

ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Fusarium* spp.  
OBTENIDOS A PARTIR DE MUESTRAS DE SUELO DE REGIONES SOJERAS DE  
ARGENTINA

Trabajo Final de Grado  
de la alumna



VIVIANA NATALIA DECKER

Este trabajo ha sido presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Licenciada en Genética

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.  
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino, 21 Marzo de 2024

ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Fusarium* spp.  
OBTENIDOS A PARTIR DE MUESTRAS DE SUELO DE REGIONES SOJERAS DE  
ARGENTINA

Trabajo Final de Grado  
de la alumna

VIVIANA NATALIA DECKER

Aprobada por el Tribunal Evaluador

Dra. María Lorena Roldán  
**Evaluador/a**

Dr. Pablo Copia  
**Evaluador/a**

Dra. Diana Acosta  
**Evaluador/a**

Dr. Miguel A. Lavilla  
**Director**

Dra. Agustina Affinito  
**Co-Directora**

Dra. Juliana Iglesias  
**Co-Directora**

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,  
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires

Pergamino, 21 de Marzo 2024

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	5
RESUMEN .....	6
INTRODUCCIÓN .....	8
El cultivo de soja y enfermedades asociadas .....	8
El género <i>Fusarium</i> .....	9
Enfermedades causadas por <i>Fusarium</i> en soja .....	10
Manejo de enfermedades causadas por <i>Fusarium</i> en soja .....	13
Importancia del análisis morfológico y molecular de <i>Fusarium</i> .....	13
HIPÓTESIS .....	16
OBJETIVOS .....	16
OBJETIVO GENERAL.....	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
MATERIALES Y MÉTODOS .....	17
Origen y obtención de los aislamientos .....	17
Caracterización morfológica de los aislamientos .....	18
Caracterización molecular de los aislamientos .....	18
Análisis de secuencias .....	20
Obtención de haplotipos y análisis de polimorfismos .....	21
Construcción de árboles filogenéticos a partir de los datos moleculares.....	22
Análisis considerando datos morfológicos y moleculares.....	23
Análisis <i>a posteriori</i> .....	23
RESULTADOS.....	24
Caracterización morfológica de los aislamientos .....	24
Caracterización molecular de los aislamientos.....	25

Amplificación, secuenciación y BLAST .....	25
Análisis de la diversidad genética .....	29
Relaciones haplotípicas .....	30
Construcción de árboles filogenéticos.....	35
Caracterización conjunta utilizando información morfológica y molecular .....	41
Análisis <i>a posteriori</i> .....	42
DISCUSIÓN .....	45
CONCLUSIONES.....	48
BIBLIOGRAFÍA .....	49
ANEXOS .....	57
Anexo I.....	57
Anexo II.....	59
Anexo III.....	65
Anexo IV .....	69

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios que puso en mi vida a personas maravillosas que me ayudaron en mi formación tanto profesional como personal.

A mi familia: mi mamá Dora, mi papá Roberto, mis abuelas Lidia y María a mis hermanos Karen y Marcelo, a Sergio y a mis dos bebés Blasito y Agustín, por el apoyo y aguante en los buenos y malos momentos.

A mi director Miguel Lavilla, que confió en mí para desarrollar este tema.

A mis co-directoras Agostina Affinito y Juliana Iglesias que me guiaron y dieron la fuerza para poder terminar la escritura.

A mis compañeros que me apoyaron en cada momento: Daniela, Lorena, Agostina, Abel, Carla, María Laura y Manuela que convierten mis días en hermosos momentos compartidos.

A los chicos de informática Mariano, Gaspar y Eduardo que me instalaron los softwares que necesitaba y me resolvieron cada urgencia.

A Virginia Zelada que me enseñó a usar los programas. A Noelia Rodríguez por su apoyo.

A todas las personas que rezaron y se preocuparon para que yo llegue hasta este momento.

Gracias Totales...

## .RESUMEN

El género *Fusarium* abarca más de 400 especies de hongos, y se anticipa que continúen siendo descritas nuevas especies en el futuro. Las especies de este género son habitantes naturales del suelo, causando diferentes patologías en cultivos de importancia agronómica en Argentina, lo cual conlleva grandes pérdidas de rendimiento. En el cultivo de soja existen diferentes enfermedades causadas por *Fusarium* spp. El objetivo de este trabajo fue estudiar la variabilidad morfológica y molecular en aislamientos de *Fusarium* obtenidos a partir de muestras de suelo en diferentes localidades de Argentina. Para ello se analizaron 30 aislamientos de este género mediante tres caracteres: color de micelio, densidad de micelio y diámetro de la colonia a los 7 días de siembra en medio Agar Papa Dextrosa (APD). Posteriormente se llevó adelante la amplificación por PCR y secuenciación de dos fragmentos de las regiones genómicas conocidas *Elongation factor 1-alpha (EF1)* e *Internal transcribed spacer +5.8S nrDNA (ITS)*. Las secuencias se editaron con el programa Bioedit y se buscó homología en la base de datos de *GenBank* mediante BLASTn. Uno de los aislamientos no presentó homología con el género *Fusarium* por lo cual se descartó de los análisis posteriores. Se encontraron secuencias pertenecientes a siete especies: *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *F. solani*, *F. acuminatum*, *F. neocosmoporiellum*, *F. triseptatum* y *F. cerealis*. A partir de las secuencias de los aislamientos y de las secuencias publicadas en *GenBank* se encontraron 15 haplotipos para *EF1* y 6 para *ITS* mediante el programa DnaSP v6. Se realizaron redes haplotípicas a través de la aplicación PopArt y estudios filogenéticos utilizando el método de reconstrucción filogenética de Neighbor Joining (NJ) con el programa MEGAXI y el método de inferencia bayesiana mediante el paquete informático BEAST 2.5. Además, se realizó un análisis conjunto con los haplotipos de las dos regiones génicas con el programa InfoGen utilizando el coeficiente de emparejamiento simple y la metodología de encadenamiento promedio. Se realizaron análisis *a posteriori* comparando las características morfológicas (fenotipo fúngico), considerando su lugar de colecta, y su clasificación molecular de especie (basado en *EF1*), no obstante, no se encontraron tendencias de ningún tipo. En conclusión, se encontró que las variantes haplotípicas de los aislamientos presentaron homología con secuencias presentes en la base de datos del *GenBank* pertenecientes a siete especies que pueden producir enfermedades en el cultivo de

soja según la bibliografía consultada. Una de ellas (*F. triseptatum*) no ha sido reportada en Argentina hasta el momento. El gen *EF1* fue el que mejor permitió clasificar y agrupar a los aislamientos según las posibles especies de pertenencia que se habían encontrado por homología. Por otra parte, el gen *ITS* permitió discriminar hasta género, lo cual coincide con lo reportado en la bibliografía. Contar con información sobre el género y la especie de un patógeno es una herramienta fundamental para el manejo eficiente de los cultivos y el desarrollo sustentable de la agricultura.

## **INTRODUCCIÓN**

### **El cultivo de soja y enfermedades asociadas**

La soja (*Glycine max* L. Merr.) tiene su origen en China y se ha cultivado tradicionalmente para consumo del grano. Ocupa en la actualidad el octavo lugar en cuanto a producción, con un valor anual aproximado de 320 millones de toneladas, luego de cultivos como maíz, trigo y arroz, constituyéndose en el cultivo oleaginoso de mayor importancia a nivel mundial. Estados Unidos, Brasil y Argentina producen, en conjunto, más del 80 % del total de la producción mundial (Martino *et al.*, 2014). Argentina presentó en la campaña 2021/2022 una superficie sembrada de 16 millones de hectáreas, una producción de casi 40 millones de toneladas y un rendimiento promedio de 2723 kg ha<sup>-1</sup> (SAGyP, 2023). Las provincias con mayor producción de soja fueron Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe y Entre Ríos.

Si se repasa la historia del cultivo en el país, se aprecia que durante la década del 60 el esfuerzo estuvo dedicado a investigación, conocimiento y promoción del cultivo, mientras que la década del 70 marcó el despegue del mismo (Giorda *et al.*, 1997). A partir de la década del 80 la superficie sembrada se incrementó considerablemente, pasando desde casi 1,7 millones de hectáreas en el ciclo 1980/81 hasta 18,7 millones de hectáreas en el 2009 convirtiéndose en el principal cultivo del país con el 55 % del área agrícola total (Ivancovich *et al.*, 2009). La difusión de variedades resistentes a herbicidas y la siembra directa, convirtieron a la Argentina en uno de los principales exportadores mundiales de aceite y harina de soja, lo que constituye la principal fuente de ingreso de divisas para el país.

Diversos factores afectan la producción de soja, tales como el manejo del suelo y el cultivo, las condiciones climáticas predisponentes y factores abióticos y bióticos. Dentro de estos últimos se encuentran las enfermedades, que pueden perjudicar al cultivo desde la siembra hasta la cosecha, e incluso en el período de almacenamiento. En Argentina, la reducción en la producción de soja debida a las enfermedades se calculada en alrededor de 900 mil toneladas por año, causando pérdidas de más de 250 millones de dólares (Reznikov *et al.*, 2020). Son especialmente relevantes las enfermedades fúngicas, favorecidas por el monocultivo y el uso de labranzas conservacionistas ya que los agentes fúngicos sobreviven en rastrojos en el suelo (Ivancovich *et al.*, 2003; Distefano *et al.*, 2010).

Durante las últimas décadas diferentes enfermedades han causado problemas sanitarios en el cultivo de soja en Argentina. La enfermedad de mayor importancia económica desde finales de la década de los '70 ha sido la podredumbre húmeda del tallo causada por *Sclerotinia sclerotiorum* (Wrather *et al.*, 1997). También han sido de importancia la muerte de plántulas por *damping off* causada por *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* spp.; y la podredumbre de la semilla por *Phomopsis sojiae*, *Colletotrichum* spp. y *Fusarium* spp. (Lavilla & Ivancovich, 2021). En la década del '90 y a principios de los 2000, ocurrieron epifitias de *S. sclerotiorum*, cancro del tallo causado por *Diaporthe phaseolorum*, mancha ojo de rana causada por *Cercospora sojina* y podredumbre carbonosa del tallo causada por *Macrophomina phaseolina* (Ploper, 2004). Además, la soja fue afectada por el síndrome de la muerte repentina (SDS, del inglés *soybean death syndrome*) causado por *Fusarium tucumaniae*, *F. virguliforme* y otras especies de *Fusarium* (Scandiani *et al.*, 2004). Desde el año 2000, han presentado importancia en la zona núcleo de Argentina las llamadas enfermedades de fin de ciclo (EFC) que afectan a los tallos, hojas, vainas y semillas de las plantas de soja, provocando una senescencia prematura y una disminución del rendimiento y de la calidad de las semillas (Reznikov *et al.*, 2019). Entre las principales EFC se encuentran la mancha marrón, causada por *Septoria glycines* Hemmi, la mancha ojo de rana causada por *Cercospora sojina* Hara y el tizón foliar causado por *Cercospora kikuchii*.

Actualmente, las principales enfermedades del cultivo de soja en Argentina son el SDS, la podredumbre carbonosa, el tizón foliar causado por *Cercospora*, la mancha marrón, la mancha anillada (*Corynespora cassiicola*) y la podredumbre del tallo por *Sclerotinia* (Lin *et al.*, 2002).

### **El género *Fusarium***

La clasificación y taxonomía del género *Fusarium* es la siguiente:

Super Reino: Eucariota

Reino: Fungi

Sub-reino: Dikarya

Phylum: Ascomycota

Sub- phylum: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Sub-clase: Hypocreomycetidae

Orden: Hypocreales

Familia: Nectriaceae

Género: *Fusarium*

Los hongos del género *Fusarium* son ascomicetos filamentosos y cosmopolitas, tienen un micelio bien desarrollado, tabicado y conidióforos característicos (macroconidios, microconidios y clamidosporas), aunque algunas especies tienen un talo unicelular (Leslie & Summerell, 2008).

*Fusarium* pertenece a la clase de hongos imperfectos, sus conidióforos se forman sobre una base y toda la estructura se denomina esporodoquio (Figura 1; Agrios, 2005).

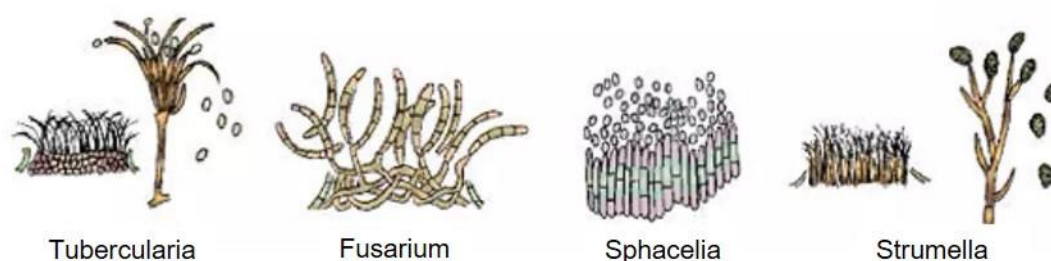


Figura 1: Estructuras que forman los hongos imperfectos sobre esporodoquios. Tomada de Agrios (2005).

Además de dañar a cultivos de importancia agronómica, *Fusarium* produce micotoxinas y otros metabolitos, que pueden ser perjudiciales para la seguridad alimentaria. La identificación de géneros y especies de manera exacta resulta importante para llevar adelante estrategias de tratamiento o manejo en el sector agrícola (Crous *et al.*, 2021).

### **Enfermedades causadas por *Fusarium* en soja**

Los hongos del género *Fusarium* son habitantes naturales de los suelos, causando diferentes patologías en especies cultivadas de importancia agronómica en Argentina. En el cultivo de soja se pueden manifestar diferentes enfermedades según la especie de *Fusarium* que lo infecte. Las principales enfermedades causadas por este género

en el cultivo son marchitamiento, síndrome de muerte súbita, podredumbre de semilla y plántula (*i.e damping off*), y pudrición de la raíz (Díaz *et al.*, 2013).

Una de las enfermedades más importantes que puede estar causada por *Fusarium* spp. es el *damping-off*, que afecta a las semillas antes o durante la germinación, generando una reducción en la emergencia de plántulas, plántulas atrofiadas y con crecimientos débiles (Zhang *et al.*, 2016). Cuando el agente causal del *damping-off* es *Fusarium* puede haber varias especies involucradas: *F. acuminatum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. pallidoroseum*, *F. rigidiusculum*, *F. solani*, *F. sporotrichoides* y *F. ricinctum* (Stewart & Rodríguez, 2013). Cuando *Fusarium* se detecta en infecciones tempranas como en el *damping-off*, en pre-emergencia, o en post-emergencia, puede provenir de las semillas sembradas o del suelo. En las semillas se encuentra ubicado normalmente en los tegumentos y puede pasar al cotiledón en infecciones severas. Luego del período de almacenaje, si se mantiene activo el patógeno, es responsable de la muerte de plántulas y de plántulas anormales en el período de germinación y emergencia. Por otra parte, las especies mencionadas son organismos saprófitos que pueden permanecer en residuos de cosechas y en el suelo, como consecuencia de la siembra directa y el monocultivo de soja. En general, aparece asociado a *Phomopsis* spp. y los síntomas de ambos son difíciles de diferenciar en plántulas (Lavilla *et al.*, 2016).

En línea con lo mencionado, *Fusarium* causa deterioro patológico de las semillas, disminuyendo su vigor, lo que ha podido comprobarse en laboratorio y campo con pruebas de vigor o pruebas de estrés y en siembras tempranas con bajas temperaturas (Giachino *et al.*, 2004). Los síntomas de podredumbre de semilla se observan como un desarrollo micelial algodonoso de colores rosa claro, amarillento o blanco, cuando las mismas están expuestas a condiciones de humedad mayor al 80 % y temperaturas de 25 °C (Gally *et al.*, 2006).

El síndrome de muerte repentina (SDS) puede estar causado por *Fusarium* spp, y es una enfermedad que genera grandes pérdidas económicas en toda América (Silva, *et. al.* 2023). Se caracteriza por clorosis y necrosis foliar, pudrición radicular, decoloración vascular de tallos y raíces, defoliación y muerte. Las especies de *Fusarium* que pueden causarlo son las del complejo *Fusarium solani*: *F. virguliforme*, *F. tucumaniae* y *F. brasiliense*, entre otras (Aoki *et al.*, 2012). En la Figura 2 se muestra su ciclo biológico.

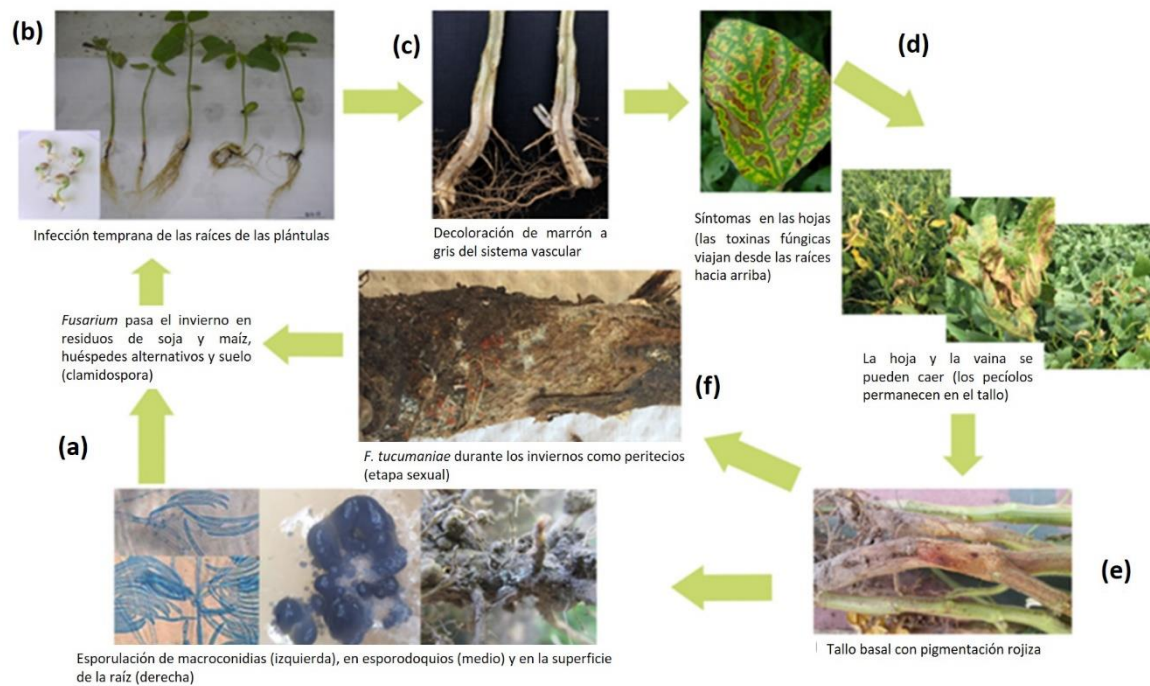


Figura 2: Ciclo biológico del síndrome de la muerte súbita en soja. Imagen adaptada de Rodríguez *et al.* (2021).

Cuatro especies del complejo *F. graminearum* fueron encontradas en asociación a la soja en Argentina: *F. graminearum sensu stricto*, *F. cortaderiae*, *F. meridionale* y *F. boothii* (Chiotta *et al.*, 2015). Especies de dicho complejo se identificaron como patógenas del cultivo en Sudamérica, produciendo decoloración de la vaina, podredumbre de raíz y podredumbre de semillas (citas contenidas en Chiotta *et al.*, 2015). Se trata de un hongo necrotrófico que se hospeda principalmente en gramíneas y por su capacidad saprofita sobrevive en los rastrojos de especies no gramíneas como la soja. En los residuos de cosecha se forman los peritecios, que maduran con temperaturas y humedad adecuadas y en presencia de luz, liberando ascosporas, que son la principal fuente de inóculo para las infecciones primarias. Los granos infectados pueden generar debilitamiento o muerte de las plántulas (Okello *et al.*, 2020).

Otras enfermedades de importancia causadas por el género *Fusarium* son los tizones, podredumbre de raíz y marchitez. Esta última también conocida como fusariosis, incluye el amarillamiento y la defoliación de la planta, desde abajo hacia arriba acompañado por el amarronamiento y ennegrecimiento del tejido vascular del tallo, culminando en necrosis (Ellis *et al.*, 2014). La fusariosis ocasiona estos síntomas debido al bloqueo en el transporte de agua y nutrientes producido por parte del hongo,

principalmente *F. oxysporum*. Este patógeno puede también causar podredumbre de raíz si las condiciones edafoclimáticas son favorables. *F. solani* también causa podredumbre de raíz en plántulas y plantas jóvenes (Figura 3), mientras que esta enfermedad es generalmente causada en plantas adultas por *F. equiseti*, *F. moniliforme*, y *F. graminearum* (Stewart & Rodríguez, 2013).



Figura 3. Síntomas de podredumbre de raíz inoculadas con *Fusarium graminearum* (a), *F. oxysporum* (b) y *F. solani* (c), comparadas con un control sin inocular (d). Imagen tomada de Zhang *et al.*, (2013).

