

## **Fuentes de inóculo de especies de *Fusarium* potenciales productoras de micotoxinas en el agroecosistema soja**

### **Inoculum sources of potential toxigenic *Fusarium* species in the soybean agroecosystem**

María Laura Chiotta, Sofía Chulze, Germán Barros

Originales: *Recepción:* 30/06/2014 - *Aceptación:* 01/06/2015

#### **RESUMEN**

La mayoría de los estudios de diversidad, capacidad toxicogénica e incidencia de micotoxinas se han focalizado en trigo y maíz, y poca información se encuentra disponible sobre soja. Los objetivos del presente trabajo fueron: evaluar posibles fuentes de inóculo de las especies de *Fusarium* potenciales productoras de micotoxinas en estadios reproductivos R6 y R8 del cultivo de soja; determinar la incidencia natural de deoxinivalenol (DON) y nivalenol (NIV) en los granos y evaluar el perfil de producción de tricotecnos de las cepas de *F. graminearum*. En todas las fuentes evaluadas, se recuperaron cepas de *Fusarium* spp. con altos niveles de incidencia. *Fusarium equiseti* fue la especie predominante en aire, vainas y semillas de ambos estadios analizados, mientras que cepas del complejo *F. solani* y *F. oxysporum* fueron dominantes en rastrojos tanto de maíz como maní. En cuanto a *F. graminearum*, los rastrojos de cultivos antecesores serían una fuente de inóculo más importante que el aire circundante del cultivo, aspecto que no había sido explorado con anterioridad en este cultivo. Además, se recuperó un mayor número de cepas de *F. graminearum* de vainas respecto de las semillas provenientes de dichas vainas, que mostraron una baja incidencia de contaminación natural con DON.

#### **Palabras clave**

soja • *Fusarium* • inóculo • deoxinivalenol

---

Departamento de Microbiología e Inmunología. Facultad de Ciencias Exactas Físico Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta Nacional 36 Km 601, Río Cuarto, Córdoba, Argentina. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

## ABSTRACT

Most of the studies of diversity, toxigenic potential and mycotoxin occurrence respect to *Fusarium* species have focused on wheat and maize, and there is little information on soybean crop. Our aims in the present study were to: evaluate the inoculum sources of toxigenic *Fusarium* species associated with soybean during crop reproductive stages; determine the occurrence of deoxynivalenol (DON) and nivalenol (NIV) in soybean seeds and characterize the trichothecenes profile of *F. graminearum* strains. A high incidence of *Fusarium* spp. was observed in all inoculum sources evaluated. *Fusarium equiseti* was the dominant species in air, pods and seeds of both stages, while strains belonging to *F. solani* complex and *F. oxysporum* were dominant in both corn and peanuts residues. Respect to *F. graminearum*, the results show that the crops residues would source more relevant than the surrounding air of crop, something that had not been explored previously in soybean. Moreover, levels of *F. graminearum* isolates were greater on pods than on seeds that showed a low incidence of DON contamination.

### Keywords

soybean • *Fusarium* species • inoculum sources • deoxynivalenol

## INTRODUCCIÓN

Argentina es uno de los principales productores de soja a nivel mundial ocupando el tercer lugar detrás de Estados Unidos y Brasil. Sin embargo, Argentina es el primer exportador mundial de productos de soja procesados: aceites y harinas proteicas (17).

La contaminación fúngica puede afectar la calidad de la semilla y del grano ocasionando diversos tipos de daños tales como: disminución de la germinabilidad, decoloración, calentamiento, pudrición y probable aparición de micotoxinas. Estas toxinas tienen efectos perjudiciales para la salud por su toxicidad, debido a que disminuyen la disponibilidad de alimentos proteicos, afectan la inmunidad humoral y celular causando una mayor predisposición a las infecciones microbianas y por la morbimortalidad de animales de producción (11). Además, ocasionan pérdidas económicas derivadas de la comercialización de materias primas contaminadas, ya que

los límites de tolerancia establecidos en la comercialización internacional son cada vez más exigentes (13). Por lo tanto, es importante avanzar en el conocimiento de las condiciones que favorecen dicha contaminación, entender cómo llegan los hongos productores al sustrato y cómo es la evolución de los mismos a través del tiempo, para posteriormente evaluar las estrategias de prevención y/o control (25).

Las especies de *Fusarium* son consideradas los patógenos de plantas más importantes del mundo, y presentan la capacidad de sintetizar una amplia variedad de micotoxinas que pertenecen a tres grandes grupos: sesquiterpenos (tricotecenos tipo A y B), derivados de policétidos (fumonisinas) y lactonas (zearalenona) (15).

La soja es una leguminosa con alto contenido de proteínas y aceite, lo que la hace diferente a otras semillas y granos de consumo masivo, como maíz, trigo y

arroz y la contaminación con micotoxinas en soja ha sido comparativamente poco estudiada en el mundo y específicamente en Argentina (4, 8, 24). Sin embargo, dichos trabajos muestran que las micotoxinas cuya incidencia requiere mayor atención son fundamentalmente deoxinivalenol (DON) y zearalenona (ZEA) producidas principalmente por especies del complejo *F. graminearum*.

Actualmente, sobre la base de estudios de reconocimiento de especies filogenéticas y concordancia genealógica, Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition (GCPSR), se demostró que el complejo *F. graminearum* está formado por al menos 16 especies filogenéticas separadas estructural y biogeográficamente. (12). Dentro de este complejo, *F. graminearum* es la especie responsable de la podredumbre del tallo y la mazorca en maíz, así como de fusariosis de la espiga en trigo (9) y ha sido relacionada en trabajos previos con patologías en base de tallo, raíz y semillas (7, 26) y la contaminación con DON en soja (34).

