



Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales

***Fusarium graminearum* SENSU STRICTO Y *Fusarium poae* EN
CEBADA DESTINADA A LA INDUSTRIA CERVECERA**

**TESIS DE GRADO
LORENZO ANTONIO ROSALES CAVAGLIERI
Diciembre de 2019**

Este trabajo es presentado por el alumno Lorenzo Antonio Rosales Cavaglieri para optar al Título de Microbiólogo por la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Directora de la Tesis:

Dra. Sofía Noemí Chulze _____

Co-Directora de la Tesis:

Dra. María Laura Chiotta _____

Miembros del Jurado:

Dra. Sofía N. Chulze _____

Dr. Matias Pellegrino _____

Dr. Juan Palazzini _____

AGRADECIMIENTOS

Llegar hasta la meta no es fácil, el camino es largo y difícil. Lleno de obstáculos. Compartirlo junto a seres queridos lo hace más agradable.

A mis padres y hermanos por su apoyo, sino esto, quizás, hubiera sido diferente. Gracias, en especial, a mis padres, que siempre creyeron incondicionalmente en mí y en cada una de las decisiones que he tomado, enseñándome a ser una mejor persona.

A Belén, mi compañera incondicional que estuvo para escucharme y brindarme su cariño.

A mis amigos y amigas, que han compartido conmigo este camino tan especial.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, por permitirme realizar mis estudios y así convertirme en profesional.

Tarda en llegar, y al final hay recompensa.

ÍNDICE

Resumen	1
I. INTRODUCCIÓN	2
Características del cultivo de la cebada	3
Producción de cebada a nivel mundial y nacional	4
La contaminación de la cebada con hongos toxicogénicos	6
Género <i>Fusarium</i>	7
Especies de <i>Fusarium</i> y la fusariosis de cebada	8
<i>Fusarium graminearum</i> sensu stricto	9
<i>Fusarium poae</i>	10
Micotoxinas	12
Micotoxinas producidas por especies del género <i>Fusarium</i>	12
Tricotecenos	13
Control biológico de microorganismos	14
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	15
Hipótesis	15
Objetivos generales	15
Objetivos específicos	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS	16
Aislamiento e identificación de las especies de <i>Fusarium</i> , aisladas de cebada cervecera recolectadas de distintas regiones productoras de Argentina.	17
Identificación de las especies del complejo <i>Fusarium graminearum</i> y <i>Fusarium poae</i>	18
Caracterización de las especies del complejo <i>Fusarium graminearum</i> y <i>Fusarium poae</i> sobre la base de sus perfiles toxicogénicos	20
Incidencia natural de deoxinivalenol en granos de cebada	21
Evaluación <i>in-vitro</i> de la actividad antagonista de los potenciales agentes de biocontrol sobre las especies del complejo <i>Fusarium graminearum</i> y <i>Fusarium poae</i>	22
Análisis estadístico	23
IV. RESULTADOS	24
Especies de <i>Fusarium</i> aisladas de cebada cervecera recolectadas de distintas regiones productoras en Argentina	25
Identificación a nivel molecular de las especies del complejo	29

<i>Fusarium graminearum</i> y <i>Fusarium poae</i>	
Caracterización de las especies del complejo <i>Fusarium graminearum</i> y <i>Fusarium poae</i> sobre la base de sus perfiles toxicogénicos	30
Incidencia natural de deoxinivalenol en granos de cebada	32
Evaluación <i>in-vitro</i> de la actividad antagonista de los potenciales agentes de biocontrol sobre cepas de <i>Fusarium graminearum</i> sensu stricto y <i>Fusarium poae</i>	33
V. DISCUSIÓN	37
VI. CONCLUSIONES	44
VII. REFERENCIAS	45

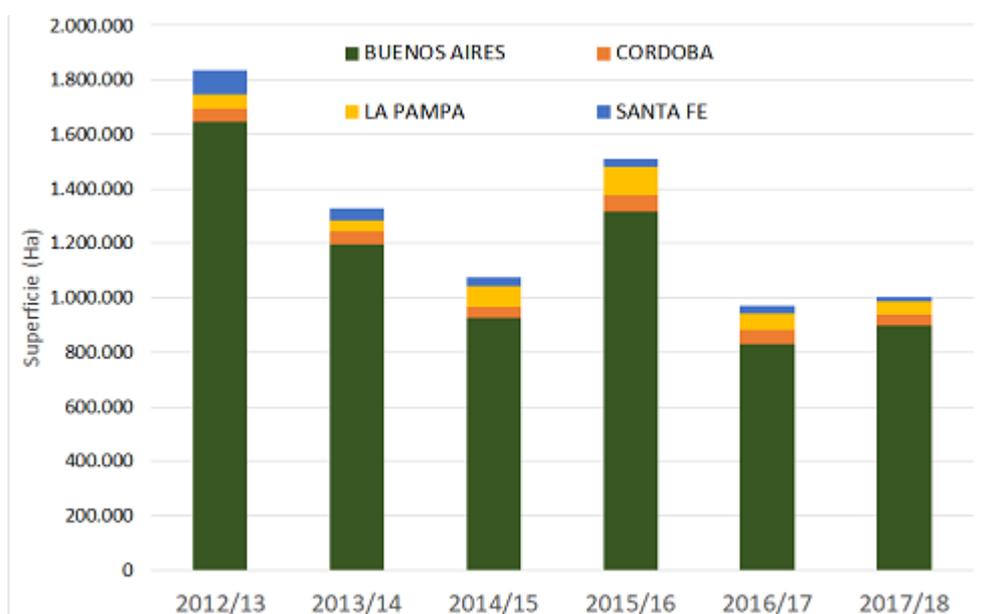
RESUMEN

La fusariosis es una de las enfermedades fúngicas más importante que afectan a la cebada y al trigo en todo el mundo. Si bien la enfermedad causa una disminución del rendimiento y la calidad de las semillas, las micotoxinas que pueden acompañar la enfermedad representan un riesgo toxicológico para la salud de los consumidores. La utilización de agentes de control biológico surge como una alternativa a los métodos tradicionales de control fúngico y/o toxicológico, que además, es una estrategia amigable con el medioambiente y favorece la salud humana. Los objetivos del presente trabajo fueron: 1) determinar la ocurrencia de las especies del complejo *Fusarium graminearum* y *Fusarium poae* en cebada cervecera en Argentina y caracterizar las cepas aisladas en base a sus perfiles toxicogénicos, 2) determinar la incidencia natural de deoxivalenol en granos de cebada y 3) evaluar *in vitro* la interacción entre diferentes cepas de *Lactobacillus plantarum* y *Bacillus* spp. contra *F. graminearum* sensu stricto y *F. poae* como estrategia de biocontrol. Los resultados obtenidos demostraron que los porcentajes de infección del género *Fusarium* fueron altos en las cuatro zonas geográficas evaluadas, Ferré, Bigand, Carcarañá y Victoria. La identificación morfológica reveló que las especies del complejo *F. graminearum* se aislaron con alta frecuencia en todas las zonas estudiadas, mientras que *F. poae* presentó una incidencia menor y fue aislado sólo en las regiones Ferré y Bigand. La variedad de cebada fue importante en la susceptibilidad fúngica, principalmente para *F. poae*. Mediante el secuenciamiento del gen del factor de elongación 1 α se demostró que la principal especie aislada del complejo *F. graminearum* fue *F. graminearum* sensu stricto y se confirmó que todas las cepas identificadas morfológicamente como *F. poae* pertenecían a dicha especie. Ambas especies se diferenciaron en cuanto a sus perfiles toxicogénicos, el 91% de las cepas de *F. graminearum* sensu stricto produjeron de forma simultánea tricotecenos del grupo B, con niveles de producción altos de deoxivalenol; mientras que, el 100% de las cepas de *F. poae* produjeron nivalenol en niveles altos. La incidencia natural de DON en cebada cervecera en las zonas de estudio demostró que, en las muestras analizadas se detectó DON en bajos niveles. Los resultados de las interacciones *in vitro* demostraron una dominancia a distancia (I_d 5/0) entre *B. velezensis* RC218 con todas las cepas de *F. graminearum* sensu stricto y *F. poae*. En las interacciones entre *B. subtilis* subsp. *inoquosorum* con *F. graminearum* y *F. poae* se observó dominancia por contacto (I_d 4/0) y, en las interacciones entre las cepas *L. plantarum* Fpav, LpW con ambas cepas de *F. graminearum* y entre la cepa *L. plantarum* Fpav y *F. poae* FRC42 se observó dominancia por contacto. En base a los resultados obtenidos se puede concluir que la presencia de las principales especies fúngicas causantes de la fusariosis de cebada, *F. graminearum* sensu stricto y *F. poae* y sus perfiles toxigénicos podrían representar un riesgo de contaminación de los granos de cebada destinados a la industria cervecera. El uso de cepas de *B. velezensis*, *Bacillus* spp. y *L. plantarum* como agentes de biocontrol constituyen una estrategia promisoras para inhibir el crecimiento de *F. graminearum* sensu stricto y *F. poae* en cebada.

INTRODUCCIÓN

Características del cultivo de cebada

La cebada (*Hordeum vulgare L.*) es una planta anual monocotiledónea perteneciente a la familia de las poáceas y constituye uno de los principales cereales en Argentina estratégicamente importante para la sustentabilidad del sistema agrícola. La mayor parte del cultivo de cebada se concentra en la región pampeana, siendo Buenos Aires la principal provincia productora, seguida de La Pampa, Santa Fe y Córdoba (Figura 1) (<https://www.bcr.com.ar/es/mercados/investigacion-y-desarrollo/informativo-semanal/noticias-informativo-semanal/como-se>).



Para el cultivo de cebada se utiliza la especie *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*. Esta especie puede ser empleada con diferentes propósitos donde, para la elaboración de cerveza, se utilizan mayormente las variedades de cebada con espigas de dos hileras (Figura 2), denominadas comúnmente cebadas cerveceras. En la producción de forraje para la alimentación animal, se utilizan mayormente las variedades de cebada con espigas de seis hileras (Figura 2), llamadas comúnmente cebadas forrajeras. La cebada de dos hileras también es denominada como *Hordeum distichum*, mientras que la cebada de seis hileras como *Hordeum hexastichon*, los cuales son sinónimos utilizados normalmente para referirse a ellas (https://www.agroindustria.gov.ar/sitio/areas/ss_mercados_agropecuarios/informes/perfil-de-cebada-2019.pdf).

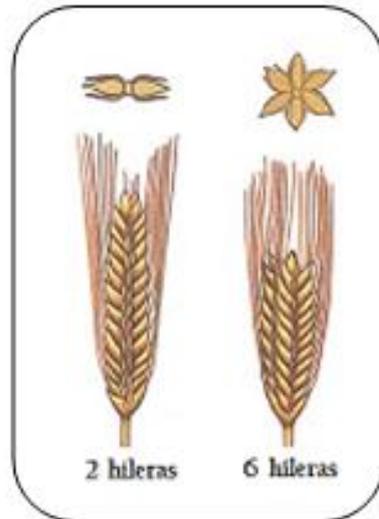


Figura 2. Tipos de espigas o “hileras” de cebada

La industria cervecera requiere de cebada con un porcentaje elevado de granos grandes (calibre alto), un porcentaje de germinación superior al 98 % y un porcentaje de proteína que puede oscilar entre 10 y 11%, con una tolerancia de hasta un 12% (<http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Publicaciones/revistas/nota.php?id=119>). El contenido de proteínas superior al 12% da como resultado un mayor contenido de proteínas solubles en el mosto, lo que hace que la cerveza presente sabores indeseables. Por otro lado, un contenido de proteína más bajo generalmente se correlaciona con niveles bajos de carbohidratos y valores de extracto más bajos. Esto causa efectos adversos en la fermentación, debido al contenido bajo de aminoácidos disponible para la nutrición de la levadura. Cantidades de glucanos bajas (<4%) se consideran útiles en la elaboración de cerveza, ya que estabilizan la espuma de cerveza y mejoran las propiedades organolépticas de la bebida, pero en cantidades más altas causan problemas durante el malteado y la elaboración de la misma (Havlova y col., 2006; Krstanović y col., 2016).

Producción de cebada a nivel mundial y nacional

En la última década la cebada se ha convertido en el quinto cereal más cultivado en el mundo. Actualmente, entre los productores más importantes del mercado se encuentran la Unión Europea, Rusia, Canadá, Australia, Ucrania, Turquía, y Kazajstán (Tabla 1). En el ámbito global el principal destino del grano de cebada ha sido para el forraje y en un lugar secundario la industria alimenticia. En cambio, en Argentina, el producto está asociado en su mayor proporción a la industria cervecera, debido al aumento de la demanda de malta. Las variedades utilizadas en la industria

cervecera para la producción de malta son varias: Shakira, Scarlett, Andreia, Danielle, MP1012, entre otras. Tanto Andreia como Shakira son las que conforman casi la totalidad del cultivo de cebada en Argentina. La variedad Andreia es actualmente la dominante en la zona de cultivo desde el año 2014, ocupando el 80% del total de siembra(https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/ss_mercados_agropecuarios/informes/perfil-de- cebada-2019.pdf).

Tabla 1. Producción mundial de cebada cervecera.

	2014/15	2015/16	2016/17	2017/18	2018/19*
<i>Unión Europea</i>	60.609	62.095	59.978	59.064	57.250
<i>Rusia</i>	20.026	17.083	17.547	20.183	16.500
<i>Canadá</i>	7.117	8.257	8.839	7.900	8.800
<i>Australia</i>	8.646	8.993	13.506	8.900	7.800
<i>Ucrania</i>	9.450	8.751	9.874	8.695	7.600
<i>Turquía</i>	4.000	7.400	4.750	6.400	7.400
<i>Kazajistán</i>	2.412	2.675	3.231	3.305	4.200
Argentina	2.900	4.940	3.300	3.740	4000
<i>EE.UU</i>	3.953	4.750	4.353	3.090	3.333
<i>Irán</i>	3.200	3.200	3.000	3.100	3.100
<i>Marruecos</i>	1.638	3.400	620	2.000	2.500
<i>Etiopía</i>	1.953	2.047	2.025	2.100	2.170
<i>China</i>	1.810	1.870	1.752	1.800	1.850
<i>India</i>	1.831	1.613	1.440	1.750	1.770
<i>Bielorrusia</i>	1.988	1.849	1.253	1.420	1.700
<i>Argelia</i>	1.300	1.300	1.000	968	1.400
<i>Otros</i>	9.151	9.552	10.699	9.856	9.881
Total Mundial	141.984	149.775	147.167	144.271	141.254

Argentina la producción de cebada alcanzó casi 4 millones de toneladas en las campañas 2018/2019. El total exportado supera los 2 millones de toneladas, mientras que el año pasado apenas alcanzaba las 676 mil toneladas. La cebada forrajera para exportación cambió significativamente desde 163,5 mil toneladas en 2017/2018 a más de un millón de toneladas en la campaña 2018/2019. La industria adquirió cerca de 500 mil toneladas más de cebada cervecera respecto al ciclo previo, lo que significó un aumento considerablemente alto. Por otra parte, se destaca que Argentina es el principal proveedor de malta de América del Sur, siendo Brasil el principal lugar de destino. Las compras de cebada cervecera para exportación (producción de malta)

son levemente superiores a la campaña 2017/2018 (Figura 3) (<https://www.bcr.com.ar/es/mercados/investigacion-y-desarrollo/informativo-semanal/noticias-informativo-semanal/como-se-0>).