### **Manejo de enfermedades causadas por *Fusarium* en soja**

El manejo de las enfermedades causadas por especies de *Fusarium* requiere de la integración de diversas tácticas. Por un lado, es cada vez más importante el uso de variedades resistentes, basadas en el hallazgo de diversas fuentes de resistencia mediante mejoramiento genético tradicional y herramientas biotecnológicas como el mapeo de QTL, GWAS y uso de transgénesis (Hartman *et al.*, 2015). También puede realizarse el tratamiento de semillas mediante fungicidas (Ellis *et al.*, 2011), aunque por sí solo no es suficiente. Por otra parte, existen prácticas agronómicas fundamentales en el manejo de enfermedades fúngicas, como la rotación y diversificación de cultivos (Leandro *et al.*, 2018; Marburger *et al.*, 2015), con la idea de evitar la siembra de soja en lotes donde haya habido enfermedades asociadas al cultivo. En este sentido, la destrucción de rastrojos podría generar beneficios, pero no es compatible con la siembra directa que se realiza habitualmente en nuestro país.

### **Importancia del análisis morfológico y molecular de *Fusarium***

El control de las enfermedades fúngicas ha dependido, en gran medida, de los tratamientos con agroquímicos. Sin embargo, su uso representa un severo riesgo

para la salud humana y contribuye al aumento de la contaminación al medioambiente, así como también a la generación de microorganismos altamente resistentes que conducen a enfermedades fúngicas con mayor incidencia que antes (Villa *et al.*, 2015). Para reducir este problema, existe la necesidad de buscar y adoptar estrategias que sean accesibles, sencillas de aplicar y no tóxicas para seres humanos y animales (Naeini *et al.*, 2010). Una alternativa es la utilización de organismos benéficos o controladores biológicos, como los hongos del género *Trichoderma*, que controlan a otros hongos mediante la competencia por el espacio, rápido crecimiento, la síntesis de enzimas degradadoras de la pared celular de los hongos patógenos y producción de sustancias antibióticas, que inducen mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos (Guzmán-Guzmán *et al.*, 2019; Alfiky & Weisskopf, 2021).

Una de las principales limitaciones en el control de las enfermedades de la soja causadas por especies de *Fusarium* es la falta de información sobre la identidad de los patógenos que afectan actualmente a los cultivos y el desarrollo de métodos adecuados para su manejo (Sun *et al.*, 2022). La identificación precisa a nivel de especie de un agente etiológico es crucial para el diagnóstico y el manejo de la enfermedad, ya que ayuda a establecer su distribución geográfica y sus hospedadores (O'Donnell *et al.*, 2022).

El género *Fusarium* comprende más de 400 especies y se considera que aún restan por describir muchas más. La identificación morfológica de los hongos es el primer paso y el que requiere de más experiencia y formación para llevar adelante un adecuado proceso de identificación. Si bien lo morfológico suele no ser suficiente para llegar a una identificación completa, suele proporcionar mucha información valiosa (Rahjoo *et al.*, 2008). Sin embargo, es importante destacar que análisis adicionales, como la secuenciación de regiones específicas del ADN, son necesarios para confirmar la identidad taxonómica de los aislamientos (O'Donnell *et al.*, 2022).

Considerando que el género *Fusarium* es de importancia económica en Argentina al menos desde la década del 80, en este trabajo se llevó adelante un muestreo de suelos de diferentes regiones sojeras del país a los fines de conocer patógenos presentes en los mismos y su potencialidad para impactar el cultivo de soja. En este sentido se realizó la caracterización morfológica y molecular de aislamientos de *Fusarium* obtenidos a partir de las muestras de suelo mencionadas.

Los análisis generados en este trabajo nos permitirán tener un mayor conocimiento de las especies de *Fusarium* facilitando su manejo agronómico en la región sojera, generando beneficios económicos y dando respuesta a la sociedad en su conjunto.

## **HIPÓTESIS**

Existe variabilidad morfológica y molecular entre aislamientos de *Fusarium* obtenidos a partir de muestras de suelo de diferentes localidades sojeras de Argentina.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la variabilidad morfológica y molecular en aislamientos de *Fusarium* obtenidos a partir de muestras de suelo de diferentes localidades de Argentina.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar morfológicamente aislamientos de *Fusarium* obtenidos a partir de muestras de suelo de diferentes localidades del país.
- Analizar la variabilidad molecular entre los aislamientos de *Fusarium* mediante la secuenciación de dos regiones genómicas y comparar con secuencias presentes en bases de datos conocidas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Origen y obtención de los aislamientos**

Se analizaron 30 aislamientos de *Fusarium* spp. (Anexo I y II) obtenidos a partir de muestras de suelo colectadas en distintas localidades de las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, Entre Ríos y Chaco (Tabla 1, Figura , Figura 13).

Tabla 1: Origen de los aislamientos de *Fusarium* spp. Se indica la provincia, la localidad, la cantidad de aislamientos por localidad y los números de identificación (ID) bajo el cual fueron registrados en la colección del Laboratorio de Fitopatología de la ECANA-UNNOBA.

<b>Provincia</b>	<b>Localidad</b>	<b>Cantidad</b>	<b>ID</b>
Buenos Aires	Carlos Casares	3	1, 2, 30
Buenos Aires	Fontezuela	2	6, 7
Buenos Aires	Rojas	2	18, 28
Buenos Aires	Chacabuco	1	11
Buenos Aires	Saliqueló	1	20
Buenos Aires	General Villegas	1	21
Buenos Aires	Necochea	1	22
Buenos Aires	Vedia	1	24
Córdoba	Marcos Juárez	1	3
Córdoba	Hernando	1	4
Córdoba	Río Primero	1	19
Córdoba	Sampacho	2	5, 29
Córdoba	Coronel Moldes	2	9, 10
Córdoba	Laboulaye	1	12
Misiones	Colonia Almada	1	16
Santa Fe	Zavalla	1	15
Santa Fe	Palacio	1	13
Santa Fe	Los Cardos	1	25
Entre Ríos	Gualeguaychú	2	8, 27
Entre Ríos	Rincón de Nogoyá	1	17
Entre Ríos	Seguí	2	14, 26
Chaco	Pampa del Infierno	1	23

Los aislamientos se obtuvieron siguiendo el protocolo de extracción de tierra para el aislamiento y cuantificación de patógenos que es de uso cotidiano en el Laboratorio de Fitopatología de la ECANA-UNNOBA (Leslie & Summerell, 2008 con modificaciones) (Anexo I). De cada parcela en estudio, se tomaron cinco muestras de 30 cm de profundidad utilizando un barreno. El muestreo se hizo formando una W y se homogeneizó el suelo recolectado. La muestra debidamente rotulada se conservó en una bolsa de color negro en heladera a  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ .

### Caracterización morfológica de los aislamientos

Se repicó cada aislamiento bajo cámara de flujo laminar vertical en placas de Petri previamente preparadas utilizando como medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (APD). Se dejó incubar durante 7 días en una cámara de crecimiento a  $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ , con alternancia de doce horas de luz negra (320-400 nm) y doce horas de oscuridad. Las características macroscópicas que se evaluaron fueron: color de micelio (CM; blanco, blanco-rosado, sepia, amarillo-rosado, blanco violáceo, bordó), densidad de micelio (DM; relajado, compacto) (Figura 4), y diámetro a los 7 días de la siembra (7DDS; cm). Fueron evaluadas a simple vista y/o bajo microscopio estereoscópico.



Figura 4: Escalas visuales usadas para registrar las características morfológicas de los aislamientos de *Fusarium* en estudio. a) Escala para CM. b) Escala para DM.

### Caracterización molecular de los aislamientos

En colaboración con el Laboratorio de la EEA Pergamino, INTA, se cultivaron los aislamientos durante 7 días en placas de Petri con APD a  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$  en oscuridad. De

cada placa de Petri se tomaron aproximadamente 50 mg de micelio fresco a partir del área de crecimiento activo y se extrajo el ADN genómico siguiendo el protocolo de Liu *et al.* (2000) con modificaciones menores (Anexo IV). Se verificó la integridad del ADN extraído en gel de agarosa 0,8 %, teñido con bromuro de etidio (0,5 g/ml). La concentración del ADN se estimó en forma visual a partir de imágenes de dichos geles comparando con un marcador de peso molecular de 100pb.

El ADN extraído se utilizó en la amplificación de dos fragmentos de las regiones genómicas conocidas como factor de elongación 1-alfa (*EF1*) y el espaciador transcrito interno (*ITS*), mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los cebadores que se indican en la Tabla 2.

Tabla 2: Cebadores utilizados para la amplificación de las secuencias *EF1* e *ITS* en aislamientos de *Fusarium*. Se indica la secuencia, la temperatura de unión ( $T_m$ ), el origen bibliográfico y el tamaño del amplicón que genera el par de cebadores en pares de bases (pb).

Nombre	Secuencia	Origen bibliográfico	$T_m$ (°C)	Tamaño aproximado del amplicón (pb)
EF1	5'– ATGGGTAAGGAGGACAAGAC–3'	O'Donnell <i>et al.</i> (1998)	60	743
EF2	5'– GGAAGTACCAGTGATCATGTT–3'			
ITS1	5'–TCCGTAGGTGAACCTGCGG–3'	White <i>et al.</i> (1990)	58	546
ITS4	5'–TCCTCCGCTTATTGATATGC–3'			

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de reacción de 30  $\mu$ l. En cada reacción se utilizó 0,31  $\mu$ l de cada dNTP 200  $\mu$ M, 4  $\mu$ l de *Buffer* Taq 10X, 1,6  $\mu$ l de  $Mg^{2+}$  2,5 mM, 0,62  $\mu$ l de cada cebador 10 mM, 0,26  $\mu$ l (5U/ $\mu$ l) de Taq ADN Polimerasa Pegasus (PB-L, Argentina) y aproximadamente 70 ng de ADN templado. Se llevaron a cabo en un termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher, Estados Unidos), utilizando el siguiente perfil de PCR: 5 min a 95 °C; 35 ciclos de 30 seg a 95 °C, 30 seg a 58 o 60 °C según  $T_m$  del par de cebadores empleado y 45 seg a 72 °C; y una etapa final de extensión de 10 min a 72 °C. El producto de amplificación se visualizó en un gel de agarosa 0,8 %, teñido con bromuro de etidio (0,5 g/ml) para comprobar la existencia de un único amplicón con un peso molecular cercano al esperado. El producto de PCR se envió a purificar y secuenciar por la empresa Macrogen (Corea). En el caso de *EF1* se realizó la secuenciación en los dos sentidos por recomendación de la empresa por tener más de 600pb, y para *ITS* en sentido directo por tener menos de 600 pb.

## **Análisis de secuencias**

Cada secuencia obtenida se editó con el programa Bioedit (Hall, 1999) a fin de eliminar los errores de secuenciación al principio y al final de la secuencia. Con las secuencias editadas de *EF1* e *ITS* se hizo un BLASTn (*nucleotide Basic local Alignment search tool*) en el sitio web del NCBI (Madden, 2013). Dicho procedimiento sirvió para verificar que las secuencias obtenidas corresponden a esos genes, para confirmar la pertenencia al género *Fusarium* y determinar la posible especie a la que pertenecen.

Se realizaron alineamientos múltiples utilizando la herramienta ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) del paquete BioEdit. Se obtuvieron, además, alineamientos agregando las secuencias de *GenBank* de alta homología con los aislamientos según los resultados de los BLASTn realizados con anterioridad, y secuencias pertenecientes a otros géneros para usar como *outgroup* (Tabla 3).

Tabla 3: Secuencias de *EF1* e *ITS* para diferentes especies de *Fusarium* utilizadas para el alineamiento múltiple, con sus respectivos números de acceso a *GenBank*. También se incluyeron secuencias de otros géneros como *outgroup*.

<b>Secuencia</b>	<b>Especie</b>	<b>Nº Acceso en GenBank</b>
<i>EF1</i>	<i>Fusarium solani</i>	KF939494.1
<i>EF1</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	LT548510.1
<i>EF1</i>	<i>Fusarium acuminatum</i>	MG826876.1
<i>EF1</i>	<i>Fusarium acuminatum</i>	MG826892.1
<i>EF1</i>	<i>Fusarium cerealis</i>	MH341231.1
<i>EF1</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	MH572242.1
<i>EF1</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	MH572264.1
<i>EF1</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	MH582351.1
<i>EF1</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	MK414771.1
<i>EF1</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	MN417194.1
<i>EF1</i>	<i>Fusarium triseptatum</i>	MZ921889.1
<i>EF1</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	OP985484.1
<i>EF1</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	OQ511046.1
<i>EF1</i>	<i>Cercospora kikuchii</i> ( <i>outgroup</i> )	XM_044798206.1
<i>ITS</i>	<i>Fusarium neocosmosporiellum</i> (= <i>Neocosmospora vasinfecta</i> )	JF699610.1
<i>ITS</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	KT215400.1
<i>ITS</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	MK243483.1
<i>ITS</i>	<i>Fusarium solani</i>	MN013858.1
<i>ITS</i>	<i>Fusarium cerealis</i>	MT558855.1
<i>ITS</i>	<i>Fusarium triseptatum</i>	MW016606.1
<i>ITS</i>	<i>Fusarium acuminatum</i>	OM811273.1
<i>ITS</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	OR018296.1
<i>ITS</i>	<i>Cercospora kikuchii</i> ( <i>outgroup</i> )	JF747035.1

### Obtención de haplotipos y análisis de polimorfismos

El número de haplotipos de cada secuencia se obtuvo con el programa DnaSP v6 (Rozaz *et al.*, 2017). Se denominan haplotipos a las secuencias de ADN de un

organismo que pueden ser definidas por variaciones de los polimorfismos de nucleótido simple (SNP) y las inserciones o deleciones (INDEL) (Nei, 2007). Se determinó la longitud en pares de bases de cada haplotipo, el número de sitios polimórficos (SP), el número de mutaciones (NM) y la diversidad haplotípica (DH), es decir la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar sean diferentes (Nei, 1987).

Las relaciones haplotípicas considerando sitios de muestreo fueron determinadas mediante el algoritmo *Median Joining* a través de la aplicación PopArt (Bandelt *et al.*, 1999; Leigh & Bryant, 2015).

### **Construcción de árboles filogenéticos a partir de los datos moleculares**

A partir de los fragmentos de los genes *EF1* e *ITS* correspondientes a los aislamientos, se realizaron los alineamientos con las secuencias obtenidas del NCBI, con y sin *outgroup* y se obtuvieron árboles filogenéticos mediante diferentes enfoques. Utilizando cada gen por separado, por un lado, se usaron los métodos de reconstrucción filogenética de máxima verosimilitud (MV), empleando el modelo de sustitución de *Maximum Composite Likelihood*, con el programa MEGAXI (Tamura *et al.*, 2021).

Un segundo tipo de abordaje filogenético se llevó a cabo a través del método de inferencia bayesiana mediante el paquete informático BEAST 2.5 (Bouckaert *et al.*, 2019). Para ello, previamente se estimaron los modelos de sustitución con jModelTest (Posada, 2008). El programa Tracer 1.7.1 (Rambaut *et al.*, 2018) fue empleado para determinar la convergencia de las cadenas de Markov, que se alcanzó en todas las ejecuciones. Los árboles se resumieron con la opción de *Maximum Clade Credibility* (MCC) usando *TreeAnnotator* 2.5.2 (Bouckaert *et al.*, 2019) y el árbol final fue visualizado en FigTree 1.4.4 (Rambaut, 2018).

En un tercer enfoque, a fin de considerar a los dos genes en conjunto, se generó una matriz con los haplotipos de cada secuencia blanco, la cual fue utilizada para realizar un análisis de conglomerados y un análisis de coordenadas principales con el programa InfoGen versión 2016 (Balzarini *et al.*, 2016). Se utilizó la distancia a partir del coeficiente de emparejamiento simple (*simple matching*) y la metodología de encadenamiento promedio (*average linkage* o UPGMA, *Unweighted Pair-Group Method using an Arithmetic Average*) (Sokal & Michener, 1958).

### **Análisis considerando datos morfológicos y moleculares**

Se realizaron dos análisis de conglomerados con el programa InfoGen. En uno se incluyeron solo las variables morfológicas (DC, DM y 7DDS) y el otro se realizó con los haplotipos correspondientes *EF1* e *ITS* y las variables morfológicas. En estos dos casos se utilizó la distancia a partir del coeficiente de Gower (Gower & Ross, 1969), porque permite relacionar variables cuantitativas y cualitativas en el mismo análisis y la metodología de encadenamiento promedio ya mencionada.

### **Análisis *a posteriori***

Una vez determinadas las posibles especies de pertenencia de cada aislamiento mediante los análisis previos, se realizaron análisis comparativos entre ellas. La distribución de las variables cualitativas CM y DM se analizó a través de pruebas de Chi cuadrado ( $p \leq 0,05$ ) utilizando a las posibles especies como criterio de clasificación. Para el análisis del 7DDS se aplicó análisis de varianza (ANOVA). Por otra parte, a partir de los haplotipos de *EF1* e *ITS* se realizó un análisis de la varianza molecular (AMOVA) mediante el programa InfoGen utilizando la distancia de emparejamiento simple. Este análisis se realizó para determinar la existencia de variabilidad entre y dentro de las especies de *Fusarium*.

## RESULTADOS

### Caracterización morfológica de los aislamientos

Previamente, en base a características macro y microscópicas, los 30 aislamientos incluidos en este estudio se habían clasificado como pertenecientes al género *Fusarium* (Dr. M. Lavilla, comunicación personal). En el presente trabajo se realizó una caracterización macroscópica de las colonias CM, DM, 7DDS (Anexo II).

En la Figura 5 se observan las distribuciones de frecuencia de las tres variables evaluadas.

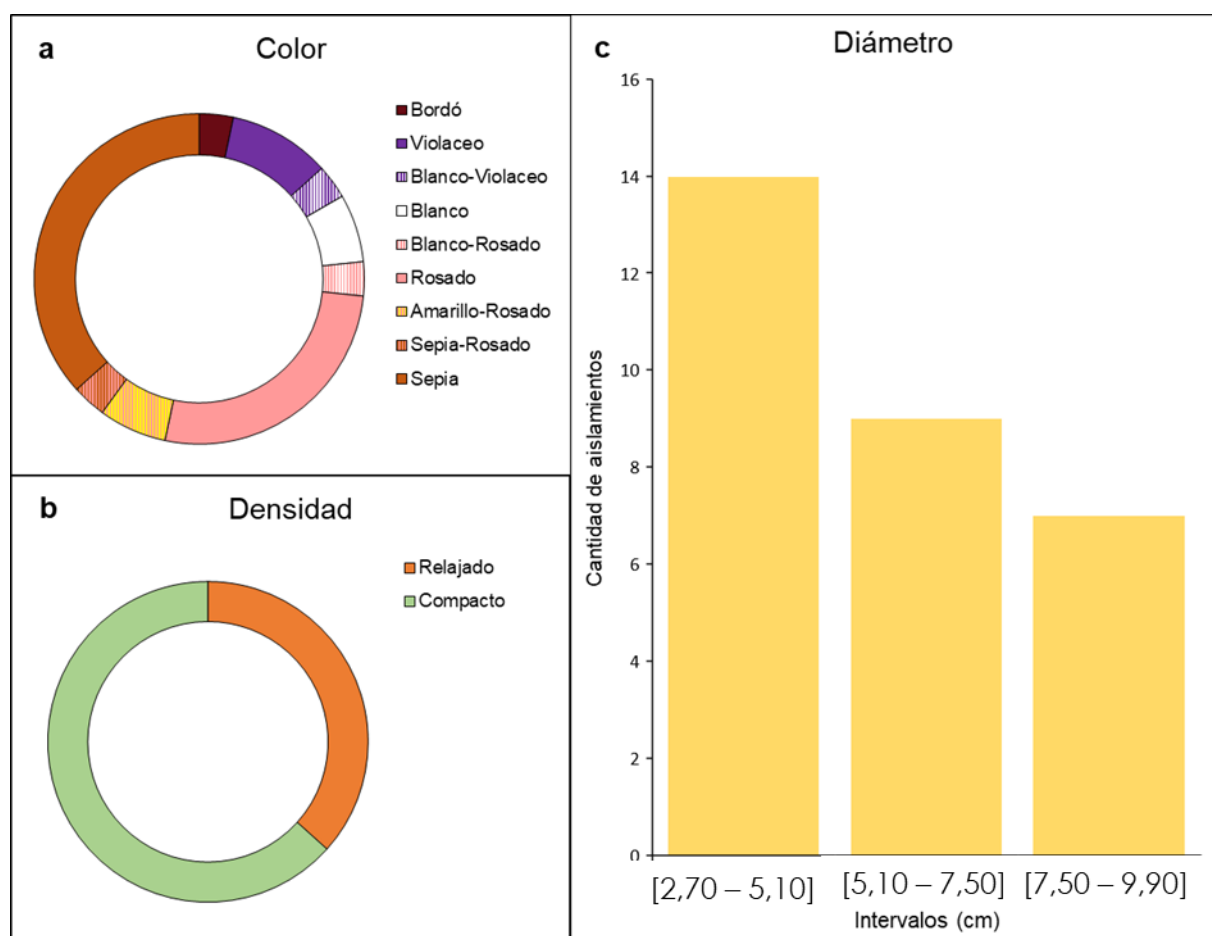


Figura 5: Distribución de frecuencias de las variables macroscópicas evaluadas. a) CM. b) DM. c) 7DDS.

