



RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad
Nacional
de Quilmes

Mourellos, Cecilia Alejandra

Fusariosis de la espiga del trigo : dinámica del inóculo de *Fusarium graminearum* ante un manejo sustentable



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Mourellos, C. A. (2015). *Fusariosis de la espiga del trigo: Dinámica del inóculo de Fusarium graminearum ante un manejo sustentable. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes*
<http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/579>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

FUSARIOSIS DE LA ESPIGA DEL TRIGO: Dinámica del inóculo de *Fusarium graminearum* ante un manejo sustentable

TESIS DOCTORAL

Cecilia Alejandra Mourellos

mouceci@yahoo.com.ar

Resumen

La fusariosis de la espiga de trigo (FET) es una de las enfermedades fúngicas más importantes del cultivo de trigo y de otros cereales en la Argentina. En el país, la enfermedad es causada principalmente por *Fusarium graminearum* Schwabe [teleomorfo *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch]. Esta patología afecta tanto el rendimiento como la calidad de los granos debido a pérdidas en el tenor proteico y a la frecuente contaminación con micotoxinas. Estos metabolitos son producidos por el patógeno durante el proceso patogénico y pertenecen al grupo de los tricotecenos. Las micotoxinas más frecuentemente encontradas sobre granos afectados con FET son deoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV) y zearalenona (ZEA), y su consumo afecta tanto la salud de los animales como de los humanos. Usualmente el hongo expresa una de ellas, DON y 15-acetil-DON (quimiotipo 15-ADON), DON y 3-acetil-DON (quimiotipo 3-ADON) o NIV y su derivado acetilado fusarenona-X (quimiotipo NIV). Si bien el rol de estas micotoxinas es incierto, se ha propuesto que actuarían como factores de agresividad. Un alto grado de variación genética y en la agresividad fue observado en las poblaciones de *F. graminearum*. El manejo de la FET es complicado debido a la capacidad de *G. zeae* de sobrevivir saprofiticamente; a la presencia y dispersión del inóculo a grandes distancias; al amplio rango de hospedantes alternativos; y a las condiciones ambientales que inducen la enfermedad. Es importante destacar, que al tratarse de una enfermedad monocíclica, la cantidad de inóculo primario disponible en el periodo de antesis está estrechamente relacionada con la ocurrencia de epidemias.

En el presente estudio, se recuperaron e identificaron aislamientos de *F. graminearum* procedentes de distintas fuentes de inóculo, y se conformó una colección de 132 aislamientos. Mediante la técnica de inoculación puntual en trigo y bajo condiciones de campo se analizó la agresividad de un grupo de esos aislamientos, la capacidad para producir micotoxinas in vivo y la variabilidad genética por medio de marcadores RFLP. Por otro lado, se evaluó la dinámica del patógeno sobre los residuos de cultivos cereales y soja naturalmente infectados mediante siembra en placa y PCR en tiempo real.

Se encontraron por primera vez a 54 especies de malezas pertenecientes a 19 familias botánicas como hospedantes alternativos de *F. graminearum* y se confirmó la presencia de inóculo durante todo el año de forma cuantificable y viable. Además, se comprobó la supervivencia del inóculo de *F. graminearum* en residuos de cereales y soja por al menos 18 y 14 meses postcosecha, respectivamente.

Todos los aislamientos seleccionados fueron capaces de provocar síntomas de la FET sobre las espigas inoculadas en el campo. Aun cuando diferencias en la agresividad fueron encontradas, no se identificó un efecto significativo con respecto a la fuente de origen. La variabilidad genética testada a partir de la aplicación de RFLP en fragmentos de ADN de *F. graminearum* de 2427 bp generados por PCR utilizando primers diseñados ad hoc, demostró que hubieron escasas diferencias genómicas entre aislamientos. Adicionalmente, no existió una relación evidente entre el perfil de RFLP y la fuente de procedencia y/o la agresividad. De acuerdo al análisis genotípico de la capacidad toxicogénica se encontraron aislamientos pertenecientes a los 3 quimiotipos de *F. graminearum*, aunque la mayoría de los aislamientos obtenidos

correspondían al quimiotipo 15-ADON. Se observó una correlación positiva entre la severidad de los síntomas y la concentración de DON producida in vivo por los aislamientos. La información provista en este estudio podría ser importante para el conocimiento de la epidemiología de *F. graminearum* y para contribuir al desarrollo de estrategias de manejo sustentables destinadas a reducir el inóculo de *F. graminearum* disponible en los campos para el desarrollo de la FET.

Abstract

Fusarium Head Blight (FHB) of wheat is one of the most important fungal diseases of wheat crop and other cereals in Argentina. In the country, the disease is caused principally by *Fusarium graminearum* Schwabe [teleomorfo *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch]. This pathology affects yield and quality of the grain due to losses in the protein content and frequent contamination with mycotoxins. These metabolites are produced by the pathogen during the pathogenic process and belong to the group of trichotecenes. The most frequent mycotoxins found on FHB-affected grains are deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV) and zearalenone (ZEA), and they affect both human and animal health. Usually *F. graminearum* produces one of three chemotypes: DON and 15-acetyl-DON (15-ADON chemotype), DON and 3-acetyl-DON (3-ADON chemotype) or NIV and its acetylated derivative fusarenone-X (NIV chemotype). Although the role of these mycotoxins is uncertain, they have been proposed to act as aggressiveness factors. Genetic variation and variability in aggressiveness were observed in populations of *F. graminearum*. The management of FHB is complicated by the capacity of *G. zeae* to survive saprophitically; by the prevalence of the inoculum and its dispersal to long distances; by the ample range of alternative hosts; and by the weather conditions that induce disease. As FHB is a monocyclic disease, the quantity of primary inoculum available at the time of anthesis is related with the occurrence of epidemics.

In this study, *F. graminearum* isolates from different inoculum sources were recovered and identified, and a collection of 132 isolates was obtained. Aggressiveness of a group of these isolates on wheat was evaluated by point inoculation under field conditions; the in vivo capacity to produce mycotoxins; and the genetic variability using markers RFLP were analyzed. Additionally, pathogen dynamic on cereal and soybean residues naturally infected was evaluated through conventional methodologies and realtime PCR. Fifty four of the weed species from which isolates of *F. graminearum* were obtained, belonging to 19 botanical families, were first identified as alternative hosts of the pathogen. Furthermore, inoculum presence along to the year and its viability were confirmed and quantified. *Fusarium graminearum* inoculum was present in cereals and soybean residues by at least 18 and 14 postharvest months, respectively.

All isolates induced FHB symptoms on inoculated spikes. Even though differences in aggressiveness were found, no significant effect of the source of the isolate was identified. Genetic variability tested by RFLP on *F. graminearum* DNA fragments of 2427 bp generated by PCR using primers designed ad hoc, showed that there were scarce genetic differences between isolates. Furthermore, no evident relationship between the RFLP profile and the source and/or aggressiveness was found.

Isolates belonging to all three *F. graminearum* chemotypes were found, although most of the isolates obtained belonged to 15-ADON chemotype. A positive correlation between symptom severity and in vivo DON production was observed. The information provided in this work could prove valuable to the understanding of the epidemiology of *F. graminearum* and for the development of management practices aimed at reducing the amount of inoculum available for FHB epidemics.



**FUSARIOSIS DE LA ESPIGA DEL TRIGO:
Dinámica del inóculo de *Fusarium
graminearum* ante un manejo sustentable**

*Tesis redactada para optar al título de Doctora en Ciencia y Tecnología de la
Universidad Nacional de Quilmes.*

Cecilia Alejandra Mourellos

Licenciada en Biotecnología-Universidad Nacional de Quilmes

Directores: Ing. Agr. Gladys A. Lori

Dr. Pablo D. Ghiringhelli



FUSARIOSIS DE LA ESPIGA DEL TRIGO: Dinámica del inóculo de *Fusarium graminearum* ante un manejo sustentable

Cecilia Alejandra Mourellos

Licenciada en Biotecnología-Universidad Nacional de Quilmes

Directores: -Ing. Agr. *Gladys A. Lori*

-Dr. *Pablo D. Ghiringhelli*

Consejera de Posgrado: -Dra. *Liliana Semorile*

Jurados: -Dra. *Virginia Elena Fernández Pinto*

-Dra. *Azucena del Carmen Ridao*

-Ing Agr. *Marina Noemí Sisterna*

Lugar de trabajo:

*Centro de Investigaciones de Fitopatología e Instituto de Fisiología Vegetal,
Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata.*

*Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Celular y Molecular,
Universidad Nacional de Quilmes.*

A Claudis y Carlitos...

*“Un científico en su laboratorio no es un mero técnico:
es también un niño confrontando fenómenos naturales
que lo impresionan como si fueran cuentos de hadas.”*

Marie Curie

*“...Y es que los científicos también somos un poco
de Peter Panes empecinados en no crecer,
en seguir preguntando por qué y por qué.”*

Diego Golombek

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecerles a mis directores *Gladys Lori* y *Daniel Ghiringhelli* por su orientación, compromiso y colaboración en el desarrollo y redacción de esta Tesis. En especial, a *Gladys* por su compañía, aliento, estimulación y entusiasmo diario en la vida y en la ciencia, y en cada resultado obtenido en el mundo de la *Fusariosis de la Espiga* y de las especies del género *Fusarium*.

A la ANPCyT y CONICET por financiar mis estudios de posgrado.

A *Nestor Bayón* por su colaboración en la identificación de las malezas; a *Diego Mengual Gómez* por su asistencia en el uso de la PCR en tiempo real, y a *Florencia Orlandini*, a *Tomás Malaissi* y a *Juan Montecchia* por su cooperación en los ensayos realizados en el campo.

A *Ismael Malbrán*, mi “*hermano de la ciencia*” por sus sugerencias y su Gran Ayuda. *Gracias...*

A mi Familia: a Mi tío *Osvaldo* y mi tía *Mabel*, a mis primos *Fer* y *Mari*, a *María Rosa*, y a *Ale* y *More*, que sin darse cuenta fueron un apoyo para seguir adelante y crecer.

A mis “*Amigas de la Facu*”, *Cin*, *Debo*, *Eri*, *Lore*, *Sil* y *Vale*, por los lindos momentos compartidos y por seguir estando todas juntas.

A mis “*Amigas de la Vida*”, *Fla*, *Sole* y *Sory*, por su amistad y compañía en cada etapa que requiere un cambio, con lo difícil que se me hace...

A mis “*Amigos del Labo*”, *Ale, Mari, Pau, Pepe* y *Romi*, por cada día dentro y fuera del laboratorio, y por cada palabra de aliento, especialmente en estos últimos meses en los que fueron mis “psicólogos” y me dieron el *aguante* que necesitaba...*Muchas Gracias!!!*

Al director del CIDEFI, *Pedro Balatti*, y a cada uno de sus integrantes que me acompañaron durante el desarrollo de este estudio, y por cada uno de los mates y almuerzos “cidefianos” compartidos con consejos y sobre todo anécdotas bastante particulares.

A *Diego*, “Mi Carnel”, por su inmensa Compañía, por su Amistad, Confianza, Ayuda y por sobre todo su PACIENCIA...Gracias por haberme elegido y creer en mí!
...*Sin vos hubiese sido más difícil....*

A mi hermano *Pablito*, mi amigo, por estar Siempre a mi lado y confiar en mí en cada momento.

Y por último, a mi mamá (*Claudis*) y a mi papá (*Carlitos*), por estar cuando los necesito, confiar en mí más que nadie, y ayudarme a seguir creciendo; por cada capricho cumplido, y por cada demostración de que “***Se Puede***”... ***MUCHAS GRACIAS!!!***

...GRACIAS a Cada Uno, porque hicieron posible el desarrollo y finalización de esta Tesis...

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
ÍNDICE	iv
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xvii

CAPÍTULO I

Introducción general.....	1
1.1. Origen del Trigo	2
1.2. El trigo en la Argentina	2
1.2.1. Principales áreas trigueras en la Argentina.....	4
1.3. Principales enfermedades que afectan al trigo	5
1.4. Fusariosis de la espiga de trigo.....	6
1.4.1. Importancia económica	7
1.4.2. Sintomatología.....	9
1.4.3. El patógeno: <i>Fusarium graminearum</i>	11
1.4.4. Ciclo biológico de la Fusariosis de la espiga de trigo.....	13
1.4.5. Hospedantes/Fuentes de inóculo.....	15
1.4.6. Manejo de la Fusariosis de la espiga	16
1.4.7. Herramientas moleculares para el estudio de la FET	20
Hipótesis	23
Objetivos.....	24

CAPÍTULO II

Identificación taxonómica de aislamientos de <i>Fusarium graminearum</i> procedentes de distintas fuentes de inóculo. Caracterización genotípica de los quimiotipos presentes	25
2.1. Introducción.....	26
2.1.1. Taxonomía de <i>Fusarium graminearum</i>	26
2.1.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	29
2.1.3. Estructuras para la identificación de <i>Fusarium graminearum</i>	30

2.1.4. Micotoxinas y quimiotipos	31
2.1.5. Las malezas como fuente de inóculo	35
Objetivos.....	36
2.2. Materiales y métodos.....	37
2.2.1. Colección de aislamientos de <i>Fusarium graminearum</i> provenientes de distintas fuentes de inóculo	37
2.2.1.1. Muestreo	37
2.2.1.2. Aislamiento e identificación taxonómica	38
2.2.1.3. Conformación de la colección de aislamientos de <i>Fusarium graminearum</i> y mantenimiento	38
2.2.1.4. Extracción de ADN y PCR especie-específica.....	39
2.2.2. Análisis genotípico de los quimiotipos de <i>Fusarium graminearum</i> provenientes de distintas fuentes de inóculo.....	41
2.2.3. Dinámica de <i>Fusarium graminearum</i> en hospedantes alternativos.....	42
2.2.3.1. Análisis estadístico	42
2.3. Resultados.....	43
2.3.1. Colección de aislamientos de <i>Fusarium graminearum</i> provenientes de distintas fuentes de inóculo	43
2.3.1.1. Muestreo	43
2.3.1.2. Aislamiento	43
2.3.1.3. Identificación taxonómica.....	44
2.3.2. Análisis genotípico de los quimiotipos de <i>Fusarium graminearum</i> provenientes de distintas fuentes de inóculo.....	48
2.3.3. Dinámica de <i>Fusarium graminearum</i> en especies de malezas	49
2.4. Discusión	51
2.5. Conclusión.....	55

CAPÍTULO III

Dinámica de <i>Fusarium graminearum</i> en rastrojos de cultivos invernales y estivales y su relación con la descomposición de los mismos.....	56
--	----

3.1. Introducción.....	57
3.1.1. Epidemias.....	57
3.1.2. Condiciones ambientales predisponentes	60
3.1.3. Producción y dispersión de inóculo	61

3.1.4. Fuente de inóculo principal: Residuos de cultivos	63
2.1.5. Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real (<i>Real-time</i> PCR).....	68
Objetivos.....	69
3.2. Materiales y métodos.....	70
3.2.1. Muestras de rastrojos	70
3.2.2. Supervivencia-viabilidad de <i>Fusarium graminearum</i> / <i>Gibberella zeae</i>	71
3.2.3. Extracción de ADN a partir de rastrojos.....	72
3.2.4. PCR en tiempo real	74
3.2.5. Descomposición de rastrojos	75
3.2.6. Análisis estadístico	75
3.3. Resultados.....	75
3.3.1. Descomposición de rastrojos	76
3.3.2. Supervivencia-viabilidad de <i>Fusarium graminearum</i> / <i>Gibberella zeae</i> sobre los residuos de cultivos	77
3.3.3. Extracción de ADN.....	78
3.3.4. Dinámica de <i>F. graminearum</i> / <i>Gibberella zeae</i> en residuos de cultivos.....	80
3.4. Discusión	85
3.5. Conclusión	90

CAPÍTULO IV

Capacidad infectiva y variabilidad genética de poblaciones de *Fusarium graminearum* procedentes de distintas fuentes de inóculo91

4.1. Introducción.....	92
4.1.1. Variabilidad en la agresividad de <i>Fusarium graminearum</i>	92
4.1.2. Capacidad toxicogénica, su importancia en la seguridad alimentaria y su rol en la patogénesis de la Fusariosis de la espiga	96
4.1.3. Variabilidad genética de las poblaciones de <i>Fusarium graminearum</i>	98
Objetivos.....	101
4.2. Materiales y métodos.....	101
4.2.1. Implantación del cultivo de trigo	101
4.2.2. Preparación del inóculo artificial.....	102
4.2.3. Análisis de agresividad	104

4.2.3.1. Inoculación	104
4.2.3.2. Evaluación de agresividad a campo	105
4.2.4. Producción de deoxinivalenol <i>in vivo</i>	107
4.2.5. Variabilidad genética de las poblaciones de <i>Fusarium graminearum</i>	108
4.2.6. Análisis estadístico	111
4.3. Resultados.....	112
4.3.1. Evaluación de la agresividad a campo	112
4.3.2. Producción de deoxinivalenol <i>in vivo</i>	120
4.3.3. Variabilidad genética de las poblaciones de <i>Fusarium graminearum</i>	123
4.4. Discusión	128
4.5. Conclusión	133
 CAPÍTULO V	
Discusión y Conclusiones finales.....	134
5.1. Discusión integradora	135
5.2. Conclusiones finales	140
5.3. Interrogantes surgidos y vinculados con el presente estudio.....	142
 BIBLIOGRAFÍA	145

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Grupos funcionales R1, R2, R3, R4 y R5 de los tricotecenos de tipo A y tipo B.	34
Tabla 2: Lista de familias, especies y hábitos de las malezas muestreadas en el presente trabajo para recuperar aislamientos de <i>Fusarium graminearum</i>	46
Tabla 3: Comparación de rendimientos de ADN y amplificación especie-específica de <i>Fusarium graminearum</i> por PCR del ADN extraído con los diferentes métodos a partir de los residuos de cultivos.	79
Tabla 4: Aislamientos de <i>Fusarium graminearum</i> incluidos en el ensayo de agresividad	102
Tabla 5: Enzimas utilizadas en el ensayo de RFLP con sus correspondientes secuencias de reconocimiento, y sitios de corte teóricos y tamaños de los mismos a obtener para el fragmento amplificado DGFg de <i>Fusarium graminearum</i>	111
Tabla 6: Estimaciones de los componentes de la varianza de la severidad de la fusariosis de la espiga de trigo a los 21 días post inoculación (dpi), para los 31 aislamientos de <i>Fusarium graminearum</i> inoculados en espigas de trigo en los 2 años de ensayos de campo..	116
Tabla 7: Severidad de la fusariosis de la espiga de trigo a los 21 días post inoculación (dpi) y área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC) inducidos por 61 aislamientos de <i>Fusarium graminearum</i> inoculados en espigas de trigo en los 2 años de ensayos de campo... ..	117
Tabla 8: Resultados del análisis genotípico de tricotecenos y de producción de micotoxinas in vivo durante el ensayo a campo efectuado en los años 2011 y 2013 de los 31 aislamientos de <i>Fusarium graminearum</i> provenientes de distintas fuentes de inóculo.	121

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Stock inicial y producción obtenida de trigo en las campañas 2011/12; 2012/13 y 2013/14 (Fuente SIIA).	3
Figura 2: Subregiones trigueras de la Argentina (Fuente Sinavimo).	4
Figura 3: Espigas con síntomas característicos de la Fusariosis de la espiga de trigo. a) Espiga infectada con el tejido apical necrosado; b) Espiguillas infectadas con agrupamiento salmón-anaranjado de macroconidios (pionnotes); c) Espiguillas infectadas con crecimiento de micelio sobre las glumas.	10
Figura 4: Porciones de tallos de trigo con peritecios de <i>Gibberella zeae</i>	10
Figura 5: Observación al microscopio de peritecios de <i>Gibberella zeae</i> . a) Peritecio inmaduro; b) Peritecio maduro con masa de ascas y ascosporas.	12

Figura 6: Principales micotoxinas producidas por <i>Fusarium graminearum</i> . a) Zearalenona; b) Nivalenol; c) Deoxinivalenol.	12
Figura 7: Ciclo de vida de la Fusariosis de la espiga de trigo ocasionada por <i>Fusarium graminearum</i> Schwabe (Trail, 2009)	14
Figura 8: Comparación entre granos de trigo afectados por la Fusariosis de la espiga (“chuzos”) (Izquierda) y sanos (Derecha).	15
Figura 9: Estructura química de los tricotecenos de los grupos de tipo A y tipo B.	34
Figura 10: a) y b) Aislamientos de <i>Fusarium graminearum</i> realizados a partir de inflorescencias de malezas en placas de Petri con medio de cultivo Agar papa glucosado (APG); c) Colonia de <i>F.graminearum</i> , micelio aéreo, y d) Reverso de colonia mostrando la coloración rojiza-carmín en el medio de cultivo	45
Figura 11: Gel sembrado con los productos de reacción de la PCR especie-especifica (Fg16N) de aislamientos de la colección. CALLES: 1-Marcador de Peso Molecular; 2-Control de Condiciones de Reacción; 3-Control positivo (<i>F. graminearum</i> RBG2507); 4-10 Aislamientos de malezas (LH14; LH15; LH16; LH18; LH19; LH20; LH21); 11-12 Controles negativos, <i>F. poae</i> ; 13-18 Aislamientos de malezas (LH22; LH23; LH25; LH26; LH27; LH28).....	46
Figura 12: Gel sembrado con los productos de reacción de la PCR múltiple de 12 aislamientos. CALLES: 1: Marcador de Peso Molecular; 2-3: Aislamientos con quimiotipo 15-ADON (LH14; LH17); 4-6: Aislamientos con quimiotipo NIV (LH27; LH28; LH83); 9-13: Aislamientos con quimiotipo 15-ADON (LH20; LH22; LH25; LH26; LH64); 8: Aislamiento con quimiotipo •3-ADON (LH39); 7: reacción negativa.	48
Figura 13: Porcentaje de los quimiotipos obtenidos mediante la PCR múltiple desarrollada por Starkey <i>et al.</i> (2007) de la colección de aislamientos de <i>Fusarium graminearum</i> provenientes de distintas fuentes de origen.).....	49
Figura 14: Porcentaje de incidencia de colonización de <i>Fusarium graminearum</i> en todas las especies de malezas recolectadas durante los 6 eventos de muestro. Letras distintas implican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$).....	50
Figura 15: Porcentaje de incidencia de colonización de <i>Fusarium graminearum</i> analizada solamente en las 5 especies de malezas (<i>Cynodon dactylon.</i> , <i>Cyperus eragrostis</i> , <i>Picris echinoides</i> , <i>Raphanus sativus</i> , y <i>Dactylis glomerata</i>) que fueron recolectadas en cada uno de los 6 eventos de muestro. Letras distintas implican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$).50	
Figura 16: Frecuencias de epidemias de la FET en el Cono Sur (Kholi y Díaz de Ackermann, 2013)	59
Figura 17: Evolución de la superficie sembrada bajo siembra directa en la Argentina (AAPRESID, 2012).....	67
Figura 18: a) Cultivos de cereales invernales naturalmente infectados y, b) Cultivo de soja de segunda implantado mediante siembra directa sobre los rastrojos de los cultivos invernales.. ..	71

- Figura 19:** Datos meteorológicos de las variables Temperatura y Precipitaciones promedio del periodo de tiempo en que se realizaron los ensayos (correspondientes a las 4 estaciones del año 2010, y al Verano y Otoño de 2011).. 76
- Figura 20:** Disminución de peso seco de los distintos rastrojos de cultivos gramíneas analizados en los 5 periodos de muestreo. 77
- Figura 21:** a) Nudos de cereales con peritecios de *Gibberella zeae*; Abajo: Aislamientos en APG (supervivencia-viabilidad) de *Fusarium graminearum*/*Gibberella zeae* a partir de las muestras de: b) rastrojos de trigo y, c) y d) rastrojos y semillas de soja recolectados en distintos periodos de muestreo..... 78
- Figura 22:** Curva de melting [derivada negativa de Fluorescencia con respecto a la temperatura (-dF/dT) vs. Temperatura °C] mostrando amplificación específica del fragmento Fg16N de las distintas muestras en PCR en tiempo real, y gel de agarosa 1,5% del producto específico de 280 pb. Calles: Marcador de Peso Molecular 1Kb escalonado; 1- Control negativo-Agua; 2- Control negativo-ADN extraído de planta de trigo sana; 3- Control positivo-ADN puro de *F. graminearum*; 4 a 11-Muestras de rastrojos.) 80
- Figura 23** Dinámica de *Fusarium graminearum* / *Gibberella zeae* en rastrojos de cultivos gramíneas a los 4 (Abril 2010), 6 (Junio 2010), 9 (Septiembre 2010) y 11 meses postcosecha (Noviembre 2010), analizada por cuantificación de UFC en placa. Las medias con una letra en común no son significativamente distintas ($p < 0.05$)..... 81
- Figura 24:** Dinámica de *Fusarium graminearum* /*Gibberella zeae* en rastrojos de cultivos gramíneas a los 6 (Junio 2010), 9 (Septiembre 2010), 11 (Noviembre 2010) y 18 meses postcosecha (Julio 2011), analizada por PCR cuantitativa con el par de *primers* Fg16N. Las medias con una letra en común no son significativamente distintas ($p < 0.05$).. 83
- Figura 25:** Dinámica de *Fusarium graminearum* / *Gibberella zeae* en rastrojos de soja a los 4 (Septiembre 2010), 8 (Enero 2011) y 14 meses postcosecha (Julio 2011), analizada por PCR cuantitativa con el par de *primers* Fg16N. Las medias con una letra en común no son significativamente distintas ($p < 0.05$).. 84
- Figura 26:** Cuantificación por PCR en tiempo real de *Fusarium graminearum*/gramo de rastrojo en Julio de 2011 (último momento de muestreo, 18 meses postcosecha cultivos cereales y 14 meses postcosecha cultivo de soja). 85
- Figura 27:** Análisis de la agresividad a campo: a) Espigas de trigo seleccionadas, marcadas y numeradas; b) Inoculación puntual en una de las espiguillas centrales de la espiga; c) Espigas inoculadas y cubiertas individualmente con bolsas de polietileno (cámara húmeda). 105
- Figura 28:** Esquema de numeración de cada espiguilla en las espigas inoculadas. Solo se indican numeradas las 4 espiguillas superiores e inferiores al punto de inoculación (-1 y +1). 106
- Figura 29:** Cuantificación de la producción de DON *in vivo* mediante ELISA. a) Pesaje de muestra de granos molidos; b) Homogenización de la mezcla y c) Filtrado de cada una de las muestras. d) Determinación de la absorbancia a 450 nm de cada muestra en el detector de microplacas. 108

- Figura 30:** Secuencia del amplicón obtenido de *Fusarium graminearum* con los *primers* DG-Fg (2427 bp). Al inicio y al final de la secuencia se detallan los *primers*. El fragmento sombreado corresponde al fragmento obtenido con los *primers* especie-específicos Fg16N (Nicholson *et al.*, 1998). 110
- Figura 31:** Representación de los sitios de corte de las 4 enzimas de restricción utilizadas (RsaI, HinfI, Fnu4HI y Sau3AI) del fragmento DGFg de *Fusarium graminearum*. El segmento resaltado con un rectángulo celeste corresponde al fragmento especie –específico Fg16N (Nicholson *et al.*, 1998)..... 111
- Figura 32:** Datos meteorológicos. Temperatura (°C) y Humedad relativa (%) durante el periodo de antesis en los 3 años de ensayo, a) Año 2011, b) Año 2012 y c) Año 2013. Las flechas indican eventos de lluvias. 114
- Figura 33:** Espigas de trigo inoculadas con macroconidios de *Fusarium graminearum* con distinto porcentaje de síntomas necróticos en espiguillas (% Severidad). 115
- Figura 34:** Análisis de regresión entre el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC) y la severidad de la FET (%) de los 31 aislamientos del ensayo de 2011 (rótulos rellenos) y de los 61 aislamientos de *Fusarium graminearum* del ensayo de 2013 (rótulos vacíos). ■, ▲ y ●: corresponden a los aislamientos provenientes de malezas gramíneas, de malezas no-gramíneas y de cultivos invernales y estivales, respectivamente..... 119
- Figura 35:** Análisis de regresión entre el peso de mil granos (PMG) y la severidad de la FET (%) de los 31 aislamientos del ensayo de 2011 (rótulos rellenos) y de los 61 aislamientos de *Fusarium graminearum* del ensayo de 2013 (rótulos vacíos). ■, ▲ y ●: corresponden a los aislamientos provenientes de malezas gramíneas, de malezas no- gramíneas y de cultivos invernales y estivales, respectivamente..... 120
- Figura 36:** Análisis de regresión entre la severidad de la infección de la FET (%) y la concentración de DON (ppm) producida en las espigas por cada aislamiento en los ensayos correspondientes a los años 2011 y 2013..... 123
- Figura 37:** Ejemplo de geles obtenidos a partir de la digestión de los aislamientos de *Fusarium graminearum* con la enzima Sau 3AI. Las Calles 1 a 10 corresponden a aislamientos de la colección procedentes de malezas no gramíneas; la calle 11 corresponde al aislamiento IVII3 (control positivo); y las calles 12 a 20 a aislamientos de la colección procedentes de malezas gramíneas.... 125
- Figura 38:** Dendrograma filogenético obtenido a partir de los fragmentos generados por 51 aislamientos de *Fusarium graminearum* con 4 enzimas de restricción (RFLP) del fragmento amplificado con los *primers* DGFg..... 126
- Figura 39:** Mapa genómico del fragmento DGFg de *Fusarium graminearum* (Broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_graminearum/Regions.html)..... 127

ABREVIATURAS

15-ADON: 15-Acetil deoxinivalenol.

3-ADON: 3-Acetil deoxinivalenol.

AAPRESID: Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

AFLP: Polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (*Amplified Fragment Length Polymorphism*).

ANOVA: Análisis de la varianza.

APG: Medio de cultivo Agar Papa Glucosado.

ARN: Ácido Ribonucleico.

AUDPC: Área bajo la curva de progreso de la enfermedad (*Area Under Disease Progress Curve*).

CMC: Carboximetil Celulosa.

CIMMYT: Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo

Cl₂Mg: Cloruro de Magnesio.

Ct: Ciclo umbral o *Threshold cycle*.

CTAB: Bromuro de hexadecil trimetilamonio (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*).

DAS: Diacetoxiscirpenol.

DL₅₀: Dosis Letal 50.

dNTP: Desoxirribonucleótido trifosfato.

DON: Deoxinivalenol.

dpi: Días post inoculación.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético (*Ethylenediaminetetraacetic acid*).

EE.UU.: Estados Unidos de América.

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligada a enzimas (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

FDA: Administración de medicamentos y alimentos (*Food and Drugs Administration*).

FET: Fusariosis de la espiga de trigo.

FUS-X: Fusarenona-X.

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución (*High Performance Liquid Chromatography*).

ISSR: Repeticiones de Secuencia Intergénica Simple (*Inter-Simple Sequence Repeats*). **NaCl:** Cloruro de Sodio.

NIV: Nivalenol.

PCNB: Pentacloronitrobenzeno.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*).

PI: Punto de inoculación.

PMG: Peso de mil granos.

ppm: Partes por millón.

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

QTL: Locus de rasgos cuantitativos. (*Quantitative Trait Locus*).

RAPD: ADN polimórfico amplificado al azar (*randomly amplified polymorphic DNA*).

RFLP: Polimorfismos en el largo de fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*).

RNAsa: Ribonucleasa.

SIIA: Sistema Integrado de Información Agropecuaria.

Sinavimo: Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de plagas.

Tris: Tris (hidroximetil)aminometano.

UFC: Unidades Formadoras de Colonias.

VCG: Grupos de Compatibilidad Vegetativa (*Vegetative Compatibility Groups*).

ZEA: Zearalenona.



RESUMEN

La fusariosis de la espiga de trigo (FET) es una de las enfermedades fúngicas más importantes del cultivo de trigo y de otros cereales en la Argentina. En el país, la enfermedad es causada principalmente por *Fusarium graminearum* Schwabe [teleomorfo *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch]. Esta patología afecta tanto el rendimiento como la calidad de los granos debido a pérdidas en el tenor proteico y a la frecuente contaminación con micotoxinas. Estos metabolitos son producidos por el patógeno durante el proceso patogénico y pertenecen al grupo de los tricotecenos. Las micotoxinas más frecuentemente encontradas sobre granos afectados con FET son deoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV) y zearalenona (ZEA), y su consumo afecta tanto la salud de los animales como de los humanos. Usualmente el hongo expresa una de ellas, DON y 15-acetil-DON (quimiotipo 15-ADON), DON y 3-acetil-DON (quimiotipo 3-ADON) o NIV y su derivado acetilado fusarenona-X (quimiotipo NIV). Si bien el rol de estas micotoxinas es incierto, se ha propuesto que actuarían como factores de agresividad. Un alto grado de variación genética y en la agresividad fue observado en las poblaciones de *F. graminearum*. El manejo de la FET es complicado debido a la capacidad de *G. zeae* de sobrevivir saprofiticamente; a la presencia y dispersión del inóculo a grandes distancias; al amplio rango de hospedantes alternativos; y a las condiciones ambientales que inducen la enfermedad. Es importante destacar, que al tratarse de una enfermedad monocíclica, la cantidad de inóculo primario disponible en el periodo de antesis está estrechamente relacionada con la ocurrencia de epidemias.

En el presente estudio, se recuperaron e identificaron aislamientos de *F. graminearum* procedentes de distintas fuentes de inóculo, y se conformó una colección de 132 aislamientos. Mediante la técnica de inoculación puntual en trigo y bajo

condiciones de campo se analizó la agresividad de un grupo de esos aislamientos, la capacidad para producir micotoxinas *in vivo* y la variabilidad genética por medio de marcadores RFLP. Por otro lado, se evaluó la dinámica del patógeno sobre los residuos de cultivos cereales y soja naturalmente infectados mediante siembra en placa y PCR en tiempo real.

Se encontraron por primera vez a 54 especies de malezas pertenecientes a 19 familias botánicas como hospedantes alternativos de *F. graminearum* y se confirmó la presencia de inóculo durante todo el año de forma cuantificable y viable. Además, se comprobó la supervivencia del inóculo de *F. graminearum* en residuos de cereales y soja por al menos 18 y 14 meses postcosecha, respectivamente.

Todos los aislamientos seleccionados fueron capaces de provocar síntomas de la FET sobre las espigas inoculadas en el campo. Aun cuando diferencias en la agresividad fueron encontradas, no se identificó un efecto significativo con respecto a la fuente de origen. La variabilidad genética testada a partir de la aplicación de RFLP en fragmentos de ADN de *F. graminearum* de 2427 bp generados por PCR utilizando *primers* diseñados *ad hoc*, demostró que hubieron escasas diferencias genómicas entre aislamientos. Adicionalmente, no existió una relación evidente entre el perfil de RFLP y la fuente de procedencia y/o la agresividad. De acuerdo al análisis genotípico de la capacidad toxicogénica se encontraron aislamientos pertenecientes a los 3 quimiotipos de *F. graminearum*, aunque la mayoría de los aislamientos obtenidos correspondían al quimiotipo 15-ADON. Se observó una correlación positiva entre la severidad de los síntomas y la concentración de DON producida *in vivo* por los aislamientos. La información provista en este estudio podría ser importante para el conocimiento de la epidemiología de *F. graminearum* y para contribuir al desarrollo de estrategias de

manejo sustentables destinadas a reducir el inóculo de *F. graminearum* disponible en los campos para el desarrollo de la FET.



ABSTRACT

Fusarium Head Blight (FHB) of wheat is one of the most important fungal diseases of wheat crop and other cereals in Argentina. In the country, the disease is caused principally by *Fusarium graminearum* Schwabe [teleomorfo *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch]. This pathology affects yield and quality of the grain due to losses in the protein content and frequent contamination with mycotoxins. These metabolites are produced by the pathogen during the pathogenic process and belong to the group of trichotecenes. The most frequent mycotoxins found on FHB-affected grains are deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV) and zearalenone (ZEA), and they affect both human and animal health. Usually *F. graminearum* produces one of three chemotypes: DON and 15-acetyl-DON (15-ADON chemotype), DON and 3-acetyl-DON (3-ADON chemotype) or NIV and its acetylated derivative fusarenone-X (NIV chemotype). Although the role of these mycotoxins is uncertain, they have been proposed to act as aggressiveness factors. Genetic variation and variability in aggressiveness were observed in populations of *F. graminearum*. The management of FHB is complicated by the capacity of *G. zeae* to survive saprophitically; by the prevalence of the inoculum and its dispersal to long distances; by the ample range of alternative hosts; and by the weather conditions that induce disease. As FHB is a monocyclic disease, the quantity of primary inoculum available at the time of anthesis is related with the occurrence of epidemics.

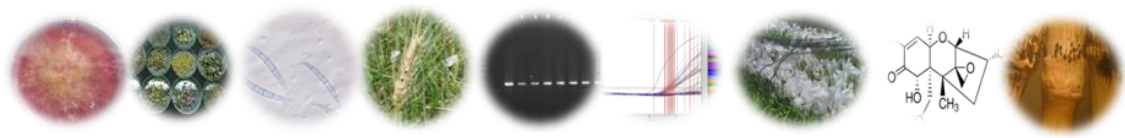
In this study, *F. graminearum* isolates from different inoculum sources were recovered and identified, and a collection of 132 isolates was obtained. Aggressiveness of a group of these isolates on wheat was evaluated by point inoculation under field conditions; the *in vivo* capacity to produce mycotoxins; and the genetic variability using

markers RFLP were analyzed. Additionally, pathogen dynamic on cereal and soybean residues naturally infected was evaluated through conventional methodologies and real-time PCR.

Fifty four of the weed species from which isolates of *F. graminearum* were obtained, belonging to 19 botanical families, were first identified as alternative hosts of the pathogen. Furthermore, inoculum presence along to the year and its viability were confirmed and quantified. *Fusarium graminearum* inoculum was present in cereals and soybean residues by at least 18 and 14 postharvest months, respectively.

All isolates induced FHB symptoms on inoculated spikes. Even though differences in aggressiveness were found, no significant effect of the source of the isolate was identified. Genetic variability tested by RFLP on *F. graminearum* DNA fragments of 2427 bp generated by PCR using primers designed ad hoc, showed that there were scarce genetic differences between isolates. Furthermore, no evident relationship between the RFLP profile and the source and/or aggressiveness was found. Isolates belonging to all three *F. graminearum* chemotypes were found, although most of the isolates obtained belonged to 15-ADON chemotype. A positive correlation between symptom severity and *in vivo* DON production was observed. The information provided in this work could prove valuable to the understanding of the epidemiology of *F. graminearum* and for the development of management practices aimed at reducing the amount of inoculum available for FHB epidemics.





CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Origen del Trigo

Los ancestros de los trigos actuales podrían haber tenido su origen tanto en la Mesopotamia (actual Irak), como en las tierras de Etiopía. Las primeras plantas de trigo fueron encontradas a orillas de los lagos de Suiza en las ruinas de los pobladores de la Edad de Piedra, quienes vivieron allí hace aproximadamente 10.000 a 15.000 años.

Otros documentos atestiguan que el cultivo de trigo es originario de Asia Menor y que luego se expandió a los países de la cuenca del Mediterráneo y a algunos países asiáticos. Ulteriormente, alcanzó al resto de Europa y posterior a su descubrimiento, a América y Oceanía (Tombetta y Nisi, 1998).

1.2. El trigo en la Argentina

El trigo (*Triticum aestivum* L.) fue introducido en la Argentina desde Europa por los conquistadores españoles. Sebastián Gaboto fue el primero en introducirlo en el Río de la Plata en el año 1527, efectuando la primera siembra en pequeña escala en el fuerte *Sancti Spiritu*, que fundara en la desembocadura del Río Carcarañá, en la provincia de Santa Fe.

La provincia de Santa Fe fue la primera tierra argentina poblada ruralmente por la conquista y la primera en donde se sembró trigo. “El trigo fue por lo tanto el cultivo pionero o fundador de la colonización agrícola de la región pampeana”.

La expansión del cultivo de trigo se intensificó a partir de la década de 1870. En la primera década de 1900, Argentina exportaba alrededor de 3 millones de toneladas, ocupando el primer lugar como exportador con el 23% de la producción. Los rendimientos siguieron en aumento, registrándose récords de producción en las cosechas correspondientes a las campañas agrícolas 1982/83 y 1996/97 con 15 y 16 millones de toneladas, respectivamente (Tombetta y Nisi, 1998). En las últimas campañas, los

rendimientos en las cosechas de trigo fueron, 14,5 millones de toneladas, 8 millones de toneladas y 9,2 millones de toneladas en los años 2011/12; 2012/13 y 2013/14 respectivamente (Figura 1) (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca-Sistema Integrado de Información Agropecuaria- Disponible en http://www.siiia.gob.ar/sst_pcias/estima/estima.php). Durante la campaña 2012/13 la cantidad de hectáreas sembradas indicó un retroceso del 20% en relación a la cobertura lograda en el ciclo precedente. La influencia negativa de las lluvias acaecidas en Octubre, Noviembre y Diciembre, determinó la presencia masiva de enfermedades en hoja y espiga. Esta situación se tradujo en rindes y calidad de grano inferior a lo esperado. En la campaña siguiente, 2013/14, si bien la producción y la cobertura de superficie implantada con respecto al ciclo previo aumentaron un 10% y 16% respectivamente, los rindes obtenidos fueron regulares a bajos debido a inclemencias climáticas (falta de lluvias y heladas) (<http://www.siiia.gob.ar/informes>).

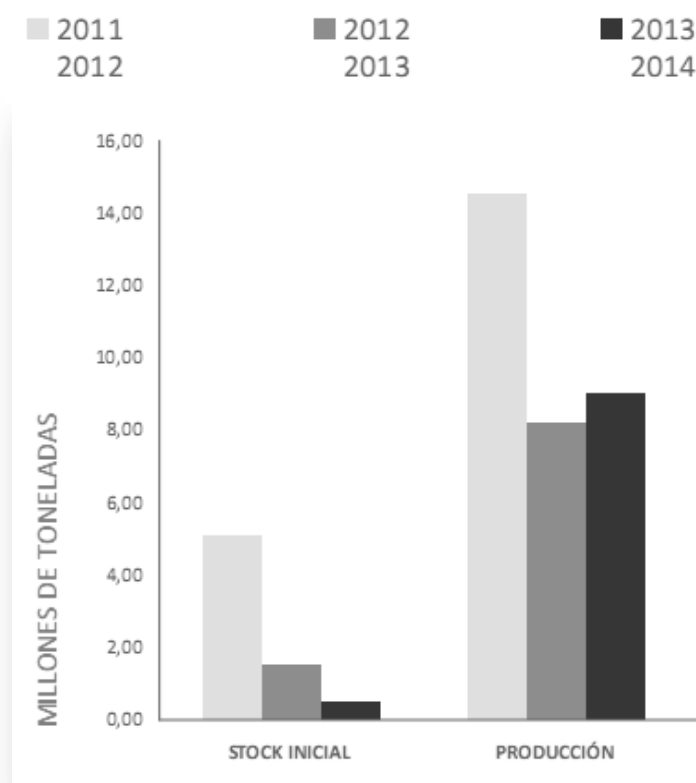


Figura 1: Stock inicial y producción obtenida de trigo en las campañas 2011/12; 2012/13 y 2013/14 (Fuente SIIA).

1.2.1. Principales áreas trigueras en la Argentina

La región triguera argentina está ubicada entre los paralelos 31° y 40° latitud Sur y los meridianos 58° y 65° de longitud Oeste de Greenwich. Abarca las provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba, La Pampa, Entre Ríos, y las provincias del Noroeste (NOA) y Noreste argentino (NEA). Tiene un clima templado con elevada variabilidad, debido al régimen de lluvias que suele ser irregular de un año al otro, influyendo sobre la producción.

Como consecuencia de la amplitud de toda la región triguera y la diversidad de ambientes, el Ministerio de Agricultura en la década del 1930, estableció seis Regiones Trigueras que luego fueron modificadas a 9 en 1952. Para la delimitación de cada una, fueron tenidas en cuenta las diferencias ecológicas de cada Región. Las 9 subregiones fueron nombradas: NOA, NEA, I, II Norte y II Sur, III, IV, V Norte y V Sur (Figura 2).

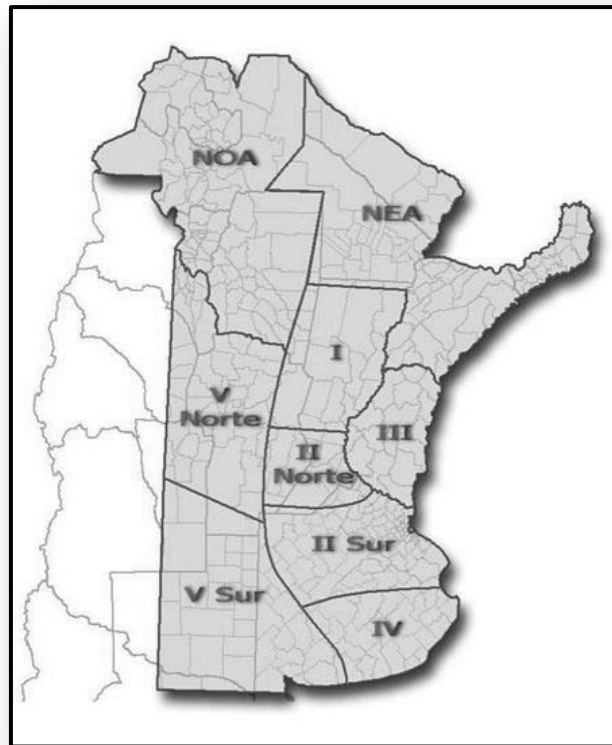


Figura 2: Subregiones trigueras de la Argentina (Fuente Sinavimo).

