F. inflexum</i>	NRRL 20433	AF008479.1	<i>Vicia faba</i>	Alemania

<i>F. konzum</i>	MRC 8544	EU220235.1	Prairie grasses	Estados Unidos
<i>F. lactis</i>	NRRL 25200	AF160272.1	<i>Ficus carica</i>	Estados Unidos
<i>F. mangiferae</i>	NRRL 25226	AF160281	<i>Mangifera indica</i>	India
<i>F. marasasianum</i>	CMW 25261	KJ541063.1	<i>Pinus patula</i>	Colombia
<i>F. mexicanum</i>	NRRL 53147	GU737282.1	<i>Mangifera indica</i>	México
<i>F. mundagurra</i>	RBG 5599	KP083255.1	Soil- <i>Mangifera indica</i>	Australia
<i>F. musae</i>	NRRL 25059	FN552086.1	<i>Musa sp.</i>	Honduras
<i>F. napiforme</i>	NRRL 13604	AF160266.1	<i>Pennisetum typhoides</i>	Sudáfrica
<i>F. nygamai</i>	NRRL 13488	AF160273.1	<i>Sorghum bicolor</i>	Australia
<i>F. parvisorum</i>	CMW 25267	KJ541060.1	<i>Pinus patula</i>	Colombia
<i>F. phyllophilum</i>	NRRL 13617	AF160274.1	<i>Dracaena deremensis</i>	Italia
<i>F. pininemorale</i>	CMW 25243	KJ541064.1	<i>Pinus tecunumanii</i>	Colombia
<i>F. proliferatum</i>	NRRL 22944	AF160280.1	<i>Cattleya sp.</i>	Alemania
<i>F. pseudoanthophilum</i>	NRRL 25206	AF160264.1	<i>Zea mays</i>	Zimbabwe
<i>F. pseudocircinatum</i>	NRRL 22946	AF160271.1	<i>Solanum sp.</i>	Ghana
<i>F. pseudonygamai</i>	NRRL 13592	AF160263.1	<i>Pennisetum typhoides</i>	Nigeria
<i>F. ramigenum</i>	NRRL 25208	AF160267.1	<i>Ficus carica</i>	Estados Unidos
<i>F. sacchari</i>	NRRL 13999	AF160278.1	<i>Saccharum officinarum</i>	India
<i>F. secorum</i>	NRRL 62593	KJ189225	<i>Beta vulgaris L.</i>	Estados Unidos
<i>F. sudanense</i>	CBS 454.97	KU711697	<i>Striga hermonthica</i>	Sudan
<i>F. sororula</i>	CMW 40578	KJ541067.1	<i>Pinus platula</i>	Colombia
<i>F. sterilihyphosum</i>	NRRL 25623	AF160300.1	<i>Mangifera indica</i>	Sudáfrica
<i>F. subglutinans</i>	NRRL 22016	AF160289.1	<i>Zea mays</i>	Estados Unidos
<i>F. succisae</i>	NRRL 13613	AF160291.1	<i>Succisa pratensis</i>	Alemania
<i>F. temperatum</i>	MUCL 52450	HM067687.1	<i>Zea mays</i>	Bélgica
<i>F. terricola</i>	CBS 483.94	KU711698	Soil	Australia

<i>F. thapsinum</i>	NRRL 22045	AF160270.1	<i>Sorghum bicolor</i>	Sudáfrica
<i>F. tjaetaba</i>	RBG 5361	KP083263.1	<i>Sorghum interjectum</i>	Australia
<i>F. tupiense</i>	CML 262	DQ452859.1	<i>Magnifera indica</i>	Brasil
<i>F. udum</i>	NRRL 22949	AF160275.1	Desconocido	Alemania
<i>F. verticillioides</i>	NRRL 22172	AF160262.1	<i>Zea mays</i>	Alemania
<i>F. werrikimbe</i>	F 19350	EF107131.1	<i>Sorghum leiocladum</i>	Australia
<i>F. xylarioides</i>	NRRL 25486	AY707136.1	<i>Coffea sp.</i>	Costa de Marfil

---

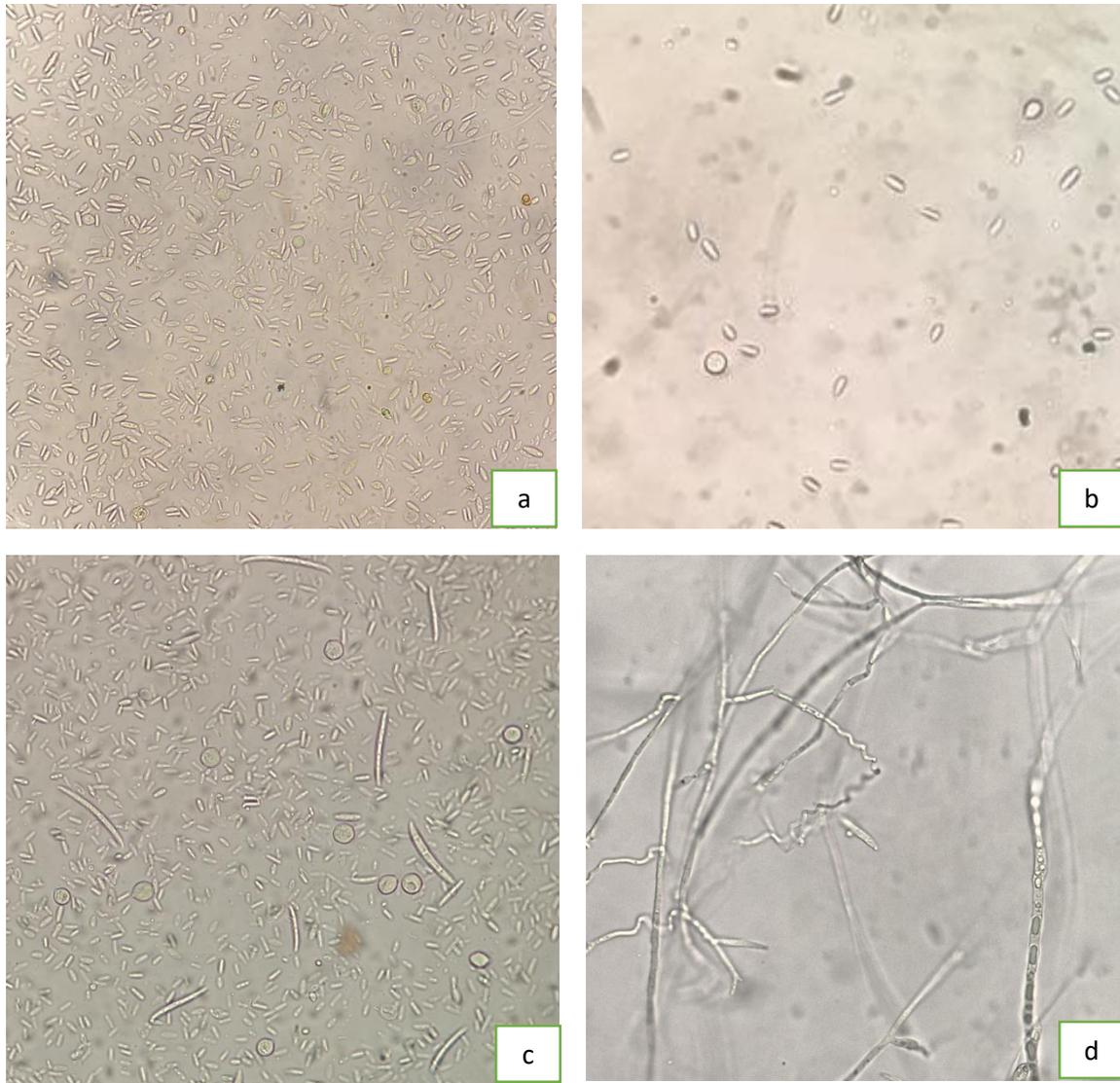
## V. Resultados y Discusión

En el presente trabajo se re-evaluaron 84 aislados de *Fusarium* pertenecientes al CEFF obtenidos previamente a partir de pastos pertenecientes a la familia Poaceae desarrolladas en los humedales del Chaco. A partir de las características morfológicas microscopias de los hongos crecidos en medio AHC se hizo una clasificación, tomando como criterio la disposición de los microconidios y a partir de que estructura conidiógena eran originados:

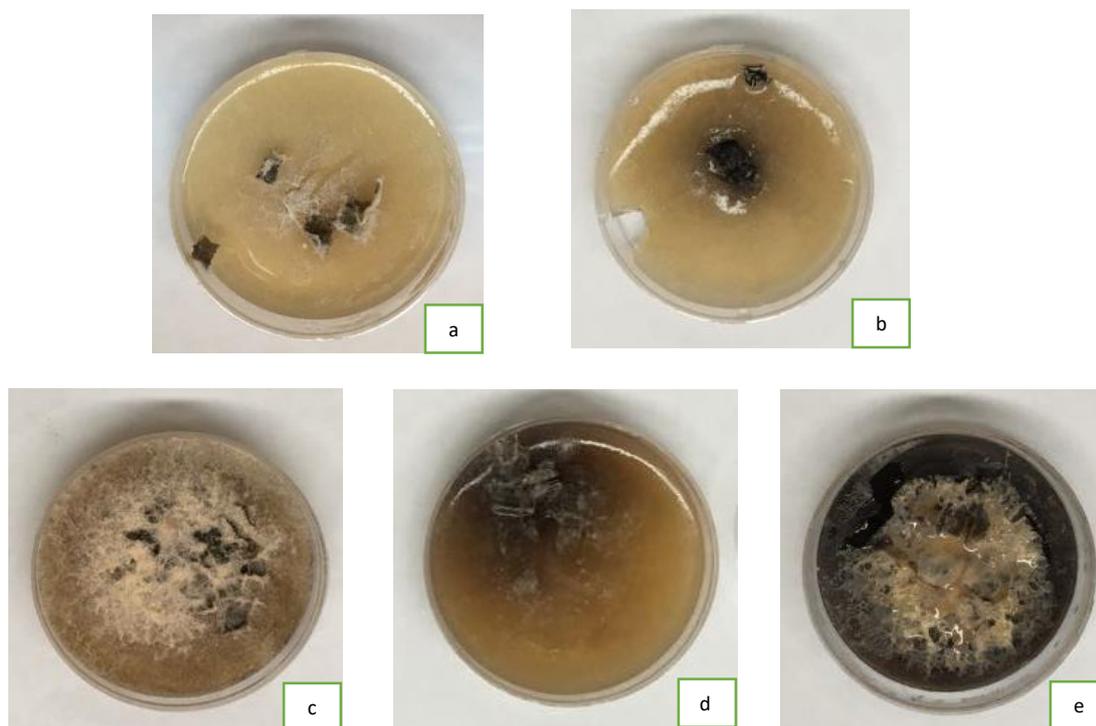
1. Microconidios dispuestos en falsas cabezas y cadenas, originados a partir de polifiálides y monofiálides.
2. Microconidios dispuestos en falsas cabezas y originados a partir de polifiálides y monofiálides.
3. Microconidios dispuestos en falsas cabezas y cadenas, originados a partir de monofiálides.
4. Microconidios dispuestos en falsas cabezas, originados a partir de monofiálides.