Se realizó un análisis de conglomerados considerando las tres variables morfológicas (Figura 6). Se utilizaron los aislamientos como criterio de clasificación, y se agregó la localidad de muestreo de cada uno, para observar si existía algún agrupamiento vinculado al origen geográfico, aunque en general no se encontró nada destacable.

Por este motivo, no se realizó ANOVA o test Chi-cuadrado agrupando por localidad o provincia.

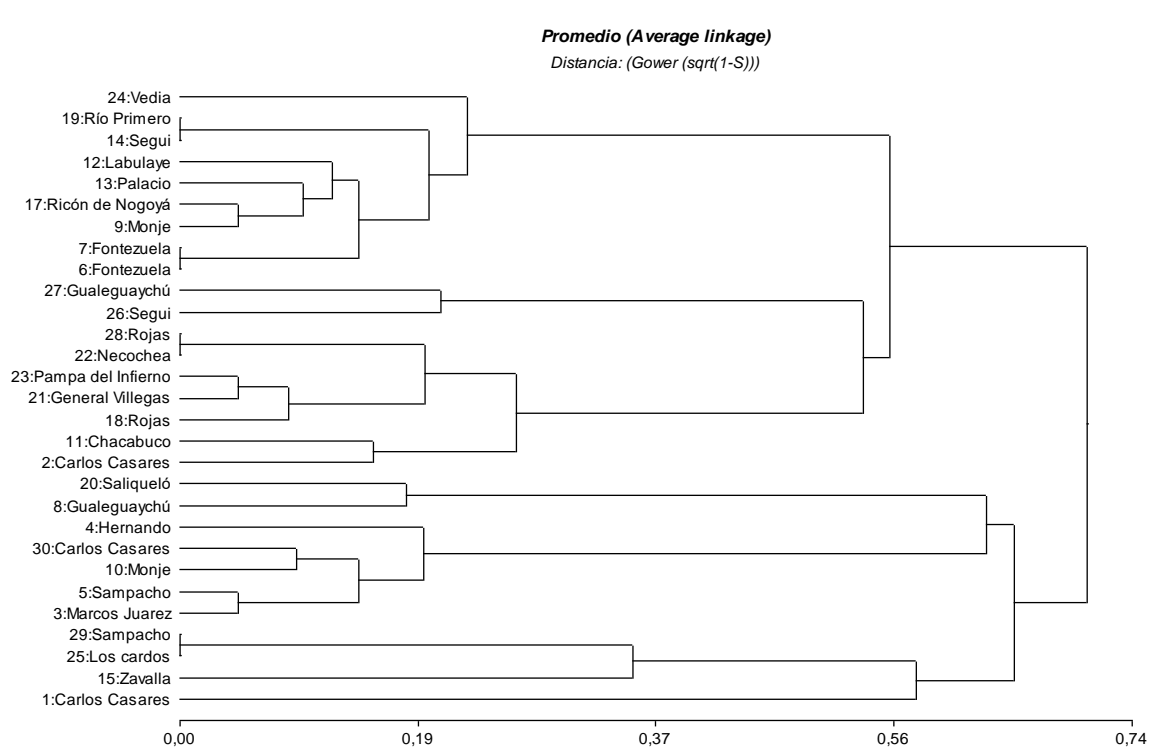


Figura 6: Análisis de conglomerados realizado utilizando las variables macroscópicas evaluadas (CM, DM, 7DDS) utilizando en programa Infogen. El número representa el ID de cada aislamiento.

## Caracterización molecular de los aislamientos

### Amplificación, secuenciación y BLAST

Se obtuvo una buena calidad y cantidad de ADN de los 30 aislamientos (Figura 7).

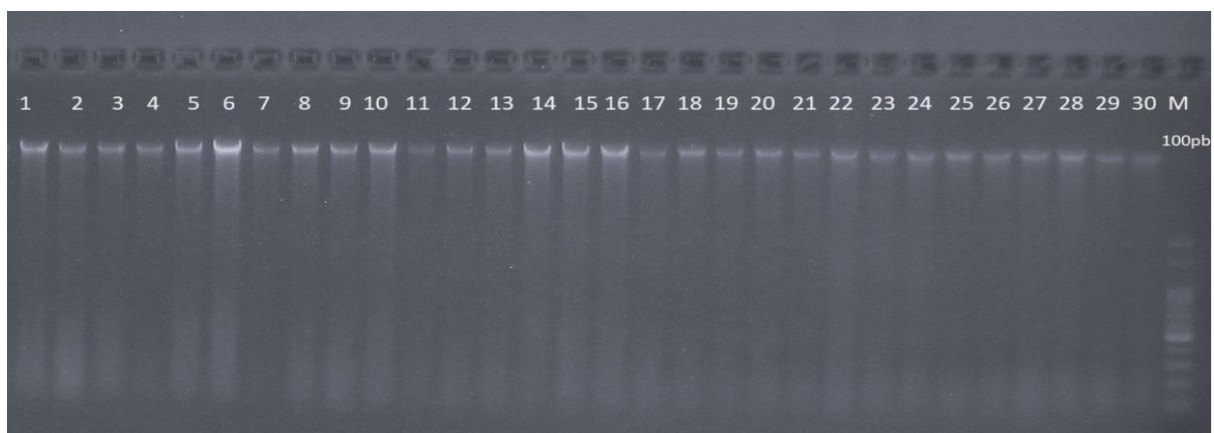


Figura 7: Calidad de los ADN extraídos a partir de 30 aislamientos de *Fusarium spp.* Las calles de 1 a 30 corresponden a los aislamientos y en la calle 31 se encuentra el marcador de peso molecular de 100pb cuya banda de 500pb [100ng/μl] (PB-L, Argentina).

Se amplificaron los fragmentos del tamaño esperado de *EF1* e *ITS*. En la Figura 8: Visualización de los productos amplificados por PCR de las secuencias EF1 (arriba) e ITS (abajo) en aislamientos de *Fusarium* spp. Las calles numeradas 1 a 30 corresponden a los aislamientos. La primera y última calle (M100) se encuentra el marcador de peso molecular de 100pb (PB-L, Argentina), cuya banda más notoria corresponde a 500 pb. se muestran las amplificaciones de la mayor parte de los aislamientos, los faltantes fueron completándose posteriormente.

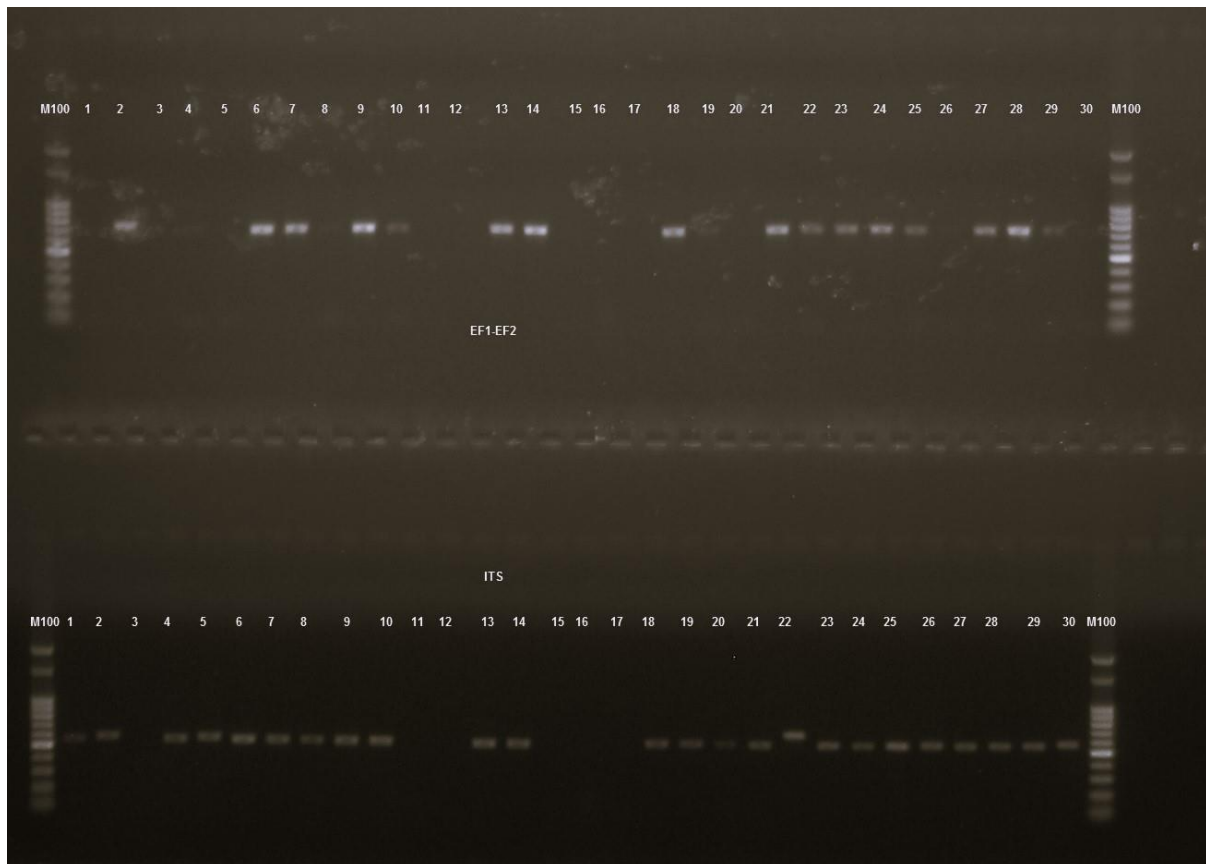


Figura 8: Visualización de los productos amplificados por PCR de las secuencias EF1 (arriba) e ITS (abajo) en aislamientos de *Fusarium* spp. Las calles numeradas 1 a 30 corresponden a los aislamientos. La primera y última calle (M100) se encuentra el marcador de peso molecular de 100pb (PB-L, Argentina), cuya banda más notoria corresponde a 500 pb.

La secuenciación fue exitosa en las 30 secuencias analizadas para *EF1*. En el Anexo III se pueden visualizar electroferogramas de diferente calidad obtenidos a partir de la secuenciación estándar y purificación del producto de PCR realizada por la empresa Macrogen (Corea). Si bien algunos electroferogramas como 4F, 7F, 11F y 13R no pudieron interpretarse (Anexo III), al contar con las secuencias en las dos direcciones, pudo utilizarse al menos una de ellas. Por el contrario, de las secuencias de *ITS*, los electroferogramas correspondientes a los aislamientos 3, 15 y 22 generaron dificultades en su lectura e interpretación. En el caso del aislamiento 22, el

peso molecular fue diferente respecto al resto, como se aprecia en la Figura 8: Visualización de los productos amplificados por PCR de las secuencias EF1 (arriba) e ITS (abajo) en aislamientos de *Fusarium* spp. Las calles numeradas 1 a 30 corresponden a los aislamientos. La primera y última calle (M100) se encuentra el marcador de peso molecular de 100pb (PB-L, Argentina), cuya banda más notoria corresponde a 500 pb.. En los otros dos casos una explicación podría ser que el producto de amplificación no estuviera bien purificado y/o que la concentración no haya sido la requerida, ocasionando que la señal se termine antes que se lea todo el fragmento. Al contarse solo con la secuenciación en un sentido, estos aislamientos no se tuvieron en cuenta en los análisis filogenéticos.

Se realizó BLASTn con las secuencias obtenidas, en búsqueda de homología con secuencias publicadas de diferentes especies. En la Tabla 4 se indican las secuencias homologas con *e-values*=0 para cada aislamiento. En la mayor parte de los casos se obtuvo más del 99 % de identidad y cobertura.

Tabla 4: Secuencias homologas de *EF1* e *ITS* encontradas en la base de datos del NCBI a partir de BLAST con las secuencias en estudio. Se presentan las secuencias de menor *e-value*. Se indica la identidad y cobertura y su especie correspondiente. En rojo se indican las secuencias descartadas para los análisis posteriores.

Aislamiento	EF1			ITS		
	% identidad	% cobertura	Especie de <i>Fusarium</i>	% identidad	% cobertura	Especie de <i>Fusarium</i>
7	100	99	<i>F. acuminatum</i>	100	99	<i>F. acuminatum</i>
11	100	100		99,78	100	
30	100	100		99,8	100	
25	99,85	100	<i>F. cerealis</i>	100	100	<i>F. cerealis</i>
1	100	100	<i>F. graminearum</i>	100	100	<i>F. graminearum</i>
6	100	100		99	100	
10	100	100		100	100	
20	100	99		100	100	
26	100	100		100	100	
29	100	99		100	100	
2	100	100	<i>F. solani</i>	100	100	<i>F. solani</i>
15	99,44	100		81,27	66	
3	100	100	<i>F. oxysporum</i>	91,38	22	<i>F. oxysporum</i>
5	100	100		100	100	
8	99,85	100		99,79	100	

9	100	100		100	100	
12	99,85	100		100	100	
13	100	100		100	100	
14	99,27	99		100	100	
18	100	100		100	100	
19	99,85	100		99,08	100	
21	100	100		100	100	
22	100	100		91,38	19	
23	99,85	99		100	100	
24	100	100		100	100	
27	100	100		100	100	
28	100	100		100	100	
17	100	99	<i>F. triseptatum</i>	99,79	100	<i>F. triseptatum</i>
4	99,71	100	<i>F. neocosmosporiellum</i>	88,54	100	<i>F. neocosmosporiellum</i>
16	99,87	99	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	95,22	68	<i>Epicoccum nigrum</i>

El aislamiento 16 fue descartado de los análisis posteriores por no corresponder al género *Fusarium* según los resultados del BLASTn.

De las siete especies de *Fusarium* encontradas, 15 aislamientos pertenecerían a *F. oxysporum* y 6 *F. graminearum* (Figura 9). Además, debe destacarse que la especie *F. triseptatum* hasta el momento no se reportó en Argentina en el Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de Plagas (SINAVIMO; [sinavimo.org.ar](http://sinavimo.org.ar)).

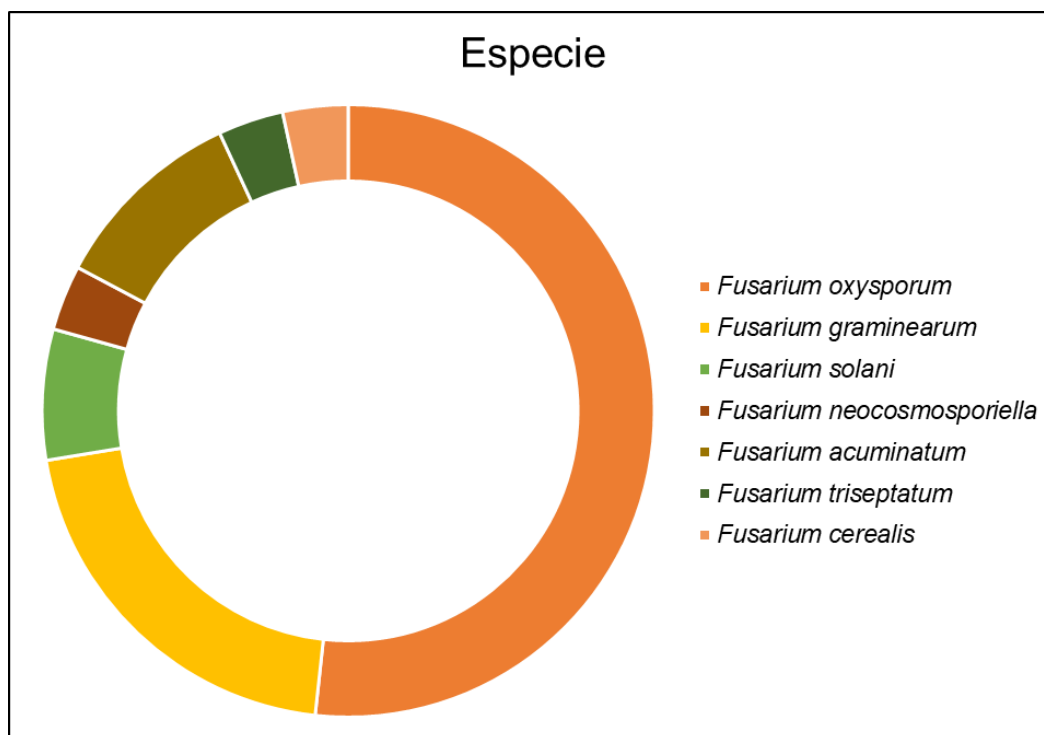


Figura 9: Proporción de especies a las que corresponderían los 29 aislamientos del género *Fusarium* considerados en este estudio.

### Análisis de la diversidad genética

En la Tabla 5 se describen algunos rasgos sobresalientes de las dos secuencias amplificadas, *EF1* e *ITS*.

Tabla 5: Descripción de las secuencias obtenidas a partir del programa DnaSP v6 de los genes *EF1* e *ITS*.

	Secuencia	
	<i>EF1</i>	<i>ITS</i>
Número de secuencias (NS)	29	26
Número de haplotipos (NH)	15	5
Número de pares de bases máximo (NPB)	744	518
Sitios polimórficos (SP)	173	161
Diversidad haplotípica (DH)	0,93	0,72

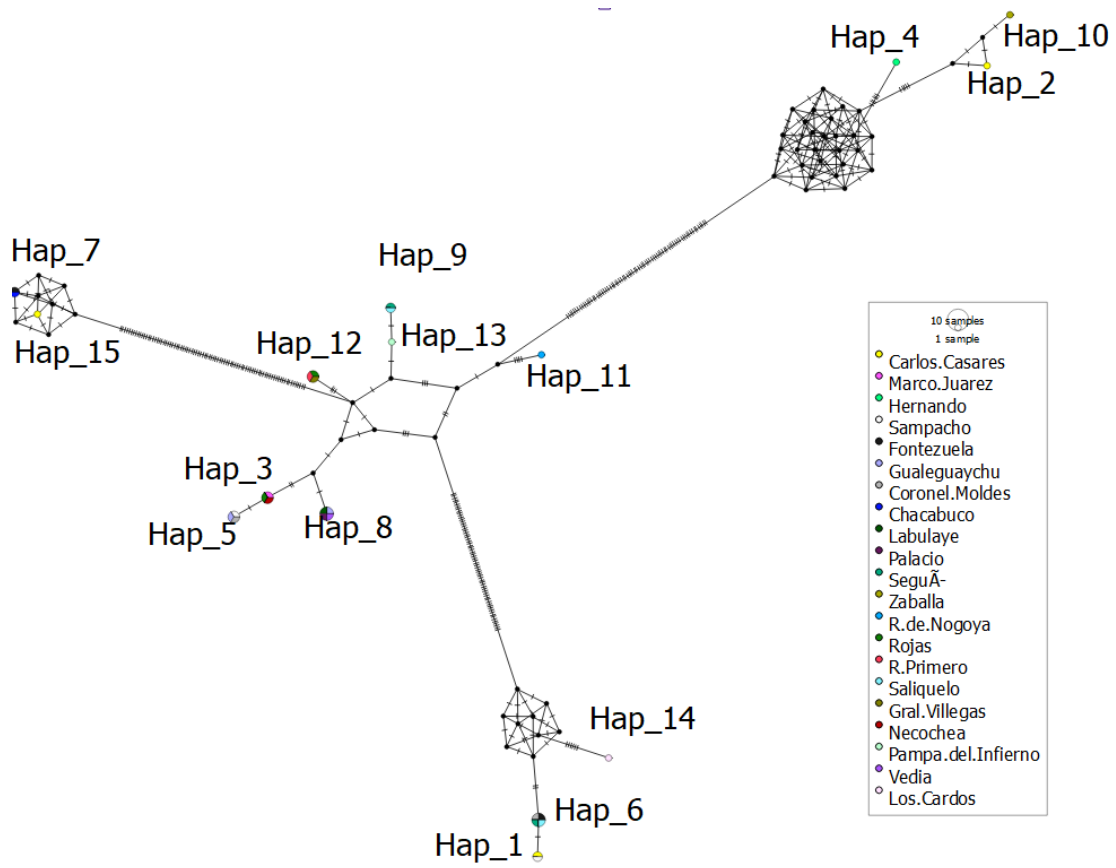
Los fragmentos obtenidos para *EF1* permitieron diferenciar 15 haplotipos. Al incorporar al análisis las secuencias publicadas en el NCBI, el número de haplotipos resultó el mismo. Para el caso de *ITS* se encontraron 5 haplotipos y resultaron 6 al

incorporar las secuencias del NCBI. Los sitios polimórficos fueron 173 para *EF1* y 161 para *ITS*, lo cual resulta en valores similares, considerando que *ITS* tiene un fragmento menor de amplificación. La diversidad haplotípica es mayor para el caso de *EF1* por lo que es más informativa.