En la Argentina las principales regiones productoras de trigo son el sur de la provincia de Buenos Aires, que produce aproximadamente el 60% del total del país, el sur de Santa Fe y el sur de Córdoba con una producción de alrededor del 15% del total, cada una.

A nivel mundial, China e India son los principales países productores de trigo, registrando en los últimos 6 años importantes incrementos en la producción. Estos dos países ocupan los primeros puestos en el ranking de producción mundial. En lo que respecta a la Argentina las últimas campañas representaron el 1,2% del total mundial, posicionándose decimocuarta en el ranking de países productores (www.bcr.com.ar/Pages/Publicaciones/infoboletinsemanal.aspx?IdArticulo=796, Bolsa de Comercio de Rosario).

1.3. Principales enfermedades que afectan al trigo

Diversas enfermedades afectan al cultivo de trigo, dentro de las cuales existen patologías causadas por bacterias, virus y hongos. Los últimos microorganismos mencionados son los más numerosos y los que causan mayores daños. Los hongos absorben nutrientes del tejido vivo o muerto de su hospedante. Este grupo de organismos provoca las siguientes enfermedades en el cultivo de trigo:

“Fusariosis de la espiga” [*Fusarium graminearum* Schwabe (teleomorfo: *Gibberella zae* (Schwein) Petch)], las royas “anaranjada de la hoja” (*Puccinia triticina* Eriks.) y “negra del tallo” (*Puccinia graminis* Pers.), “la roya amarilla” (*Puccinia striiformis* Westend.), la “mancha amarilla de la hoja” [*Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. (anamorfo: *Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoemaker)], la “septoriosis de la hoja” [*Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schröt. (anamorfo:

Septoria tritici Desm.] y los “carbones volador y hediondo” (*Ustilago tritici* Pers. y *Tilletia triticina* Ranoj.), entre otras.

Los patógenos fúngicos se propagan de muchas formas: pueden ser transmitidos por semillas o el suelo; dispersados por el viento, el agua (lluvia, agua de riego), insectos, animales y/o el hombre.

Las infecciones provocadas por hongos dependen de varios factores, por lo general se requiere la presencia de una película de agua en la superficie de la planta hospedante, sensibilidad del hospedante, densidad de inóculo y temperatura ambiente. Algunos hongos atacan sólo a una o algunas especies hospedantes, y otros atacan a un amplio rango de especies de plantas. Los síntomas y el desarrollo de la enfermedad dependen de la interacción entre el parásito y el hospedante.

1.4. Fusariosis de la Espiga de Trigo

El primer reporte de la Fusariosis de la Espiga de Trigo (FET) fue hecho en Inglaterra a fines del siglo XIX por Smith (1884), quien atribuyó la enfermedad al hongo *Fusisporium culmorum* W.G. Smith.

En EE. UU. en el mismo período, Chester (1890) y Arthur (1891) citaron en forma independiente que la Fusariosis de la espiga comenzaba a ser importante en el cultivo de trigo. En la década de 1920 aparecieron referencias acerca de la ocurrencia de la enfermedad en Alemania, Argentina, Australia, Brasil, Canadá, Francia, Holanda, Inglaterra, Italia, Japón, Noruega, Rusia y Suiza. En la mayoría de los casos, *F. graminearum* era considerada la especie predominante responsable de la enfermedad, aunque en ese tiempo la taxonomía del género *Fusarium* era controversial (Parry *et al.*, 1995).

Desde los primeros registros de la enfermedad, la FET fue reportada en la mayoría de las áreas de cultivo de trigo del mundo, y 17 especies de *Fusarium* se han asociado con la enfermedad (*F. acuminatum*, *F. avenaceum*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. lateritium*, *F. moniliforme*, *F. nivale*, *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. proliferatum*, *F. sambucinum*, *F. semitectum*, *F. sporotrichiodes*, *F. subglutinan* y *F. tricinctum*). Sin embargo, las 3 especies que predominan internacionalmente implicadas en el desarrollo de la FET son *F. graminearum* (*Gibberella zeae*), *F. culmorum* y *F. avenaceum* (*G. avenacea*); su distribución geográfica está relacionada a los requerimientos de temperatura de cada especie (Parry *et al.*, 1995).

En la Argentina, *Fusarium graminearum* Schwabe, cuyo estado perfecto es *Gibberella zeae* (Schwein) Petch es el principal patógeno asociado a la FET (de Galich, 1997), y desde el año 1927 ha sido mencionado en este país (Marchionatto, 1927; Fernández Valiela, 1978). Otras especies del género *Fusarium* menos patogénicas sobre el trigo también han sido aisladas en el país a partir de granos infectados, incluyendo *F. acuminatum*, *F. equiseti*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. semitectum* y *F. solani* (Carrera, 1954; Dalcero *et al.*, 1997; de Galich, 1989; Lori *et al.*, 1992).

1.4.1. Importancia económica

La FET no solo afecta el rendimiento de los granos, causando pérdidas de entre 5 a 15% en años con epidemias moderadas, y mermas superiores al 40% en años con epidemias severas, sino que también provoca la disminución de la calidad del grano debido a pérdidas en el contenido proteico y a la frecuente contaminación de éstos con micotoxinas producidas por el patógeno. Estos metabolitos secundarios, interfieren en la producción de proteínas de las células eucariotas, inhibiendo la incorporación de

aminoácidos. Además, su consumo ha sido asociado con hemorragias, emesis y anemia en animales (Marasas *et al.*, 1984). Long *et al.* (1982) demostraron que cuando cerdas jóvenes son alimentadas con cereales contaminados con la micotoxina zearalenona, producida por *F. graminearum* o *F. culmorum*, estos animales padecen prolapso vaginal y vulvovaginitis.

Durante los últimos 70 años, 17 epidemias de variada severidad ocurrieron en el área centro y norte de la Argentina. Las más graves fueron en 1945/46, 1978, 1985, 1993, y 2001, donde las pérdidas en el rendimiento, si bien difirieron entre zonas, promediaron el 25% (de Galich, 1989; de Galich y Galich, 1994; Kholi *et al.*, 1996; Kikot *et al.*, 2011). La mayor pérdida se registró en 1993 en áreas sembradas bajo siembra directa sobre rastrojos de maíz. Las pérdidas alcanzaron un 50%, debido al bajo peso hectolítrico de los granos y la presencia de granos “fusariosos” contaminados con micotoxinas (de Galich y Galich, 1994).

En el área Sureste, región principal de cultivo de trigo candeal o fideo (*Triticum durum* Desf.), también ocurrieron epidemias severas con pérdidas de aproximadamente el 60% de la producción en 1963, 1976, 1978 y 1985. En 1976, el trigo candeal representó el 20% del área productora de trigo de la zona. La epidemia fue tan grave que en los años subsiguientes la proporción de cultivo de trigo candeal fue reducida al 3,5% y desplazada por el cultivo de trigo pan (de Galich, 1997).

Durante la campaña 2012/13 en la región central del país hubo presencia de enfermedades foliares y fusariosis de la espiga en forma generalizada, inclusive en lotes tratados, dando como consecuencia granos pequeños que no completaron su llenado y la presencia de granos con el hongo *Fusarium* en porcentajes variables. Esta situación se produjo por el marcado efecto del fenómeno climático “El Niño”, que se caracterizó por fuertes tormentas de viento, granizo y lluvias abundantes superiores a los valores

históricos. El año no fue bueno para el cultivo de trigo ni para los cultivos alternativos como cebada, garbanzo y colza. Todo esto afectó el rendimiento y la calidad comercial e industrial del grano, haciendo que los lotes rindieran menos de lo esperado (www.trigoargentino.com.ar).

1.4.2. Sintomatología

Los síntomas iniciales de la FET coinciden con pequeñas marcas marrones y húmedas sobre las glumas que coinciden con el punto de penetración del patógeno, seguida por una decoloración por pérdida de clorofila en la espiguilla. Generalmente la primera manifestación de la enfermedad surge en la zona media de la espiga o el tercio superior.

Bajo condiciones húmedas, la espiguilla infectada se cubre de micelio blanco y/o de una gran cantidad de esporas asexuales en masas viscosas, extensas y de color salmón/naranja intenso, de conidios asexuales denominados pionnotes (Müller y Loeffler, 1976) y esporodoquios (Figura 3). La enfermedad se propaga a las otras espiguillas tanto de forma apical como basípeta. El síntoma más severo es el resultante del crecimiento fúngico dentro del raquis. El hongo bloquea la translocación de agua y nutrientes y como consecuencia, la espiga adquiere la apariencia de madurez prematura (necrosis de los tejidos) (Figura 3). También puede aparecer la forma sexual manifestándose como puntuaciones negras (peritecios) (Figura 4) (Nicholson *et al.*, 2007; Trail, 2009).

Si la infección es temprana, puede producir el aborto de las flores; si el ataque a las espiguillas es más tardío puede provocar granos con escaso desarrollo y con deformaciones; si el ataque es aún más tardío, cuando el grano ya está desarrollado, se

pueden originar granos de tamaño normal pero contaminados con toxinas (Bai y Shaner, 1994).



Figura 3: Espigas con síntomas característicos de la Fusariosis de la espiga de trigo. **a)** Espiga infectada con el tejido apical necrosado; **b)** Espiguillas infectadas con agrupamiento salmón-anaranjado de macroconidios (pionnotes); **c)** Espiguillas infectadas con crecimiento de micelio sobre las glumas.



Figura 4: Porciones de tallos de trigo con peritecios de *Gibberella zeae*.

1.4.3. El Patógeno: *Fusarium graminearum*

Fusarium graminearum es un ascomicete que produce esporas sexuales (ascosporas) en un saco conocido como asca. El estado asexual del patógeno produce esporas llamadas macroconidios.

El teleomorfo del hongo es *Gibberella zeae*. El género *Gibberella* pertenece a la familia Hypocreaceae, que se caracteriza por la producción de cuerpos fructíferos denominados peritecios. Los peritecios de este organismo son de coloración púrpura oscuro a negro (Figura 4). Las ascosporas formadas dentro de las ascas, son descargadas en forma activa desde los peritecios a través de una pequeña abertura conocida como ostiolo (Figura 5). Cada asca puede contener 8 esporas, las cuales son hialinas, ligeramente curvadas con los extremos redondeados, miden $3,5 \times 17-25 \mu\text{m}$ y presentan de 0-4 septos (Marasas *et al.*, 1984; Leslie y Summerell, 2006). El anamorfo, *F. graminearum* (estado asexual), produce macroconidios derivados de las células conidiógenas, llamadas fiálides. Los agrupamientos de fiálides y esporas asexuales (macroconidios) son conocidos como esporodoquios. Los macroconidios son hialinos, relativamente delgados, curvados de $2,5 \times 35-63 \mu\text{m}$, poseen de 5-6 septos y se caracterizan por presentar una célula basal con forma de pie (www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/Fusarium.aspx; Booth, 1971). Sobre la superficie de los tejidos infectados o sobre los residuos de los mismos se producen masas viscosas de macroconidios (pionnotes) (Müller y Loeffler, 1976; Trail, 2009). Las clamidosporas raramente presentes son globosas, de 10-12 μm de diámetro, y pueden formarse simples o en cadena (Leslie y Summerell, 2006).

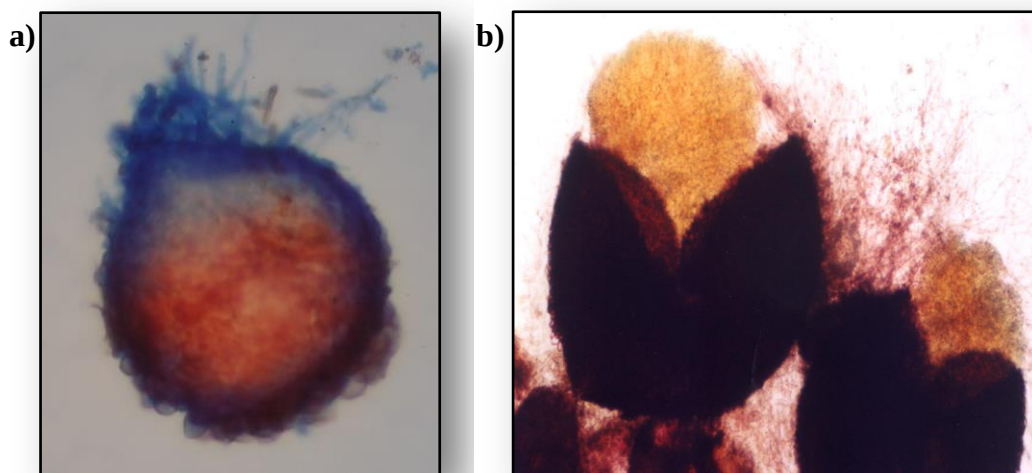


Figura 5: Observación al microscopio de peritecios de *Gibberella zeae*. **a)** Peritecio inmaduro; **b)** Peritecio maduro con masa de ascas y ascosporas.

Fusarium graminearum no se asocia directamente como patógeno humano, pero los aislamientos de esta especie producen 3 importantes micotoxinas, zearalenona (ZEA), nivalenol (NIV) y deoxinivalenol (DON) (Figura 6), así como aurofusarina, fusarina C, fusarocromanona y esteroides (Leslie y Summerell, 2006) cuyo consumo provoca inconvenientes en la salud del hombre (Marasas *et al.*, 1984).

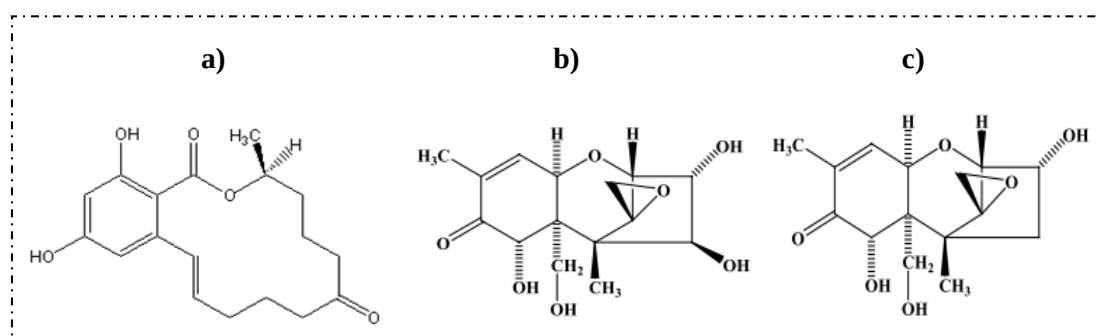


Figura 6: Principales micotoxinas producidas por *Fusarium graminearum*. **a)** Zearalenona; **b)** Nivalenol; **c)** Deoxinivalenol.

1.4.4. Ciclo biológico de la Fusariosis de la espiga

El inóculo primario de la FET es formado principalmente bajo condiciones de alta humedad y temperatura templada sobre los residuos de los cultivos dejados en la superficie del campo, en donde el hongo sobrevive saprofiticamente (Goswami y Kistler, 2004). La FET es iniciada por las ascosporas que son transportadas por el viento, la lluvia o los insectos, y depositadas sobre las anteras de las espigas en floración en donde las esporas geminan e ingresan a la espiga (Figura 7). Una vez que el patógeno se encuentra dentro de la flor, las anteras, estigmas y lodículas son los órganos que primero son colonizados. En el inicio de la infección, el hongo crece intercelularmente y asintomáticamente (Bushnell *et al.*, 2003; Guenther y Trial, 2005).

El principal modo de expansión del hongo en el trigo es de flor a flor dentro de una espiguilla y desde espiguilla a espiguilla a través del tejido vascular en el raquis (Ribichich *et al.*, 2000). El hongo se propaga radialmente y crece intracelularmente generando la necrosis de los tejidos vegetales, debido a la rápida colonización de los mismos. Los síntomas en esta etapa incluyen tejidos de aspecto acuoso, especialmente del clorénquima, seguido por el blanqueamiento prematuro de las espigas (de Galich, 1997). Posterior a la infección de las flores del trigo, el patógeno expresa genes para la biosíntesis de DON. El DON según Proctor *et al.* (1995) es un factor de agresividad que causa la necrosis del tejido y de acuerdo a Jansen *et al.* (2005) permite la expansión del hongo dentro del raquis. La colonización de los granos en desarrollo es acompañada por la acumulación de DON, generando granos arrugados, de menor tamaño, denominados como “granos chuzos” (Figura 8).

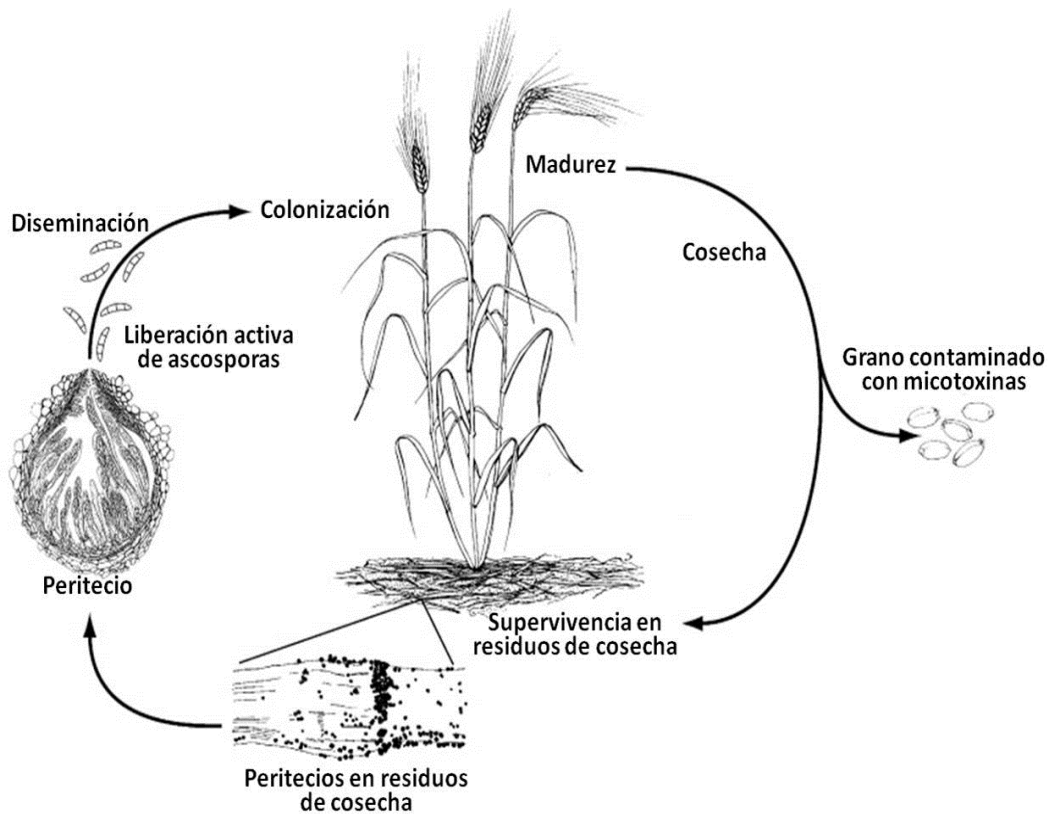


Figura 7: Ciclo de vida de la Fusariosis de la espiga de trigo ocasionada por *Fusarium graminearum* Schwabe (Trail, 2009).

Fusarium graminearum puede fácilmente completar su ciclo de vida en el cultivo o en asociación con un hospedante. Como la mayoría de los hongos, *F. graminearum* es haploide la mayor parte de su ciclo biológico. El desarrollo sexual comienza con la formación de hifas con células binucleadas, este patógeno es homotálico y como resultado, los dos núcleos de las células binucleadas son genéticamente idénticos. Estas desarrollan pequeñas células enrolladas, que son las que inician la formación de los cuerpos fructíferos (Trail y Common, 2000). Las ascas son sacos tubulares que contienen a las ascosporas (producto de meiosis).



Figura 8: Comparación entre granos de trigo afectados por la Fusariosis de la espiga (“chuzos”) (Izquierda) y sanos (Derecha).

1.4.5. Hospedantes / Fuentes de inóculo

Todas las especies del género *Fusarium* que infectan cereales son capaces de sobrevivir saprofiticamente sobre rastrojos de cultivos de cereales (Parry *et al.*, 1994). Estos residuos de cultivos son considerados el principal reservorio de inóculo de la FET (Sutton, 1982). Varios autores demostraron que la rotación de maíz-trigo provee abundante cantidad de rastrojos sobre los cuales el inóculo primario podría producirse (Seaman, 1982; Tusa *et al.*, 1981; Clear y Abramson, 1986). Adicionalmente, Pioli *et al.* (2000; 2004) en la Argentina demostraron que la soja era hospedante de *F. graminearum* y como resultado, la sucesión de cultivos Maíz-Soja-Trigo/Soja no inhibía el ciclo del hongo. Gilbert y Fernando (2004) analizando cultivos pertenecientes a distintas familias botánicas (Crucíferas y Leguminosas) encontraron altos niveles de esporulación de *F. graminearum* sobre residuos de cultivos de canola y guisante forrajero.

La tasa de descomposición de los residuos de cultivos es más rápida en el suelo que sobre la superficie del mismo (Khonga y Sutton, 1988) y sumado a la inexistente

producción de esporas bajo esta situación, esto significaría que los rastros enterrados no contribuirían a la carga inicial de inóculo.

Los hospedantes alternativos sin importancia económica, podrían ser una fuente de inóculo a tener en cuenta. Durante un estudio efectuado con 1346 plantas de 15 especies de malezas, Jenkinson y Parry (1994) obtuvieron 226 aislamientos de *Fusarium* spp. Fueron aisladas las especies *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* y *F. poae*. De 77 aislamientos testeados, 75 fueron patogénicos en trigo. En la Argentina, Carmona *et al.* (1999) aislaron *F. graminearum* de tallos, semillas y/o raíces de 5 especies de malezas gramíneas. Si las especies de malezas comunes proveen un hospedante alternativo en el cual *F. graminearum* puede sobrevivir, o si ellas proveen una fuente de inóculo significativa para el desarrollo de la FET, aún se mantiene poco claro (Parry *et al.*, 1995).

1.4.6. Manejo de la Fusariosis de la espiga

La dependencia de esta enfermedad de los factores climáticos, su naturaleza y epidemiología y su esporádica manifestación, han determinado que las medidas de control existentes no sean satisfactorias. Sin embargo, la FET no solo depende de las condiciones climáticas, sino también de factores agronómicos, como las prácticas culturales, el uso de genotipos resistentes al patógeno, la aplicación de fungicidas y la utilización de agentes de biocontrol (Parry *et al.*, 1995). Estudios previos demostraron que si bien emplear métodos individuales de control puede reducir el impacto de la enfermedad, la combinación de estrategias permitiría lograr un resultado más eficiente en el manejo de la FET (Edwards, 2004).

Las alternativas de supervivencia y dispersión del inóculo inicial, la naturaleza ubicua y el amplio rango de hospedantes de *F. graminearum* y de las otras especies de

Fusarium capaces de causar la enfermedad, debilitan el efecto de las prácticas de control por rotación de cultivos (Reis, 1990). Métodos apropiados de preparación del suelo, rotación con cultivos no cereales, buenas técnicas de laboreo, y diferentes tiempos de siembra, ayudarían a reducir la cantidad de inóculo primario y la probabilidad de infección.

El desarrollo de cultivares resistentes es la medida más efectiva para el control de la FET (Miedaner *et al.*, 2003). La primera observación de diferencias en susceptibilidad a esta enfermedad entre cultivares fue realizada por Arthur (1891), quien evidenció que cultivares de trigo de madurez temprana tendían a ser más resistentes que los cultivares de madurez tardía. En el trigo existe variabilidad genética para la resistencia a la fusariosis aunque no se conoce ningún genotipo inmune (de Galich, 2004). La mayoría de los cultivares comerciales se expresan como susceptibles, moderadamente susceptibles, o moderadamente resistentes de acuerdo a las condiciones ambientales e incluso mostrando variaciones entre localidades dentro de un mismo año o ciclo de cultivo.

Se han descrito 5 tipos de resistencia: resistencia a la penetración; resistencia al avance de la enfermedad dentro de la espiga; resistencia a la infección del grano; tolerancia a la FET y resistencia a la acumulación de DON (Miller y Arnison, 1986; Wang y Miller, 1988; Mesterházy, 1995; Miedaner *et al.*, 2003). La resistencia a la infección inicial o penetración (Tipo I) y la resistencia al avance del patógeno dentro de los tejidos de la espiga (Tipo II) fueron descritos por Schroeder y Christensen (1963), quienes encontraron que ambos tipos de resistencia son independientes y varían entre cultivares (Parry *et al.*, 1995; Miedaner, 1997). La fuente de resistencia genética más usada contra la FET es el cultivar de trigo de origen chino, Sumai 3, con resistencia tipo II (Bai y Shaner, 1994).

El uso de fungicidas es otra herramienta apropiada para el control de la FET, principalmente en regiones propensas a la enfermedad y en mercados en donde las clases de trigo poseen distintos comportamientos. Sin embargo, el uso de fungicidas no es universal debido al alto costo de las aplicaciones de los fungicidas y al hecho de que los químicos disponibles en el mercado no son consistentemente efectivos en el control de la fusariosis y en la reducción de la síntesis de DON. El control químico se utiliza como herramienta complementaria del manejo de la FET. El tratamiento debe realizarse de manera preventiva para evitar la germinación de las ascosporas y penetración del hongo en la espiga, antes de la ocurrencia de los primeros síntomas, ya que una vez que el patógeno ha penetrado los tejidos de esta inflorescencia, la cantidad de fungicida dentro de la misma es incapaz de detener el crecimiento del hongo (Díaz de Ackermann y Kholi, 2013). Los fungicidas conteniendo triazol, imidazol o triazolintiona como ingrediente activo, que inhiben la biosíntesis de ergosterol, fueron los más activos contra la FET y contaminación con DON (Haidukowski *et al.*, 2005).

Experimentos usando fungicidas para controlar la FET y prevenir la contaminación de los granos con DON, demuestran un amplio rango de eficiencia de acuerdo a múltiples factores tales como la elección del fungicida, el momento y método de aplicación, considerando los tipos de picos pulverizadores y las condiciones climáticas presentes durante el momento de aplicación (Díaz de Ackermann y Kholi, 2013). Si las condiciones ambientales predisponentes próximas a la anthesis son favorables a la infección es recomendable la aplicación de fungicidas. La primera aplicación debería ser realizada previamente a la ocurrencia de precipitaciones. Reis y Zoldan (2014) mencionan que en el caso de que luego de 15-20 días a la primera aplicación hubiera una previsión de lluvias, se puede proceder con una segunda

aplicación y que las mismas, deberían realizarse con picos que dirijan la pulverización hacia los laterales de las espigas.

En la Argentina y Brasil, se desarrollaron varios modelos y sistemas de monitoreo para analizar y aportar estrategias de control químico basados en datos meteorológicos (Moschini y Fortugno 1996; Del Ponte *et al.*, 2004). El uso de estos modelos permite predecir la intensidad de la enfermedad y generar alertas y recomendaciones de control (Reis y Carmona, 2013).

Por otra parte, varios estudios se orientan en el uso de agentes de control biológico para el manejo integrado de la FET. El biocontrol podría jugar un rol importante en la producción del trigo. Las cepas que están siendo estudiadas y muestran resultados promisorios con relación al control de la enfermedad y la reducción de contaminación con micotoxinas son fundamentalmente bacterias tales como, *Bacillus* spp, *Pseudomonas* spp y *Lysobacter* spp y levaduras tales como, *Cryptococcus* spp y *Sporobolomyces* spp (Jochum *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2012). Si bien esta alternativa podría ser competente, actualmente los experimentos realizados bajo condiciones de campo dieron como resultado una baja efectividad. Aunque es importante remarcar que en la Argentina, Palazzini *et al.* (2007) demostraron que bajo condiciones de invernáculo, 9 agentes biocontroladores aislados de anteras de trigo, fueron capaces de reducir la severidad de la FET y el contenido de DON en las espigas entre un 37-100% en comparación con los tratamientos control.

Otra de las aplicaciones con microorganismos biocontroladores se focaliza en el control de propágulos sobre residuos de cultivos, basándose en los mecanismos de micoparasitismo, antibiosis o en la producción de componentes volátiles que inhiben al patógeno. Ensayos realizados *in vitro*, demostraron que *Trichoderma harzianum* fue identificado como un efectivo agente biocontrolador contra *F. graminearum* sobre

rastreros de trigo. No obstante, pese a las diferentes variables que se presentan en la naturaleza, a los efectos de optimizar la eficacia del biocontrol, son necesarios más estudios bajo condiciones de campo que incluyan dosis, formulación y momento de aplicación de los posibles agentes biocontroladores (Gilbert y Fernando, 2004).

1.4.7. Herramientas moleculares para el estudio de la FET

Un gran número de técnicas moleculares rápidas, precisas, sensibles y cuantitativas están siendo aplicadas para entender la naturaleza y diversidad de los patógenos responsables de la FET. Las técnicas moleculares también se utilizan para detectar e identificar patógenos, estudiar las interacciones entre los patógenos y sus hospedantes y entre los patógenos mismos y/o con la influencia de factores ambientales, cuantificar la biomasa de patógenos en tejidos de hospedantes, determinar el origen geográfico o las relaciones genéticas de una cepa y documentar la existencia de infecciones latentes (Vincelli y Tisserat, 2008). La mayoría de las técnicas se basan en análisis de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), aunque la medición de niveles de ergosterol usando cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) es también utilizada como un estimador de la biomasa fúngica en estudios que involucran la inoculación de plantas con aislamientos característicos de especies conocidas.

Actualmente, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una metodología sensible, rápida y potencialmente específica para detectar e identificar especies correctamente. Esta técnica se basa en la amplificación exponencial de una secuencia blanco de ADN catalizada por una ADN-polimerasa termoestable. Numerosos ensayos fueron desarrollados para permitir la detección de patógenos asociados con la FET y también para detectar especies individuales en experimentos a campo y para determinar

su localización en el tejido (Doohan *et al.*, 1998). Existen ensayos de PCR disponibles para detectar a *F. graminearum* (Nicholson *et al.*, 1998), *F. culmorum* (Schilling *et al.*, 1996), *F. poae* (Parry y Nicholson, 1996), *F. cerealis* (Sin. *F. crookwellense*) (Yoder y Christianson, 1998), *F. avenaceum* (Schilling *et al.*, 1996; Turner *et al.*, 1998) y *F. verticillioides* (Möller *et al.*, 1999).

Otras técnicas de PCR que se implementaron, consisten en estudiar patógenos por su potencial toxicogénico. El gen *Tri5* es común en todas las especies productoras de tricotecenos conocidas del género *Fusarium*. Ensayos de PCR basados en la secuencia de este gen conservado han sido desarrollados para detectar la presencia de hongos capaces de producir toxinas. Además, se realizaron ensayos basados en los genes *Tri7* y *Tri13* para permitir la detección y diferenciación de los quimiotipos DON y NIV, debido a que estos genes son no funcionales en aislamientos con quimiotipo DON, lo cual los hace incapaces de producir nivalenol (Lee *et al.*, 2001).

Entre las distintas metodologías disponibles para analizar la diversidad genotípica dentro de una población, la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) y repeticiones de secuencia intergénica simple (ISSR), son las más utilizadas. Aislamientos de *F. graminearum* recolectados de maíz, trigo, y arroz en Nepal se dividieron en 2 grupos (denominados A y B) sobre las bases de un análisis RAPD (Carter *et al.*, 2000). La diferencia en el agrupamiento podría estar relacionada con la preferencia con el hospedante, siendo los aislamientos del grupo B menos frecuentemente aislados de trigo o arroz que de maíz. Similarmente, mediante análisis de RFLP con una población de aislamientos de *F. graminearum* recolectados en el Este de China se encontraron 65 haplotipos distintos entre 225 aislamientos (Gale *et al.*, 2002).

Sumíková *et al.* (2013) emplearon la técnica AFLP para estudiar la variabilidad genética de un set de 103 aislamientos de *F. graminearum* recuperados de espigas de trigo naturalmente infectadas correspondientes a 20 localidades distintas de República Checa. El resultado del análisis filogenético mostró que los aislamientos fueron altamente heterogéneos dentro y entre las localidades, y no encontraron asociación evidente entre el perfil de AFLP obtenido y el origen geográfico de cada aislamiento. En Canadá, Mishra *et al.* (2004) estudiaron la estructura genética de poblaciones de *F. graminearum* utilizando marcadores ISSR. El análisis sugirió una elevada diversidad genética.

Los estudios que se fundamentan en la comparación de secuencias nucleotídicas de genes conservados, posibilitan la confirmación de la identidad específica como el estudio de la diversidad genética existente en las poblaciones de aislamientos de una especie. Para ello, los productos (amplicones) de PCR se secuencian a través de secuenciadores automáticos. Con la secuencia obtenida y a través de las bases de datos genéticas disponibles en internet se puede comparar la secuencia de una muestra con las secuencias existentes en la base de datos. O'Donnell *et al.* (2000; 2004; 2008), Starkey *et al.* (2007) y Sarver *et al.* (2011) utilizaron estos análisis para diferenciar aislamientos de *F. graminearum* en al menos 15 especies estructuradas biogeográficamente.

Otras técnicas moleculares que se aplican en fitopatología, son las técnicas cuantitativas. Convencionalmente, para cuantificar el grado de colonización fúngica en el grano, se realizan mediciones de niveles de ergosterol (Miedaner y Perkowski, 1996; Gang *et al.*, 1998). Estos estudios son posibles cuando aislamientos conocidos son usados para inocular plantas y donde la influencia de infección secundaria es mínima. Sin embargo, el uso del ergosterol para estimar la colonización fúngica es limitada ya que el método mide la cantidad total de hongos presentes y no la cantidad de alguna

especie específica. La PCR convencional es una técnica sensible y específica, pero debido a la naturaleza del ensayo es generalmente inadecuada para la cuantificación, ya que mínimas diferencias en la eficiencia de la amplificación, tales como muestras con diferentes niveles de impurezas inhibitorias, podrían resultar en distintos rendimientos de amplicon. Actualmente se han desarrollado 2 metodologías (PCR competitiva y PCR en tiempo real) derivadas de la PCR que pueden ser usadas para detectar y cuantificar especies fúngicas individuales en muestras de tejidos vegetales, aún cuando estén presentes en una muestra compleja. Estas herramientas, permiten además, estudiar como la interacción entre patógenos y hospedantes está influenciada por factores ambientales, incluyendo las aplicaciones de fungicidas (Nicholson *et al.*, 2003).

Otra de las metodologías para obtener datos cuantitativos de la enfermedad, son los ensayos por inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA). Esta metodología utiliza anticuerpos específicos contra una especie o grupo de especies, o contra determinados antígenos fúngicos. Hill *et al.* (2006; 2008) utilizaron el anticuerpo monoclonal género específico contra *Fusarium* spp. para cuantificar la severidad de la FET en un ensayo sobre trigo realizado a campo. Por otra parte, existen kits de ELISA comerciales para determinar el contenido de micotoxinas en cereales y alimentos.

HIPÓTESIS

- “Las fuentes o reservorios de inóculo de la FET son numerosas y diversas.”
- “Los distintos rastrojos de cultivos antecesores alteran la supervivencia y aumentan el potencial infectivo de *Fusarium graminearum*.”
- “Las poblaciones del patógeno tienen una amplia variabilidad genética.”
- “De acuerdo a la fuente de inóculo las poblaciones de *Fusarium graminearum* no poseen una capacidad diferencial para provocar la enfermedad.”

OBJETIVOS

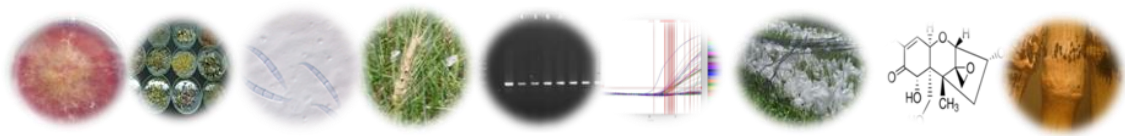
General:

- Aportar conocimientos para contribuir al desarrollo de nuevas estrategias ecológicamente aceptables para el manejo de la Fusariosis de la espiga y realizar investigaciones epidemiológicas utilizando no sólo las metodologías convencionales sino además metodologías modernas, rápidas y precisas aportadas por el campo de la biología molecular.

Específicos:

- Dimensionar el rol que cumplen las malezas como hospedantes alternativos y con ello como fuente de inóculo.
- Investigar *in vivo* la dinámica de poblaciones de *Fusarium graminearum* (capacidad de colonización y supervivencia) en residuos de diferentes cultivos.
- Caracterizar molecularmente las poblaciones de *Fusarium graminearum* según su fuente de inóculo.
- Determinar la potencialidad para inducir la FET a partir de aislamientos provenientes de distintas fuentes.
- Cuantificar la capacidad de producción de tricotecenos de los aislamientos *in vivo*.
- Correlacionar la acumulación de tricotecenos con la agresividad y la reducción del rendimiento.





CAPÍTULO II

IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE
AISLAMIENTOS DE *Fusarium graminearum*
PROCEDENTES DE DISTINTAS FUENTES DE
INÓCULO. CARACTERIZACION GENOTÍPICA
DE LOS QUIMIOTIPOS PRESENTES.

2.1. INTRODUCCIÓN

2.1.1. Taxonomía de *Fusarium graminearum*

El concepto genérico de *Fusarium* fue descrito por primera vez en 1809 por Link, quien lo definió como una especie hialina con esporas en forma de canoa (característica primaria) basándose en observaciones de *F. roseum*. No obstante, debido a modificaciones en el concepto de especie dentro del género, la taxonomía de *Fusarium* ha experimentado un gran número de cambios durante los últimos cien años.

Numerosos sistemas taxonómicos fueron propuestos para el género *Fusarium* basados en los trabajos realizados por Wollenweber y Reinking (1935). Entre ellos se destacan los estudios de Gordon entre 1930 y 1960, Raillo y Bilai durante 1935 y 1955-1970, respectivamente, Joffe a finales de 1940, Messiaen y Cassini en 1968, Booth durante 1960-1970, Matuo en 1972, Gerlach y Nirenberg en 1982, y Nelson, Tousson y Marasas en 1983 (Leslie y Summerell, 2006).

A mediados de 1930, Wollenweber y Reinking, en la publicación *Die Fusarien* reformularon el concepto de especie y desarrollaron guías basadas en características micológicas para la identificación de cepas. Estos investigadores reordenaron el amplio número de especies descritas de *Fusarium* (> 1000) en 16 secciones, 65 especies y 77 formas y variedades subespecíficas. Sin embargo, en la décadas de 1940 y 1950, Snyder y Hansen redujeron la cantidad de especies dentro del género a nueve. Dentro de los cambios más importantes implementados, 4 de las 16 secciones definidas por Wollenweber y Reinking fueron reducidas a una única especie, *F. roseum*, dentro de la cual se ubicó a *F. graminearum*. El uso y los estudios posteriores de esta clasificación permitieron concluir que esta reducción no podía ser justificada y debía abandonarse (Nelson, 1991). Sin embargo, las bases establecidas en los trabajos de Snyder y Hansen

persistieron alrededor de 50 años, derivaron en grandes pérdidas de información y ocasionaron que los resultados obtenidos durante esos años resultasen difíciles de evaluar e interpretar posteriormente. A pesar de ello, algunos de los aportes realizados por los autores, como la importancia de los aislamientos monospóricos en la correcta identificación de las especies o la amplia variabilidad intraespecífica presente en el género se mantienen vigentes.

Booth (1971) desarrolló claves de identificación que incluían en el estudio de la morfología a las células conidiógenas y demostró la importancia de la presencia de monofiálides y polifiálides en la diferenciación de secciones y especies (Leslie y Summerell, 2006).

En 1983, Nelson *et al.* publican el manual de identificación para *Fusarium*, uno de los sistemas taxonómicos más relevantes a nivel mundial que en la actualidad permanece en uso. Esta guía incluyó información sobre aislamientos y cultivos de *Fusarium*, como así también, fotografías a color y microfotografías de algunas especies.

Actualmente, el género *Fusarium* comprende 70 especies descriptas agrupadas en 12 secciones (Leslie y Summerell, 2006).

Con respecto a *F. graminearum*, en Australia, donde este hongo es predominante, Francis y Burguess (1977) caracterizaron 2 poblaciones de esta especie. Durante varios años, *F. graminearum* estuvo dividido en 2 taxones, *F. graminearum* Grupo 1 y Grupo 2. Morfológicamente era muy difícil diferenciar estos 2 grupos, sin embargo, análisis de RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar) junto con estudios morfológicos y análisis de secuencias de ADN permitieron la división de estos grupos y la redesignación de los mismos en Grupo 1 como *F. pseudograminearum* (teleomorfo *Gibberella coronicola*) y Grupo 2 reteniendo el nombre original *F. graminearum* y a *Gibberella zeae* como su teleomorfo (Aoki y O'Donnell, 1999). *Fusarium graminearum*

es homotático y la mayoría de las cepas producen peritecios, a diferencia de *F. pseudograminearum* que es heterotático y los cultivos monospóricos purificados no pueden formar dicha estructura en la naturaleza.

Posteriormente, mediante el uso de análisis filogenéticos de secuencias de ADN genómico de aislamientos recolectados alrededor del mundo, O'Donnell *et al.* (2000) detectaron 7 linajes filogenéticamente distintos y geográficamente estructurados. La especie *F. graminearum* fue caracterizada como “Complejo *F. graminearum*” y cada uno de los linajes como especies. Los linajes 1 a 5 proceden del Hemisferio sur (dos en América el Sur y Central, y tres en África) y el linaje 6 y 7 del Hemisferio norte, mientras que el linaje 6 se limita a países de Asia. A partir del uso de más aislamientos de *F. graminearum*, se descubrieron 8 linajes adicionales. Por lo tanto, la especie *F. graminearum* es actualmente considerada un complejo formado por al menos 15 especies monofiléticas (O'Donnell *et al.*, 2004; 2008; Starkey *et al.*, 2007; Yli-Mattila *et al.*, 2009; Sarver *et al.*, 2011). Estas especies son *F. austroamericanum* (linaje 1), *F. meridionale* (linaje 2), *F. boothii* (linaje 3), *F. mesoamericanum* (linaje 4), *F. acaciae-meansii* (linaje 5), *F. asiaticum* (linaje 6), *F. graminearum* (linaje 7), *F. cortaderiae* (linaje 8), *F. brasiliicum* (linaje 9), *F. aethiopicum*, *F. gerlachii*, *F. vorosii*, *F. louisianense*, *F. nepalense* y *F. ussurianum*. Estas especies tienen distinta distribución geográfica, difieren en la producción de tricotecenos y podrían tener diferente capacidad para causar enfermedad sobre algunos cultivos (O'Donnell *et al.*, 2000; 2004; Cumagun *et al.*, 2004).

Hasta el presente se han utilizado varias técnicas moleculares para proporcionar información sobre su estructura poblacional, tales como PCR, RFLP, RAPD, ISSR y AFLP (Leslie *et al.*, 2007).

2.1.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica que relaciona el proceso de amplificación de una secuencia específica de ácido nucleico en una muestra y la detección, presencia o ausencia, de la misma por uso de una sonda. La técnica se basa en una reacción repetitiva para lograr la amplificación de la secuencia deseada del ácido nucleico (Mullis *et al.*, 1987). El proceso de PCR por lo general consiste en una serie de 20 a 35 cambios repetidos de temperatura llamados ciclos; cada ciclo suele consistir en 2-3 pasos a diferentes temperaturas. La PCR común se realiza con ciclos que tienen tres pasos de temperatura (desnaturalización; temperatura de unión de los *primers* a la secuencia del ácido nucleico a amplificar y extensión). Los ciclos a menudo están precedidos por una incubación a alta temperatura (mayor a 90 °C, desnaturalización inicial), y seguidos por otra incubación al final para completar el proceso de extensión del producto final. Las temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo dependen de gran variedad de parámetros. Éstos incluyen la enzima usada para la síntesis de ADN, la concentración de iones divalentes y de los desoxiribonucleótidos (dNTP's) en la reacción, y la temperatura de unión de los cebadores (*primers*), así como la longitud del ADN que se desea amplificar (Sambrook y Russel, 2001).

Nicholson *et al.* (1998), demostraron como los análisis de PCR pueden ser usados para comprender mejor algunos problemas asociados con el diagnóstico de la fusariosis en trigo y diseñaron *primers* especie-específicos para diferenciar aislamientos de *F. graminearum* de las especies del género *Fusarium* relacionadas.

2.1.3. Estructuras para la identificación de *Fusarium graminearum*

Las características principales que presenta la especie son:

- Los esporodoquios y pionnotes, que contienen a los macroconidios, son de coloración naranja intenso. Los macroconidios, son las esporas asexuales (principales en la caracterización), su forma y tamaño varía según la especie, son relativamente delgados, con forma de hoz, de pared gruesa, con generalmente 5 septos, con una célula apical cónica y una célula basal en forma de pie. Esta especie no presenta microconidios. Las clamidosporas, raramente presentes pueden ser globosas, simples o en cadena, habitualmente se constituyen a partir de macroconidios pero se pueden observar en forma intercalar o terminal en el micelio. Es un hongo homotálico y sus peritecios de coloración púrpura-negro (fase sexual) se forman a partir de un estroma ovoide. Cada peritecio posee ascas distribuidas en su interior y cada asca posee ocho ascosporas que presentan de 0-4 septos. Las ascosporas poseen sus extremos redondeados. (Booth, 1971; Leslie y Summerell, 2006)

En el laboratorio, para su cultivo y para la observación de estas características se utiliza generalmente el medio de cultivo agar papa glucosado (APG). Sobre este sustrato, las colonias crecen rápidamente y producen micelio aéreo denso que varía de color rosado a rojo carmesí, a menudo convirtiéndose a vinaceo con un tinte amarronado, y pueden tener un sector de color amarillo grisáceo o blanco en el centro. Los esporodoquios y pionnotes se producen lentamente y son de coloración naranja (Booth, 1971). Generalmente los cultivos forman pigmentos rojo carmín en el agar. (Todos los términos referidos a colores, están definidos en relación a los descriptos por Rayner, 1970).