La mayoría de los aislamientos se ubicaron dentro del grupo número 1 (n= 55). En 8 de los aislados pertenecientes a este grupo, se observó presencia de hifas en espiral (Figura 8 d). Por lo general, la mayoría de los aislados en este grupo presentaron microconidios ovales sin septos y piriformes (Figura 8 a); mientras que algunos de ellos presentaron pigmentación en el medio del cultivo, siendo esta característica muy variable ya que dependió de las condiciones de incubación. Por lo general aquellos aislamientos que presentaron pigmentación tuvieron escasa cantidad de micelio aéreo cuando desarrollaban en AHC como se observa en la figura 9 c y e. En el medio APG, muchos de los aislamientos presentaron pigmentación violeta en el reverso del tubo y una cantidad intermedia de micelio aéreo color tan, como se observa en la figura 10 d y tres de los aislamientos presentaron un color violáceo – rojo en el reverso del tubo con abundante micelio aéreo color tan como se observa en la figura 10 e y el resto de los aislamientos permanecieron incoloros o se fueron tornando violetas en el reverso del tubo.

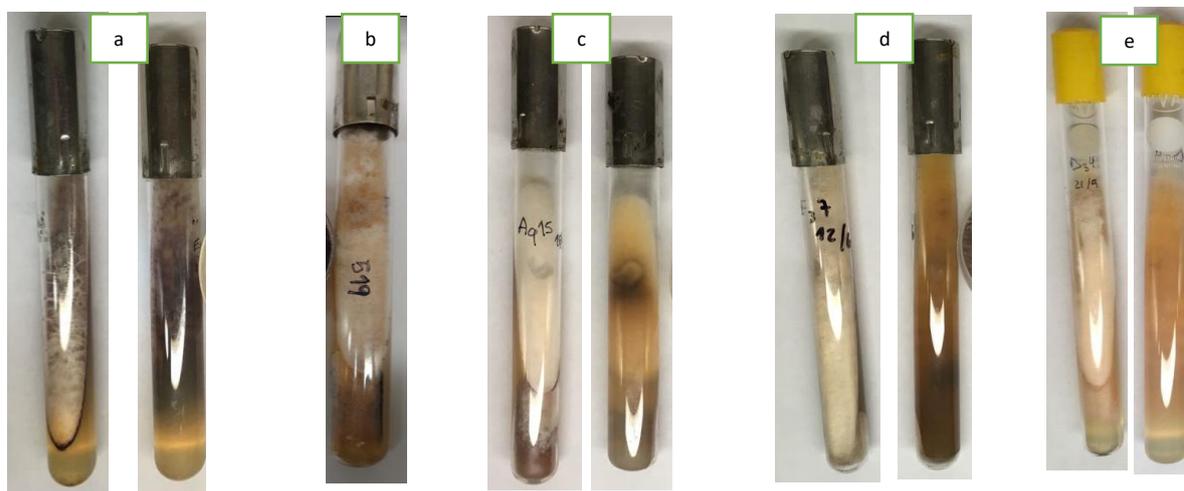
Entre los miembros del grupo número 2 se obtuvo un número menor de aislamientos (n= 12) con respecto al grupo 1. Por lo general se observaron microconidios ovales sin septos comunes entre especies pertenecientes al CEFF y microconidios redondos (Figura 8 b). En cuanto a las características macroscópicas, ninguno de los aislamientos pertenecientes a este grupo presentaron pigmentación en el medio de cultivo AHC (Figura 9 a), y mostraron escasa cantidad de micelio aéreo y de color tan. En el medio APG, la mayoría de los aislamientos presentaron pigmentación violeta en el reverso del tubo y abundante micelio aéreo como puede observarse en la figura 10 b.



**Figura 8.** Morfología de los microconidios de las cepas de *Fusarium* del CEFF desarrollados en medio AHC a 25 °C durante 15 días de incubación observados en un aumento 400X. a) microconidios ovales sin septos y piriformes b) microconidios ovales sin septos y redondos, c) microconidios ovales sin septos, redondos grandes y piriformes, d) hifas en espiral.



**Figura 9.** Morfología de las colonias (anverso) de los diferentes grupos clasificados; corresponden a los aislamientos: a) RC-J140 (grupo 2), b) RC-J1386 (grupo 4), c) RC-J311 (grupo 1), d) RC-J657 (grupo 3) y e) RC-J 466 (grupo 1) en agar AHC durante 15 días de incubación a 25 °C.



**Figura 10.** Morfología de las colonias (anverso y reverso) de los diferentes grupos clasificados; corresponden a los aislamientos: a) RC-J490 (grupo 4), b) RC-J1519 (grupo 2), c) RC-JA9 15 (grupo 3), d) RC-J459 (grupo 1) y e) RC-J408 (grupo 1), en APG durante 15 días de incubación a 25 °C.

El grupo número 3 estuvo conformado sólo por 8 aislamientos, los cuales presentaron variedad de microconidios: algunos presentaron conidios ovoides sin septos, redondos grandes y piriformes (Figura 8 c), y otros aislamientos presentaron una gran diversidad de microconidios, pero más pequeños. Tres de los aislamientos presentaron pigmentación violeta y escasa cantidad de micelio aéreo cuando desarrollaron en AHC (Figura 9 d). En medio APG estos mismos aislamientos presentaron pigmentación violeta y presencia de esporoquios en el punto de inoculación (Figura 10 c). El resto de los aislamientos no mostró pigmentación, pero si abundante micelio aéreo en AHC, mientras que en APG presentaron pigmentación violeta y una cantidad intermedia de micelio color tan.

El grupo número 4, estuvo conformado por 9 aislamientos, los cuales presentaron microconidios ovoides sin septos típicos de las especies pertenecientes al CEFF (Figura 8 a), y de diferentes tamaños. En AHC muchos de los aislamientos no presentaron pigmentación, aunque en algunos casos se tornaron violetas como se muestra en la figura 9 b, pero como se mencionó anteriormente, esta es una característica variable. En APG, también algunos de los aislamientos presentaron pigmentación en el reverso del tubo (Figura 10 a) y micelio abundante color tan, mientras que otros permanecieron incoloros.

Dentro de estos grupos, se analizaron otras características microscópicas, entre las que se destacaron: presencia de hifas en espiral, y presencia de microconidios piriformes y napiformes.

Una vez concluido el análisis de las características macro y micromorfológicas de los aislados, se tomó al azar un número representativo de miembros de cada grupo, dependiendo de la cantidad total de aislados (criterio de selección), para realizar la identificación molecular de los mismos. Para esto, se utilizaron cebadores específicos para la amplificación de una porción del gen *EF-1 $\alpha$* , y una vez amplificadas, secuenciadas y editadas las secuencias fueron alineadas utilizando la base de datos de NCBI y *Fusarium* MSLT. En la tabla 3 pueden observarse los cuatro grandes grupos obtenidos usando criterios morfológicos, con sus características detalladas, y al mismo tiempo el resultado del análisis molecular (expresado como porcentaje de similitud entre esa secuencia y la secuencia del mismo gen de especies conocidas).

La principal ventaja de los métodos de identificación basados en el ADN es que no están influenciados por las condiciones ambientales, y no dependen de la interpretación, a veces subjetiva, de características morfológicas. Su correcta identificación es imprescindible, debido a que muchas de las especies que pertenecen al CEFF son patógenos de plantas con importancia agrícola y a su vez productores de micotoxinas.