### **Relaciones haplotípicas**

Para la secuencia *EF1* se observa un grupo central con los haplotipos 3, 5, 8, 9, 11, 12 y 13; y luego tres grupos bien diferenciados: uno con los haplotipos 1, 6 y 14; otro con los haplotipos 7 y 15; y otro con los haplotipos 2, 4 y 10 (Figura 10 a). Estos grupos se corresponden con la clasificación por especies realizada a partir del análisis de homología de secuencias (Figura 10 b). Los haplotipos centrales corresponden a la especie *F. oxysporum*, siendo el 8 y el 12 los más frecuentes con 4 aislamientos cada uno. Los haplotipos 1 y 6 corresponden a los aislamientos que pertenecerían a *F. graminearum*, siendo el haplotipo 6 el más frecuente con 4 aislamientos. El haplotipo 14 pertenecería a *F. cerealis*, cercano a *F. graminearum*. Por otro lado, los (haplotipos 7 y 15) corresponden a los aislamientos de *F. acuminatum*; y el último grupo corresponde a *F. solani* (haplotipos 2 y 10) y a *F. neocosmosporiellum* haplotipo 4 (Figura 10 b). Dentro de la red se observan una gran cantidad de puntos negros correspondientes a haplotipos no muestreados en el presente trabajo. No se observa una asociación evidente entre haplotipos y sitios de muestreo (Figura 11).

a)



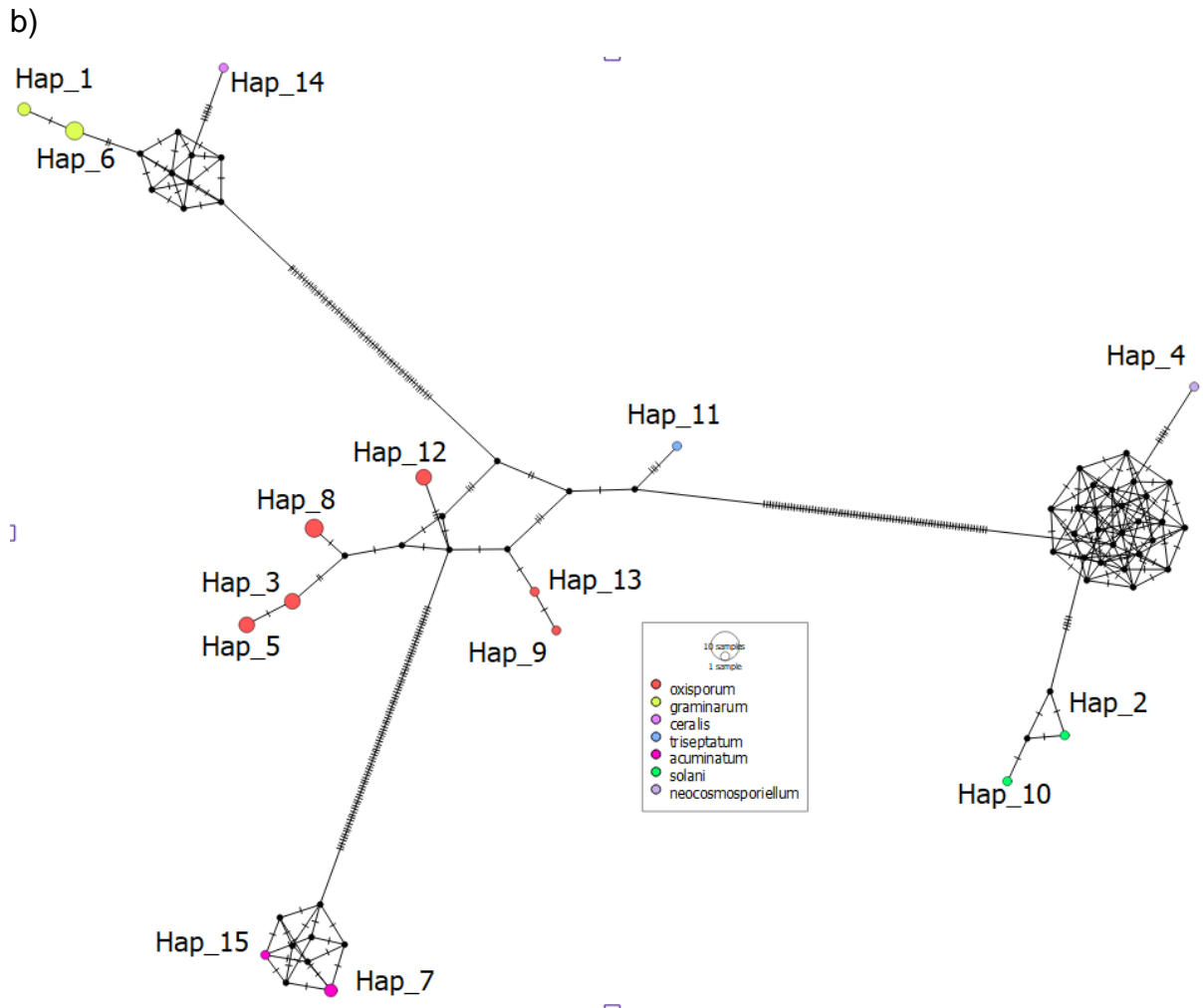


Figura 10: a) Red haplotípica obtenida mediante el análisis *Median Joining* a partir de un fragmento del gen *EF1* analizado para aislamientos de *Fusarium*. El tamaño del círculo es proporcional a la frecuencia de secuencias dentro de cada haplotipo y cada línea transversal entre ellos representa una mutación. Los círculos negros corresponden a posibles haplotipos no muestreados. Los colores indican los sitios de muestreo. b) Red haplotípica obtenida mediante el análisis *Median Joining* a partir de un fragmento del gen *EF1* teniendo en cuenta la especie.

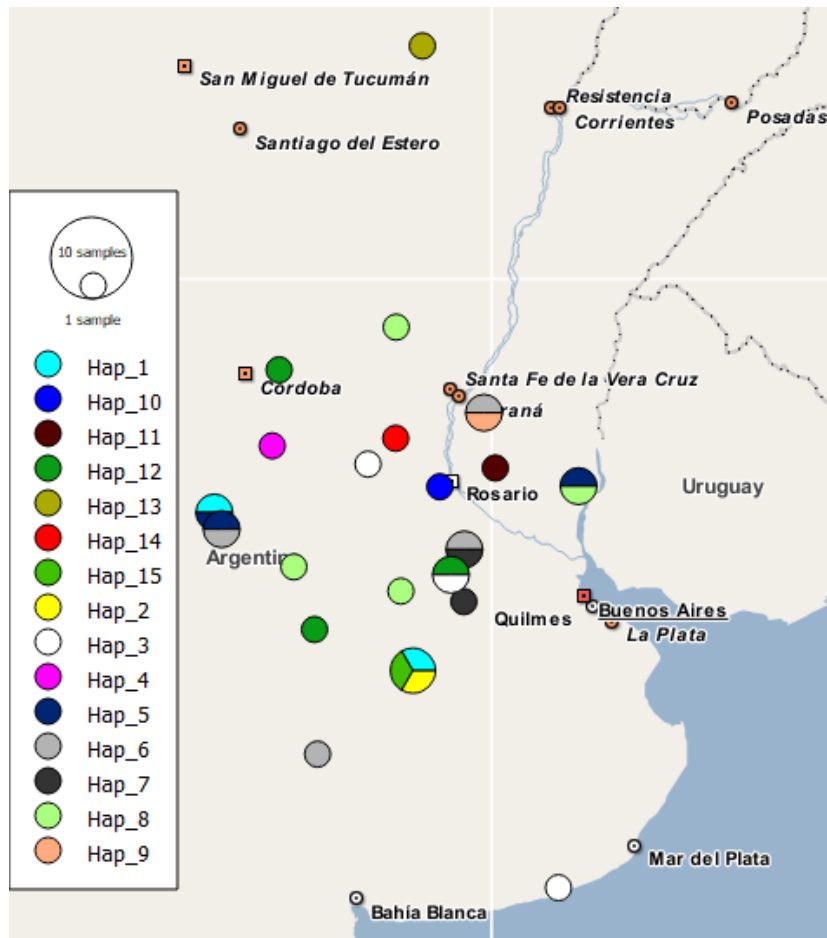


Figura 11: Haplotipos por sitio de muestreo obtenidos mediante el análisis *Median Joining* a partir de un fragmento del gen *EF1* analizado para aislamientos de *Fusarium*. El tamaño del círculo es proporcional a la frecuencia de los haplotipos por sitio de muestreo.

Para la secuencia *ITS* se observa una red de haplotipos no muestreados en el centro y cuatro grupos bien definidos: uno con los haplotipos 1 y 5; y los otros tres cuentan con un haplotipo cada uno: 4, 2 y 3 (Figura 12 a). En este caso, cada haplotipo incluye a más de dos especies y no se ve un agrupamiento claro. El haplotipo 4 es el que presenta mayor frecuencia de aislamientos y pertenecerían a las especies *F. graminearum*, *F. oxysporum*, y *F. triseptatum* (Figura 12 b)

El haplotipo 5 solo se encontró en Rio Primero y el 2 solo en Carlos Casares. No se observan otras asociaciones entre haplotipos y sitios de muestreo (Figura 13).

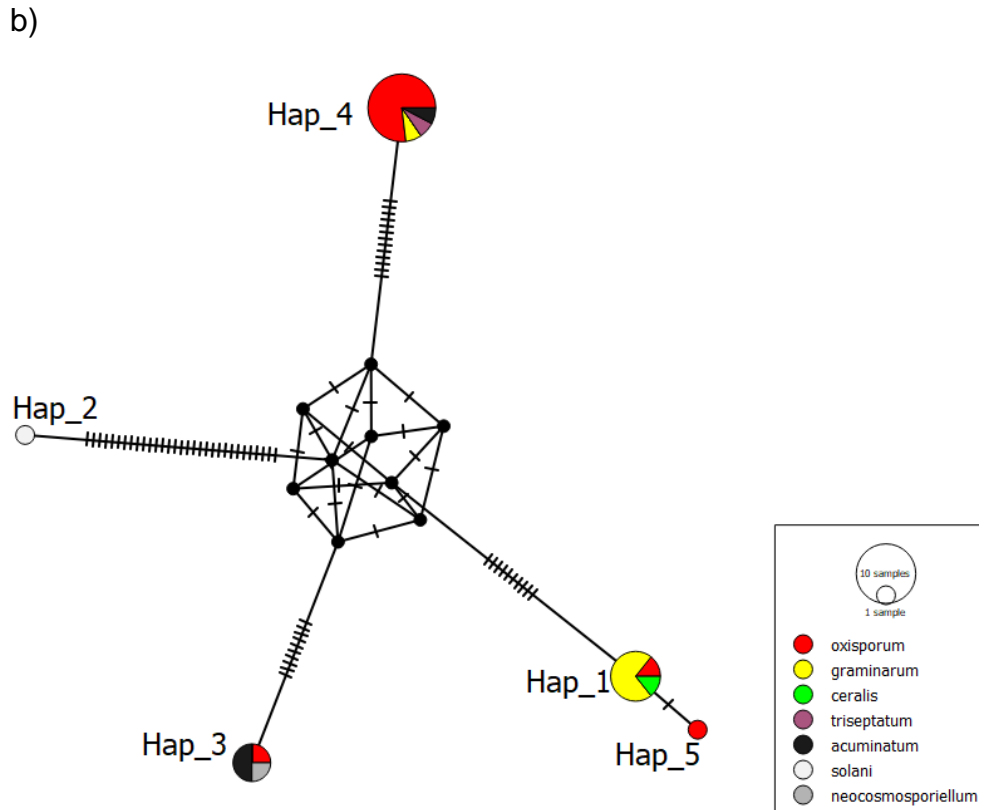
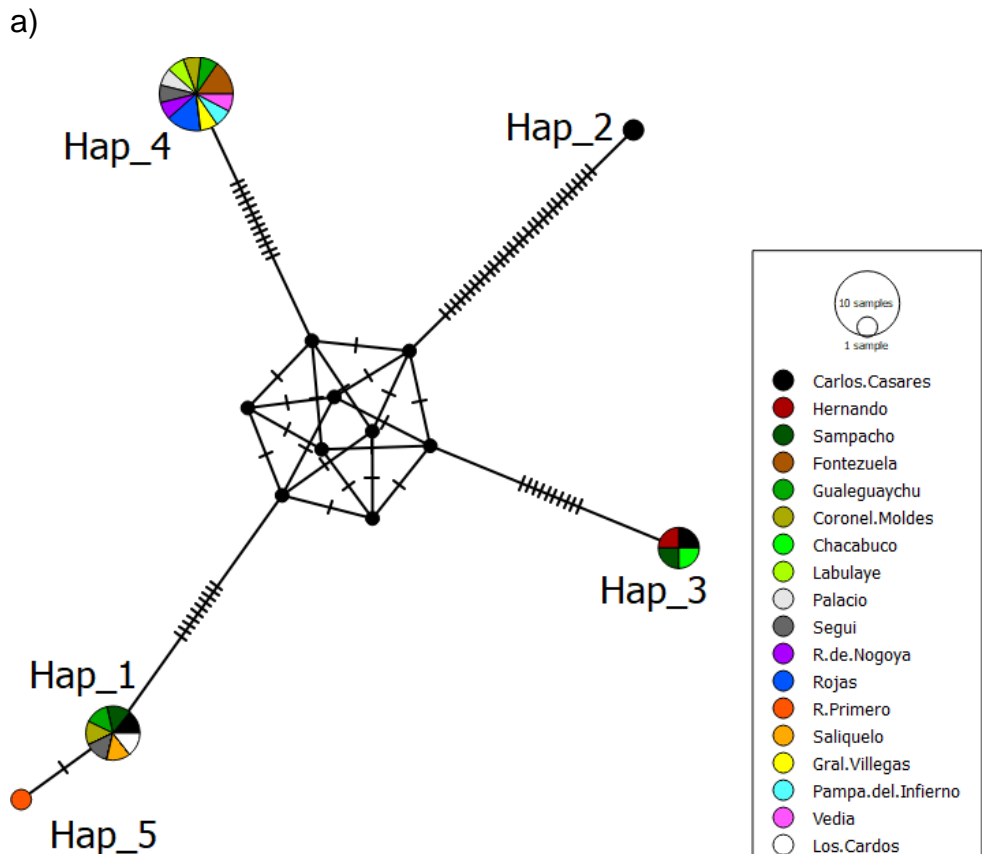


Figura 12: a) Red haplotípica obtenida mediante el análisis *Median Joining* a partir de un fragmento del gen *ITS* analizado para aislamientos de *Fusarium*. El tamaño del círculo es proporcional a la frecuencia de secuencias dentro de cada haplotipo y cada línea transversal entre ellos representa una mutación. Los colores indican los sitios de muestreo. b) Red haplotípica teniendo en cuenta las especies.

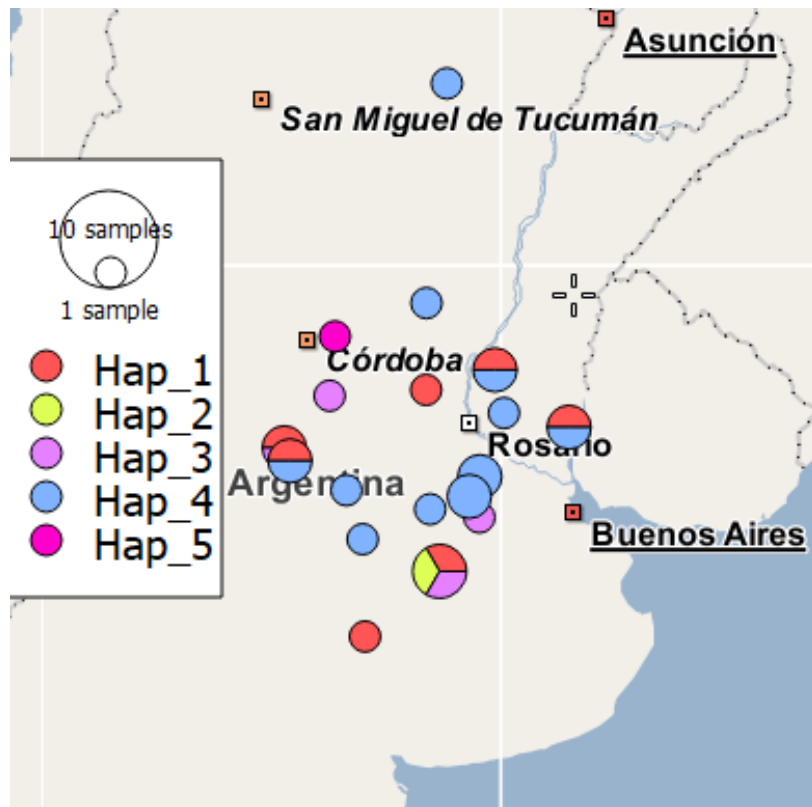


Figura 13: Haplotipos por sitios de muestreo mediante el análisis *Median Joining* a partir de un fragmento del gen *ITS* analizado para aislamientos de *Fusarium*. El tamaño del círculo es proporcional a la frecuencia de los haplotipos por sitio de muestreo.

### Construcción de árboles filogenéticos

Para la secuencia *EF1*, el árbol filogenético obtenido mediante la metodología MV muestra que los aislamientos se separan en 6 grupos, relacionados en gran medida con las especies de las secuencias encontradas a partir del BLAST, que también se incorporaron al árbol (Figura 114). El primer grupo está formado por los aislamientos 25, 1, 29, 6, 10, 20, 26 que corresponderían a *F. graminearum* en base al BLASTn al estar formado los aislamientos. El segundo grupo está formado únicamente por el aislamiento 25 *F. cerealis*. El tercero agrupa a *F. acuminatum* (aislamientos 7, 11, 30), 15 y 2 (*F. solani*) y 4 (*F. neocosporiellum*). El cuarto grupo correspondería al aislamiento 17 (*F. triseptatum*), y el quinto grupo cuenta con los aislamientos 9, 27, 5, 3, 22, 28, 13, 8, 12, 24, 18, 19, 21, 14 y 23; que corresponderían a *F. oxysporum*. El sexto grupo es el *outgroup*, que enraíza correctamente el árbol.

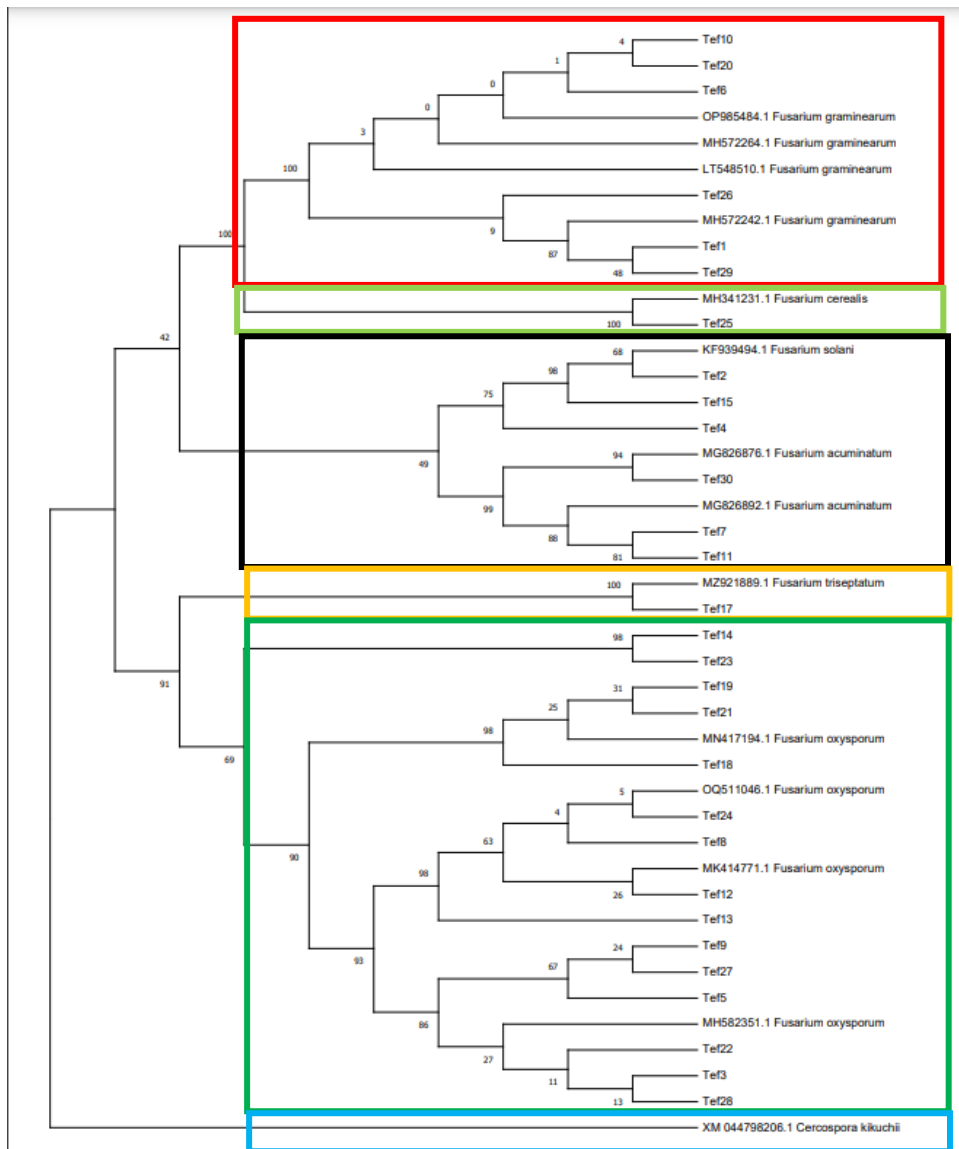


Figura 14: Árbol filogenético obtenido mediante la metodología MV a partir de un fragmento del gen *EF1* (*Tef*) analizado para aislamientos de *Fusarium*. Los agrupamientos están señalados por los cuadros de colores. Bootstrap 500

Al utilizar inferencia bayesiana, los aislamientos se separan en seis grupos considerando la mejor probabilidad posterior calculada por *Beast* (Figura 15). Como en la metodología anterior, puede observarse que los aislamientos del presente trabajo se agrupan según las que serían sus especies de pertenencia. Los grupos son similares, solo que en este caso el aislamiento 25 (*F. cerealis*) conforma un grupo separado, y los aislamientos que posiblemente pertenezcan a *F. solani* (15 y 2) se agrupan con los de *F. acuminatum* (30, 7 y 11) y con el aislamiento 4 (*F. neocosmosporiellum*).