2.1.4. Micotoxinas y quimiotipos

Las toxinas más comúnmente sintetizadas por *Fusarium* spp. son los tricotecenos (metabolitos secundarios), una familia de sesquiterpenoides que al ingerirlas inhiben la síntesis de proteínas en eucariotas y provocan toxicosis en humanos y otros animales afectando el funcionamiento normal del intestino, el sistema endocrino y neurológico (Marasas *et al.*, 1984; Kendrick, 1992; Maresca, 2013). Los tricotecenos también producen marchitamiento, clorosis, necrosis y otros síntomas no específicos de fitotoxicidad en una amplia variedad de plantas y tejidos vegetales (Desjardins, 2006). Estas moléculas poseen en su mayoría un núcleo tetraciclo con un doble enlace entre los carbonos 9 y 10, y un anillo epoxi en los carbonos 12 y 13. Las propiedades tóxicas de los tricotecenos están relacionadas a la presencia del grupo 12,13-epóxido que se une de forma irreversible a la subunidad 60 S en mamíferos, inhibiendo la síntesis de proteínas. En cuanto a sus propiedades físicoquímicas, son cristalinos, incoloros, químicamente estables, solubles en agua y poseen actividad óptica. La primera molécula conocida de este grupo fue la tricotecina, aislada de *Trichothecium roseum* como un metabolito antifúngico en 1949 y en 1961 se aisló el primer tricoteceno producido por especies del género *Fusarium* como un metabolito fitotóxico (Brian *et al.*, 1961; Desjardins, 2006).

La mitad de los genes requeridos para la biosíntesis de los tricotecenos están localizados en un *cluster* génico de 25 kb, denominado *cluster Tri* que incluye 2 genes regulatorios (*Tri6* y *Tri10*), los genes encargados de la estructura básica de los tricotecenos (ej. *Tri4* y *Tri5*), los genes involucrados en las diferencias estructurales que dan origen a los distintos quimiotipos (ej. *Tri3* y *Tri13*) y el gen *Tri8*, que sería requerido para la conversión de 3,15-diAcetildeoxinivalenol a 3-Acetildeoxinivalenol o 15-Acetildeoxinivalenol (Goswami y Kistler, 2004; Alexander *et al.*, 2011; Pasquali y Migheli, 2014). La biosíntesis de los tricotecenos del género *Fusarium* inicia con la

ciclación del farnesil pirofosfato para formar el tricodieno, reacción que es catalizada por la enzima tricodieno sintasa (*Tri5*). Luego una secuencia de oxigenaciones, isomerizaciones, ciclaciones y esterificaciones conducen del tricodieno a la toxina tricoteceno (Desjardins *et al.*, 1993).

Estos metabolitos se dividen en 4 grupos (tipos A-D) de acuerdo a sus grupos funcionales. Solo los tricotecenos del grupo A y del grupo B son importantes desde el punto de vista agronómico. El género *Fusarium* produce tricotecenos de los grupos A y B, estos se diferencian por la presencia de un oxígeno o un grupo funcional carbonilo en la posición C-8, respectivamente (Ueno *et al.*, 1973) (Figura 9; Tabla 1). Los productos principales de la ruta de biosíntesis de tricotecenos son la toxina T-2, la toxina HT-2 y el diacetoxiscirpenol (DAS) correspondientes al tipo A, principalmente producidos por *F. poae* y *F. sporotrichioides*, y deoxinivalenol (DON) y nivalenol (NIV) pertenecientes al tipo B, producidos por *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. graminearum* y *F. sambucinum* (Desjardins *et al.*, 1993; Rocha *et al.*, 2005).

La producción de DON o NIV usualmente está determinada por la funcionalidad del gen *Tri13* (Lee *et al.*, 2001; 2002). Existen técnicas basadas en PCR con *primers* específicos para identificar alelos funcionales o no funcionales de este gen (Chandler *et al.*, 2003), como también con *primers* dirigidos a la región intergénica *Tri5-Tri6* que diferencian cepas productoras de DON y NIV (Li *et al.*, 2005).

En base al tipo de tricoteceno producido por *F. graminearum* se han descripto diferentes quimiotipos: i) quimiotipo NIV, produciendo nivalenol y su derivado acetilado fusarenona-X (FUS-X), ii) quimiotipo DON, produciendo deoxinivalenol y sus derivados acetilados. Adicionalmente, este último quimiotipo mencionado, puede ser dividido en iii) quimiotipo 3-ADON (productores de DON y 3-acetilDON) y iv) quimiotipo 15-ADON (productores de DON y 15-acetilDON (Ward *et al.*, 2002). Las

diferencias estructurales entre los quimiotipos podrían tener consecuencias sobre el comportamiento de las cepas, ya que los patrones específicos de oxigenación y acetilación podrían modificar la bioactividad y a menudo la fitotoxicidad de estos compuestos (Ward *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002). Con respecto a ésto, Yoshizawa y Mooroka (1974) mencionan que la toxicidad del nivalenol es 20 veces superior a la del deoxinivalenol en la mayoría de los sistemas biológicos, a pesar de la cercanía entre ambas estructuras químicas.

Distintos autores reportaron la prevalencia de los quimiotipos DON o NIV de acuerdo a la distribución geográfica de *F. graminearum* (Wang *et al.*, 2011). En China y Australia, las poblaciones del patógeno mostraron prevalencia del quimiotipo DON, con frecuencias similares de cepas 15-ADON y 3-ADON; mientras que en Japón, el quimiotipo predominante es NIV. En Europa, Sudáfrica, Brasil y México, 15-ADON es el quimiotipo más frecuente. Por otro lado, en EE. UU. y Canadá, se ha reportado un incremento del quimiotipo 3-ADON durante los últimos años (Malhipour y Gilbert, 2012; Pasquali y Migheli, 2014). Sepúlveda Díaz (2014) menciona que los perfiles de producción de un quimiotipo dado varían con el año de la cosecha, notándose un aumento relativo del perfil DON y 3-ADON.

En la Argentina, aunque 15-ADON es el quimiotipo más común (Álvarez *et al.*, 2009; Malbrán *et al.*, 2014), la presencia del quimiotipo NIV también ha sido reportada (Lori *et al.*, 1992; Fernández Pinto *et al.*, 2008; Sampietro *et al.*, 2011; Reynoso *et al.*, 2011). En efecto, las diferencias en la distribución y abundancia de un quimiotipo frente a otro podría estar relacionada con ciertos factores ambientales, particularmente con la temperatura y con las prácticas culturales (Greenhalgh, *et al.*, 1983; Gale *et al.*, 2007). También existen teorías que sugieren que la especialización de un quimiotipo

determinado se correspondería con el hospedante del cual procede un aislamiento (Pasquali y Migheli, 2014).

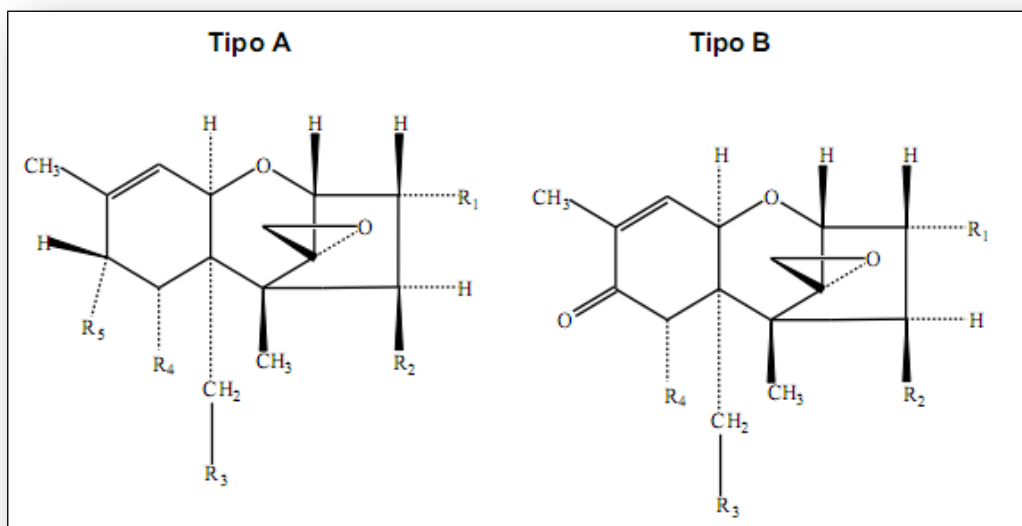


Figura 9: Estructura química de los tricotecenos de los grupos de tipo A y tipo B.

Tabla 1: Grupos funcionales R1, R2, R3, R4 y R5 de los tricotecenos de tipo A y tipo B.

Tricoteceno	R1	R2	R3	R4	R5
<i>Tipo A</i>					
Toxina HT-2	OH	OH	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Toxina T-2	OH	OAc	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Diacetoxiscirpenol	OH	OAC	OAc	H	H
<i>Tipo B</i>					
Deoxinivalenol	OH	H	OH	OH	O
3-Acetildeoxinivalenol	OAc	H	OH	OH	O
15-Acetildeoxinivalenol	OH	H	OAc	OH	O
Nivalenol	OH	OH	OH	OH	O
Fusarenona X	OH	OAc	OH	OH	O

Con respecto a la FET, la presencia de micotoxinas producidas por *F. graminearum* en los granos, limita la utilización comercial de los mismos. Varias enfermedades están asociadas con el consumo de granos contaminados con tricotecenos, incluyendo emesis, diarreas, hemorragias pérdida de peso y anemia (Marasas *et al.*, 1984).

Estudios bajo condiciones de campo sugieren que la producción de tricotecenos no es necesaria para el inicio de la infección sino que actuaría como un factor importante de agresividad y de dispersión del hongo dentro de la espiga infectada (Bai *et al.*, 2002; Proctor, *et al.*, 1995). Proctor *et al.* (1995) y Bai *et al.* (2002) demostraron mediante una evaluación sobre cultivos de trigo, maíz, centeno y avena con aislamientos mutantes incapaces de producir tricotecenos (Tri5⁻), que la agresividad producida por estas cepas sobre los cultivos fue menor que la de las cepas *wild type* (cepas sin transformar, Tri5⁺). Este resultado podría deberse a que las toxinas contribuyen con la patogenicidad de *F. graminearum*. Sin embargo, su rol en el mecanismo de patogénesis se mantiene poco claro.

2.1.5. Las malezas como fuente de inóculo

Las malezas constituyen uno de los medios más importantes de difusión y supervivencia de numerosos patógenos (Dinoor, 1974). Hay una gran cantidad de trabajos publicados sobre las malezas como hospedantes alternativos de virus de plantas (Dufus, 1971) en comparación a los estudios que tratan a las malezas como hospedantes alternativos de patógenos fúngicos.

Fusarium graminearum es capaz de infectar y sobrevivir sobre un gran número de hospedantes cereales, leguminosos y posiblemente especies de malezas (Goswami y Kistler, 2004). Un hospedante es definido como “un organismo vivo que alberga a un parásito” (Ainsworth, 1971) y bajo esta definición están incluidos tanto el hospedante económicamente importante como los potenciales hospedantes alternativos.

Fusarium graminearum es una especie cosmopolita y puede encontrarse en una amplia variedad de hospedantes económicamente importantes. En los últimos años, el rango de hospedantes de *F. graminearum* se fue expandiendo desde cereales a cultivos

no-cereales, incluyendo la colza (*Brassica napus* L.) (Chongo *et al.*, 2001), la papa (*Solanum tuberosum* L.) (Ali *et al.*, 2005), la remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L. *subsp. vulgaris* var. *altissima* Döll) (Hanson, 2006) y la soja (*Glycine max* L.) (Pioli *et al.*, 2004; Broders *et al.*, 2007). Numerosas especies de malezas también fueron identificadas como hospedantes alternativos de este patógeno y se ha propuesto su posible rol como fuentes de inóculo para el desarrollo de la FET (Jenkinson y Parry, 1994; Carmona *et al.*, 1999; Inch y Gilbert, 2003; Pereyra y Dill-Macky, 2008; Landschoot *et al.*, 2011; Postic *et al.*, 2012; Tekle *et al.*, 2012).

En EE.UU. se ha comprobado bajo estudios realizados con condiciones controladas, que aislamientos de *F. graminearum* procedentes de tubérculos de papa y raíces de remolacha fueron capaces de infectar trigo y producir micotoxinas en las espigas (Burlakoti *et al.*, 2007). Por otro lado, en Inglaterra (Jenkinson y Parry, 1994) demostraron que aislamientos de *Fusarium* spp. obtenidos de malezas fueron patógenos para plántulas de trigo inoculadas artificialmente. Aunque el potencial toxicogénico de esos aislamientos no fue valorado.

Aún cuando los rastrojos de cultivos se han identificado como la fuente de inóculo principal para la enfermedad, la participación de las malezas en la epidemiología de la FET, especialmente de las especies no-gramíneas, es un aspecto importante que podría conducir al desarrollo de prácticas de manejo para reducir su impacto como fuentes de inóculo.

Objetivos:

- Obtener aislamientos de *F. graminearum* a partir de potenciales fuentes de inóculo (malezas y cultivos invernales y estivales, etc.).

- Caracterizar genotípicamente los quimiotipos presentes en los distintos aislamientos de *F. graminearum* provenientes de las diferentes fuentes de inóculo.
- Analizar la dinámica de *F. graminearum* en hospedantes alternativos durante las cuatro estaciones del año.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Colección de aislamientos de *Fusarium graminearum* provenientes de distintas fuentes de inóculo

2.2.1.1. Muestreo

Seis eventos de muestreo fueron realizados durante el período de 12 meses en la estación Experimental Julio Hirschhorn de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina (34° 52' S y 57° 58' O). Los eventos de muestreo se efectuaron en los meses de Febrero, Abril, Junio, Septiembre y Noviembre de 2010, y Enero de 2011. Se recolectaron al azar muestras de malezas en estado de floración presentes en la cercanía de cultivos de trigo pan (*Triticum aestivum* L.) trigo candeal o fideo (*T. durum* Desf.), cebada (*Hordeum vulgare* L.), tritordeum (x *Tritordeum* Ascherson et Graebner), avena (*Avena sativa* L.), centeno [*Secale cereale* (L.) M.Bieb.], maíz (*Zea mays* L.) y soja (*Glycine max* L.). También se tomaron muestras de espigas, tallos, vainas y rastrojos de distintos cultivos. Las plantas muestreadas se dejaron secar, se localizaron en sobres de papel y se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento. Las especies de malezas se identificaron de acuerdo a su morfología por medio de las claves de identificación descriptas por Cabrera y Zardini (1993).

2.2.1.2. Aislamiento e identificación taxonómica

Los aislamientos de *F. graminearum* se obtuvieron por dos metodologías de acuerdo a la procedencia de la muestra:

- a) En el caso de las malezas, las inflorescencias fueron diseccionadas y cortadas en piezas de 0,5 a 2 cm. Las piezas fueron superficialmente desinfectadas en alcohol 70° y en una solución de hipoclorito de sodio 5% (55g de Cl.litro⁻¹) seguido por un lavado en agua destilada estéril, y sembradas en placas de Petri con medio de cultivo agar papa glucosado (APG al 2%) adicionado con Cloranfenicol (250 mg/L) y 0,6% (p/v) de Pentacloronitrobenceno (PCNB polvo mojable al 75%).

- b) Las muestras correspondientes a cultivos de trigo, centeno, cebada, tritordeum, soja y maíz fueron sembradas directamente, sin desinfección superficial previa, en placas de Petri con el medio de cultivo descrito anteriormente.

Las placas fueron incubadas at 25°C ± 2°C durante 4-5 días. Se seleccionaron visualmente las colonias obtenidas con características culturales y morfológicas de la especie, se repicaron a tubos pico de flauta con medio APG. La identificación taxonómica se realizó en base a las características culturales y morfológicas de las esporas como así también de acuerdo al análisis de la ontogenia conídica (células conidiógenas) (Booth, 1971; Leslie y Summerell, 2006). La identidad de los aislamientos se confirmó mediante el uso de PCR con el marcador especie-específico Fg16N (Nicholson *et al.*, 1998).

2.2.1.3. Conformación de la colección de aislamientos de *Fusarium graminearum* y mantenimiento

De cada aislamiento se obtuvieron cultivos monospóricos, para ello, los aislamientos identificados como *F. graminearum* se repicaron mediante el uso de un

ansa estéril en el medio de cultivo carboximetil celulosa líquido en baño térmico a 25°C en agitación a 45 revoluciones min^{-1} por 2 días (Cappellini y Peterson, 1965). Se obtuvieron cultivos monospóricos a partir de la esporulación de los aislamientos.

El mantenimiento de aislamientos monospóricos se llevó a cabo en viales con vaselina y con agua destilada estéril a 4°C (Buell y Weston, 1947).

2.2.1.4. Extracción de ADN y PCR especie-específica

Los aislamientos provenientes de cultivos monospóricos se sembraron en placas de Petri con medio de cultivo APG con el agregado de Cloranfenicol (250 mg/L) y se incubaron durante 7 días a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Para la extracción de ADN, se utilizó el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.). Las colonias obtenidas se molieron en morteros individuales con Nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. El micelio molido se colocó en un tubo Eppendorf de 1,5 mL y se le añadieron 600 μL de solución de lisis nuclear (Promega), se agitó y se incubó en baño térmico a 65°C durante 30 min. Se adicionaron 3 μL de solución de RNasa (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; Sigma, EE.UU.), se mezcló por inversión, se incubó a 37°C durante 15 min y se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente. Se agregaron 200 μL de solución de precipitación de proteínas (Promega), se mezcló vigorosamente y se centrifugó por 3 min a 16.000 g. El sobrenadante se transfirió a un tubo de 1,5 mL limpio con 600 μL de isopropanol a temperatura ambiente. Se mezcló por inversión, se centrifugó a 16.000 g durante 1 min, y el pellet obtenido se lavó añadiendo 600 μL de etanol 70°. Se centrifugó a 16.000 g por 1 min y se dejó secar. Finalmente, el pellet se resuspendió en 50 μL de buffer TE a 37°C.

Para evaluar la calidad y cantidad del ADN obtenido, las muestras se sembraron en un gel de agarosa al 0.7% teñido con Bromuro de etidio (0,2 mg/mL) junto con el marcador de peso molecular Lambda Hind III (Fermentas, EE.UU.). El rendimiento de ADN fue estimado por comparación entre la intensidad de las bandas generadas por las muestras y las del marcador utilizado.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo con los *primers* Fg16NF (5'-ACA GAT GAC AAG ATT CAG GCA CA-3') y Fg16NR (5'-TTC TTT GAC ATC TGT TCA ACC CA-3) desarrollados por Nicholson *et al.* (1998) acorde a las modificaciones del procedimiento descrito por Malbrán *et al.* (2012). Las reacciones se efectuaron en el termociclador PTC-150 MiniCycler™ (M.J.Research, INC, EE.UU.). La mezcla de reacción se realizó en volúmenes de 25 µL, conteniendo 5-20 ng de ADN fúngico, 200 µM de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0,5 µM de cada uno de los *primers* (FAGOS/Ruralex, Argentina), 0,8 unidades de Taq polimerasa (Highway Molecular Biology – InBio-UNICEN-Tandil, Argentina), 1,5 µM Cl₂Mg, y 10X buffer de reacción (50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl, 1% Triton X-100). El programa de ciclado consistió en un paso de desnaturalización (95°C) por 3 min, seguido por 38 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, *annealing* a 62°C por 20 s y extensión a 72°C por 45 s, seguidos por un ciclo final de extensión (72°C) durante 5 min. Hasta su recuperación las reacciones fueron mantenidas a 15°C.

Todas las reacciones incluyeron un control positivo, uno negativo y control de las condiciones de reacción.

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (p/v) teñidos con bromuro de etidio (0,2 mg/mL) junto con el marcador de peso molecular escalonado de 100bp (Fermentas, EE.UU.). El tamaño de las bandas obtenidas se estimó por comparación con las bandas del marcador utilizado. Los geles

se visualizaron con el analizador de imágenes GeneGenius (Syngene, EE.UU.), utilizando el software GeneSnaps para la toma de fotografías, y el software GeneTools para el análisis de las mismas.

2.2.2. Análisis genotípico de los quimiotipos de *Fusarium graminearum* provenientes de distintas fuentes de inóculo

El análisis genotípico de los quimiotipos de los aislamientos de *F. graminearum* conservados en agua y vaselina, del total de la colección (132 aislamientos) se llevó a cabo mediante el uso de la multiplex PCR desarrollada por Starkey *et al.* (2007) con los *primers* 12CON (5' – CAT GAG CAT GGT GAT GTC – 3') común a todos los quimiotipos, 12NF (5' - TCT CCT CGT TGT ATC TGG – 3'), 12-15F (5' - TAC AGC GGT CGC AAC TTC – 3'), y 12-3F (5' - CTT TGG CAA GCC CGT GCA – 3'). Esta reacción múltiple produce amplicones de aproximadamente 840, 670, y 410bp con aislamientos que tienen quimiotipo NIV, 15-ADON, y 3-ADON, respectivamente.

Las reacciones de amplificación se realizaron en el termociclador PTC-150 MiniCycler™ (M.J.Research, INC, EE.UU.). La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 µL, conteniendo 5-10 ng de ADN fúngico, 200 µM de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0,2 µM de cada uno de los *primers* (FAGOS/Ruralex, Argentina), 0,5 unidades de Taq polimerasa (Highway Molecular Biology-InBio-UNICEN-Tandil, Argentina), 1,5 µM Cl₂Mg, y 1X buffer de reacción (50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl, 1% Triton X-100). El programa de ciclado consistió en un paso de desnaturalización inicial de 3 min a 94°C; seguido por 25 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 53°C, y 1 min a 72°C; y un paso de extensión final de 5 min a 72°C. Hasta su recuperación las reacciones fueron mantenidas a 15°C.

Todas las reacciones incluyeron un control positivo, uno negativo y un control de las condiciones de reacción.

Los productos de PCR se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (p/v) teñidos con bromuro de etidio ($0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$) junto con el marcador de peso molecular escalonado de 100bp (Highway Molecular Biology- InBio- UNICEN-Tandil, Argentina). El tamaño de las bandas obtenidas se estimó por comparación con las bandas del marcador utilizado. Los geles se visualizaron con el analizador de imágenes GeneGenius (Syngene, EE.UU.), utilizando el software GeneSnaps para la toma de fotografías, y el software GeneTools para el análisis de las mismas.

2.2.3. Dinámica de *Fusarium graminearum* en hospedantes alternativos

El estudio de la dinámica de *F. graminearum* en los hospedantes alternativos, tales como las malezas, se realizó a lo largo de un año comprendiendo 6 tiempos de muestreo (Febrero, Abril, Junio, Septiembre, Noviembre de 2010 y Enero de 2011). Se evaluó la incidencia de colonización de *F. graminearum* en las inflorescencias de las mismas. Para ello, doce piezas por planta fueron sembradas en 2 placas de Petri de 9 cm con medio APG (6 piezas por placa). Cada pieza de inflorescencia evaluada estaba compuesta por al menos una flor entera. Luego de los 5-7 días de incubación a 25°C , se evaluó la incidencia de colonización de *F. graminearum* como el número de piezas de inflorescencias colonizadas sobre el total, para cada especie de maleza y tiempo de muestreo.

2.2.3.1. Análisis estadístico

Se analizó la incidencia de colonización de *F. graminearum* en las inflorescencias de malezas en cada uno de los eventos de muestreo mediante un análisis de varianza (ANOVA) y se compararon las medias con un test de Tukey ($p \leq 0,05$). Se utilizó el software Statistix V.8 (Analytical Software, Tallahassee, EE.UU.). Previo al

análisis, los datos expresados como porcentaje fueron transformados usando la función arcoseno.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Colección de aislamientos de *Fusarium graminearum* provenientes de distintas fuentes de inóculo

2.3.1.1. Muestreo

Se recolectaron 67 especies de malezas, perteneciente a 22 familias botánicas (Tabla 2). Las familias analizadas fueron Amaranthaceae, Apiáceae, Apocynaceae, Asteraceae, Boraginaceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Chenopodiaceae, Convolvulaceae, Cyperaceae, Fabaceae, Fumariaceae, Gentianaceae, Lamiaceae, Malvaceae, Plantaginaceae, Poaceae, Polygonaceae, Portulacaceae, Rubiaceae, Solanaceae y Verbenaceae. Se analizó la colonización por *F. graminearum* en un total de 162 muestras de malezas gramíneas y no-gramíneas (23 en Febrero, 32 en Abril, 23 en Junio, 20 en Septiembre, 28 en Noviembre y 36 en Enero).

2.3.1.2. Aislamiento

A partir de las inflorescencias de las plantas recolectadas, se obtuvieron 1020 aislamientos de *F. graminearum* que se identificaron por medio de la metodología convencional y la molecular. Para el armado de la colección se seleccionaron 107 aislamientos de *F. graminearum* provenientes de malezas.

Aunque otras especies de *Fusarium* también fueron aisladas, *F. graminearum* fue la especie predominante y fue encontrada colonizando el 100% de las especies de

malezas testeadas. Ninguna de las especies de malezas analizadas presentó síntomas que pudieran asociarse a patógenos o a una infección causada por *Fusarium* spp. De las muestras de cereales y soja se obtuvieron 124 aislamientos del hongo y se seleccionaron e identificaron 25 aislamientos de *F. graminearum* para la conformación de la colección.

2.3.1.3. Identificación taxonómica

En el medio de cultivo APG los aislamientos de *F. graminearum* crecieron rápidamente, llegando a completar una caja de Petri de 90 mm de diámetro en 5 días. Las colonias presentaron micelio aéreo denso de color rosado-rojo carmín y sectores con coloración blanca o tonos amarillentos grisáceos. En el agar, produjeron pigmentos de color rojo carmín. Los aislamientos presentaron las características indicadas por Booth (1971) y Leslie y Summerell (2006) en sus descripciones de la especie *F. graminearum* (Figura 10).

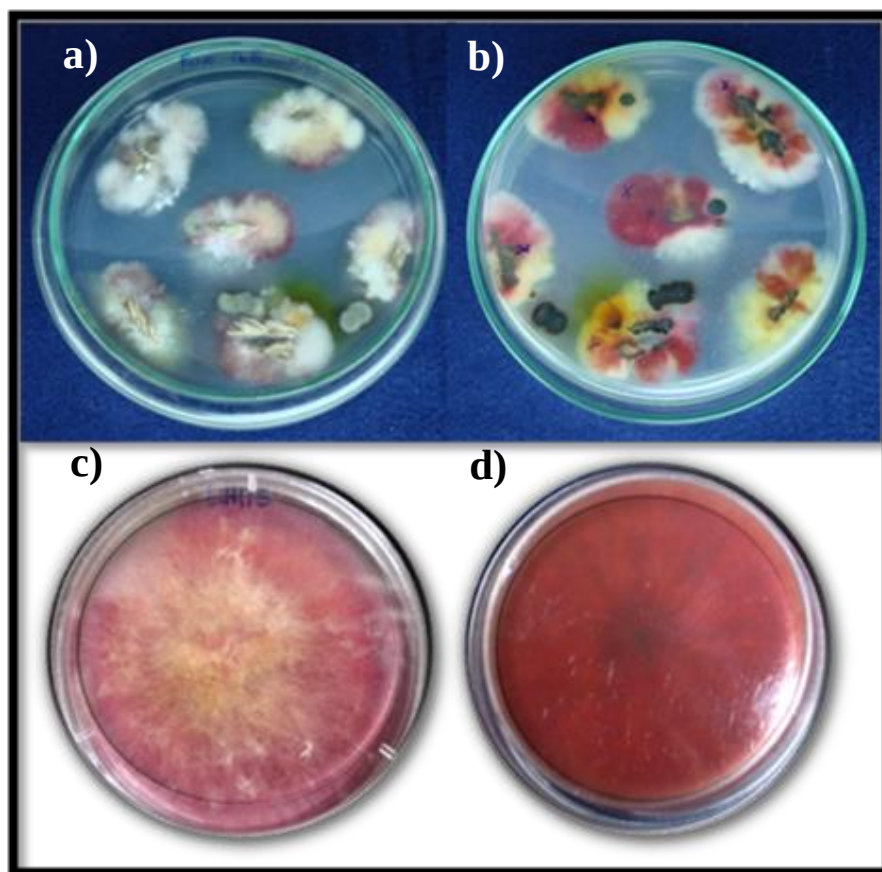


Figura 10: a) y b) Aislamientos de *Fusarium graminearum* realizados a partir de inflorescencias de malezas en placas de Petri con medio de cultivo Agar papa glucosado (APG); c) Colonia de *F.graminearum*, micelio aéreo, y d) Reverso de colonia mostrando la coloración rojiza-carmín en el medio de cultivo.

Por medio de PCR especie-específica, utilizando el par de *primers* Fg16N (Nicholson *et al.*, 1998), se confirmó que todos los aislamientos obtenidos y seleccionados a través de sus características morfológicas y culturales correspondían a aislamientos de *F. graminearum* (Figura 11). Esta reacción de amplificación genera un producto de 280 bp a partir del ADN molde.

Del muestreo realizado, las 67 especies de malezas pertenecientes a 22 familias botánicas se identificaron como hospedantes alternativos de *F. graminearum* en la Argentina (Tabla 2) (Mourellos *et al.*, 2014).

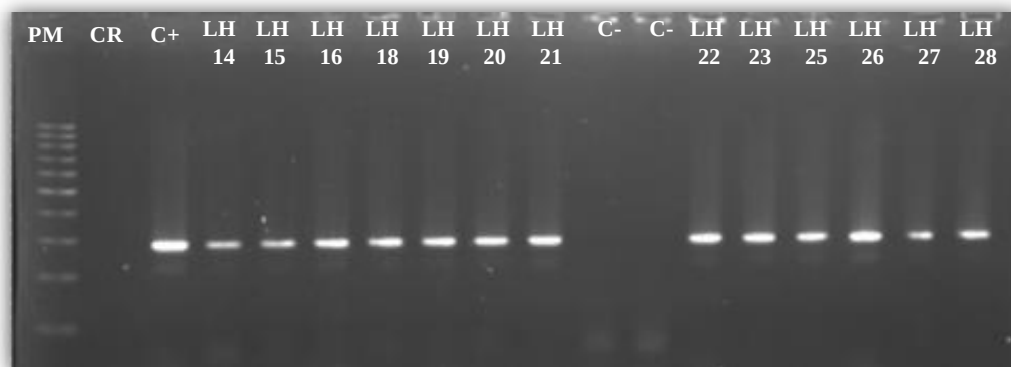


Figura 11: Gel sembrado con los productos de reacción de la PCR especie-específica (Fg16N) de aislamientos de la colección. CALLES: 1-Marcador de Peso Molecular; 2-Control de Condiciones de Reacción; 3-Control positivo (*F. graminearum* RBG2507); 4-10 Aislamientos de malezas (LH14; LH15; LH16; LH18; LH19; LH20; LH21); 11-12 Controles negativos, *F. poae*; 13-18 Aislamientos de malezas (LH22; LH23; LH25; LH26; LH27; LH28).

Tabla 2: Lista de familias, especies y hábitos de las malezas muestreadas en el presente trabajo para recuperar aislamientos de *Fusarium graminearum*.

Familia	Especies de malezas	Hábito
Amaranthaceae	<i>Alternanthera philoxenoides</i> (Mart.) Griseb ^a	Perenne
	<i>Amaranthus dubius</i> Mart. Ex Thell ^a	Anual
Apiaceae	<i>Cyclospermum leptophyllum</i> (Pers.) Sprague ^a	Anual
	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill ^a	Perenne
Apocynaceae	<i>Oxypetalum solanoides</i> Hook. and Arn. ^a	Perenne
Asteraceae	<i>Anthemis cotula</i> L. ^a	Anual
	<i>Aster squamatus</i> (Spreng.) Hieron. ^a	Perenne
	<i>Baccharis glutinosa</i> Pers. ^a	Perenne
	<i>Bidens subalternans</i> DC ^a	Anual
	<i>Cichorium intybus</i> L. ^a	Perenne
	<i>Cirsium arvense</i> (L.) Scop. ^a	Anual
	<i>C. vulgare</i> (Savi) Ten. ^a	Bianual
	<i>Coniza bonariensis</i> (L.) Cronquist ^a	Anual
	<i>Galinsoga parviflora</i> Cav. ^a	Anual
	<i>Gamochaeta spicata</i> (Lam.) Cabrera ^a	Anual/Bianual
	<i>Hypochaeris radicata</i> L. ^a	Perenne
	<i>Matricaria recutita</i> L.	Anual
	<i>Picris echioides</i> L. ^a	Anual
	<i>Solidago chilensis</i> Meyen ^a	Perenne
	<i>Sonchus asper</i> (L.) Hill ^a	Anual
Boraginaceae	<i>S. oleraceus</i> L. ^a	Anual
	<i>Taraxacum officinale</i> G. Weber ex F. H. Wigg ^a	Perenne
Boraginaceae	<i>Echium plantagineum</i> (L.) ^a	Anual
Brassicaceae	<i>Brassica rapa</i> L. ^a	Anual/Bianual
	<i>Capsella bursa-pastoris</i> (L.) Medik. ^a	Anual
	<i>Raphanus sativus</i> L. ^a	Anual/Bianual

Continua de Tabla 2:

Familia	Especies de malezas	Hábito
Cariophyllaceae	<i>Cerastium glomeratum</i> Thiull. ^a	Annual
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium hircinum</i> Schrad. ^a <i>C. quinoa</i> Wild.	Annual Annual
Convolvulaceae	<i>Convolvulus arvensis</i> L.	Perenne
Cyperaceae	<i>Cyperus eragrostis</i> Lam. ^a <i>C. rotundus</i> (L.) ^a	Perenne Perenne
Fabaceae	<i>Trifolium pratense</i> L. ^a <i>T. repens</i> L. ^a <i>Vicia villosa</i> Roth ^a	Perenne Perenne Annual
Fumariaceae	<i>Fumaria capreolata</i> L. ^a	Annual
Gentianaceae	<i>Centaurium pulchellum</i> (Sw.) Druce ^a	Annual
Lamiaceae	<i>Lamium amplexicaule</i> L. ^a <i>Stachys arvensis</i> (L.) L. ^a	Annual Annual
Malvaceae	<i>Anoda cristata</i> L. ^a	Perenne
Plantaginaceae	<i>Veronica persica</i> Poir.	Annual
Poaceae	<i>Avena byzantina amarilla</i> C. Koch ^a <i>A. fatua</i> L. ^a <i>A. sativa</i> L. <i>Bothriochloa laguroides</i> (DC.) Herter ^a <i>Briza minor</i> L. ^a <i>Bromus mollis</i> L. ^a <i>B. unioloides</i> (Willd.) Raspail, hom. illeg. <i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers. <i>Dactylis glomerata</i> (L.) ^a <i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop. <i>Echinochloa crus-galli</i> (L.) P. Beauv <i>Festuca</i> sp. ^a <i>F. arundinacea</i> Schreb. <i>Lolium multiflorum</i> Lam. <i>Panicum</i> sp. ^a <i>Paspalum dilatatum</i> Poir. ^a <i>Phalaris aquatica</i> L. ^a <i>Sorghum halepense</i> (L.) Pers.	Annual Annual Annual Perenne Annual Annual Perenne Perenne Perenne Annual Annual Perenne Perenne Annual/Bianual Annual Perenne Perenne Perenne
Polygonaceae	<i>Rumex crispus</i> L.	Perenne
Portulacaceae	<i>Portulaca oleracea</i> L. ^a	Annual
Rubiaceae	<i>Borreira verticillata</i> (L.) G. Mey ^a	Annual/perenne
Solanaceae	<i>Datura ferox</i> L. ^a <i>Nicotiana longiflora</i> Cav. ^a <i>Solanum chenopodioides</i> Lam. ^a	Annual Perenne Annual
Verbenaceae	<i>Verbena montevidensis</i> Spreng. ^a <i>V. bonariensis</i> L. ^a	Perenne Annual/Bianual

^a Primer reporte de aislamiento de *Fusarium graminearum* sobre este hospedante (Mourellos *et al.*, 2014).

2.3.2. Análisis genotípico de los quimiotipos de *Fusarium graminearum* provenientes de distintas fuentes de inóculo

Mediante una PCR múltiple en la que se utilizó un set de 4 *primers* se determinaron los quimiotipos de los aislamientos obtenidos de *F. graminearum* del total de la colección conformada por 132 aislamientos provenientes de malezas (107) y cultivos de importancia económica (25). Esta reacción produjo amplicones de aproximadamente 840 bp, 670 bp y 410 bp para aislamientos con quimiotipo NIV, 15-ADON y 3-ADON, respectivamente (Figura 12). Se encontraron aislamientos pertenecientes a los 3 quimiotipos posibles, aunque la mayoría de los aislamientos pertenecían al quimiotipo 15-ADON (88,65%) y el grupo restante, 9,85% y 1,5%, al quimiotipo NIV y 3-ADON respectivamente (Figura 13). Los aislamientos productores de nivalenol fueron procedentes de las malezas *Amaranthus dubius*, *Cichorium intybus*, *Raphanus sativus*, *Trifolium repens*, *Stachys arvensis*, *Dactylis glomerata*, *Lolium multiflorum* y *Phalaris aquatica*, con excepción de un aislamiento NIV aislado de tritordeum y uno de soja, y aquellos con quimiotipo 3-ADON de las malezas *Anoda cristata* y *Paspalum dilatatum*.

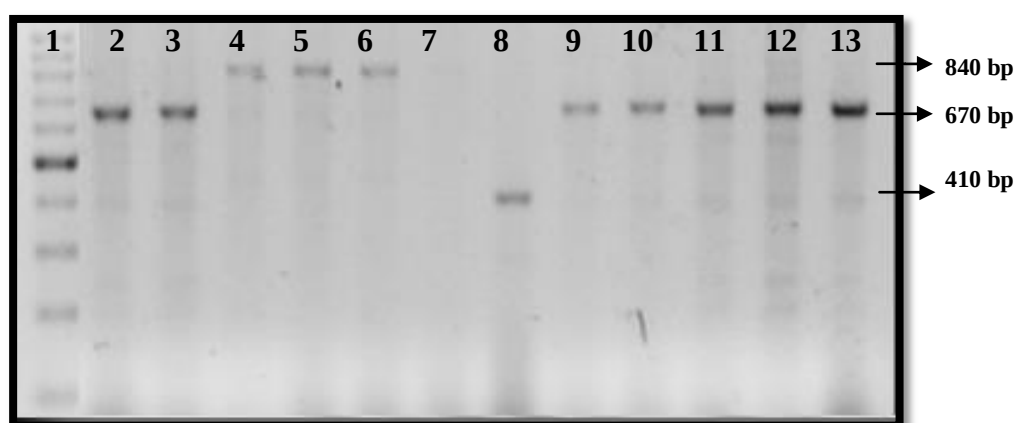


Figura 12: Gel sembrado con los productos de reacción de la PCR múltiple de 12 aislamientos. CALLES: 1: Marcador de Peso Molecular; 2-3: Aislamientos con quimiotipo 15-ADON (LH14; LH17); 4-6: Aislamientos con quimiotipo NIV (LH27; LH28; LH83); 9-13: Aislamientos con quimiotipo 15-ADON (LH20; LH22; LH25; LH26; LH64); 8: Aislamiento con quimiotipo 3-ADON (LH39); 7: reacción negativa.

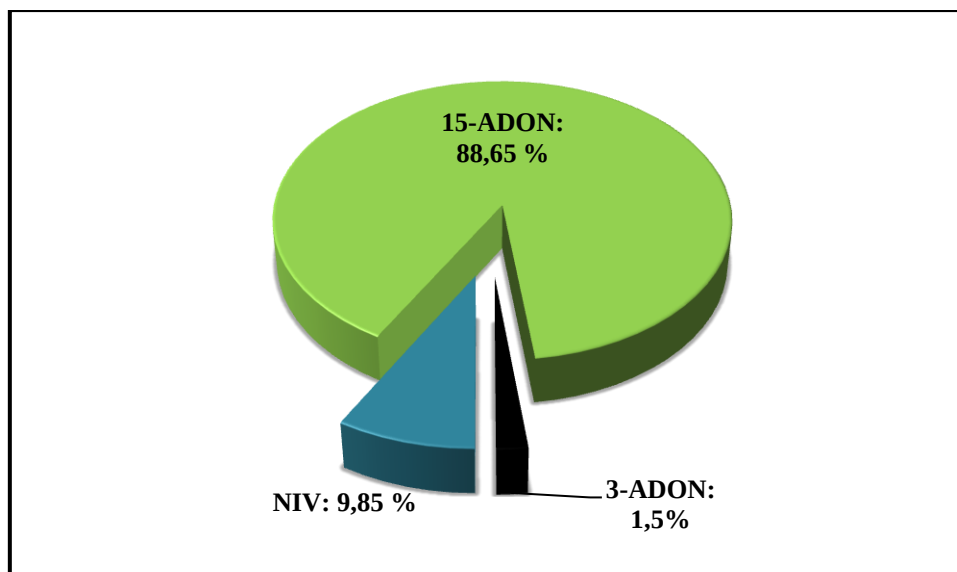


Figura 13: Porcentaje de los quimiotipos obtenidos mediante la PCR múltiple desarrollada por Starkey *et al.* (2007) de la colección de aislamientos de *Fusarium graminearum* provenientes de distintas fuentes de origen.

2.3.3. Dinámica de *Fusarium graminearum* en especies de malezas

Las especies de malezas consideradas en el presente estudio, tenían hábitos de crecimiento y ciclos de vida diferentes y como consecuencia las especies recolectadas en cada tiempo de muestreo fueron distintas. De las 67 especies de malezas recolectadas, solo *Cynodon dactylon* (L.) Pers., *Cyperus eragrostis* Lam., *Picris echinoides* L., *Raphanus sativus* L., y *Dactylis glomerata* (L.) estuvieron presentes en todos los eventos de muestreo. Aún cuando *F. graminearum* se encontró colonizando a las inflorescencias de malezas durante todo el año, la diferencia de colonización en las distintas estaciones fue significativamente diferente ($F = 4.35$; $p < 0.01$). La incidencia de colonización más alta (nº de piezas de inflorescencias colonizadas sobre el total) se observó en verano (69% en Febrero de 2010) y primavera (58% en Noviembre de 2010) mientras que las más bajas incidencias correspondieron a otoño (45% en Abril de 2010) e invierno (46% en Junio de 2010) (Figura 14). Se obtuvo una tendencia similar cuando solo se analizó la dinámica de *F. graminearum* para las 5 especies de malezas presentes

en los 6 eventos de muestreo realizados, aunque las diferencias encontradas no fueron significativas ($F = 2.11$, $p = 0.0992$) (Figura 15).

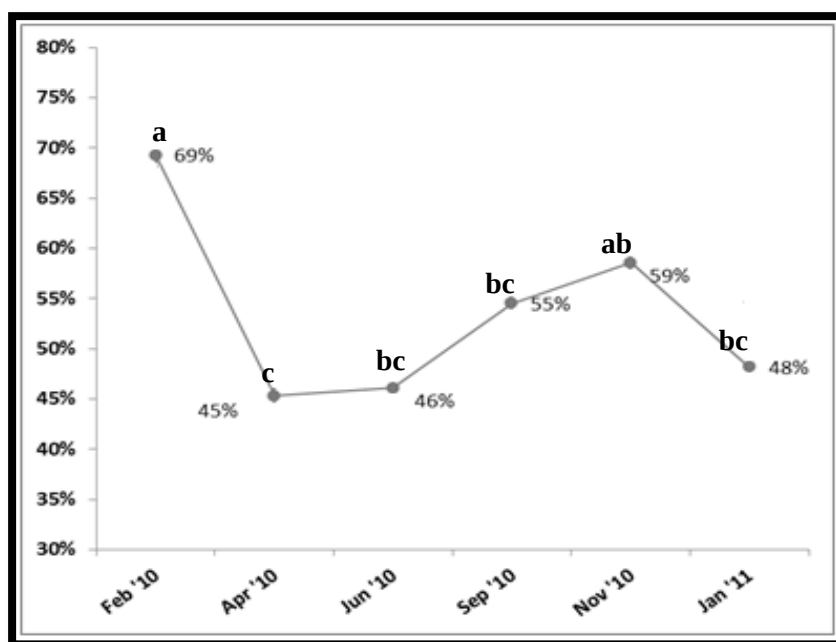


Figura 14: Porcentaje de incidencia de colonización de *Fusarium graminearum* en todas las especies de malezas recolectadas durante los 6 eventos de muestro. Letras distintas implican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$).