Las cepas de *F. graminearum* suelen expresar uno de tres grupos de metabolitos de tricotecenos: nivalenol y derivados acetilados (quimiotipo NIV), 3-acetildeoxinivalenol y DON (quimiotipo 3-AcDON), o 15-acetildeoxinivalenol y DON (quimiotipo 15-AcDON).

La caracterización de la vía biosintética de los tricotecenos, ha llevado a la identificación de genes *TRI* útiles para la discriminación entre los diferentes genotipos productores, mediante métodos basados en PCR (33).

La supervivencia de *F. graminearum* en soja es de particular importancia ya que tanto maíz como trigo, donde esta especie es patógena, son cultivos comúnmente usados en rotaciones con soja en Argentina.

El hongo patógeno puede estar presente y sobrevivir como micelio en

residuos de la cosecha, desarrollándose de forma saprofitica.

Durante condiciones favorables, *F. graminearum* produce peritecios con ascosporas (esporas sexuales) que son expulsadas y se dispersan por movimientos de aire y junto a los conidios (esporas asexuales) constituyen las fuentes de inóculo primario. Los conidios se diseminan por medio de la lluvia y así arriban a hospederos o sustratos donde producen enfermedad, micotoxinas, o ambos (22).

### Objetivos

Evaluar posibles fuentes de inóculo de las especies de *Fusarium* potenciales productoras de micotoxinas a partir de muestras de aire, rastrojos, vainas y semillas en estadios reproductivos del cultivo de soja; determinar la incidencia natural de tricotecenos tipo B (DON y NIV) en los granos de soja en los estadios reproductivos R6 y R8 y determinar el perfil de producción de tricotecenos de las cepas de *F. graminearum* por un método de PCR múltiple.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### Muestreo

El muestreo se realizó durante la campaña agrícola 2012/2013 en dos campos pertenecientes a la Universidad Nacional de Río Cuarto (Río Cuarto, Córdoba) donde se cultivó soja de la variedad Nidera A 5009 RG, utilizando siembra directa como método de labranza con dos cultivos antecesores: maíz y maní. Los muestreos se realizaron en ambos lotes (100m x 100m, aproximadamente) en dos estadios fenológicos del cultivo de soja, R6 (formación de la semilla) y R8 (maduración). Las muestras de aire, rastrojos, vainas y semillas fueron

tomadas trazando dos secciones diagonales desde los vértices del lote. Un total de 10 muestras (5 de cada diagonal) fueron tomadas aproximadamente cada 10 metros de distancia.

### **Aislamiento de las especies pertenecientes al Género *Fusarium***

-Muestras de aire: las esporas de *Fusarium* en el aire circundante a los campos de soja evaluados fueron colectadas en placas de Petri conteniendo el medio selectivo pentacloronitrobenzeno (PCNB) (21) en los puntos de muestreo descritos anteriormente.

Las placas de Petri fueron colocadas abiertas durante 15 minutos en dirección del viento en distintas bandas horarias desde la mañana a la noche.

Una vez expuestas en el campo, las placas fueron selladas y llevadas al laboratorio donde se incubaron a 24°C con períodos de 12 horas de luz blanca y 12 horas de luz negra durante 7 días.

Las cepas pertenecientes al género *Fusarium* se subcultivaron en medio agar nutriente sintético, Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) para su posterior identificación.

-Rastrojos: se siguió la metodología propuesta por Pereyra & Dill-Macky (2008) y la metodología de incubación descrita precedentemente.

-Vainas y semillas: en cada punto de muestreo se seleccionaron 10 plantas al azar y una vez en el laboratorio se separaron las vainas del resto del material vegetal.

A partir de cada una de las muestras se seleccionaron 100 vainas al azar, se abrieron manualmente y se recuperaron las semillas a las que se les midió la actividad acuosa con un equipo Aqualab Serie 3 (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA).

Tanto vainas como semillas se secaron a temperatura ambiente y fueron almacenadas a 4°C hasta su análisis, siempre dentro de la misma semana de obtención. Como paso previo al aislamiento, 100 vainas y 100 semillas de cada muestra y de cada estadio se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 1% durante 1 minuto.

Posteriormente, se realizaron tres lavados sucesivos con agua destilada estéril y se siguió la metodología de aislamiento descrita precedentemente. Una vez transcurrido el período de incubación, se calcularon los porcentajes de infección del género *Fusarium* a través de la siguiente relación:  $(n^{\circ} \text{ semillas infectadas} / n^{\circ} \text{ semillas totales}) \times 100$ .

Las cepas pertenecientes al género *Fusarium* se subcultivaron en el medio SNA para su posterior identificación a nivel de especie.

### **Identificación de las especies de *Fusarium***

A partir del cultivo de cada cepa en SNA se realizaron aislamientos monospóricos para obtener cultivos puros, en el medio agar hojas de clavel (AHC) en placas de Petri de 6 cm y en un tubo de ensayo conteniendo el medio agar papa glucosado (APG). Los cultivos se incubaron durante dos semanas con ciclos alternativos de luz blanca / luz negra de 12 horas a 24°C.

Para la identificación de las especies de *Fusarium* se observaron las características microscópicas luego del desarrollo de las cepas en AHC, y las características culturales en APG, siguiendo la metodología propuesta por Nelson *et al.* (1983) y Leslie y Summerell (2006).

La densidad relativa de cada especie fue calculada como:  $(\text{número de cepas aisladas de una especie} / \text{número total de cepas obtenidas}) \times 100$ .