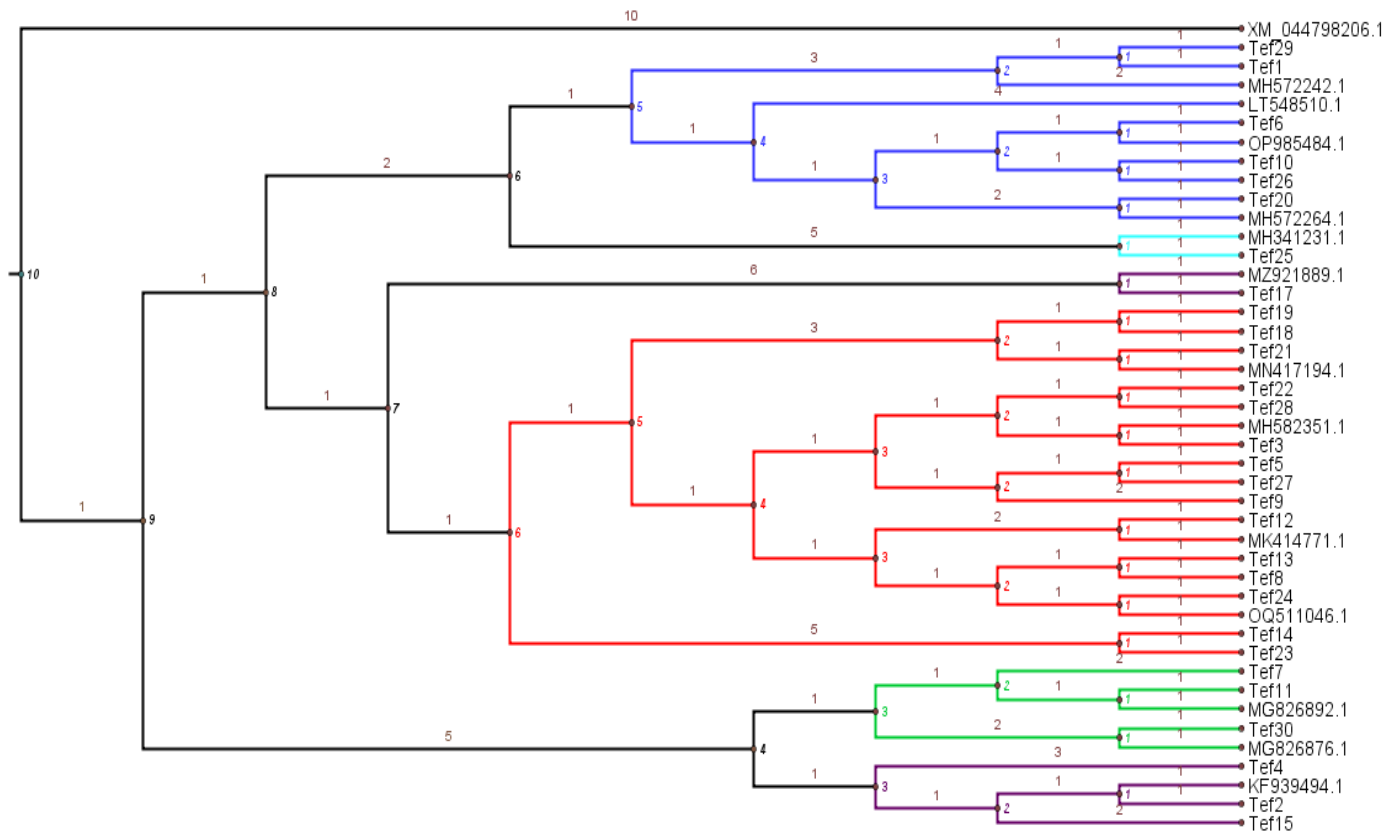


Figura 15: Árbol filogenético obtenido mediante inferencia bayesiana a partir de un fragmento del gen *EF1* analizado para aislamientos de *Fusarium*. Los números indican el valor de probabilidad posterior de cada nodo, KF939494.1 *F. solani*, LT548510.1 *F. graminearum*, MG826876.1 *F. acuminatum*, MG826892.1 *F. acuminatum*, MH341231.1 *F. cerealis*, MH572242.1 *F. graminearum*, MH572264.1 *F. graminearum*, MH582351.1 *F. oxysporum*, MK414771.1 *F. oxysporum*, MN417194.1 *F. oxysporum*, MZ921889.1 *F. triseptatum*, OP985484.1 *F. graminearum*, OQ511046.1 *F. oxysporum*. XM\_044798206.1 *Cercospora kikuchii* outgroup

Para la secuencia *ITS*, el árbol filogenético obtenido mediante la metodología MV muestra que los aislamientos se separan en 3 grupos (Figura 86) el primer grupo compuesto por los aislamientos 9, 28, 27, 24, 23, 21, 17, 6, 7, 12, 13, 14, 18, 2, 4, 5, 11, 30, el segundo por los aislamientos 19, 26; 20, 29, 1, 10, 8, 25, y el tercero es el outgroup.

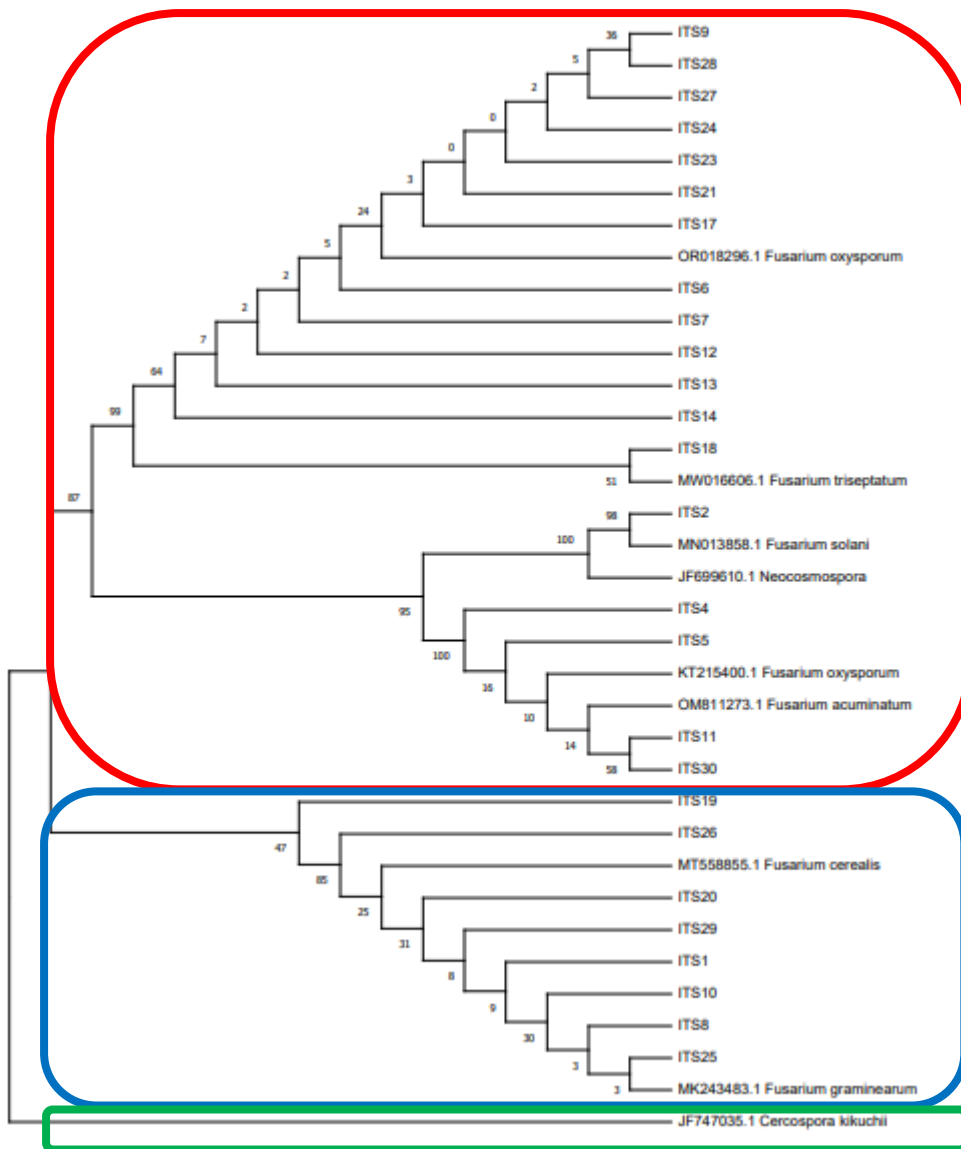


Figura 86: Árbol filogenético obtenido mediante la metodología MV a partir de un fragmento de *ITS* analizado para aislamientos de *Fusarium*, los grupos están señalados por los cuadros de colores. Bootstrap 500

Al utilizar inferencia bayesiana, los aislamientos se separan en 5 grupos en base a la probabilidad posterior calculada por *Beast* (Figura 17). El primer grupo es el *outgroup*, el segundo grupo los aislamientos 11, 5, 4, 30 y 2; el tercer grupo los aislamientos 19, 20, 29, 26, 1, 25, 10, 8; el cuarto grupo el 18 y el quinto grupo los aislamientos 21, 17, 28, 9, 27, 12, 24, 6, 23, 7, 14, 13.

En base a estos resultados, la secuencia *ITS* no realizó los agrupamientos que se esperaban según las especies de las secuencias homólogas del BLAST.

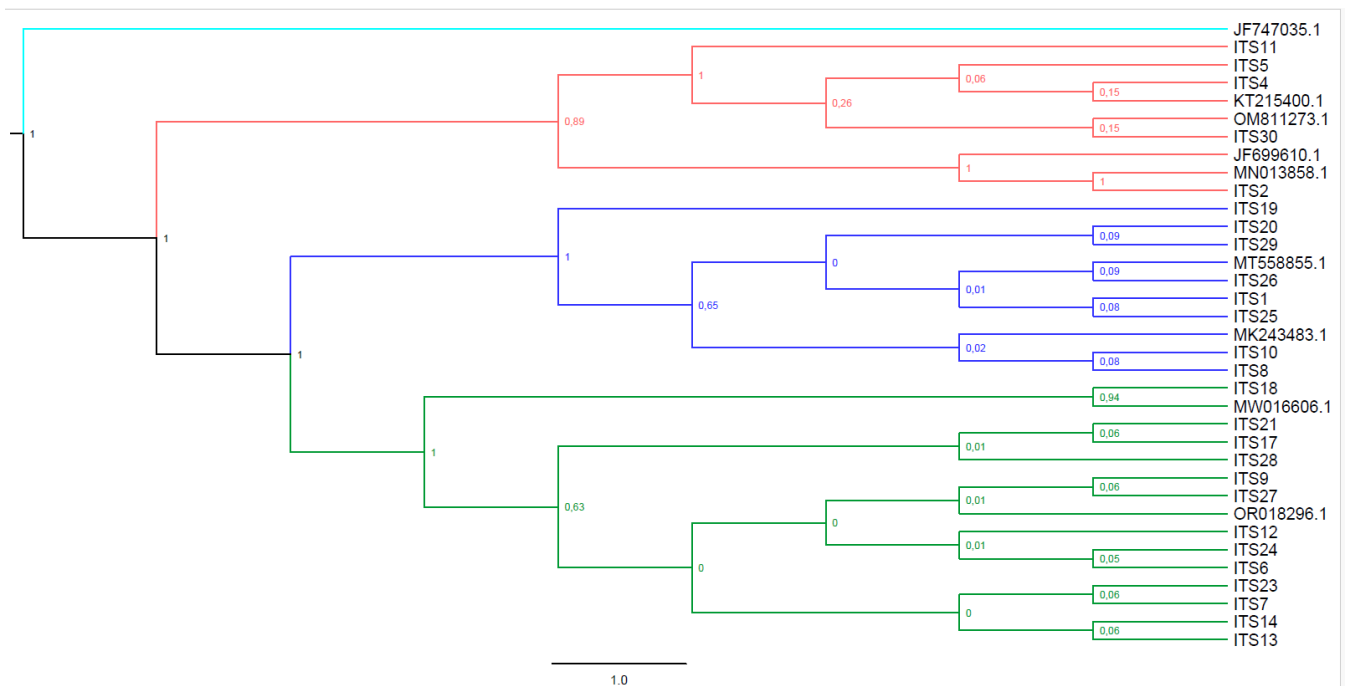


Figura 97: Árbol filogenético obtenido mediante inferencia bayesiana a partir de un fragmento del gen *ITS* analizado para aislamientos de *Fusarium*. Los números indican el valor de probabilidad posterior de cada nodo. JF699610.1 *F. neocosmoporiellum*, KT215400.1 *F. oxysporum*, MK243483.1 *F. graminearum*, MN013858.1 *F. solani*, MT558855.1 *F. cerealis*, MW016606.1 *F. triseptatum*, OM811273.1, *F. acuminatum*, OR018296.1 *F.oxysporum*, JF747035.1 *Cercospora kikuchii*.

Por último, se realizó un análisis conjunto con las dos secuencias mediante un análisis de conglomerados utilizando los haplotipos obtenidos en *DnaSP* (Figura 108). Debe aclararse que los aislamientos 3, 15 y 22 solo contaron con el haplotipo de *EF1*. En este caso, se formaron cuatro grupos: el primero únicamente cuenta con el aislamiento 2, el segundo está formado por los aislamientos 30, 12, 5 y 4; el tercero por los aislamientos 19, 15, 23, 21, 18, 17, 14, 24, 13, 27, 9, 7, 6, 28, 22 y 3; y el cuarto por los aislamientos 25, 11, 26, 20, 10, 8, 29, 1.

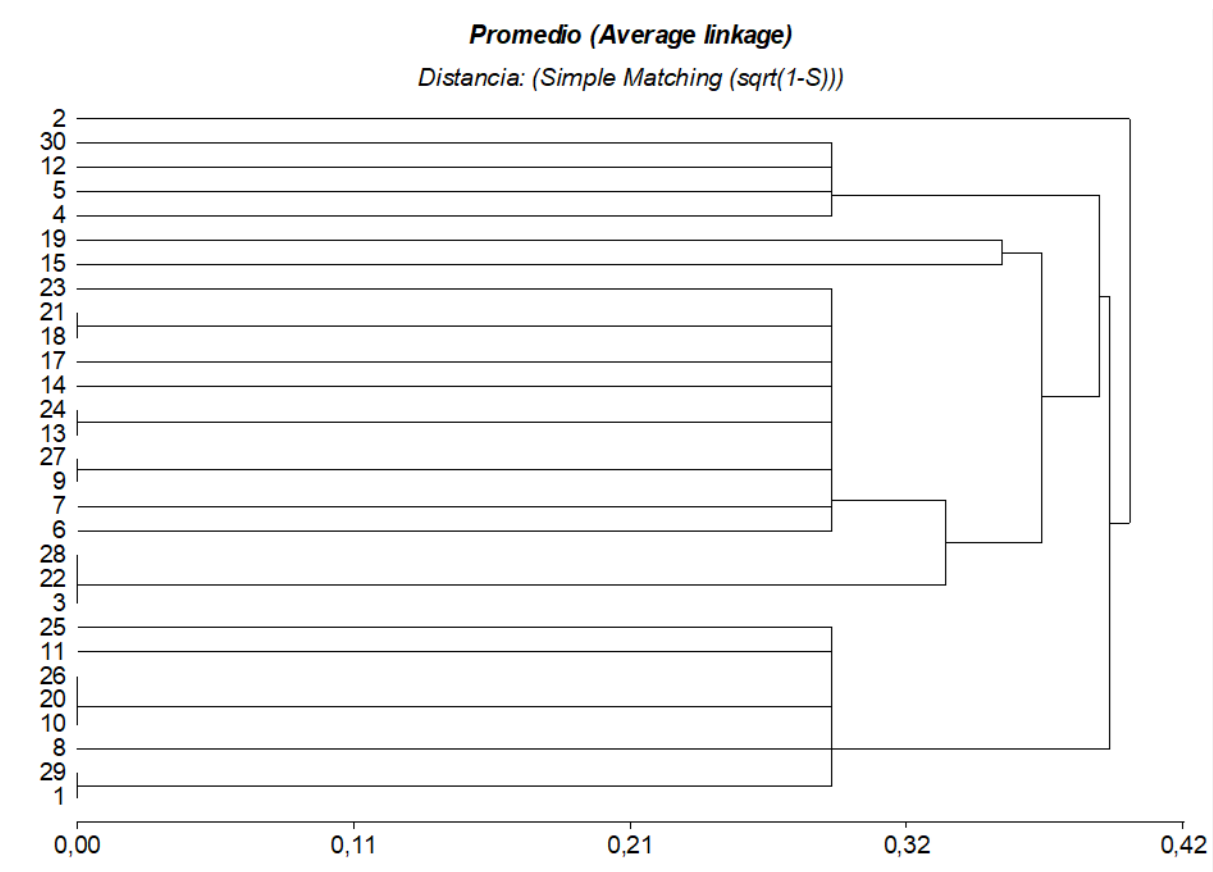


Figura 108: Dendrograma a partir de los haplotipos de *ITS* y *EF1* de aislamientos de *Fusarium* de distintas localidades de Argentina.

También con los haplotipos de las dos secuencias se realizó un análisis de coordenadas principales con el fin de visualizar los agrupamientos. Se formaron cuatro grupos de aislamientos (Figura 119). Si bien en todos los grupos se encuentran varias de las especies que se determinaron según el BLAST, en el grupo encerrado con azul se ubican la mayor parte de los posibles *F. graminearum* y en el encerrado con rojo los *F. oxysporum*. Los aislamientos que según el BLAST corresponderían a *F. solani* se ubican en el grupo central encerrado en verde.