**Tabla 3.** Características morfológicas de los aislados fúngicos y resultados de BLAST de las secuencias analizadas

Grupo	Aislamiento	Planta aislada	Características morfológicas en AHC (400x)	Resultado de BLAST (NCBI)	Fusarium MSLT
1. Microconidios dispuestos en falsas cabezas y cadenas, originados a partir de polifiálides y monofiálides.	RC-J 622	<i>Flia. Poaceae</i>	Microconidios redondos y piriformes.	<i>F. proliferatum</i> 100%	<i>F. proliferatum</i> 98% <i>F. globosum</i> 97%
	RC-J 761	<i>Flia. Poaceae</i>	Microconidios ovales sin septos y pocos piriformes.	<i>F. proliferatum</i> 100%	<i>F. proliferatum</i> 98% <i>F. globosum</i> 97%
	RC-J 635	<i>Flia. Poaceae</i>	Microconidios ovales sin septos y piriformes.	<i>F. proliferatum</i> 100%	<i>F. proliferatum</i> 98% <i>F. globosum</i> 97%
	RC-J C5C10	<i>Flia. Poaceae</i>	Diferentes tipos de microconidios, piriformes y napiformes.	<i>F. proliferatum</i> 100%	<i>F. proliferatum</i> 98% <i>F. globosum</i> 97%
	RC-J 72	<i>Flia. Poaceae</i>	Diferentes tipos de microconidios, piriformes, napiforme y globosos.	<i>F. proliferatum</i> 100%	<i>F. proliferatum</i> 98% <i>F. globosum</i> 97%
	RC-J 733	<i>Flia. Poaceae</i>	Diferentes tipos de microconidios algunos piriformes. Hifas en espiral.	<i>F. proliferatum</i> 100%	<i>F. proliferatum</i> 99% <i>F. globosum</i> 97%
	RC-J 476		Microconidios ovales sin septos y piriformes.	NA	NA
	RC-J 269		Microconidios ovales sin septos y piriformes.	NA	NA
	RC-J 404		Microconidios piriformes.	NA	NA
	RC-J 1789	<i>Dichantium sp.</i>	Diversidad de microconidios y piriformes.	<i>F. proliferatum</i> 100%	<i>F. proliferatum</i> 98% <i>F. globosum</i> 97%
	RC-J 412	<i>Flia. Poaceae</i>	Diversidad de microconidios, piriformes e Hifas en espiral.	<i>F. proliferatum</i> 100%	<i>F. proliferatum</i> , <i>F. globosum</i> 98%
	RC-J 408		Hifas en espiral muy raras.	NA	NA
	RC-J 311	<i>Flia. Poaceae</i>	Diferentes tipos de microconidios e hifas en espiral.	<i>F. proliferatum</i> 100%	<i>F. proliferatum</i> <i>F. globosum</i> 98%

RC-J 454	<i>Flia. Poaceae</i>	Microconidios ovales sin septos iguales, hifas engrosadas e hifas en espiral.	NA	NA
RC-J 484	<i>Flia. Poaceae</i>	Varios tipos de microconidios e hifas en espiral.	<i>F. proliferatum</i> 100%	<i>F. proliferatum</i> <i>F. globosum</i> 98%
RC-J 409	<i>Flia. Poaceae</i>	Varios tipos de microconidios e hifas en espiral.	NA	NA
RC-J 505		Hifas en espiral , se observan bolas raras.	NA	NA
RC-J 1665	<i>Diplacha sp.</i>	Diferentes tipos de microconidios, piriformes y napiformes.	<i>F. proliferatum</i> 100%	<i>F. proliferatum</i> 99% <i>F. globosum</i> 97%
RC-J 1718	<i>Leersia luziola</i>	Microconidios ovales sin septos e hifas en espiral.	<i>F. proliferatum</i> 100%	<i>F. proliferatum</i> 99% <i>F. globosum</i> 97%
RC-J 268		Diferentes tipos de microconidios, piriformes y napiformes.	NA	NA
RC-J 466	<i>Flia. Poaceae</i>	Diferentes tipos de microconidios, piriformes y napiformes.	<i>F. proliferatum</i> 100%	<i>F. proliferatum</i> , <i>F. globosum</i> 98%
RC-J 421	<i>Flia. Poaceae</i>	Microconidios comunes chicos, botellitas largas.	<i>F. proliferatum</i> 100%	<i>F. proliferatum</i> <i>F. globosum</i> 98%
RC-J 425	<i>Flia. Poaceae</i>	Diferentes tipos de microconidios chicos.	<i>F. proliferatum</i> 100%	<i>F. proliferatum</i> 99% <i>F. globosum</i> 97%
RC-J 437	<i>Flia. Poaceae</i>	Diferentes tipos de microconidios, ovales.	<i>F. proliferatum</i> 100%	<i>F. proliferatum</i> <i>F. globosum</i> 98%
RC-J 443	<i>Flia. Poaceae</i>	Diferentes tipos de microconidios, ovales y piriformes.	<i>F. proliferatum</i> 100%	<i>F. proliferatum</i> <i>F. globosum</i> 98%
RC-J 282		Diferentes tipos de microconidios, piriformes y napiformes.	NA	NA
RC-J 192		Diferentes tipos de microconidios chicos.	NA	NA
RC-J 1690		Diferentes tipos de microconidios, ovales.	NA	NA

RC-J 627		Diferentes tipos de microconidios, ovals y piriformes.	NA	NA
RC-J 310	<i>Flia. Poaceae</i>	Diferentes tipos de microconidios, redondos y piriformes.	<i>F. proliferatum</i> 100%	<i>F. proliferatum</i> <i>F. globosum</i> 98%
RC-J 459	<i>Flia. Poaceae</i>	Diferentes tipos de microconidios, redondos como si no se separaran de las falsas cabezas.	<i>F. proliferatum</i> 100%	<i>F. proliferatum</i> <i>F. globosum</i> 98%
RC-J 407		Diferentes tipos de microconidios, redondos y clamidiosporas.	NA	NA
RC-J 701	<i>Flia. Poaceae</i>	Diferentes tipos de Microconidios de diferentes tamaños, algunos grandes y redondeados.	<i>F. proliferatum</i> 100%	<i>F. proliferatum</i> 99% <i>F. globosum</i> 97%
RC-J 739	<i>Flia. Poaceae</i>	Diferentes tipos de microconidios.	<i>F. proliferatum</i> 100%	<i>F. proliferatum</i> 98% <i>F. globosum</i> 97%
RC-J 506	<i>Flia. Poaceae</i>	Monofialides con aglomerados de microconidios.	<i>F. proliferatum</i> 100%	<i>F. proliferatum</i> 98% <i>F. globosum</i> 97%
RC-J 636		Abundantes microconidios. Macroconidio largo y fino.	NA	NA
RC-J 406	<i>Flia. Poaceae</i>	Diferentes tipos de microconidios.	<i>F. proliferatum</i> 100%	<i>F. proliferatum</i> <i>F. globosum</i> 98%
RC-J 1787	<i>Dichantium sp.</i>	Diferentes tipos de microconidios.	<i>F. proliferatum</i> 100%	<i>F. proliferatum</i> , <i>F. globosum</i> 98%
RC-J 397	<i>Flia. Poaceae</i>	Diferentes tipos de microconidios.	<i>F. proliferatum</i> 100%	<i>F. proliferatum</i> , <i>F. globosum</i> 98%
RC-J 1763	<i>Hymenachme sp.</i>	Diferentes tipos de microconidios.	<i>F. proliferatum</i> 100%	<i>F. proliferatum</i> 99% <i>F. globosum</i> 97%
RC-J 688		Diferentes tipos de microconidios.	NA	NA
RC-J 475		Diferentes tipos de microconidios.		

	RC-J 1782	<i>Pasto horqueta</i>	Diferentes tipos de microconidios.	<i>F. proliferatum</i> 100%	<i>F. proliferatum</i> , <i>F. globosum</i> 98%
	RC-J 405		Diferentes tipos de microconidios.	NA	NA
	RC-J 402		Diferentes tipos de microconidios.	NA	NA
	RC-J 1564		Diferentes tipos de microconidios.	NA	NA
	RC-J 678		Diferentes tipos de microconidios.	NA	NA
	RC-J 1593		Diferentes tipos de microconidios.	NA	NA
	RC-J 1759		Diferentes tipos de microconidios.	NA	NA
	RC-J 546		Diferentes tipos de microconidios.	NA	NA
	RC-J 1689		Diferentes tipos de microconidios.	NA	NA
	RC-J 423		Diferentes tipos de microconidios.	NA	NA
	RC-J 400		Diferentes tipos de microconidios.	NA	NA
	RC-J 140		Microconidios ovales sin septos.	NA	NA
2. Microconidios dispuestos en falsas cabezas y originados a partir de polifiálides y monofiálides.	RC-J A9 22	<i>Flia. Poaceae</i>	Abundantes microconidios ovales sin septos e hifas enroscadas.	<i>F. circinatum</i> , <i>F. guttiforme</i> , <i>F. subglutinans</i> 97%	<i>F. bulbicola</i> , <i>F. anthophilum</i> , <i>F. begoniae</i> 96%
	RC-J 224	<i>Flia. Poaceae</i>	Abundantes microconidios ovales sin septos y redondos.	<i>F. circinatum</i> 97% <i>F. guttiforme</i> , <i>F. bulbicola</i> 96%	<i>F. bulbicola</i> , <i>F. anthophilum</i> , <i>F. begoniae</i> 96%
	RC-J 1448	<i>Elionurus sp.</i>	Abundantes microconidios comunes, en forma de pera e hifas en espiral.	<i>F. circinatum</i> , <i>F. anthophilum</i> 96%	<i>F. anthophilum</i> , <i>F. bulbicola</i> , <i>F. begoniae</i> 96%

	RC-J 1592	<i>Spartina sp.</i>	Observa un Macroconidio, hifas electrizadas.	<i>F. pseudocircinatum</i> 99%	<i>F. pseudocircinatum</i> 99%
	RC-J 493	<i>Flia. Poaceae</i>	Macroconidios chicos algunos con septos.	<i>F. subglutinans</i> 100% <i>F. bulbicola</i> , <i>F. guttiforme</i> 99%	<i>F. bulbicola</i> , <i>F. anatum</i> , <i>F. begoniae</i> 98%
	RC-J 1483	<i>Elionurus sp.</i>	Microconidios grandes y Macroconidios rectos.	<i>F. subglutinans</i> 100%	<i>F. subglutinans</i> 100%
	RC-J 1519	<i>Eriochloa sp.</i>	Microconidios ovales sin septos gordos y Macroconidios largos grandes.	<i>F. pseudocircinatum</i> , <i>F. subglutinans</i> 99%	<i>F. pseudocircinatum</i> 99% <i>F. nygamai</i> 97%
	RC-J 401	<i>Flia. Poaceae</i>	Microconidios grandes y Macroconidios rectos.	<i>F. subglutinans</i> 100%	<i>F. subglutinans</i> 100%
	RC-J 345		Microconidios ovales sin septos, Macroconidios comunes e hifas en espiral.	NA	NA
	RC-J 279		Macroconidios rectos de varios tamaños.	NA	NA
	RC-J 22		Microconidios grandes y Macroconidios rectos	NA	NA
3. Microconidios dispuestos en falsas cabezas y cadenas originados a partir de monofiálides.	RC-J 1639	<i>Cynodon dactylon sp</i>	Microconidios ovales sin septos gordos y Macroconidios largos grandes.	<i>F. pseudocircinatum</i> 99%	<i>F. pseudocircinatum</i> 99% <i>F. nygamai</i> 97%
	RC-J 249	<i>Flia. Poaceae</i>	Microconidios napiformes y piriformes.	<i>F. anthophilum</i> , <i>F. bactrioides</i> 100%	<i>F. anthophilum</i> 100%
	RC-J 1560		Monofialides largas.	NA	NA
	RC-J 745		Monofialides.	NA	NA
	RC-J 235		Clamidiosporas.	NA	NA
	RC-J 424	<i>Flia. Poaceae</i>	Muchos microconidios de diferente tamaño, algunos en	<i>F. verticilloides</i> 100%	<i>F. moniliforme</i> 100% <i>F. verticilloides</i> 99%