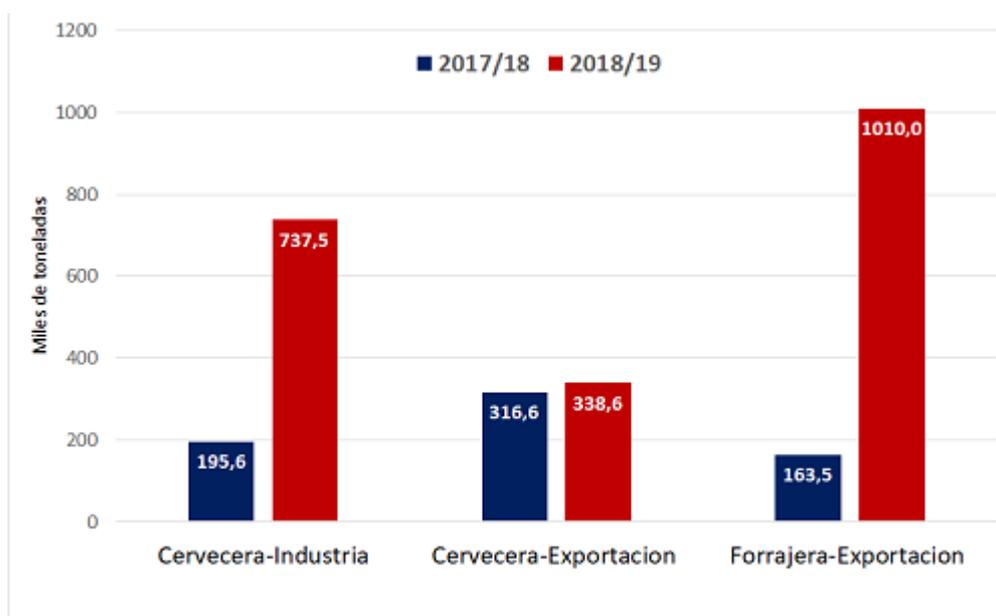


Figura 3. Destino de la cosecha de cebada.

La producción de cebada durante la campaña 2018/2019 tuvo rendimientos altos, buena calidad y precios altos. Sin embargo, en varias operaciones en la provincia sureste de Buenos Aires, heladas tardías y exceso de lluvia durante la floración y cosecha produjo cebada de menor calidad que se comercializa para piensos (a precios más bajos) debido a la presencia de micotoxinas (https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/ss_mercados_agropecuarios/informes/per-fil-de-cebada-2019.pdf).

La contaminación de la cebada con hongos toxicogénicos

La calidad del grano de cebada para la producción de malta y la elaboración de la cerveza podría verse dañada por varios microorganismos fúngicos (Laitila y col., 2007). Las especies fúngicas que colonizan los granos de cebada se encuentran incluidas principalmente en los géneros *Alternaria*, *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium* (Beccari y col., 2017; y col., Medina y col., 2006). Diversas especies pertenecientes a estos géneros pueden colonizar y deteriorar los granos de cebada, además de sintetizar micotoxinas (Ferrigo y col., 2016), produciendo una repercusión negativa en la calidad de la malta y la elaboración de la cerveza (Inoue y col., 2013; Oliveira y col., 2013; Rodríguez Carrasco y col., 2015; Wolf-Hall, 2007).

Entre los géneros de hongos típicos que colonizan comúnmente los granos de cebada, el género *Fusarium* se considera la principal amenaza para la obtención de malta y cerveza cualitativamente buenas, pudiendo infectar durante la fase de cultivo, el almacenamiento, el malteado y la elaboración de cerveza, pudiendo biosintetizar una amplia gama de micotoxinas y generando un deterioro de la calidad (Beccari y col., 2017).

Los síntomas producidos por la infección de *Fusarium* se hacen evidentes durante el proceso de malteado, particularmente durante las fases de remojo y germinación, donde se desarrolla el micelio blanco y aéreo, evitando así la germinación del grano, el cual adquiere un color púrpura intenso (Niessen y col., 1991).

Según Sarlin y col., (2005) y Schwarz y col., (2001), las infecciones producidas por los hongos del género *Fusarium* pueden causar una reducción en el peso del grano, un aumento en el contenido de humedad, una prolongación del tiempo de sacarificación y la velocidad de filtración y un aumento en el contenido total de proteína soluble y el contenido total de nitrógeno. El color del mosto, el color después del tostado, la viscosidad, el nitrógeno básico volátil y el valor del pH también son susceptibles a cambio.

La infección por *Fusarium* también afecta otros parámetros de calidad de la malta: menor peso del grano y capacidad germinativa, disminución del rendimiento, degradación de las proteínas y el almidón, etc. (Schwarz y col., 2001; Vaughan y col., 2005).

Género *Fusarium*

Las especies del género *Fusarium* se ubican en el phylum Ascomycota, familia Nectriaceae, orden Hypocreales y clase Sordariomycetes (Aoki y col., 2014). Fue descrito por primera vez por Link en 1809 y desde entonces, se han realizado varios cambios en su taxonomía. Los miembros de este género pueden producir enfermedades en plantas, humanos y animales domésticos. Son conocidos patógenos del suelo, pero en algunos casos, pueden ser dispersados por el viento y la lluvia a otros ecosistemas (citas). Además, *Fusarium* spp. producen una gran variedad de metabolitos secundarios que están asociados con enfermedades de las plantas (Fuente Leslie y Summerell, 2006).

Antes de 1997 la taxonomía y la sistemática de *Fusarium* spp. se basaban exclusivamente en caracteres fenotípicos, observados en aislados en medios de

cultivo, obtenidos de plantas enfermas, animales, incluidos los humanos y diversos sustratos como el suelo y el agua, además de la identificación de especies biológicas (Aoki y col., 2014). Con el posterior desarrollo de las técnicas moleculares, comenzó el avance en la identificación filogenética, modificando así la sistemática de *Fusarium* spp. que era utilizada hasta el momento, siendo remplazada por complejos de especies, distinguiéndose así, entre otros, cuatro complejos de especies de *Fusarium* fitopatógenos:

- Complejo *F. fujikuroi*: inducen la enfermedad de Bakanae del arroz, la pudrición del maíz y el chancro de pino. También contaminan el maíz y otros cereales con micotoxinas.
- Complejo *F. oxysporum*: agentes causales de la marchitez vascular, marchitamiento fúngico y pudrición de la corona y la raíz de una amplia gama de huéspedes.
- Complejo *F. solani*: ampliamente reportado como un patógeno en vegetales, frutas y flores.
- Complejo *F. graminearum*: estas especies son los agentes causales de la fusariosis de la espiga de cebada (FC) (Aoki y col., 2014).

Especies de *Fusarium* y la fusariosis de cebada

Diferentes especies de *Fusarium* son los agentes causales de la FC y, al mismo tiempo, potenciales fuentes de contaminación de micotoxinas en los granos de cebada (Figura 4). Esta es una enfermedad compleja causada por al menos 17 especies de *Fusarium*, siendo *F. graminearum* sensu stricto, *F. poae*, *F. avenaceum* y *F. culmorum* los principales agentes de FC (Xu y col., 2008). Otras especies, tales como *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae*, *F. tricinctum*, *F. acuminatum* y miembros del complejo de especies *F. incarnatum equiseti* (FIESC) pueden estar presentes con incidencia baja, sin embargo, se considera que la composición del complejo FC varía como consecuencia de factores climáticos como la temperatura y la humedad durante la antesis (Beccari y col., 2017; Ferrigo y col., 2016; Xu y col., 2008), así como por cultivos previos (Schöneberg y col., 2016).

Por estas razones, la contaminación por micotoxinas de granos cultivados durante una temporada específica y en un área geográfica particular es la consecuencia de la composición de la comunidad de *Fusarium* spp. (Vogelgsang y col., 2017). De hecho, cada especie de *Fusarium* posee un perfil micotoxigénico específico, incluso si se detectaron diferencias en la capacidad de biosintetizar metabolitos secundarios entre diferentes cepas de la misma especie (Ferrigo y col., 2016).



Figura 4. Infección de cebada por *Fusarium* spp. A-Síntomas de infección por FC. B-Blanqueamiento de la espiga (izquierda) C- Semillas sanas. D- Semillas infectadas.

***Fusarium graminearum* sensu stricto**

Fusarium graminearum sensu stricto se encuentra dentro del complejo de especies *Fusarium graminearum* (CEFG) siendo uno de los agentes causales de la FC (Aoki y col., 2014). Es uno de los principales agentes causales de la fusariosis de la cebada debido a que puede producir la contaminación de cereales con micotoxinas tales como el deoxinivalenol (DON), el nivalenol (NIV) (Windels y col., 2000), además de análogos del estrógeno como la zearalenona (ZEA) y derivados (Placinta y col., 1999).

Para la identificación a nivel de especies morfológicas del complejo *F. graminearum* se utilizan los medios de cultivo agar hojas de clavel (AHC) y agar papa glucosado (APG). Las características microscópicas se definen en el medio AHC, ya que este medio favorece la esporulación para la formación de conidios y conidióforos en abundancia (Figura 5). Las características macroscópicas se observan en el medio APG (Leslie y Summerell, 2006).

Características sobre APG:

- Micelio denso que varían de blanco a naranja pálido a amarillo.
- Escasos esporodocios que varían del rojo-marrón al anaranjado (> 30 días).
- Pigmentos rojos en el medio de cultivo.

Características sobre AHC:

- Macroconidios relativamente delgados, con forma de hoz a casi rectos, de paredes gruesas, con una célula apical cónica y una célula basal claramente en forma de pie.
- Microconidios ausentes.
- La formación de clamidosporas es variable, y con frecuencia se forman en los macroconidios.
- El hongo es homotálicos y los peritecios se pueden formar sin la necesidad de cruzar cepas.

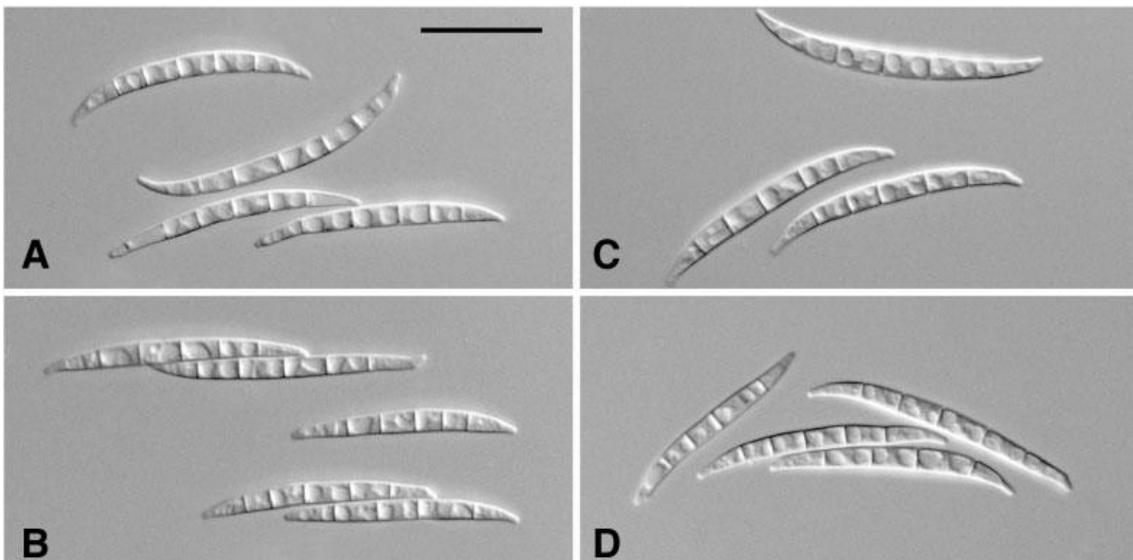


Figura 5. *Fusarium graminearum*. Macroconidios A-D. Barra de escala: 25 μm (Fuente Leslie y Summerell, 2006).

Fusarium poae

Fusarium poae, junto con las especies del complejo *F. graminearum*, es uno de los agentes causales de la FC más frecuentemente aislados (Aoki y col., 2014). Los principales tricotecenos producidos por *Fusarium poae* son diacetoxiscirpenol (DAS), monoacetoxiscirpenol (MAS), scirpentriol (SCR), nivalenol (NIV) y fusarenona-X (FX) (Thrane y col., 2004).

Para la identificación a nivel de especies morfológicas de *F. poae* se utilizan los medios de cultivo AHC y APG (Figura 6) (Leslie y Summerell, 2006).

Características sobre APG:

- Micelio aéreo abundante, con apariencia “peluda” o de “fieltro”, que cambia a un aspecto “polverulento” a medida que se forman los microconidios.
- Inicialmente, el color del micelio es de color pálido, oscureciéndose hacia un color marrón rojizo con el tiempo.
- Producción de pigmentos rojizos y amarillentos en el medio.
- Producción de compuestos volátiles que le confieren un olor característico dulce

Características sobre AHC:

- La producción de macroconidios es rara, salvo que se lo exponga a radiación ultravioleta.
- Son relativamente cortos, con forma de hoz y 3 septos, con una célula apical curva y estrecha y una célula basal en forma de pie.
- Abundante producción de microconidios en monofiálides, son no septados, de forma globosa a napiforme
- Conidióforos cortos y ramificados, con apariencia de “racimo de uvas”.
- Rara producción de clamidiosporas

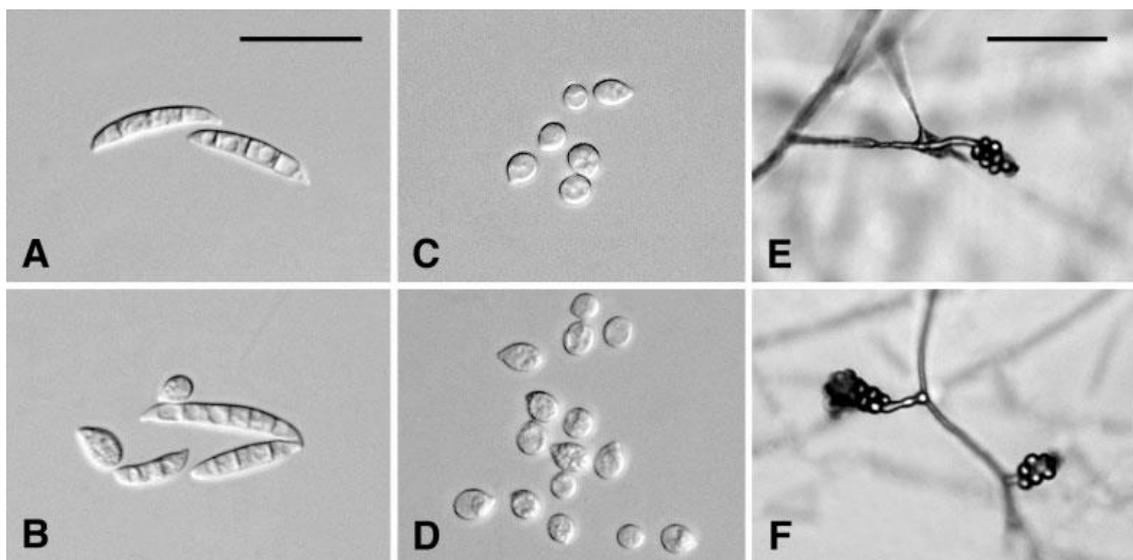


Figura 6. *Fusarium poae*. A-B: Macroconidios; C – D: Microconidios; E-F: Microconidios *in situ*; A-D, barra de escala = 25 μ m; E-F, barra de escala = 50 μ m (Fuente Leslie y Summerell, 2006)

Micotoxinas

Las micotoxinas son sustancias producidas por especies de hongos filamentosos microscópicos que son tóxicas para los mamíferos. Se clasifican como metabolitos secundarios, porque no se consideran esenciales para el crecimiento y reproducción de los hongos que las producen. Los metabolitos secundarios tienen funciones importantes, como ayudar a la invasión del tejido vegetal, como sistema de defensa o competencia contra hongos y otros microorganismos (Fletcher y col., 2018).

Las micotoxinas son producidas por muchos géneros fúngicos, principalmente *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium* y *Claviceps*. Los grupos de micotoxinas más relevantes en los alimentos son: aflatoxinas, producidas por *Aspergillus*; ocratoxinas A, producida tanto por *Aspergillus* como por *Penicillium*; tricotecenos (tipo A: toxina HT-2 y T-2, y tipo B: deoxinivalenol, nivalenol), zearalenona, fumonisinas B1 y B2, y micotoxinas emergentes como fusaproliferina, moniliformina, beauvericina y eniatinas producidas principalmente por especies de *Fusarium*; los alcaloides, producidos por *Claviceps*; y altenueno, alternariol, alternariol mono metil éter, altertoxina y ácido tenuazónico producidos por especies de *Alternaria* (Barkai-Golan y col., 2008; Bottalico y col., 1998).