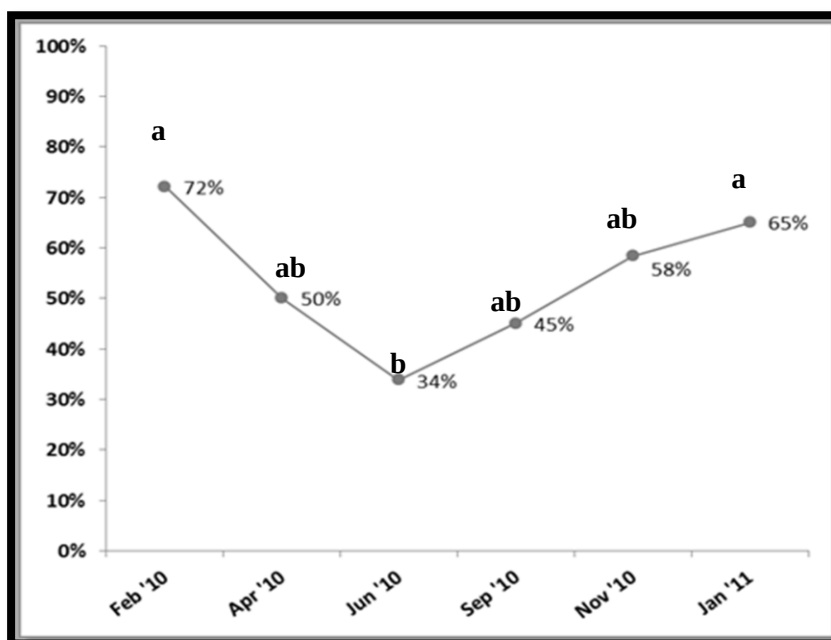


Figura 15: Porcentaje de incidencia de colonización de *Fusarium graminearum* analizada solamente en las 5 especies de malezas (*Cynodon dactylon.*, *Cyperus eragrostis*, *Picris echioides*, *Raphanus sativus*, y *Dactylis glomerata*) que fueron recolectadas en cada uno de los 6 eventos de muestro. Letras distintas implican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$).

2.4. DISCUSIÓN

En la fitopatología, la identificación de patógenos asociados a las plantas es de gran importancia para la realización de estudios epidemiológicos y el establecimiento de medidas efectivas tendientes a prevenir, diagnosticar, controlar y erradicar enfermedades que afecten a los vegetales. Para la identificación de hongos fitopatógenos es necesaria la observación de características morfobiométricas y culturales, y el uso claves taxonómicas para determinar el género y la especie de un organismo dado. En las últimas décadas se han incorporado las técnicas moleculares como una herramienta importante y precisa para la identificación de microorganismos en el área de la micología. En el presente estudio aislamientos obtenidos de sesenta y siete especies de malezas y de semillas, rastrojos e inflorescencias de trigo pan, trigo candeal o fideo, tritordeum, cebada, centeno, maíz y soja, fueron identificados como *Fusarium graminearum sensu lato* en base a sus características morfobiométricas, culturales y al uso de una PCR especie-específica.

En la Argentina, las condiciones climáticas favorecen la abundancia y prevalencia de plantas de malezas alrededor y dentro de los campos de cultivo a lo largo de todo el año. El clima templado y el amplio rango de especies de malezas con diferentes hábitos de crecimiento hospedando a *F. graminearum* podría explicar la presencia ubicua del patógeno. Según Dinoor (1974), los hospedantes alternativos actúan como importantes puentes epidemiológicos que le permiten a los patógenos sobrevivir, incrementar o mantener la cantidad de inóculo en contra de la tendencia natural de disminución en ausencia del hospedante principal.

Según los resultados obtenidos en este estudio, ninguna de las especies de malezas analizadas presentó síntomas de infección por *Fusarium* spp o *F. graminearum*, lo cual

está en concordancia con reportes previos (Jenkinson y Parry, 1994; Inch y Gilbert, 2003). Respecto a esta situación, Sieber *et al.* (1988) sugirieron una colonización endofítica por parte de *F. graminearum* sobre los hospedantes alternativos. Además, hay evidencias que durante el desarrollo de la FET, existe un estado asintomático, en el cual las hifas de *F. graminearum* pueden crecer en los espacios intercelulares dentro de las espigas, alimentándose exclusivamente de los exudados extracelulares (Brown *et al.*, 2010).

La presencia del hongo en especies de malezas fue reportada sobre órganos vegetales asociados al suelo tales como rizomas y raíces (Carmona *et al.*, 1999; Postic *et al.*, 2012). Sin embargo, en este estudio, todos los aislamientos de *F. graminearum* obtenidos a partir de malezas fueron aislados de las inflorescencias de las mismas. La colonización por parte de este patógeno a partir de los órganos aéreos tales como las inflorescencias de malezas podría resultar más relevante desde un punto de vista epidemiológico debido a que la FET se inicia en los órganos aéreos (espigas) del trigo.

Cincuenta y cuatro especies de malezas y 16 familias botánicas fueron encontradas por primera vez como hospedantes alternativos del patógeno (Mourelos *et al.*, 2014). Del muestreo realizado, 13 especies de malezas pertenecientes a 6 familias botánicas (Asteraceae, Chenopodiaceae, Convolvulaceae, Plantaginaceae, Poaceae, y Polygonaceae) fueron citadas previamente como hospedantes de *F. graminearum* en la Argentina (Carmona *et al.*, 1999), Canadá (Inch y Gilbert, 2003), Croacia (Postic *et al.*, 2012), Inglaterra (Jenkinson y Parry, 1994) y Uruguay (Pereyra y Dill-Macky, 2008). Inch y Gilbert (2003) en Canadá proponen que, debido a la falta de peritecios de *G. zeae*, las malezas no aportarían las ascosporas que actúan como inóculo inicial para el desarrollo de la FET, pero los autores mencionan en concordancia con Carmona *et al.* (1999) que servirían como reservorio para el patógeno en los campos cuando los

hospedantes susceptibles no están presentes. Sin embargo, Pereyra y Dill-Macky (2008) en Uruguay, en estudios efectuados *in vitro* encontraron que *G. zeae* es capaz de producir peritecios sobre residuos de malezas gramíneas.

En la Argentina, los informes recientes indican que aproximadamente el 80% del total de la tierra cultivable en el país es sembrada bajo el sistema de siembra directa (Trigo *et al.*, 2009; AAPRESID, 2012), que deja gran cantidad de residuos de cultivos como así también residuos de malezas sobre la superficie del suelo. Bajo estas condiciones, los hospedantes alternativos de *F. graminearum* no solo actuarían como reservorio del patógeno entre 2 cultivos susceptibles, sino que también producirían los peritecios de *G. zeae* sobre sus residuos que podrían a la vez servir como fuente de inóculo para el inicio de la infección de la FET. Aunque la producción de peritecios de *G. zeae* sea menor sobre malezas que sobre otros residuos de cultivo (Pereyra y Dill-Macky, 2008), su contribución podría ser relevante cuando las condiciones climáticas son favorables (Lori *et al.*, 2009), ya que según mencionan Xu (2003) y Reis *et al.* (1988) solo una mínima cantidad de inóculo sería necesaria para el desarrollo de una epidemia de FET.

En el estudio de la dinámica sobre malezas, la incidencia de colonización de *F. graminearum* fue mayor en los muestreos realizados en los meses correspondientes al verano. Este resultado podría deberse a la falta del cultivo principal y/o a la presencia de una mayor cantidad de hospedantes alternativos en floración. A pesar de ello, queda demostrado que durante todo el año existe inóculo disponible en el campo al igual que mencionan Reis *et al.* (1988) en el sur de Brasil. En consecuencia las distintas especies de malezas deberían ser consideradas cuando se implementan medidas de control para prevenir el desarrollo de la FET.

En el país, distintos estudios sugieren que el tricoteceno predominante entre poblaciones de *F. graminearum* es el DON (Dalcero *et al.*, 1997; Lori *et al.*, 2003; Ramírez *et al.*, 2006; Alvarez *et al.*, 2009; Reynoso *et al.*, 2011; Malbrán *et al.*, 2014), aunque aislamientos productores de NIV también han sido encontrados (Lori *et al.*, 1992; Fernández Pinto *et al.*, 2008). En aislamientos obtenidos a partir de trigo, prevalecieron los productores de 15-ADON (Alvarez *et al.*, 2009; Reynoso *et al.*, 2011; Malbrán *et al.*, 2014) sobre los que producen NIV (Lori *et al.*, 1992; Fernández Pinto *et al.*, 2008). Por otro lado, en maíz se ha reportado una importante presencia de productores de NIV (Sampietro *et al.*, 2011). La alta proporción de aislamientos 15-ADON encontrada con los aislamientos de trigo, maíz, soja, centeno, tritordeum y malezas en esta tesis, se corresponde con los trabajos mencionados anteriormente. Si bien en la Argentina no hay estudios de caracterización genotípica de quimiotipos a partir de aislamientos de *F. graminearum* provenientes de malezas, en Nepal (Desjardins *et al.*, 2004) hallaron que el 68% de 31 aislamientos tomados de malezas se identificaron como productores de NIV. En el presente estudio los aislamientos con quimiotipo NIV encontrados, estuvieron asociados principalmente a especies de malezas, hallazgo que reforzaría junto a los datos de Desjardins *et al.* (2004) y a las condiciones ambientales y de laboreo como lo citan Pasquali y Migueli (2014) la hipótesis de una posible especialización de los quimiotipos en ciertos hospedantes.

La presencia de aislamientos con genotipo de tricoteceno NIV resulta de gran relevancia, debido a esta toxina es más tóxica que DON en ratones y posiblemente en humanos (Yoshizawa y Morooka, 1977). Por lo tanto, la ocurrencia de NIV podría tener mayor significancia con respecto a salud pública.

Estos resultados indicarían que aislamientos de *F. graminearum* procedentes de malezas como de otras fuentes podrían provocar infecciones en cultivos de importancia

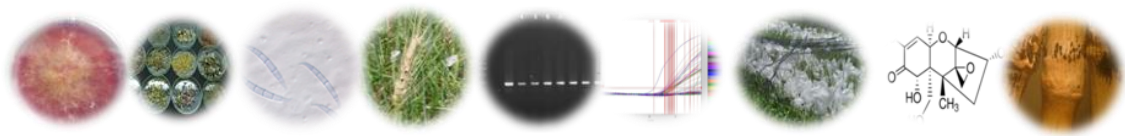
económica generando una contaminación potencial de las materias primas destinadas a la producción de alimentos con diferentes tricotecenos sintetizados por el patógeno.

2.5. CONCLUSIÓN

En el presente capítulo se obtuvieron aislamientos de *F. graminearum* de distintas fuentes de origen. Se citaron por primera vez 54 hospedantes alternativos de *F. graminearum*. A través del estudio de la dinámica, este patógeno se detectó en distintos hospedantes alternativos durante todo el año. Esta información resulta valiosa para comprender mejor la epidemiología de *F. graminearum* y para llevar a cabo prácticas de manejo tendientes a reducir la cantidad de inóculo disponible para el desarrollo de epidemias de la FET. No obstante, son necesarios estudios futuros para definir con mayor precisión el impacto de las malezas como hospedantes alternativos. Se obtuvieron aislamientos de *F. graminearum* con quimiotipo 15-ADON, como también aislamientos con quimiotipos no comúnmente citados, tales como 3-ADON y NIV a partir de fuentes de inóculo aún no estudiadas, tales como las malezas. Este hallazgo, aporta información relevante sobre el riesgo toxicológico debido a la presencia de más de un quimiotipo determinado sobre los alimentos. Considerando principalmente que el nivalenol sería más tóxico que el deoxinivalenol en humanos.

Las próximas investigaciones deberían focalizarse en la determinación del mecanismo de infección empleado por este hongo patógeno en su interacción con las malezas, como también el tipo de inóculo provisto por estos hospedantes alternativos y su importancia en la epidemiología de la FET.





CAPÍTULO III

DINÁMICA DE *Fusarium graminearum* EN
RASTROJOS DE CULTIVOS INVERNALES Y
ESTIVALES Y SU RELACIÓN CON LA
DESCOMPOSICIÓN DE LOS MISMO

3.1. INTRODUCCIÓN

3.1.1. Epidemias

La FET provoca importantes daños en todas las áreas cerealeras del mundo, en general, de forma esporádica. En China, especialmente en el Este y centro del país, han ocurrido varias epidemias severas desde 1936 y a partir de mediados de 1980 las mismas comenzaron a producirse más frecuentemente (Gale *et al.*, 2002). Las pérdidas afectaron a 7 millones de hectáreas de trigo y a más de 1 millón de toneladas de granos debido a mermas en el rendimiento (Windels, 2000).

En Rusia, se produjeron epidemias de FET con distintos niveles de severidad. La primera fue registrada a finales del siglo XIX en la región Este, donde las condiciones ambientales son predisponentes para esta enfermedad (Voronin, 1890). En el Sur del país se registraron años epidémicos durante las décadas de 1960, 1980 y 1990 (Ivanchenko, 1960; Kirienkova, 1992). Por otra parte, en la región Noroeste de Rusia, se ha identificado a *F. graminearum* en el año 2003, y desde ese momento la FET comenzó a ocurrir con mayor frecuencia (Gagkaeva *et al.*, 2009). En Japón una epidemia severa provocó la pérdida de aproximadamente la mitad del rendimiento de trigo en 1963 y más recientemente, durante 1998 y 1999 se reportaron mermas considerables de rendimiento (Suga *et al.*, 2008).

En Europa e India, se han reportado una gran cantidad de epidemias de FET con pérdidas de aproximadamente el 40% y superiores al 70% en algunos países (Parry *et al.*, 1995).

En algunas regiones productoras de los EE.UU. y Canadá, durante 1993 se experimentó una pérdida cercana a mil millones de dólares debido a bajas en el rendimiento y a la contaminación de los granos con micotoxinas, representando 4,8

millones de toneladas (McMullen *et al.*, 1997). Posteriormente, se documentaron en estos países numerosas epidemias de variada intensidad que derivaron directa e indirectamente en pérdidas económicas (Goswani y Kistler, 2004).

En países de Latinoamérica, principalmente Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay, ocurrieron epifitias de la FET que redujeron el rendimiento y la calidad de los granos en cultivos de trigo (Figura 16). Esta situación provocó pérdidas económicas debido a restricciones comerciales en los mercados (Magliano y Chulze, 2013). En Brasil, si bien se reportan epidemias desde antes de 1940, en los últimos años las mismas comenzaron a producirse con mayor frecuencia (Panisson *et al.*, 2003), las epidemias más recientes fueron registradas en la región Sur del país durante 1997, 1998, 2000 y 2002, años coincidentes con elevadas precipitaciones durante la antesis del trigo (Documentos online, EMBRAPA trigo: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do40_2.htm). En Paraguay, la enfermedad produjo ataques de importancia en 1972, 1975, 1983 y 1985, en simultáneo con una alta frecuencia de lluvias durante el periodo de floración y llenado del grano (de Viedma, 1989). En Uruguay, durante las últimas décadas, brotes de FET de moderada y severa intensidad ocurrieron en intervalos de 4 años (Díaz de Ackermann y Pereyra, 2011). Las epidemias más importantes transcurrieron en 1991, 1993, 2001, 2002 y 2012 (Umpiérrez *et al.*, 2013).

En nuestro país las áreas mayormente afectadas son las subregiones ecológicas trigueras II Norte y II Sur, III, IV y el NEA (Noreste Argentino). La FET se presenta con carácter epidémico en las subregiones II Norte y III, fundamentalmente en el Nordeste de Buenos Aires, Sur de Santa Fe y Sur de Entre Ríos, donde pueden esperarse 3-4 epidemias de severidad alta cada 20 años (Moschini y Fortugno, 1996; Moschini, 2007). En los últimos 20 años, la frecuencia de epidemias de la FET se incrementó en

algunas áreas de la Argentina así como en otros países. Este hecho ha sido asociado a posibles cambios climáticos, pero más frecuentemente a la adopción de sistemas de labranza conservacionistas, como la siembra directa (MacMullen, 1997; Stack, 1999).

Epidemias severas de FET fueron registradas en la Argentina en 1945, 1976, 1978, 1985, 1993, 1997 y 2001 (Moschini y Fortugno, 1996; de Galich, 1997; Kikot, 2011), con pérdidas que alcanzaron hasta el 70% de la producción. Dichas pérdidas se relacionan con la esterilidad de las espiguillas y la formación de granos poco desarrollados, los cuales son castigados en la comercialización por tener una constitución alterada y bajo peso hectolítrico. Durante la campaña 2012/13 se registró en el país la última epidemia de esta enfermedad. En esta campaña, la cantidad de lluvias fue altamente superior a los valores históricos, resultando en condiciones favorables para el desarrollo de la FET. Los cultivos de trigo fueron fuertemente afectados por la enfermedad y se reportaron pérdidas de rendimiento superiores al 60% en algunos campos (Bolsa de comercio de Rosario, 2012).

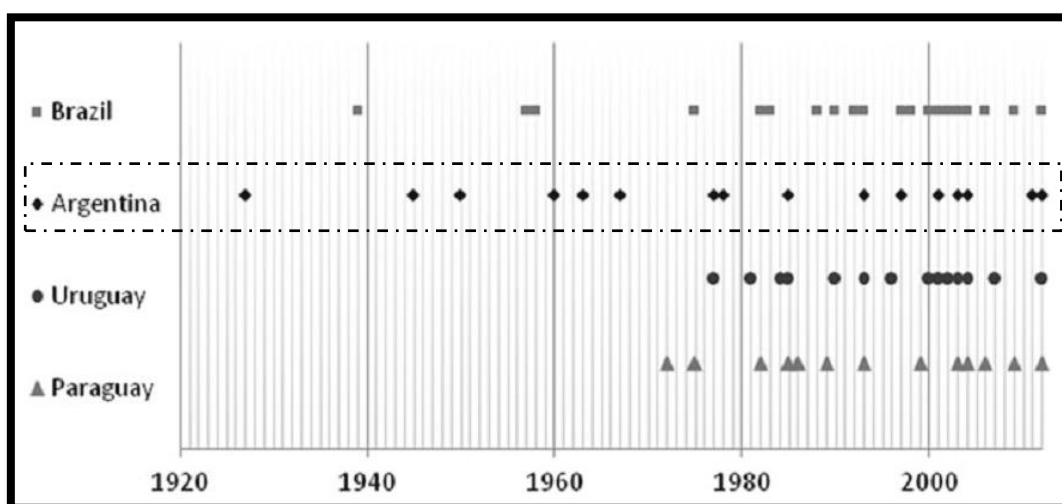


Figura 16: Frecuencias de epidemias de la FET en el Cono Sur (Kholi y Díaz de Ackermann, 2013)

3.1.2. Condiciones ambientales predisponentes

Las plantas de trigo son más susceptibles a la FET durante la antesis, que es una fase relativamente corta del desarrollo del trigo. Para que la infección sea exitosa durante esta etapa, debe haber inóculo disponible y las condiciones climáticas óptimas para el desarrollo de la FET deberían prevalecer. De Wolf *et al.* (2001) observó en EE.UU. que las condiciones ambientales previas al estadio de floración del trigo, fueron menos importantes epidemiológicamente que las reinantes durante el periodo de antesis. Un estudio sobre espigas de trigo realizado con distintas especies de *Fusarium* bajo condiciones controladas, determinó que *F. graminearum* tuvo la mayor incidencia de infección a 28-29°C y que la misma se incrementó en forma directamente proporcional con el incremento de periodos húmedos (Rossi *et al.*, 2001). Similarmente, un ensayo realizado en el transcurso de 3 años con espigas de trigo infectadas naturalmente, indicó que la incidencia y severidad de la FET fueron mayores cuando las condiciones climáticas durante el periodo de floración se caracterizaron por presencia de lluvia y alta humedad relativa (Lori *et al.*, 2009).

La dependencia de la FET a los factores ambientales ha permitido el desarrollo de modelos de pronóstico de la enfermedad que se utilizan ampliamente. Estos modelos incorporan factores como la temperatura, la humedad, las precipitaciones, la producción de inóculo, y el estadio de desarrollo de la planta como componentes de predicción de la severidad de la FET. Estos modelos derivan de modelos de regresión empírica basados en observaciones a campo a largo plazo (Moschini y Fortugno, 1996; Lu *et al.*, 2001). En la Argentina, mediante el desarrollo de modelos predictivos de la enfermedad, se encontró que una de las variables climáticas más importantes que influye en el inicio la patología fue la duración medida en horas de humedad relativa > 90% en coincidencia con temperaturas entre 15-30°C (Moschini y Fortugno, 1996; Moschini *et al.*, 2001).

Estas condiciones favorecerían la germinación de las ascosporas. Investigadores chinos demostraron que la misma está afectada por el ambiente, logrando un porcentaje de germinación tan alto como 97,5% luego de 8 horas a 25°C y 100% de humedad relativa (Lu *et al.*, 2001).

En general estos modelos incluyen los efectos de las variables climáticas sobre 2 aspectos epidemiológicos (Xu, 2003):

- La producción de esporas: la presencia de lluvias alrededor de 8-10 días antes y durante la antesis favorece tanto la producción de conidios como de ascosporas.

- La dispersión de esporas y la infección: las lluvias son necesarias para dispersar las esporas y, como consecuencia, los subsiguientes periodos húmedos conducen a la infección de las espigas.

3.1.3. Producción y dispersión de inóculo

Los propágulos que pueden constituir el inóculo de la FET son principalmente ascosporas y macroconidios, aunque bajo condiciones experimentales también se incluye a las clamidosporas y a fragmentos de hifas. La deposición de las esporas sobre o dentro de la espiga inicia el proceso de infección. El inóculo para la FET requiere la dispersión aérea para alcanzar el sitio de infección, por ello las ascosporas y macroconidios, son el tipo de inóculo más importante en el desarrollo de epidemias (Sutton, 1982).

Entre las especies causantes de la FET, *F. graminearum* tiene la ventaja epidemiológica de formar peritecios, que resultan en la producción de ascosporas (Xu, 2003). Existen 2 estados del patógeno: el estado sexual *G. zeae*, y el estado asexual *F. graminearum*. Los macroconidios son producidos por reproducción asexual en esporodoquios sobre espigas y rastrojos infectados (Booth, 1971). Los cuerpos

fructíferos sexuales, o peritecios (producen ascosporas por reproducción sexual), se forman sobre la superficie de los rastrojos y requieren niveles de lluvias diarias mayores a 5 mm para desarrollarse. Las ascosporas son vigorosamente descargadas desde los peritecios y dispersadas por el viento entre los 3 a 5 días posteriores a un evento de lluvia (Parry *et al.*, 1995; Paulitz, 1996; Inch y Gilbert, 2003).

Los rastrojos de cultivos previos son el principal reservorio de *F. graminearum*. El patógeno sobrevive en tallos y espigas de maíz, sobre residuos de trigo, cebada, otros cereales y soja (Reis, 1988a; Bai y Shaner, 1994; Goswani y Kistler, 2004; Pioli *et al.*, 2000; 2004). Principalmente permanece en tejidos que resisten el quiebre/ruptura, por lo que su supervivencia es mayor en los nudos que en los entrenudos de los tallos del trigo (Sutton, 1982). En consecuencia, el inóculo primario para esta enfermedad proviene principalmente de rastrojos de cultivos colonizados sobre los cuales el hongo sobrevive como micelio saprofítico.

El inóculo es producido bajo condiciones húmedas y cálidas. La temperatura requerida para la formación de peritecios y ascosporas es similar a la de la formación de macroconidios. Las ascosporas son producidas con temperaturas de entre 13 y 33°C, con un óptimo a los 29°C. Por otro parte, los macroconidios requieren temperaturas comprendidas entre 16 a 36°C, siendo 32°C la óptima, acorde a estudios realizados con aislamientos de *F. graminearum* por Andersen (1948).

Los macroconidios son generados en cortas fiálides y en esporodoquios sobre los rastrojos (Paulitz, 1996) y, debido a su naturaleza hidrofílica, las gotas de lluvia impulsadas por el viento serían su mecanismo de dispersión principal (Sutton, 1982).

Observaciones a campo han revelado que las ascosporas son dispersadas principalmente a la noche entre las 21:00 y 06:00 hs y que el viento sería el mecanismo primario de transporte (Sutton, 1982; Paulitz, 1996). En base a lo mencionado, los

macroconidios y ascosporas estarían implicadas en la dispersión a corta y larga distancia, respectivamente (Reis, 1989).

Estudios bajo condiciones controladas y de campo, confirmaron que las temperaturas frías a moderadas (alrededor de 15 a 25°C) favorecen la descarga de ascosporas (Gilbert y Fernando, 2004). Cuando las temperaturas son inferiores, el desarrollo de los peritecios se detiene pero se reactiva cuando las temperaturas aumentan nuevamente (Tschanz *et al.*, 1975, 1976; Gilbert y Fernando, 2004). Hay trabajos que sugieren que ciclos alternativos de incremento y disminución de la humedad relativa durante el día, estimulan la liberación de las esporas sexuales (Paulitz, 1996; Trail *et al.*, 2005). No hay evidencias de la producción de esporas sobre los residuos que han sido enterrados (Khongla y Sutton, 1988; Inch y Gilbert, 2003).

Numerosas prácticas han sido sugeridas para controlar la FET y reducir la cantidad de inóculo. Algunas de ellas incluyen la rotación de cultivos con plantas no hospedantes, el uso de fungicidas, el biocontrol y el empleo de cultivares resistentes (Jenkinson y Parry, 1994; Palazzini *et al.*, 2007; Blandino *et al.*, 2012).

3.1.4. Fuente de inóculo principal: Residuos de cultivos

La práctica de labranza convencional se desarrolló con la creación de una herramienta de arado en 1784 por parte de Thomas Jefferson (Lal *et al.*, 2007). No obstante, este sistema no comenzó a expandirse hasta después de la segunda Guerra Mundial. La labranza convencional es un tipo de preparación del suelo en donde los primeros 15-25 cm de la capa superior de tierra se invierten, exponiendo suelo nuevo y enterrando la superficie de suelo anterior (Sturtz *et al.*, 1997; Lal *et al.*, 2007). A partir de 1980, las prácticas de labranza reducida y conservacionistas desplazaron a las de laboreo convencional de los campos, debido a que su uso afectaba la integridad del

suelo. Estos nuevos sistemas de labranza tienen por objetivo disminuir la erosión del suelo, creando un ambiente favorable para el crecimiento vegetal, incrementando la cantidad de agua que se infiltra en el suelo, y aumentando la retención de materia orgánica y la conservación de nutrientes en el suelo (Singh *et al.*, 2005). El sistema de siembra directa o labranza cero, que consiste en la remoción del suelo exclusivamente en la línea de siembra, constituye el máximo exponente de la labranza reducida. A pesar de las ventajas mencionadas, la utilización de los sistemas de labranza cero aporta grandes cantidades de residuos de cultivos que se mantienen sobre la superficie de los campos y en consecuencia proveen una fuente de inóculo para algunas patologías provocadas por hongos necrotróficos, tales como la FET y *F. graminearum* (Sutton, 1982). Con respecto a esto, Reis (1988b) demostró que el 98% de los propágulos de *G. zeae* presentes en el aire correspondía a ascosporas y que estas esporas eran provistas por los rastrojos de cultivos dejados sobre la superficie del suelo.

En el Cono Sur, el área sembrada bajo labranza cero se ha incrementado considerablemente durante las últimas 2 décadas y actualmente en la Argentina más de 27 millones de hectáreas son sembradas bajo esta práctica de cultivo, representando el 78,5% del total de la superficie de tierra cultivable en el país (Figura 17), (AAPRESID, 2012).

Bajo siembra directa, la tasa de descomposición de los residuos de cultivo es baja, debido a que el acceso de los microorganismos a los mismos es limitado. Cuando los residuos son enterrados (labranza convencional) su tasa de descomposición es mayor lo que, sumado a la ausencia de producción de esporas en el suelo, contribuye a disminuir la carga de inóculo (Dill-Mackay y Jones, 2000; Pereyra *et al.*, 2004).

Los residuos de cultivos están compuestos por tallos (nudos y entrenudos), hojas, partes florales y granos que se perdieron en la cosecha. Los nudos y entrenudos

constituyen el 40-80% del rastrojo total del cultivo de trigo. Las diferencias estructurales y en la composición bioquímica de los diferentes componentes de los residuos podrían contribuir a la colonización fúngica diferencial (Pereyra y Lori, 2013).

Las paredes de los tallos de trigo están formadas por epidermis, tejidos esclerentimático y parenquimático, y los componentes químicos principales, son la celulosa y la hemicelulosa, que contribuyen el 75-80% del peso seco (Harper y Lynch, 1985).

Un amplio rango de microorganismos tienen la capacidad de colonizar y degradar los residuos de cultivos, sin embargo, los hongos suelen ser predominantes.

En epidemias monocíclicas, la enfermedad es directamente proporcional a la cantidad de inóculo primario (Zadoks y Schein, 1979). La FET es una enfermedad monocíclica, es decir, que el patógeno concluye solo un ciclo de enfermedad (o incluso parte de él) en un ciclo de cultivo (Agrios, 2005). El inóculo de *F. graminearum* en rastrojos y otros reservorios es un factor clave para el manejo de la enfermedad, pero hay pocos datos cuantitativos sobre el inóculo y/o los efectos de las prácticas de manejo sobre la cantidad de inóculo habitualmente presente en los restos culturales.

La dispersión del inóculo desde la fuente hacia las espigas del trigo es un evento crítico en el ciclo infectivo de la FET. Numerosos estudios examinaron el efecto de las prácticas de labranza en el desarrollo de esta enfermedad. Se ha propuesto que el uso de prácticas culturales que dejan residuos de cultivos infectados sobre la superficie del suelo, incrementaría la incidencia de la FET (Sutton, 1982; Miller *et al.*, 1998). Sin embargo, ensayos independientes realizados en Uruguay y Argentina que estudiaron la influencia de distintos sistemas de laboreo sobre la fusariosis determinaron que frente a la ocurrencia de condiciones climáticas favorables, la influencia del sistema de labranza

utilizado en el desarrollo de la enfermedad es mínima (Pereyra y Dill-Macky, 2008; Lori *et al.*, 2009).

Una de las prácticas tendientes a controlar la enfermedad y atenuar los efectos producidos por los rastrojos, es la rotación con cultivos no hospedantes. El riesgo de infección de FET y contaminación de los granos con DON generalmente es mayor para cultivos de trigo que son sembrados sobre residuos de cultivos previos que se comportan como hospedantes de *F. graminearum* (Edwards, 2004). Además, la severidad de esta enfermedad es más alta si los cultivos precedentes son maíz o sorgo (Champeil *et al.*, 2004). Otras evidencias sugieren que secuencias trigo-trigo involucran un riesgo superior que trigo-no-cereal. Sin embargo, numerosos cultivos no-cereales son hospedantes de *F. graminearum*, como la soja, la papa y la remolacha azucarera, y se ha demostrado que la sucesión de cultivos de maíz-soja-trigo/soja, no inhibe el ciclo del hongo (Dill-Macky y Jones, 2000; Pioli *et al.*, 2004). Díaz de Ackermann y Pereyra (2011) indican que el periodo de rotación con cultivos no susceptibles debería ser de al menos 2 años para mitigar el riesgo de infección. La diversificación de la siembra con cultivares con diferentes fechas de espigazón también puede favorecer la posibilidad de escape a la infección, que es de índole netamente floral y altamente dependiente del clima (de Galich, 2004).

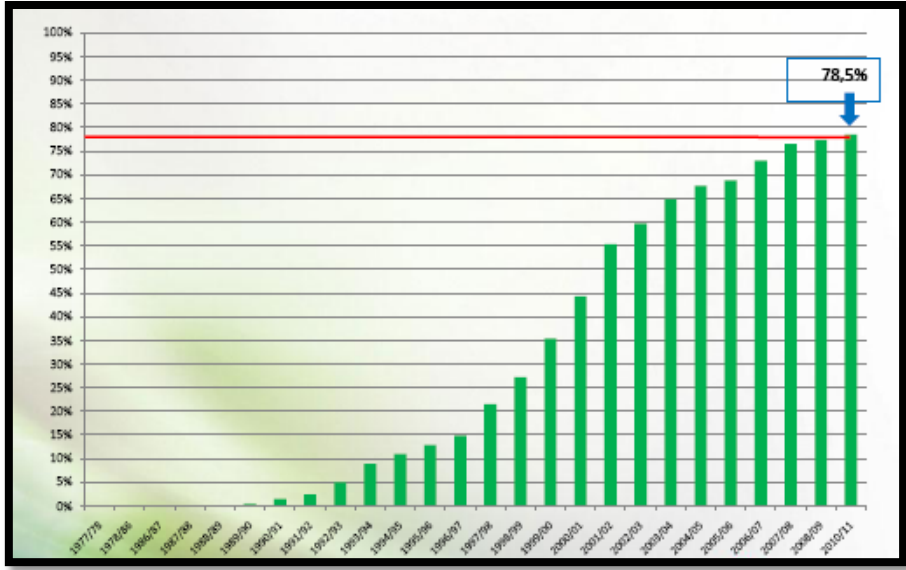


Figura 17: Evolución de la superficie sembrada bajo siembra directa en la Argentina (AAPRESID, 2012).

La aplicación de metodologías de cuantificación y estudio de la dinámica de *F. graminearum* en rastrojos podría disminuir las fuentes de inóculo del patógeno. Tradicionalmente, la cuantificación de *Fusarium* spp. sobre trigo incluye la valoración de la severidad de la enfermedad o incidencia y recuento de las esporas del hongo. Estos métodos si bien son útiles, consumen mucho tiempo, requieren de experiencia y suelen ser laboriosos (Burlakoti *et al.*, 2007). Existe una reducida cantidad de trabajos sobre la supervivencia de *G. zae* durante largos lapsos de tiempo en asociación con residuos de cultivos. Pereyra *et al.* (2004) estudiaron mediante metodología convencional, la colonización de especies de *Fusarium* sobre rastrojos de trigo bajo 4 condiciones de laboreo. Los autores indicaron que los residuos del trigo actúan como una fuente de inóculo del patógeno por largos periodos de tiempo. Por otro lado, mediante la aplicación de PCR en tiempo real Köhl *et al.* (2007) y Hogg *et al.* (2010) en Holanda y EE.UU, respectivamente, estudiaron la supervivencia de poblaciones de *Fusarium* spp. en residuos de trigo, obteniendo datos precisos de la cantidad de inóculo presente luego de la cosecha del cultivo.

3.1.5. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (*Real-time PCR*)

La PCR en tiempo real, desarrollada por Higuchi *et al.* (1992; 1993), es una variante de la PCR original en la que el proceso de amplificación se puede monitorear en el momento en el cual transcurre la reacción mediante fluorescencia. Esta técnica se puede utilizar para distintos propósitos, generalmente para cuantificar ácidos nucleicos y para genotipificación. La técnica consiste en el registro de la fluorescencia en cada ciclo (que es proporcional a la cantidad de ácido nucleico), a través de un programa informático.

Los dos reactivos más utilizados para la emisión/detección de fluorescencia son los fluorocromos (SYBR[®] Green I) y las sondas de hibridación (TaqMan[®]) (Nitsche *et al.*, 1999; Morrison *et al.*, 1998). SYBR[®] Green I es un agente intercalante que fluoresce cuando se une a una doble cadena de ADN sin especificidad, mientras que las sondas TaqMan[®] fluorescen solo cuando el fluorocromo es liberado por actividad de la polimerasa, es decir que se unen de forma específica a una secuencia de ADN blanco (Hogg *et al.*, 2007).

Para cada muestra el *software* calcula el número de ciclo en el cual se detecta un incremento significativo de fluorescencia (ciclo umbral o *threshold*, *Ct*). Como resultado de la reacción de amplificación mediante PCR en tiempo real, se obtienen curvas que grafican el incremento del número de copias del fragmento de ADN amplificado. La información que se obtiene de las curvas de amplificación se utiliza para cuantificar la cantidad inicial de moléculas de ADN o ARNm con alta precisión dentro de un rango de concentraciones. Se utilizan controles en un rango determinado de concentraciones conocidas del ácido nucleico blanco para la confección de una curva patrón. Junto al logaritmo de las concentraciones conocidas de ADN y sus *Ct* correspondientes se obtiene una curva patrón. Con la gráfica de la misma se interpolan

los valores de *Ct* de cada muestra y se determina la concentración de ácido nucleico inicial en cada una de ellas (Filion *et al.*, 2003).

Para algunas de las especies del género *Fusarium*, tales como *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* y *F. poae*, los métodos de PCR en tiempo real han probado su utilidad para la identificación y/o para establecer la correlación que existe entre la cantidad de ADN de una única especie o grupos de especies de *Fusarium* y la acumulación de las micotoxinas producidas (Sarlin *et al.*, 2006; Burlakoti *et al.*, 2007; Fredlund *et al.*, 2008; Nicolaisen *et al.*, 2009). Otros autores demostraron el uso de esta técnica en estudios epidemiológicos con respecto al género *Fusarium* en Holanda (Köhl *et al.*, 2007), Alemania (Brandfass y Karlovsky, 2006) y EE.UU. (Hogg *et al.*, 2010) en los cuales, se estudio la dinámica de poblaciones de *Fusarium* spp. sobre plantas y residuos de trigo. En la Argentina, recientemente, se aplicó PCR en tiempo real para llevar a cabo un estudio de biocontrol para la FET (Palazzini *et al.*, 2013).

El estudio de la dinámica del inóculo de la FET en rastrojos podría ayudar al desarrollo de medidas de manejo sustentables y efectivas para esta y otras patologías.

Objetivos

- Cuantificar y analizar la dinámica de *Fusarium graminearum* en distintos residuos de cultivos de invierno y de verano en el campo, aplicando una técnica convencional y una molecular (*Real-time* PCR).
- Evaluar la viabilidad del inóculo en los distintos muestreos de rastrojos.
- Estudiar la tasa de descomposición de los distintos residuos que operan como fuente de inóculo en el campo.

- Relacionar la cantidad de inóculo de *Fusarium graminearum* en los distintos rastrojos y la descomposición de los mismos.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Muestras de rastrojos

Se evaluaron muestras de cinco parcelas de rastrojos de distintos cultivos que presentaban infección natural de la campaña 2009 implantados en el Campo Experimental de Los Hornos, Buenos Aires, Argentina (34° 52' S y 57° 58' O). Sobre los rastrojos de trigo pan (*Triticum aestivum* L.), trigo candeal (*T. durum* Desf.), cebada (*Hordeum vulgare* L.), centeno [*Secale cereale* (L.) M.Bieb.] y tritordeum (x *Tritordeum* Ascherson et Graebner), en siembra directa y como cultivo de segunda, se efectuó la siembra de soja (*Glycine max* L.) para determinar el grado de colonización y el potencial de inóculo en la rotación con este cultivo estival (Figura 18).

De las muestras de los residuos pertenecientes a cereales fueron seleccionados para su análisis los nudos de los tallos por ser la estructura más resistente a la degradación. La dinámica del patógeno en los rastrojos de las distintas parcelas se evaluó por 2 metodologías (secciones 3.2.2 y 3.2.4 de este capítulo). El muestreo se realizó al azar a lo largo de cada parcela de cultivo durante 2010/2011. Los rastrojos naturalmente infectados de cultivos invernales (trigo pan, trigo candeal, cebada, centeno, tritordeum) y el cultivo estival (soja) fueron monitoreados a lo largo de los 18 y 14 meses posteriores a la cosecha respectivamente. La dinámica de supervivencia del patógeno sobre los residuos de soja solo se evaluó por PCR en tiempo real (sección 3.2.4).

Las variables meteorológicas correspondientes a Temperatura (°C) y Precipitaciones (mm) de las 4 estaciones del año de 2010 y, de Verano y Otoño de 2011 fueron registradas de acuerdo a los datos mencionados en www.tutiempo.net (Copyright © Tutiempo Network, S.L.), ya que valores de 25°C y elevado porcentaje de humedad influyen tanto en la producción de peritecios de *G. zae*, como en la tasa de descomposición de los rastrojos y en el incremento de la actividad microbiana presente en los mismos.



Figura 18: a) Cultivos de cereales invernales naturalmente infectados y, b) Cultivo de soja de segunda implantado mediante siembra directa sobre los rastrojos de los cultivos invernales.

3.2.2. Supervivencia-viabilidad de *Fusarium graminearum* / *Gibberella zae*

Se determinó la presencia, supervivencia y viabilidad de *G. zae* en una cantidad conocida de rastrojos mediante técnicas convencionales. Se eliminó manualmente el excedente de suelo de la muestra y se dejó secar en oscuridad y a temperatura ambiente

por 48 horas. Se cortaron trozos de aproximadamente 2 cm (conteniendo un nudo y las porciones adyacentes de los entrenudos, en el caso de los cereales) y se efectuó la siembra de las piezas de rastrojos en placas con medio APG con PCNB al 75% (0,6 g/L). Se incubó a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 5 días y se evaluó la presencia y viabilidad de *F. graminearum* mediante observación directa en placa de acuerdo a su morfología cultural y su ontogenia conídica (Booth, 1971).

Para estudiar la dinámica de la supervivencia del patógeno en rastrojos, 0,5 g de cada muestra se sumergieron en una solución de 10 mL de agua destilada estéril con el agregado de Cloranfenicol (250 mg/L) y 3 gotas de Tween 80. Las muestras fueron incubadas en la solución durante 12 horas a temperatura ambiente y posteriormente se dejaron en agitación por 10 minutos (Pereyra y Dill-Macky, 2008). Se evaluó la cantidad de unidades formadoras de colonias de *F. graminearum* / *G. zeae* a partir de dos alícuotas, de 0,5 y 1 μL , de cada solución obtenida de las muestras. Las mismas se sembraron en placas con medio de cultivo APG y se incubaron a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 hs. Se realizaron 2 replicados de cada muestra y 2 duplicados de cada alícuota sembrada.

3.2.3. Extracción de ADN a partir de rastrojos

Fueron evaluados cinco protocolos de extracción, incluyendo los descritos por Doohan *et al.* (1998), Syamkumar *et al.* (2005) y Bharmauria *et al.* (2010), el Kit de Purificación de ADN genómico Wizard® Genomic (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.) y una versión modificada del protocolo Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), validado por la unidad de biotecnología y organismos genéticamente modificados de la Comisión Europea para la cuantificación de la línea NK603 de maíz

(disponible en <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/NK603-WEB-ProtocolValidation.pdf>).

Las muestras de rastrojos se secaron y se molieron hasta obtener un polvo fino y homogéneo, y se usaron 200 mg como material de partida en cada una de las metodologías. En el caso de las gramíneas, la muestra estaba conformada por porciones conteniendo nudos de los tallos y para la soja se utilizaron porciones de tallos, vainas y hojas.

El protocolo de extracción basado en CTAB fue modificado de la siguiente manera: se agregaron 1,5 mL de buffer de lisis (20 g/L CTAB, 1,4 M NaCl, 0,1 M tris-HCl, 30 mM Na₂EDTA, pH 8,0) a la muestra molida, mezclando vigorosamente con vórtex. Después de 60 min de incubación a 65°C, fueron añadidos 10 µL de RNasa (10 mg/mL, Sigma) y se incubó a 37°C por 30 min. Las muestras fueron centrifugadas a 13.000 g durante 10 min y el sobrenadante fue transferido a un tubo limpio conteniendo 500 µL de cloroformo, se mezcló usando vórtex y se centrifugó a 12.000 g por 15 min. Este procedimiento fue repetido una vez, pero el tiempo de centrifugación se disminuyó a 5 min. La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo conteniendo 2 volúmenes de solución de precipitación CTAB (5 g/L CTAB, 0,04 M NaCl, pH 8,0) y se incubó a temperatura ambiente durante 90 min. Las muestras fueron centrifugadas a 16.000 g durante 5 min, el pellet fue disuelto en 350 µL NaCl (1,2 M), se agregaron 350 µL cloroformo, se mezcló con vórtex durante 40 s y se centrifugó a 12.000 g durante 10 min. El sobrenadante fue precipitado en 0,6 volúmenes de isopropanol a -20°C *overnight*. Los tubos fueron centrifugados 10 min a 12.000 g, el pellet fue lavado con 400 µL de etanol 70%, secado y resuspendido en 30 µL de buffer TE a 37°C durante 30 min.

La calidad y cantidad del ADN obtenido con los distintos protocolos fue evaluada mediante la siembra en un gel de agarosa al 0,7% teñido con Bromuro de etidio (0,2 mg/mL) junto con el marcador de peso molecular Lambda Hind III (Fermentas, EE.UU.). El rendimiento de ADN fue estimado por comparación entre la intensidad de las bandas generadas por las muestras y las del marcador utilizado.

3.2.4. PCR en tiempo real

La cuantificación por PCR en tiempo real se hizo sobre 4 tiempos de muestreo para los residuos de cereales (6, 9, 11 y 18 meses postcosecha) y sobre 3 tiempos de muestreo para los de soja (4, 8 y 14 meses postcosecha).

Las reacciones de cuantificación de *F. graminearum* por PCR se llevaron a cabo usando el par de *primers* especie-específicos Fg16N (Nicholson *et al.*, 1998). Las reacciones de amplificación se realizaron en 25 µL conteniendo 15 ng de ADN, 12,5 µL Maxima[®] SYBR-Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas, EE.UU.) y 0,6 µM de cada *primer*. Las amplificaciones se efectuaron en un SmartCycler[™] Thermal Cycler (Cepheid, EE.UU.) cuyo programa consistió en un ciclo de desnaturalización inicial de 3 min a 95°C; seguido por 40 ciclos de 30 s a 95°C, 20 s a 62°C y 45 s a 72°C; y un ciclo de extensión final de 5 min a 72°C. Se construyó una curva estándar con diluciones de una cantidad conocida de ADN de *F. graminearum* (100 ng a 10 pg), graficando el valor *Ct* obtenido versus el logaritmo de la concentración de cada dilución. De cada muestra se hicieron análisis por duplicado. Además se añadieron 2 controles negativos en cada ensayo, uno conteniendo ADN del cultivo de trigo sin infección y otro sin ADN (Agua).

Se analizaron los resultados a través de la curva de *melting* del fragmento amplificado. La misma se confeccionó graficando la derivada negativa de Fluorescencia

con respecto a la temperatura ($-dF/dT$) versus la Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), a través del *software* SmartCycler.