### **Determinación de la incidencia natural de tricotecenos tipo B deoxinivalenol (DON) y nivalenol (NIV) en granos de soja de los estadios reproductivos R6 y R8**

La contaminación con tricotecenos tipo B (DON y NIV) se evaluó siguiendo la metodología propuesta por Barros *et al.* (3) con modificaciones.

Cada muestra de soja fue molida, cuarteada y 25 g fueron extraídos con 2 g NaCl, 40 ml de hexano y 100 ml de una mezcla de acetonitrilo:agua (84:16, v/v) por agitación durante 30 min.

El extracto obtenido fue colocado a 4°C toda la noche y luego se filtró a través de un filtro de papel Whatman N° 4.

Posteriormente, 8 ml del filtrado fueron pasados a través de una columna de limpieza Mycosep™ 227 (RomerLabs. Inc., Union, MO) recuperándose 4 ml que fueron evaporados bajo flujo de nitrógeno gaseoso en un bloque de calor (Thermoscientific, Rockford, IL, USA).

El residuo seco fue resuspendido en 400 µl de agua:metanol (88:12, v/v), homogeneizada en vórtex e inyectada en el sistema HPLC.

Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo en una columna C<sub>18</sub> de fase reversa (150 mm × 4,6 mm d.i., 5 µm tamaño de partícula; Luna-Phenomenex, Torrance, CA, USA). La fase móvil fue agua:metanol (88:12, v/v) a un flujo de 1,5 ml/min. Las micotoxinas fueron detectadas con UV a 220nm (Detector programable Hewlett Packard modelo 1100, Palo Alto, CA, USA) y cuantificadas por un módulo de datos (Hewlett Packard Kayak XA, HP ChemStation Rev. A.06.01, Palo Alto, CA, USA).

Los niveles de micotoxinas fueron calculados comparando el área del pico cromatográfico de las muestras con aquellas de soluciones testigos cargadas en una curva de calibración.

El límite de detección fue de 0,1 µg g<sup>-1</sup> para DON and 0,2 µg g<sup>-1</sup> para NIV, basados en un radio señal-ruido de 3:1.

### **Determinación del genotipo de producción de tricotecenos de las cepas de *F. graminearum* por PCR múltiple**

Para la producción de la biomasa fúngica, se transfirió una pequeña cantidad de propágulos fúngicos desde el medio SNA de cada cepa a frascos Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio completo (MC) (10).

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

El micelio congelado se pulverizó en morteros con nitrógeno líquido para lograr la ruptura mecánica de las células y se distribuyó 1,5 g del mismo en tubos tipo Eppendorf.

El ADN se extrajo con buffer bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) siguiendo la metodología propuesta por Leslie y Summerell (2006). Para la determinación del genotipo de tricotecenos por PCR múltiple se siguió la metodología desarrollada por Quarta *et al.* (2006).

Los experimentos de PCR múltiples se llevaron a cabo utilizando cebadores específicos, cuya secuencia, gen blanco y tamaño de los fragmentos amplificados se muestran en la tabla 1 (pág. 176).

El ADN de cada cepa a evaluar se diluyó en agua bidestilada estéril hasta alcanzar una concentración aproximada de 10-25 ng/µl. De dicha dilución, se utilizó 5 µl y a estos se les adicionó posteriormente 45 µl de la mezcla de reacción:

**Tabla 1.** Secuencias de cebadores y fragmentos amplificados en los diferentes genotipos de tricotecenos.**Table 1.** Primers sequences and amplified fragments in different trichothecenes genotypes.

Cebador	Secuencia del cebador (5' - 3')	Gen blanco	Producto amplificado (pb)	Genotipo
3551H	ACT TTC CCA CCG AGT ATT TT	Tri5	525	DON
4056H	CAA AAA CTG TTG TTC CAC TGC C			
Tri3F971	CAT CAT ACT CGC TCT GCT G	Tri3	708	15-AcDON
Tri3R1679	TT(AG) TAG TTT GCA TCA TT(AG) TAG			
Tri3F1325	GCA TTG GCT AAC ACA TGA	Tri3	354	3-AcDON
Tri3R1679	TT(AG) TAG TTT GCA TCA TT(AG) TAG			
Tri7F340	ATC GTG TAC AAG GTT TAC G	Tri7	625	NIV
Tri7R965	TTC AAG TAA CGT TCG ACA AT			

Fuente/Source: Quarta *et al.* (2006).

Buffer PCR 1X conteniendo MgCl<sub>2</sub> en una concentración de 1,5 mM, 2U de *Taq* DNA polimerasa (Promega), dNTPs (Invitrogen Argentina) en una concentración de 2 mM, una concentración de 0,2 mM para los cebadores Tri3 y 0,1 mM para los cebadores Tri7.

Posteriormente, la cubeta fue colocada en un termociclador PTC-2000 (MJ Research Inc.) usando el programa que constó de los siguientes pasos: (1) 94°C 3 min; (2) 94°C 30 seg; (3) 53°C 30 seg; (4) 72°C 1 min; (5) Repetición de los pasos 2, 3 y 4 durante 34 veces; (6) 72°C 10 min; (7) 4°C 5 min.

En cada amplificación se utilizó un control negativo conteniendo todos los reactivos excepto el ADN molde y controles positivos de cada genotipo.

Los fragmentos amplificados fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio.

### Análisis estadístico

La comparación de la variable dependiente porcentaje de infección en

rastrojos, vainas y semillas se realizó utilizando análisis de varianza (ANOVA) y comparación entre medias se llevó a cabo con el test de Duncan de Rangos Múltiples ( $P < 0,05$ ) (29).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En diversos estudios realizados sobre soja que determinaron la contaminación fúngica, las semillas han recibido mayor atención que la incidencia de hongos en vainas, rastrojos y muestras de aire. Sin embargo, desde el punto de vista epidemiológico es importante reconocer de qué manera un hongo patógeno, o saprófito que puede convertirse en oportunista, llega a la semilla.