Se han establecido los niveles máximos y recomendados para ciertas micotoxinas en los alimentos en la Unión Europea (UE) (Commission European, 2013), incluidas las materias primas tradicionales. Además, aún no se han legislado otras micotoxinas, así como muchos otros metabolitos secundarios fúngicos con un impacto aún incierto en la salud del consumidor final.

Micotoxinas producidas por especies del género *Fusarium*

Las micotoxinas producidas por especies del género *Fusarium* son las toxinas más importantes desde el punto de vista económico (Moretti y col., 2017). Las fumonisinas, las zearalenonas y los tricotecenos (toxina T-2, toxina HT-2, deoxinivalenol, nivalenol, etc.) son las principales micotoxinas estudiadas de *Fusarium* (Munkvold, 2017). Dichas toxinas contaminan los granos de cereales, los alimentos para animales y alimentos para humanos, no sólo causando enormes pérdidas económicas, sino que también representan una amenaza para la salud animal y humana a nivel mundial (Moretti y col., 2017).

Tricotecenos

Los tricotecenos son las micotoxinas más importantes, desde el punto de vista económico, producidas por las especies de *Fusarium*. Se han asociado con mayor frecuencia a toxicosis en humanos y problemas en la salud del ganado. Son sesquiterpenos, recibiendo su nombre por poseer un esqueleto tetracíclico, 12,13-epoxitricotec-9-eno que puede ser sustituido químicamente en varias posiciones (Figura 7). Hay más de 200 tricotecenos, clasificados en cuatro grupos (tipos A, B, C y D) según las sustituciones en C-8 y otras posiciones alrededor de la estructura central (Munkvold y col., 2017).

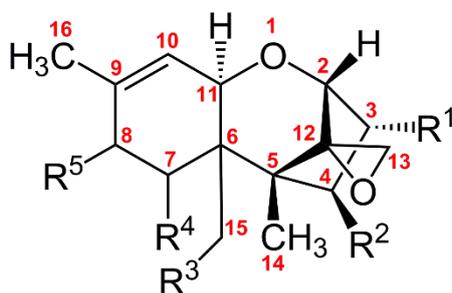


Figura 7. Estructura química de un tricoteceno

Los tricotecenos producidos por las especies de *Fusarium* pueden ser tipo A, que tienen un hidróxilo o éster o sin sustitución de oxígeno en C-8; o tipo B, que tienen un grupo ceto (carbonilo) en C-8. Los tricotecenos de tipo A más importantes producidos por *Fusarium* spp. incluyen diacetoxiscirpenol (DAS), HT-2, T-2 y neosolaniol (NEO), mientras que los de tipo B incluyen al deoxinivalenol (DON), nivalenol, (NIV) y sus derivados acetilados. El DON y el NIV se han asociado con rechazo de piensos, vómitos y funciones inmunitarias suprimidas, pero NIV tiene una mayor toxicidad para los seres humanos y los animales domésticos que DON (Pestka, 2010). Además, estas micotoxinas son actualmente fitotoxinas y funcionan como factores de virulencia en algunos cereales (Jansen y col., 2005). La toxicidad de estos compuestos está dada por varios mecanismos, entre ellos la inhibición de síntesis de proteínas ribosomales, la inhibición en la biosíntesis de AND y ARN, y afectando la función mitocondrial (Rocha y col., 2005).

Control biológico de microorganismos

El control biológico se define como una estrategia “amigable con el medio ambiente” que utiliza microorganismos vivos o sus derivados para reducir o controlar el desarrollo de un patógeno específico (Legrand y col., 2017). Los agentes de control biológico (ACB) actúan mediante diferentes estrategias antagónicas, dependiendo del patógeno, el huésped y el medioambiente. No existe un solo modo de acción (Di Francesco y col., 2016).

Como se mencionó anteriormente, la fusariosis de la cebada es una enfermedad que causa pérdidas de rendimiento, disminución de la calidad del grano y germinación de las semillas. Otra consecuencia de la FC es la producción de micotoxinas (Legrand y col., 2017). El control tradicional de FC incluye: utilización de cultivos resistentes, tratamientos con fungicidas, rotación de cultivos y manejo de residuos de cultivos mediante prácticas de labranza (Maiorano y col., 2008; Pérez y col., 2008; Wegulo y col., 2013). Sin embargo, la eficacia de estos métodos es altamente variable (Anand y col., 2003; Pérez y col., 2008), por lo que el uso de ACB surge como una alternativa a los métodos tradicionales de control y como una forma de reducir el impacto negativo de estas prácticas en el medioambiente y en la salud humana.

Ensayos realizados a campo han demostrado la reducción en la incidencia y en la severidad de la FC utilizando cepas bacterianas, que incluyen: *Bacillus* spp. (Khan y col., 2001; Palazzini y col., 2007; Schisler y col., 2002) *Pseudomonas* spp. (Schisler y col., 2006; Wang y col., 2015), *Streptomyces* spp. (Palazzini y col., 2007, 2017) y *Lactobacillus plantarum* (Baffoni, y col., 2015).

HIPÓTESIS

Entre las principales especies fúngicas causantes de la fusariosis de la espiga de cebada se encuentran *Fusarium graminearum* sensu stricto y *Fusarium poae*. La incidencia de ambas especies y sus perfiles toxicogénicos influyen sobre la contaminación de los granos de cebada destinados a la industria cervecera. El uso de *Lactobacillus plantarum* y especies de *Bacillus* como agentes de biocontrol es una estrategia promisor para inhibir el crecimiento de *Fusarium graminearum* sensu stricto y *Fusarium poae* en cebada.

OBJETIVOS GENERALES

- Determinar la ocurrencia de las especies del complejo *Fusarium graminearum* y *Fusarium poae* en cebada cervecera en Argentina y establecer la influencia de sus perfiles toxicogénicos sobre la contaminación de los granos.

- Evaluar la interacción entre diferentes cepas de *Lactobacillus plantarum* y *Bacillus* spp. contra *Fusarium graminearum* sensu stricto y *Fusarium poae* como estrategia de biocontrol.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la distribución de las especies del complejo *Fusarium graminearum* y *Fusarium poae* aisladas de diferentes variedades de cebada cerveceras recolectadas de distintas regiones productoras de Argentina.

- Caracterizar las especies *Fusarium graminearum* y *Fusarium poae* sobre la base de sus perfiles toxicogénicos.

- Determinar la incidencia natural de deoxinivalenol en granos de cebada.

- Evaluar el efecto *in-vitro* de diferentes agentes de biocontrol sobre el crecimiento de *Fusarium graminearum* sensu stricto y *Fusarium poae* en un medio a base de cebada.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Aislamiento e identificación de las especies de *Fusarium*, aisladas de cebada cervecera recolectadas de distintas regiones productoras de Argentina.

1.1 Muestreo

Se analizaron 56 muestras de granos de cebada de diferentes variedades (n=8) que comúnmente son utilizadas para el proceso de elaboración de la cerveza: MP1012, Danielle, Montoya, Andreia, Shakira, Voyager y MP2122. Las mismas fueron recolectadas de distintas áreas de producción de Argentina: Ferret (Buenos Aires), Carcarañá (Santa Fe), Bigand (Santa Fe) y Victoria (Entre Ríos), durante las campañas 2016 y 2017. Se analizaron 7 muestras de cada zona por año. Para el muestreo se eligieron 10 puntos a lo largo de las dos diagonales de cada lote, de cada punto se tomaron granos de tres plantas en el estadio de cosecha y se transportaron en bolsas de papel para realizar el aislamiento de las especies de *Fusarium* dentro de las 24 h.

1.2 Aislamiento de las especies de *Fusarium*

El aislamiento de las especies de *Fusarium* se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Leslie y Summerell (2006). Se tomaron 50 semillas de cada muestra de cebada al azar, las cuales fueron desinfectadas sumergiéndolas en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 1% durante 1 minuto, seguido por dos lavados con agua estéril. Las semillas desinfectadas fueron colocadas con una pinza estéril en placas con el medio de cultivo agar peptona pentacloronitrobenceno (PCNB) (Nelson y col., 1983) e incubadas durante 7 días con ciclos alternativos de luz blanca/oscuridad de 12 h a 25°C. De las 50 semillas analizadas por muestra, se calculó el porcentaje de infección teniendo en cuenta el desarrollo de micelio característico de *Fusarium*. El porcentaje de infección de las semillas colocadas en las placas, teniendo en cuenta la siguiente relación:

$$\frac{\text{Número de semillas infectadas}}{\text{Número total de semillas}}$$

2. Identificación de las especies del complejo *Fusarium graminearum* y *Fusarium poae*.

2.1 Identificación morfológica

Para la identificación de las especies del complejo *F. graminearum* y *F. poae* se seleccionaron al azar 3 colonias de *Fusarium* desarrolladas en cada placa (n=10 semillas sembradas por placa) con medio PCNB y se subcultivaron en el medio Agar Nutritivo Sintético (SNA). Cultivos monospóricos se desarrollaron a partir de las cepas crecidas sobre SNA, para lo cual raspando la superficie del micelio se transfirieron una pequeña cantidad de propágulos fúngicos en 10 ml de agua destilada estéril. La suspensión homogeneizada se transfirió a una placa de Petri con Agar Agua (AA), se diseminó por rotación durante un minuto y luego se descartó. Las placas fueron incubadas inclinadas de 16 a 18 h a temperatura ambiente para permitir la germinación de las esporas que quedaron retenidas sobre el medio de cultivo. Utilizando una lupa (40X) se seleccionó un conidio germinado, se cortó el taco de agar conteniendo el conidio, se transfirió al medio agar hojas de clavel (AHC) y se incubó durante 10 días con ciclos alternativos de luz blanca/oscuridad de 12 h a 25°C.

La identificación se basó en la observación de las características macro y microscópicas siguiendo la metodología propuesta por Leslie y Summerell (2006). Para confirmar que las cepas pertenecían a las especies del complejo *F. graminearum*, se sembraron en Agar Zanahoria (AZ) y se incubaron con ciclos alternativos de luz blanca/oscuridad de 12 h a 25°C hasta observar la formación de peritecios.

2.2 Identificación molecular

2.2.1 Cepas

De las 572 cepas aisladas, se seleccionaron 11 cepas pertenecientes a las especies del complejo *F. graminearum* y el total de cepas pertenecientes a *Fusarium poae* (n=38) para su identificación a nivel de especie mediante el secuenciamiento de la secuencia parcial del factor de elongación 1 α (TEF-1 α), utilizando los cebadores descritos por O'Donnell y col. (2000, 2004).

2.2.2 Producción de la biomasa fúngica

Para la producción de biomasa fúngica se realizó una suspensión de esporas de cada monospórico desarrollado en SNA y se transfirió a frascos Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio completo (MC) (Leslie y Summerell, 2016). Las cepas se

incubaron a 25°C durante 2 a 3 días en un agitador rotatorio (150 rpm) y el micelio se cosechó por filtración, se lavó con agua destilada estéril y se secó entre papel absorbente. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta el momento de realizar la extracción del ADN.

2.2.3 Extracción y purificación de ADN genómico

El ADN se extrajo con buffer CTAB siguiendo la metodología propuesta por Murray y Tompson (1980), modificada por Kéryenyi y col. (1999). Al micelio congelado (aproximadamente 1,5 a 2 gr) se le adicionó 700 µL de buffer CTAB al 2% (65°C) (2% CTAB, 100 mM Tris-ClH [pH 8], 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl) y 15 µL de 2-mercaptoetanol y se incubó a 65°C durante 30 min. Posteriormente, se agregaron 300-400 µL de una solución de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1, v/v), se agitó la mezcla durante 2 a 3 min. en agitador Vortex y se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 min. Se tomaron 600 µL de la fase acuosa y los ácidos nucleicos crudos se precipitaron con un volumen igual de isopropanol. El "pellet" se disolvió en 350 µL de buffer TE 1x (10 mM Tris-HCl [pH 7,4], 1 mM EDTA) y se agregó un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v) y se centrifugó la mezcla a 12.000 rpm durante 5 min. La fase acuosa (aproximadamente 500 µL) se trató con 1,5 µL de ARNsa A (2 mg/mL) e incubó a 37°C durante 30 min. Los ácidos nucleicos se precipitaron con 500 µL de isopropanol. El "pellet" se lavó 2 ó 3 veces con 1 mL de etanol frío al 70% (v/v), se secó a temperatura ambiente durante 2 ó 3 min. y se resuspendió en 50 µL de buffer TE 1x para ser conservado a -20°C hasta su posterior análisis.

El ADN genómico se cuantificó por comparación visual usando ADN del bacteriófago λ digerido con *HindIII* como ADN testigo. Las muestras se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en buffer TAE 1x (40 mM Tris-base [pH 8], 0,5 mM EDTA; ácido acético glacial) a 60 Volt conteniendo bromuro de etidio (5 µg/mL). Se realizaron las diluciones correspondientes de cada muestra en agua bidestilada calidad biología molecular hasta obtener concentraciones de 100 ng para su posterior análisis.

2.2.4 Generación de las secuencias

Para la amplificación de la secuencia parcial del factor de elongación 1 α de las cepas de *Fusarium graminearum* y *Fusarium poae*, se utilizaron los cebadores E1/E2 y 82F/R, respectivamente (O'Donnell y col., 2000, 2004; Vanheule y col., 2017). Cada reacción de PCR consistió en una mezcla conteniendo entre 20-30 ng de ADN genómico, 100 mM de dNTPs (25 mM de c/u, A, C, G, T), Buffer *Taq* 10x, 100 nM de

cada cebador (“forward” y “reverse”), 5 U/ml de U *Taq* ADN polimerasa y 50 mM de MgCl₂. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador 1060 PTC-200 (MJ Research Inc., Watertown, MA, USA). La reacción de PCR consistió en: un paso de desnaturalización inicial de 95°C durante 2 min; 35 ciclos de 95°C durante 30 s, 56°C y 62°C (para *F. graminearum* y *F. poae*, respectivamente) durante 30 s, 72°C durante 45 s; extensión final de 72°C por 2 min. Se incluyó un control negativo que incluía todos los reactivos y cebadores, excepto ADN, que fue reemplazado por agua bidestilada. Las amplificaciones fueron confirmadas mediante electroforesis en gel de agarosa. Los productos de PCR se purificaron utilizando el Kit Wizard® SV Gel and a PCR Clean-Up System (Promega, WI, USA). El secuenciamiento de Sanger se realizó en el Instituto Wageningen Plant Research, Wageningen, Holanda.

3. Caracterización de las especies del complejo *Fusarium graminearum* y *Fusarium poae* sobre la base de sus perfiles toxicogénicos.

3.1 Capacidad toxicogénica

Para la producción de tricotecenos de tipo A, las cepas se cultivaron en un Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 25 g de arroz grano largo, previamente esterilizado dos veces consecutivas en autoclave a 115°C durante 20 min. Luego del primer proceso de esterilización, se adicionaron 10 mL de agua destilada para alcanzar un 40% de humedad. Una vez estériles, los granos de arroz se inocularon con un taco de agar de 5 mm de diámetro proveniente del margen de una colonia cultivada en SNA durante 7 días a 25°C. Los Erlenmeyer se incubaron en oscuridad durante 28 días a 25°C y se agitaron a mano diariamente durante la primera semana de incubación. Luego, cada muestra se secó a 50°C durante 24 horas, se molió y finalmente se almacenó a -20°C hasta su posterior análisis.

Para la extracción de toxina, se siguió la metodología propuesta por Sulyok y col. (2007), con algunas modificaciones. Un gramo de cada muestra molida se mezcló con con 4 mL de acetonitrilo/agua/ácido acético (79:20:1, v/v/v), en agitador rotatorio durante 2 horas. Después de la extracción, las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 2 min y el sobrenadante fue transferido a viales color caramelo de 4 mL para ser evaporado a sequedad bajo N₂.

3.1 Detección y cuantificación de deoxinivalenol y nivalenol

La detección y cuantificación se realizó utilizando un espectrómetro de masa QTrap 4000 (Applied Biosystems, Foster City, CA) equipado con una fuente de ionización por electro aspersion Turbo-Ion-Spray (LC/ESI-MS/MS) de acuerdo a Malachová y col., (2014). La detección y cuantificación fue realizada en University of Applied Sciences Wiener, Neustadt (Tulln, Austria).