3.2.5. Descomposición de rastros

Solo se realizó el ensayo de descomposición de residuos para las muestras de cereales. La determinación de la descomposición de los residuos se realizó con mediciones de peso seco. Para ello, los residuos fueron lavados superficialmente con agua corriente para eliminar el suelo adherido, y secados en estufa hasta peso constante. Las muestras de los distintos residuos fueron pesadas y se expresó la disminución de la materia seca con respecto al peso inicial de la muestra. Se hicieron 2 replicados de cada muestra de rastrojo.

3.2.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el *software* InfoStat versión 2008.

Los datos de cuantificación de *F. graminearum* / *G. zeae* en placa y PCR en tiempo real se estudiaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA). Las medias fueron comparadas usando el test de Tukey ($p \leq 0,05$).

3.3. RESULTADOS

Datos meteorológicos

Las temperaturas medias en el año 2010 durante los meses de verano (Enero, Febrero, Marzo), otoño (Abril, Mayo, Junio), invierno (Julio, Agosto, Septiembre) y primavera (Octubre, Noviembre, Diciembre) fueron 24,1; 15,5; 12,5; y 20,4 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. En el 2011, las temperaturas medias durante verano y otoño fueron 23,5 y 15,3 $^{\circ}\text{C}$.

El total de lluvias acumulado durante 2010 fue de 1173,5 mm, con lluvias de 515,4 mm (30 eventos de lluvia) en verano, 231,7 mm (20 eventos de lluvia) en otoño, 213 mm (29 eventos de lluvia) en invierno y 213,5 mm (19 eventos de lluvia) en primavera. En la primera mitad del año 2011 el total de lluvia fue 603,4 mm, con lluvias de 239,2 mm (22 eventos de lluvia) en verano y 354,2 mm (24 eventos de lluvia) en otoño (Figura 19).

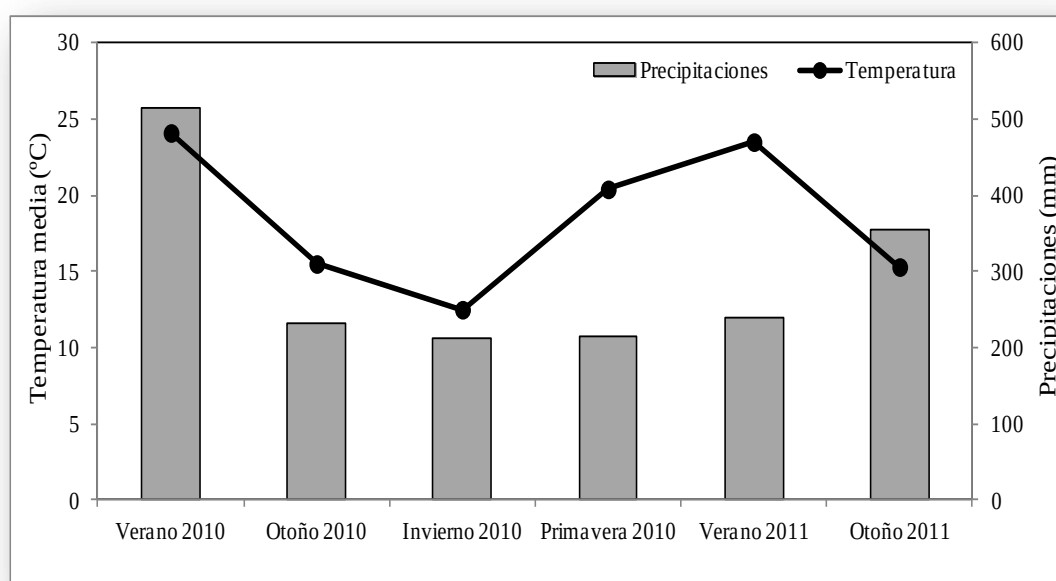


Figura 19: Datos meteorológicos de las variables Temperatura y Precipitaciones promedio del periodo de tiempo en que se realizaron los ensayos (correspondientes a las 4 estaciones del año 2010, y al Verano y Otoño de 2011).

3.3.1. Descomposición de residuos

Se observó una reducción evidente de peso seco de los residuos (aproximadamente 50%) a lo largo de los meses en que las muestras fueron recolectadas (Figura 20). Los porcentajes de pérdida de peso fueron comparados para los distintos cultivos pero no se encontraron diferencias significativas entre los perfiles de descomposición correspondientes a los 5 cultivos.

En el último evento de muestreo se pudo observar la fragilidad de los tejidos de los rastrojos.

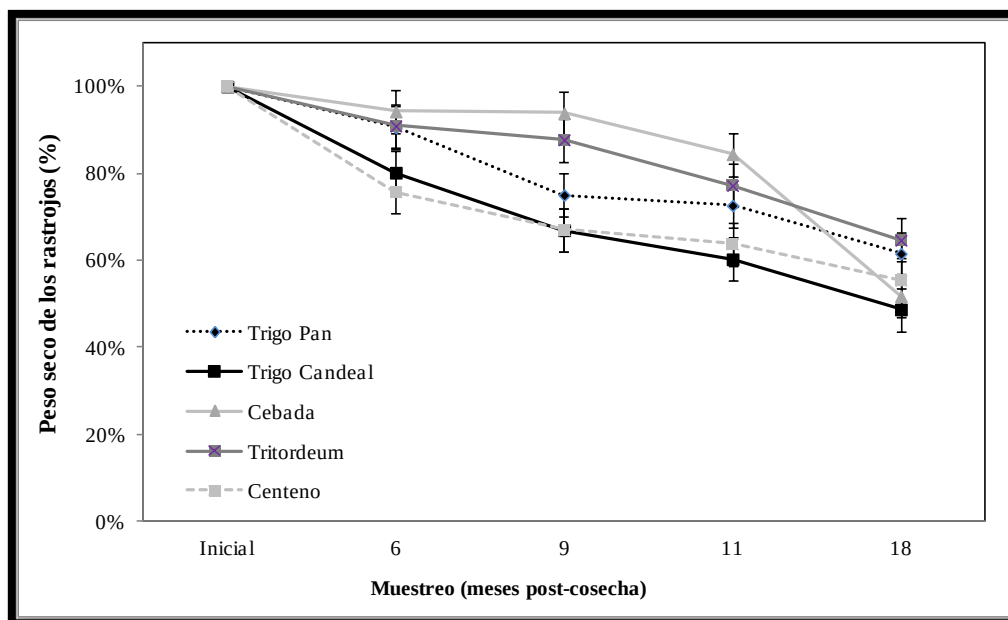


Figura 20: Disminución de peso seco de los distintos rastrojos de cultivos gramíneos analizados en los 5 periodos de muestreo.

3.3.2. Supervivencia-viabilidad de *Fusarium graminearum* / *Gibberella zeae* sobre los residuos de cultivos

El patógeno estuvo presente en todas las muestras de residuos recolectadas y tiempos de muestreo realizados (14 y 18 meses postcosecha de los cultivos estival e invernales). A partir de la siembra de los rastrojos en placas con medio de cultivo, se observó que el inóculo de *G. zeae* presente en las muestras permanecía viable. Pudo observarse el desarrollo de colonias con las características culturales de *F. graminearum* (abundante micelio aéreo rosado-amarillento y pigmentación rojiza del medio de cultivo) a partir de las porciones de rastrojos sembradas (Figura 21b; c; d). Más aun, fue posible observar la presencia de las estructuras sexuales de *G. zeae* (peritecios) en los nudos de los rastrojos (Figura 21a).

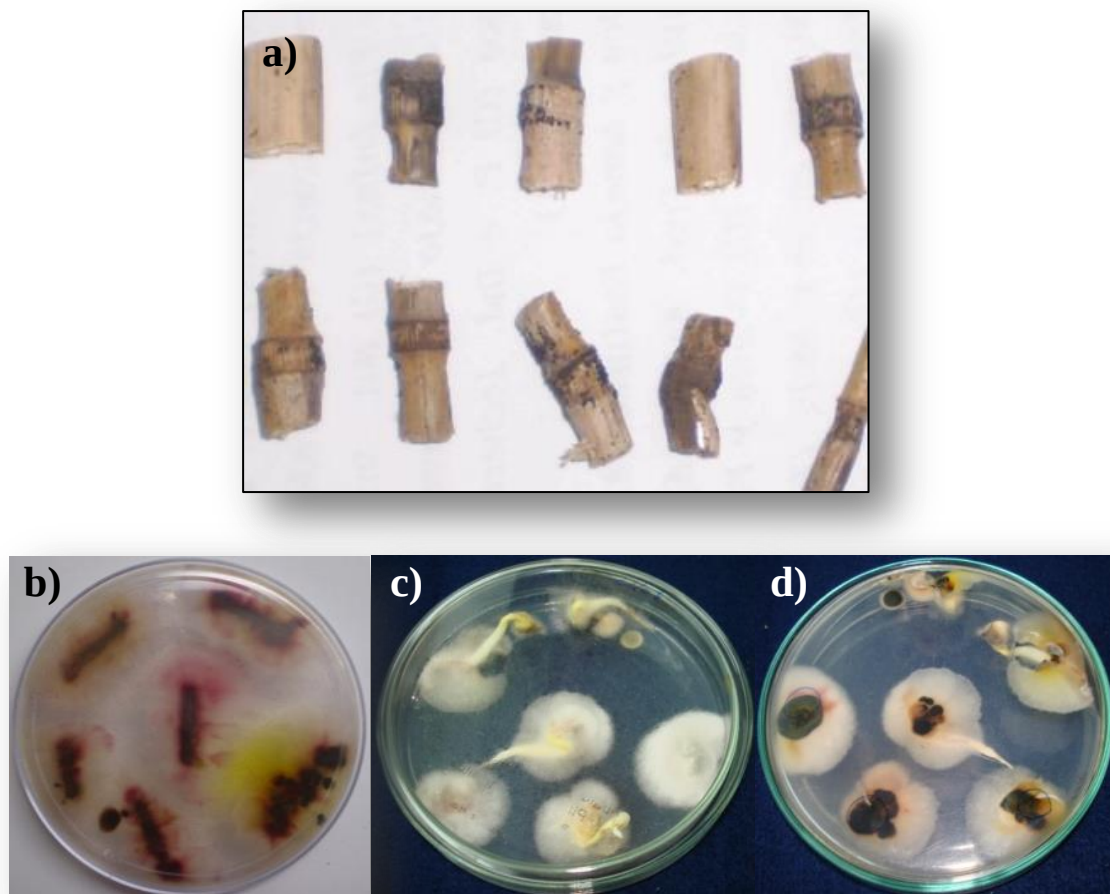


Figura 21: a) Nudos de cereales con peritecios de *Gibberella zeae*; Abajo: Aislamientos en APG (supervivencia-viabilidad) de *Fusarium graminearum*/*Gibberella zeae* a partir de las muestras de: b) rastrojos de trigo y, c) y d) rastrojos y semillas de soja recolectados en distintos periodos de muestreo.

3.3.3. Extracción de ADN

Se pudo aislar ADN desde los rastrojos con todos los métodos de extracción testeados. Sin embargo, los protocolos difirieron en su eficiencia, ya que el rendimiento de ADN obtenido varió en un rango comprendido entre 1,2 a 7,5 µg/g rastrojo (Tabla 3).

Solo se obtuvieron amplificaciones positivas del fragmento de 280 pb generado por los *primers* Fg16N mediante PCR, cuando el ADN se aisló con la metodología desarrollada por Syamkumar *et al.* (2005), el Kit comercial de extracción o el método basado en CTAB modificado. Este último aportó los mejores resultados en términos de

eficiencia, reproducibilidad y costos, aunque el mismo proporcionó un rendimiento más bajo en comparación con el obtenido a partir del Kit comercial (Tabla 3).

Tabla 3: Comparación de rendimientos de ADN y amplificación especie-específica de *Fusarium graminearum* por PCR del ADN extraído con los diferentes métodos a partir de los residuos de cultivos.

Método	Rendimiento ADN (µg/g Rastrojo)	PCR ^a
Bharmauria <i>et al.</i> (2010)	7,5	-
Doohan <i>et al.</i> (1998)	2,25	-
Syamkumar <i>et al.</i> (2005)	1,2	+
commercial kit Promega	3,75	+
Método basado en CTAB	2,25	+

^a amplificación por PCR convencional usando el par de *primers* Fg16N (Nicholson *et al.*, 1998). +: señal detectada en el gel de agarosa; -: señal no detectada.

El ADN obtenido por el método basado en CTAB fue idóneo para utilizar en la detección y cuantificación de ADN de *F. graminearum* a partir de rastrojos de cultivos ya que no aportó ningún contaminante que interfiera inhibiendo la reacción de amplificación (Figura 22). El análisis de la curva de *melting* reveló la presencia de un solo pico para *F. graminearum*, y mediante electroforesis en gel de agarosa en el que se pudo visualizar únicamente la banda de 280 pb esperada, producto de la amplificación con el par de *primers* Fg16N. No se obtuvieron productos de PCR a partir de los controles negativos.

La temperatura de *melting* para el amplicón obtenido fue de 77,8°C, y no estuvo afectada por la concentración de ADN fúngico. La altura de cada curva de *melting* fue proporcional a la cantidad de producto de PCR (Figura 22).

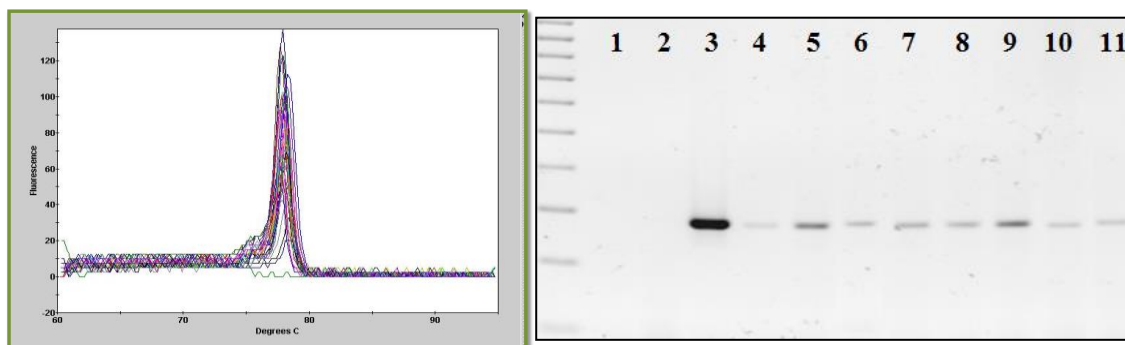


Figura 22: Curva de *melting* [derivada negativa de Fluorescencia con respecto a la temperatura ($-dF/dT$) vs. Temperatura °C] mostrando amplificación específica del fragmento Fg16N de las distintas muestras en PCR en tiempo real, y gel de agarosa 1,5% del producto específico de 280 pb. Calles: Marcador de Peso Molecular 1Kb escalonado; 1- Control negativo-Agua; 2- Control negativo-ADN extraído de planta de trigo sana; 3- Control positivo-ADN puro de *F. graminearum*; 4 a 11-Muestras de rastrojos.

3.3.4. Dinámica de *Fusarium graminearum* / *Gibberella zeae* en residuos de cultivos

Todos los residuos analizados mostraron signos de infección asociados a especies de *Fusarium*, principalmente peritecios. Si bien se identificaron otras especies del género, como *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. poae* y *F. semitectum*, *F. graminearum*/*G. zeae* se encontró en mayor frecuencia en los residuos de los 5 cultivos evaluados en todos los meses de muestreo.

La dinámica del patógeno estudiada tanto por medio de unidades formadoras de colonias (UFC) en placa, así como por el número de copias por PCR en tiempo real, mostró la disminución de *F. graminearum*/*G. zeae* en el campo a lo largo del tiempo, manifestándose una relación directa con la descomposición de los residuos.

-Metodología convencional

La cantidad de UFC fue evaluada en los rastrojos durante los 11 meses postcosecha de los cultivos, encontrándose resultados distintos para cada uno de los momentos de toma de muestras. En el muestreo del mes de Abril (4 meses postcosecha) se encontraron diferencias significativas entre los distintos cultivos hospedando a *G. zeae* ($p < 0,0001$). Los residuos de trigo candeal, trigo pan y tritordeum fueron los que

mayor nivel de colonización presentaron. Aunque *G. zae* se encontró colonizando los residuos de cebada y centeno, el patógeno fue recuperado a menores niveles en estos sustratos (Figura 23). Por el contrario, en los meses de Junio, Septiembre y Noviembre no hubo diferencias significativas en la cantidad de UFC en los distintos rastrojos.

Solo los residuos correspondientes a las especies de trigo mostraron una disminución significativa en la cantidad de inóculo hacia los meses de Junio, Septiembre y Noviembre con respecto al mes de Abril. En el resto de los rastrojos las diferencias observadas no fueron significativas en todo el periodo evaluado.

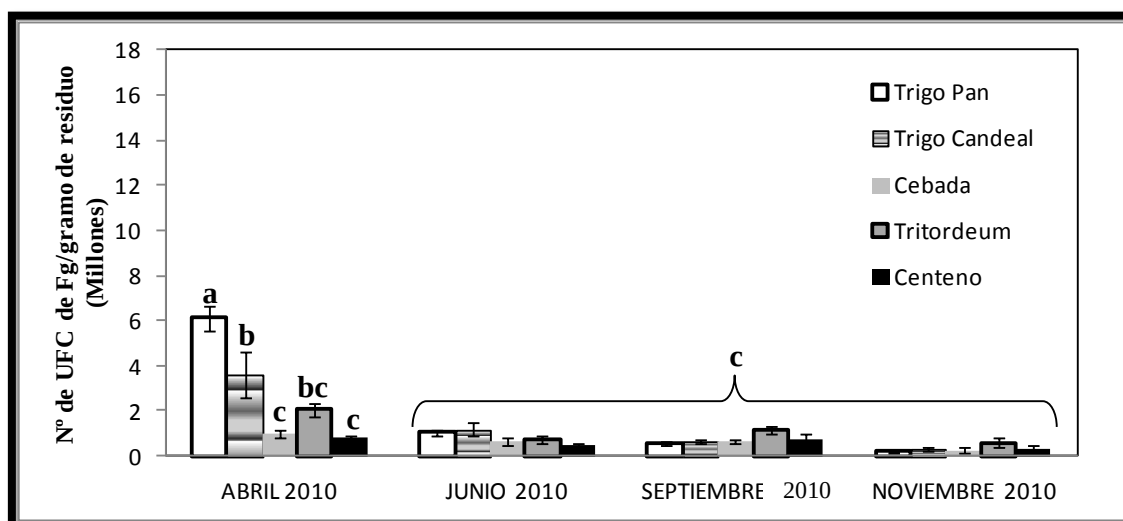


Figura 23: Dinámica de *Fusarium graminearum* / *Gibberella zae* en rastrojos de cultivos gramíneas a los 4 (Abril 2010), 6 (Junio 2010), 9 (Septiembre 2010) y 11 meses postcosecha (Noviembre 2010), analizada por cuantificación de UFC en placa. Las medias con una letra en común no son significativamente distintas ($p < 0.05$).

-PCR en tiempo real

Se pudo estudiar la dinámica mediante la puesta a punto de un protocolo de PCR en tiempo real, en la cual se optimizó la concentración de los *primers* y la temperatura de *annealing*. No se observó fluorescencia en los controles negativos conteniendo agua o ADN genómico de trigo sin infección. Para determinar los valores de *Ct* se fijó una posición umbral de 30 unidades relativas de fluorescencia para todas las muestras. Por

otra parte, las rectas de regresión lineal de cada una de las curvas patrón realizadas en un rango de ADN de 10 pg a 100 ng mostraron que la relación entre el log de la concentración de ADN del patógeno y el valor de C_t , fue lineal y altamente significativa, indicado por un coeficiente de correlación elevado ($R^2 = 0,985$; $0,991$ y $0,988$).

Los resultados obtenidos mediante PCR en tiempo real mostraron una dinámica de la colonización por *G. zeae* en los residuos de gramíneas similar a la obtenida con los resultados de UFC. Sin embargo, los valores cuantificados fueron superiores y los 4 eventos de muestreo correspondieron a 18 meses postcosecha de los cultivos.

Se obtuvo una considerable disminución del número de copias de ADN de *F. graminearum* en el tiempo, principalmente entre el primer (Junio de 2010) y segundo (Septiembre de 2010) evento de muestreo. En el mes de Junio de 2010 (6 meses postcosecha) la cantidad de copias de ADN de *F. graminearum* fue considerablemente alta en todas las muestras de rastrojos, con excepción de los residuos de cebada (Figura 24). Durante los 12 meses siguientes de muestreo no se encontraron diferencias significativas entre la cantidad de copias de genoma del patógeno y los distintos residuos. A diferencia de los resultados hallados mediante la metodología convencional, en el primer evento de muestreo, tanto los rastrojos de trigo como los de centeno y tritordeum mostraron diferencias significativas en la cantidad de *F. graminearum* con respecto a los meses de Septiembre de 2010, Noviembre de 2010 y Julio de 2011 (Figura 24).

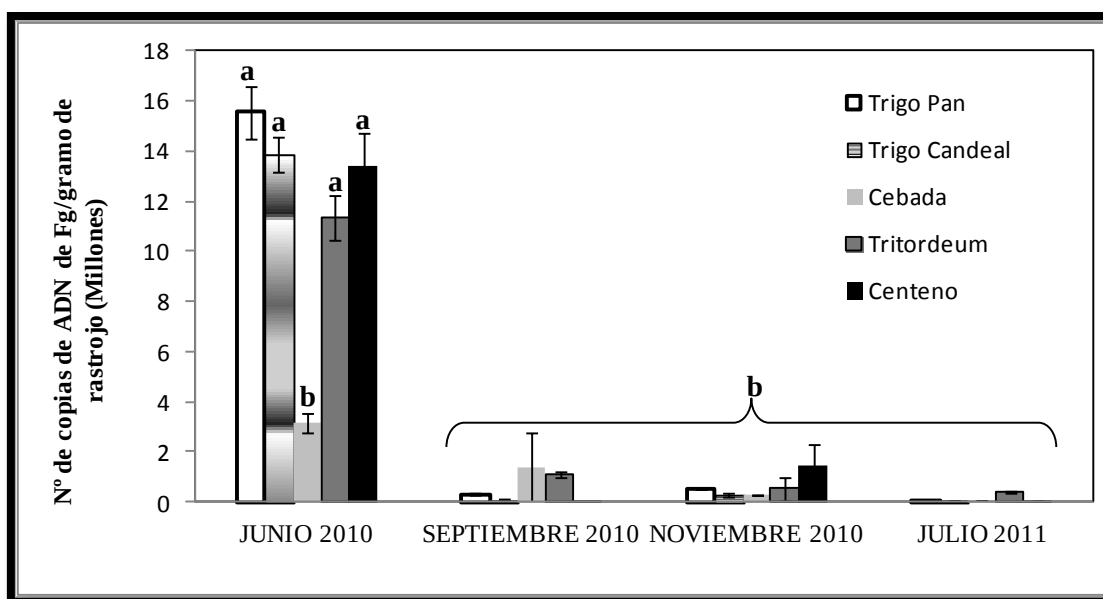


Figura 24: Dinámica de *Fusarium graminearum* / *Gibberella zeae* en rastrojos de cultivos gramíneas a los 6 (Junio 2010), 9 (Septiembre 2010), 11 (Noviembre 2010) y 18 meses postcosecha (Julio 2011), analizada por PCR cuantitativa con el par de *primers* Fg16N. Las medias con una letra en común no son significativamente distintas ($p < 0.05$).

En el estudio de la dinámica sobre rastrojos de soja, la cantidad de copias de ADN de *F. graminearum* / *G. zeae* sobre los residuos fue disminuyendo con el transcurso del tiempo, al igual que la tendencia que se obtuvo con las gramíneas (Figura 25).

Se estudio la dinámica sobre la soja implantada sobre cultivos de trigo pan, cebada y tritordeum. Aunque se encontraron diferencias en la cantidad de copias obtenida con respecto al cultivo previo, las mismas no fueron significativas en ninguno de los eventos de muestreos realizados ($p = 0,587$; $p = 0,129$ y $p = 0,635$, respectivamente). Los rastrojos de soja dejados sobre los residuos de trigo pan y cebada redujeron significativamente la cantidad inicial de inóculo a los 8 y 14 meses postcosecha en relación a los datos conseguidos en Septiembre de 2010 (4 meses postcosecha). Contrariamente, las copias de ADN de *F. graminearum* en los residuos de soja sobre tritordeum no disminuyeron de manera estadísticamente significativa.

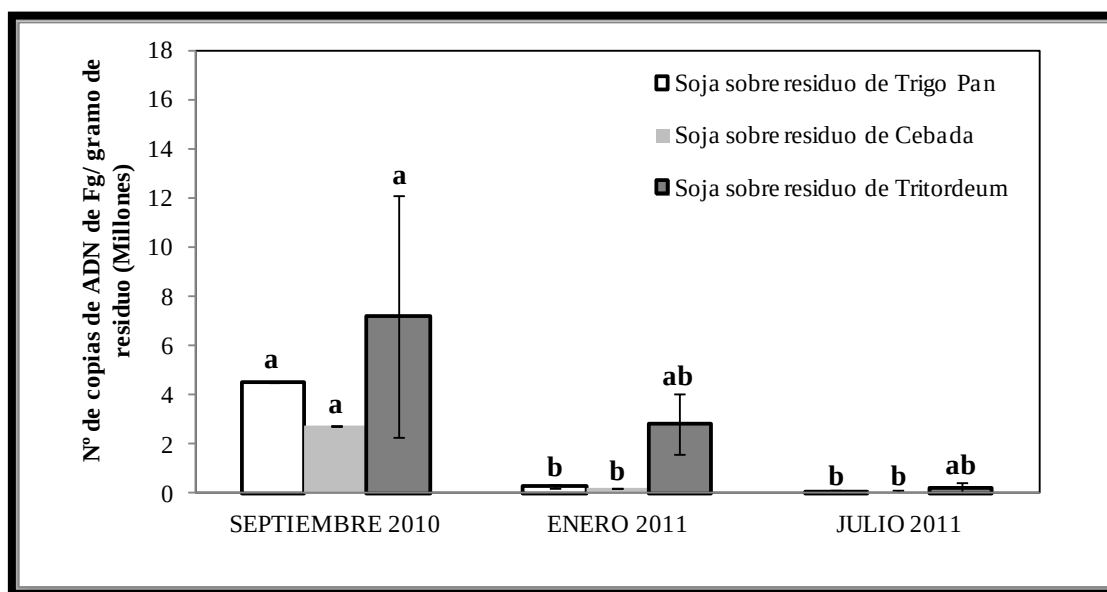


Figura 25: Dinámica de *Fusarium graminearum* / *Gibberella zeae* en rastrojos de soja a los 4 (Septiembre 2010), 8 (Enero 2011) y 14 meses postcosecha (Julio 2011), analizada por PCR cuantitativa con el par de *primers* Fg16N. Las medias con una letra en común no son significativamente distintas ($p < 0.05$).

Durante el último evento de muestreo, Julio de 2011 (18 meses postcosecha de los cultivos de cereales y 14 meses postcosecha del cultivo de soja), se pudo cuantificar a *F. graminearum* en todos los sustratos evaluados aunque a niveles inferiores a los obtenidos en el resto de los muestreos (Figura 26). Se observó que la cantidad de inóculo presente en el trigo pan, cebada y tritordeum con la cantidad de inóculo cuantificado en las muestras de soja implantadas sobre los mismos estaba parcialmente relacionada. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre el número de copias detectado del patógeno en los cultivos invernales y/o estivales.

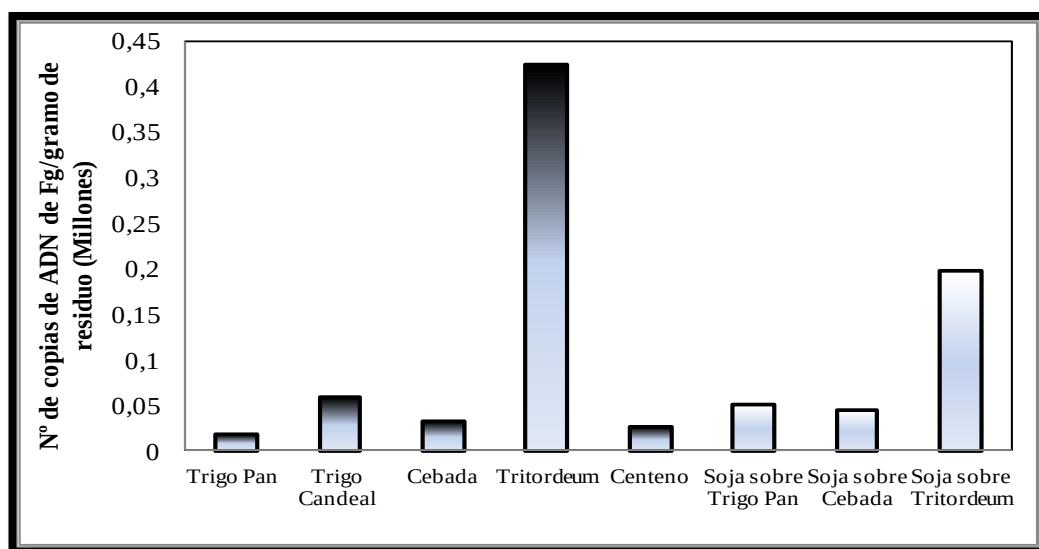


Figura 26: Cuantificación por PCR en tiempo real de *Fusarium graminearum*/gramo de rastrojo en Julio de 2011 (último momento de muestreo, 18 meses postcosecha cultivos cereales y 14 meses postcosecha cultivo de soja).

3.4. DISCUSIÓN

Las ascosporas producidas por *G. zeae* sobre los residuos de cultivos que son dejados en la superficie de los campos luego de las cosechas constituyen el inóculo principal para el desarrollo de la FET, ya que sirven como sustratos para que el hongo sobreviva en ausencia del hospedante principal (Sutton, 1982; Mc Mullen *et al.*, 1997; Pereyra y Dill-Macky, 2008). En este capítulo, con las dos metodologías utilizadas (convencional y molecular) se pudo analizar la presencia, viabilidad y cantidad de *F. graminearum*/*G. zeae* en campos sin laboreo.

Adicionalmente, distintos estudios realizados en Italia (Blandino *et al.*, 2012), Alemania (Koch *et al.*, 2006), EE.UU. (Dill-Macky y Jones, 2000), Canadá (Schaafsma *et al.*, 2001) y Argentina (Lori *et al.*, 2009) demuestran como la labranza cero genera niveles más altos de enfermedad en comparación con las prácticas agronómicas convencionales (30 cm de profundidad de labranza). La tendencia hacia las prácticas de conservación de suelos contribuyeron a las epidemias de la fusariosis más recientes en

EE.UU. (Dill-Macky y Jones, 2000). Sin embargo, cuando las condiciones ambientales son propicias para el desarrollo de la patología, la influencia de los distintos sistemas de laboreo del suelo sobre la incidencia y severidad es poco notoria (Lori *et al.*, 2009; Blandino *et al.*, 2010).

En el presente capítulo se reportan los resultados obtenidos para la cuantificación de la presencia de *F. graminearum* / *G. zeae* en rastrojos de distintos cultivos mediante metodología convencionales (siembra en placa) y moleculares (PCR en tiempo real). La aplicación de la metodología convencional permitió verificar que el inóculo presente en los distintos eventos de muestreo permanecía viable.

El uso de PCR en tiempo real con SYBR[®] Green I permitió cuantificar ADN de *F. graminearum* en muestras complejas. El protocolo de extracción de ADN modificado para llevar a cabo este estudio proporcionó ADN de alta calidad a partir de las muestras de rastrojos permitiendo cuantificar ADN fúngico en un rango de concentraciones de 4-5 órdenes de magnitud y sin contaminantes que inhiban la amplificación. Se lograron detectar con exactitud, en combinación con el método de extracción desarrollado, hasta 50 pg de ADN del patógeno por gramo de rastrojo, lo que teóricamente se traduciría a 1250 copias, dado que el genoma de *F. graminearum* es de 0,04 pg (36 Mb) (Goswami y Kistler, 2004). El uso de esta herramienta molecular fue altamente sensible y reproducible en el análisis de la dinámica del patógeno en rastrojos de distintos cultivos. Sin embargo, una de las limitaciones de esta técnica radica en que la amplificación del material genético se produce tanto en las células vivas como en las muertas (falsos positivos). Además, considerando que: i) el inóculo cuantificado está compuesto principalmente de ascosporas (Reis, 1988a); ii) la PCR se basa en la amplificación de copias ADN; iii) en cada célula hay una copia genómica, y iv) una ascospora está conformada por más de una célula (generalmente 4 células = 1 UFC), esta situación

justificaría el mayor número de inóculo obtenido molecularmente con respecto a los datos conseguidos por medio de recuento en placa.

Aunque la identificación y cuantificación realizada mediante PCR en tiempo real fue más rápida y precisa que la llevada a cabo por conteo de UFC en placa, ésta última también resultó eficaz y mostró una tendencia semejante a la obtenida molecularmente. Conjuntamente, la siembra en placa aportó información sobre la población de especies del género *Fusarium*. Al igual que en los trabajos de Köhl *et al.* (2007) y Landschoot *et al.* (2011), *F. graminearum* fue predominante en todos los muestreos de residuos, lo que es de gran importancia debido a que este es el patógeno principal de trigo en áreas con clima templado, como la Argentina (Waalwijk *et al.*, 2003; Isebaert *et al.*, 2009).

Se pudo observar que los residuos de trigo son los que mayor carga inicial de patógeno aportaron y que a lo largo de los meses la supervivencia del hongo sobre este y otros sustratos muestreados se redujo. Aunque hubo diferencias en el peso seco de los residuos y en la cantidad de patógeno, no se observaron diferencias significativas entre los 9 meses postcosecha y el último momento de muestreo. Resultados similares fueron reportados sobre residuos de trigo por Fernandez *et al.* (1993) y Pereyra y Dill-Macky, (2008) mediante metodología convencional y por Hogg *et al.* (2010) con PCR cuantitativa. Este periodo en el cual el inóculo se mantuvo relativamente constante puede deberse a que la descomposición de los residuos fue más lenta ya que la temperatura y la cantidad de lluvias durante otoño e invierno fueron menores.

En los primeros meses los residuos de trigo candeal y centeno fueron los que mostraron una tasa de descomposición más rápida que el resto de los cultivos, sin embargo durante el periodo muestreado todos los residuos tuvieron un porcentaje de reducción de peso equivalente y, si bien las diferencias no fueron significativas, los residuos de tritordeum fueron los de menor porcentaje de descomposición y los que

mayor cantidad de UFC y copias de ADN de *G. zeae* presentaron al final de los ensayos. Por el contrario, los residuos de cebada fueron los que menor inóculo exhibieron. Este resultado puede deberse a los distintos factores que influyen la descomposición y colonización inicial de los sustratos, como la composición bioquímica y estructura de los residuos, y la disponibilidad de nutrientes (Pereyra y Dill-Macky, 2008). Además, la disminución en la cantidad de inóculo se correspondería con la presencia de un mayor número de microorganismos compitiendo saprofiticamente, como así también con las condiciones climáticas acaecidas durante invierno y primavera desfavorables para el desarrollo y maduración de los peritecios, pero óptimas para la descarga de ascosporas (Sutton, 1982; Dufault *et al.*, 2006). Por otro lado como menciona Köhl, *et al.* (2007) el decrecimiento en la cantidad de copias de ADN del patógeno podría ser explicado en parte por la transformación de la biomasa micelial en estructuras de supervivencia como una consecuencia del estrés provocado por el ambiente.

En cuanto a la función de la soja como reservorio de inóculo, sus residuos aportaron menos carga inicial en comparación con las gramíneas y la cantidad de copias de *F. graminearum* fue proporcional a la cantidad de moléculas halladas en el cultivo previo (soja implantada sobre tritordeum y trigo > soja sobre cebada). Esta situación demostraría que la cantidad de inóculo presente en los residuos de un cultivo dado sobre la superficie del suelo determinaría la presencia del hongo en el rastrojo del cultivo siguiente, perpetuando así el inóculo en los campos e incrementando la probabilidad de desarrollo de una infección con la ocurrencia de condiciones climáticas predisponentes. La cantidad de copias de *G. zeae* sobre estos rastrojos disminuyó junto a la edad de los residuos. No se observó un periodo marcado de estabilidad de la carga de inóculo como en los rastrojos de gramíneas, debido a que los residuos del cultivo de soja son de menor

volumen y rápidamente descompuestos (McMullen *et al.*, 1997; Dill-Macky y Jones, 2000).

En la fase saprofítica el hongo puede permanecer viable por el tiempo que existan nutrientes disponibles (Reis, 1989). Con respecto a ésto, la presencia de rastrojos infectados no descompuestos más allá de los 18 meses postcosecha involucraría la supervivencia de *F. graminearum* / *G. zeae*.

Los resultados informados en el presente capítulo demuestran, en concordancia con trabajos previos (Reis, 1988a; Fernandez *et al.*, 1993; Pereyra y Dill-Macky, 2008), que *G. zeae* puede sobrevivir sobre una gran variedad de residuos de cultivos invernales y estivales (residuos de trigo pan, trigo candeal, cebada, tritordeum, centeno y soja) por largos periodos. Por consiguiente es evidente que las prácticas culturales causan efectos sobre el desarrollo de la FET, particularmente aquellas que mantienen a los rastrojos sobre la superficie del suelo.

Por último cabe mencionar que son necesarias más investigaciones para corroborar si la cantidad de copias detectadas de *F. graminearum* en el último momento de muestreo (Figura 26) es suficiente para provocar la infección en trigo bajo distintas condiciones ambientales. Ya que, de acuerdo a Reis (1988b) y a Xu (2003) cuando las condiciones meteorológicas son favorables para la FET solo una mínima cantidad de inóculo es suficiente para el desarrollo de una epidemia, indicando la importancia de los resultados obtenidos luego de 14 y 18 meses postcosecha de los cultivos. No obstante, las implicancias de los datos hallados serían mayores si bajo un ambiente moderado o no conducente para la patología, la cantidad de UFC de *F. graminearum*/*G. zeae* encontrada en los restos culturales es adecuada para provocar la enfermedad en el cultivo siguiente implantado sobre los mismos, produciendo mermas significativas en el rendimiento y la calidad de este cultivo.

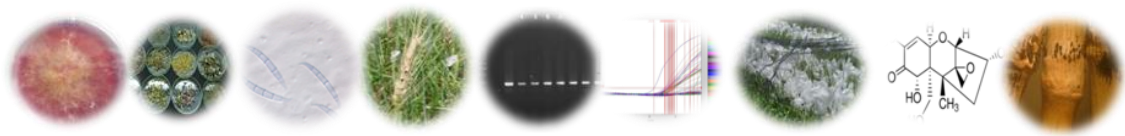
3.5. CONCLUSIÓN

Existen varios estudios en la bibliografía de cuantificación por PCR y la mayoría se basan en la cuantificación de hongos toxicogénicos en semillas o espiga o en la identificación de distintas especies dentro del género *Fusarium*. En el presente estudio la técnica se utilizó con fines epidemiológicos sobre distintos sustratos naturalmente infectados y bajo condiciones de campo.

La cuantificación del inóculo por medio de la metodología convencional y la molecular arrojó resultados similares mostrando una disminución en el tiempo que estuvo relacionada con la descomposición de los rastrojos.

La dinámica del patógeno sobre rastrojos de cereales y soja pudo ser analizada a lo largo de 18 y 14 meses respectivamente, de manera cuali y cuantitativa con una alta sensibilidad a través del desarrollo de un protocolo de extracción de ADN a partir de residuos culturales que resultó óptimo para la aplicación deseada. Por lo tanto, se fundamenta la utilización de esta técnica molecular como herramienta de diagnóstico en fitopatología.





CAPÍTULO IV

CAPACIDAD INFECTIVA Y VARIABILIDAD
GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE
Fusarium graminearum PROCEDENTES DE
DISTINTAS FUENTES DE INÓCULO

4.1. INTRODUCCIÓN

4.1.1. Variabilidad en la agresividad de *Fusarium graminearum*

La agresividad de un agente fitopatógeno es un factor importante que determina la capacidad potencial de una cepa de causar pérdidas de rendimiento a un determinado cultivo. La agresividad se define como la capacidad cuantitativa de una cepa de causar la enfermedad en una planta huésped susceptible en un patosistema específico (Van der Plank, 1968).

Los aislamientos de *F. graminearum* dentro de una población presentan variabilidad en su agresividad. Hay pocas evidencias sobre la especialización patogénica dentro de *F. graminearum*. Un alto grado de variación en la agresividad fue observado en muestreos de distintas escalas espaciales: diferentes partes del mundo (Bai y Shaner, 1996; Miedaner *et al.*, 2001; Carter *et al.*, 2002), países o regiones dentro de estos (Dusabenyagasani *et al.*, 1999; Walker *et al.*, 2001; Burlakoti *et al.*, 2007) e incluso en lotes de producción (Miedaner y Schiling, 1996; Talas *et al.*, 2012).

En Canadá, fue observado un alto nivel de variación en la agresividad entre y dentro de especies del complejo *F. graminearum*, siendo los aislamientos de *F. graminearum sensu stricto* los de mayor agresividad, seguidos por aislamientos de *F. boothii* y *F. crookwellense* (Malhiy pour y Gilbert, 2012). Sin embargo, Goswami y Kistler (2005), en EE.UU., al evaluar la variación en la agresividad de aislamientos pertenecientes a 8 especies del complejo *F. graminearum*, encontraron que la variabilidad observada fue característica de cada cepa testada e independiente de la especie considerada.

La diversidad en la agresividad de poblaciones del patógeno sobre distintos hospedantes, también ha sido estudiada y se ha sugerido que la misma varía de acuerdo

al hospedante ensayado (Langevin *et al.*, 2004). Hay evidencias que demuestran que aislamientos obtenidos de papa, remolacha y malezas gramíneas que han sido estudiados y comparados en ensayos de severidad sobre trigo difirieron en la agresividad independientemente de su fuente de origen (Jenkinson y Parry, 1994; Desjardins *et al.*, 2004; Burlakoti *et al.*, 2007).

En la Argentina, fueron encontradas diferencias en la agresividad dentro de poblaciones de *F. graminearum* procedentes de distintas regiones trigueras, tanto en ensayos realizados bajo condiciones de campo (Malbrán *et al.*, 2012) como en invernáculo con condiciones controladas (Álvarez *et al.*, 2010).

La evaluación de la agresividad de distintos aislamientos de *F. graminearum* es de fundamental importancia para desarrollar genotipos resistentes (Mesterházi, 2003). Un modelo para evaluar la resistencia a la FET fue propuesto por Schroeder y Christensen (1963), quienes sugirieron 2 tipos de resistencia; resistencia a la infección inicial (tipo I) y resistencia a la colonización dentro de la espiga (tipo II). Posteriormente, otros mecanismos de resistencia fueron propuestos pero solo la resistencia a la infección del grano (tipo III), tolerancia a la FET (tipo IV) y resistencia a la acumulación de toxinas (tipo V) fueron ampliamente aceptados (Mesterházy *et al.*, 1999; 2002).

Los 2 mecanismos de resistencia más estudiados son los tipo I y tipo II (Buerstmayr *et al.*, 2009). Para la evaluación de ambos, es necesario realizar ensayos en los cuales las espigas sean inoculadas artificialmente. El tipo II de resistencia es generalmente analizado en ensayos de invernáculo utilizando la técnica de inoculación puntual con una suspensión de macroconidios, por otro lado, la resistencia tipo I se estudia mediante técnicas que incluyen algún método de aspersión o irrigación con una solución de esporas (Hall y Van Sanford, 2003). En la bibliografía, pocos estudios han reportado diferencias en la agresividad de aislamientos de *F. graminearum* bajo

condiciones de campo con la técnica de inoculación puntual (Malbrán *et al.*, 2012). La utilidad de las 2 metodologías de inoculación fueron comparadas en Alemania (Miedaner *et al.*, 2003), Canadá (Gilbert *et al.*, 1997) y EE.UU. (Hall y Van Sanford, 2003). Si bien ambas técnicas arrojan resultados similares dentro de cada ambiente analizado (campo e invernáculo), la inoculación puntual permite el estudio de la dispersión del hongo dentro de la espiga a partir de una espiguilla infectada, y constituye el mejor estimador del efecto de la fusariosis (Schroeder y Christensen, 1963; Bai y Shaner, 1996). No obstante, esta metodología es más laboriosa y requiere de mayor tiempo para inocular las espigas (Miedaner *et al.*, 2003).

Por otro lado, teniendo en cuenta que los factores ambientales durante la floración del trigo influyen en la patogenicidad y en la acumulación de micotoxinas (Miller, 1994), el comportamiento del patógeno bajo condiciones controladas no sería el mismo que el desarrollado en la naturaleza, lo cual resulta de gran relevancia en los estudios de agresividad del hongo (Malbrán *et al.*, 2012).

De acuerdo a la gran variación patogénica encontrada con distintas poblaciones de *F. graminearum*, en los programas de mejoramiento deberían utilizarse aislamientos con diferente comportamiento para obtener cultivares de trigo con resistencia a la FET por términos de tiempo prolongados.

Existen numerosos parámetros que permiten cuantificar los niveles de enfermedad en estudios epidemiológicos y en estudios de agresividad fúngica. Hay estudios en los cuales se realizan valoraciones visuales de síntomas de necrosis o blanqueamiento del tejido de las glumas como porcentaje del número de espiguillas afectadas sobre el total de las espiguillas en la espiga o a partir de escalas de severidad (Stack y McMullen, 1995). Estas estimaciones se realizan en un momento dado o en varias fechas de evaluación para producir el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC

por sus iniciales en inglés: *Area Under the Disease Progress Curve*). También, se evalúa el peso de los granos cosechados (PMG, peso de los mil granos) como estimador de la disminución del rendimiento. Adicionalmente, estos parámetros de enfermedad pueden ser correlacionados con la cantidad de micotoxinas presentes.