En el presente estudio, se decidió trabajar en dos estadios reproductivos del desarrollo de la planta de soja en el cual las semillas pueden ser infectadas por distintas especies de *Fusarium* y existe riesgo de formación de micotoxinas, evaluado las posibles vías de contaminación como los rastrojos de cultivos

antecesores y el aire circundante al cultivo. Los porcentajes de infección con especies de *Fusarium* en rastrojo variaron entre 60 y 100%, y no se observaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los estadios reproductivos R6 y R8 en ambos campos independientemente del cultivo antecesor (figura 1).

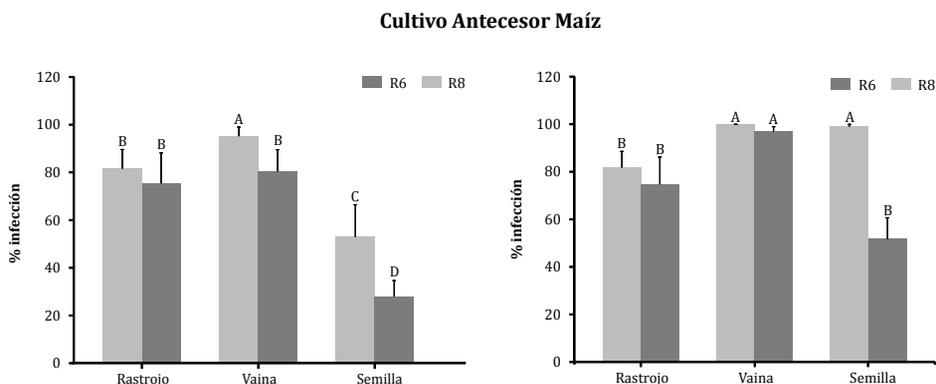
Respecto de la contaminación en vainas y semillas, la incidencia de *Fusarium* spp. fue significativamente mayor en las vainas en comparación con las semillas en ambos campos. En estas últimas se observaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en los porcentajes de infección entre las etapas reproductivas evaluadas, observándose en ambos campos mayores porcentajes de infección en las semillas del estadio R6 que mostraron niveles de actividad acuosa mayores respecto de las semillas del estadio R8 (figura 1).

En contraste, otros estudios han demostrado que la tasa de pérdida de

humedad se ha correlacionado positivamente con la incidencia de patógenos, tales como *Phomopsis* spp., en el intervalo entre las etapas de crecimiento R6 y R8 en el cultivo de soja en Estados Unidos (2, 32).

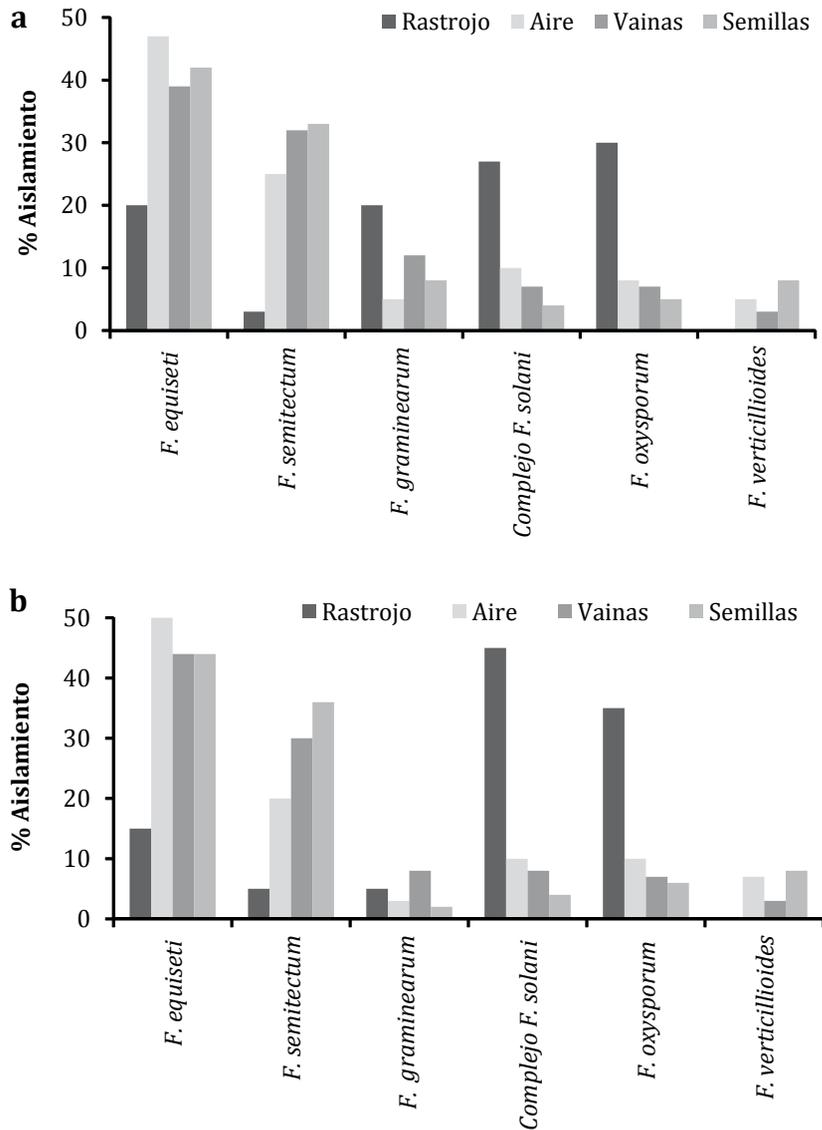
En cuanto a la identificación de las especies, se analizó un total de 480 cepas fúngicas (240 por campo, 30 cepas/ sustrato/estadio), observándose que la especie *F. equiseti* fue predominante en las muestras de aire ( $n=51$ ), vainas ( $n=49$ ) y semillas ( $n=50$ ), tanto en el estadio reproductivo R6 como R8, con densidades relativas que variaron entre un 13 y 50% en ambos campos evaluados, seguida por la especie *F. semitectum* (figura 2 a y 2 b, pág. 178; figura 3 a y 3 b pág. 179).