		forma ovoide con una base aplanada.			
	RC-J 413	Abundantes microconidios ovales sin septos de diferentes tamaños.	NA	NA	
	RC-J 657	Microconidios ovales sin septos chicos y piriformes.	NA	NA	
4. Microconidios dispuestos en falsas cabezas y originados a partir de monofilídes.		<i>Flia. Poaceae</i>			
	RC-J 251	Microconidios ovales sin septos chicos.	<i>F. circinatum, F. guttiforme, F. bulbicola</i> 97%	<i>F. bulbicola, F. anthophilum, F. begoniae</i> 96%	
	RC-J 34	Microconidios ovales sin septos chicos.	<i>F. circinatum, F. guttiforme, F. subglutinans</i> 97% <i>F. bactrioides</i> 96%	<i>F. bulbicola, F. anthophilum, F. begoniae</i> 96%	
	RC-J 82	Microconidios ovales sin septos .	<i>F. circinatum, F. guttiforme, F. subglutinans, F. bactrioides</i> 97%	<i>F. bulbicola, F. anthophilum, F. begoniae, F. circinatum</i> 96%	
	RC-J 217	Microconidios iguales de diferentes tamaños e hifas en espiral.	<i>F. circinatum, F. guttiforme, F. bulbicola, F. subglutinans</i> 97%	<i>F. bulbicola, F. anthophilum, F. begoniae, F. circinatum</i> 96%	
	RC-J 1386	Microconidios ovales sin septos chicos.	NA	NA	
	RC-J 490	Microconidios iguales de diferente tamaño.	NA	NA	
	RC-J 1387	Microconidios iguales de diferente tamaño.	NA	NA	
	RC-J 1609	<i>Panicum sp.</i>	Macroconidios rectos.	<i>F. temperatum</i> 99%	<i>F. bulbicola, F. begoniae, F. ananatum</i> 97%
	RC-J 132	Macroconidios largos finos, algunos rectos.	NA	NA	

Del análisis de la tabla 3, puede observarse que las secuencias de los productos de PCR de todos los aislamientos (n= 28) dentro del grupo 1 se alinearon con un 100% de similitud con la secuencia del mismo gen de la especie *F. proliferatum* cuando el análisis fue hecho con la base de datos del NCBI y con un porcentaje de similitud entre 98-99% con la misma utilizando la base de datos Fusarium MLST. Además, todos estos aislamientos mostraron tener las características morfológicas esperadas para esta especie (microconidios en cadenas originados a partir de polifialides), aunque además muchos presentaron microconidios napiformes y piriformes, característica no descrita entre miembros de esta especie según Leslie y Summerell (2006).

En el grupo 2, el resultado de BLAST de los aislamientos RC-JA9 22, RC-J224 y RC-J1448 mostraron valores de similitud de 96-97%, con varias especies dentro del CEFF. Por ejemplo, para el aislamiento RC-JA9 22 se le asignaron 3 especies diferentes: *F. circinatum*, *F. guttiforme* y *F. subglutinans*, con un porcentaje de similitud de 97%. Mientras que el aislamiento RC-J224 se alineó con tres especies diferentes: *F. circinatum* con un 97% de similitud y *F. guttiforme*, *F. bulbicola* con un 96% de similitud. El aislamiento RC-J1448 se alineó con dos especies diferentes: *F. circinatum* y *F. anthophilum* con un porcentaje de similitud de 96%. Todos estos resultados se corresponden con el BLAST realizado utilizando la base de datos del NCBI, cuando la base de datos utilizada fue Fusarium MLST se obtuvieron resultados similares (Tabla 3). Estos tres aislamientos compartían características morfológicas. En cualquiera de los 3 casos vemos que no encontramos un buen porcentaje de identidad con una especie puntual, por lo que no podríamos clasificar por este medio a estos aislados dentro de una especie. Para los aislamientos RC-J1483 y RC-J401 el análisis de BLAST con ambas bases de datos dio un 100% de similitud con *F. subglutinans*, además mostraron tener las características morfológicas esperadas para esta especie. El aislado RC-J493 presento alto porcentaje de similitud con varias especies incluidas dentro del clado Americano del CEFF utilizando ambas bases de datos, no pudiendo entonces resolver su identidad. Los aislamientos RC-J1519 y RC-J1592 dieron un 99% de similitud con *F. pseudocircinatum* utilizando ambas bases de datos. Esta especie según Leslie y Summerell (2006) presenta microconidios dispuestos en cadenas cortas, característica que quizás fue pasada de alto en nuestro análisis morfológico, siendo el resto de las características observadas las esperadas para esta especie (Tabla 3).

En el grupo 3, el resultado de BLAST para el aislamiento RC-J424 dió un 100% de similitud con *F. verticilloides* utilizando ambas bases de datos (Tabla 3), lo cual se correspondió con las características observadas en el análisis morfológico y esperadas para esta especie. Por otro lado, el aislamiento RC-J1639 dio un 100% de similitud con *F. pseudocircinatum* en el resultado de BLAST utilizando ambas bases de datos. En cuanto a sus características morfológicas lo observado se correspondió con lo esperado para esta

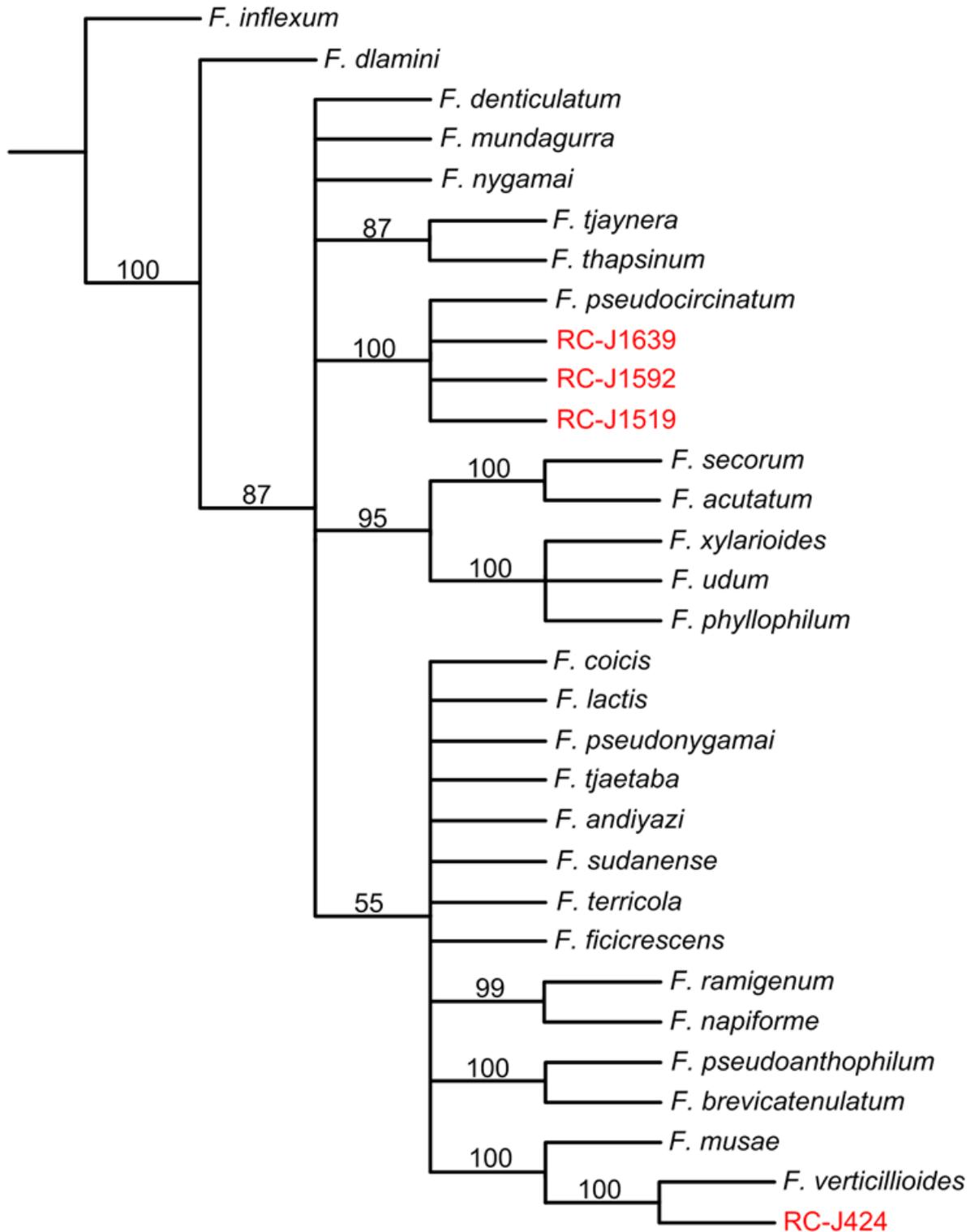
especie. Por último, el aislamiento RC-J249 dio como resultado un 100% de similitud con 2 especies: *F. anthophilum* y *F. bactrioides* cuando el BLAST se realizó utilizando la base de datos de NCBI, y dio un 100% de similitud solo con *F. anthophilum* cuando la base de datos utilizada fue Fusarium MLST.