Se ha propuesto que diferencias cualitativas y cuantitativas en la producción de enzimas y micotoxinas serían las posibles causas de la gran variación en la agresividad de las cepas. Wanjiru *et al.* (2002) demostraron que luego de la infección con *F. graminearum*, los componentes de las paredes celulares correspondientes a las células del trigo estaban degradadas. Con respecto a esto, Ortega *et al.* (2013) encontraron que distintos niveles de producción enzimática en aislamientos de *F. graminearum* se relacionaban con la capacidad diferencial para infectar espigas de trigo.

Hay estudios que sugieren que una gran cantidad de genes estarían involucrados en la agresividad de distintas cepas de *F. graminearum* (Miedaner *et al.*, 2000; Miedaner y Schilling, 1996). En contraste con esta información, Cumagun *et al.* (2004) encontraron solo 2 locus de rasgos cuantitativos (QTL, *quantitative trait locus*) implicados en la agresividad. Los autores también detectaron que uno de estos QTL asociados a la agresividad se encontraba cercano al gen *Tri5*, proponiendo una posible relación entre este gen y la capacidad patogénica de los diferentes aislamientos. Con respecto a dicha información, un amplio número de trabajos mencionan una alta correlación entre la producción de micotoxinas y el grado de severidad generado por distintos aislamientos (Maier *et al.*, 2006; Burlakoti *et al.*, 2007; Talas *et al.*, 2012; Malbrán *et al.*, 2014).

4.1.2. Capacidad toxicogénica, su importancia en la seguridad alimentaria y su rol en la patogénesis de la Fusariosis de la espiga

Fusarium graminearum es el principal patógeno causante de la FET en la mayoría de los países del mundo. Este puede ser altamente agresivo y producir micotoxinas.

Las micotoxinas son compuestos tóxicos que afectan la salud del hombre y los animales. Los valores de la dosis letal 50 (DL₅₀, dosis de micotoxina a la cual muere el 50% de los individuos testeados) han sido obtenidos mediante experimentos realizados en animales. Los rangos de valores de DL₅₀ estimados son 46-78, 34-59, 34-113 mg/kg de peso corporal de ratones para DON, 15-ADON y 3-ADON, respectivamente (Thompson y Wannemacher, 1986; Forsell *et al.*, 1987). En cambio para NIV los valores son de aproximadamente 39 mg/kg peso corporal de ratones (Ryu *et al.*, 1988). Esta información sugiere que a pesar de la similitud entre las estructuras químicas, el DON y el NIV difieren en sus propiedades toxicológicas, siendo NIV más toxicogénico que DON en la mayoría de los sistemas biológicos (Yoshizawa y Morooka, 1974).

Hay evidencias sobre las consecuencias generadas por el consumo de toxinas en humanos. La infección del trigo en la India en el año 1987 afectó a 50.000 personas debido al consumo de panificados elaborados con trigo contaminado con DON (Bhat *et al.*, 1989). En Asia, entre 1961 y 1985, hubo casos agudos de trastornos gastrointestinales que fueron relacionados con la ingesta de cereales conteniendo DON (Anadón *et al.*, 2005; WHO, 2001). Debido a las diferencias toxicológicas entre NIV y DON es importante determinar los quimiotipos presentes en una región geográfica dada (Desjardins y Proctor, 2007).

En 1982, la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, por sus iniciales en inglés: *Food and Drug Administration*) emitió un comunicado oficial de

recomendación de un nivel máximo de DON de 2 ppm en el trigo destinado a molienda. Luego el límite de DON en harinas y salvado para consumo humano se redujo a 1 ppm (Jones y Mirocha, 1999).

Los tricotecenos también son tóxicos para las plantas, y se cree que juegan un rol en la habilidad para causar enfermedad, en la agresividad o en ambas (Desjardins *et al.*, 1996; Proctor *et al.*, 1995). Sin embargo el papel que juegan estos compuestos en las enfermedades de las plantas no está determinado. Hay evidencias de una correlación positiva entre la agresividad y la concentración de DON producido por *F. culmorum* y *F. graminearum* (Desjardins *et al.*, 1996; Gang *et al.*, 1998; Malbrán *et al.*, 2014), pero otros resultados no mostraron correlación o fueron inconsistentes (Adams *et al.*, 1989; Liu *et al.*, 1997). En la Argentina, Álvarez *et al.* (2010) realizaron ensayos para la determinación de la relación existente entre estos parámetros. Los autores no encontraron correlación significativa entre la cantidad de tricotecenos producidos por los aislamientos y su agresividad. Por el contrario, Malbrán *et al.* (2014), en un ensayo bajo condiciones de campo, detectaron una relación positiva entre la severidad de los aislamientos y la producción de DON *in vivo*. Además, los autores demostraron que no hubo correlación entre la cantidad de DON producida *in vitro* e *in vivo*, ya que la producción de toxina bajo condiciones controladas fue superior a la producción *in vivo* de todos los aislamientos. Estos resultados sugieren que el potencial para la producción de micotoxinas bajo condiciones controladas no tiene correlación con su capacidad para producirlos en la planta (Malbrán *et al.*, 2014).

Para la detección y cuantificación química de micotoxinas existen 2 tipos de metodologías, las inmunológicas y las cromatográficas, mientras que los métodos basados en PCR de los genes *Tri* se utilizan para la determinación potencial del genotipo de tricoteceno de un aislamiento. Desjardins (2008) propuso la diferencia entre

genotipo y quimiotipo para expresar el perfil de tricotecenos de una determinada cepa. Siendo el genotipo referido a secuencias de ADN y quimiotipo refiriéndose solo a datos de análisis químicos.

Actualmente, los métodos inmunológicos son los más empleados para la determinación de micotoxinas en cereales y alimentos.

En base a lo mencionado resulta significativo identificar los quimiotipos presentes y cuantificar la producción de tricotecenos *in vivo* bajo condiciones de campo para estimar los riesgos relacionados con la contaminación en granos de trigo, y consecuentemente en los productos derivados de esta materia prima.

4.1.3. Variabilidad genética de las poblaciones de *Fusarium graminearum*

Las epidemias de la FET están fuertemente influenciadas por las condiciones ambientales locales y regionales, como también por factores relacionados con los hospedantes y con los patógenos, incluyendo su adaptación y agresividad (Osborne y Stein, 2007). La variación genética dentro del complejo *F. graminearum* es muy alta y afecta la agresividad, el tipo y abundancia de toxinas, la interacción con el hospedante y la respuesta frente a un ambiente dado (Desjardins, 2006).

La diversidad genética de poblaciones del complejo *F. graminearum* se ha estudiado en numerosos trabajos en el mundo; en Europa (Schilling *et al.*, 1997; Sumíková *et al.*, 2013), Asia (Carter *et al.*, 2000; Gale *et al.*, 2002; Desjardins *et al.*, 2004), Australia (Akinsanmi *et al.*, 2008), América del Norte (Ouellet y Seifert, 1993; Gilbert *et al.*, 2001; Zeller *et al.*, 2003; Mishra *et al.*, 2004) y América del sur (Ramírez *et al.*, 2007; Álvarez *et al.*, 2011), a partir del uso de una variedad de marcadores moleculares, incluyendo RAPD (amplificación aleatoria de ADN polimórfico), AFLP (polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados), ISSR (repeticiones de

secuencia intergénica simple) y RFLP (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción). En todos los estudios se encontraron altos niveles de diversidad genética.

Bowden y Leslie (1996) mencionan que la fase sexual de *G. zeae* es la principal fuente de variación genética del hongo. Si bien no se encontró recombinación sexual bajo condiciones de campo, se ha reportado una tasa de entrecruzamiento de 35% bajo condiciones de laboratorio a partir del cruce de diferentes cepas (Bowden y Leslie, 1999). Por otra parte, Miedaner *et al.* (2001) reportaron que poblaciones de *F. culmorum* de Rusia, tuvieron una mayor diversidad genética en comparación con una población de *F. graminearum*. Este resultado es importante ya que no se conoce el estado teleomórfico de *F. culmorum*.

Poco se sabe sobre la variabilidad presente en poblaciones de *F. graminearum* de diferente origen geográfico o distintos hospedantes, y sobre la influencia de las diferencias genéticas en la agresividad del patógeno. Miedaner *et al.*, (2001) y Gagkaeva y Yli-Mattila (2004), encontraron una correlación positiva entre los agrupamientos genéticos y el origen geográfico de los aislamientos. Sin embargo, los aislamientos no pudieron ser agrupados acorde a su origen cuando poblaciones de distintas regiones dentro de un país fueron analizados (Sumíková *et al.*, 2013). Análisis similares con poblaciones de *F. graminearum* aisladas de arroz, maíz y trigo tampoco pudieron asociarse con el hospedante de procedencia (Ouellet y Seifert, 1993; Desjardins *et al.*, 2004).

Carter *et al.* (2000) en Nepal, mediante estudios de poblaciones de *F. graminearum* obtenidas de gramíneas, indicaron que los aislamientos se dividieron en 2 grupos, A y B, de acuerdo al hospedante del cual habían sido aislados. Localizando frecuentemente en el grupo A a los aislamientos de trigo y arroz, y a los aislamientos de maíz distribuidos entre los 2 grupos. No obstante, los autores mencionan que los

resultados obtenidos podrían haber sido influenciados por el año del aislamiento. Por otro lado, Tóth *et al.* (2005) realizaron un estudio filogenético con aislamientos de *F. graminearum* del centro de Europa aplicando RFLP y demostraron que las diferencias genéticas encontradas no se relacionaron con el origen de los aislamientos.

Dill-Macky (1996) sugiere el uso de técnicas con marcadores genéticos moleculares, para la detección de material resistente a la fusariosis, así como su mapeo genómico (Buerstmayr *et al.*, 1996). Estas herramientas pueden ayudar en la diferenciación de especies, aislamientos y razas fisiológicas del género *Fusarium*. Al respecto, se han logrado avances notables utilizando, por ejemplo, la técnica RAPD (Schilling *et al.*, 1994).

En la Argentina, utilizando Grupos de Compatibilidad Vegetativa (VCG) y análisis AFLP se demostró la presencia de variabilidad genética en poblaciones de *F. graminearum* procedentes de trigo (Ramírez *et al.*, 2006; 2007). Adicionalmente, el análisis de secuencias para estudiar la variabilidad genética de cepas aisladas de distintos campos de la región triguera confirmaron que el linaje 7 es la especie predominante en nuestro país (Ramírez *et al.*, 2007; Álvarez *et al.*, 2011). Aunque, al analizar 112 cepas del complejo *F. graminearum* aisladas de maíz en el noroeste de la Argentina, Sampietro *et al.* (2011) reportaron la presencia de *F. meridionale* y *F. boothii* en el país.

Se conoce poco sobre las bases genéticas de la agresividad en las poblaciones de este hongo. Para entender la naturaleza y la diversidad de los patógenos responsables de la FET, se han desarrollado un gran número de técnicas moleculares. Estas metodologías también se utilizan para estudiar las interacciones entre los patógenos y sus hospedantes (Nicholson *et al.*, 2003). La obtención de información respecto de la variabilidad genética de aislamientos de *F. graminearum* y su relación con la

agresividad en un determinado cultivar podría resultar importante para desarrollar cultivares de trigo resistentes a la FET.

Objetivos

- Determinar la potencialidad de aislamientos de *F. graminearum* provenientes de distintas fuentes para inducir la FET.
- Cuantificar la capacidad de producción de tricotecenos de los aislamientos.
- Correlacionar la acumulación de tricotecenos con la agresividad y la reducción del rendimiento.
- Analizar la diversidad genética de los aislamientos de *F. graminearum*.
- Determinar si la variabilidad genética se correlaciona con la agresividad y el origen de los aislamientos.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar a cabo los objetivos propuestos se condujeron 3 ensayos a campo en años consecutivos empleando un cultivar de trigo comercial y 60 aislamientos de *F. graminearum* obtenidos de diferentes fuentes de inóculo (colección mencionada en el capítulo II).

4.2.1. Implantación del cultivo de trigo

El ensayo se realizó en parcelas ubicadas en el campo didáctico de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata (Buenos Aires) (34° 54' S y 57° 55' O). Se utilizó el cultivar comercial de trigo pan Klein Chajá sembrado con una densidad de 350 plantas/m² en parcelas de 7 hileras de 4 metros de largo y 1,2 metros de ancho. Se efectuaron 3 ensayos de campo en años sucesivos

(2011, 2012 y 2013). Las variables climáticas (temperatura, precipitaciones y humedad relativa) fueron registradas en el transcurso de los ensayos con una estación meteorológica automatizada.

4.2.2. Preparación del inóculo artificial

En el ensayo correspondiente al año 2011 se inocularon las espigas con 31 aislamientos de *F. graminearum* de la colección obtenida (véase Capítulo II), mientras que en los ensayos realizados en el año 2012 y 2013, se estudió la agresividad de 61 aislamientos (Tabla 4).

Para la preparación del inóculo se sembraron los aislamientos monospóricos de la colección y un aislamiento control de *F. graminearum* procedente de trigo (IV_{II}3), en viales conteniendo 6 mL de medio líquido de Capellini y Peterson (Booth, 1971) y se incubaron durante 3 días a 25°C ± 2°C con agitación constante (150 rpm). Los macroconidios se recogieron mediante centrifugación a 4.000 rpm durante 10 min a 2°C. Se realizaron lavados sucesivos del precipitado con agua destilada estéril; el pellet de esporas obtenido se resuspendió en agua destilada estéril y su concentración fue ajustada a aproximadamente 10.000 esporas/mL usando la cámara de Neubauer.

Tabla 4: Aislamientos de *Fusarium graminearum* incluidos en el ensayo de agresividad.

Origen	Aislamiento	Especie
Malezas gramíneas	LH15*	<i>Echinochloa crus-galli</i>
	LH19*	<i>Sorghum halepense</i>
	LH20*	<i>Sorghum halepense</i>
	LH25	<i>Bromus unioloides</i>
	LH26	<i>Festuca arundinacea</i>
	LH27*	<i>Avena sativa</i>
	LH28*	<i>Dactylis glomerata</i>
	LH34	<i>Lolium multiflorum</i>
	LH47	<i>Paspalum dilatatum</i>
	LH48*	<i>Paspalum dilatatum</i>
	LH55*	<i>Cynodon dactylon</i>
	LH83*	<i>Dactylis glomerata</i>

Continúa de Tabla 4:

Origen	Aislamiento	Especie
Malezas gramíneas	LH130*	<i>Digitaria sanguinalis</i>
	LH131	<i>Digitaria sanguinalis</i>
	LH142*	<i>Paspalum dilatatum</i>
Malezas No gramíneas	LH14	<i>Picris echioides</i>
	LH17	<i>Picris echioides</i>
	LH21	<i>Amaranthus dubius</i>
	LH22	<i>Raphanus sativus</i>
	LH35	<i>Solidago chilensis</i>
	LH39*	<i>Anoda cristata</i>
	LH44*	<i>Galinsoga parviflora</i>
	LH50	<i>Cyperus rotundus</i>
	LH59*	<i>Portulaca oleracea</i>
	LH63	<i>Cyclospermum leptophyllum</i>
	LH64*	<i>Trifolium pratense</i>
	LH68	<i>Foeniculum vulgare</i>
	LH71*	<i>Stachys arvensis</i>
	LH81	<i>Verbena bonariensis</i>
	LH87	<i>Rumex crispus</i>
	LH88	<i>Brassica rapa</i>
	LH96	<i>Aster squamatus</i>
	LH97*	<i>Aster squamatus</i>
	LH99	<i>Rumex crispus</i>
	LH101*	<i>Fumaria capreolata</i>
	LH103*	<i>Lamium amplexicaule</i>
	LH105*	<i>Verónica pérsica</i>
	LH113*	<i>Trifolium repens</i>
	LH135*	<i>Nicotiana longiflora</i>
	LH138	<i>Cichorium intybus</i>
Cultivos Invernales y estivales	IV _{II} 3	<i>Triticum aestivum</i>
	LH73	<i>Glycine max</i>
	LH77	<i>Glycine max</i>
	LH92*	<i>Zea mays</i>
	LH94*	<i>Triticum aestivum</i>
	LH107*	<i>Secale cereale</i>
	LH108*	<i>Tritordeum</i>
	LH109*	<i>Triticum durum</i>
	LH110*	<i>Triticum durum</i>
	LH115*	<i>Secale cereale</i>
	LH121*	<i>Tritordeum</i>
	LH123	<i>Tritordeum</i>
	LH125	<i>Triticum aestivum</i>
	LH126*	<i>riticum durum</i>
	LH127	<i>Triticum aestivum</i>
	LH128*	<i>Triticum aestivum</i>
	CB1	<i>Hordeum vulgare</i>
	CB8	<i>Hordeum vulgare</i>
	CB9	<i>Hordeum vulgare</i>
	TC38	<i>Triticum durum</i>
	TC45	<i>Triticum durum</i>

* Aislamientos utilizados en los 3 años de ensayo.

4.2.3. Análisis de agresividad

4.2.3.1. Inoculación

Las espigas de trigo cultivadas a campo se inocularon puntualmente en plena anthesis (Zadoks 64-65) (Zadoks *et al.*, 1974). Para ello, las flores correspondientes a las dos espiguillas centrales de cada espiga se marcaron con un marcador indeleble y 5 μ L de la suspensión de macroconidios se introdujeron mediante el uso de una micropipeta, entre la lema y la palea de cada flor marcada. Las espigas inoculadas se cubrieron individualmente con bolsas de polietileno para mantener aproximadamente 100% de humedad relativa durante 48 hs (Figura 27).

Las parcelas se dividieron en bloques uniformes que se inocularon en días consecutivos. En cada bloque se seleccionaron aleatoriamente 5 espigas para cada aislamiento y se inocularon. Se realizaron 4 bloques de inoculación y cada uno de ellos fue considerado como una réplica para cada tratamiento (20 espigas totales para cada tratamiento). Además en todos los bloques se incluyó un tratamiento control que consistió en la inoculación de las espigas con agua destilada estéril.



Figura 27: Análisis de la agresividad a campo: a) Espigas de trigo seleccionadas, marcadas y numeradas; b) Inoculación puntual en una de las espiguillas centrales de la espiga; c) Espigas inoculadas y cubiertas individualmente con bolsas de polietileno (cámara húmeda).

4.2.3.2. Evaluación de la agresividad a campo

Se analizó la dinámica de la enfermedad sobre cada espiga inoculada.

Se evaluó la dispersión del hongo tanto en forma acrópeta como basípeta. Para ello, cada espiguilla de la espiga fue numerada como positiva o negativa considerando su posición con respecto al punto de inoculación (PI) (Malbrán *et al.*, 2012) (siendo +1 y -1 las espiguillas inoculadas y, +2 y -2 las espiguillas ubicadas inmediatamente arriba y abajo del punto de inoculación, respectivamente) (Figura 28).

La evaluación se realizó visualmente a los 7, 14 y 21 días posteriores a la inoculación (dpi) y las espiguillas que desarrollaron síntomas de la FET fueron registradas. La severidad de la enfermedad se calculó como el porcentaje de espiguillas enfermas sobre el total de espiguillas en cada espiga. Las espiguillas que presentaron

síntomas de desecamiento prematuro no fueron consideradas para el cálculo de la severidad de la enfermedad.

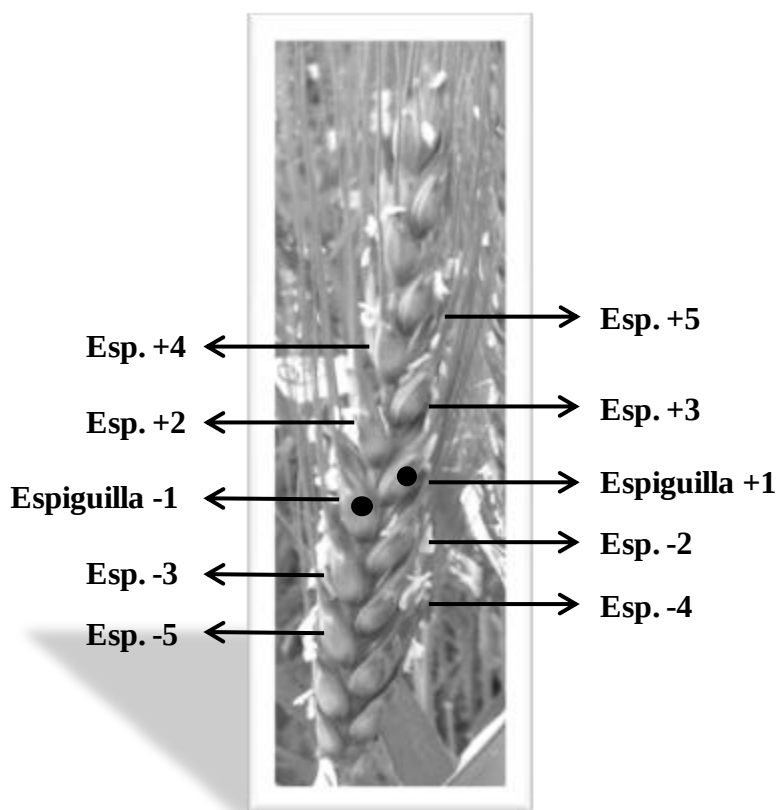


Figura 28: Esquema de numeración de cada espiguilla en las espigas inoculadas. Solo se indican numeradas las 4 espiguillas superiores e inferiores al punto de inoculación (-1 y +1).

El área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC) fue calculada para cada tratamiento acorde a la fórmula de Shaner y Finney, (1977):

$$AUDPC = \sum_{i=1}^n \frac{S_i + S_{i+1}}{2} \cdot (t_{i+1} - t_i)$$

Donde S_i = severidad de la enfermedad en la observación i , t_i = días a la observación i , y n = número total de observaciones.

Las espigas maduras se cosecharon, se trillaron manualmente y se determinó el peso de mil granos (PMG) para los bloques de cada tratamiento.

4.2.4. Producción de deoxinivalenol *in vivo*

El análisis cuantitativo del DON producido *in vivo* por *F. graminearum* en las espigas inoculadas en el ensayo a campo se realizó mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus iniciales en inglés: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Se utilizó el inmunoensayo enzimático RIDASCREEN® FAST DON (R-Biopharm, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Gosman *et al.*, 2005; 2007).

Se utilizaron para ello los granos obtenidos de la trilla manual de las espigas inoculadas a campo con el grupo de 31 aislamientos de *F. graminearum* que fueron estudiados durante los 3 años de ensayos de campo (Tabla 3, aislamientos marcados con *). Para la cuantificación de DON, los granos fueron molidos y pesados para cada uno de los bloques de cada tratamiento. Los granos obtenidos del tratamiento control inoculado con agua se utilizaron como control negativo.

Los granos molidos se pesaron, se diluyeron 1:20 (p/v) en agua destilada y se homogeneizó la mezcla con un agitador magnético durante 3 minutos. Las muestras se filtraron a través de papel de filtro Whatman número 1, y 50 µL de la solución resultante fueron utilizados para la determinación de DON.

Se adicionaron los estándares de DON provistos por el kit para la elaboración de una curva patrón. La absorbancia se midió en un detector para microplacas Beckman Coulter dtx-800 (Beckman Coulter, Brea, EE.UU.) a 450 nm (Figura 29). Los datos obtenidos se expresaron como concentración de DON (ppm) por medio del uso del programa RIDA® SOFT Win (R-Biopharm, Alemania).

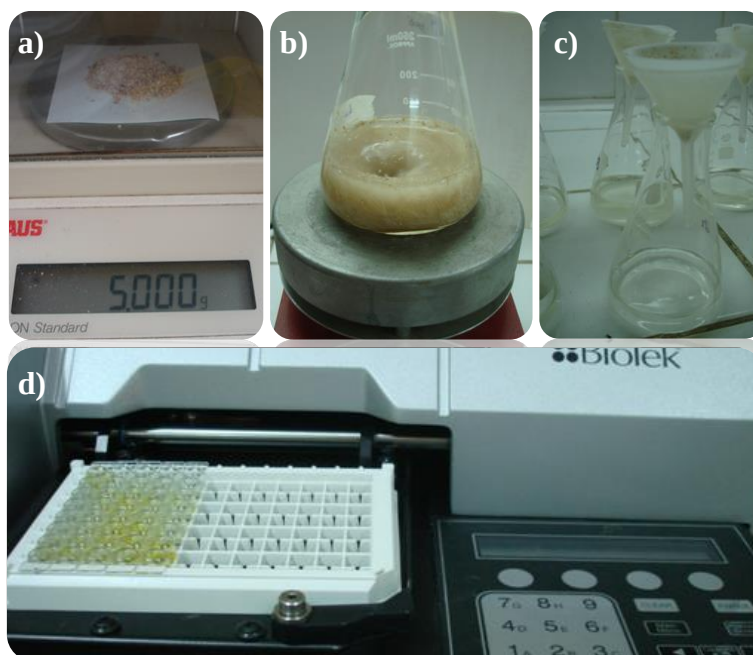


Figura 29: Cuantificación de la producción de DON *in vivo* mediante ELISA. a) Pesaje de muestra de granos molidos; b) Homogenización de la mezcla y c) Filtrado de cada una de las muestras. d) Determinación de la absorbancia a 450 nm de cada muestra en el detector de microplacas.

4.2.5. Variabilidad genética de las poblaciones de *Fusarium graminearum*

Se estudió la variabilidad genética del grupo de 60 aislamientos cuya agresividad fue evaluada a campo (Tabla 4) mediante la técnica de RFLP.

Para el análisis de la variabilidad genética, se generaron fragmentos de ADN de 2427 bp específicos para *F. graminearum* mediante PCR utilizando el par de *primers* diseñados *ad hoc* DGFg_F1 (5'-GAGAAGAACCAATGACCAAATCT-3') y DGFg_R1 (5'-TGAAGGGCCTGAGTTTTCCGTGA-3'). Los *primers* se diseñaron en base a los datos de secuencia del genoma de la cepa PH1 de *F. graminearum* (disponible en www.Broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group/MultiHome.html) por medio de un programa informático desarrollado por P.D. Ghiringhelli (*software* no publicado). El amplicón generado a partir de los *primers* DGFg contenía en su

secuencia al fragmento especie-específico para *F. graminearum* Fg16N (Nicholson *et al.*, 1998) (Figura 30). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador PTC-150 MiniCycler™ (M.J.Research, INC, EE.UU.). La mezcla de reacción se realizó en volúmenes de 25 µL conteniendo 10-20 ng de ADN fúngico, 200 µM de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0,5 µM de cada uno de los *primers* (FAGOS/Ruralex, Argentina), 0,8 unidades de Taq polimerasa (Highway Molecular Biology-InBio-UNICEN-Tandil, Argentina), 1,5 µM Cl₂Mg, y 1X buffer de reacción (50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl, 1% Triton X-100). El perfil de ciclado consistió en una secuencia de ciclos conformados por: un paso de desnaturalización (95°C) por 4 min, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 35 s, *annealing* a 60 °C por 25 s y extensión a 72 °C por 2,5 min, seguidos por un paso final de extensión (72 °C) durante 5 min. Hasta su recuperación las reacciones fueron mantenidas a 15 °C.

Los fragmentos amplificados obtenidos se digirieron con 4 endonucleasas de restricción, RsaI, HinfI, Fnu4HI y Sau3AI (*Fast Digest restriction enzymes*-Fermentas, EE.UU.) (Tabla 5). Los sitios de corte de las 4 enzimas de restricción del fragmento amplificado DGFg se obtuvieron a través del estudio *in silico* con la secuencia de ADN de la cepa PH1 de *F. graminearum* (Figura 31).

Las digestiones se realizaron empleando 10 µL de producto amplificado (≈0,2 µg), 1X de buffer de reacción correspondiente a cada enzima y 1 unidad de enzima (cantidad de enzima necesaria para digerir 1µg de ADN de Lambda en 5 min a 37°C en 1X de Buffer *FastDigest*), en un volumen final de 30 µL. Las mezclas de digestión se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Se utilizó el aislamiento IV_{II} 3 de *F. graminearum* como control positivo en las 4 digestiones.

Las digestiones de los fragmentos obtenidos con los *primers* DGFg se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% (p/v) teñidos con bromuro de etidio (0,2

mg/mL) junto con el marcador de peso molecular Lambda Hind III (Fermentas, EE.UU.). El tamaño de las bandas obtenidas se estimó por comparación con las bandas del marcador utilizado. Los geles se visualizaron con el analizador de imágenes GeneGenius (Syngene, EE.UU.), utilizando el *software* GeneSnaps para la toma de fotografías. A partir del perfil de bandas observadas y conseguidas para cada aislamiento con cada enzima utilizada, se hizo el análisis filogenético sobre la base de una matriz binaria de datos. Los fragmentos de ADN menores a 50 bp no fueron tomados en cuenta para el análisis, dado que no se resolvieron correctamente en los geles de agarosa realizados.

```

DG-Fg F1 ->
GAGAAGAACCAATGACCAATCTCCCAGATAGCATGCTGAACGACTGGTCAGTGGACAAATGTAACAGAA
CACTAAAGACAACCGGGGCATATCCATTTTTGTCATGCTCATGAAACACATCGCTCCAGTCTAGAGCTACT
ATCTTAGCCATAATGAAGATGCCTCAGAAATTTTGAAGCATAGTGTCCCTCTGGCGTTTTCTTGATCCT
TTCTATCTTAACTATAATTAATAGACTACCTCGTGGGGATAATGCGACGTTCCCAAGGATACTTTAGCT
CATACTTGACTCCCTCGTCATGCGCCAGATCTTGTTGCCCCGTTACTGAATATTGTAAGCTGAATTGC
CGTTAGCAGTGAGTGCAAGTGAGGGATGTCATTCGGGAGAAAATTGTCTTCGTCGGGCAGATAATTGACA
CCCTCCATGGAACTAGGGACTCTTGTTCTCCTAGATTGTCTTGCACTGGGGCTGCTTGATGGGAAACCCC
AGCAGACATCATGGAAGGCCGAACGATGTTGACGATCACTCATCATGAAGACGCTGATTGCCCCACAG
AAGAGGTGACTCACCGCTATCCCATGTCGAGGTCAATGACTCAAAGCTGCTCATTGAAAGAATATATAA
GGTGCTGGAAGAAGACCAGACAAGACTGCTAGCAACGCACGCGAAGAAGCACGATGGGCCTAAGACTGT
AGAAAGGAGAAATGACCAATTGACAACGACAAAGAGCAGAGCCATATGAACTTCAAAAAAGAGTGACAAG
TCACCATCCAAAAGTATCACAGACCAGTTTCTTCGGATTTATGCCGAAGTGAAATCCATGTACATTGAG
GGCGCTATTGTGTTTTTTTTTTTGAATGTCTCTCATGATATAGGGGTGCAGCAGTCAAGATCTGCATA
TTTGCTGAGATGGCTAAGGGGATGGCAGGAACTGAAGACCTCCGCTTGGGACATATAAAATAAACAGCC
TAAGAGCGGGTTAAAGTGCCCGGTATAAGGCAACTGTATTATTTATCCCTGAGGCAGCAGAAATCGAG
TCTTGTTGTTGCTCCGCGGGATGTTTGAAGATCAAAGAATGTATAAATTAGTAGAGATACGACAATAATC
CAGCGACTGCTTCGCCGTAATACCGATTGATCTTACGAGTTCTCTTATTCTAGCTTTATTCATTCGTTA
GGACTCTCTTCGTGTTTTGGCCATGGGTAACGTGATTACTTCTTCCATGGCTTGAAATGCCACACCTAAC
AAAGAACCCCTGGTAAGAATGACTGCTCACAATATTTCACTTGAGATGGGAAACAATGGAAGAGAATGTT
GAATGAACTTATTGAATATTGACGGGTTTAAATGACTGCTAAATAAAGCAATTAAGGACCCATAACGGT
TGACGAAGAGGGGGCATAGTTAACTCCTTCCCTGACGTTTCTCGTACAGGGCGATTGCTGTTGAAATG
ACGCTTCAAACCTTCAAACCAGCATATCGTTCCACATAATAATAGACTGCCGGAAGTAGCTTTAGTCTT
TATGCTTGTTTACCGCAATAGACCAAACCGCTATAGTATCCATAAATCAAATTGCATACTTATATGC
AGTAACTGCTTGAGCGTGATGTTAAGACACCAACTTTAAACCCTCATATAGTGTATCCATAAAGCTAG
CCAGTAGCTCGCAATCAACAAGGTTCTGATAGAGTCTGTCGCTGGGTCTGAACGCTTAGCTTTGTTAGAA
GTCAATGCTAGTTTACATCTTCTTTGACATCTGTTCAACCCAGTAAAGCTGTAATAATGTAATTATCAA
TGACACCTTTTGTATTCTATCGTTTCATCGGCAGCATACTATGAGGGTCTGTTGCATTATCCTTTGTACT
TGAAAAATCTCCTTTATAACTTGTCATATGATACCTTCCGCTTCCAGGAGTTGAAAGCACAGTCGAACAT
CATACCTATATACCATTGCATTACCTACCTAGGTAGGTATCCGACATGGCAAACCTTATAAGTGCAGTTAT
ATGTGCCTGAATCTTGTCTATCTGTTTCCACCTGCAGCAACCTTAACCGACTATTCTACACTGCTATTATC
CTTAACCGACTGTTCTACACTGCTATTGTTTGGCAGGCACCGATCGCAAGATGGCTAAACAGCACGAATG
CCCGACTTGCCCCAAGGCATTCCAATTAAAGAAAGACTTGAAGAGACATATCTCGTGTGTTACAGGAAG
CGCCAGCCCTTCAAATGTCCCCATTGCCCCAAGTCATTGCGGACAAAGGGCAATATGGCGAAGCATATCC
AGATCATCCATGAGCAACGCAAGCCCTTCAAAAGTTTCGATTGCTCAAGACATTCTCAGACCAGAGCAA
TTTGACGCAACATATCCGGAGCGTTCACGGAAAACCTCAGGCCCTTCA
<- DG-Fg R1

```

Figura 30: Secuencia del amplicón obtenido de *Fusarium graminearum* con los primers DG-Fg (2427 bp). Al inicio y al final de la secuencia se detallan los primers. El fragmento sombreado corresponde al fragmento obtenido con los primers especie-específicos Fg16N (Nicholson *et al.*, 1998).

Tabla 5: Enzimas utilizadas en el ensayo de RFLP con sus correspondientes secuencias de reconocimiento, y sitios de corte teóricos y tamaños de los mismos a obtener para el fragmento amplificado DGFg de *Fusarium graminearum*.

Enzima	Sitio de restricción	Sitios de corte	Tamaño de los fragmentos (bp)
Fnu4HI	5'-...GC/NGC...-3'	6	961, 472, 363, 283, 212, 136
Hinfl	5'-...G/ANTC...-3'	9	847, 444, 388, 288, 151, 144, 129, 31, 5
RsaI	5'-...GT/AC...-3'	5	832, 571, 540, 441, 40
Sau3AI	5'-.../GATC...-3'	9	992, 377, 215, 204, 179, 170, 116, 104, 70

Siendo N = A, C, G o T.

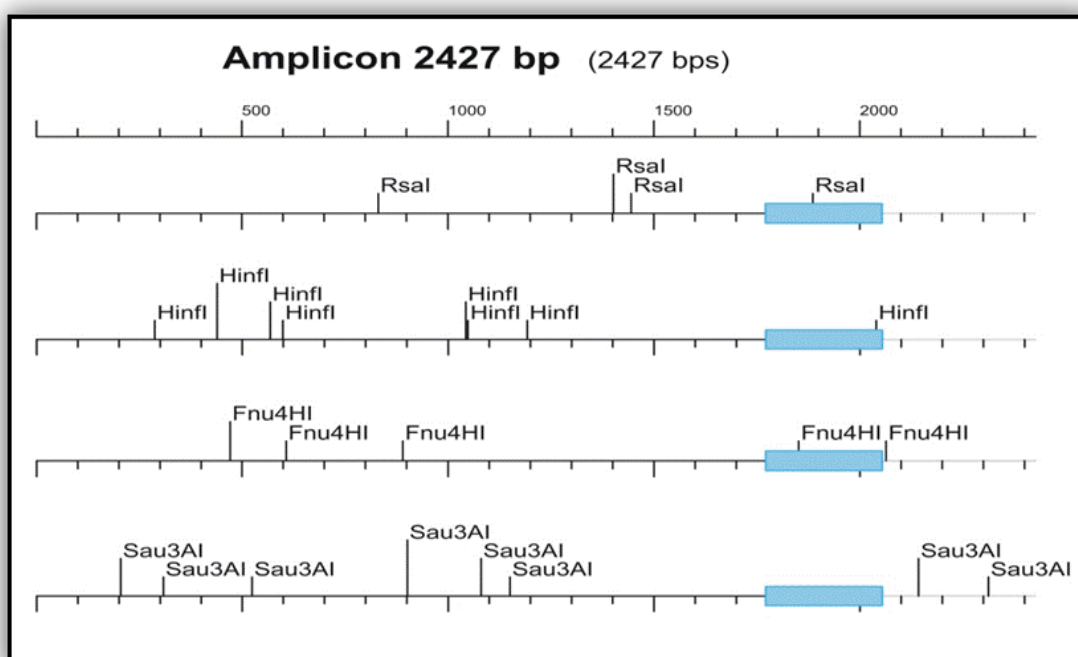


Figura 31: Representación de los sitios de corte de las 4 enzimas de restricción utilizadas (RsaI, HinfI, Fnu4HI y Sau3AI) del fragmento DGFg de *Fusarium graminearum*. El segmento resaltado con un rectángulo celeste corresponde al fragmento especie –específico Fg16N (Nicholson *et al.*, 1998).

4.2.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó por medio del software Statistix v.8 (Analytical Software, Tallahassee, EE.UU.). Los datos de agresividad, PMG, AUDPC y producción de tricotecenos por parte de *F. graminearum* se estudiaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA) y se establecieron los correspondientes coeficientes de correlación.

Para los parámetros PMG y producción de DON *in vivo* se utilizaron como unidad experimental los bloques de inoculación.

Las medias fueron comparadas con un test de Tukey ($p \leq 0,05$). Los análisis de correlación se llevaron a cabo para todas las combinaciones de parámetros con $\alpha = 0,05$.

El análisis de los datos obtenidos a partir de RFLP se realizó mediante el programa InfoStat versión 2008. La matriz binaria básica de datos fue construida en forma de tabla ($n \times t$, n = filas = aislamientos, y t = columnas = bandas). Los datos se convirtieron a variables binarias de la siguiente manera: cada fragmento de la digestión observado para cada enzima utilizada, con una movilidad electroforética determinada y correspondiente a una banda en el gel, se le asignó el valor de 1 si estaba presente en cada aislamiento y el valor 0 a la ausencia.

Para determinar la relación genética entre aislamientos se construyó una matriz de distancia que combinó todos los polimorfismos detectados entre los aislamientos, utilizando el coeficiente de distancia Euclídea. A partir de los datos generados se construyó un dendrograma.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Evaluación de la agresividad a campo

Durante los ensayos realizados bajo condiciones de campo sobre las espigas inoculadas puntualmente hubo desarrollo de síntomas de la FET sobre la espigas del cultivo de trigo. Se encontraron diferencias en la agresividad de los aislamientos de *F. graminearum* seleccionados y procedentes de distintos hospedantes.

Las variables climáticas, precipitaciones, temperatura y humedad relativa, se registraron en los 3 años durante los 7 días previos y posteriores a la antesis (Figura 32). El total de precipitaciones fue de 76 mm (3 eventos de lluvias), 183 mm (3 eventos de

lluvias) y 62 mm (2 eventos de lluvias) para el año 2011, 2012 y 2013, respectivamente. En la Argentina, Moschini y Fortugno (1996) encontraron que alrededor de la floración el número de períodos de dos días con presencia de lluvias y humedad relativa $>81\%$ y $>78\%$ en el primero y segundo día, respectivamente, resulta la variable que presenta mayor asociación con el ataque de FET.

En el segundo año de ensayo (2012) el volumen de lluvias acaecidas durante el periodo de floración del trigo superó ampliamente los valores promedio históricos. Esta situación sumada a los datos de temperatura y humedad relativa registrados, favorecieron la ocurrencia de epidemias de la enfermedad (Figura 32 b), derivando en la ocurrencia de numerosos eventos de infección natural tanto en las espigas inoculadas como en los controles. El 90% de las espigas seleccionadas e inoculadas artificialmente demostraron síntomas en espiguillas que no habían sido tratadas, y las mismas no se correspondían a la dispersión del patógeno en la espiga desde el punto de inoculación, sino que eran producto de eventos de infección natural. Las valoraciones visuales llevadas a cabo sobre las espigas estuvieron afectadas por un índice elevado de infección de *F. graminearum*, sobrestimando los valores reales de agresividad provocados por los aislamientos de la colección. Como consecuencia, el análisis correspondiente al año 2012 no fue utilizado para analizar la agresividad, ni para el estudio de la capacidad toxicogénica *in vivo*.

Las condiciones climáticas correspondientes al primer y tercer año de ensayo fueron moderadas para el desarrollo de la FET.

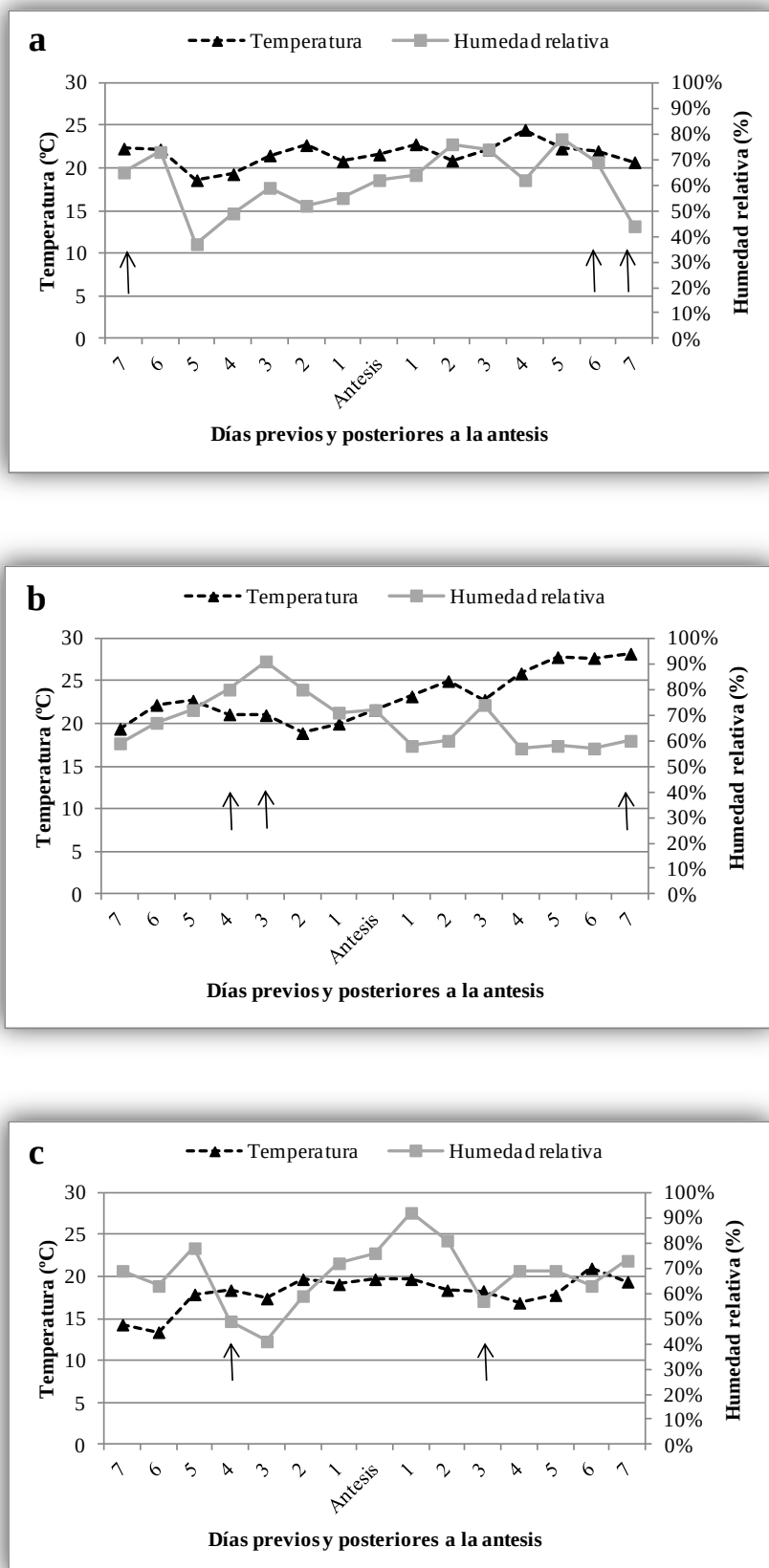


Figura 32: Datos meteorológicos. Temperatura (°C) y Humedad relativa (%) durante el periodo de antesis en los 3 años de ensayo, a) Año 2011, b) Año 2012 y c) Año 2013. Las flechas indican eventos de lluvias.