Este resultado concuerda con un estudio previo realizado en laboratorio que demostró que estas especies eran las más frecuentemente aisladas en el agroecosistema soja antes de la cosecha (5).



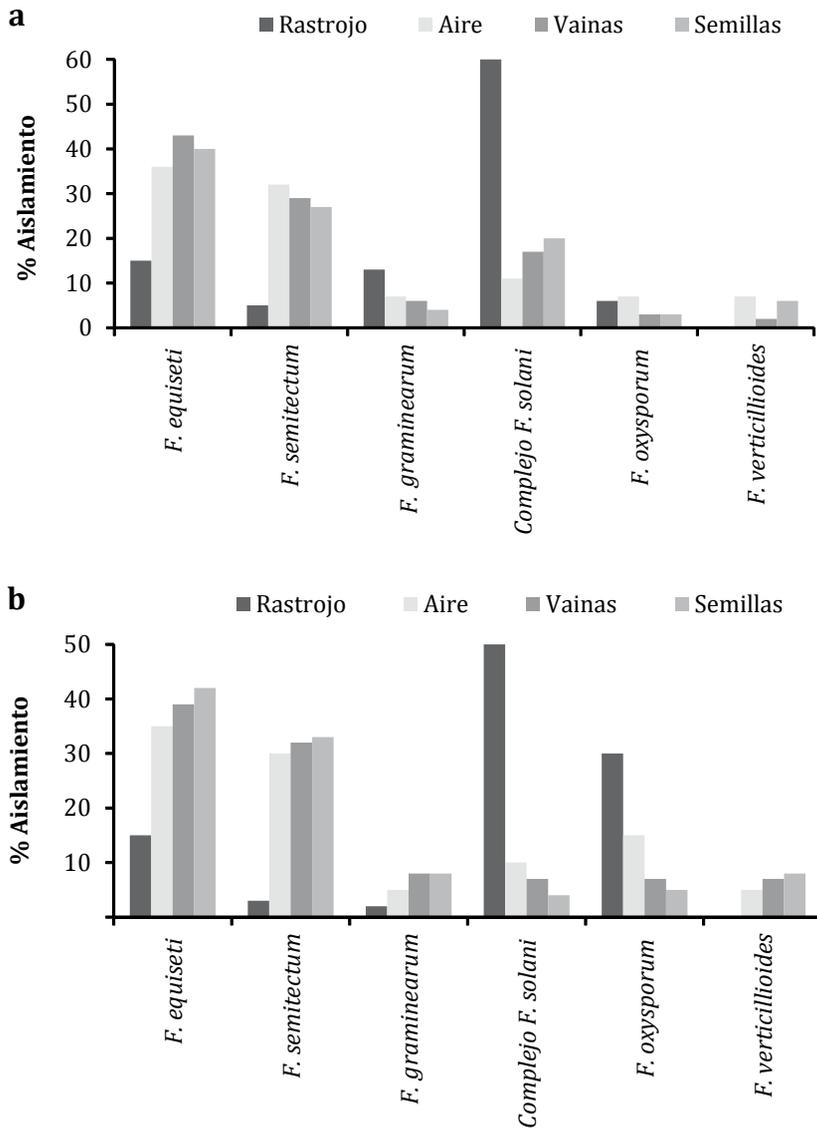
**Figura 1.** Porcentajes de infección de *Fusarium* spp. en rastrojos, vainas y semillas en los estadios reproductivos R6 y R8. Las barras que no presentan letras iguales son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

**Figure 1.** Infection percentage of *Fusarium* spp. isolated from residues crops, pods and seeds at R6 and R8 reproductive growth stages. Bars not sharing a common letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).



**Figura 2.** Frecuencia de aislamiento (%) de las especies de *Fusarium* en rastrojos, aire, vainas y semillas de los estadios R6 (a) y R8 (b) en el campo de soja con maíz como cultivo antecesor.

**Figure 2.** Isolation frequency of different *Fusarium* species from crop residues, air, pods and seeds at R6 (a) and R8 (b) reproductive growth stages in the soybean field using maize as preceding crop.



**Figura 3.** Frecuencia de aislamiento (%) de las especies de *Fusarium* en rastrojos, aire, vainas y semillas de los estadios R6 (a) y R8 (b) en el campo de soja con maní como cultivo antecesor.

**Figure 3.** Isolation frequency of different *Fusarium* species from crop residues, air, pods and seeds at R6 (a) and R8 (b) reproductive growth stages in the soybean field using peanut as preceding crop.

La predominancia de dichas especies demuestra un bajo riesgo toxicológico debido a una limitada capacidad de producción de micotoxinas por parte de las mismas (6).

En cuanto a las cepas aisladas a partir de los rastrojos tanto de maíz como de maní, se observó una marcada prevalencia de especies pertenecientes a los complejos *F. solani* (n=52) con densidades relativas que variaron entre 26 y 47%, seguidas por *F. oxysporum* (n=25) con densidades relativas entre 6 y 30%. Pereyra & Dill-Macky (2008) observaron similar predominancia de especies en residuos de girasol en Uruguay, sin embargo en rastrojos de maíz *F. verticillioides* fue la especie predominante.