4. Incidencia natural de deoxinivalenol en granos de cebada

4.1 Análisis de DON

Para determinar la incidencia natural de DON, se analizaron 37 muestras (Andreia n=6, Shakira n=4, Voyager n=5, Montoya n=5, Danielle n=7, MP1012 n=5 y MP2122 n=5) de granos de cebada, las cuales fueron previamente analizadas para determinar los porcentajes de infección de las especies de *Fusarium*. La contaminación con DON en granos de cebada se evaluó siguiendo la metodología propuesta por Barros y col. (2008). Para la extracción de las toxinas, cada muestra fue molida, cuarteada y 25 g se homogeneizaron con 100 mL de la mezcla acetonitrilo:agua (84:16, v/v) por agitación durante 30 min. El extracto obtenido se filtró a través de un filtro de papel Whatman N°4 y 5 mL del filtrado se pasó a través de una columna de limpieza Mycosep™ 225 (Romer Labs. Inc., Union, MO). Dos mililitros del extracto se recuperaron y evaporaron bajo flujo de nitrógeno gaseoso en un bloque de calor (Thermoscientific, Rockford, IL, USA). Una vez evaporado a sequedad, el extracto seco fue conservado a 4°C hasta el momento del análisis por HPLC (Waters, Milford, MA, USA).

4.2 Detección y cuantificación

La detección y cuantificación de las toxinas a partir de los extractos secos se realizó utilizando cromatografía de alta performance (HPLC), en cromatógrafo Waters 2695. Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo utilizando una columna de fase reversa C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm de tamaño de partícula; Phenomenex, Luna), conectada a una pre-columna Supelguard LC-ABZ (20 x 4,6 mm, 5 µm de tamaño de partícula, Supelco). Para la detección de absorbancia de DON y NIN fue utilizado el módulo Waters 2487. El volumen de inyección utilizado fue de 50 µL. Como fase móvil se utilizó una mezcla de agua:metanol (88:12, v/v). El flujo de la fase móvil fue de 1,5 mL/min. La longitud de onda de absorbancia fue de 220 nm. Las soluciones testigos se prepararon disolviendo DON y NIV (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO USA, pureza > 99%) en agua:metanol (95:5, v/v). Se resuspendieron los extractos en 250 µL de

fase móvil. La cuantificación de tricotecenos se realizó por la medición de la altura de los picos y su extrapolación a una curva de calibración obtenida mediante el uso de soluciones testigos de toxina. La cuantificación fue realizada utilizando el software integrador Empower (Milford, MA, USA).

5. Evaluación *in-vitro* de la actividad antagonista de los potenciales agentes de biocontrol sobre las especies del complejo *Fusarium graminearum* y *Fusarium poae*.

5.1 Cepas

Se utilizaron dos cepas de *F. graminearum* sensu stricto (FRC 1 y FRC 6) y dos cepas de *Fusarium poae* (FRC 42 y FRC 50) previamente aisladas de muestras de cebada (Inciso 2.1) e identificadas molecularmente (Inciso 2.2), cuyo quimiotipo para la producción de tricotecenos se determinó previamente por HPLC-MS-MS (Inciso 3.1). Las dos cepas de *F. graminearum* sensu stricto y *F. poae* se seleccionaron debido a su capacidad alta para producir DON y NIV, respectivamente. Como agentes de biocontrol se utilizaron las cepas de *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* 592, 1204, 1634 y 1633, la cepa *Bacillus nakamurai* 545, la cepa *Bacillus velescenzis* RC218 caracterizada previamente (Palazzini et al. 2016, 2018) y las cepas de *Lactobacillus plantarum* (CB1, Lpov y LpW). Las cepas de utilizadas como biocontroladores fueron de aisladas de suelos y algunas son utilizadas como probióticos en productos comerciales. Las cepas de *Bacillus* spp. fueron cedidas por el Departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA), de Estados Unidos. Las cepas de *Lactobacillus plantarum* fueron cedidas por el Instituto de Lactología Industrial (INLAIN) UNL-CONICET, de Santa Fe.

5.2 Ensayo *in vitro* - índice de dominancia (I_D)

El ensayo se llevó a cabo utilizando un medio de cultivo a base de cebada (2%), inoculando un taco de agar de la cepa de *F. graminearum* o *F. poae* en el centro de la placa y una estría paralela con el potencial agente de biocontrol. El taco de agar con las cepas de *Fusarium* fue obtenido de una colonia en activo crecimiento desarrollada en agar SNA durante 7 días a 25°C. Las estrías con el agente biocontrolador, se realizaron a una distancia de 30 mm al lado del taco a partir de un cultivo de 24 h realizado en caldo nutritivo o MRS, para *Bacillus* y *Lactobacillus* respectivamente. Las placas coinoculadas se incubaron en oscuridad a 25°C durante 5 días.

La interacción obtenida en cada placa se examinó macroscópicamente, asignando el tipo de interacción (I_D), de acuerdo a las categorías descritas por Magan y Lacey (1984) (Tabla 3).

Tabla 3. Índice de dominancia (I_D)

Tipo de Interacción	Valor Numérico
Mezcla mutua	$1/1$
Inhibición mutua por contacto	$2/2$
Inhibición mutua a distancia	$3/3$
Dominancia por contacto (el antagonista continúa inalterado o creciendo a una velocidad reducida a través de la colonia del organismo inhibido)	$4/0$
Dominancia a distancia (antibiosis del antagonista)	$5/0$

6. Análisis estadístico

Los datos de porcentaje de infección y contaminación con tricotecenos se analizaron por medio del Test ANOVA y la separación de las medias por medio del Test LSD Fisher ($p < 0,001$) ($p < 0,05$). Para los estudios estadísticos se utilizó el programa InfoStat versión 2017 (Argentina).

RESULTADOS

1. Especies de *Fusarium* aisladas de cebada cervecera recolectadas de distintas regiones productoras en Argentina.

En la Figura 7 se muestran los porcentajes de infección de *Fusarium* spp. aisladas de las diferentes zonas de producción de cebada cervecera durante las campañas 2016 y 2017. Los resultados obtenidos muestran que no se observaron diferencias importantes en cuanto al porcentaje de infección de *Fusarium* entre los años y las zonas estudiadas. Durante la campaña 2016 las zonas con mayor incidencia fueron Victoria (95%) y Carcarañá (92%), mientras que durante la campaña 2017 la zona de Ferré (97%) presentó la mayor incidencia de dicho género, comparada con el resto de las zonas.

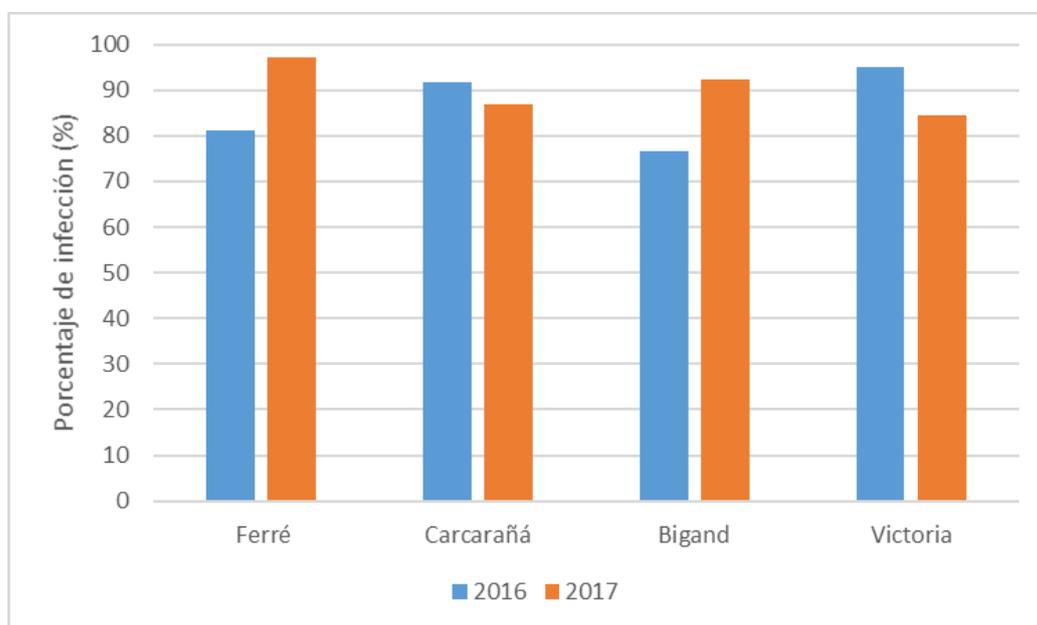


Figura 7. Porcentaje de especies de *Fusarium* en distintas zonas geográficas y campañas de producción.

En la Figura 8 se muestran los porcentajes de infección de *Fusarium* aisladas de diferentes variedades de semillas de cebada cervecera cosechadas durante las campañas de producción 2016 y 2017. En la campaña 2016, en todas las variedades se observaron altos niveles de infección, aunque no se observaron diferencias significativas entre las diferentes variedades. Durante la campaña 2017 la variedad más infectada fue Voyager (media = 95%), seguida por Shakira, Andreia, MP2122, Montoya, MP1012 y Danielle (media = 79%). Durante esta campaña, las únicas variedades de semillas que presentaron diferencias significativas fueron la variedad Voyager y Danielle ($p < 0,05$).

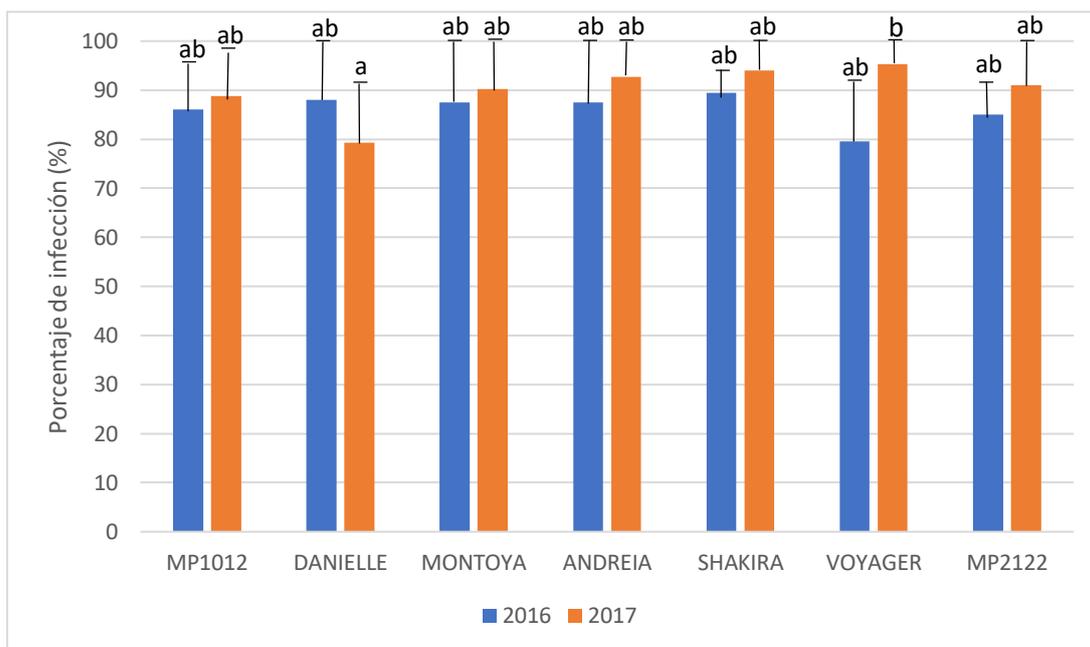


Figura 8. Porcentaje de infección de *Fusarium* (media \pm DE) aisladas de distintas variedades de semillas de cebada cervecera, en diferentes campañas de producción. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas con un $p < 0,05$.

En la Figura 9 se observa la relación entre los porcentajes de aislamientos de las especies del complejo *Fusarium graminearum*, *Fusarium poae* y *Fusarium* spp. aislados durante las campañas 2016 y 2017 en las cuatro zonas de estudio. En las cuatro zonas se obtuvieron mayores porcentajes de aislamiento de las especies del complejo *F. graminearum*, en niveles que variaron entre 53% y 88%. *Fusarium poae* fue aislada con mayor incidencia en la zona Ferré (30%) y en menor porcentaje (1%) en la zona Bigand, mientras que en Carcarañá y Victoria no fue aislado. El resto de las especies de *Fusarium* fueron aisladas frecuentemente, siguiendo en orden de frecuencia de aislamiento a las especies del complejo *F. graminearum*, en las zonas de Bigand, Carcarañá y Victoria en porcentajes de 20%, 12% y 16%, respectivamente.

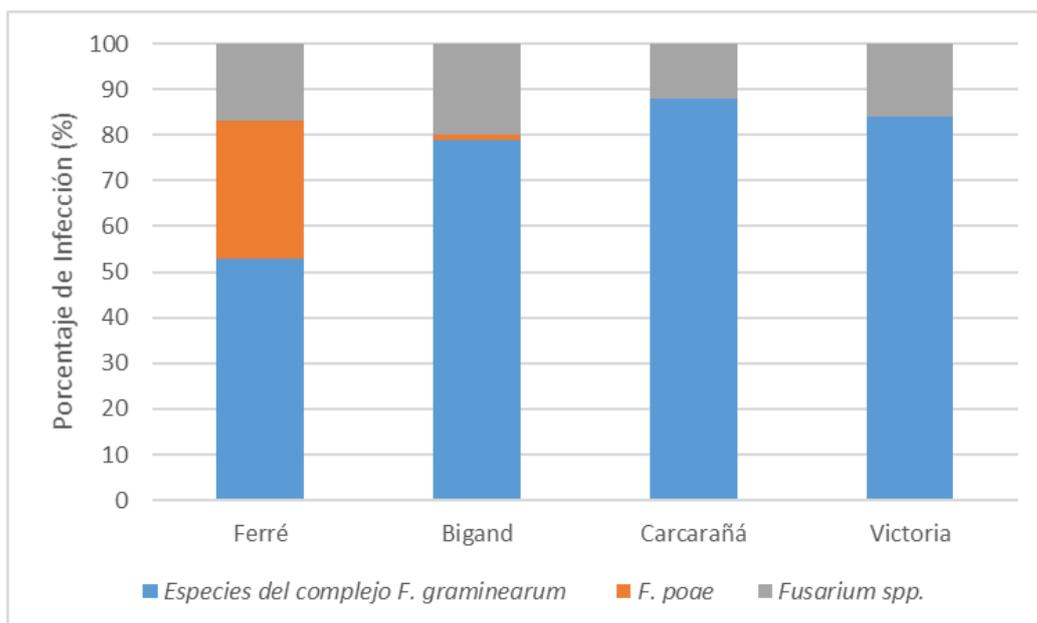


Figura 9. Especies del complejo *Fusarium graminearum*, *Fusarium poae* y *Fusarium spp.* aisladas en las diferentes zonas geográficas en la campaña 2016.

La relación entre los porcentajes de aislamientos de las especies del complejo de especies *Fusarium graminearum*, *Fusarium poae* y *Fusarium spp.* aislados durante la campaña 2017 en las cuatro zonas de estudio se observan en la Figura 10. Durante la campaña 2017, las especies del complejo *F. graminearum* presentaron la mayor incidencia en todas las zonas evaluadas, al igual que la campaña anterior en niveles que variaron entre 45% y 89%. El resto de las especies de *Fusarium*, siguieron en orden de aislamiento en porcentajes que variaron entre 11% y 36%. *Fusarium poae* sólo fue aislado en la zona Ferré (22%).