A través de la inoculación puntual de las espigas, se pudo estudiar la agresividad de aislamientos provenientes de distintas fuentes de inóculo como también analizar el desarrollo de los síntomas de la FET bajo condiciones de campo. La mayoría de las espigas inoculadas (65% en el año 2011 y 80% en el año 2013) desarrollaron los síntomas característicos de la FET y manifestaron una reducción en el peso de los granos en los 2 años de ensayo (Figura 33). En concordancia con Malbrán *et al.* (2012) se observó que la dispersión del patógeno en la espiga fue principalmente hacia abajo del punto de inoculación (basípeto).



Figura 33: Espigas de trigo inoculadas con macroconidios de *Fusarium graminearum* con distinto porcentaje de síntomas necróticos en espiguillas (% Severidad).

Todos los aislamientos fueron capaces de desarrollar los síntomas de la FET en las espigas y se observó la ocurrencia de variabilidad en la agresividad entre los mismos. Hubo diferencias significativas en la severidad de los síntomas entre los aislamientos y entre los años de ensayo ($p < 0,01$). Sin embargo, las diferencias para el comportamiento de la interacción entre el año de ensayo (2011 y 2013) y los distintos aislamientos fueron altamente significativas, siendo el factor Año el de mayor influencia

en la varianza obtenida (Tabla 6). Por lo tanto, con la finalidad de representar los valores correspondientes a la capacidad patogénica de cada aislamiento se analizaron los datos de cada año individualmente.

Tabla 6: Estimaciones de los componentes de la varianza de la severidad de la fusariosis de la espiga de trigo a los 21 días post inoculación (dpi), para los 31 aislamientos de *Fusarium graminearum* inoculados en espigas de trigo en los 2 años de ensayos de campo.

FUENTE	Gl	SC	Cm	F	P
Aislamiento	31	15,853	0,51139	13,09	0,0006
Año	1	4,1387	4,13872	105,91	0,0000
Aislamiento x Año	31	12,4954	0,40308	10,31	0,0006
Error	1152	45,0167	0,03908		
Total	1215				

La variabilidad en la agresividad de los aislamientos (expresada como porcentaje de severidad a los 21 días post inoculación (dpi) sobre el cultivar de trigo Klein Chajá resultó significativamente diferente en ambos años de ensayo ($F = 14.94$ y $p < 0,001$ en 2011, y $F = 4,93$ y $p < 0,001$ en 2013) (Tabla 7). Sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre la severidad y la fuente de origen de los aislamientos en ninguno de los ensayos. En el año 2011 la severidad a los 21 dpi de los aislamientos procedentes de malezas gramíneas fue de 21%, mientras que para los aislamientos obtenidos de malezas no-gramíneas y cultivos invernales y estivales fue de 34% y 31%, respectivamente. Los resultados de severidad con respecto a las distintas fuentes de origen en el año 2013 fueron 15% para los aislamientos de malezas gramíneas y 19,5% y 16% para los aislamientos procedentes de malezas no-gramíneas y cultivos invernales y estivales.

La severidad de los síntomas de la FET fue mayor en promedio en el ensayo de 2011 en comparación con los valores obtenidos en el año 2013 (30% y 17%). La

severidad en el primer año osciló entre un mínimo de 0 y 1% a los 21 dpi para los aislamientos LH39, LH94 y LH121 a un máximo de 61 y 65% con los aislamientos LH109 y LH71. Por otro lado, en el año 2013 el porcentaje de infección varió entre 1% con el aislamiento LH 26 a un máximo de 37% para el aislamiento LH108.

Tabla 7: Severidad de la fusariosis de la espiga de trigo a los 21 días post inoculación (dpi) y área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC) inducidos por 61 aislamientos de *Fusarium graminearum* inoculados en espigas de trigo en los 2 años de ensayos de campo.

Aislamiento	Hospedante/ Origen	Severidad 21 dpi. (%)		AUDPC	
		Año 2011	Año 2013	Año 2011	Año 2013
LH108	Cultivo	47 ^{abcd}	37 ^a	532 ^{bcde}	273 ^a
LH14	Maleza no gramínea	n. d.	29 ^{ab}	n. d.	246 ^{ab}
LH103	Maleza no gramínea	34 ^{bcdef}	28 ^{abc}	395 ^{cdefghi}	214 ^{abc}
LH101	Maleza no gramínea	33 ^{cdefg}	27 ^{abcd}	374 ^{cdefghijk}	212 ^{abcd}
LH105	Maleza no gramínea	36 ^{bcdef}	26 ^{abcde}	408 ^{cdefgh}	177 ^{abcdef}
TC38	Cultivo	n. d.	25 ^{abcdef}	n. d.	207 ^{abcde}
LH87	Maleza gramínea	n. d.	25 ^{abcdef}	n. d.	169 ^{abcdef}
LH19	Maleza gramínea	22 ^{defgh}	24 ^{abcdef}	255 ^{defghijk}	157 ^{abcdefgh}
LH17	Maleza no gramínea	n. d.	23 ^{abcdefg}	n. d.	166 ^{abcdefg}
LH48	Maleza gramínea	38 ^{abcdef}	23 ^{abcdefg}	391 ^{cdefghi}	170 ^{abcdef}
LH130	Maleza gramínea	5 ^h	23 ^{abcdefg}	55 ^{ghijk}	132 ^{abcdefgh}
LH35	Maleza no gramínea	n. d.	23 ^{abcdefg}	n. d.	146 ^{abcdefgh}
LH44	Maleza no gramínea	36 ^{bcdef}	22 ^{abcdefg}	387 ^{cdefghij}	161 ^{abcdefg}
LH59	Maleza no gramínea	39 ^{abcdef}	21 ^{abcdefgh}	458 ^{bcdef}	168 ^{abcdef}
LH127	Cultivo	n. d.	21 ^{abcdefgh}	n. d.	132 ^{abcdefgh}
CB1	Cultivo	n. d.	21 ^{abcdefgh}	n. d.	143 ^{abcdefgh}
LH99	Maleza no gramínea	n. d.	21 ^{abcdefgh}	n. d.	144 ^{abcdefgh}
LH68	Maleza no gramínea	n. d.	21 ^{abcdefgh}	n. d.	144 ^{abcdefgh}
LH110	Cultivo	5 ^{gh}	21 ^{abcdefgh}	44 ^{ghijk}	143 ^{abcdefgh}
LH39	Maleza no gramínea	1 ^h	20 ^{abcdefghi}	7 ^{jk}	142 ^{abcdefgh}
LH142	Maleza gramínea	6 ^{gh}	20 ^{abcdefghi}	57 ^{ghijk}	135 ^{abcdefgh}
LH64	Maleza no gramínea	28 ^{cdefgh}	19 ^{abcdefghi}	287 ^{cdefghijk}	176 ^{abcdef}
LH92	Cultivo	42 ^{abcde}	19 ^{abcdefghij}	473 ^{bcdef}	139 ^{abcdefgh}
TC45	Cultivo	n. d.	19 ^{abcdefghij}	n. d.	172 ^{abcdef}
LH125	Cultivo	n. d.	19 ^{abcdefghij}	n. d.	133 ^{abcdefgh}
LH55	Maleza gramínea	49 ^{abcd}	19 ^{abcdefghij}	639 ^{abc}	143 ^{abcdefgh}
LH97	Maleza no gramínea	14 ^{fgh}	18 ^{abcdefghij}	134 ^{fghijk}	128 ^{abcdefgh}
LH131	Maleza gramínea	n. d.	17 ^{bcdefghij}	n. d.	113 ^{bcdefgh}
LH81	Maleza no gramínea	n. d.	17 ^{bcdefghij}	n. d.	105 ^{bcdefgh}
LH107	Cultivo	56 ^{abc}	16 ^{bcdefghij}	604 ^{abcd}	126 ^{abcdefgh}
LH47	Maleza gramínea	n. d.	16 ^{bcdefghij}	n. d.	153 ^{abcdefgh}
LH123	Cultivo	n. d.	16 ^{bcdefghij}	n. d.	92 ^{bcdefgh}
LH63	Maleza no gramínea	n. d.	16 ^{bcdefghij}	n. d.	125 ^{abcdefgh}
LH138	Maleza no gramínea	n. d.	15 ^{bcdefghij}	n. d.	117 ^{abcdefgh}
LH71	Maleza no gramínea	65 ^a	15 ^{bcdefghij}	935 ^a	102 ^{bcdefgh}
LH25	Maleza gramínea	n. d.	15 ^{bcdefghij}	n. d.	93 ^{bcdefgh}
LH50	Maleza no gramínea	n. d.	14 ^{bcdefghij}	n. d.	118 ^{abcdefgh}
LH115	Cultivo	16 ^{efgh}	14 ^{bcdefghij}	164 ^{efghijk}	102 ^{bcdefgh}
LH34	Maleza gramínea	n. d.	14 ^{bcdefghij}	n. d.	101 ^{bcdefgh}

Continúa de Tabla 7:

Aislamiento	Hospedante/ Origen	Severidad 21 dpi. (%)		AUDPC	
		Año 2011	Año 2013	Año 2011	Año 2013
LH20	Maleza gramínea	14 ^{efgh}	14 ^{bcdefghij}	149 ^{fghijk}	73 ^{cdefgh}
LH27	Maleza gramínea	3 ^h	14 ^{bcdefghj}	34 ^{hijk}	99 ^{bcdefgh}
IVII 3	Cultivo	n. d.	14 ^{bcdefghj}	n. d.	117 ^{abcdefgh}
LH21	Maleza no gramínea	n. d.	13 ^{bcdefghj}	n. d.	97 ^{bcdefgh}
LH109	Cultivo	61 ^{ab}	13 ^{bcdefghj}	835 ^{ab}	77 ^{cdefgh}
LH128	Cultivo	46 ^{abcd}	13 ^{bcdefghj}	615 ^{abcd}	96 ^{bcdefgh}
LH135	Maleza no gramínea	37 ^{abcdef}	12 ^{bcdefghj}	492 ^{bcdef}	100 ^{bcdefgh}
LH77	Cultivo	n. d.	12 ^{bcdefghj}	n. d.	85 ^{cdefgh}
LH96	Maleza no gramínea	n. d.	11 ^{bcdefghj}	n. d.	69 ^{cdefgh}
LH126	Cultivo	36 ^{bcdef}	10 ^{bcdefghj}	421 ^{cdefg}	58 ^{cdefgh}
CB9	Cultivo	n. d.	10 ^{cdefghj}	n. d.	65 ^{cdefgh}
LH94	Cultivo	1 ^h	8 ^{defghij}	19 ^{ijk}	64 ^{cdefgh}
LH73	Cultivo	n. d.	8 ^{defghij}	n. d.	54 ^{defgh}
CB8	Cultivo	n. d.	8 ^{defghij}	n. d.	64 ^{cdefgh}
LH22	Maleza no gramínea	n. d.	8 ^{efghij}	n. d.	47 ^{fgh}
LH28	Maleza gramínea	2 ^h	7 ^{fghij}	29 ^{hijk}	51 ^{efgh}
LH88	Maleza no gramínea	n. d.	6 ^{fghij}	n. d.	47 ^{fgh}
LH121	Cultivo	0 ^h	6 ^{fghij}	0 ^k	53 ^{defgh}
LH83	Maleza gramínea	17 ^{efgh}	4 ^{ghij}	171 ^{efghijk}	27 ^{fgh}
LH113	Maleza no gramínea	55 ^{abc}	3 ^{hij}	662 ^{abc}	31 ^{fgh}
LH15	Maleza gramínea	49 ^{abcd}	3 ^{hij}	595 ^{abcd}	20 ^{fgh}
LH26	Maleza gramínea	n. d.	1 ^{ij}	n. d.	9 ^{gh}
TESTIGO		0 ^h	0 ^j	0 ^k	0 ^h

n. d. = Aislamiento no determinado en ese año. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0 = 0,05$).

En ambos años de ensayo se observó la existencia de diferencias significativas en el peso de mil granos (PMG) entre los tratamientos ($F = 5,53$ y $p < 0,001$ para 2011, y $F = 2,62$ y $p < 0,001$ para 2013). La reducción del rendimiento en comparación con el testigo varió entre el 3 y 52% en el ensayo de 2011, y entre el 4 y 42% en el del 2013. También se encontraron diferencias significativas en ambos años de ensayos en los valores del AUDPC de los distintos aislamientos ($F = 13,61$ y $p < 0,001$ para 2011, y $F = 4,26$ y $p < 0,001$ para 2013).

Los análisis de correlación y de regresión lineal entre la severidad a los 21 dpi y los parámetros PMG ($r = -0,90$ y $p < 0,01$ para el año 2011 y 2013) y AUDPC ($r = 0,96$ y $p < 0,01$ para el año 2011, y $r = 0,99$ y $p < 0,01$ para el año 2013) evidenciaron una

relación estrecha entre estos parámetros (Figuras 34 y 35). Los parámetros severidad de la FET a los 21 dpi y el AUDPC se relacionaron positivamente, mientras que la severidad de la FET a los 21 dpi y el PMG mostraron una correlación negativa.

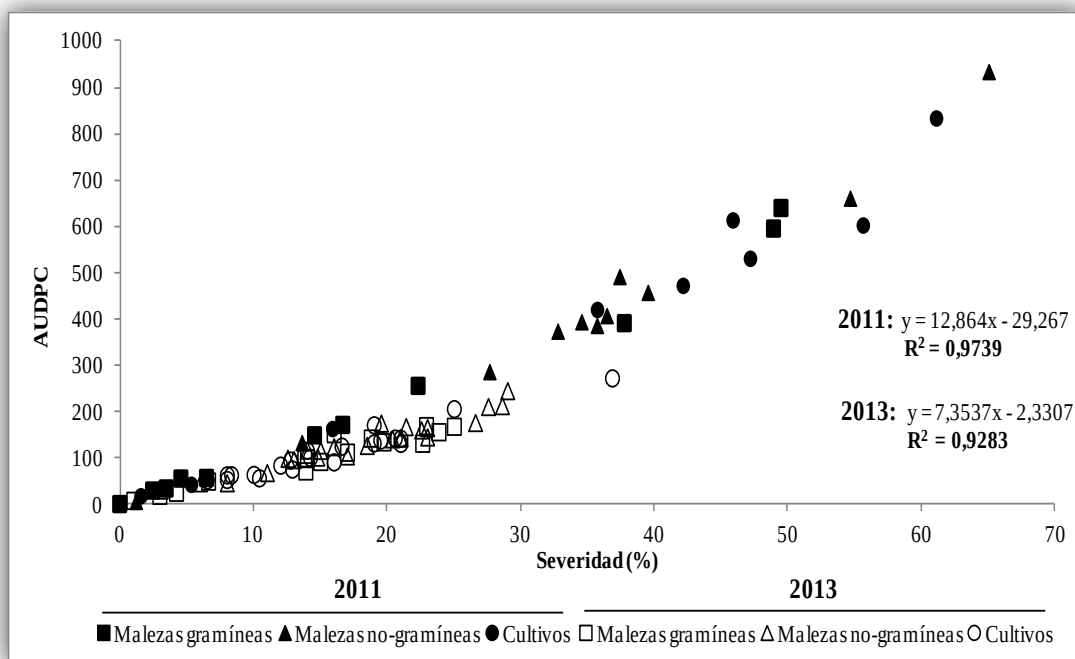


Figura 34: Análisis de regresión entre el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC) y la severidad de la FET (%) de los 31 aislamientos del ensayo de 2011 (rótulos rellenos) y de los 61 aislamientos de *Fusarium graminearum* del ensayo de 2013 (rótulos vacíos). ■, ▲ y ●: corresponden a los aislamientos provenientes de malezas gramíneas, de malezas no-gramíneas y de cultivos invernales y estivales, respectivamente.

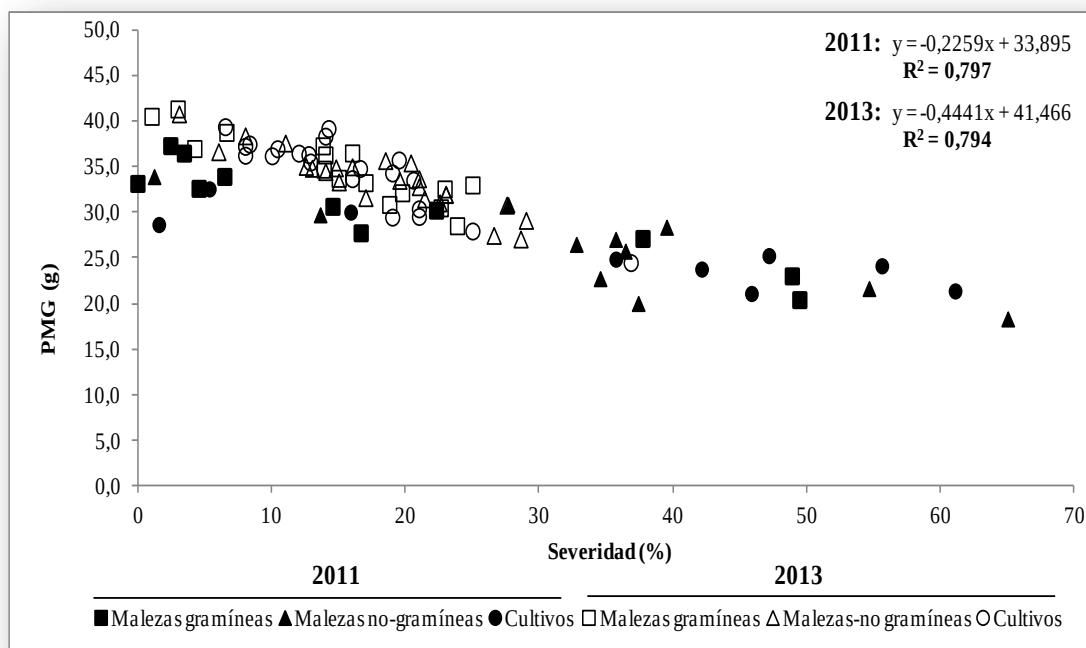


Figura 35: Análisis de regresión entre el peso de mil granos (PMG) y la severidad de la FET (%) de los 31 aislamientos del ensayo de 2011 (rótulos rellenos) y de los 61 aislamientos de *Fusarium graminearum* del ensayo de 2013 (rótulos vacíos). ■, ▲ y ●: corresponden a los aislamientos provenientes de malezas gramíneas, de malezas no-gramíneas y de cultivos invernales y estivales, respectivamente.

4.3.2. Producción de deoxinivalenol *in vivo*

La concentración de DON producido en las espigas de trigo puntualmente inoculadas con 31 aislamientos de *F. graminearum* y analizada mediante la técnica de ELISA difirió significativamente entre los distintos aislamientos ($F = 6,63$ y $p < 0,01$ y $F = 3,87$ y $p < 0,01$, para el año 2011 y 2013, respectivamente) (Tabla 8). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre la capacidad de producción de DON y el origen de los aislamientos.

Tabla 8: Resultados del análisis genotípico de tricotecenos y de producción de micotoxinas *in vivo* durante el ensayo a campo efectuado en los años 2011 y 2013 de los 31 aislamientos de *Fusarium graminearum* provenientes de distintas fuentes de inóculo.

Aislamiento	Genotipo *	DON (ppm)	
		Año 2011	Año 2013
Testigo	-	0,00 ^a	0,00 ^a
LH28	NIV	0,00 ^a	0,00 ^a
LH83	NIV	0,14 ^{ab}	0,00 ^a
LH121	NIV	0,19 ^{ab}	0,00 ^a
LH115	NIV	0,80 ^{abc}	0,10 ^{ab}
LH27	NIV	1,59 ^{abcd}	1,85 ^{abcd}
LH97	15-ADON	1,74 ^{abcde}	3,79 ^{bcd}
LH39	3-ADON	2,54 ^{abcdef}	2,40 ^{abcd}
LH110	15-ADON	2,57 ^{abcdef}	2,21 ^{abcd}
LH94	15-ADON	3,71 ^{abcdef}	1,87 ^{abcd}
LH142	3-ADON	3,88 ^{abcdef}	2,48 ^{abcd}
LH64	15-ADON	4,46 ^{abcdef}	4,60 ^d
LH130	15-ADON	4,47 ^{abcdef}	2,73 ^{abcd}
LH20	15-ADON	4,53 ^{abcdef}	2,96 ^{abcd}
LH101	15-ADON	4,84 ^{bcdef}	3,04 ^{abcd}
LH19	15-ADON	4,92 ^{bcdef}	4,14 ^{cd}
LH92	15-ADON	5,04 ^{cdef}	2,32 ^{abcd}
LH59	15-ADON	5,09 ^{cdef}	3,45 ^{abcd}
LH126	15-ADON	5,14 ^{cdef}	1,18 ^{abcd}
LH48	15-ADON	5,16 ^{cdef}	2,83 ^{abcd}
LH44	15-ADON	5,38 ^{cdef}	4,16 ^{cd}
LH107	15-ADON	5,40 ^{cdef}	3,62 ^{abcd}
LH108	15-ADON	5,52 ^{cdef}	3,11 ^{abcd}
LH105	15-ADON	5,54 ^{cdef}	2,00 ^{abcd}
LH55	15-ADON	5,78 ^{def}	1,05 ^{abcd}
LH103	15-ADON	5,86 ^{def}	3,91 ^{cd}
LH113	NIV	5,90 ^{def}	0,86 ^{abc}
LH128	15-ADON	6,13 ^{def}	2,45 ^{abcd}
LH15	15-ADON	6,15 ^{def}	1,39 ^{abcd}
LH135	15-ADON	6,39 ^{def}	2,06 ^{abcd}
LH71	15-ADON	6,45 ^{ef}	2,27 ^{abcd}
LH109	15-ADON	6,71 ^f	3,37 ^{abcd}

*Análisis genotípico de tricotecenos realizado mediante PCR múltiple (Starkey *et al.*, 2007- Capítulo II).

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Se encontró que el quimiotipo predominante fue entre los aislamientos analizados fue el DON (15-ADON y 3-ADON) y que hubo correspondencia entre el genotipo

(véase Capítulo II) y el quimiotipo de tricoteceno determinado para cada aislamiento con excepción de los aislamientos LH27 y LH113 (Tabla 8). No se confirmó la producción de nivalenol debido a que el kit de ELISA que se comercializa no es capaz de detectar dicha micotoxina.

No se encontró la presencia de micotoxinas en el control inoculado con agua (control negativo). Al igual que en el estudio de la agresividad a campo, no hubo relación entre los valores hallados de producción de toxinas entre los aislamientos en los distintos ensayos y su fuente de origen. Los niveles de DON obtenidos fueron mayores en el ensayo correspondiente al año 2011 en comparación al ensayo realizado en el año 2013. En el primer año de ensayo 25 aislamientos ($\approx 80\%$) tuvieron valores de toxina superior a 2 ppm, mientras que en el año 2013 este porcentaje se redujo al 64% de los aislamientos. Las concentraciones máximas de micotoxinas detectadas fueron las producidas por los aislamientos LH109 (6,71 ppm), LH71 (6,45 ppm) y LH135 (6,39 ppm) en el 2011, y LH64 (4,60 ppm) en el 2013 (tabla 8).

Cuando se analizó la correlación entre la severidad de la FET inducida por los aislamientos y la acumulación de DON *in vivo*, se encontró una correlación positiva en los dos años de ensayo ($r = 0,84$ y $p < 0,01$ para el año 2011, y $r = 0,62$ y $p < 0,01$ para el año 2013). Asimismo, de acuerdo al análisis de regresión, la relación entre la severidad de la enfermedad y la cantidad de DON en las espigas resultó lineal y de signo positivo tanto en el primer año ($R^2 = 0,7014$) como en el año 2013 ($R^2 = 0,3875$) (Figura 36), aunque en el año 2013 la relación entre estos 2 parámetros fue más débil, ya que hubieron aislamientos que provocaron un bajo porcentaje de infección en las espigas pero fueron capaces de producir niveles altos de DON.

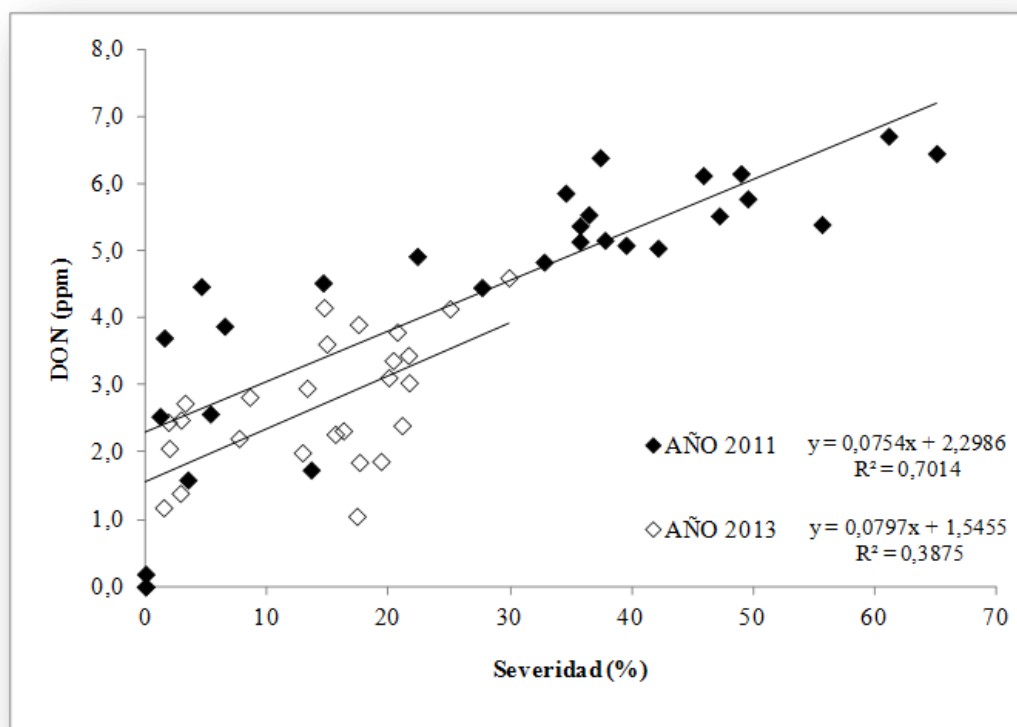


Figura 36: Análisis de regresión entre la severidad de la infección de la FET (%) y la concentración de DON (ppm) producida en las espigas por cada aislamiento en los ensayos correspondientes a los años 2011 y 2013.

4.3.3. Variabilidad genética de las poblaciones de *Fusarium graminearum*

Se analizó la variabilidad genética de los 61 aislamientos de *F. graminearum* estudiados bajo condiciones de campo (Tabla 3) mediante PCR y RFLP.

A partir del uso de los *primers* DGFg desarrollados se obtuvo un fragmento de ADN de 2427 bp para cada aislamiento. Éstos fueron digeridos con las enzimas de restricción RsaI, HinfI, Fnu4HI y Sau3AI. Sin embargo, 10 de los aislamientos analizados (LH15, LH28, LH83, LH94, LH96, LH115, LH121, LH125, LH126 y LH135) no se utilizaron en el armado del dendrograma debido a que los perfiles de bandas obtenidos con los mismos fueron demasiado tenues, lo que hizo confuso establecer la presencia o ausencia de determinados fragmentos.

Se obtuvieron 33 fragmentos de ADN como resultado de la digestión del fragmento DGFg amplificado con las 4 enzimas seleccionadas, de los cuales el 49% fueron polimórficos. La variabilidad genómica analizada mediante RFLP demostró que hubieron diferencias genómicas entre aislamientos. Sin embargo, no se verificó la existencia de una relación entre el perfil de RFLP obtenido para el fragmento analizado y la procedencia y/o la agresividad de los aislamientos. Así, los grupos resultantes incluyeron aislamientos provenientes de distintos orígenes y con distinta capacidad de inducción de los síntomas de la FET en los ensayos a campo.

La mayoría de los aislamientos exhibieron perfiles idénticos de RFLP (Figura 37). No obstante, con la información obtenida con las 4 enzimas, se pudieron diferenciar 3 grupos de aislamientos (Figura 38). El 82% de los aislamientos evaluados se agruparon junto al aislamiento de *F. graminearum* utilizado como control positivo (IV_{II} 3).

Aunque solo se detectó un limitado nivel de variabilidad genética con RFLP, la aplicación de la técnica fue efectiva en diferenciar aislamientos con distinto quimiotipo, ya que los aislamientos de quimiotipo NIV y 3-ADON (LH21, LH27, LH39, LH73, LH113, LH138 y LH142) se agruparon separados a los aislamientos de quimiotipo 15-ADON. Un tercer grupo, formado por los aislamientos LH22 y LH25 procedentes de malezas, se separó del resto de los aislamientos a pesar de haber sido caracterizados como productores de 15-ADON. Este grupo se diferenció a una distancia menor del grupo con mayor cantidad de individuos que el agrupamiento conformado con los aislamientos con quimiotipo NIV y 3-ADON, indicando una mayor similitud genética a los productores 15-ADON (Figura 38).

Los aislamientos LH22 y LH25 presentaron un patrón de bandas diferente en la digestión realizada con la enzima Fnu4HI en relación a los perfiles obtenidos con dicha enzima y los aislamientos que conformaron el grupo mayoritario.

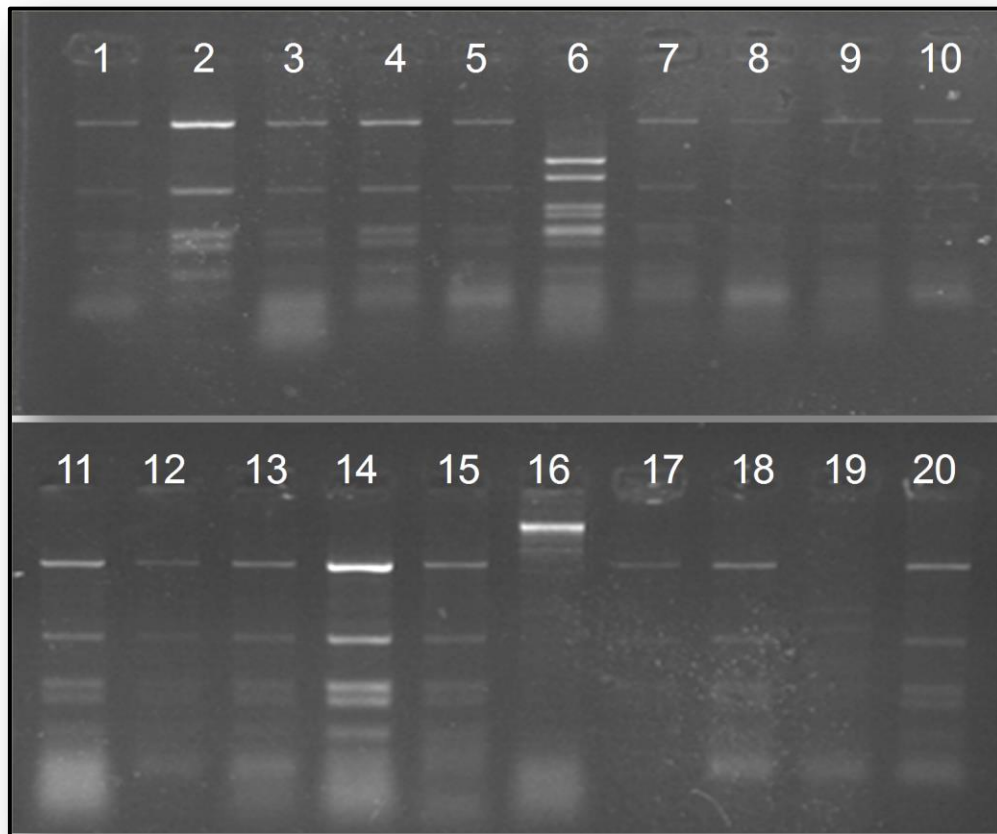


Figura 37: Ejemplo de geles obtenidos a partir de la digestión de los aislamientos de *Fusarium graminearum* con la enzima Sau 3AI. Las Calles 1 a 10 corresponden a aislamientos de la colección procedentes de malezas no gramíneas; la calle 11 corresponde al aislamiento IV₁₁3 (control positivo); y las calles 12 a 20 a aislamientos de la colección procedentes de malezas gramíneas.

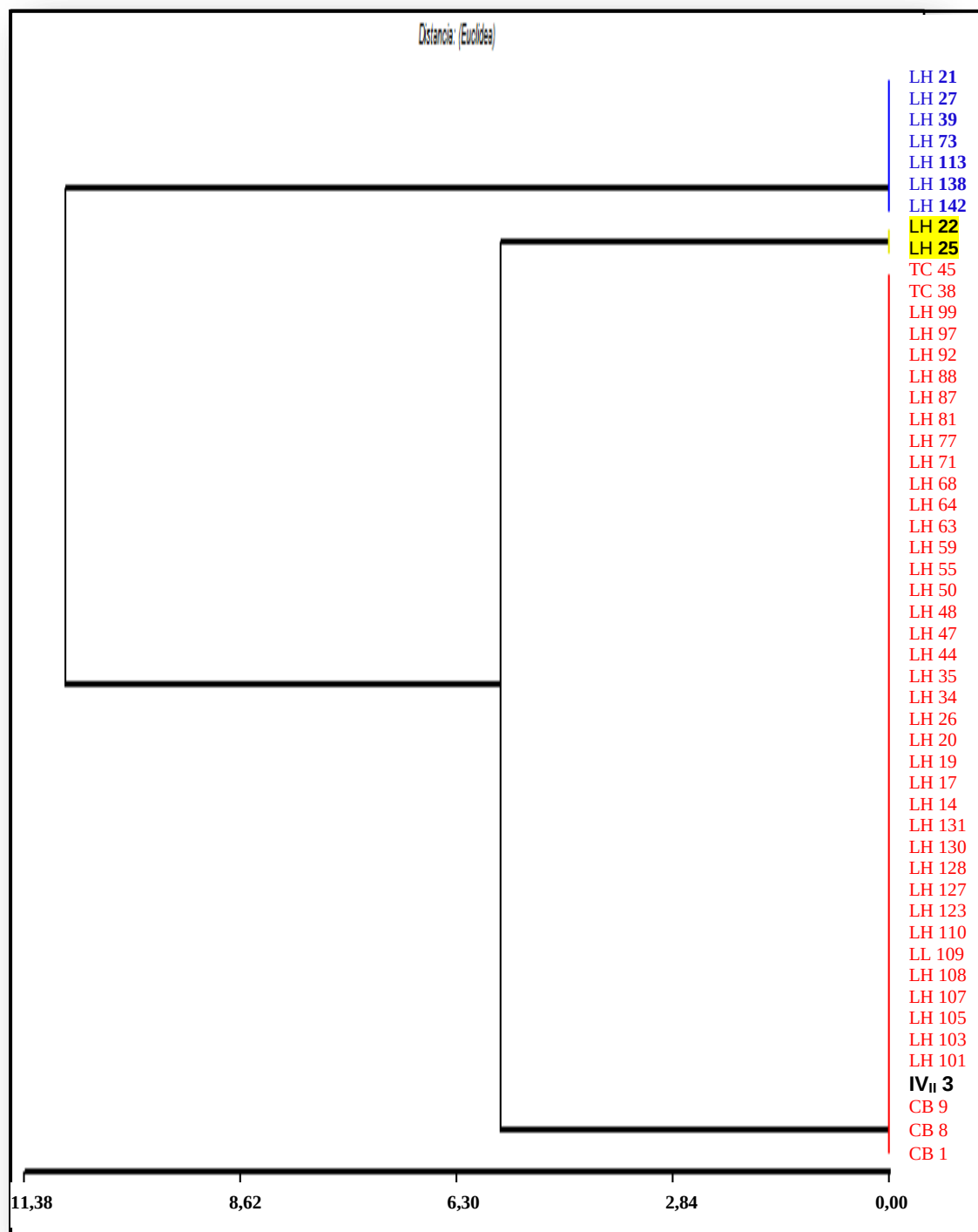


Figura 38: Dendrograma filogenético obtenido a partir de los fragmentos generados por 51 aislamientos de *Fusarium graminearum* con 4 enzimas de restricción (RFLP) del fragmento amplificado con los *primers* DGFg.

4.4. DISCUSIÓN

En el presente capítulo se estudiaron tanto la agresividad como la capacidad toxicogénica de un grupo de aislamientos de *F. graminearum* procedentes de distintos hospedantes alternativos. La agresividad fue analizada bajo condiciones de campo sobre espigas de trigo inoculadas artificialmente mediante la técnica de inoculación puntual. La técnica empleada fue eficaz para evaluar el comportamiento y dispersión del patógeno en las espigas tal como ocurre en la naturaleza. El ensayo correspondiente al año 2012 se vio afectado por la ocurrencia de infección natural en las espigas, reafirmando la alta dependencia de la FET de las condiciones ambientales presentes durante el periodo de floración (Moschini y Fortugno, 1996; Xu, 2003). Por otro lado, en los ensayos llevados a cabo en el año 2011 y 2013, no se observaron infecciones naturales sobre las espigas de los tratamientos analizados y/o las espigas control.

Los 61 aislamientos de *F. graminearum* fueron capaces de inducir la sintomatología característica de la FET sobre las espigas inoculadas y se encontraron diferencias significativas en la severidad provocada por los distintos aislamientos. No obstante, la existencia de interacción significativa entre la agresividad y el año de ensayo (2011 y 2013) sugiere que la mayor proporción de las diferencias encontradas en la severidad de la FET inducida por los aislamientos de *F. graminearum* estuvo influenciada tanto por el año del ensayo como por la severidad de los genotipos. Este resultado podría estar relacionado con la influencia del clima y a la falta de uniformidad en el cultivo, ya que las espigas no fueron homogéneas y hubo poco desarrollo y escaso número de macollos en el inicio del cultivo. Contrariamente, Miedaner *et al.* (1996) bajo condiciones controladas y Malbrán *et al.* (2012) bajo condiciones de campo obtuvieron valores significativos de variación en la agresividad con aislamientos de *F. graminearum* que presentaron una alta heredabilidad, sugiriendo que la varianza

observada no fue inducida por los años de los ensayos, sino que corresponde al genotipo de los aislamientos.

Las diferencias en la agresividad entre los aislamientos no se relacionaron con su fuente de origen (no se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de severidad y el hospedante del cual se aislaron), confirmando la importancia epidemiológica de todos los hospedantes alternativos de *F. graminearum*. Resultados similares fueron reportados sobre plantas de centeno (Miedaner *et al.*, 1996) al evaluar la severidad de aislamientos de este patógeno obtenidos de trigo, maíz, cebada, ray grass y *Paspalum* sp.

En concordancia con Malbrán *et al.* (2012), en la mayoría de las espigas la dispersión de los síntomas ocurrió desde el punto de inoculación hacia la base de las mismas. En la parte apical, las espigas experimentaron síntomas de desecamiento prematuro posiblemente, como proponen Bai y Shaner (1996), provocados por el taponamiento del sistema vascular de las plantas debido a la dispersión del hongo a lo largo del raquis.

La correlación entre el PMG y la severidad fue significativa y de signo negativo en ambos años de ensayo. Esto sugiere que la manifestación de los síntomas tuvo una alta asociación con el nivel de infección de los granos.

En la Argentina, solo 2 trabajos estudiaron la variación en la agresividad de poblaciones de *F. graminearum* aisladas de trigo de diferentes regiones trigueras, uno bajo condiciones controladas (Álvarez *et al.*, 2010) y el otro bajo condiciones de campo (Malbrán *et al.*, 2012). En ambos estudios se encontró variabilidad en la patogenicidad, sin embargo, Álvarez *et al.* (2010) no obtuvieron correlación entre la severidad, el AUDPC y el PMG. Contrariamente y en concordancia con el presente estudio, Malbrán *et al.* (2012) hallaron una estrecha correlación entre dichos parámetros.

Debido a las diferencias toxicológicas entre NIV y DON (Desjardins y Proctor, 2007) es importante determinar los quimiotipos de los aislamientos presentes en una región geográfica dada. El quimiotipo preponderante en los aislamientos estudiados fue el 15-ADON, en coincidencia con los resultados publicados previamente en la Argentina (Quiroga *et al.*, 1995; Dalcerro *et al.*, 1997; Rizzo *et al.*, 1997; Reynoso *et al.*, 2011; Malbrán *et al.*, 2014). El 87% de los aislamientos fueron capaces de producir DON en los granos y se encontró correspondencia entre la determinación de los quimiotipos y los resultados de genotipo de tricotecenos analizados en el capítulo II de esta tesis. Futuros estudios deberían realizarse para confirmar la producción de NIV en todos los aislamientos, principalmente los caracterizados con dicho genotipo (véase Capítulo II). Los aislamientos LH27 y LH113, fueron identificados mediante PCR como productores de NIV, sin embargo a través de la técnica de ELISA estos aislamientos mostraron valores de producción de DON, sugiriendo que los mismos podrían ser quimiotipo NIV/DON. Sepúlveda Díaz (2014) encontró en la Argentina aislamientos de *F. graminearum* capaces de producir ambas micotoxinas aunque en menor frecuencia en comparación con los productores de 3-ADON, 15-ADON, o NIV.

La mayoría de los aislamientos produjeron niveles de DON en las espigas mayores a 2 ppm, valor que excede en 2 veces los valores recomendados por la FDA para consumo humano y los niveles de tolerancia para la comercialización propuestos por la Unión Europea.

Numerosos trabajos realizados en diferentes países evaluaron la relación entre la agresividad y la producción de micotoxinas. Carter *et al.* (2002) y Walker *et al.* (2001) en EE.UU. no encontraron una relación entre estos 2 parámetros. Por otra parte en Europa (Miedaner *et al.*, 2000; Mesterházy, 2002; Cumagun *et al.*, 2004; Talas *et al.*, 2012) y en la Argentina (Malbrán *et al.*, 2014) se encontró una estrecha correlación

entre la agresividad observada y la concentración de DON. Con respecto a ésto, Proctor *et al.* (1995) propusieron que los tricotecenos producidos por *F. graminearum* actuarían como factores de agresividad durante su parasitismo en el hospedante susceptible. En el presente estudio se encontró una relación moderada entre la severidad alcanzado por cada aislamiento y la concentración de DON generada *in vivo*, a pesar de que algunos aislamientos produjeron niveles medios a altos de toxina y bajos porcentajes de severidad. Estos resultados se corresponden con trabajos previos (Walker *et al.*, 2001; Talas *et al.*, 2012; Malbrán *et al.*, 2014). De acuerdo a Desjardins (2006), el DON es más fitotóxico que el NIV para el trigo. Esto confirmaría por qué los aislamientos con quimiotipo NIV pertenecieron a aquellos que indujeron menores niveles de severidad, con excepción del aislamiento LH113, que en el año 2011, mostró un porcentaje de infección de la FET de 55% lo que corroboraría, como se mencionó anteriormente, que dicho aislamiento tenga la capacidad de producir DON y NIV.

Adicionalmente la diferencia observada en la cantidad de DON producido entre los 2 años podría deberse a factores tales como las lluvias y la humedad relativa, considerando que Hart *et al.* (1984) mencionan que los periodos de humedad cercana al 90% incrementan la severidad de la FET como también la producción de DON. Al respecto Lori *et al.* (2003) reportaron que los mayores niveles de toxina estuvieron relacionados con la contaminación de los granos con *Fusarium* spp. y con los factores climáticos.

La variabilidad genotípica de aislamientos de *F. graminearum* fue examinada. A diferencia de reportes previos que mencionan una gran heterogeneidad genética entre los aislamientos de *F. graminearum* (Gale *et al.*, 2002; Zeller *et al.*, 2004), en este estudio no se observó una alta diversidad genética entre los mismos. Similares resultados fueron obtenidos por Ouellet y Seifert (1993) al caracterizar aislamientos de

F. graminearum de Canadá usando RAPD y RFLP. Sin embargo, las diferencias encontradas en los perfiles de digestión del fragmento DGFg de ADN genómico con 4 enzimas de restricción permitió agrupar a los aislamientos en tres grupos. Más aún, uno de los grupos obtenidos incluyó exclusivamente a los aislamientos de quimiotipo NIV y 3-ADON. El grupo mayor de aislamientos correspondió a aquellos de quimiotipo 15-ADON.

Por otra parte, a partir de la relación hallada entre la variabilidad genómica y los quimiotipos se puede sugerir que los aislamientos correspondientes a los 2 grupos con menos individuos no pertenecerían al linaje 7. En la Argentina hay evidencias de cepas de *F. meridionale* aisladas de maíz productoras de NIV (Sampietro *et al.*, 2011). Este resultado podría indicar que con los *primers* DGFg y las 4 enzimas utilizadas se podrían diferenciar aislamientos con distinto quimiotipo y/o diferente linaje dentro del complejo *F. graminearum*. Sin embargo, la aplicación de esta técnica para diferenciación de aislamientos por quimiotipo, podría no resultar adecuada, ya que no se encontró ningún gen asociado al *cluster Tri* en la secuencia correspondiente al fragmento DGFg. Por otro lado, serían necesarios estudios futuros para confirmar a que linaje corresponden los aislamientos para llevar a cabo el diseño de herramientas moleculares útiles de diagnóstico e identificación de especies dentro del complejo *F. graminearum*.

Con respecto a la severidad de los síntomas, no se encontró relación entre el grado de patogenicidad y los perfiles genómicos obtenidos a partir de RFLP. Tampoco hubo relación entre los perfiles de bandas y el origen de los aislamientos. Resultados similares fueron obtenidos por Ouellet y Seifert (1993) y Desjardins *et al.* (2004) cuando analizaron la variabilidad genética de poblaciones de *F. graminearum* procecentes de arroz, maíz y trigo.