La tercera especie en importancia aislada de rastrojos tanto de maíz como de maní fue *F. equiseti* (n=20), con densidades relativas entre 13 y 20%. Fernandez *et al.* (2008) mostraron una correlación negativa entre *F. equiseti* y varias especies de *Fusarium* en distintos tipos de rastrojos, sugiriendo que dicha especie tiene una ventaja competitiva como saprófita para posteriormente establecerse en los tejidos del huésped y tendría un fuerte efecto antagonista contra otras especies patógenas de *Fusarium* (16).

Una de las especies del género *Fusarium* de importancia en cuanto a la producción de micotoxinas, y específicamente, de DON es *F. graminearum*.

En general, la densidad relativa de esta especie fue baja y osciló entre 3 y 20%, siendo las vainas y los rastrojos los sustratos a partir de los cuales se recuperaron más cepas (n=37).

No se evidenciaron diferencias marcadas en cuanto al aislamiento de *F. graminearum* entre los rastrojos de maíz y maní, que son los cultivos antecesores comúnmente usados en el sudoeste de la provincia de Córdoba en rotación con soja.

En cuanto a las densidades relativas de *F. graminearum* en las muestras de aire, las mismas fueron bajas en ambos estadios y antecesores evaluados y no superaron el 7% (figura 2 a y 2 b, pág. 178; figura 3 a y 3 b, pág. 179).

Como ocurre con la gran mayoría de los hongos, *F. graminearum*, es haploide en la mayor parte de su ciclo de vida y el desarrollo de la faz sexual, comienza con la formación de hifas con células binucleadas y finaliza con la formación de un cuerpo fructífero o peritecio conteniendo sacos tubulares llamados ascos con ascosporas (esporas sexuales). Estas últimas constituyen una importante fuente de inóculo al ser transportadas largas distancias en la atmósfera por el viento hasta llegar al huésped susceptible (30).

En el caso de las esporas asexuales, que se producen abundantemente sobre los residuos de cosecha, sirven principalmente como un mecanismo de dispersión en distancias cortas que se diseminan por medio de la lluvia y así arriban a hospederos o sustratos donde producen enfermedad, micotoxinas, o ambos (31).

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, la principal fuente de inóculo de *F. graminearum* en soja serían los rastrojos de cultivos antecesores, más que el aire circundante del cultivo. Esto podría estar influenciado por el uso extendido de prácticas agrícolas conservacionistas, que deja abundantes residuos de cosecha en la superficie del suelo y favorecería la supervivencia de *F. graminearum* en el agroecosistema (19, 20).

Otro aspecto importante relacionado con la presencia de *F. graminearum* en rastrojos, es su rol como potencial patógeno en soja provocando podredumbre de raíz en plántulas (7, 26) y su asociación con un aumento en la podredumbre del

tallo de maíz en la región centro sur de Córdoba (18).

La existencia de datos que aporten información sobre la contaminación natural de micotoxinas en soja y subproductos en Argentina son limitados (4, 8, 23). Además, dichos trabajos se realizaron en soja obtenida al momento de la cosecha y muestras provenientes del ecosistema de almacenamiento.

En el presente estudio se analizó en total 40 muestras de semillas de soja, 20 muestras del estadio R6 y 20 correspondientes a R8. En cuanto a los tricotecenos del grupo B, en ninguna de las muestras se observó contaminación con nivalenol; mientras que solo una muestra correspondiente al estadio R6 en el campo con maíz como cultivo antecesor mostró contaminación con DON, en un nivel de 1,3 µg/g. Esta baja incidencia y nivel de contaminación observados están en concordancia con un estudio previo realizado en la zona de Río Cuarto en soja recién cosechada durante la campaña agrícola 2010/2011 (5).

En ambos estudios se observó una mayor frecuencia de aislamiento de *F. graminearum* en vaina respecto de las semillas provenientes de dichas vainas, esto podría estar relacionado con factores medioambientales, a un corto período de tiempo para colonizar las semillas y/o al grado de susceptibilidad del huésped al patógeno.

El presente estudio, junto al realizado en la campaña agrícola 2010/2011, muestra que la incidencia de DON en soja a nivel de campo en la provincia de Córdoba es baja. Sin embargo, conocer la dinámica en el perfil de producción de tricotecenos de las cepas *F. graminearum* aisladas en un cultivo y área determinada, puede ser de utilidad para evaluar variaciones en la distribución de genotipos y también para

identificar posibles patógenos emergentes que puedan aumentar el riesgo de contaminación de los granos cosechados.

Para determinar el genotipo de producción de tricotecenos de las cepas de *F. graminearum* (n=52) aisladas del agroecosistema soja se utilizó un método de PCR múltiple, donde se amplificaron fragmentos de los genes Tri3, Tri5 y Tri7 involucrados en la vía biosintética de tricotecenos.

Los resultados mostraron que el 100% de las cepas analizadas pertenecieron al genotipo 15-AcDON, es decir que muestran la capacidad de producir simultáneamente DON y su derivado acetilado 15-AcDON, y amplificaron dos fragmentos de 525 y 708 pb correspondientes a los genes Tri5 (DON) y Tri3 (15-AcDON), respectivamente (figura 4, pág. 182). Estos resultados concuerdan con trabajos previos, los cuales determinaron que el genotipo 15-AcDON es el dominante en cepas de *F. graminearum* aisladas de trigo (1, 28) y soja en Argentina (5).

## CONCLUSIONES

El presente trabajo aporta nuevos datos respecto de la dinámica de las poblaciones de distintas especies de *Fusarium* en el cultivo de soja, siendo la especie *F. equiseti* la que mostró mayor prevalencia en vainas, semillas y el aire en los estadios reproductivos R6 y R8.