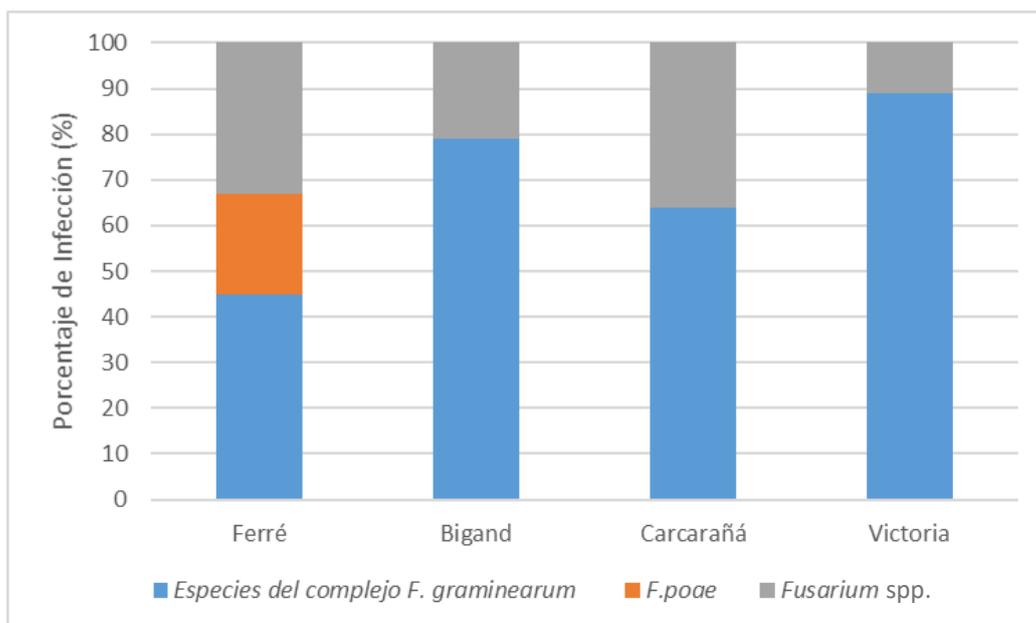


Figura 10. Especies del complejo *Fusarium graminearum*, *F. poae* y otros *Fusarium* spp. aislados en diferentes zonas geográficas en el año 2017.

La Figura 11 muestra la relación de porcentajes de aislamientos de las especies del complejo *Fusarium graminearum*, *Fusarium poae* y *Fusarium* spp. durante las campañas 2016 y 2017 en las diferentes variedades de las semillas evaluadas. Durante la campaña 2016, las especies del complejo *F. graminearum* tuvieron una prevalencia alta en todas las variedades de semillas (rango: 52%-93%), mientras que *F. poae* fue aislado sólo en las variedades Montoya, Danielle, Andreia y MP1012, siendo más prevalente en la variedad Montoya (45%). El resto de las especies de *Fusarium* se aislaron en todas las variedades analizadas en frecuencia baja (rango: 3%-18%). Durante la campaña 2017, las especies del complejo *F. graminearum* tuvieron alta prevalencia en todas las variedades de semillas en niveles que variaron entre 57% y 88%. *Fusarium poae* fue el segundo de mayor prevalencia en la variedad Montoya (21%) y en la variedad Danielle se aisló con la misma incidencia que *Fusarium* spp. (7%). El resto de las especies de *Fusarium* tuvieron mayor prevalencia que *F. poae* en las demás variedades analizadas.

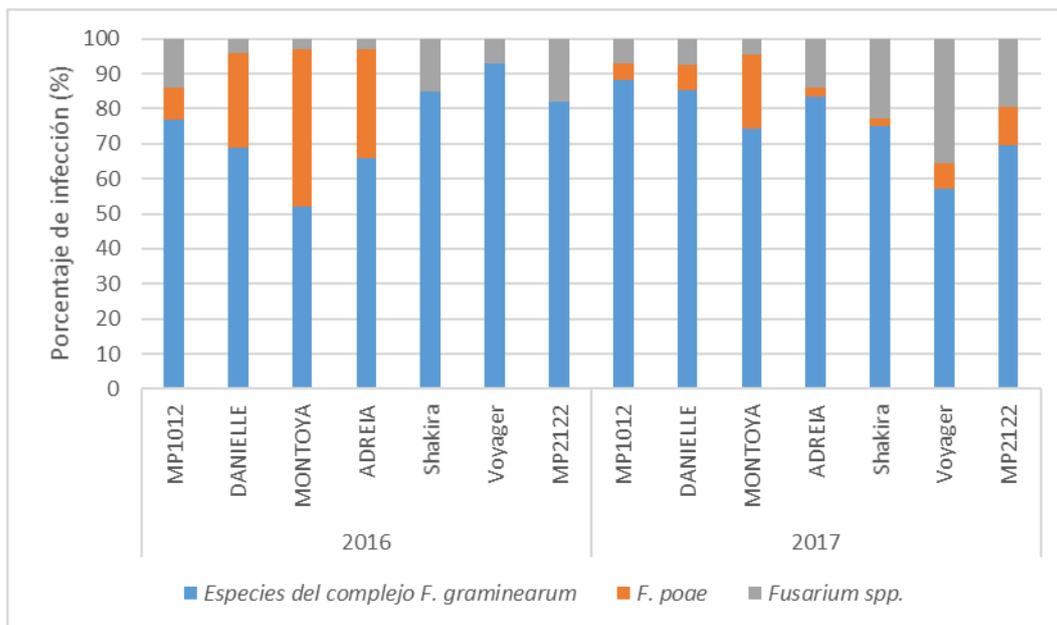


Figura 11. Especies del complejo *Fusarium graminearum*, *F. poae* y otras especies de *Fusarium* aisladas de diferentes variedades de semillas de cebada cervecera durante las campañas 2016 y 2017.

2. Identificación a nivel molecular de las especies del complejo *Fusarium graminearum* y *Fusarium poae*.

De las 38 cepas de *F. poae* identificadas a través de marcadores morfológicos, se observó que el 100% de las mismas pertenecían a esta especie luego de analizarlas mediante el secuenciamiento parcial del factor de elongación 1 α (TEF-1 α)

Se utilizó la misma metodología para el análisis de las especies del complejo *F. graminearum*, sólo que, del total de especies aisladas en el presente estudio (n= 572), se analizaron 11 cepas al azar, para confirmar su identificación. Las 11 cepas se identificaron como *F. graminearum* sensu stricto luego de realizar el secuenciamiento parcial del factor de elongación 1 α (TEF-1 α).

Finalmente, conociendo molecularmente las especies estudiadas, se tomaron 2 cepas seleccionadas entras las 38 cepas de *F. poae* y 2 cepas entre las 11 cepas de *F. graminearum* sensu stricto para su posterior evaluación aplicando agentes de biocontrol.

3. Caracterización de las especies del complejo *Fusarium graminearum* y *Fusarium poae* sobre la base de sus perfiles toxicogénicos.

La Tabla 4 muestra los perfiles toxicogénicos de las 38 cepas de *F. poae* aisladas de las zonas Ferré y Bigand durante la campaña 2016 y 2017. Del total de cepas analizadas en la zona de Ferré en el año 2016, el 85% fue capaz de producir NIV en niveles que variaron entre 47,24 mg/kg y 64120 mg/kg; mientras que, entre las cepas aisladas en la campaña 2017, el 100% de las cepas fueron productoras de NIV en el rango 157,76 mg/kg – 35444 mg/kg. En la zona de Bigand, una única cepa aislada fue identificada como *F. poae* durante la campaña 2016 y fue positiva para la producción de NIV (23164 mg/Kg).

El 91% de las cepas de *F. poae* produjeron más de una toxina simultáneamente, los tricotecenos del tipo B en combinación con los del tipo A: diacetoxiscirpenol (DAS), neosolaniol (NEO), monoacetoxiscirpenol (MAS) y T2-tetraol (T2). Con respecto a los tricotecenos del tipo A, el 60%, 77%, 69%, y 34% de las cepas fueron productoras de DAS, NEO, MAS y T2-tetraol, respectivamente. Los niveles medios de producción para DAS, NEO, MAS y T2-tetraol, fueron de 317 mg/kg, 179 mg/kg, 638 mg/kg y 1846 mg/kg, respectivamente.

Los extractos de las cepas que resultaron negativos para la producción de tricotecenos fueron descartados del análisis, debido a posibles errores en la extracción o detección.

Tabla 4. Caracterización de las especies de *Fusarium poae* en base a sus perfiles toxicogénicos.

Cepa	Región	Año	Variedad	Tricotecenos				
				Tipo B		Tipo A		
				NIV (mg/Kg)	DAS (mg/Kg)	NEO (mg/Kg)	MAS (mg/Kg)	T2 (mg/Kg)
FRC 3	Ferré	2016	MP1012	22052	< LOD	< LOD	342,2	3161,2
FRC 5	Ferré	2016	MP1012	25188	2192,4	353,16	1484	1560
FRC 8	Ferré	2016	MP1012	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
FRC 14	Ferré	2016	Danielle	1569,6	171,72	188,56	82,8	< LOD
FRC 16	Ferré	2016	Montoya	3821,6	82,84	32,704	47,44	< LOD
FRC 17	Ferré	2016	Montoya	1554,8	150,56	59,88	98,88	< LOD
FRC 22	Ferré	2016	Montoya	11952	< LOD	17,868	15,88	< LOD
FRC 25	Ferré	2016	Montoya	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
FRC 27	Ferré	2016	Montoya	63240	< LOD	2462,8	4788	12592
FRC 28	Ferré	2016	Montoya	10604	305,04	40,92	115,52	95,76
FRC 29	Ferré	2016	Montoya	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
FRC 32	Ferré	2016	Andreia	303,4	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
FRC 37	Ferré	2016	Shakira	2536,4	13,808	4,26	8,72	< LOD
FRC 40	Ferré	2016	Voyager	32064	9,388	371,56	46,92	1892,4
FRC 42	Ferré	2016	Voyager	64120	1798,4	694,4	4872	5812
FRC 43	Ferré	2016	Voyager	47,24	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
FRC 44	Ferré	2016	MP2122	1302,4	< LOD	6,536	12,16	< LOD
FRC 45	Ferré	2016	MP2122	3570,8	464	46,64	212,48	17,576
FRC 47	Ferré	2016	MP2122	8560	542,4	195,88	190,44	242,24
FRC 48	Ferré	2016	MP2122	9204	297,68	51,52	135,84	< LOD
FRC 50	Bigand	2016	Danielle	23164	< LOD	46,44	55,32	< LOD
FRC 4	Ferré	2017	MP1012	1885,2	12,568	3,4496	21,836	< LOD
FRC 7	Ferré	2017	MP1012	35444	34,86	49,36	739,6	478
FRC 10	Ferré	2017	MP1012	26708	213,6	175,68	1555,6	840,4
FRC 11	Ferré	2017	Danielle	12236	227,4	42,96	195	< LOD
FRC 12	Ferré	2017	Danielle	3596,8	< LOD	194,6	< LOD	57,56
FRC 15	Ferré	2017	Danielle	352,72	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
FRC 20	Ferré	2017	Montoya	2886,4	89,56	13,12	85,84	< LOD
FRC 21	Ferré	2017	Montoya	2485,6	7,28	11,748	< LOD	< LOD
FRC 23	Ferré	2017	Montoya	7088	115,92	30,924	269,12	194,92
FRC 24	Ferré	2017	Montoya	17664	460	116,36	821,6	493,2
FRC 26	Ferré	2017	Montoya	157,76	2,8324	< LOD	< LOD	< LOD
FRC 31	Ferré	2017	Andreia	3182,4	110,52	13,488	217,92	< LOD
FRC 33	Ferré	2017	Andreia	9264	229,44	61,4	559,2	177,8
FRC 34	Ferré	2017	Andreia	2932,4	< LOD	9,256	< LOD	< LOD
FRC 35	Ferré	2017	Shakira	10780	129,16	61,6	134,68	69,56
FRC 38	Ferré	2017	Shakira	1905,2	< LOD	3,2	< LOD	< LOD
FRC 46	Ferré	2017	MP2122	2234,4	97,64	21,708	121,44	< LOD

NIV: Nivalenol; DAS: diacetoxiscirpenol; NEO: neosolaniol; MAS: monoacetoxiscirpenol; T2: T2-tetraol

La Tabla 5 muestra el perfil toxicogénico de las 11 cepas de *F. graminearum* aisladas de la zona de Ferré durante la campaña 2016. Todas las cepas analizadas demostraron la capacidad de producir tricotecenos del grupo B: NIV, DON, 15-acetildeoxinivalenol (15-ADON) y 3-acetildeoxinivalenol (3-ADON), a excepción de la cepa *Fusarium graminearum* FRC 36 que no produjo 15-ADON. Los niveles de producción de deoxinivalenol fueron mayores en comparación con las otras tres micotoxinas producidas y los niveles variaron entre 3,9 mg/kg y 4409,4 mg/kg. Los niveles de producción de NIV fueron más bajos, en el rango entre 1,2 mg/kg y 17,2 mg/kg.

Tabla 5. Caracterización de las especies de *Fusarium graminearum* sensu stricto en base a sus perfiles toxicogénicos.

Cepa N	Región	Año	Variedad	Tricotecenos del tipo B			
				NIV (mg/Kg)	DON (mg/Kg)	15-ADON (mg/Kg)	3-ADON (mg/Kg)
FRC 1	Ferré	2016	MP1012	7,1	2654,6	146,1	271,7
FRC 2	Ferré	2016	MP1012	8,7	2818,8	136,4	277,9
FRC 6	Ferré	2016	MP1012	14,8	4037,6	281,9	573,4
FRC 9	Ferré	2016	MP1012	11,7	3574,1	255,7	509,4
FRC 13	Ferré	2016	Danielle	1,6	1233,8	50,2	8,9
FRC 18	Ferré	2016	Montoya	17,2	4409,4	483,5	497,9
FRC 19	Ferré	2016	Montoya	13,2	3578,8	298,8	286,3
FRC 30	Ferré	2016	Andreia	13,2	3404,7	221	285,2
FRC 36	Ferré	2016	Shakira	1,2	3,9	<LOD	0,4
FRC 39	Ferré	2016	Voyager	10,2	3607	216,8	461,2
FRC 41	Ferré	2016	Voyager	9,1	3390,6	191,5	450,6

NIV: nivalenol; DON: deoxinivalenol; 15-ADON: 15-acetil-deoxinivalenol; 3-ADON: 3-acetil-deoxinivalenol

4. Incidencia natural de deoxinivalenol en granos de cebada.

El estudio de la incidencia natural de DON en las muestras de granos de cebada recolectadas en las zonas de Ferré, Carcarañá, Bigand y Victoria durante la campaña 2016, demostró que todas las muestras analizadas presentaron una incidencia de DON, con excepción de las tomadas en la zona de Victoria, donde sólo el 82% presentó dicha micotoxina. La media de producción de DON fue de 0,46 mg/kg, mientras que el rango de producción de DON fue 0,10 mg/kg – 1,77 mg/kg, donde la zona Victoria tubo la mayor producción, con una media de 1,00 mg/kg (Tabla 6).

Tabla 6. Incidencia de deoxinivalenol en las muestras de granos de cebada

Regiones	DON		
	Muestras positivas/Total	Rango (mg/kg)	Media (mg/kg)
Ferré	7/7	0,18 - 0,55	0,34
Carcaraña	7/7	0,46 - 1,77	1,00
Bigand	13/13	0,10 - 0,51	0,30
Victoria	9/11	0,10 - 0,54	0,20

DON: deoxinivalenol

4. Evaluación *in-vitro* de la actividad antagonista de los potenciales agentes de biocontrol sobre cepas de *Fusarium graminearum* sensu stricto y *Fusarium poae*.

4.1 Ensayo in vitro - índice de dominancia (I_d)

En la Figura 13 se observa la interacción entre las cepas antagonistas de *B. subtilis* subsp *inaquosorum* 592, 1204, 1634 y 1633; *B. nakamurai* 545 con las cepas *F. graminearum* sensu stricto FRC1 y FRC6. Las interacciones A-E y A-K demostraron una inhibición por contacto, siendo una interacción 4/0 de acuerdo al índice de dominancia. Las interacciones F y L presentaron una inhibición a distancia, siendo una interacción 5/0 de acuerdo al índice de dominancia.

En la Figura 14 se observa la interacción entre las mismas cepas antagonistas mencionadas anteriormente, con las cepas *F. poae* FRC42 y FRC 50. Los resultados obtenidos de las interacciones entre estas cepas, son iguales a los descriptos para la Figura 13.