Por último, en el grupo 4 el aislamiento RC-J1609 dio en el análisis de BLAST un 99% de similitud con *F. temperatum*, pero este aislamiento no compartió las características morfológicas esperadas para esta especie, debido a que no se observaron microconidios originados a partir de polifálides que es una característica de esta especie según Scaufaire et al., (2012). Por otro lado, 4 aislados que compartían características morfológicas (RC-J34, RC-J82, RC-J217 y RC-J251) no pudieron ser resueltos por análisis de BLAST ya que como puede observarse en la tabla 3 un único aislado dio el mismo porcentaje de similitud con más de una especie. A modo de ejemplo el aislamiento RC-J34 dio un 97% de similitud con *F. circinatum*, *F. guttiforme* y *F. subglutinans*.

A los fines de encontrar la identidad de los aislados se complementaron los análisis anteriores con un análisis filogenético. Para esto se realizó un alineamiento que contenía 44 secuencias del gen *EF-1 $\alpha$*  pertenecientes a los aislados de este estudio junto con secuencias de todas las especies pertenecientes al CEFF disponibles en el GenBank (ver Tabla 2 en materiales y métodos). El análisis contenía 736 caracteres, de los cuales 174 fueron informativos de parsimonia. El análisis de máxima parsimonia (MP) usando los caracteres informativos construyó 1868 árboles de 547 pasos de longitud (IC = 0,41; IR = 0,82). En la figura 11 que se presenta a continuación puede analizarse el árbol consenso obtenido de dicho análisis, en el cual 28 nodos presentaron valores de bootstrap >90%. Allí puede observarse que las cepas estudiadas en este trabajo se distribuyeron entre los tres grandes clados que conforman el CEFF. Analizando los resultados anteriores, y considerando que el número de cepas analizadas era abundante, se decidió hacer un análisis separado para cada uno de los clados que conforman el CEFF.

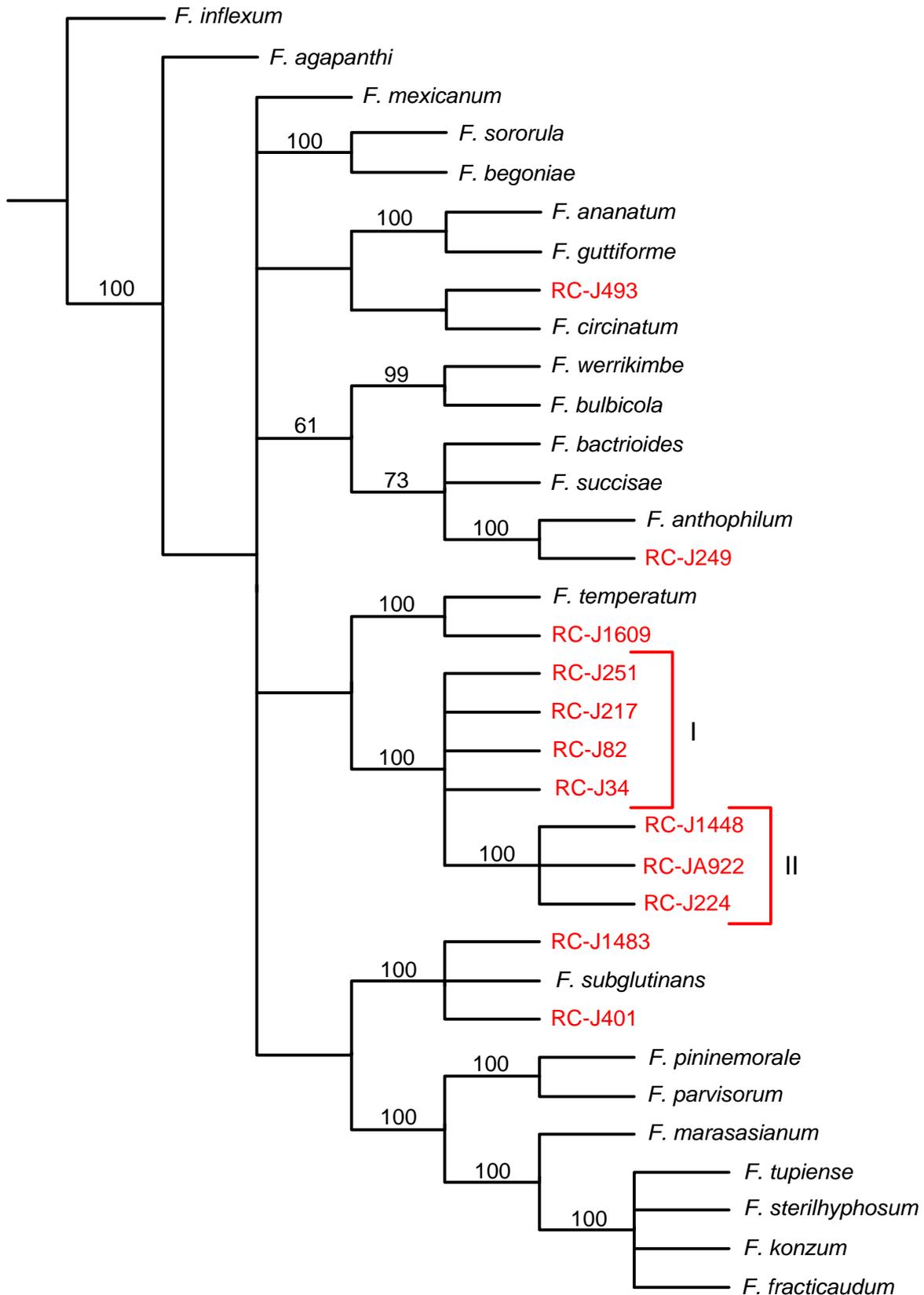


Cuatro de nuestros aislamientos se ubicaron en el clado Africano dentro del CEFF. Se realizó un alineamiento con 4 secuencias del gen *EF-1 $\alpha$*  pertenecientes a los aislados en estudio junto con 27 secuencias disponibles en el GenBank de todas las especies pertenecientes al clado Africano del CEFF descritas hasta el momento (Tabla 2). Este alineamiento contenía 721 caracteres, de los cuales 111 fueron informativos de parsimonia. El análisis de MP usando los caracteres informativos construyó 103 árboles de 271 pasos de longitud (IC = 0,56; IR = 0,68), a continuación, se muestra en la figura 12 el árbol consenso obtenido como resultado de dicho análisis (9 nodos presentaron valores de bootstrap >90%). En esta misma figura puede observarse que el aislamiento RC-J424 se agrupó con *F. verticillioides* NRRL 22172 con un valor de bootstrap de 100%, lo cual coincide con el resultado del BLAST y con las características morfológicas observadas y esperadas para esta especie (Tabla 3). Es importante destacar que esta especie es productora de importantes micotoxinas (fumonisinas, moniliformina, etc), además de ser patógeno de maíz (Leslie y Summerell, 2006). Se aísla con frecuencia a partir de maíz y derivados en Argentina (Marasas et al., 1986; Moretti et al., 1995; Logrieco et al., 1996, 1998; Desjardins, 2006, Munkvold, 2017). Los 3 aislados restantes (RC-J1639, RC-J1592, RC-J1519) se agruparon con *F. pseudocircinatum* NRRL22946 con un valor de bootstrap de 100%, lo cual coincidió con el resultado del BLAST. Esta especie hasta ahora no había sido aislada en Argentina, ya que por lo general se encuentra en regiones tropicales del mundo (Ghana, Panamá, Filipinas y Papua Nueva Guinea) donde fue identificada a partir de numeroso sustratos vegetales. Recientemente fue aislada en México causando malformaciones en mangos (O'Donnell et al., 1998; Leslie y Summerell, 2006; Liew et al., 2016).