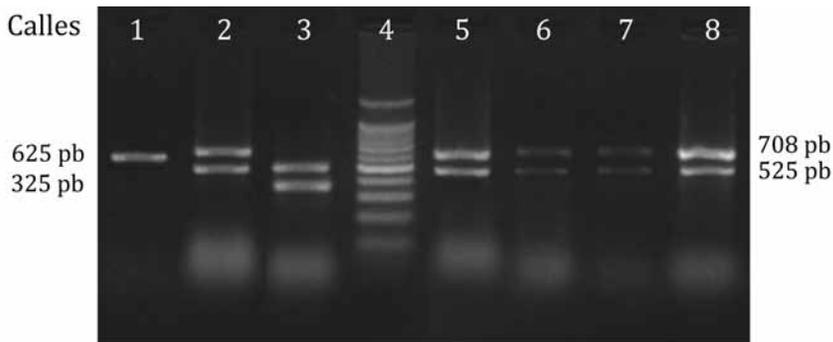
Los resultados obtenidos muestran que los rastrojos de cultivos antecesores serían una fuente de inóculo de *F. graminearum* más importante que el aire circundante del cultivo, aspecto que no había sido explorado con anterioridad en este cultivo.

Además, la recuperación de un mayor número de cepas de *F. graminearum* en

vainas respecto de las semillas provenientes de dichas vainas, evidenciaría cierta incapacidad de *F. graminearum* de infectar el grano que se vio reflejada en una baja incidencia de contaminación natural con DON en la semilla.

Nuevos estudios se están realizando para evaluar la agresividad de cepas de

*F. graminearum* con diferentes genotipos de producción de tricotecenos en vainas y semillas de soja y el papel que desempeñan las micotoxinas en la virulencia de dichas cepas sobre el cultivo.



**Figura 4.** Productos de amplificación obtenidos usando PCR múltiple con los cebadores de los genes Tri3, Tri5 y Tri7. Línea 1: genotipo NIV (cepa control *F. culmorum*). Línea 2: genotipo 3 AcDON (cepa control *F. culmorum*). Línea 3: genotipo 15 AcDON (cepa control *F. graminearum*). Línea 4: Marcador de peso molecular (100 pb). Líneas 5-8 cepas de *F. graminearum* aisladas de soja.

**Figure 4.** Amplification fragments of multiplex PCR assay. Lane 1: positive control of NIV genotype (*F. culmorum* strain). Line 2 positive control of 3-ADON genotype (*F. culmorum* strain). Line 3 positive control of 15-ADON genotype (*F. graminearum* strain). Lane 4, 100-pb ladder marker; lanes 5-8, 15-ADON genotype soybean isolates.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarez, C. L.; Somma, S.; Proctor, R. H.; Stea, G.; Mulè, G.; Logrieco, A.; Fernandez Pinto, V.; Moretti, A. 2011. Genetic diversity in *Fusarium graminearum* from a major Wheat-producing region of Argentina. *Toxins*. 3: 1294-1309.
2. Baird, R. E.; Abney, T. S.; Mullinix, B. G. 2001. Fungi associated with pods and seeds during the R6 and R8 stages of four soybean varieties in Southwestern Indiana. *Phytoprotection*. 82: 1-11.
3. Barros, G.; García, D.; Oviedo, S.; Ramirez, M. L.; Torres, A.; Chulze S. 2008. Deoxynivalenol and nivalenol analysis in soybean and soy flour. *World Mycot. J.* 1(3): 263-266.
4. Barros, G.; García, D.; Oviedo, S.; Ramirez, M. L.; Torres, A.; Lattanzio, V.; Pascale, M.; Chulze, S. 2011. Survey of T-2 and HT-2 toxins in soybean and soy meal from Argentina using immunoaffinity clean-up and high performance liquid chromatography. *World Mycot. J.* 4(2): 189-197.