En la Figura 15 se observan las interacciones entre las cepas de *F. graminearum* sensu stricto FRC1, FRC6 y las cepas de *F. poae* FRC 42, FRC50 con las cepas antagonistas de *Lactobacillus plantarum* FPAV, LpW y CB1. Las interacciones A, B, D, E y J presentaron una inhibición por contacto, siendo una interacción 4/0 de acuerdo al índice de dominancia. En los demás casos, no se observó ningún tipo de interacción, lo que se denomina mezcla mutua, obteniendo un valor 0/0 de acuerdo al índice de dominancia.

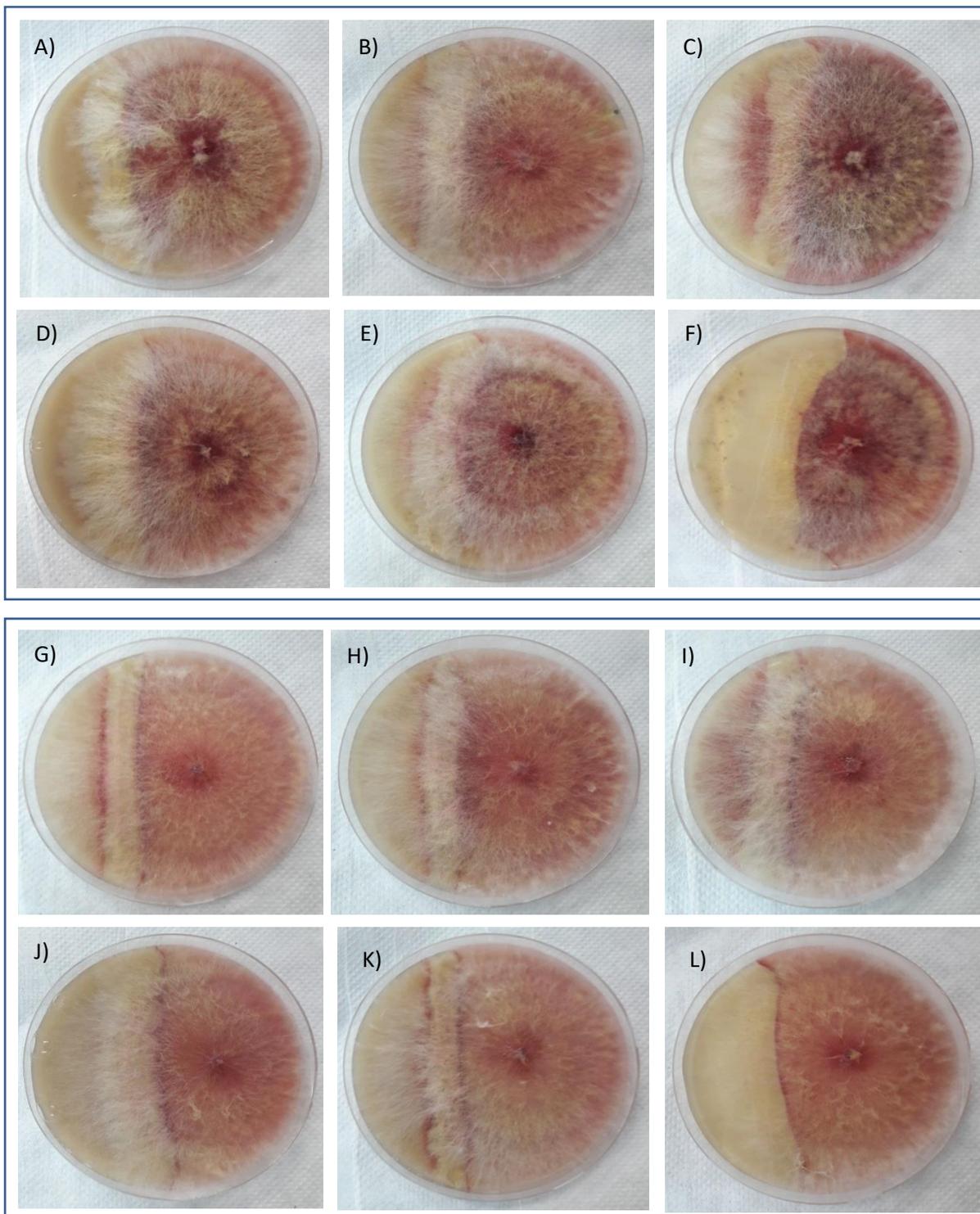


Figura 13. Interacción *Fusarium graminearum* sensu stricto vs *Bacillus* spp. **FRC1:** A) *Bacillus subtilis* subsp *inaquosorum* 592, B) *B. subtilis* subsp *inaquosorum* 1204, C) *B. nakamurai* 545, D) *B. subtilis* subsp *inaquosorum* 1634, E) *B. subtilis* subsp *inaquosorum* 1633, F) *Bacillus velezensis* RC218. **FRC6:** G) *B. subtilis* subsp *inaquosorum* 592, H) *B. subtilis* subsp *inaquosorum* 1204, I) *B. nakamurai* 545 3, J) *B. subtilis* subsp *inaquosorum* 1634, K) *B. subtilis* subsp *inaquosorum* 1633 y L) *Bacillus velezensis* RC218.

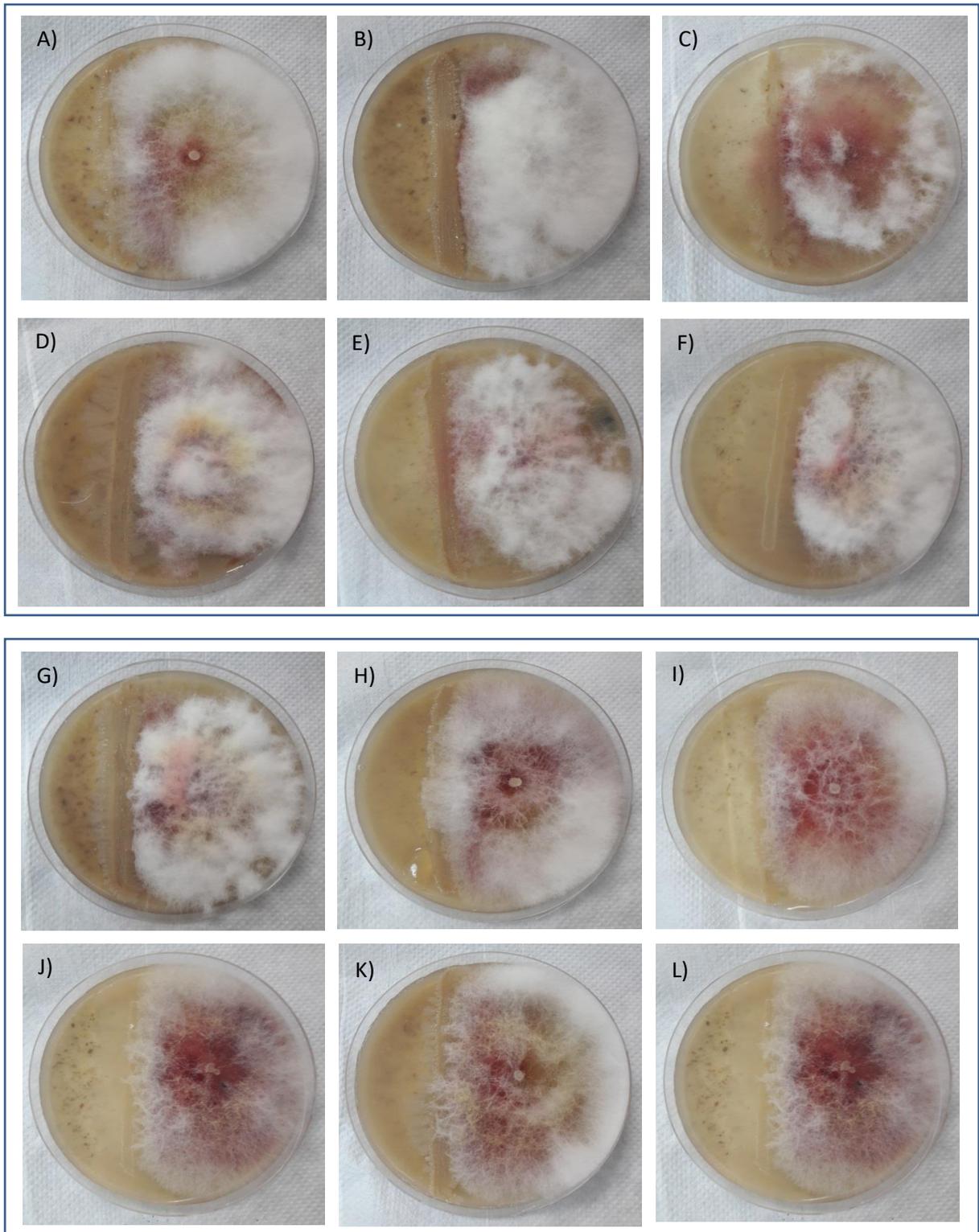


Figura 14. Interacción *Fusarium poae* vs *Bacillus* spp. **FRC42:** A) *Bacillus subtilis* subsp *inaquosorum* 592, B) *B. subtilis* subsp *inaquosorum* 1204, C) *B. nakamurai* 545, D) *B. subtilis* subsp *inaquosorum* 1634, E) *B. subtilis* subsp *inaquosorum* 1633, F) *Bacillus velezensis* RC218. **FRC50:** G) *B. subtilis* subsp *inaquosorum* 592, H) *B. subtilis* subsp *inaquosorum* 1204, I) *B. nakamurai* 545, J) *B. subtilis* subsp *inaquosorum* 1634, K) *B. subtilis* subsp *inaquosorum* 1633 y L) *Bacillus velezensis* RC218

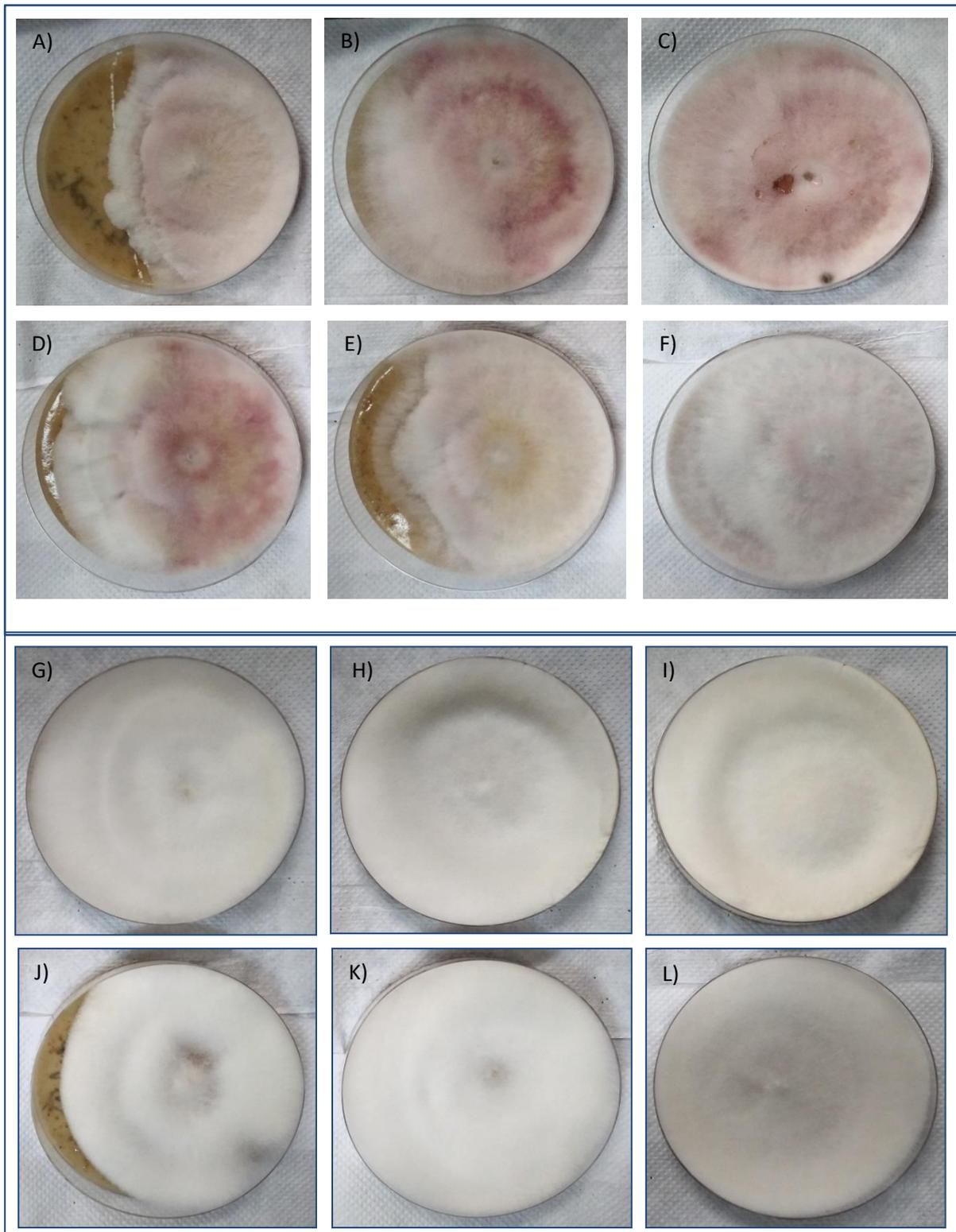


Figura 15. Interacción *Fusarium graminearum* sensu stricto y *Fusarium poae* vs *Lactobacillus plantarum*. *Fusarium graminearum* FRC1: A) FPAV, B) LpW, C) CB1. *Fusarium graminearum* FRC 6: D) FPAV, E) LpW, F) CB1. *Fusarium poae* FRC42: G) FPAV, H) LpW, I) CB1. *Fusarium poae* FRC 50: J) FPAV, K) LpW, L) CB1.

DISCUSIÓN

La fusariosis de la espiga es una de las enfermedades fúngicas más graves que afectan a la cebada y al trigo en todo el mundo. Si bien la enfermedad causa una disminución del rendimiento y la calidad de las semillas, las micotoxinas que pueden acompañar la enfermedad son a menudo un problema aún más grave (Osborne y Stein, 2007). El presente trabajo se focalizó en el estudio de las especies de *Fusarium* con potencial para producir la fusariosis de la espiga de cebada, *Fusarium graminearum* y *Fusarium poae*.

El inóculo del patógeno fúngico suele ser muy abundante en el campo, sin embargo, la producción y la dispersión de dicho inóculo depende de las condiciones climáticas que se desarrollen durante el cultivo. En este sentido, un clima cálido y húmedo, caracterizado por precipitaciones frecuentes, es muy favorable para el crecimiento fúngico, infección y desarrollo de las enfermedades (Osborne y Stein, 2007). Los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron una incidencia alta de las especies de *Fusarium* en las cuatro zonas geográficas evaluadas, Ferré, Bigand, Carcarañá y Victoria. El clima en dichas zonas corresponde a la región conocida como templado pampeano (o también como subtropical húmedo) y cumple con las características mencionadas que favorecen al desarrollo fúngico. El período de primavera, cuando se produce la antesis del cultivo de cebada y el llenado de los granos, se caracteriza por ser húmedo, con precipitaciones entre 250-300 mm, temperaturas medias de 16°C-18°C, temperaturas mínimas de 10°C -12°C y temperaturas máximas de 22°C-24°C. Piacentini y col., (2015) estudiaron la incidencia de las especies de *Fusarium* en cebada cervecera obtenida de los estados de Santa Catarina y Paraná (Brasil) dónde las condiciones climáticas son similares a las registradas en las zonas evaluadas en el presente estudio y encontraron porcentajes de infección similares (67 %) a los observados en el presente estudio. Por el contrario, Beccari y col., (2016) analizaron muestras de cebada de la región de Umbría (Italia) y aunque las condiciones climáticas son similares, se obtuvo una incidencia menor (20 %) en las especies de *Fusarium* de los granos de cebada. Estos resultados podrían explicarse sobre la base de los resultados obtenidos en un estudio realizado por Wolf y col. (2003) para evaluar las condiciones ambientales que favorecen la FHB. Dichos autores demostraron que las variables más útiles fueron: la duración de las precipitaciones 7 días antes de antesis, la duración de la temperatura entre 15 y 30°C, 7 días antes de antesis y la duración de la temperatura entre 15 y 30°C y la humedad relativa mayor o igual al 90%.