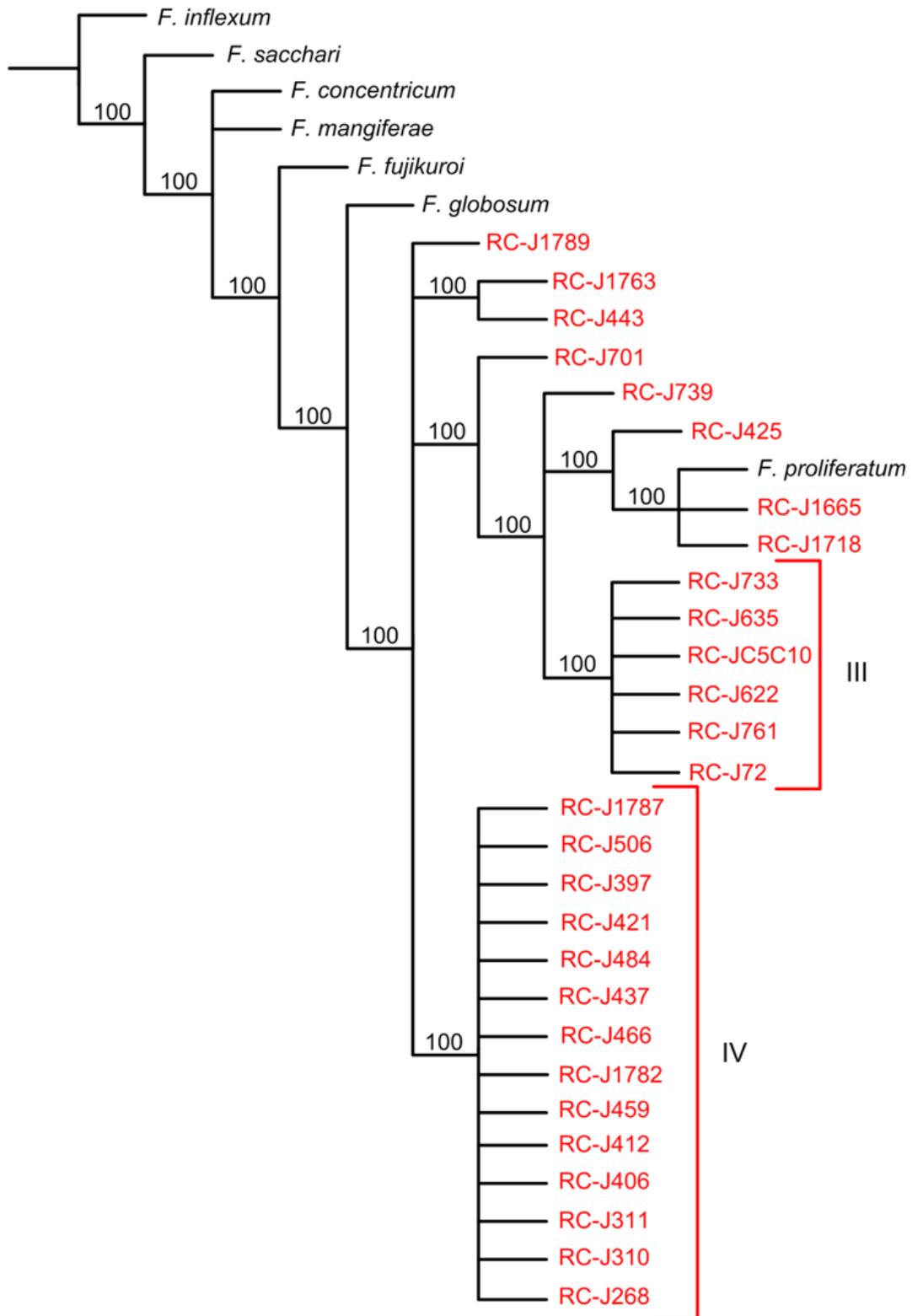
**Figura 12.** Árbol consenso de los 103 árboles parsimoniosos encontrados a partir de los datos combinados de las secuencias de 4 cepas de *Fusarium* pertenecientes al clado Africano del CEFF aisladas en el presente estudio (color rojo) y 27 cepas de *Fusarium* pertenecientes al clado Africano del CEFF disponibles en el GenBank. La cepa *F. inflexum* NRRL 20433 se utilizó como grupo externo.

Doce de nuestros aislamientos se agruparon en el clado Americano dentro del CEFF (Figura 13), esas secuencias se alinearon con 22 secuencias disponibles en GenBank de las especies que pertenecen al mismo clado de este complejo (Tabla 3). Dicho alineamiento contenía 681 caracteres, de los cuales 56 fueron informativos de parsimonia. El análisis de MP usando los caracteres informativos construyó 4 árboles de 102 pasos de longitud (IC = 0,75; IR = 0,88). La figura 13, a continuación, muestra el árbol consenso obtenido de dicho análisis, en el cual 13 nodos presentaron valores de bootstrap >90%. El aislamiento RC-J1609 se agrupó con *F. temperatum* HM067687 con un valor de bootstrap de 100%, lo cual coincide con los resultados del BLAST. Esta especie ha sido recientemente descrita a partir de aislamientos provenientes de maíz y sorgo, en Bélgica y Serbia respectivamente (Scauflaire et al., 2012; Levic et al., 2013). En Argentina esta especie fue aislada por primera vez a partir de maíz en el año 2014 y se determinó que era capaz de producir beauvericina y fusaproliferina (Fumero et al., 2015). Otros 2 aislamientos RC-J401 y RC-J1483 se agruparon con *F. subglutinans* NRRL25300 con un valor de bootstrap de 100%, lo cual coincidió en un 100% con los resultados del BLAST y mostraron tener las características morfológicas esperadas para esta especie. Esta especie se aísla con frecuencia de maíz en Argentina (Chulze et al., 2000; Torres et al., 2001; Reynoso, 2002), también produce micotoxinas como la moniliformina, fusaproliferina y beauvericina (Marasas et al., 1986; Moretti et al., 1995; Logrieco et al., 1996, 1998; Desjardins, 2006, Munkvold 2017). Por otra parte, el aislamiento RC-J249 se agrupó con *F. anthophilum* NRRL360 con un valor de bootstrap de 100%, esto coincidió con el resultado del BLAST en un 100%. Esta especie es de distribución cosmopolita y ha sido aislada de orquídeas, mijo y plantas de trigo silvestre que por lo general son de zonas templadas. Además, esta especie también es productora de micotoxinas como fumonisinas, moniliformina, beauvericina y fusaproliferina (Desjardins, 2006; Munkvold 2017), y hasta el momento no ha sido aislada en Argentina. Por último, en la misma figura puede observarse que hay dos grupos: I y II, que no incluyen a ninguna especie de *Fusarium* conocida hasta el momento. A su vez cada grupo posee buenos valores de soporte, presentan valores de bootstrap de 100%. Por otro lado, resulta interesante destacar que los aislados miembros de cada uno de los grupos I y II comparten características morfológicas entre sí (Ver tabla 3) y mostraron similares resultados de BLAST: con el cual no se logró resolver la identidad de los mismos. Todo esto nos hace suponer que estos dos grupos podrían representar especies de *Fusarium* que no han sido descritas hasta el momento. Sin embargo, para llegar a una conclusión de este tipo se deberían realizar secuenciamientos de múltiples genes que permitan la resolución taxonómica de estos aislados. Esta falta general de coherencia entre los resultados de BLAST y los análisis filogenéticos, destacan las limitaciones asociadas con el uso de similitud de secuencias solo para el diagnóstico de nuevas especies.



**Figura 13.** Árbol consenso de los 4 árboles parsimoniosos encontrados a partir de los datos combinados de las secuencias de 12 cepas de *Fusarium* pertenecientes al clado Americano del CEFF aisladas en el presente estudio (color rojo) y 22 cepas de *Fusarium* pertenecientes al mismo clado del CEFF disponibles en el GenBank. La cepa *F. inflexum* NRRL 20433 se utilizó como grupo externo.

Veintiocho aislamientos se ubicaron en el clado Asiático del CEFF. Se alinearon 28 secuencias del gen *EF-1 $\alpha$*  de los aislados seleccionados junto con 8 secuencias disponibles en GenBank de las especies que pertenecen al mismo clado de este complejo (Tabla 2). Dicho alineamiento contenía 678 caracteres, de los cuales 43 fueron informativos de parsimonia. El análisis de MP usando los caracteres informativos construyó 1 árbol de 65 pasos de longitud (IC = 0,83; IR = 0,93) en el cual 12 nodos presentaron valores de bootstrap >90%, como puede observarse en la figura 14. En este clado solamente 2 de los aislamientos RC-J1665 Y RC-J1718 se agruparon con *F. proliferatum* NRRL229 con valores de bootstrap de 100%, lo cual coincide con los resultados del BLAST y con las características morfológicas observadas/esperadas (Tabla 3). Esta especie es reconocida como un importante patógeno de maíz capaz de producir un gran número de micotoxinas, entre las que se incluyen: fumonisinas, moniliformina, beauvericina, ácido fusárico y fusaproliferina (Desjardins, 2006; Munkvold, 2017). Sin embargo, además de colonizar el maíz, este hongo tiene la capacidad de colonizar un amplio rango de hospederos como pino, espárrago, higo, ajo, arveja, cebolla, tomate, ananá, palmera, como también cereales tales como arroz, cebada, y trigo (Abdalla et al., 2000; Kenényi et al., 2002; Aliakbari et al., 2007; Stankovic et al., 2007; von Bargen et al., 2009; Stępień et al., 2011; Waśkiewicz et al., 2013). En nuestro país se aísla con frecuencia a partir de maíz y trigo (Ramirez, 2000; Reynoso, 2002; Palacios et al., 2011). El resto de los aislamientos que según BLAST correspondían, con un 100% de similitud a la especie *F. proliferatum* no se agruparon con ninguna de las especies conocidas de *Fusarium* hasta el momento.



**Figura 14.** Único árbol encontrado a partir de los datos combinados de las secuencias de 28 aislados de *Fusarium* pertenecientes al clado Asiático del CEFF obtenidos en el presente estudio (color rojo) y 8 cepas de *Fusarium* pertenecientes al mismo clado del CEFF disponibles en el GenBank. La cepa *F. inflexum* NRRL 20433 se utilizó como grupo externo.

En la misma figura pueden observarse 2 grupos: III (6 aislamientos) y IV (14 aislamientos), ambos soportados con valores de bootstrap de 100%. Es importante destacar que los aislamientos dentro de cada grupo compartían todas sus características morfológicas (Tabla 3). Todo esto nos reafirma lo expresado anteriormente, que a veces la información de un solo gen no es suficiente para resolver la identidad de una cepa por lo que se necesitaría la secuenciación de múltiples genes para permitir la resolución taxonómica de estos aislados.

Por último, los aislamientos RC-J1789, RC-J1763, RC-J701, RC-J739, RC-J425 y RC-J 493, no se agruparon con ninguna de las especies conocidas de *Fusarium* y los mismos se encuentran solos en el árbol filogenético. Para lograr la correcta identificación de estos aislamientos se necesitaría la secuenciación de múltiples genes para lograr la resolución taxonómica y ver si nos encontramos ante nuevas especies o especies ya conocidas cuyo secuenciamiento de un único gen no logra su correcta identificación.

En la mayoría de los casos las investigaciones sobre el género *Fusarium*, tanto a nivel mundial como nacional, se han focalizado en especies patógenas y/o productoras de micotoxinas presentes en plantas de interés económico, principalmente cereales y oleaginosas. Investigaciones recientes, en Australia, EEUU, Hungría y Polonia, sugieren que las especies de *Fusarium* comúnmente se encuentran en pastos de la flia. Poaceae (no cultivados) presentes en pastizales naturales representando así una fuente importante de nuevas especies (Zeller et al., 2003; Leslie et al., 2004; Phan 2006; Sánchez Márquez et al., 2008; Szécsi et al., 2013; Laurence et al., 2016).