5. Barros, G.; Alaniz Zanon, M. S.; Abod, A.; Oviedo, S.; Ramirez, M. L.; Reynoso, M. M., Torres, A.; Chulze, S. 2012a. Natural deoxynivalenol occurrence and genotype and chemotype determination of a field population of the *Fusarium graminearum* complex associated with soybean in Argentina. *Food Add. Contam.* 29: 293-303.
6. Barros, G.; Alaniz Zanon, M. S.; Palazzini J. M.; Haidukowski M.; Pascale M.; Chulze S. 2012b. Trichothecenes and zearalenone production by *Fusarium equiseti* and *Fusarium semitectum* species isolated from Argentinean soybean. *Food Add. Contam.* 29(9): 1436-1442.
7. Barros, G.; Alaniz Zanon, M. S.; Chiotta, M. L.; Reynoso, M. M.; Scandiani, M. M.; Chulze, S. 2014. Pathogenicity of species in the *Fusarium graminearum* complex on soybean seedlings in Argentina. *Eur. J. Plant Pathol.* 138: 215-222.
8. Boca, R. T.; Pacin, A. M.; Gonzalez, H. H. L.; Resnik, S. L.; Souza, J. C. 2003. Soja y micotoxinas: Flora fúngica- Variedades - Prácticas agronómicas. *Aceites y Grasas.* 4: 510-515.
9. Bottalico, A.; Perrone, G. 2002. Toxicogenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 611-624.
10. Correll, J. C.; Klittich C. J. R.; Leslie, J. F. 1987. Nitrate non-utilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology.* 77: 1640-1646.
11. De Buck, J.F.; Van Immerseel, F.; Haesebrouck, R.; Ducatelle, R. 2004. Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by *Salmonella*. *Appl. Microbiol.* 97(2): 233-45.
12. Desjardins, A. E.; Proctor, R. H. 2011. Genetic diversity and trichothecene chemotypes of the *Fusarium graminearum* clade isolated from maize in Nepal and identification of a putative new lineage. *Fungal Biol.* 115: 38-48.
13. FAO. 2004. Worldwide regulations for mycotoxin in food and feeds in 2003. Food and Nutrition Paper 81. FAO Organization of the United Nations, Roma.
14. Fernandez, M. R.; Huber, D.; Basnyat, P.; Zentner, R. P. 2008. Impact of agronomic practices on populations of *Fusarium* and other fungi in cereal and noncereal crop residues on the Canadian Prairies. *Soil and Till. Res.* 100: 60-71.
15. Leslie, J. F.; Summerell, B. A. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Professional, Ames, Iowa, USA. 388 p.
16. Luongo, L.; Galli, M.; Corazza, L.; De Haas, E. L.; Van Der Plas, C. L.; Köhl, J. 2005. Potential of fungal antagonists for biocontrol of *Fusarium* spp. in wheat and maize through competition in crop debris. *Biocontrol Sci. Technol.* 15(3): 229-242.
17. MAGPyA (Ministerio de Agricultura Ganadería Pesca y Alimentación de la Nación). 2013. Soja Informe general. Disponible en: <http://www.sagyp.mecon.gov.ar/new/0-0/agricultura/otros/estimaciones/soja/infsoja/php> (fecha de consulta 20/12/13).
18. Marinelli, A.; Oddino, C.; García, J.; Tarditi, L.; Ferrari, S.; D'Eramo, L.; Lenardon, J.; Palacios, S.; Chulze, S.; March, G. J. 2010. Podredumbre del tallo y raíz del maíz en la región centro sur de Córdoba. IX Congreso Nacional de Maíz. Simposio Nacional de Sorgo. Rosario, Argentina. 22-24 p.
19. Miller, J. D.; Culley, J.; Fraser, K.; Hubbard, S.; Meloche, F.; Ouellet, T.; Seaman, W. L.; Seifert, K. A.; Turkington, K.; Voldeng, H. 1998. Effect of tillage practices on *Fusarium* head blight of wheat. *Can. J. Plant Pathol.* 20: 95-103.
20. Munkvold, G. P. 2003. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41: 99-116.
21. Nelson, P. E.; Toussoun, T. A.; Marasas, W. F. O. 1983. *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park, PA, USA. 226 p.
22. Osborne, L. E.; Stein, J. M. 2007. Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. *Int. J. Food Microbiol.* 119: 103-108.
23. Pacin, A. M. 2006. ¿Existe un diagnóstico sobre micotoxinas en soja en Argentina?. 3º Congreso de Soja del Mercosur. Rosario, Santa Fe, Argentina. 285-287 p.
24. Pereyra, S. A.; Dill-Macky, R. 2008. Colonization of the residues of diverse plant species by *Gibberella zeae* and their contribution to *Fusarium* head blight inoculum. *Plant Dis.* 92(5): 800-807.

25. Perniola, O. S.; Staltari, S.; Chorzempa, S. E.; Astiz Gassó, M. M.; Molina, M. del C. 2014. Control biológico de *Fusarium graminearum*: utilización de *Trichoderma* spp. y biofumigación con parte aérea de *Brassica juncea*. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina. 46(2): 45-56.
26. Pioli, R. N.; Mozzoni, L.; Morandi, E. N. 2004. First report of pathogenic association between *Fusarium graminearum* and soybean. Plant Dis. 88: 220.
27. Quarta, A.; Mita, G.; Haidukowski, M.; Logrieco, A.; Mule, G.; Visconti, A. 2006. Multiplex PCR assay for the identification of nivalenol 3 and 15 acetyl deoxynivalenol chemotypes in *Fusarium*. FEMS Microbiol. Lett. 259: 7-13.
28. Reynoso, M. M.; Ramirez, M. L.; Torres, A.; Chulze, S. 2011. Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* strains isolated from wheat in Argentina. Int. J. Food Microbiol. 145: 444-448.
29. SAS Institute. 1998. SAS user guide. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
30. Schmale, D. G.; Leslie, J. F.; Zeller, K. A.; Saleh, A. A.; Shields, E. J.; Bergstrom, G.C. 2006. Genetic structure of atmospheric populations of *Gibberella zeae*. Phytopathology. 96: 1021-1026.
31. Shaner, G. E. 2003. Epidemiology of *Fusarium* Head Blight of small grain cereals in North America. In: Leonard, K. J., Bushnell, W. (Eds), *Fusarium* Head Blight of Wheat and Barley. APS Press, St. Paul, MN USA. 88-119.
32. Villarroel, D. A.; Baird, R. E.; Trevathan, L. E.; Watson, C. E.; Scroggs, M. L. 2004. Pod and seed mycoflora on transgenic and conventional soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] cultivars in Mississippi. Mycopathologia. 157: 207-215.
33. Ward, T. J.; Bielawski, J. P.; Kistler, H. C.; Sullivan, E.; O'Donnell, K. 2002. Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99: 9278-9283.
34. Wicklow, D. T.; Bennet, G. A.; Shotwell, O. L. 1987. Secondary invasion of soybean by *Fusarium graminearum* and result in mycotoxin contamination. Plant Dis. 71: 1146.

#### AGRADECIMIENTOS

A Mariela Bruno encargada del Campo Experimental de la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC) por su predisposición y permitirnos la utilización de los lotes donde se realizó el muestreo.

El presente trabajo ha sido financiado con fondos de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT-2457/11) y la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Río Cuarto.