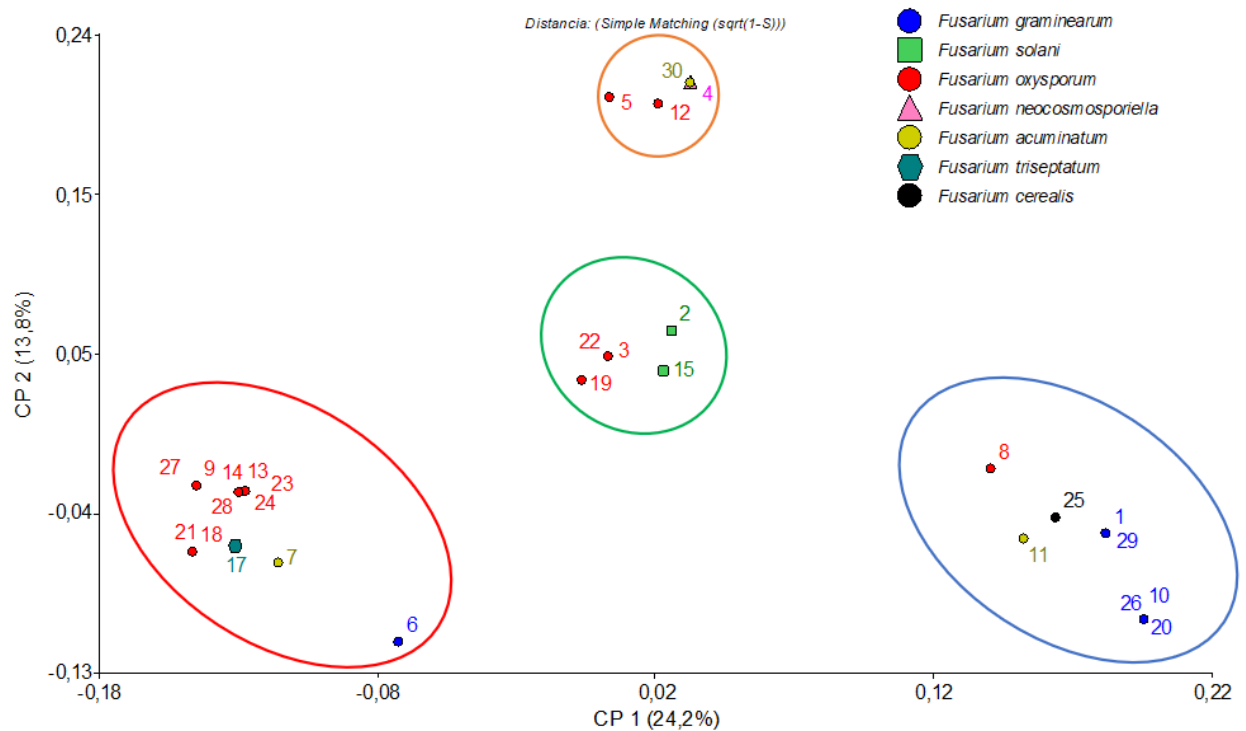


Figura 119: Análisis de coordenadas principales a partir de los haplotipos de *EF1* e *ITS* de aislamientos de *Fusarium* de distintas localidades de Argentina. Se observan cuatro agrupamientos encerrados con círculos de diferentes colores.

### Caracterización conjunta utilizando información morfológica y molecular

Se realizó un análisis de conglomerados considerando tanto los haplotipos de las dos secuencias como las variables morfológicas usando el algoritmo de encadenamiento promedio (UPGMA) y la matriz de distancia construida a partir del índice de similitud de Gower (Figura 20). En este caso, los grupos que se conforman son: 1) 27 y 26; 2) 19, 12, 14, 17, 9, 24, 13, 7, 6, 11, 28, 22, 23, 21, 18, 2; 3) 10, 30, 5, 4, 3; 4) 20 y 8; 5) 29, 25, 15, 1.

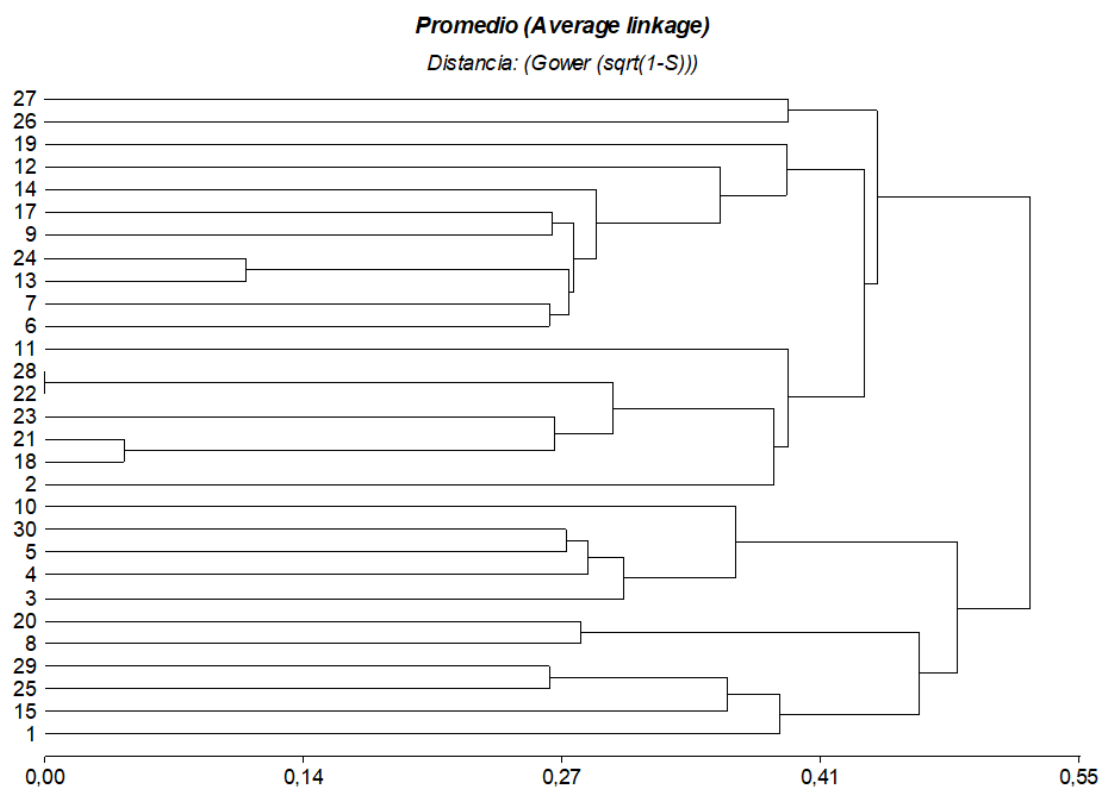


Figura 20: Dendrograma a partir de los haplotipos de *ITS* y *EF1* y las variables morfológicas (DM, CM y 7DDS) de aislamientos de *Fusarium* de distintas localidades de Argentina.

### **Análisis a posteriori**

Considerando la clasificación por especie realizada principalmente por la secuencia *EF1*, se buscó determinar si los aislamientos que posiblemente pertenezcan a la misma especie, presentan características comunes.

En primer lugar, se realizó AMOVA considerando especie como criterio de clasificación. Se utilizaron los haplotipos de las dos secuencias en estudio y se encontró que existen diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en la variabilidad genética de la población de *Fusarium* según la especie (Tabla 6). El 16,67 % de la variabilidad puede encontrarse entre especies, y el 83,33 % dentro de las especies.

Tabla 6: Análisis molecular de la varianza (AMOVA) para la población de *Fusarium* considerando la especie de pertenencia según los resultados obtenidos previamente en este trabajo. Se indica el valor  $p$  asociado y el porcentaje de la variabilidad explicada entre y dentro de las especies.

F.V.	p-valor	Porcentaje
Posible especie	0,0025	16,67
Dentro	0,0025	83,33
Total		100

Asimismo, se realizaron pruebas de Chi-cuadrado para determinar la existencia de asociación entre especies y las características morfológicas cualitativas. No se encontró relación ni con el color ( $p=0,2811$ ) ni con la densidad de micelio ( $p=0,2247$ ). Tampoco existe asociación entre especie y la provincia donde se realizó el muestreo ( $p=0,6210$ ). En el caso del diámetro, por ser una variable cuantitativa, se realizó ANOVA, pero no se encontraron diferencias entre especies ( $p=0,6069$ ). Por último, se realizó un análisis de conglomerados de las especies solo con los haplotipos (Figura 21) y otro con los haplotipos y las variables morfológicas (Figura 22). En los dos casos *F. oxysporum* y *F. solani* forman grupos separados de las demás especies.

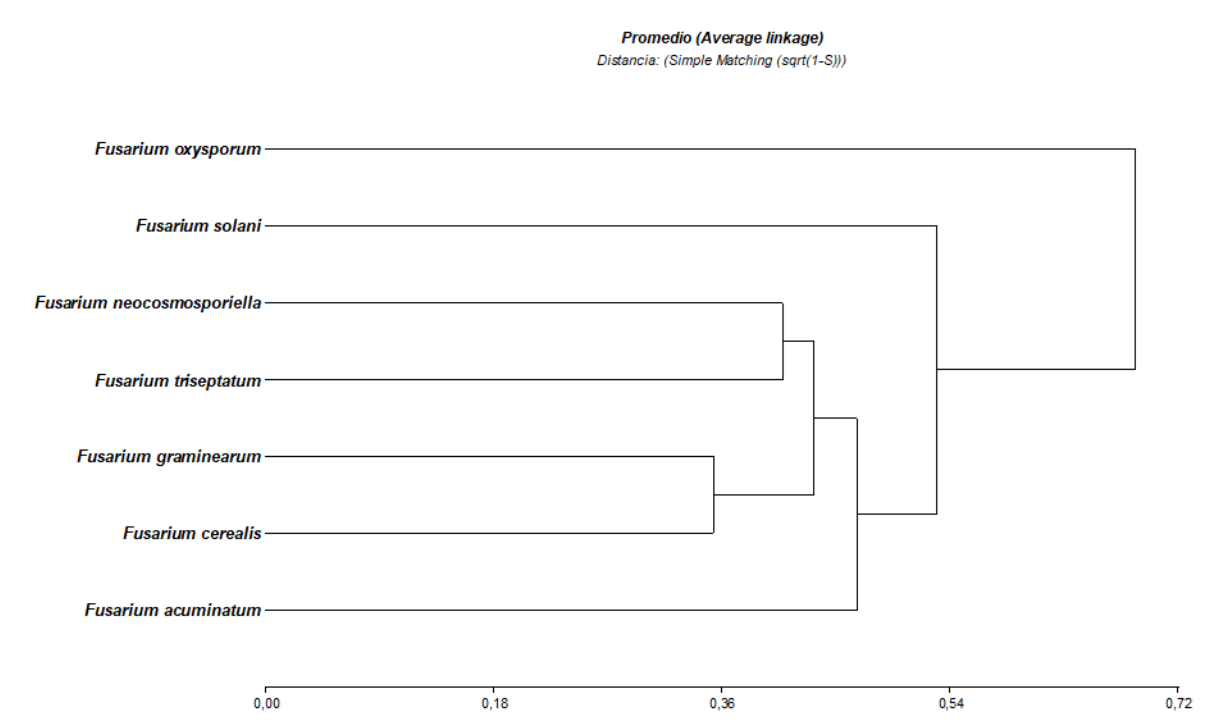


Figura 21: Dendrograma a partir de los haplotipos de *EF1* e *ITS* de las posibles especies encontradas en aislamientos de *Fusarium* de distintas localidades de Argentina.

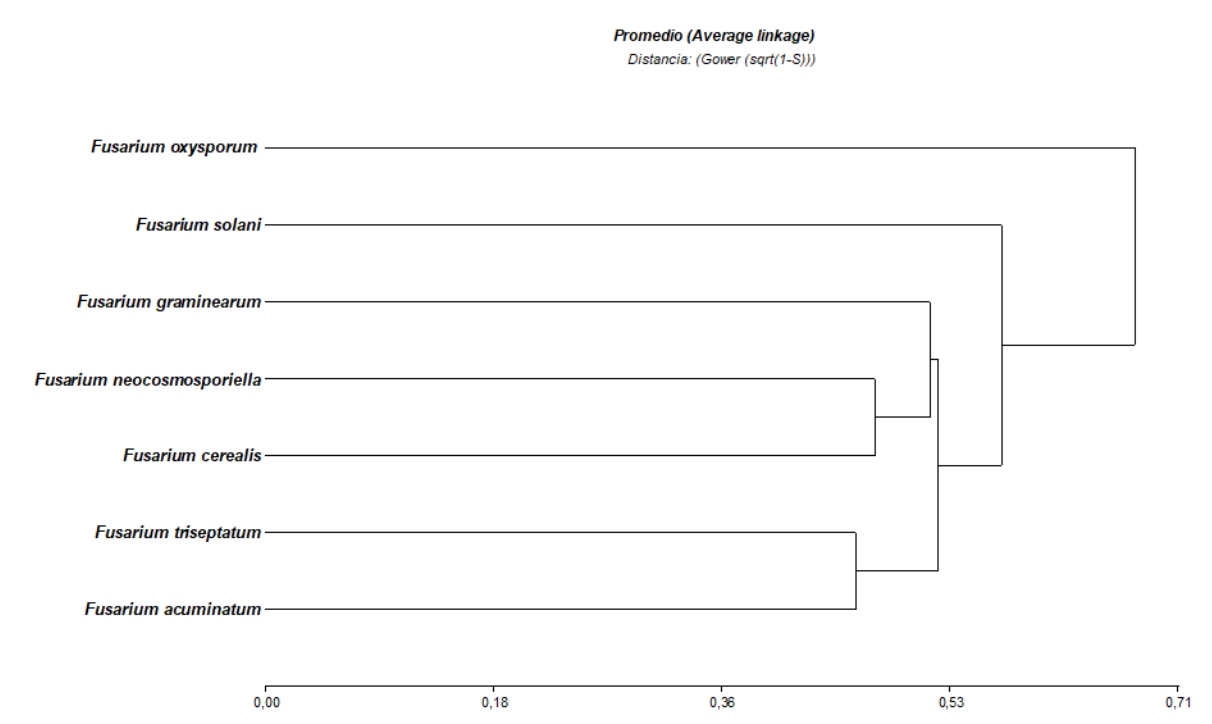


Figura 22: Dendrograma a partir de los haplotipos de *EF1* e *ITS* y de las variables morfológicas (CM, DM, 7DDS) de las posibles especies encontradas en aislamientos de *Fusarium* de distintas localidades de Argentina.

## **DISCUSIÓN**

En el presente trabajo, se realizó una caracterización exhaustiva de una colección de 30 aislamientos fúngicos, obtenidos a partir de muestras de suelo de diferentes localidades sojeras de Argentina. El énfasis estuvo puesto en el estudio de la composición de especies del género *Fusarium* presentes.

Notablemente, la identificación de *Fusarium* a nivel de especie se realiza en base a características morfológicas (*i.e* morfología de micelio, hifas, macro y microconidios, presencia/ausencia clamidosporas, entre otras) (Agrios 2005, Leslie & Summerell, 2008) y con el apoyo de herramientas moleculares. En muchos casos la morfología no es suficiente *per se* para distinguir entre especies, razón por la cual los estudios moleculares cobran relevancia (O'Donnell *et al.*, 2022).

En primer lugar, se estudiaron los aislamientos según su morfología macroscópica a través de los caracteres CM, DM y 7DDS en APD y, se pudo observar una composición heterogénea de la colección, que dio cuenta de su riqueza fenotípica. Estas observaciones permitieron también realizar un seguimiento de la pureza de los cultivos, su sanidad y una primera agrupación dentro del género *Fusarium*. También permitieron realizar análisis de asociación y agrupamiento entre puntos de muestreo y especies, pero sin encontrar tendencias de relevancia.

Posteriormente se llevó adelante la caracterización molecular. Para ello se utilizaron dos fragmentos correspondientes a los genes *EF1* e *ITS*. De ellos, el gen del factor de elongación 1-alfa (*EF1*) posibilita en mayor medida hacer la caracterización a nivel de especie dentro del mismo género debido a su mayor variabilidad entre especies relacionadas, lo que permite una mayor resolución (Karlsson *et al.*, 2016; Ramdial *et al.*, 2017). Mientras que el espaciador transcritto interno (*ITS*) es una región del ADN ribosómico nuclear que se considera el “código de barras” en la identificación de hongos (Schoch *et al.*, 2012) y por ello fue utilizado para llegar al nivel de género. Su secuencia es de fácil amplificación por PCR y hay una gran cantidad de información en las bases de datos públicas para comparar y corroborar el género *Fusarium* (Crous *et al.*, 2021). Si bien *ITS* permite reconocer complejos dentro del género, no sería útil para el reconocimiento de especies (O'Donnell *et al.*, 2022). Además, *EF1* es de única

copia en el genoma (Geiser *et al.*, 2004), mientras que para *ITS* se han encontrado parálogos (Summerell, 2019) lo cual complejizaría el análisis de secuencias.

En un trabajo en el que se obtuvieron redes filogenéticas para el género *Fusarium* a partir de varios genes utilizando más de 100 aislamientos de referencia a nivel mundial, se hallaron 31 haplotipos para el gen *EF1* y 10 para *ITS* (Vásquez Barajas, 2021). En otro trabajo se identificaron 42 haplotipos para *EF1* en 79 aislamientos de 11 países y 12 para *ITS* utilizando 92 aislamientos (Ramdial *et al.*, 2017). En coincidencia con lo antes mencionado, en el presente trabajo, el número de haplotipos encontrados y la diversidad haplotípica fue mayor para *EF1* que para *ITS*, lo cual podría demostrar una mayor tasa de evolución, haciéndolo más indicado para estudios de diversidad genética (Kumar *et al.*, 2018). En el análisis BLASTn para el gen *EF1* se obtuvieron porcentajes identidad entre el 99,27-100 % en coincidencia con la literatura publicada para especies de *Fusarium* (Geiser *et al.*, 2004; López *et al.*, 2020). Para *ITS* el porcentaje fue de 88,54-100 %. Considerando que los porcentajes de identidad fueron adecuados para los dos genes (O'Donnell *et al.*, 2015), las secuencias pueden considerarse homólogas a las halladas en la base de datos. De esta forma fue posible descartar uno de los aislamientos que se había clasificado previamente como *Fusarium* (aislamiento 16), confirmando que tanto *EF1* como *ITS* permitirían evitar este tipo de error de clasificación. El resto de los aislamientos presentaron homología con alguna de las siguientes siete especies de *Fusarium*: *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *F. solani*, *F. acuminatum*, *F. neocosmoporiellum*, *F. triseptatum* y *F. cerealis*.

Tanto en los dendrogramas como en el cálculo de redes haplotípicas, el gen *EF1* permitió una clasificación por especies coincidente con el estudio previo de homología de secuencias. El análisis filogenético agrupó a los aislamientos que pertenecerían a la misma especie con las respectivas secuencias obtenidas del NCBI. Este tipo de análisis permite describir especies estrechamente relacionadas. Según los resultados de este trabajo, *F. graminearum* sería más cercana a *F. cerealis* coincidiendo con estudios previos (Láday & Szécsi, 2001). Además, *F. solani* se agrupa con *F. neocosmoporiellum*, lo cual puede explicarse en el hecho de que ambos pertenecen al complejo de especies *F. solani* según lo indicado por O'Donnell (2022).

La especie más abundante en los suelos de las localidades muestreadas fue *F. oxysporum* que agrupado con otras especies de *Fusarium* es causal de una de las enfermedades preemergentes más importantes, que afecta el cultivo de soja desde la semilla: el *damping-off* (Stewart & Rodríguez, 2013). Otra especie abundantemente encontrada fue *F. graminearum*, que posee diferentes hospedantes, pero ataca principalmente gramíneas, luego sobrevive en los rastrojos y es capaz de producir virulencia a través de sus micotoxinas en soja (Barros *et al.* 2014). *F. acuminatum* se ha encontrado asociado con podredumbre de raíz en soja (Okello *et al.*, 2019), lo mismo que *F. cerealis* (Abdelmagid *et al.*, 2018), por lo que su presencia en el suelo puede ser perjudicial para el cultivo. Las especies del complejo *F. solani* producen SDS (Spampinato *et al.*, 2021) y *F. neocosmosporiellum* se asoció en los últimos años también con podredumbre del tallo (Greer *et al.*, 2015; Jimenez Madrid *et al.*, 2023).

De las siete especies encontradas, *F. triseptatum*, colectada en Rincón de Nogoyá, provincia de Entre Ríos, no ha sido reportada en Argentina según el Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de Plagas (SINAVIMO). Para poder llevarlo a cabo, debería realizarse una caracterización morfológica y molecular más exhaustiva para confirmar que se trata de esta especie, y luego realizar pruebas de patogenicidad con soja ya que no se encontró información sobre los efectos en el cultivo. Es una especie relacionada a *F. oxysporum* (Lombard *et al.*, 2019), lo cual también se observó en los árboles filogenéticos realizados con las secuencias de este trabajo.

Utilizar un único enfoque para la identificación de especies de *Fusarium* puede resultar insuficiente, sobre todo cuando las especies se encuentran genéticamente muy relacionadas. En el presente trabajo, se avanzó en la identificación a través de técnicas moleculares. Resta por realizar a futuro estudios microscópicos que complementarían y confirmarían la identidad taxonómica de los aislamientos en estudio. Adicionalmente podrían realizarse pruebas de patogenicidad y virulencia para comprobar si los aislamientos son capaces de causar enfermedad en soja o en otros cultivos de importancia, y así evaluar su potencialidad como causantes de enfermedad, epifitias y pérdidas económicas.