## VI. Conclusiones y perspectivas futuras

- ❖ Se observó una gran diversidad entre los aislados de *Fusarium* estudiados pertenecientes al CEFF provenientes de un ecosistema natural con muy baja actividad antropogénica. Esto indicaría que Argentina posee riqueza de especies de *Fusarium* no solamente en agroecosistemas sino también en ecosistemas naturales como son los humedales.
- ❖ El análisis de las características morfológicas, se correlacionó en muchos casos con el posterior análisis de BLAST, y luego con el análisis filogenético, dando lugar a la resolución de la identidad de algunos de los aislados (*F. verticillioides*, *F. anthophilum*, *F. pseudocircinatum*, *F. subglutinans*, *F. proliferatum* y *F. temperatum*).
- ❖ Muchos de los aislados que compartían características morfológicas entre sí y cuya identidad no pudo resolverse con el análisis de BLAST, se agruparon de manera consistente y sin incluirse en ninguna especie conocida (grupos I, II, III y IV) cuando se realizó el análisis de inferencia filogenética, sugiriendo así que las herramientas utilizadas no fueron suficientes para resolver su identidad.
- ❖ Una limitación de nuestro estudio fue la utilización de un solo gen (EF-1  $\alpha$ ). Sin embargo, el mismo resulto altamente informativo ya que permitió la separación de especies estrechamente relacionadas dentro del CEFF, siendo esto más evidente en los clados Americano y Asiático donde se ubicaron la mayoría de los aislados en estudio.
- ❖ Debido a que las especies fehacientemente identificadas son reconocidas como patógenos de ciertas plantas (maíz, trigo, pinos, entre otros) y además productoras de importantes micotoxinas existiría un riesgo potencial si se utilizaran estos pastizales naturales para producción animal o las tierras para la producción agrícola.

## VII. Bibliografía

- ❖ Abdalla, M.Y., Al-Rokibah, A., Moretti, A., Mulè, G. (2000). Pathogenicity of toxigenic *Fusarium proliferatum* from date palm in Saudi Arabia. *Plant Disease*, 84, 321-324.
- ❖ Aliakbari, F., Mirabolfathy, M., Emami, M., Mazhar, S.F., Karami-Osboo, R.K. (2007). Natural occurrence of *Fusarium* species in maize kernels at Gholestan province in northern Iran. *Asian Journal of Plant Science*, 8, 1276-1281.
- ❖ Alves-Santos F.M., Benito, E.P., Eslava, A.P., Díaz-Mínguez, J.M. (1999). Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 3335–3340.
- ❖ Al-Hatmi, A.M., Normand, A.C., van Diepeningen, A.D., Hendrickx, M., de Hoog, G.S., Piarroux, R. (2015). Rapid species-level identification of opportunists in the *Fusarium fujikuroi* species complex using MALDI-TOF mass spectrometry. *Future Microbiology*, 10, 1939–1952.
- ❖ Aoki, T., O'Donnell, K., Ichikawa, K. (2001). *Fusarium fractiflexum* sp. nov. and two other species within the *Gibberella fujikuroi* species complex recently discovered in Japan that form aerial conidia in false heads. *Mycoscience*, 42, 462-478.
- ❖ Aoki, T., O' Donnell, K.Y., Geiser, D.M. (2014). Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *Journal of General Plant Pathology*, 80, 189-201.
- ❖ Beyon, F.H.L., Burgess, L.W., Sharp, P.J. (2000). Molecular Genetic Investigations and reclassification of *Fusarium* species in sections *Fusarium* and *Roseum*. *Mycological Research*, 104, 1164-1174.
- ❖ Britz, H., Steenkamp, E.T., Coutinho, T.A., Wingfield, B.D., Marasas, W.F.O., Wingfield, M. J. (2002). Two new species of *Fusarium* Section *Liseola* associated with mango malformation. *Mycologia*, 94, 722-730.
- ❖ Burgess, L.W., Forbes, G.A., Windels, C., Nelson, P.E., Marasas, W.F.O., Gott, K.P. (1993). Characterization and distribution of *Fusarium acuminatum* subsp. *armeniicum* subsp. nov. *Mycologia*, 85, 119-124.
- ❖ Burgess, L.W., Summerell, B.A. (2000). Taxonomy of *Fusarium*: *Fusarium acuminatum*. Nov. *Mycotaxon*, 75, 347 -348.
- ❖ Chang, D.C., Grant, G.B., O'Donnell, K., Wannemuehler, K.A., Noble- Wang, J., Rao, C.Y., Jacobson, L.M., Crowell, C.S., Sneed, R.S., Lewis, F.M., Schaffzin, J.K., Kainer, M.A., Genese, C.A., Alfonso, E.C., Jones, D.B., Srinivasan, A., Fridkin, S.K., Park, B.J. (2006). Multistate outbreak of *Fusarium* keratitis associated with use of a contact lens solution. *Journal of the American Medical Association*, 296, 953-963.

- ❖ Chulze, S.N., Ramírez, M.L., Torres, A., Leslie, J.F. (2000). Genetic variation in *Fusarium* Section Liseola from no-till maize in Argentina. *Applied Environmental Microbiology*, 66, 5312–5315.
- ❖ Dayrat, B. (2005). Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85, 407-415.
- ❖ Desjardins, A. (2006). *Fusarium* Mycotoxins: Chemistry, Genetics and Biology. APS Press, St. Paul, MN, pp. 79- 108.
- ❖ Fumero, M.V., Reynoso, M.M., Chuzle, S.N. (2015). *Fusarium temperatum* and *Fusarium subglutinans* isolated from maize in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 199, 86-92.
- ❖ Geiser, D.M., Jiménez-Gasco, M.M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T.J., Zhang, N., Kuldau, G.A., O'Donnell, K. (2004). FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 473-479.
- ❖ Geiser, D.M., Lewis Ivey, M.L., Hakiza, G., Juba, J.H., Miller, S.A. (2005). *Gibberella xylarioides* (anamorph: *Fusarium xylarioides*), a causative agent of coffee wilt disease in Africa, is a previously unrecognized member of the *G. fujikuroi* complex. *Mycologia*, 97, 191-201.
- ❖ Geiser, D.M, Aoki, T., Bacon, C.W., Baker, S.E., Bhattacharyya, M.K., Brandt, M.E., Brown, D.W., Burgess, L.W., Chulze, S., Coleman, J.J., Correll, J.C., Covert, S.F., Crous, P.W., Cuomo, C.A., De Hoog, G.S., Di Pietro, A., Elmer, W.H., Epstein, L., Frandsen, R.J. N., Freeman, S., Gagkaeva, T., Glenn, A.E., Gordon, T.R., Gregory, N.F., Hammond- Kosack, K.E., Hanson, L.E., del Mar Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Kistler, H.C., Kuldau, G.A., Leslie, J.F., Logrieco, A. , Lu, G., Lysøe, E., Ma, L-J., McCormick, S.P., Migheli, Q., Moretti, A., Munaut, F., O'Donnell, K., Pfenning, L., Ploetz, R.C., Proctor, R.H., Rehner, S. A., Robert, V.A.R.G., Rooney, A.P., Bin Salleh, B., Scandiani, M.M., Scauflaire, J., Short, D.P.G., Steenkamp, E., Suga, H., Summerell, B.A., Sutton, D.A., Thrane, U., Trail, F., Van Diepeningen, A., VanEtten, H.D., Viljoen, A., Waalwijk, C., Ward, T.J., Wingfield, M.J. , Xu, J-R., Yang, X-B., Yli-Mattila, T., Zhang, N. (2013). One fungus, one name: defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. *Phytopathology*, 103, 400–408.
- ❖ Goloboff, P.A., Farris, J.S., Nixon, K.C. (2008). TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*, 24, 774–786.
- ❖ Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- ❖ Herron, D.A., Wingfield, M.J., Wingfield, B.D., Rodas, C.A., Marincowitz, S., Steenkamp, E.T. (2015). Novel taxa in the *Fusarium fujikuroi* species complex from *Pinus* spp. *Studies in Mycology*, 80, 131-150.

- ❖ Karim, N.F.A., Mohd, M., Nor, N.M.I., Zakaria, L. (2016). Saprophytic and potentially pathogenic *Fusarium* species from peat soil in Perak and Pahang. *Tropical Life Sciences Research*, 27,1–20.
- ❖ Katoh, K., Standley, D.M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability (outlines version 7). *Molecular Biology and Evolution*, 30, 772-780.
- ❖ Kenényi, Z., Mulé, G., Moretti, A., Waalwijk, C., Hornok, L. (2002). Fertility and mating type assessment within *Fusarium proliferatum* isolates from different host plants. *Journal of Applied Genetics*, 43, 55–68.
- ❖ Klittich, C.J.R., Leslie, J.F., Nelson, P.E. and Marasas, W.F.O. (1997). *Fusarium thapsinum* (*Gibberella thapsina*): A new species in section *Liseola* from sorghum. *Mycologia*, 89, 643-652.
- ❖ Kvas, M., Marasas, W.F.O., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J., Steenkamp, E.T. (2009). Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. *Fungal Diversity* 34:1-21.
- ❖ Laurence, M.H., Walsh, J.L., Robinson, D.M., Johansen, R.M., Petrovic, T., Vu, T.T.H., Buegess, L.W., Summerell, B.A. (2016). Six novel species of *Fusarium* from natural ecosystems in Australia. *Fungal Diversity*, 77, 349-366.
- ❖ Leslie, J.F., Pearson, C.A., Nelson, P.E., Toussoun, T.A. (1990). *Fusarium* species from corn, sorghum and soybean fields in the central and eastern United States. *Phytopathology*, 88, 343-350.
- ❖ Leslie, J.F. (1991). Mating populations in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*) *Phytopathology*. 81 :1058–1060.
- ❖ Leslie, J.F., Zeller, K.A., Wohler, M., Summerell, B.A. (2004). Interfertility of two mating populations in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 611-618.
- ❖ Leslie, J.F., Summerell, B.A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Professional, Ames, Iowa, USA.
- ❖ Leslie, J.F., Summerell, B.A. (2011). In search of New *Fusarium* species. *Plant Breeding and Seed Science*, 63, 93-101.
- ❖ Lević, J., Munaut, F., Scauflaire, J., Stanković, S., Ivanović, D., Krn, V. (2013). Pathogenicity of *Fusarium temperatum* and *Fusarium subglutinans* on maize stalk and ear under artificial inoculation under field conditions. 12th European *Fusarium* Seminar. Bordeaux, France, 12-16.
- ❖ Liew, E.C., Lurence, M.H., Pearce, C.A., Shivas, R.G., Johnson, G.I., Tan, Y.P., Edwards, J., Perry, S., Cooke, A.W., Summerell, B.A. (2016). Review of *Fusarium* species isolated in association with mango malformation in Australia. *Australian Plant Pathology*, 45, 547-559.