Fusarium graminearum sensu stricto junto con *F. culmorum*, son considerados como las especies prevalentes en los cultivos de cebada en regiones de los EEUU, Canadá, China y el hemisferio sur, mientras que en Europa la incidencia de estos es

menor, y la mayor frecuencia es de *F. avenaceum*, *F. poae*, *F. graminearum* y *F. tricinctum* (Nielsen y col., 2014). En Argentina el principal agente causal de FHB es *F. graminearum* sensu stricto, aunque hay estudios que demuestran la aparición de otras especies de *Fusarium*, entre ellas *F. poae*. Ambas especies, además de producir la enfermedad, tienen la capacidad de producir micotoxinas que pueden ser nocivas para la salud humana (Dinolfo y Stenglein, 2014; Nogueira y col., 2018). En el presente trabajo se observó una incidencia alta de *F. graminearum* sensu stricto en todas las zonas estudiadas. Los resultados obtenidos por Piacentini y col., (2015) en Brasil, Nogueira y col., (2018) en Argentina, y Umpiérrez-Failache y col., (2013) en Uruguay, mostraron una prevalencia mayor de *F. graminearum* en las muestras de cebada cervecera, del 26%, 51% y 86%, respectivamente. En cambio, en los estudios realizados por Beccari y col., (2016) y Nielsen y col., (2014) en el Reino Unido, *F. graminearum* presentó una incidencia del 19% y 46% respectivamente, y no fue la principal especie de *Fusarium* contaminante de la cebada cervecera; sino que, *F. avenaceum* fue prevalente en ambos estudios, con incidencias del 63% y 100% respectivamente. Aunque las condiciones climáticas de Argentina e Italia son similares, como previamente fue mencionado, los porcentajes de aislamientos de las especies incluidas en el género fue diferente en ambas regiones. Los autores Beccari y col., (2017) y Schöneberg y col., (2016) proponen que las diferencias en el aislamiento de dichas especies en el cultivo de cebada podrían estar relacionado a variaciones de temperatura, humedad y lluvias que se registran en cada lugar, además de variables como variedad de cebada, prácticas agrícolas, utilización de fungicidas, etc.

La incidencia de *F. poae* en el presente estudio, fue menor en comparación con la incidencia de *F. graminearum* sensu stricto y sólo fue aislado en la zona de Ferré durante las campañas 2016 y 2017, y en Bigand, únicamente en la campaña 2016. Los resultados concuerdan con los estudios realizados previamente por Nogueira y col., (2018), Beccari y col., (2016), quienes analizaron muestras de cebada cervecera y aislaron *F. poae* en menor frecuencia que *F. graminearum*, en porcentajes del 26% y 5%, respectivamente.

Las diferencias en el aislamiento de ambas especies podrían estar asociado a las condiciones climáticas que se desarrollan en las diferentes zonas. Temperaturas alrededor de los 25°C y condiciones de sequía favorecen el crecimiento de *F. poae* (Xu y col., 2008). Las condiciones climáticas durante las campañas de estudio en las zonas evaluadas favorecieron principalmente el crecimiento de *F. graminearum* sensu stricto y únicamente en la zona Ferré se observó el aislamiento de *F. poae*. Los resultados obtenidos por Nogueira y col., (2018) en Argentina, coinciden con los

obtenidos en el presente estudio, donde *F. graminearum* sensu stricto fue la especie con mayor incidencia en todas las zonas evaluadas, mientras que *F. poae* fue la de menor incidencia, pero a diferencia del presente trabajo, fue aislado en varias de las zonas evaluadas. Con respecto a las variedades de cebada evaluadas, la incidencia de las especies de *Fusarium* fue alta en todas las variedades, en ambas campañas evaluadas. En otro estudio llevado a cabo por Nielsen y col., (2014) entre los años 2007 y 2011 no se observó diferencias significativas entre las variedades Concerto, Forensic, Optic y Westminster, analizadas en Gran Bretaña.

Las infecciones fúngicas, generalmente están acompañadas por la producción de micotoxinas. Las especies que comprenden el complejo *Fusarium graminearum*, además de producir la FHB en cebada, son capaces de producir tricotecenos de tipo B principalmente nivalenol (NIV), deoxinivalenol (DON) y sus derivados acetilados: 3-acetildeoxinivalenol (3-ADON) y 15-acetildeoxinivalenol (15-ADON). Desjardins (2006) distinguió tres perfiles de quimio/genotipos para la producción de tricotecenos: el quimiotipo NIV, cuando hay producción de NIV; el quimiotipo 15-ADON, cuando hay producción simultánea de DON y 15-ADON; y el quimiotipo 3-ADON, cuando hay producción simultánea de DON y 3-ADON. Posteriormente, en diferentes estudios se detectó la producción simultánea de 3-ADON y 15-ADON por cepas de *F. graminearum* (Alvarez y col., 2009; Fernandez Pinto y col., 2008; Szécsi y col., 2005;). Mugarabí de Kuppler y col., (2011) atribuye la producción simultánea de los tricotecenos de tipo B a los pasos de conversión enzimática de DON a NIV, y viceversa, o a que sean subproductos de la biosíntesis. Albuquerque y col., (2019) proponen como explicación a la producción simultánea de los derivados acetilados de DON, que su biosíntesis está regulada por la temperatura, que las temperaturas altas (30°C) favorecen la síntesis de 3-ADON, mientras que las temperaturas bajas (10°C) favorecen la síntesis de 15-ADON. Sin embargo, nuestros resultados difieren a los obtenidos por dichos autores debido a que el 91% de las cepas de *F. graminearum* sensu stricto produjeron de forma simultánea los tricotecenos DON, NIV, 15-ADON y 3-ADON y fueron incubadas a la misma temperatura (25°C). Los niveles de producción de DON fueron mayores a los niveles de producción de NIV, 15-ADON y 3-ADON. Los niveles de producción de 15-ADON y 3-ADON fueron bajos y se detectaron en cantidades similares. Sólo una cepa presentó sólo el quimiotipo 3-ADON. En un estudio realizado por Castañares y col., (2014) en el cual se evaluaron los perfiles de producción de tricotecenos de 110 cepas de *F. graminearum* aisladas de cebada en Argentina, se obtuvieron resultados similares a los observados en el presente estudio, pero con medias de producción cuantitativamente menores para todos los tricotecenos.

Fusarium poae es considerado un patógeno débil para producir FHB, sin embargo, su presencia es relevante debido al amplio rango de micotoxinas que puede producir, incluyendo tricotecenos del tipo A y tipo B, eniانتinas y bauvericinas (Beccari y col.,2018; Stenglein, 2009). Por lo tanto, en el presente trabajo también se estudió la producción de micotoxinas por *F. poae*. Los resultados obtenidos mostraron que el 92% de las cepas de *F. poae* tuvieron la capacidad de producir NIV en niveles altos. La producción de otras micotoxinas fue detectada en diferentes proporciones: el 63% de las cepas produjeron DAS, el 79% produjeron NEO, el 71% produjeron MAS y el 40% produjeron T2-tetraol. El 32% de las cepas fueron capaces de producir de manera simultánea las cinco micotoxinas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Somma y col., (2010) y Dinolfo y col., (2012), quienes detectaron que el 88% y 100% de las cepas de *F. poae* aisladas de Italia y Argentina respectivamente, eran productoras de nivalenol *in-vitro*. La capacidad de producción de estos tricotecenos por diferentes cepas de *F. poae* también fue informado por Beccari y col., (2018).

Cada especie fúngica, como las del género *Fusarium*, tiene requisitos biológicos y ambientales diferentes para su desarrollo, por lo que están sujetos a los cambios climáticos, las prácticas agrícolas, la aplicación de fungicidas, el huésped y la fertilización nitrogenada (Beccari y col., 2017; Karlsson y col., 2017; Osborne y Stein, 2007; Schöneberg y col., 2016). Al igual que ocurre con las especies del género *Fusarium*, la producción de toxinas en cereales de grano pequeño varía. Se observaron que los niveles de DON se incrementaban después de lluvias intensas y temperaturas cálidas, durante o después de la antesis (Hooker y col.,2002; Roer Hjelkrem y col., 2017).

En el presente trabajo se estudió la incidencia natural de DON en cebada cervecera en las zonas de estudio durante la campaña 2016. El análisis de las muestras demostró que, en las muestras analizadas, se detectó DON. Los valores de DON obtenidos en el presente estudio fueron menores comparados con los obtenidos por Nogueira y col., (2018) y Beccari y col., (2016), que tuvieron valores, en promedio, de 2600 µg/kg y 39,2 µg/kg, respectivamente.

Argentina es un país que exporta cebada a diferentes países del mundo, con y sin límites establecidos para DON, tanto para la cebada destinada a la industria cervecera como para la cebada destinada para la industria alimenticia de animales, mientras que a nivel nacional la cebada destinada a la producción de cerveza, no tiene niveles máximos permitidos para DON, ni para otras micotoxinas (Nogueira y col., 2018). En general, los resultados obtenidos no presentan un problema para la salud humana debido a que no superan los 1 mg/kg, valor máximo establecido por el Código

Alimentario Argentino para: harina, sémola, semolina y hojuelas o copos de trigo, los alimentos más similares a la cebada. Se toma estos valores debido a que no hay una regulación para la cerveza ni derivados de la cebada destinada a alimento humano. En cambio, el reglamento de la Comisión de las Comunidades Europeas establece que, para los alimentos elaborados a base de cereales, como lo es la cerveza, el valor máximo permitido es de 0,2 mg/kg (Comisión de las Comunidades Europeas, 2006). Los resultados obtenidos en el presente estudio son, en su mayoría, superiores a lo establecido, por lo que la presencia de la micotoxina DON en las muestras de cebada estudiadas, representaría un peligro potencial para la salud humana.

La aplicación de agentes microbianos biocontroladores, antagonistas de patógenos, puede ser de diferentes maneras: en el suelo o en partes aéreas de la planta (Palazzini y col., 2018), o incluso post cosecha (Di francesco y col., 2016). Un microorganismo antagonista puede poseer diferentes mecanismos de acción: de forma directa, tal como competir por nutrientes, ocupando un espacio ecológico en común, mediante antibiosis o parasitismo; de manera indirecta, mediante inducción de resistencia en la planta o mediante la promoción del crecimiento de la planta (Legrand y col., 2017). En el presente trabajo se utilizó el Índice de Dominancia (I_d) como indicador de las interacciones específicas *in-vitro*, entre las cepas de *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*, *B. velezensis* y *L. plantarum* para ser utilizadas como potenciales agentes de biocontrol y las cepas patógenas de *F. graminearum* sensu stricto y *F. poae* aisladas previamente de cebada. Los resultados obtenidos demostraron una dominancia a distancia (I_d 5/0) entre las interacciones de *B. velezensis* RC218 con todas las cepas de *F. graminearum* sensu stricto y *F. poae*. Dicha dominancia a distancia pudo estar relacionada con la producción de metabolitos secundarios por parte del antagonista. *Bacillus velezensis* RC218 fue estudiada previamente en trigo por Palazzini et al., (2016) concluyendo que reduce la severidad de la enfermedad y la acumulación de micotoxinas (deoxinivalenol), en condiciones de campo. En el presente estudio, se evaluó la interacción de potenciales agentes de biocontrol contra *F. graminearum* y *F. poae* a nivel de laboratorio, en un medio a base de cebada. Las cepas de *B. velezensis* RC218 tienen en su genoma clusters de genes que comprenden grupos de péptido sintasas no ribosomales (NRPS) y grupos de poliketidosintasas, que sintetizan compuestos con actividades antibacterianas, antifúngicas y de sideróforos (Palazzini y col., 2018).

En las interacciones entre las cepas *B. subtilis* subsp. *inoquosorum* 592, 1204, 545, 1634 y 1633 con *F. graminearum* FRC1 y FRC6 y *F. poae* FRC45 y FRC50, se demostró una dominancia por contacto (I_d 4/0). En las interacciones entre las cepas *Lactobacillus plantarum* FPAV, LpW con *F. graminearum* FRC1 Y FRC6 se observó

una dominancia por contacto; y también en la cepa *Lactobacillus plantarum* FPAV y *F. poae* FRC42. El crecimiento del patógeno fue normal hasta que entraron en contacto y, si bien el patógeno continuó su crecimiento, lo hizo de manera reducida. La disminución del crecimiento pudo deberse a la disponibilidad de los nutrientes del nicho ecológico, donde el antagonista y el patógeno competían por los mismos para el desarrollo (Legrand y col., 2017). Además, la competencia por nutrientes y espacio es responsable del fenómeno de fungistasis a través de la inhibición de la germinación de esporas (Bonanomi y col., 2014). En el resto de las interacciones se observó una mezcla mutua (*Id* 0/0), donde no hubo inhibición del patógeno ni disminución de su crecimiento. El antagonista no produjo ningún tipo de compuesto que permitiera la inhibición del patógeno, ni pudo competir adecuadamente por los nutrientes y por el espacio del nicho.

Estos resultados demuestran que similar a lo que sucede en trigo, las cepas de *B. velezensis* RC218 pueden ser utilizadas como agentes de biocontrol de *F. graminearum* y *F. poae* sobre el cultivo de cebada.

CONCLUSIONES

- La incidencia de las especies de *Fusarium* fue alta en las zonas de estudio en las dos campañas evaluadas.

- Las especies del complejo *Fusarium graminearum* presentaron una incidencia alta en la mayoría de las diferentes zonas evaluadas, a diferencia de *Fusarium poae* que sólo se aisló con frecuencia alta en las zonas de Ferré y Bigand.

- El perfil toxicogénico de *Fusarium graminearum* sensu stricto, demostró que todas las cepas produjeron DON en concentraciones altas, seguido por 3-ADON, 15-ADON y NIV.

- El perfil toxicogénico de *Fusarium poae* demostró ser más heterogéneo, ya que la mayoría de las cepas fueron capaces de producir NIV en concentraciones altas, mientras que sólo algunas cepas produjeron DAS y/o NEO y/o MAS y/o T-2 tetraol.

- La incidencia natural de DON en algunas de las muestras de cebada analizadas, presentó niveles por encima de los reglamentados internacionalmente, mientras que, según el Código Alimentario Argentino para alimentos similares, sólo algunas muestras de cebada superaban el límite establecido.

- *Bacillus velezensis* RC218 fue capaz de controlar el crecimiento *in-vitro* de las cepas de *Fusarium graminearum* sensu stricto y *Fusarium poae*. Todas las cepas de *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* ejercieron control por contacto de ambas especies de *Fusarium*, mientras que las cepas de *Lactobacillus plantarum* demostraron capacidad biocontroladora variable dependiendo de la cepa evaluada; en algunos casos se observó inhibición por contacto y en otros no se observó inhibición.

REFERENCIAS

- Alvarez C.A., Azcarate M.P., Fernandez Pinto V. (2009). Toxigenic potential of *Fusarium graminearum* sensu stricto isolates from wheat in Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* **135**, 131–135.
- Anand A., Zhou T., Trick H.N., Gill B.S., Bockus W.W., Muthukrishnan S. (2003). Greenhouse and field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against *Fusarium graminearum*. *J. Exp. Bot.* **54**, 1101–1111.
- Albuquerque D.R., Patriarca A., Pinto V.F. (2019). Can discrepancies between *Fusarium graminearum* trichothecene genotype and chemotype be explained by the influence of temperature in the relative production of 3-ADON and 15-ADON?. *Fungal Biol.* (En prensa doi: 10.1016/j.funbio.2019.09.004).
- Aoki T., O'Donnell K., Geiser D.M. (2014). Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *J. Gen. Plant Pathol.* **80**, 189–201.
- Baffoni, L., Gaggia, F., Dalanaj, N., Prodi, A., Nipoti, P., Pisi, A., Biavati, B., and Di Gioia, D. (2015). Microbial inoculants for the biocontrol of *Fusarium* spp. in durum wheat. *BMC Microbiol.* **15**, 242.
- Barkai-Golan R. (2008). *Alternaria* mycotoxins. In: Barkai- Golan, R., Nachman, P. (Eds.), *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 185–03.
- Barros G., García D., Oviedo S., Ramírez M., Torres A., Chulze S. (2008). Deoxynivalenol and nivalenol analysis in soybean and soy flour. *World Mycotoxin J.* **1**, 263-266.
- Beccari G., Caproni L., Tini F., Uhlig S., Covarelli L. (2016). Presence of *Fusarium* species and other toxigenic fungi in malting barley and multi-mycotoxin analysis by liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **64**, 4390–4399.
- Beccari G., Prodi A., Tini F., Bonciarelli U., Onofri A., Oueslati S., Limayma M., Covarelli L. (2017). Changes in the *Fusarium* head blight complex of malting barley in a three-year field experiment in Italy. *Toxins* **9**, 120.
- Beccari G., Colasante V., Tini F., Senatore M.T., Prodi A., Sulyok M., Covarelli L. (2018). Causal agents of *Fusarium* head blight of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) in central Italy and their in vitro biosynthesis of secondary metabolites. *Food Microbiol.* **70**, 17–27.