## **CONCLUSIONES**

- ✓ Según la morfología macroscópica se pudo observar una composición heterogénea de la colección de aislamientos de *Fusarium* en estudio.
- ✓ El análisis molecular realizado con las secuencias de las regiones parciales de los genes *EF1* e *ITS* permitió confirmar que 29 de los 30 aislamientos anteriormente identificados como *Fusarium* pertenecían a dicho género.
- ✓ Se encontró variabilidad molecular entre los 29 aislamientos analizados.
- ✓ Las variantes haplotípicas de los aislamientos presentaron homología con secuencias presentes en la base de datos del *GenBank* pertenecientes a siete especies: *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *F. solani*, *F. acuminatum*, *F. neocosmoporiellum*, *F. triseptatum* y *F. cerealis*.
- ✓ El gen *EF1* permitió clasificar y agrupar a los aislamientos según las posibles especies de pertenencia que se habían encontrado por homología. El gen *ITS*, por su parte, permitió discriminar hasta género.
- ✓ Las especies halladas son potenciales fitopatógenos del cultivo de soja, lo cual debería confirmarse mediante estudios de patogenicidad y monitoreos a campo. La especie *F. triseptatum* no ha sido reportada en SINAVIMO hasta el momento, por lo que, de confirmarse su presencia en Argentina como organismo de interés fitopatológico que cause daño en algún cultivo, debería reportarse.
- ✓ Para complementar los resultados de este trabajo, a futuro debería realizarse una caracterización microscópica que incluya características tales como: como la forma y el tamaño de macro y microconidios, presencia/ausencia de clamidiosporas, entre otras.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Abdelmagid, A., Hafez, M., Lawley, Y., Adam, L. R., & Daayf, F. (2018). First report of *Fusarium cerealis* causing root rot on soybean. *Plant disease*, 102:2638.

Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology* 5th edition: Elsevier academic press. Burlington, Ma. USA, 79-103.

Alfiky, A. & Weisskopf, L. (2021). Deciphering Trichoderma–Plant–Pathogen Interactions for Better Development of Biocontrol Applications. *Journal of Fungi*, 7(1), 61.

Aoki, T., Scandiani, M. M., & O'Donnell, K. (2012). Phenotypic, molecular phylogenetic, and pathogenetic characterization of *Fusarium crassistipitatum* sp. nov., a novel soybean sudden death syndrome pathogen from Argentina and Brazil. *Mycoscience*, 53(3), 167-186.

Balzarini, M. G. & Di Rienzo, J. A. (2016). InfoGen versión 2012. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.info-gen.com.ar>.

Bandelt, H. J., Foster, P. & Rohlf, A. 1999. Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 3-48.

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

Bouckaert, R. R., Vaughan, T. G., Barido-Sottani, J., Duchêne, S., Fourment, M. y Gavryushkina, A. 2019. BEAST 2.5: an advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology*.15 (4): e1006650

Chiotta, M. L., Zanon, M. S. A., Giaj-Merlera, G., Tessmann, D., Barros, G., & Chulze, S. N. (2015). Phylogenetic analyses of the *Fusarium graminearum* species complex isolated from soybean in Argentina and Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*, 10(1).

Collins, A. R. (2007). *Linkage Disequilibrium and Association Mapping: Analysis and Applications*: 376.

Díaz, A., Smith, A., Mesa, P., Zapata, J., Caviedes, D., & Cotes, A. M. (2013). Control of *Fusarium* wilt in cape gooseberry by *Trichoderma koningiopsis* and PGPR. IOBC-WPRS Bull, 86, 89-94.

Distefano, S. G., & Gadbán, L. C. (2010). "Efecto de la aplicación de fungicidas foliares de distintos grupos químicos en diferentes estadios fenológicos del cultivo de soja sobre la intensidad de «mancha ojo de rana» (*cercospora sojina*) y los componentes de rendimiento". INTA Rafaela. [http://rafaela.inta.gov.ar/publicaciones/documentos/miscelaneas/118/misc118\\_p144.pdf](http://rafaela.inta.gov.ar/publicaciones/documentos/miscelaneas/118/misc118_p144.pdf)

Ellis, M. L., Broders, K. D., Paul, P. A., & Dorrance, A. E. (2011). Infection of soybean seed by *Fusarium graminearum* and effect of seed treatments on disease under controlled conditions. *Plant Disease*, 95(4), 401-407.

Ellis, M. L., Jimenez, D. R. C., Leandro, L. F., & Munkvold, G. P. (2014). Genotypic and phenotypic characterization of fungi in the *Fusarium oxysporum* species complex from soybean roots. *Phytopathology*, 104(12), 1329-1339.

Fehr W.R., Caviness C.E., Burnood D.T. & Pennington J.S. 1977. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Science*, 11:929–931

Gally, T., González, B. A., & Pantuso, F. (2006). Efecto conjunto de *Fusarium sp.* y *Phomopsis sp.*, patógenos transmitidos por las semillas en plántulas de soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(2), 156-158.

Geiser, D. M., del Mar Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., & O'donnell, K. (2004). FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European journal of plant pathology*, 110, 473-479.

Giachino, V., Gally, T., & Pantuso, F. (2004). Evaluación de ensayos de vigor en semillas de soja de distinta calidad y su correlación con la emergencia a campo.

Giorda, L. M. & Baigorri, H. E. J. (1997). La soja en la Argentina en: El cultivo de la soja en la Argentina. Centro Regional Centro, Coordinación Subprograma Soja (INTA), 13-26.

Gower, J.C. & Ross, P.G.N. (1969). Minimum spanning tress and single cluster analysis. *Applied Statistics*, 18:54-64.

- Greer, A. M., Spurlock, T. N., & Coker, C. M. (2015). First report of *Neocosmospora* stem rot of soybean caused by *Neocosmospora vasinfecta* in Arkansas. *Plant Disease*, 99(4), 554-554.
- Guzmán-Guzmán, P., Porrás-Troncoso, M. D., Olmedo-Monfil, V., & Herrera-Estrella, A. (2019). *Trichoderma* Species: Versatile Plant Symbionts. *Phytopathology*, 109(1), 6-16.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biology sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 571-95-98
- Ivancovich, A. and Couretot, L. (2009). Diagrammatic scale for evaluation of brown spot on soybean. In: *World Soybean Conference Research, VIII. Developing a Global Soy Blueprint for a Safe Secure and Sustainable Supply*, Beijing, p. 92.
- Ivancovich, A., Botta, G., & INTA Pergamino. (2003, octubre). Enfermedades de final de ciclo de la soja. INTA Rafaela.  
[http://rafaela.inta.gov.ar/info/miscelaneas/100/misc100\\_15.pdf](http://rafaela.inta.gov.ar/info/miscelaneas/100/misc100_15.pdf)
- Lin, F., Chhapekar, S. S., Vieira, C. C., Da Silva, M. P., Rojas, A., Lee, D., & Nguyen, H. T. (2002). Breeding for disease resistance in soybean: a global perspective. *Theoretical and Applied Genetics*, 135(11), 3773-3872.
- Hartman, G. L., Chang, H. X., & Leandro, L. F. (2015). Research advances and management of soybean sudden death syndrome. *Crop protection*, 73, 60-66.
- Jimenez Madrid, A. M., Allen, T. W., & Wilkerson, T. H. (2023). First Report of *Neocosmospora* Stem Rot of Soybean Caused by *Fusarium neocosmosporiellum* in Mississippi. *Plant Disease*, 107(3), 955.
- Karlsson, I., Edel-Hermann, V., Gautheron, N., Durling, M. B., Kolseth, A. K., Steinberg, C., ... & Friberg, H. (2016). Genus-specific primers for study of *Fusarium* communities in field samples. *Applied and environmental microbiology*, 82(2), 491-501.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. y Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6): 1547-1549

- Láday, M., & Szécsi, Á. (2001). Distinct electrophoretic isozyme profiles of *Fusarium graminearum* and closely related species. *Systematic and Applied Microbiology*, 24(1), 67-75.
- Lavilla, M., Caamaño, A. A., & Ivancovich, A. J. (2016). Deterioro de la calidad sanitaria de los granos de soja por cosecha demorada. EEA Pergamino, INTA agro.unc.edu.ar
- Lavilla, M., & Ivancovich, A. (2021). Relación entre enfermedades y rendimiento de granos de soja. *Agronomía Mesoamericana*, 32(2), 479-486.
- Leandro, L. F. S., Eggenberger, S., Chen, C., Williams, J., Beattie, G. A., & Liebman, M. (2018). Cropping system diversification reduces severity and incidence of soybean sudden death syndrome caused by *Fusarium virguliforme*. *Plant Disease*, 102(9), 1748-1758.
- Leigh, J. W. & Bryant, D. 2015. Popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6: 1110-1116.
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2008). The *Fusarium* laboratory manual. 5 ed. Iowa, USA, John Wiley & Sons.
- Liu, D., Coloe, S., Baird, R., & Pedersen, J. (2000). Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *Journal of clinical microbiology*, 38(1), 471-471.
- Lombard, L., Sandoval-Denis, M., Lamprecht, S. C., & Crous, P. W. (2019). Epitypification of *Fusarium oxysporum*—clearing the taxonomic chaos. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 43(1), 1-47.
- López Bautista, V., Mora Aguilera, G., Gutiérrez Espinosa, M. A., Mendoza Ramos, C., Martínez Bustamante, V. I., Coria-Contreras, J. J., & Santana-Peñaloza, B. (2020). Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium* spp. asociados a la ocurrencia regional de marchitez y pudrición seca del cogollo en *Agave tequilana*. *Revista mexicana de fitopatología*, 38(1), 79-106.
- Madden, T. (2013). The BLAST sequence analysis tool. In *The NCBI Handbook [Internet]. 2nd edition*. National Center for Biotechnology Information (US).
- Marburger, D. A., Conley, S. P., Esker, P. D., Lauer, J. G., & Ané, J. M. (2015). Yield response to crop/genotype rotations and fungicide use to manage *Fusarium*-related diseases. *Crop Science*, 55(2), 889-898.

Martino, A. C., Álvarez, E., García, M. E. G., & Espósito, J. Presencia de soja y sus derivados en alimentos de consumo masivo. Actualization 2014.

Naeini, A., Ziglari, T., Shokri, H., & Khosravi, A. R. (2010). Assessment of growth-inhibiting effect of some plant essential oils on different *Fusarium* isolates. *Journal de mycologie médicale*, 20(3), 174-178.

Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia Univ. Press, New York.

Nei, M. (2007). The new mutation theory of phenotypic evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(30), 12235-12242.

O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E., & Ploetz, R. C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(5), 2044-2049.

O'Donnell, K., Ward, T. J., Robert, V. A., Crous, P. W., Geiser, D. M., & Kang, S. (2015). Identificación de *Fusarium* basada en secuencias de ADN: estado actual y direcciones futuras. *Fitoparasitaria*, 43, 583-595.

O'Donnell, K., Whitaker, B. K., Laraba, I., Proctor, R. W., Brown, D. W., Broders, K., Kim, H. S., McCormick, S. P., Busman, M., Aoki, T., Torres-Cruz, T. J., & Geiser, D. M. (2022). DNA Sequence-Based Identification of *Fusarium*: A Work in Progress. *Plant Disease*, 106(6), 1597-1609.

Okello, P. N., & Mathew, F. M. (2019). Cross pathogenicity studies show South Dakota isolates of *Fusarium acuminatum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. solani*, and *F. subglutinans* from either soybean or corn are pathogenic to both crops. *Plant Health Progress*, 20(1), 44-49.

Okello, PN, Petrovic, K., Singh, AK, Kontz, B. y Mathew, FM (2020). Caracterización de especies de *Fusarium* causantes de pudrición de raíz de soja (*Glycine max* L.) en Dakota del Sur, EE.UU. *Revista Canadiense de Patología Vegetal*, 42 (4), 560-571.

Ploper, L. D., González, V., Gálvez, M. R., Ramallo, N. V. D., Zamorano, M. A., García, G., & Castagnaro, A. P. (2004). Detección de la roya "asiática" en cultivos soja del noroeste argentino. *EAAOC, Avance Agroindustrial*, 25 (12-2004), 4-10.

Posada, D. 2008. JModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 1253-1256

Rahjoo, V., Zad, J., Javan-Nikkhah, M., Gohari, A. M., Okhovvat, S. M., Bihamta, M. R., ... & Klemsdal, S. S. (2008). Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from maize ears in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 463-468.

Ramdial, H., Latchoo, R. K., Hosein, F. N., & Rampersad, S. N. (2017). Phylogeny and haplotype analysis of fungi within the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex. *Phytopathology*, 107(1), 109-120.

Rambaut, A. 2018. FigTree. Version 1.4.4. [http:// tree.bio.ed.ac.uk/software-figtree/](http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/).

Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G. y Suchard, M. A. 2018. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, 675: 901-904.

Reznikov, S., De Lisi, V., Claps, P., Gonzalez, V., Devani, M. R., Castagnaro, A. P., & Ploper, L. D. (2019). Evaluation of the efficacy and application timing of different fungicides for management of soybean foliar diseases in northwestern Argentina. *Crop Protection*, 124, 104844.

Reznikov, S., Bleckwedel, J., Claps, M. P., Cataldo, D. M., Gonzáles, M. Á., Escobar, M., & Ploper, L. D. (2020). Manejo de las enfermedades en el cultivo de la soja en el noroeste argentino mediante control químico durante la campaña 2019/2020. Recuperado 10 de noviembre de 2023, [ri.conicet.gov.ar](http://ri.conicet.gov.ar)

Rozaz, J., Ferrer-Mata, A., Sanchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sanchez-Gracia, A. (2017). DnaSP v6: DNA sequence polymorphism analysis of large dataset. *Molecular Biology and Evolution*, 34, 3299-3302.

SAGyP (2023) Estimaciones agrícolas. SIIA Sistema integrado de información agropecuaria. Recuperado 8 de octubre de 2023, de <https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/estimaciones/tableros/tablero-cultivos.php?accion=imp>

Scandiani, M., Ruberti, D., O'Donnell, K., Aoki, T., Pioli, R., Giorda, L., & Biasoli, M. (2004). Recent outbreak of soybean sudden death syndrome caused by *Fusarium virguliforme* and *F. tucumaniae* in Argentina. *Plant Disease*, 88(9), 1044-1044.

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., ... & White, M. M. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (*ITS*) region

as a universal DNA barcode marker for Fungi. Proceedings of the national academy of Sciences, 109(16), 6241-6246.

Silva, LLD, Tian, H., Schemerhorn, B., Xu, JR y Cai, G. (2023). Marcadores microsatélites informativos de todo el genoma y estructura poblacional de *Fusarium virguliforme* de Argentina y Estados Unidos. Diario de Hongos, 9 (11), 1109.

Spampinato, C. P., Scandiani, M. M., & Luque, A. G. (2021). Soybean sudden death syndrome: Fungal pathogenesis and plant response. Plant pathology, 70(1), 3-12.

Sokal R.R. & Michener C.D. (1958). Statistic Methods for Evaluating Systematic Relationships. University of Kansas Science Bulletin, 38: 1409-1438.

Stewart, S., & Rodríguez, M. (2013). Manual de Identificación de Enfermedades de la Soja. INIA. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Boletín de Divulgación, (104), 22.

Summerell, B. A. (2019). Resolving *Fusarium*: Current status of the genus. Annual review of phytopathology, 57, 323-339.

Sun, Q., Zhang, S., Xie, Y., Xu, M., Herrera-Balandrano, D. D., Chen, X., Wang, S., Shi, X., & Laborda, P. (2022). Identification of New *Fusarium sulawense* Strains Causing Soybean Pod Blight in China and Their Control Using Carbendazim, Dipicolinic Acid and Kojic Acid. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(17), 10531.

Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. Molecular biology and evolution, 38(7), 3022-3027.

Thompson J.D., Higgins D.G. & Gibson T.J. (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weigh matrix choice. Nucleic Acids Research 22: 4673–4680.

Vásquez Barajas, D. A. (2021). Estudio de la diversidad molecular de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* presente en Colombia (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia). Recuperado 11 de diciembre 2023 repositorio.unal.edu.co

Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M., & Martínez-Escudero, E. (2015). Situación actual en el control de

*Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta agronómica*, 64(2), 194-205.

White T.J., Bruns T. & Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *A Guide to Molecular Methods and Applications* (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White JW, eds). Academic Press, New York: 315–322.

Wrather, J. A., Anderson, T. R., Arsyad, D. M., Gai, J., Ploper, L. D., Porta-Puglia, A., ... & Yorinori, J. T. (1997). Soybean disease loss estimates for the top 10 soybean producing countries in 1994. *Plant disease*, 81(1), 107-110.

Zhang, X. Y., Huo, H., Wang, W., Zhou, H., Dong, B., & Zhao, G. (2016). First Report of Damping-off and Seedling Blight on Oat Caused by *Rhizoctonia solani* AG 2-1 in China. *Plant Disease*, 100(3), 653.

Zhang, J. X., Xue, A. G., Cober, E. R., Morrison, M. J., Zhang, H. J., Zhang, S. Z., & Gregorich, E. (2013). Prevalence, pathogenicity and cultivar resistance of *Fusarium* and *Rhizoctonia* species causing soybean root rot. *Canadian Journal of Plant Science*, 93(2), 221-236.

## **ANEXOS**

### **Anexo I**

Protocolo para el aislamiento y reconocimiento de hongos del suelo (Fehr *et al.*, 1977)

#### **Medios de cultivo**

1. Medio APD. Ingredientes: papa 250 g; dextrosa 18 g; agar 10 g; agua destilada. Procedimiento: Se cortan 250 g de papa sin cáscara y se cubren con agua destilada. Se deja hervir durante 30 min. Concluido este tiempo se cuela la infusión o caldo de papa a través de una gasa. Se disuelve el agar en 500 ml de agua destilada, calentando ligeramente en agitación, se agrega dextrosa y se disuelve. Se añade la solución de agar dextrosa al caldo de papa mezclando bien. Finalmente, se afora con agua destilada a 1000 ml.

2. Medio V8 (jugo V8- agar). Ingredientes: jugo V8 (lata) 200 ml; CaCO 3 g; agar 18 g y agua destilada. Se pesa el CaCO y se agrega a vaso precipitado conteniendo el jugo V8 y 500 ml de agua destilada. Una vez disuelto, se agrega la cantidad necesaria de agua destilada hasta completar 1000 ml.

3. Medio AA (agua-agar). Ingredientes: agar 15 g, agua destilada. Aforar a 1000 ml.

4. Medio Agar Harina de Maíz. Ingredientes: 20 g de agar, 20 g de dextrosa, 500 ml de jugo de maíz. El jugo de maíz se obtiene llevando a hervor 20 g de harina de maíz amarillo, previamente disuelta en 500 ml de agua destilada. Se calienta a 60 °C, mientras se agita la preparación en un período aproximado de 1 hora. Luego se filtra a través de una gaza. Se agrega dextrosa y se completa con agua destilada hasta 1000 ml.

NOTA: Se agrega la cantidad correspondiente agar y se esterilizan en autoclave a 121,1°C durante 20 minutos.

#### **Siembra de suelo en placas de Petri**

Se pesa 1,5 g de suelo y se disuelve bajo cámara de flujo laminar en 5 ml de agua destilada estéril (solución madre). La solución madre se diluye 3 veces en forma

seriada a 1/10. La solución final (1/1000) se siembra en placa de Petri conteniendo los diferentes medios de cultivo, para lo cual se colocan 5 gotas de la solución 1/1000 por placa. Se deben utilizar 5 placas por medio de cultivo.

#### Incubación de los cultivos


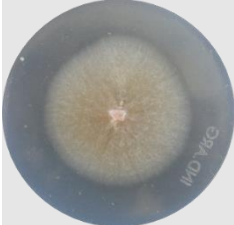



Las placas de Petri se incuban en cámaras de crecimiento a diferentes temperaturas; tres placas a 24 °C ± 2 y dos placas a 18°C durante 7 a 10 días. El fotoperiodo debe ser de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Sin embargo, puede considerarse un 100 % de oscuridad en la incubación.




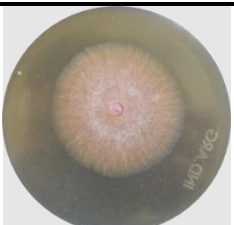

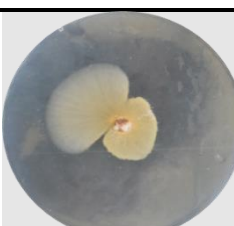
#### Evaluación de resultados






Bajo microscopio estereoscópico se determinan las variables color de micelio (CM; blanco, blanco-rosado, sepia, amarillo-rosado, blanco violáceo, bordó); densidad de micelio (DM; relajado, compacto) y diámetro a los 7 días de la siembra (7DDS; cm) de los aislamientos de *Fusarium spp.* obtenidos de suelo.