- ❖ Logrieco, A., Moretti, A., Fornelli, V., Ritieni, A., Caiaffa, M.F., Randazzo, G., Bottalico, A., Macchia, L., (1996). Fusaproliferin production by *Fusarium subglutinans* and its toxicity to *Artemia salina*, EF-9 insect cells, and IARC/LCL 171 human B lymphocytes. *Applied Environmental Microbiology*, 62, 3378–3384.
- ❖ Logrieco, A., Moretti, A., Castella, G., Kostechi, M., Golinski, P., Ritieni, A., Chelkowski, J. (1998). Beauvericin production by *Fusarium* species. *Applied Environmental Microbiology*, 64, 3084-3088.
- ❖ Logrieco, A., Bottalico, A., Mulé, G. (2003). Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 645-667.
- ❖ Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Rabie, C.J., Nelson, P.E., Toussoun, T.A.,(1986). Moniliformin production in *Fusarium* section Liseola. *Mycologia*, 78, 242–247.
- ❖ Marasas, W.F.O., Rheeder, J.P., Lamprecht, S.C., Zeller, K.A., Leslie, J.F. (2001). *Fusarium andiyazi* sp. nov., a new species from sorghum. *Mycologia*, 93, 1203-1210.
- ❖ Moretti, A., Logrieco, A., Bottalico, A., Ritieni, A., Randazzo, G., Corda, P. (1995). Beauvericin production by *Fusarium subglutinans* from different geographical areas. *Mycological Research*, 99, 282–286
- ❖ Moussa, T., Al-Zharani, H., Kadasa, N. (2017). Two new species of the *Fusarium fujikuroi* species complex isolated from the natural environment. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110, 819-832.
- ❖ Munkvold, G. (2017). *Fusarium* species and their associated mycotoxins. En: *Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol 1542. Moretti, A., Susca, A.(Eds). Springer Science+Business Media LLC. Páginas 51-106.
- ❖ Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Marasas, W.F.O. (1983) *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. Pennsylvania, USA: Pennsylvania State University.
- ❖ Nelson, P.E., Plattner, R.D., Shackelford, D.D., Desjardins, A.E. (1992). Fumonisin B<sub>1</sub> production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section Liseola and by some related species. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 948-989.
- ❖ Nelson, P.E., Dignani, M.C., Anaissie, E.J. (1994). Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology Reviews*, 479 – 504.
- ❖ Nichea, M.J., Cendoya, E., Zachetti, V.G.L., Torres, A.M., Ramirez, M.L. (2016). Search of *Fusarium* species responsible for type A trichothecene contamination on natural grasses from a wetland ecosystem in Argentina. Workshop 2016 International Commission on Food Mycology, Current and Future Trends in Food Mycology- Methods, Taxonomy and Emerging Problems, Freising, Alemania. Junio 2016.

- ❖ Nirenberg, H.I., O'Donnell, K. (1998). New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90, 434-458.
- ❖ O'Donnell, K., Cigelnik, E. (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7, 103-116.
- ❖ O'Donnell, K., Cigelnik, E., Nirenberg, H.I. (1998). Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90, 465-493.
- ❖ O'Donnell, K., Nirenberg, H.I., Aoki, T., Cigelnik, E. (2000). A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience*, 41, 61-78.
- ❖ O'Donnell, K., Sutton, D.A., Rinaldi, M.G., Sarver, B.A., Balajee, S.A., Schroers, H.J., Summerbell, R.C., Robert, V.A., Crous, P.W., Zhang, N., Aoki, T., Jung, K., Park, J., Lee, Y.H., Kang, S., Park, B., Geiser, D.M. (2010). Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 3708-3718.
- ❖ O'Donnell, K., Ward, T.J., Robert V.A.R.G., Crous, P.W., Geiser, D.M., Kang, S. (2015). DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions. *Phytoparasitica*, 43, 583-595.
- ❖ Phan, H. T. (2006). *Fusarium* species associated with tropical grasses in Australia. PhD Thesis. University of Sydney.
- ❖ Phan, H.T., Burgess, L.W., Summerell, B., Clarkson, J.R. (2004). *Gibberella gaditjirii* (*Fusarium gaditjirii*) sp. nov., a new species from tropical grasses in Australia. *Studies in Mycology*, 50, 261-272.
- ❖ Palacios, S.A., Ramirez, M.L., Cabrera Zalazar, M., Farnochi, M.C., Zappacosta, D., Chiacchiera, S.M. (2011). Occurrence of *Fusarium* spp and fumonisin in durum wheat grains. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 59, 12264-12269.
- ❖ Ramirez, M.L. (2000). Especies biológicas y grupos de compatibilidad vegetativa de *Fusarium* spp (Sección *Liseola*) y fumonisinas en maíz de la provincia de Córdoba. Tesis doctoral, UNRC.
- ❖ Rep, M., Meijer, M., Houterman, P.M., van der Does, H.C., Cornelissen, B.J.C. (2005). *Fusarium oxysporum* evades I-3-mediated resistance without altering the matching avirulence gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18, 15-23. doi: 10.1094/MPMI-18-0015.
- ❖ Reynoso, M.M. (2002). Especies biológicas dentro del complejo *Gibberella fujikuroi* aisladas de maíz en Argentina, aspectos genéticos y ecofisiológicos. (Tesis Doctoral). UNRC.
- ❖ Sangalang, A., Summerell, B., Burgess, L., Backhouse, D. (1995). Taxonomy of *Fusarium*: characterisation of *Fusarium avenacum* subsp. *aywerte* and *Fusarium avenaceum* subsp. *nurragi*. *Mycology Research*, 99, 287-290.

- ❖ Sánchez Márquez, S., Bills, G.F. and Zabalgoceazcoa, I. (2008). Diversity and structure of the fungal endophytic assemblages from two sympatric coastal grasses. *Fungal Diversity*, 33, 87-100.
- ❖ Scauflaire, J., Gourgue, M., Callebaut, A., Munaut, F. (2012) *Fusarium temperatum*, a mycotoxin-producing pathogen of maize. *European Journal of Plant Pathology*, 133, 911-922
- ❖ Stankovic, Z.S., Levic, J., Krnjaja, V.S., Bocarov-Stancic, A.S., Tancic, S.L., Kovacevic, T.M. (2007). Frequency of toxicogenic *Fusarium* species and fusariotoxins in wheat grain in Serbia. *Matica Srpska Proceedings for Nature Sciences*, 113, 93-102.
- ❖ Stępień, L., Koczyk, G., Waśkiewicz, A. (2011). Genetic and phenotypic variation of *Fusarium proliferatum* isolates from different host species. *Journal of Applied Genetics*, 52, 487-496.
- ❖ Sutton, D.A., Brandt, M.B. (2011). *Fusarium* and other opportunistic hyaline fungi. Manual of clinical microbiology, 10th edn. ASM Press, Washington, DC, pp 1853 – 1879.
- ❖ Summerell, B.A., Rugg, C.A., Burgess, L.W. (1995). Characterization of *Fusarium babinda* sp. Nov. *Mycological Research*, 99, 1345-1348.
- ❖ Summerell, B.A., Laurence, M.H., Liew, E.C.Y., Leslie, J.F. (2010). Biogeography and phulogeography of *Fusarium*: a review. *Fungal Diversity*, 44, 1-11.
- ❖ Szécsi, Á., Magyar, D., Tóth, S. and Szoke, C., (2013). *Poaceae*: A rich source of endophytic fusaria. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 48: 19-32.
- ❖ Taylor, J., Fisher, M. (2003). Fungal multilocus sequence typing - it's not just for bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 6, 351-356.
- ❖ Torres, A., Reynoso, M.M., Rojo, F., Ramírez, M.L., Chulze, S., (2001). Fungal and mycotoxin contamination in home grown maize harvested in the north area of Argentina. *Food Additives and Contaminants*, 18, 836–843.
- ❖ von Barga, S., Martinez, O., Schadock, I., Eisold, A., Gossmann, M., Buttner, C. (2009). Genetic variability of phytopathogenic *Fusarium proliferatum* associated with crown rot in *Asparagus officinalis*. *Journal of Phytopathology*, 157, 446-456.
- ❖ Waalwijk, C., Baayen R.P., de Koning, J.R.A. and Gams, W. (1996). Discordant groupings of *Fusarium* spp. from Sections *Elegans*, *Liseola* and *Dlaminia* based on ribosomal ITS1 and ITS2 sequences. *Mycologia*, 88, 361-368.
- ❖ Walsh, J., Laurence, M., Liew, E., Sangalang, A., Burgess, L., Summerell, B., Petrovic, T. (2010). *Fusarium*: two endophytic novel species from tropical grasses of northern Australia. *Fungal Diversity*, 44, 149-159.
- ❖ Waśkiewicz, A., Stępień, L., Wilman, K., Kachlicki, P. (2013). Diversity of pea-associated *F. proliferatum* and *F. verticillioides* populations revealed by *FUM1* sequence analysis and fumonisin biosynthesis. *Toxins*, 5, 488 -503.

- ❖ Zeller, K.A., Summerell, B.A., Bullock, S., Leslie, J.F. (2003). *Gibberella konza* (*Fusarium konzum*) sp. nov. from prairie grasses, a new species in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 95, 943-954.