- Bonanomi G., D'Ascoli R., Scotti R., Gaglione S.A., Caceres M.G., Sultana S., Scelza R., Rao M.A., Zoina A. (2014). Soil quality recovery and crop yield enhancement by combined application of compost and wood to vegetables grown under plastic tunnels. *Agric. Ecosyst. Environ.* **192**, 1–7.
- Bottalico A., Logrieco A. (1998). Toxigenic *Alternaria* species of economic importance. In: Sinha, K.K., Bhatnager, D. (Eds.), *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. Marcel Dekker, New York, pp. 65–108.
- Castañares E., Albuquerque D.R., Dinolfo M.I., Pinto V.F., Patriarca A., Stenglein S.A. (2014). Trichothecene genotypes and production profiles of *Fusarium graminearum* isolates obtained from barley cultivated in Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* **179**, 57–63.
- Commission Recommendation (2013). Commission Recommendation (EC) 165/2013 of 27 March 2013 on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereal and cereals products. *Off. J. Eur. Union L91*, 12–15.
- Comisión de las Comunidades Europeas (2006). Reglamento (CE) No1881/2006 de la comisión de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.
- De Wolf E.D., Madden L.V., Lipps P.E. (2003). Risk Assessment Models for Wheat *Fusarium* Head Blight Epidemics Based on Within-Season Weather Data. *Phytopathology* **93**, 428–435.
- Desjardins A. (2006). *Fusarium* Mycotoxins: Chemistry, Genetics, and Biology. APS Press, *Plant Pathol.* **56**, 337-337.
- Di Francesco A., Martini C., Mari M. (2016). Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: how many mechanisms of action? *European J. Plant Pathol.* **145**, 711–717.
- Dinolfo M.I., Barros G.G., Stenglein S.A. (2012). Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* isolates with the potential to produce nivalenol. *FEMS Microbiol. Lett.* **332**, 99-104.
- Dinolfo M.I., Stenglein S.A. (2014). *Fusarium poae* and mycotoxins: potential risk for consumers. *Bol. Soc. Argent. Bot.* **49**, 5–20.
- Fernandez Pinto V.E., Terminello L.A., Basilico J.C., Ritieni A. (2008). Natural occurrence of nivalenol and mycotoxigenic potential of *Fusarium graminearum* in wheat affected by head blight in Argentina. *Braz. J. Microbiol.* **39**, 157–162.

- Ferrigo D., Raiola A., Causin R. (2016). *Fusarium* toxins in cereals: occurrence, legislation, factors promoting the appearance and their management. *Molecules* **21**, 627.
- Fletcher M.T., Blaney B.J. (2018). Mycotoxins in Reference Module in Food Science. : *Trends Food Sci. Technol.*
- Havlova P., Lancova K., Vánová M., Havel J., Hajšlová J. (2006). The effect of fungicidal treatment on selected quality parameters of barley and malt. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 1353–1360.
- Hooker D.C., Schaafsma A.W., Tamburic-Ilincic L. (2002). Using weather variables pre- and post-heading to predict deoxynivalenol content in winter wheat. *Plant Dis.* **86**, 611–619.
- Inoue T., Nagatomi Y., Uyama A., Mochizuki N. (2013). Fate of mycotoxins during beer brewing and fermentation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 1410–1415.
- Jansen C., Von Wettstein D., Schäfer W., Kogel K.H., Felk A., Maier F.J. (2005). *Proc. Nat. Academy Sci. USA* **102**, 16892-16897.
- Karlsson I., Friberg, H., Kolseth A.-K., Steinberg C., Persson P. (2017). Agricultural factors affecting *Fusarium* communities in wheat kernels. *Int. J. Food Microbiol.* **252**, 53–60.
- Kerényi Z., Moretti A., Waalwijk C., Oláh B., Hornok L. (2004). Mating type sequences in asexually reproducing *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 4419–4423.
- Khan N.I., Schisler D.A., Boehm M.J., Slininger P.J., Bothast R.J. (2001). Selection and evaluation of microorganisms for biocontrol of *Fusarium* Head Blight of wheat incited by *Gibberella zeae*. *Plant Dis.* **85**, 1253–1258.
- Krstanović V., Lalić A., Kosović I., Velić N., Mastanjević K., Mastanjević K. (2016). A survey of total -glucan content in Croatian barley varieties. *Cereal Res. Commun.* **44**, 650–657.
- Laitila A., Kotaviita E., Peltola P., Home S., Whilhemson A. (2007). Indigenous microbial community of barley greatly influences grain germination and malt quality. *J. Inst. Brew.* **113**, 9–20.
- Legrand F., Picot A., Cobo-Díaz J.F., Chen W., Le Floch G. (2017). Challenges facing the biological control strategies for the management of *Fusarium* Head Blight of cereals caused by *F. graminearum*. *Biol. Control* **113**, 26–38.

- Leslie J.F., Summerell B.A. (2006). The *Fusarium* Laboratory Manual; Blackwell Professional: Ames, IA, USA.
- Magan N., Lacey J. (1984). The effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. *Trans. British Mycol. Soc.* **82**, 83-93.
- Maiorano A., Blandino M., Reyneri A., Vanara F. (2008). Effects of maize residues on the *Fusarium* spp. infection and deoxynivalenol (DON) contamination of wheat grain. *Crop Prot.* **27**, 182–188.
- Malachová A., Sulyok M., Beltrán E., Berthiller F., Krska R (2014). Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. *J Chromatogr A.* **3**, 145-156.
- Medina A., Valle-Algarra F.M., Mateo R., Gimeno-Adelantado G.V., Mateo F., Jiménez M. (2006). Survey of the mycobiota of Spanish malting barley and evaluation of the mycotoxin producing potential of species of *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium*. *Int. J. Food Microbiol.* **108**, 196–203.
- Moretti A., Logrieco A.F., Susca A. (2017). Mycotoxins: An Underhand Food Problem. *Methods Mol Biol.* **1542**, 3-12.
- Mugrabi de Kuppler A.L., Steiner U., Sulyok M., Krska R., Oerk E.C. (2011). Genotyping and phenotyping of *Fusarium graminearum* isolates from Germany related to their mycotoxin biosynthesis. *Int. J. Food Microbiol.* **151**, 78–86.
- Munkvold G.P. (2017). *Fusarium* Species and Their Associated Mycotoxins. *Methods Mol Biol.* **1542**, 51-106.
- Murray M.G., Tompson P.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Res.* **8**, 4321-4325.
- Nielsen L.K., Cook D.J., Edwards S.G., Ray R.V. (2014). The prevalence and impact of *Fusarium* head blight pathogens and mycotoxins on malting barley quality in UK. *Int. J. Food Microbiol.* **179**, 38–49.
- Niessen L., Donhauser, S., Weideneder, A., Geiger, E. (1991). Möglichkeiten einer verbesserten isuellen Beurteilung des mikrobiologischen Status von Malz. *Brauwelt* **131**, 1556–1562.

- Nogueira M., Decundo J., Martinez M., Dieguez S., Moreyra F., Moreno M., Stenglein S. (2018). Natural Contamination with Mycotoxins Produced by *Fusarium graminearum* and *Fusarium poae* in Malting Barley in Argentina. *Toxins* **10**, 78.
- O'Donnell K., Kistler H.C., Tacke, B.K., Casper H.H. (2000). Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proc. Nat. Academy Sci. USA* **97**, 7905-7910.
- O'Donnell K., Sutton D.A., Rinaldi M.G., Magnon K.C., Cox P.A., Revankar S.G., Padhye A. (2004). Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus DNA sequence data and amplified fragment length polymorphism analyses: evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage and nosocomial origin. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 5109-5120.
- Oliveira P.M., Waters D.M., Arendt E.K. (2013). The impact of *Fusarium culmorum* infection on the protein fractions of raw barley and malted grains. *Appl. Microbiol.* **97**, 2053–2064.
- Osborne L.E., Stein J.M. (2007). Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. *Int. J. Food Microbiol.* **119**, 103–108.
- Palazzini J.M., Ramirez M.L., Torres A.M., Chulze S.N. (2007). Potential biocontrol agents for *Fusarium* head blight and deoxynivalenol production in wheat. *Crop Prot.* **26**, 1702–1710.
- Palazzini J.M., Dunlap C.A., Bowman M.J., Chulze S.N. (2016). *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation: Genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles. *Microbiol. Res.* **192**, 30–36.
- Palazzini J.M., Yerkovich N., Alberione E., Chiotta M., Chulze S.N. (2017). An integrated dual strategy to control *Fusarium graminearum* sensu stricto by the biocontrol agent *Streptomyces* sp. RC 87B under field conditions. *Plant Gene* **9**, 13–18.
- Palazzini J., Roncallo P., Cantoro R., Chiotta M., Yerkovich N., Palacios S., Chulze S. (2018). Biocontrol of *Fusarium graminearum* sensu stricto, Reduction of deoxynivalenol accumulation and phytohormone induction by two selected antagonists. *Toxins* **10**, 88.
- Pérez C., Dill-Macky R., Kinkel L.L. (2008). Management of soil microbial communities to enhance populations of *Fusarium graminearum*-antagonists in soil. *Plant Soil* **302**, 53–69.

- Pestka J. (2010). Toxicological mechanisms and potential health effects of deoxynivalenol and nivalenol. *World Mycotoxin J.* **3**, 323-347.
- Piacentini K.C., Savi G.D., Pereira M.E.V., Scussel V.M. (2015). Fungi and the natural occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in malting barley (*Hordeum vulgare* L.). *Food Chem.* **187**, 204–209.
- Placinta C.M., D’Mello J.P.F., Macdonald A.M.C. (1999) A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Sci. Technol.* **78**, 21–37.
- Rocha O., Ansari K., Doohan F.M. (2005) Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review. *Food Addit. Contam.* **22**, 369–378.
- Rodríguez-Carrasco Y., Fattore M., Albrizio S., Berrada H., Mañes J. (2015). Occurrence of *Fusarium* mycotoxins and their dietary intake through beer consumption by European population. *Food Chem.* **178**, 149–155.
- Roer Hjelkrem A.G., Torp T., Brodal G., Aamot H.U., Strand E., Nordskog B., Dill-Macky R., Edwards S.G., Hofgaard I.S. (2017). DON content in oat grains in Norway related to weather conditions at different growth stages. *Eur. J. Plant Pathol.* **148**, 577–594.
- Sarlin T., Laitila A., Pekkarinen A., Haikara A. (2005). Effects of three *Fusarium* species on the quality of barley and malt. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **63**, 43–49.
- Schisler D.A., Khan N.I., Boehm M.J., Slininger P.J. (2002). Greenhouse and field evaluation of biological control of *Fusarium* Head Blight on durum wheat. *Plant Dis.* **86**, 1350–1356.
- Schisler D.A., Khan N.I., Boehm M.J., Lipps P.E., Slininger P.J., Zhang S. (2006). Selection and evaluation of the potential of choline-metabolizing microbial strains to reduce *Fusarium* head blight. *Biol. Control* **39**, 497–506.
- Schöneberg T., Martinb C., Wettsteina F., Buchelia T.D., Mascherb F., Bertossab M., Musaa T., Kellerc B., Vogelgsang S. (2016). *Fusarium* and mycotoxin spectra in Swiss barley are affected by various cropping techniques. *Food Addit. Contam.* **10**, 1608–1619.
- Schwarz P.B., Jones L.J., Steffenson B.J. (2002). Enzymes associated with *Fusarium* infection of barley. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **60**, 130–134.

- Schwarz P.B., Schwarz J.G., Zhou A., Prom L.K., Steffenson B.J. (2001). Effect of *Fusarium graminearum* and *Fusarium poae* infection on barley and malt quality. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **54**, 55–63.
- Somma S., Alvarez C., Ricci V., Ferracane L., Ritieni A., Logrieco A., Moretti A. (2010). Trichothecene and beauvericin mycotoxin production and genetic variability in *Fusarium poae* isolated from wheat kernels from northern Italy. *Food Addit. Contam.* **27**, 729-737.
- Stenglein S.A. (2009). *Fusarium*: a pathogen that needs more attention. *J. Plant Pathol.* **91**, 25-36.
- Sulyok M., Krska R., Schuhmacher R. (2007). A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **389**, 1505-1523.
- Szécsi Á., Bartók T., Varga M., Magyar D., Mesterházy Á. (2005). Determination of trichothecene chemotypes of *Fusarium graminearum* strains isolated in Hungary. *J. Phytopathol.* **153**, 445–448.
- Thrane U., Adler A., Clasen P.E., Galvano F., Langseth W., Lew H., Ritieni A. (2004). Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium sporotrichioides*. *Int. J. Food Microbiol.* **95**, 257–266.
- Umpiérrez-Failache M., Garmendia G., Pereyra S., Rodríguez-Haralambides A., Ward T. J., Vero S. (2013). Regional differences in species composition and toxigenic potential among *Fusarium* head blight isolates from Uruguay indicate a risk of nivalenol contamination in new wheat production areas. *Int. J. Food Microbiol.* **166**, 135–140.
- Vanheule A., De Boevre M., Moretti A., Scauflaire J., Munaut F., De Saeger S., Audenaert K. (2017). Genetic divergence and chemotype diversity in the *Fusarium* head blight pathogen *Fusarium poae*. *Toxins* **9**, 255.
- Vaughan A., O'Sullivan T., van Sinderen D. (2005). Enhancing the microbiological stability of malt and beer—A review. *J. Inst. Brew.* **111**, 355–371.
- Vogelgsang S., Musa T., Bänzinger I., Kägi A., Bucheli T.D., Wettstein F.E., Pasquali M., Forrer H. (2017). *Fusarium* mycotoxins in Swiss wheat: a survey of growers' samples between 2007 and 2014 shows strong year and minor geographic effects. *Toxins* **9**, 246.

- Wang L.Y., Xie Y.S., Cui Y.Y., Xu J., He W., Chen H.G., Guo J.H. (2015). Conjunctively screening of biocontrol agents (BCAs) against *Fusarium* root rot and *Fusarium* head blight caused by *Fusarium graminearum*. *Microbiol. Res.* **177**, 34–42.
- Wegulo S., Bockus W., Hernandez Nopsa J., Peiris K.H.S., Dowell F.E. (2013). Integration of Fungicide Application and Cultivar Resistance to Manage *Fusarium* Head Blight in Wheat. In *Fungicides - Showcases of Integrated Plant Disease Management from Around the World* (InTech doi: 10.5772/53096).
- Windels C.E. (2000) Economic and social impacts of *Fusarium* head blight: changing farms and rural communities in the Northern Great Plains. *Phytopathology* **90**, 17–21.
- Wolf-Hall C.E. (2007). Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing. *Int. J. Food Microbiol.* **119**, 89–94.
- Xu X.M., Nicholson P., Thomsett M.A., Simpson D., Cooke B.M., Doohan F.M., Brennan J., Monaghan S., Moretti A., Mulè G., Hornok L., Beki E., Tatnell J., Ritieni A., Edwards S.G. (2008). Relationship between the fungal complex causing *Fusarium* head blight of wheat and environmental conditions. *Phytopathology* **98**, 69–78.