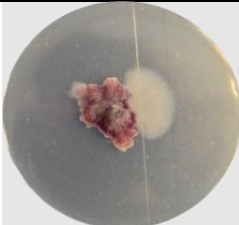


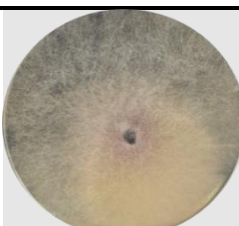

## Anexo II





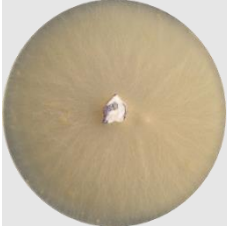

Tabla de datos morfológicos y moleculares de los aislamientos


Aislamiento	Color en APD	7DDS en APD	Densidad en APD	Haplotipos <i>EF1</i>	Haplotipos <i>ITS</i>
 1	Blanco-Rosado	9	Relajado	Hap1	Hap1
 2	Sepia	5,1	Compacto	Hap2	Hap2
 3	Sepia	3,4	Relajado	Hap3	
 4	Sepia	5,6	Relajado	Hap4	Hap3
 5	Sepia	3,3	Relajado	Hap5	Hap3

 6	Rosado	5,5	Compacto	Hap6	Hap4
 7	Rosado	5,5	Compacto	Hap7	Hap4
 8	Amarillo-Rosado	5,5	Relajado	Hap8	Hap1
 9	Rosado	4,5	Compacto	Hap5	Hap4
 10	Sepia	4,5	Compacto	Hap6	Hap1
 11	Blanco	4	Compacto	Hap7	Hap3

 12	Bordo	4	Relajado	Hap8	Hap4
 13	Rosado	5	Compacto	Hap8	Hap4
 14	Rosado	3	Compacto	Hap9	Hap4
 15	Blanco-Violáceo	9	Relajado	Hap10	
16 IMAGEN NO DISPONIBLE	Blanco	2,7	Compacto		
 17	Rosado	4,6	Compacto	Hap11	Hap4

 18	Sepia	7	Compacto	Hap12	Hap4
 19	Rosado	3	Compacto	Hap12	Hap5
 20	Amarillo- Rosado	4	Compacto	Hap6	Hap1
 21	Sepia	7,3	Compacto	Hap12	Hap4
 22	Sepia	9	Relajado	Hap3	
 23	Sepia	7,4	Compacto	Hap13	Hap4

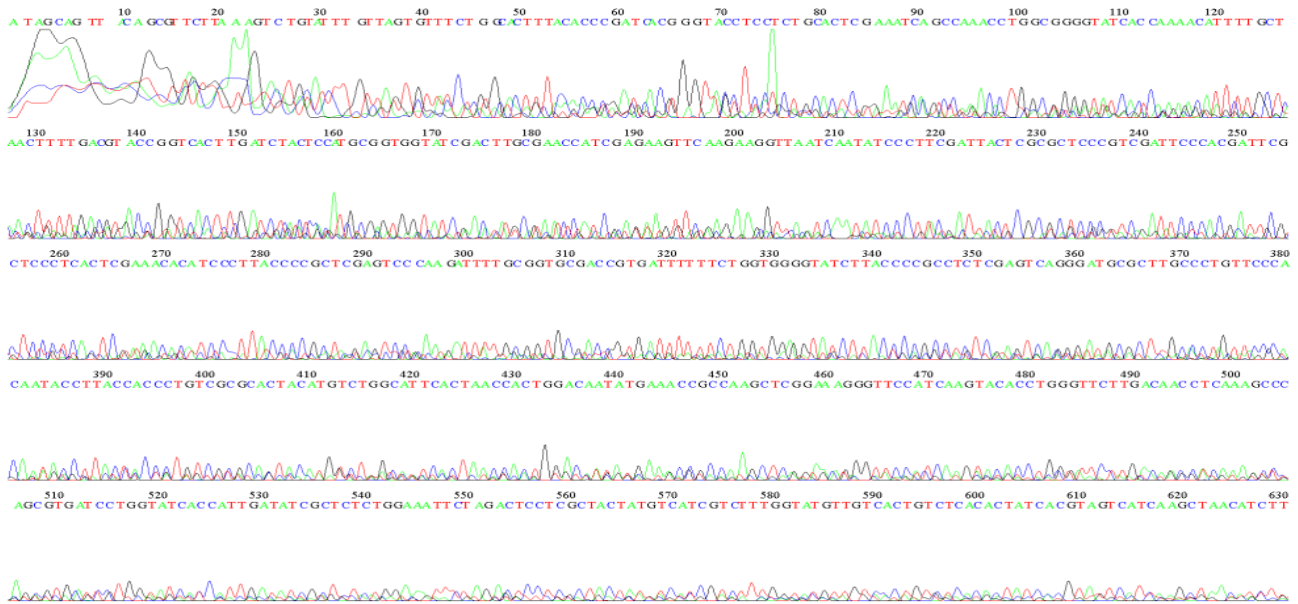
 24	Rosado	6,9	Compacto	Hap8	Hap4
 25	Violáceo	9	Relajado	Hap14	Hap1
 26	Violáceo	7	Compacto	Hap6	Hap1
 27	Sepia-Rosado	9	Compacto	Hap5	Hap4
 28	Sepia	9	Compacto	Hap3	Hap4
 29	Violáceo	9	Relajado	Hap1	Hap1

 30	Sepia	4,1	Compacto	Hap15	Hap3
---	-------	-----	----------	-------	------



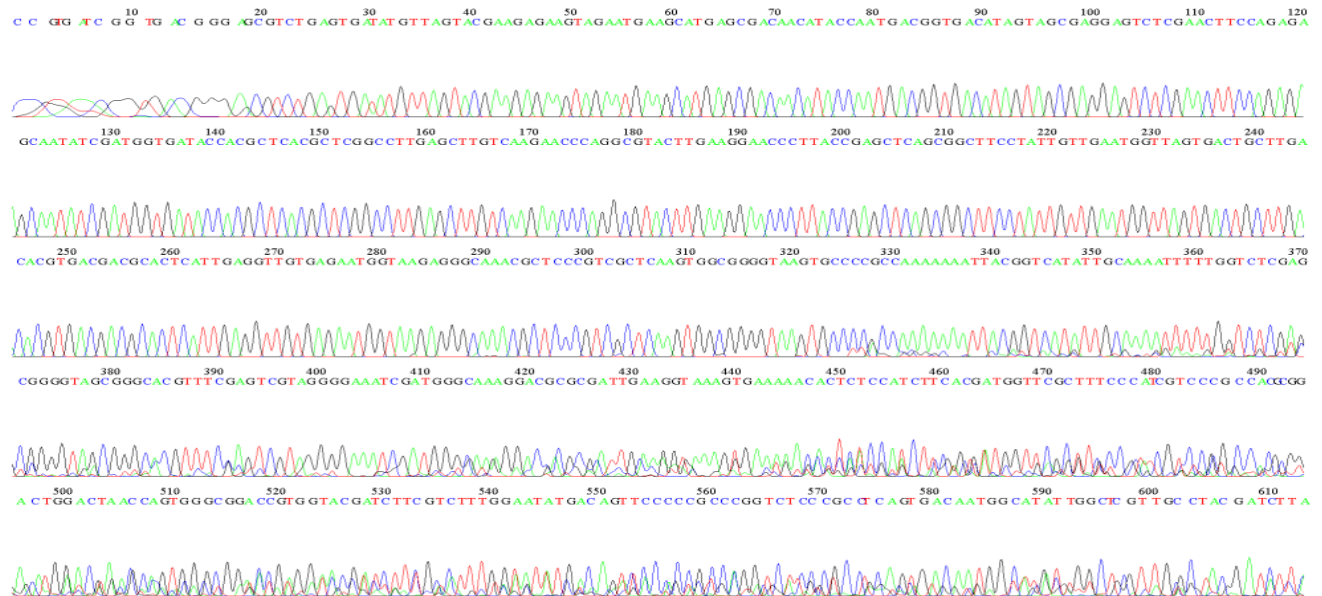
ID: 11 EF1 F

File: fus11F\_EF1.ab1 Run Ended: 2022/3/24 3:26:28 Signal G:1814 A:3004 C:4972 T:4861  
Sample: fus11F\_EF1 Lane: 23 Base spacing: 16.125835 753 bases in 8952 scans Page 1 of 2



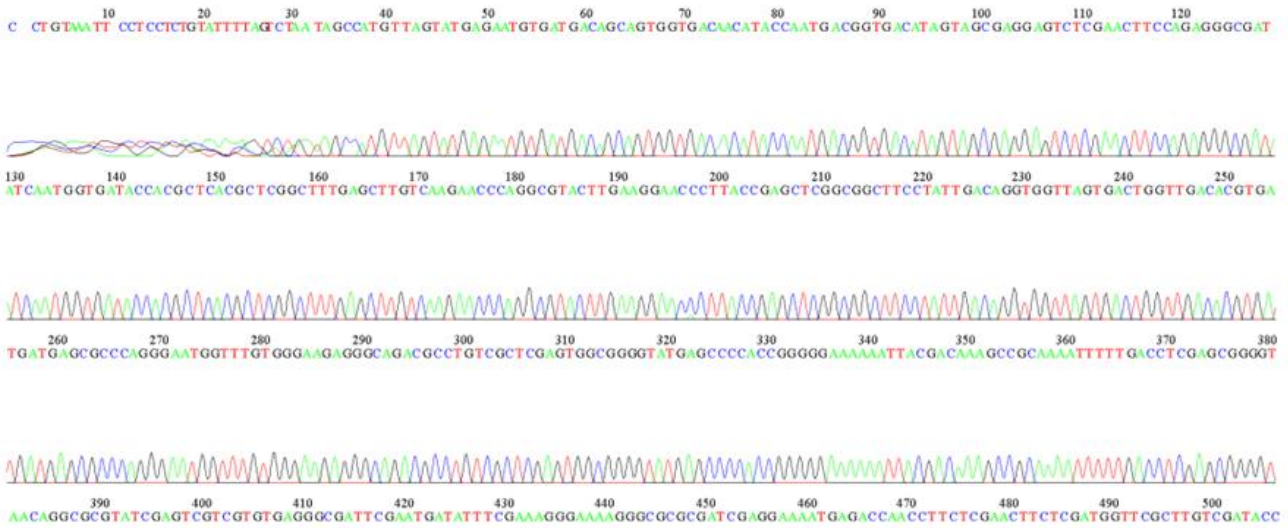
ID: 13 EF1 R

File: fus13R\_EF2.ab1 Run Ended: 2022/3/24 3:26:28 Signal G:839 A:1005 C:1108 T:1029  
Sample: fus13R\_EF2 Lane: 30 Base spacing: 16.052366 1932 bases in 21051 scans Page 1 of 2



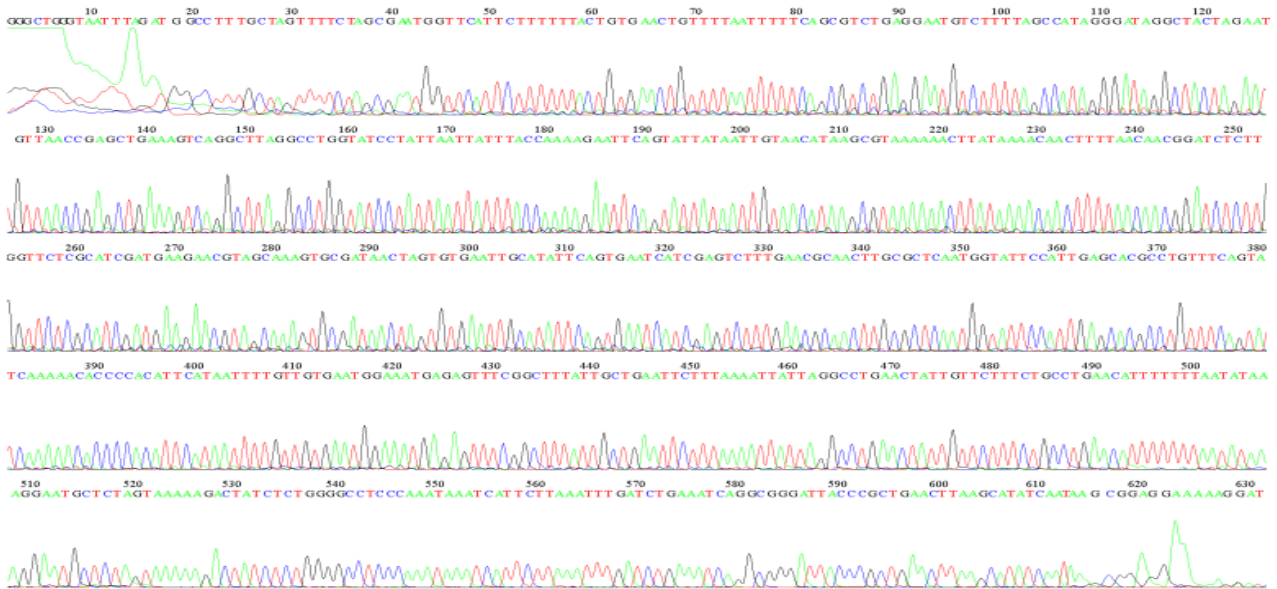
ID: 1 EF1 R

File: fus1R\_EF2.ab1 Run Ended: 2022/3/24 3:26:28 Signal G:4326 A:5051 C:6569 T:5227  
Sample: fus1R\_EF2 Lane: 13 Base spacing: 16.250038 1330 bases in 16212 scans Page 1 of 2

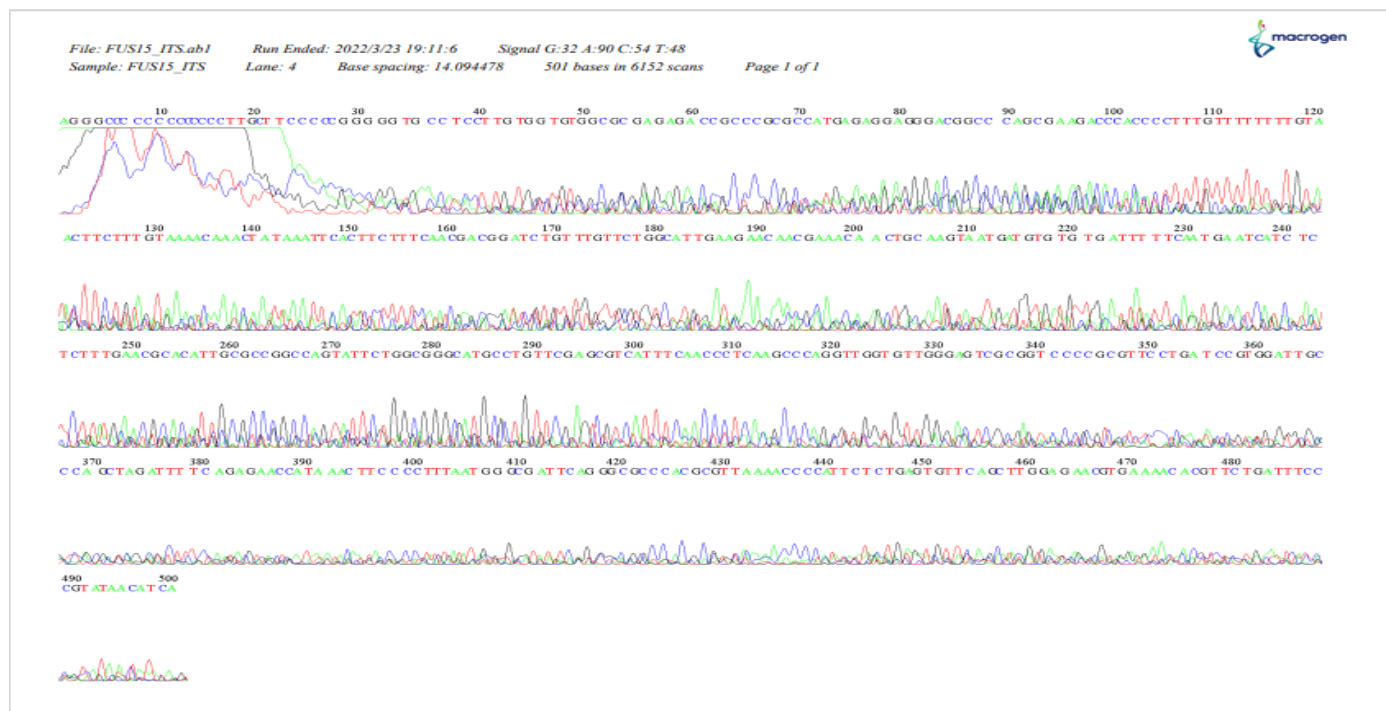


ID: 3 ITS

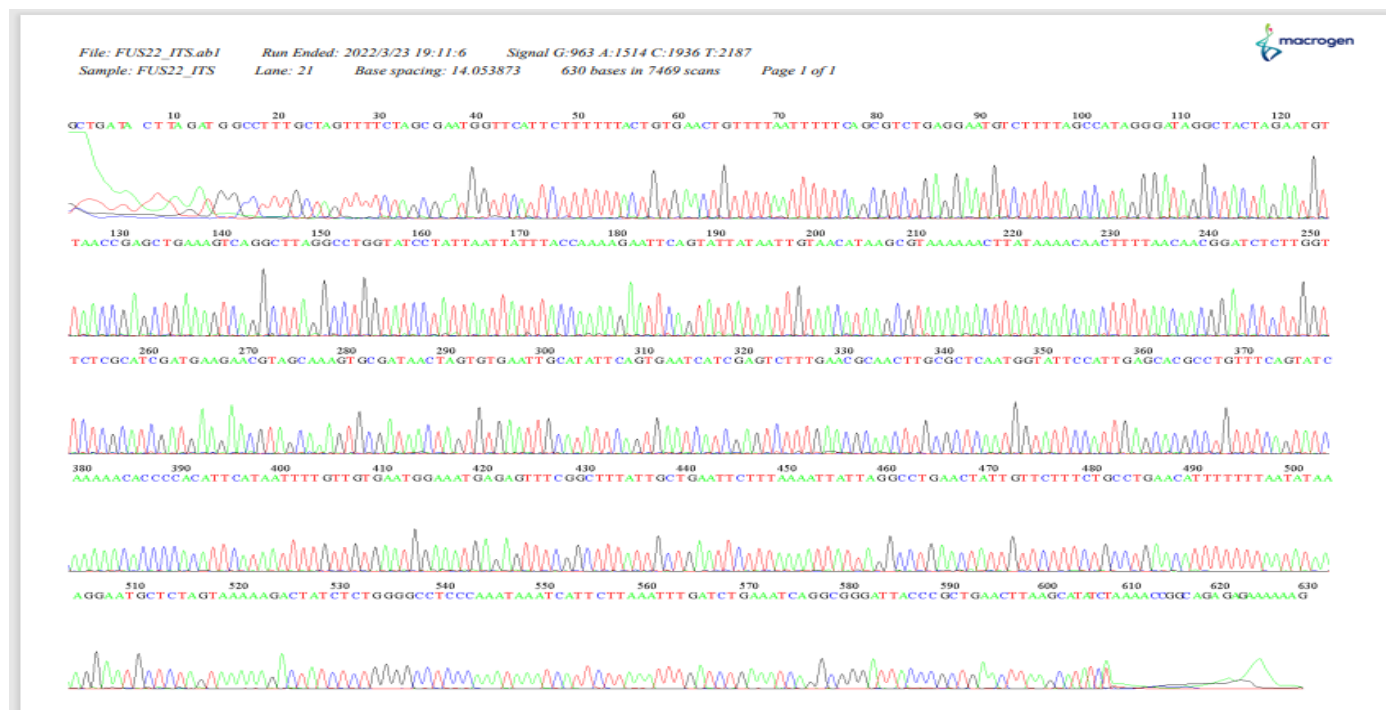
File: FUS3\_ITS.ab1 Run Ended: 2022/3/23 19:11:6 Signal G:147 A:251 C:227 T:242  
Sample: FUS3\_ITS Lane: 11 Base spacing: 14.144377 755 bases in 8900 scans Page 1 of 2



ID: 15 ITS



ID: 22 ITS



## Anexo IV

### Protocolo para microextracción de ADN en hongos (SDS)

- Colocar 100 mg de micelio en tubo cónico de 1,5 ml estéril, moler las muestras con un vástago de punta cónica, agregar 500 µl de buffer de extracción.
- Incubar en baño de agua a 65°C, 30 minutos, realizando inversiones cada 10 minutos. Retirar y agregar 150 µl acetato de potasio 5M (PH 4,8), centrifugar 10 minutos a 10.000 rpm a 4 °C.
- Transferir el sobrenadante a 1 microtubo nuevo de 1,5 ml, centrifugar 10 minutos a 10.000 rpm a 4 °C, transferir sobrenadante a un microtubo nuevo de 1,5 ml.
- Precipitar el ADN con 500 µl de isopropanol frio, colocar en freezer de -20 °C durante 10 minutos, o se puede dejar toda la noche.
- Centrifugar 5 minutos a 10000rpm, descartar el sobrenadante.
- Agregar 300 µl de etanol al 70%, centrifugar 5 minutos a 12000rpm, descartar el sobrenadante.
- Agregar 300 µl de etanol al 70%, centrifugar 5 minutos a 12000rpm, descartar el sobrenadante, dejar secar el pellet a temperatura ambiente.
- Resuspender ADN con 25 µl de TE 1X (10mM Tris-1mM EDTA)

<b>Buffer de extracción</b>	<b>[final]</b>	<b>200 ml</b>
1M Tris-CIH (PH 8)	400mM	80ml
0,5M EDTA (pH 8)	60mM	24ml
5M ClNa	150mM	1,75 g
SDS	1 %	2 g
H <sub>2</sub> O destilada		llevar a 200 ml

#### **Acetato de potasio 5M**

Disolver 49,07g de acetato de potasio (PM=98.15) en 100ml de H<sub>2</sub>O destilada.

STOCK	100 ml
KAc 5M	60 ml
Ácido acético glacial	11,5 ml
H <sub>2</sub> O	28,5 ml