4.5. CONCLUSIÓN

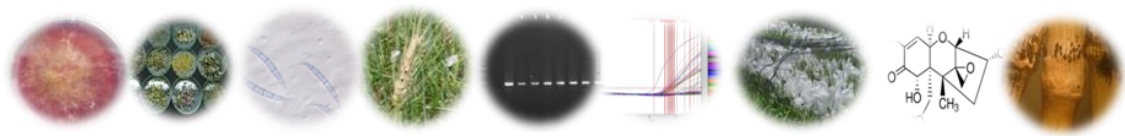
La información presente en este capítulo sobre la capacidad patogénica, la capacidad toxicogénica, y la variabilidad genómica de aislamientos de *F. graminearum* obtenidos de diferentes hospedantes (malezas y cultivos estivales e invernales) es el primer trabajo realizado en Argentina.

Todos los aislamientos indujeron los síntomas característicos de la FET sobre espigas de trigo inoculadas mediante inoculación puntual bajo condiciones de campo y la agresividad fue independiente del origen del aislamiento. La mayoría de los aislamientos fueron capaces de producir niveles de DON *in vivo* por encima de los límites sugeridos para el consumo humano.

Los parámetros PMG, AUDPC, y producción de DON *in vivo* se relacionaron con los valores de severidad estimados visualmente en las espigas, confirmando su utilidad en el estudio de la capacidad infectiva diferencial de poblaciones de *F. graminearum*.

Con respecto al estudio de la variabilidad genética, aunque se obtuvieron escasas diferencias, la técnica permitió distinguir aislamientos de *F. graminearum* con distintos quimiotipos. La variación encontrada no se relacionó ni con la severidad de los síntomas ni con la fuente de procedencia de los aislamientos.





CAPÍTULO V

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES FINALES

5.1. Discusión integradora

El cultivo de trigo es una de las mayores producciones agrícolas tanto en la Argentina como a nivel mundial. Este cultivo puede verse afectado por enfermedades de distinta etiología. Sin embargo, entre las patologías de origen fúngico, la fusariosis de la espiga (FET) es una de las más graves de este cultivo y de otros cereales menores, debido a que además de provocar mermas en la producción y en el rendimiento, contamina los granos con micotoxinas (Kendrick, 1992). Estas moléculas son producidas por el patógeno durante el proceso patogénico, afectando la calidad de los granos y comprometiendo su utilización para el consumo humano.

En la Argentina el principal agente causal de esta patología es *Fusarium graminearum* Schwabe, cuyo teleomorfo es *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch (de Galich, 1997; Lori *et al.*, 2003).

La FET es una enfermedad de difícil control y manejo, debido a la capacidad de *G. zeae* de sobrevivir saprofiticamente; a la presencia y dispersión del inóculo a grandes distancias; al amplio rango de hospedantes alternativos y, a la dependencia de esta patología de las condiciones ambientales. Por ello y teniendo en cuenta que en la actualidad no se han encontrado genotipos de trigo resistentes, ni alta eficiencia en el uso del control químico, el conocimiento de los diferentes hospedantes alternativos de *F. graminearum*, como así también el aporte de información sobre la dinámica del inóculo junto a estudios de diversidad patogénica, toxicogénica y genética de poblaciones del patógeno, podría resultar relevante para desarrollar estrategias de manejo tendientes a reducir el desarrollo de epidemias de la FET en los campos y el riesgo de contaminación de los granos con micotoxinas.

En la presente Tesis se obtuvieron 1144 aislamientos de *F. graminearum* procedentes de diferentes hospedantes en las cercanías a cultivos de trigo implantados en campos próximos a la localidad de La Plata, Provincia de Buenos Aires y se seleccionaron 132 aislamientos para la conformación de la colección. La identificación taxonómica se realizó acorde a las características morfológicas y culturales, y al análisis de la ontogenia conídica de los cultivos. Como así también mediante el uso de PCR con *primers* especie-específicos para *F. graminearum* (Nicholson *et al.*, 1998). Si bien previamente se mencionó que *F. graminearum* comprende un complejo de al menos 15 especies (O'Donnell *et al.*, 2004; 2008; Starkey *et al.*, 2007; Yli-Mattila *et al.*, 2009; Sarver *et al.*, 2011), los aislamientos obtenidos fueron identificados solamente como *F. graminearum sensu lato*.

El genotipo de tricotecenos fue evaluado sobre la colección de aislamientos realizada mediante una PCR múltiple (Starkey *et al.*, 2007). Este análisis es el primero llevado a cabo con aislamientos de malezas en el país. Aunque se encontraron los 3 quimiotipos posibles, la mayoría de los aislamientos fueron potenciales productores de 15-ADON. En la Argentina, hay evidencias que sugieren que este sería el tricoteceno predominante entre poblaciones de *F. graminearum* (Álvarez *et al.*, 2009; Malbrán *et al.*, 2014). Cabe destacar que casi la totalidad de los aislamientos pertenecientes al quimiotipo NIV y 3-ADON fueron recuperados de malezas, lo que podría reforzar la hipótesis sugerida por Pasquali y Migueli (2014), de una posible especialización de los quimiotipos en ciertos hospedantes.

Por primera vez en la literatura se describieron 54 especies de malezas y 16 familias botánicas como hospedantes alternativos de *F. graminearum*. Adicionalmente, se comprobó al igual que en Brasil (Reis *et al.*, 1988), que el inóculo del patógeno está presente en los campos durante todo el año, ya sea en malezas como en residuos de

cultivos dejados sobre la superficie del suelo, de acuerdo a los resultados obtenidos en el Capítulo II y III. A partir de estos resultados se cumplió parcialmente el objetivo de - ***Dimensionar el rol que cumplen las malezas como hospedantes alternativos y con ello como fuente de inóculo*** - , ya que no se pudo demostrar que tipo de estructura fúngica se encuentra en las malezas y cuál es la capacidad de producción de inóculo de las mismas.

Se halló en concordancia con reportes previos que los rastrojos actúan como fuentes de inóculo para la FET durante largos periodos (Pereyra y Dill-Macky, 2008; Hogg *et al.*, 2010). Según este estudio al menos 14 meses postcosecha para los residuos de soja y 18 meses postcosecha para los cultivos de trigo pan y fideo, tritordeum, cebada y centeno.

La dinámica de *F. graminearum* sobre los restos culturales bajo condiciones naturales fue llevada a cabo mediante 2 metodologías, una convencional y una molecular. En ambas se pudo confirmar cuantitativamente que la presencia de inóculo en todos los muestreos realizados fue disminuyendo a lo largo del tiempo junto a la descomposición de los rastrojos. A través de la siembra en placa se comprobó que *F. graminearum*/*G. zeae* permaneció viable en los residuos de cultivos en el periodo de tiempo en el que se realizaron los ensayos. La aplicación de PCR en tiempo real fue posible gracias a la optimización de un protocolo de extracción de ADN fúngico a partir de las muestras de rastrojos, que fue eficaz y no presentó inhibidores que interfirieran en las amplificaciones. Por medio de las 2 metodologías se halló una tendencia similar mostrando una reducción significativa del inóculo entre el primero y el resto de los meses. Estos resultados fueron coincidentes con los publicados en trabajos previos realizados en el Hemisferio Norte con poblaciones del género *Fusarium* (Köhl *et al.*, 2007; Hogg *et al.*, 2010).

Con respecto a los residuos de los distintos cultivos, se pudo observar que las diferencias en la cantidad de copias de ADN de *F. graminearum*, así como de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), podrían estar relacionadas con las estructuras de cada cultivo. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los diversos sustratos luego de los 6 meses postcosecha. Este resultado podría deberse al incremento de la relación Carbono/Nitrógeno en los residuos, al tamaño y distribución de las partículas de residuos, al pH del suelo y/o al contenido de O₂ (Cook y Baker, 1983; Knapp *et al.*, 1983). En los residuos culturales de la soja se obtuvo una cantidad de colonias de *F. graminearum* menor a la cuantificada en los cultivos invernales. Pero se encontró una relación entre la cantidad de inóculo del cultivo invernal previo y la cantidad de inóculo presente a posteriori sobre los residuos de soja. Con estos resultados se cumplió el objetivo de - ***Investigar in vivo la dinámica de poblaciones de Fusarium graminearum (capacidad de colonización y supervivencia) en residuos de diferentes cultivos-***.

En el Capítulo IV se analizó la variabilidad de la agresividad de los aislamientos de *F. graminearum* procedentes de distintas fuentes de origen. Este estudio se realizó bajo condiciones de campo mediante pruebas de patogenicidad sobre espigas de trigo inoculadas puntualmente. Todos los aislamientos de *F. graminearum* evaluados fueron capaces de inducir los síntomas característicos de la FET sobre las espigas inoculadas. Los aislamientos produjeron niveles variables de severidad de la enfermedad, sin embargo los resultados obtenidos en los 2 años de ensayos estuvieron influenciados principalmente por el año del ensayo y en menor proporción por los genotipos de los aislamientos. A pesar de ello, en ninguno de los 2 años se encontró correspondencia entre las diferencias en la agresividad inducidas por los aislamientos y la fuente de procedencia de los mismos. No obstante, se pudo cumplir el objetivo de -***Determinar la***

potencialidad para provocar la FET a partir de aislamientos provenientes de distintas fuentes-.

La severidad de los síntomas provocados por los diferentes aislamientos de *F. graminearum* estuvo correlacionada con el PMG, encontrándose una relación negativa entre estas 2 variables. Por el contrario, se halló una correlación positiva entre el porcentaje de severidad y el AUDPC.

Respecto del análisis de la capacidad toxicogénica *in vivo* realizado por medio de la aplicación de la técnica de ELISA se encontró que el 87% de los aislamientos analizados produjo DON sobre las espigas inoculadas. El porcentaje restante (13%) no fue capaz de generar concentraciones detectables de DON. Los aislamientos incluidos en ese grupo fueron caracterizados mediante PCR como productores de NIV en el Capítulo II, por lo tanto pudo comprobarse la correspondencia entre los resultados hallados con las 2 técnicas al evaluar tanto el quimiotipo como en el genotipo de los aislamientos. La concentración de DON se correlacionó con la severidad de los síntomas inducidos por cada aislamiento, demostrando que la contaminación de los granos de trigo con micotoxinas es una consecuencia de la severidad de los síntomas de la FET, al igual que Malbrán *et al.* (2014) con poblaciones de *F. graminearum* aisladas de diferentes zonas trigueras de la Argentina. En paralelo con los resultados mencionados anteriormente sobre el parámetro PMG, se cumplió con los objetivos de - ***Cuantificar la capacidad de producción de tricotecenos de los aislamientos in vivo - y - Correlacionar la acumulación de tricotecenos con la agresividad y la reducción del rendimiento-.***

La diversidad genética de los aislamientos fue evaluada con la aplicación de RFLP en el fragmento DGFg. No se encontró un alto grado de variabilidad genética

entre los aislamientos ensayados a campo, ya que la mayoría presentó idénticos perfiles de bandas luego de la digestión realizada con las 4 enzimas.

De acuerdo a la organización del dendrograma, se pudo demostrar que no hubo relación entre la diversidad genética y la fuente de origen de los aislamientos. Sin embargo, la técnica empleada permitió diferenciar a los aislamientos con quimiotipo 15-ADON de los aislamientos productores de 3-ADON y NIV. Con ello y sumado a la identificación taxonómica con *primers* especie-específicos y al análisis genotípico de tricotecnos, se cumplió el objetivo de - ***Caracterizar molecularmente las poblaciones de *Fusarium graminearum* según su fuente de inóculo***- .Si bien se observaron características comunes entre los aislamientos no se encontraron características moleculares específicas en los mismos de acuerdo a su hospedante de procedencia.

5.2. Conclusiones finales

- Se han descrito por primera vez 54 especies de malezas como hospedantes alternativos de *Fusarium graminearum*.
- La utilización de metodologías moleculares ha posibilitado la identificación y caracterización de los aislamientos de *Fusarium graminearum* procedentes de distintos hospedantes en forma precisa.
- Se optimizó una metodología basada en CTAB que aportó los mejores resultados en términos de eficiencia, reproducibilidad y costos, constituyendo una herramienta útil para obtener ADN de *Fusarium graminearum* de alta calidad partiendo de restos culturales.

- Se pudo estudiar la dinámica de *Fusarium graminearum* / *Gibberella zeae* a partir de muestras complejas, como los rastrojos, mediante siembra en placa y PCR en tiempo real.
- El protocolo de PCR en tiempo real específico para *Fusarium graminearum* / *Gibberella zeae* permitió la identificación y cuantificación precisa de esta especie en residuos de distintos cultivos validando así su aplicación en estudios epidemiológicos.
- Por primera vez en la Argentina se encontraron aislamientos de *Fusarium graminearum* con quimiotipo 15-ADON, 3-ADON y NIV procedentes de malezas. Y se demostró que la caracterización de los quimiotipos tanto por PCR como por ELISA fueron coincidentes.
- Se verificó la importancia epidemiológica de los distintos hospedantes de *Fusarium graminearum*, más allá de los cereales, ya que todos los aislamientos utilizados fueron capaces de desarrollar los síntomas característicos de la Fusariosis de la espiga y producir DON en los granos de las espigas inoculadas bajo condiciones de campo y la agresividad fue independiente del origen del aislamiento.
- Se encontraron diferencias genéticas entre aislamientos, pero no existió una clara relación entre el perfil de RFLP y la fuente de procedencia y/o la agresividad de los síntomas de la Fusariosis de la espiga inducida por los aislamientos.

- En base a los resultados obtenidos no se rechazan las hipótesis planteadas: ***“Las fuentes o reservorios de inóculo son numerosas y diversas”***; ***“Los distintos rastros de cultivos antecesores alteran la supervivencia y aumentan el potencial infectivo de *Fusarium graminearum*.”*** y que ***“De acuerdo a la fuente de inóculo las poblaciones de *Fusarium graminearum* no poseen una capacidad diferencial para provocar la enfermedad”***. Sin embargo, la hipótesis de que ***“Las poblaciones del patógeno tienen una amplia variabilidad genética”*** se rechaza conforme a las técnicas utilizadas y los datos obtenidos en el presente trabajo

5.3. Interrogantes surgidos y vinculados con el presente estudio

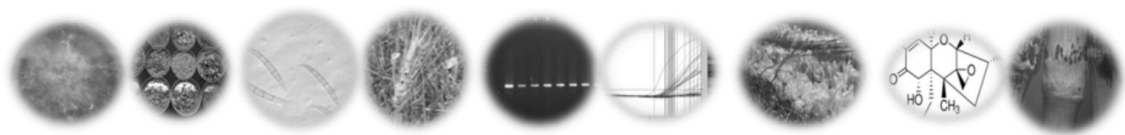
La fusariosis de la espiga es una enfermedad de difícil control y si bien ninguna práctica de manejo por sí sola es efectiva, probablemente la adopción de un conjunto de prácticas culturales generará un manejo al menos parcialmente exitoso, siendo el objetivo más importante la disminución de la carga de inóculo. En virtud de lo expresado el éxito del control cultural dependerá principalmente de la comprensión de la biología del patógeno y su interacción con los diferentes hospedantes y factores de producción. Por ello es interesante resolver algunos interrogantes derivados de la presente Tesis:

- En la Argentina, las condiciones climáticas favorecen la presencia de malezas a lo largo del año, y conforme a los resultados obtenidos en el Capítulo II, futuras investigaciones son necesarias para determinar el mecanismo de infección empleado por el patógeno en su interacción con las malezas.

- Los resultados obtenidos en el estudio de la dinámica de *Fusarium graminearum*/*Gibberella zeae* en rastrojos de cultivos demuestran una disminución considerable de inóculo en los distintos sustratos luego de los 6 meses postcosecha. En este sentido, sería importante establecer el mecanismo que conduce a esta significativa reducción del inóculo. Además es de gran relevancia determinar si la cantidad de inóculo detectada sobre los rastrojos en los diferentes eventos de muestreo resulta suficiente para provocar la FET en el cultivo de trigo, principalmente cuando las condiciones ambientales no son favorables para el desarrollo de la enfermedad.
- Respecto del análisis de los quimiotipos de los aislamientos de *F. graminearum* es fundamental realizar estudios para comprobar la producción de NIV tanto en los aislamientos caracterizados con genotipo NIV como en el resto, para identificar correctamente los quimiotipos presentes.
- El agrupamiento surgido del análisis genético mediante RFLP permitió diferenciar a los aislamientos con quimiotipo 15-ADON del resto, sin embargo, el fragmento digerido estudiado no contenía ninguno de los genes involucrados en la síntesis de tricotecenos. Sería interesante determinar, si los aislamientos testeados pertenecen a distintas especies dentro del complejo *Fusarium graminearum*, para poder desarrollar herramientas de diagnóstico que permitan identificar a los distintos linajes que comprenden el complejo.
- Por último, debido a la influencia del año del ensayo en la variación observada con respecto a la severidad de los síntomas de la FET inducida por los distintos

aislamientos, sería significativo evaluar la patogenicidad nuevamente sobre espigas de trigo bajo condiciones de campo para cuantificar o determinar niveles de agresividad entre aislamientos. Aunque en la presente Tesis se haya propuesto que la fuente de inóculo no aportaría ventajas o desventajas en la capacidad para inducir la FET.





BIBLIOGRAFÍA

Sitios WWW (World Wide Web)

- ✓ Bolsa de Comercio de Rosario- (en línea)
<www.bcr.com.ar/Pages/Publicaciones/infoboletinsemanal.aspx?IdArticulo=796>
(último acceso 16.11.14).
- ✓ Broad Institute- Fusarium Comparative Database- (en línea)
<www.Broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group/MultiHome.html>
- ✓ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento- EMBRAPA trigo- (en línea)
<http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do40_2.htm> (último acceso 16.11.14).
- ✓ Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca-Sistema Integrado de Información Agropecuaria-(en línea) <http://www.siiia.gob.ar/sst_pcias/estima/estima.php>
(último acceso 16.11.14).
- ✓ Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca-Sistema Integrado de Información Agropecuaria-(en línea) <<http://www.siiia.gob.ar/informes>> (último acceso 16.11.14).
- ✓ The American Phytopathological Society-(en línea)
<www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/Fusarium.aspx> (último acceso 16.11.14).
- ✓ Tutiempo Network, S.L (Copyright ©.)- (en línea) <www.tutiempo.net>
- ✓ <www.trigoargentino.com.ar> (en línea) (último acceso 16.11.14).

Artículos y Libros

- AAPRESID, 2012. Evolución de la superficie en Siembra Directa en Argentina. Disponible en: http://www.aapresid.org.ar/wp-content/uploads/2013/02/aapresid.evolucion_superficie_sd_argentina.1977_a_2011.pdf (último acceso 16.11.14).
- Adams, G.C. y Hart, L.P. 1989. The role of deoxinivalenol and 15-acetyldeoxynivalenol in pathogenesis of *Gibberella zeae*, as elucidated through protoplasts fusions between toxigenic and nontoxigenic strains. *Phytopathology*, 79: 404-408.
- Agrios, G.N. 2005. Plant pathology. Academic Press, San Diego, California, EE.UU.
- Ainsworth, G.C. 1971. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi, sixth ed. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, United Kingdom.
- Akinsanmi, O.A., Backhouse, D., Simpfendorfer, S. y Chakraborty, S. 2008. Mycelial compatibility reactions of Australian *Fusarium graminearum* and *F.*

- pseudograminearum* isolates compared with AFLP groupings. *Plant Pathology*, 57: 251–261.
- Alexander, N.J., McCormick, S.P., Waalwijk, C., Van der Lee, T. y Proctor, R.H. 2011. The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium*. *Fungal Genetics and Biology*, 48: 485–495.
- Ali, S., Rivera, V.V. y Secor, G.A. 2005. First report of *Fusarium graminearum* causing dry rot of potato in North Dakota. *Plant Disease*, 89: 105.
- Álvarez, C.L., Azcarate, M.P. y Fernández Pinto, V. 2009. Toxigenic potential of *Fusarium graminearum sensu stricto* isolates from wheat in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 135: 131–135.
- Álvarez, C.L., Soma, S., Moretti, A. y Fernández Pinto, V. 2010. Aggressiveness of *Fusarium graminearum sensu stricto* isolates in wheat kernels in Argentina. *Journal of Phytopathology*, 158: 173–181.
- Álvarez, C.L., Somma, S., Proctor, R.H., Stea, G., Mulè, G., Logrieco, A.F., Pinto, V.F. y Moretti, A. 2011. Genetic diversity in *Fusarium graminearum* from a major wheat-producing region of Argentina. *Toxins*, 3: 1294–1309.
- Anadón, A., Céspedes, A., Caballero, V., Martínez-Larrañaga, M.R. y Martínez, M.A. 2005. Micotoxinas de mayor impacto en la producción Porcina e implicaciones para la salud pública. *Avances en tecnología porcina*, II: 33-60.
- Andersen, A.L. 1948. The development of *Gibberella zeae* head blight of wheat. *Phytopathology*, 38: 595–611.
- Aoki, T. y O'Donnell, K. 1999. Morphological and molecular characterisation of *Fusarium pseudograminearum* sp. nov., formally recognized as the Group 1 population of *F. graminearum*. *Mycologia*, 91: 597–609.
- Arthur, J.C. 1891. Wheat scab. *Indiana Agricultural Experimental Station, Bulletin* 36: 129–132.
- Bai, G.H. y Shaner, G. 1994. Scab of Wheat: Prospects for Control. *The American Phytopathological Society*, 78: 760–766.
- Bai, G.H. y Shaner, G. 1996. Variation in *Fusarium graminearum* and cultivar resistance to wheat scab. *Plant Disease*, 80: 975-979.
- Bai, G.H., Desjardins, A.E. y Plattner, R.D. 2002. Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. *Mycopathologia*, 153: 91–98.

- Bharmauria, V., Verma, V., Narang, N. y Sharma, S. 2010. Efficient DNA isolation from *Embllica officinalis* for effective PCR. Scientific Research and Essays, 51: 105–109.
- Bhat, R.V., Ramakrishna, Y., Beedu, S.R. y Munshi, K.L. 1989. Outbreak of trichothecene mycotoxicosis associated with consumption of mould-damaged wheat products in Kashmir valley India. The Lancet, 7: 35–37.
- Bilai, V.I. 1955. The *Fusaria* (Biology and Systematics). Publ. Academic of Sciences Ukania. SSR, Kiev, USSR.
- Bilai, V.I. 1970. Experimental morphogenesis in the fungi of the genus *Fusarium* and their taxonomy. Annales Academy of Sciences Fenn. A, IV Biologica, 168: 7-18.
- Blandino, M., Pilati, A., Reyneri, A. y Scudellari, D. 2010. Effect of maize crop residue density on *Fusarium* head blight and on deoxynivalenol contamination of common wheat grains. Cereal Reseach Communication, 38: 550–559.
- Blandino, M., Haidukowski, M., Pascale, M., Plizzari, L., Scudellari, D. y Reyneri, A. 2012. Integrated strategies for the control of *Fusarium* head blight and deoxynivalenol contamination in winter wheat. Field Crops Research, 133: 139-149.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth mycological institute, Kew Surrey, United Kingdom.
- Bowden, R. L. y Leslie, J. F. 1996. Diversity and sexuality in *Gibberella zeae*. *Fusarium* Head Scab: Global Status and Future Prospects. Dubin, H. J., Gilchrist, L., Reeves, J. y McNab, A. (eds). CIMMYT, Mexico, Pp. 35-39
- Bowden, R.L. y Leslie, J.F. 1999. Sexual recombination in *Gibberella zeae*. Phytopathology, 89: 182–188.
- Brandfass, C. y Karlovsky, P. 2006. Simultaneous detection of *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* in plant material by duplex PCR with melting curve analysis. BMC Microbiology, 6: 4.
- Brian, P.W., Dawkins, A.W., Grove, J.F., Hemming, H.G., Lowe, D. y Norris. G.L.F. 1961. Phytotoxic compounds produced by *Fusarium equiseti*. Journal of Experimental Biology, 12: 1-12.
- Broders, K.D., Lipps, P.E., Paul, P.A. y Dorrance, A.E. 2007. Evaluation of *Fusarium graminearum* associated with corn and soybean seed and seedling disease in Ohio. Plant Disease, 91: 1155–1160.

- Brown, N.A., Urban, M., Van de Meene, A.M.L. y Hammond-Kosack, K.E., 2010. The infection biology of *Fusarium graminearum*: defining the pathways of spikelet to spikelet colonisation in wheat ears. *Fungal Biology*, 114: 555-571.
- Buell, C.B. y Weston, W.H. 1947. Application of the mineral oil conservation method to maintaining collections of fungous cultures. *American Journal of Botany*, 34: 555-561.
- Buerstmayr, H., Lemmens, M., Grausgruber, H. y Ruckenbauer, P. 1996. Scab resistance of international wheat germplasm. *Cereal Research Communications*, 24: 195-202.
- Buerstmayr, H., Ban, T. y Anderson, J. A. 2009. QTL mapping and marker-assisted selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat: A review. *Plant Breeding*, 128: 1-26.
- Burlakoti, R.R., Estrada, R., Rivera, V.V., Boddada, A., Secor, G.A. y Adhikari, T.B. 2007. Real-time PCR quantification and mycotoxin production of *Fusarium graminearum* in wheat inoculated with isolates collected from potato, sugar beet, and wheat. *Phytopathology*, 97: 835-841.
- Bushnell, W.R., Hazen, B.E. y Pritsch, C. 2003. Histology and physiology of *Fusarium* head blight. En: Leonard, K.J. y Bushnell, W.R. Eds. *Fusarium Head Blight of wheat and barley*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. Pp. 44-83.
- Cabrera, A.L. y Zardini, E.M., 1993. Manual de la flora de los alrededores de Buenos Aires. ACME, Buenos Aires, Argentina.
- Cappellini, R.A. y Peterson, J.L. 1965. Macroconidium formation in submerged cultures by a non-sporulating strain of *Gibberella zeae*. *Mycologia*, 57: 962-966.
- Carmona, M.A., Pioli, R. y Melo Reis, E. 1999. Malezas hospedantes de hongos necrotrofos causantes de enfermedades en trigo y cebada cervecera en la región pampeana. *Revista de la Facultad de Agronomía, UBA*, 19: 105-110.
- Carrera, C.J.M. 1954. El género *Fusarium*. Estudio e identificación de especies de la República Argentina y países limítrofes. *Revista de Investigaciones Agrícolas*, Tomo VIII.
- Carter, J.P., Rezanoor, H.N., Desjardins, A.E. y Nicholson, P. 2000. Variation in *Fusarium graminearum* isolates from Nepal associated with their host of origin. *Plant Pathology*, 49: 452-460.
- Carter, J.P., Rezanoor, H.N., Holden, D., Desjardins, A.E., Plattner, R.D. y Nicholson, P. 2002. Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of *Fusarium graminearum*. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 573-583.

- Champeil, A., Fourbet, J.F., Doré, T. y Rossignol, L. 2004. Influence of cropping system on *Fusarium* head blight and mycotoxin levels in winter wheat. *Crop Protection*, 23: 531–537.
- Chandler, E.A., Simpson, D.R., Thomsett, M.A. y Nicholson, P. 2003. Development of PCR assays to Tri7 and Tri13 trichothecene biosynthetic genes, and characterization of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62: 355–367.
- Chester, F.D. 1890. The scab of wheat. Delaware Agricultural Experimental Station, Report 3: 89–90.
- Chongo, G., Gossen, B.D., Kutcher, R., Gilbert, J., Turkington, T.K., Fernandez M.R., y McLaren, D. 2001. Susceptibility of seedling roots of various crop species to *Fusarium graminearum* from wheat heads. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 23: 132–137.
- Clear, R.M. y Abramson, D. 1986. Occurrence of *Fusarium* head blight and deoxynivalenol in two samples of Manitoba wheat in 1984. *Canadian Plant Disease Survey*, 66: 9–11.
- Cook, R.J. y Baker, K.F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. APS Press, St Paul. Pp. 539.
- Cumagun, C.J.R., Bowden, R.L., Jurgenson, J.E., Leslie, J.F. y Miedaner, T. 2004. Genetic mapping of pathogenicity and aggressiveness of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) toward wheat. *Phytopathology*, 94: 520–526.
- Cumagun, C.J.R. y Miedaner, T. 2004. Segregation for aggressiveness and deoxynivalenol production of a population of *Gibberella zeae* causing head blight of wheat. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 789–799.
- Dalcero, A., Torres, A.M., Etcheverry, M., Chulze, S.N. y Varsavsky, E. 1997. Occurrence of deoxynivalenol and *Fusarium graminearum* in Argentinian wheat. *Food Additives and Contaminants*, 14: 11–14.
- de Galich, M.T.V. 1989. Importancia y difusión de la fusariosis del trigo en Argentina. *En: Kholi, M.M. (ed.). Taller sobre la fusariosis de la espiga en América del Sur. CIMMYT. México D.F. Pp. 7–26.*
- de Galich, M.T.V. y Galich, A. 1994. Enfermedades del trigo en el área sur de Santa Fe y Córdoba correspondientes a la subregión II Norte. Informe para Extensión N° 5. EEA, Marcos Juárez. INTA. Córdoba, Argentina.
- de Galich, M.T.V. 1997. *Fusarium* head blight in Argentina. *En: Dubin, H.J., Gilchrist, L., Reeves, J. y McNab, A. (eds.). Fusarium head scab: global status and future*

- prospects. Proceedings of a workshop held at CIMMYT, El Batan, Mexico. Pp. 19-26.
- de Galich, M.T.V. 2004. Desarrollo de cultivares resistentes. *En: Cereales-Trigo*, INTA (ed.). Revista IDIA XXI, Pp. 11-65.
- de Viedma, L. 1989. Importancia y distribución de la fusariosis del trigo en el Paraguay. *En: Kholi, M.M. (ed.). Taller sobre la fusariosis de la espiga en América del Sur.* CYMMIT, Mexico, D.F. Pp. 39-48.
- De Wolf, E.D., El-Allaf, S., Lipps, P.E., Francl, L. y Madden, L.V. 2001. Influence of environment on inoculum level and *Fusarium* head blight severity. *En: Proceedings of 2001 National Fusarium Head Blight Forum*, Erlanger, KY, USA, Pp. 106–109.
- Del Ponte, E.M., Fernandes, J.M.C., Pierobom, C.R. y Bergstrom, G.C. 2004. *Giberella* do trigo – aspectos epidemiológicos e modelos de previsão. *Fitopatologia Brasileira*, 29: 587–605.
- Desjardins, A.E., Hohn, T.M. y McCormick, S.P. 1993. Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. *Microbiological Reviews*, 57: 595–604.
- Desjardins, A.E., Proctor, R.H., Bai, G., McCormick, S.P., Shaner, G., Buechley, G. y Hohn, T.M. 1996. Reduced virulence of trichothecene-nonproducing mutants of *Giberella zeae* in wheat field tests. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 9: 775–781.
- Desjardins, A.E., Jarosz, A.M., Plattner, R.D., Alexander, N.J., Brown, D.W. y Jurgenson, J.E. 2004. Patterns of trichothecene production, genetic variability, and virulence to wheat of *Fusarium graminearum* from smallholder farms in Nepal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 6341–6346.
- Desjardins, A.E. 2006. *Fusarium Mycotoxins Chemistry, Genetics and Biology*. APS Press, St. Paul, Pp. 1–260.
- Desjardins, A.E. y Proctor, R.H. 2007. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International journal of food microbiology*, 119: 47–50.
- Desjardins, A.E. 2008. Natural product chemistry meets genetics: When is a genotype a chemotype?. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 7587-7592.
- Diaz de Ackermann, M. y Pereyra, S. 2011. Fusariosis de la espiga de trigo y cebada. *En: Pereyra, S., Diaz de Ackermann, M., German, S. y Cabrera, K. (eds.) Manejo de enfermedades en trigo y cebada. Serie Técnica INIA 189.* INIA, Montevideo, Uruguay, Pp. 111–128.

- Díaz de Ackermann, M. y Kholi, M.M. 2013. Chemical control of Fusarium head blight of wheat. *En*: Alconada, T.M. y Chulze, S.N. (eds.). Fusarium head bight in Latin American, Pp. 175-189.
- Dill-Macky, R. 1996. Fusarium head blight: recent epidemics and research efforts in the Upper Midwest of the United States. *En*: Fusarium Head Scab: Global Status and Future Prospects. Dubin, H.J., Gilchrist, L., Reeves, J. y McNab, A. (eds.). CIMMYT, Mexico, D.F. Pp. 1-6.
- Dill-Macky, R. y Jones, R.K. 2000. The effect of previous crop residues and tillage on Fusarium head blight of wheat. *Plant Disease*, 84: 71–76.
- Dinoor, A. 1974. Role of wild and cultivated plants in the epidemiology of plant diseases in Israel. *Annual Review of Phytopathology*, 12: 413-436.
- Doohan, F.M., Parry, D.W., Jenkinson, P. y Nicholson, P. 1998. The use of species-specific PCR-based assays to analyse Fusarium ear blight of wheat. *Plant Pathology*, 47: 197–205.
- Dufault, N.S., De Wolf, E.D., Lipps, P.E. y Madden, L.V. 2006. Role of temperature and moisture in the production and maturation of *Gibberella zeae* perithecia. *Plant Disease*, 90: 637–644.
- Dufus, J.E. 1971. Role of weeds in the incidence of virus diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 9: 319-340.
- Dusabenyagasani, M., Dostale, D. y Hamelin, R.C. 1999. Genetic diversity among *Fusarium graminearum* strains from Ontario and Quebec. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 21: 308-314.
- Edwards, S.G. 2004. Influence of agricultural practices on fusarium infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins. *Toxicological Letters*, 153: 29–35.
- Fernandez, M.R., Fernandes, J.M. y Sutton, J.F. 1993. Effects of fallow and of summer and winter crops on survival of wheat pathogens in crop residues. *Plant Disease*, 77: 698–703.
- Fernández Pinto, V.E., Terminiello, L.A., Basilico, J.C.C. y Ritieni, A. 2008. Natural occurrence of nivalenol and mycotoxigenic potential of *Fusarium graminearum* strains in wheat affected by head blight in Argentina. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39: 157–162.
- Fernández Valiela, M.V. 1978. Introducción a la fitopatología. 3ª ed. Colección Científica INTA. Vol. III: Hongos. Buenos Aires, Argentina.

- Filion, M., St-Arnaud, M. y Jabaji-Hare, S.H. 2003. Direct quantification of fungal DNA from soil substrate using real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 53: 67–76.
- Forsell, J.H., Jensen, R., Tal, J.H., Witt, M., Lin, W.S. y Pestka, J.J. 1987. Comparison of acute toxicities of deoxynivalenol (vomitoxin) and 15-acetyldeoxynivalenol in the B6C3F1 mouse. *Food and Chemical Toxicology*, 25:155-162.
- Francis, R.G. y Burgess, L.W. 1977. Characteristics of two populations of *Fusarium roseum* 'Graminearum' in eastern Australia. *Transactions of the British Mycological Society*, 68: 421–427.
- Fredlund, E., Gidlund, A., Olsen, M., Börjesson, T., Spliid, N.H.H. y Simonsson, M. 2008. Method evaluation of *Fusarium* DNA extraction from mycelia and wheat for down-stream real-time PCR quantification and correlation to mycotoxin levels. *Journal of Microbiological Methods*, 73: 33–40.
- Gagkaeva, T.Y. y Yli-Mattila, T. 2004. Genetic diversity of *Fusarium graminearum* in Europe and Asia. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 551–562.
- Gagkaeva, T.Y., Levitin, M.M., Nazarova, L.N. y Sanin, S.S. 2009. Infected grain and complex of *Fusarium* fungi on the territory of Russia Federation for 2004-2006 years. *Agro XXI*, 4-6.
- Gale, L.R., Chen, L.F., Hernick, C.A., Takamura, K. y Kistler, H.C. 2002. Population analysis of *Fusarium graminearum* from wheat fields in Eastern China. *Phytopathology*, 92: 1315-1322.
- Gale, L.R., Ward, T.J., Balmas, V. y Kistler, H.C. 2007. Population Subdivision of *Fusarium graminearum sensu stricto* in the upper midwestern United States. *Phytopathology*, 97: 1434–1439.
- Gang, G., Miedaner, T., Schuhmacher, U., Schollenberg, M. y Geiger, H.H. 1998. Deoxynivalenol and nivalenol production by *Fusarium culmorum* isolates differing in aggressiveness toward winter rye. *Phytopathology*, 88: 879–884.
- Gerlach, W. y Nirenberg, H. 1982. The genus *Fusarium*- A pictorial atlas. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt Fur Land-und Forstwirtschaft (Berlin-Dahlem)*, 209: 1-405.
- Gilbert, J., Fedak, G., Procunier, J. D., Aung, T. y Tekauz, A. 1997. Strategies for breeding for resistance to *Fusarium* head blight in Canadian spring wheat. *En: Fusarium Head Scab: Global Status and Future Prospects*. Dubin, H. J., Gilchrist, L., Reeves, J. y McNab, A. (eds.). CIMMYT, Mexico, D.F. Pp. 47-51.

- Gilbert, J., Abramson, D., McCallum, S. y Clear, R. 2001. Comparison of Canadian *Fusarium graminearum* isolates for aggressiveness, vegetative compatibility, and production of ergosterol and mycotoxins. *Mycopathologia*, 153: 209–215.
- Gilbert, J. y Fernando, W.G.D. 2004. Epidemiology and biological control of *Gibberella zeae*/*Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 26: 464–472.
- Gordon, W.L. 1944. The occurrence of *Fusarium* species in Canada. I. Species of *Fusarium* isolated from farm samples of cereal seed in Manitoba. *Canadian Journal of Research, C*, 22: 282-286.
- Gordon, W.L. 1960. The taxonomy and habitats of *Fusarium* species from tropical and temperate regions. *Canadian Journal of Botany*, 38: 643-658.
- Gosman, N., Chandler, E., Thomsett, M., Draeger, R. y Nicholson, P. 2005. Analysis of the relationship between parameters of resistance to *Fusarium* head blight and in vitro tolerance to deoxynivalenol of the winter wheat cultivar WEK0609®. *European Journal of Plant Pathology*, 111: 57–66.
- Gosman, N., Bayles, R., Jennings, P., Kirby, J. y Nicholson, P. 2007. Evaluation and characterization of resistance to *Fusarium* head blight caused by *Fusarium culmorum* in UK winter wheat cultivars. *Plant Pathology*, 56: 264–276.
- Goswami, R.S. y Kistler, H.C. 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*, 5: 515–525.
- Goswami, R.S. y Kistler, H.C. 2005. Pathogenicity and in planta mycotoxin accumulation among members of the *Fusarium graminearum* species complex on wheat and rice. *Phytopathology*, 95: 1397-1404.
- Greenhalgh, R., Neish, G.A. y Miller, J.D. 1983. Deoxynivalenol, acetyl deoxynivalenol, and zearalenone formation by Canadian isolates of *Fusarium graminearum* on solid substrates. *Applied and Environmental Microbiology*, 46: 625–629.
- Guenther, J.C. y Trail, F. 2005. The development and differentiation of *Gibberella zeae* (anamorph: *Fusarium graminearum*) during colonization of wheat. *Mycologia*, 97: 229–237.
- Haidukowski, M., Pascale, M., Perrone, G., Pancaldi, D., Campagna, C. y Visconti, A. 2005. Effect of fungicides on the development of *Fusarium* head blight, yield and deoxynivalenol accumulation in wheat inoculated under field conditions with *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85:191–198.

- Hanson, L.E. 2006. Fusarium yellowing of sugar beet caused by *Fusarium graminearum* from Minnesota and Wyoming. *Plant Disease*, 90: 686.
- Hall, M.D. y Van Sanford, D.A. 2003. Diallel analysis of Fusarium head blight resistance in soft red winter wheat. *Crop Science*, 43: 1663–1670.
- Harper, S.H.T. y Lynch, J.M. 1985. Colonization and decomposition of straw by fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 85:655-661.
- Hart, L.P., Pestka, J.J. y Liu, M.T. 1984. Effect of kernel development and wet periods on production of deoxynivalenol in wheat infected with *Gibberella zeae*. *Phytopathology*, 74: 1415–1418.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S. y Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, 10: 413–417.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. y Watson, R. 1993. Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 11: 1026–1030.
- Hill, N.S., Schwarz, P., Dahleen, L.S., Neate, S.M., Horsley, R., Gleen, A.E. y O'Donnell, K. 2006. ELISA Analysis for *Fusarium* in barley: Development of methodology and field assessment. *Crop Science*, 46: 2636-2642.
- Hill, N.S., Neate, S.M., Cooper, B., Horsley, R., Schwarz, P., Dahleen, L.S., Smith, K.P., O'Donnell, K. y Reeves, J. 2008. Comparison of ELISA for *Fusarium*, visual screening, and deoxynivalenol analysis of Fusarium head blight for barley field nurseries. *Crop Science*, 48: 1389-1398.
- Hogg, A.C., Johnston, R.H. y Dyer, A.T. 2007. Applying real-time quantitative PCR to Fusarium crown rot of wheat. *Plant Disease*, 5: 1021–1028.
- Hogg, A.C., Johnston, R.H., Johnston, J.A., Klouser, L., Kephart, K.D. y Dyer, A.T. 2010. Monitoring Fusarium crown rot populations in spring wheat residues using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 100: 49-57.
- Inch, S. y Gilbert, J. 2003. The incidence of *Fusarium* species recovered from inflorescences of wild grasses in southern Manitoba. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 25: 379–383.
- Isebaert, S., De Saeger, S., Devreese, R., Verhoeven, R., Maene, P., Heremans, B. y Haesaert, G. 2009. Mycotoxin-producing *Fusarium* species occurring in winter wheat in Belgium (Flanders) during 2002-2005. *Journal of Phytopathology*, 157: 108–116.
- Ivanchenko, M.Y. 1960. Causal organisms of Fusarium head blight and their teleomorph stage in North Ossetia. *Plant Protection*, 12: 26-28.

- Jansen, C., von Wettstein, D., Schäfer, W., Kogel, K.-H., Felk, A., y Maier, F.J. 2005. Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. Proceedings of National Academy of Sciences, (USA), 102: 16892–16897.
- Jenkinson, P., y Parry, D.W. 1994. Isolation of *Fusarium* species from common broad-leaved weeds and their pathogenicity to winter wheat. Mycological Research, 98: 776–780.
- Jochum, C.C., Osborne, L.E. y Yuen, G.Y. 2006. Fusarium head blight biological control with *Lysobacter enzymogenes* strain C3. Biological Control, 39: 336–344.
- Joffe, A.Z. 1986. *Fusarium* species: Their biology and Toxicology. John Wiley and Sons, New York city.
- Jones, R.K. y Mirocha, C.J. 1999. Quality parameters in small grains from Minnesota affected by Fusarium head blight. Plant Disease, 83: 506-511.
- Kendrick, B. 1992. The fifth kingdom. Focus Texts, Newburyport, USA.
- Khan, N.I., Schisler, D.A., Boehm, M.J., Slininger, P.J. y Bothast, R.J. 2001. Selection and evaluation of microorganisms for biocontrol of Fusarium head blight of wheat incited by *Gibberella zeae*. Plant Disease, 85: 1253–1258.
- Kholi, M.M., Annone, J.G. y de Galich, M.T.V. 1996. Fusariosis de la espiga y su manejo. En: Kholi, M.M., Annone, J.G., García, R. (eds.), Curso de manejo de enfermedades del trigo. INTA-CIMMYT, Pergamino, Argentina. Pp. 164–189.
- Kholi, M.M. y Díaz de Ackermann, M. 2013. Resistance to Fusarium head blight in South American wheat germplasm. En: Alconada, T.M. y Chulze, S.N. (eds.). Fusarium head Bight in Latin American, Springer, Pp. 263-297.
- Khongla, E.B. y Sutton, J.C. 1988. Inoculum production and survival of *Gibberella zeae* in maize and wheat residues. Canadian Journal of Plant Pathology, 10: 232-239.
- Kikot, G.E., Moschini, R., Consolo, V.F., Rojo, R., Salerno, G., Hours, R.A., Gasoni, L., Arambarri, A.M. y Alconada, T.M. 2011. Occurrence of different species of *Fusarium* from wheat in relation to disease levels predicted by a weather-based model in Argentina Pampas region. Mycopathologia, 171: 139–149.
- Kirienkova, A.E. 1992. Fusarium head blight of cereals in Krasnodar krai. En: Goncharov, V.T. (ed.) Fusarium head blight of cereals Krasnodar, 27: 28.
- Knapp, E.B., Elliot, L.F. y Campbell, G.S. 1983. Carbon, nitrogen and microbial biomass interrelationships during the decomposition of wheat straw: a mechanistic simulation model. Soil Biology and Biochemistry, 15: 455–461.

- Koch, H.J., Pringas, C. y Maerlaender, B., 2006. Evaluation of environmental and management effects on *Fusarium* head blight infection and deoxynivalenol concentration in the grain of winter wheat. *European Journal of Agronomy*, 24: 357–366.
- Köhl, J., de Haas, B.H., Kastelein, P., Burgers, S.L.G.E. y Waalwijk, C. 2007. Population dynamics of *Fusarium* spp. and *Microdochium nivale* in crops and crop residues of winter wheat. *Phytopathology*, 97: 971–978.
- Lal, R., Reicosky, D.C. y Hanson, J.D. 2007. Evolution of the plow over 10.000 years and the rationale for no-till farming. *Soil and Tillage Research*, 93: 1-12.
- Landschoot, S., Audenaert, K., Waegeman, W., Pycke, B., Bekaert, B., De Baets, B. y Haesaert, G. 2011. Connection between primary *Fusarium* inoculum on gramineous weeds, crop residues and soil samples and the final population on wheat ears in Flanders, Belgium. *Crop Protection*, 30: 1297–1305.
- Langevin, F., Eudes, F. y Comeau, A. 2004. Effect of trichothecenes produced by *Fusarium graminearum* during *Fusarium* head blight development in six cereal species. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 735–746.
- Lee, T., Oh, D., Kim, H., Lee, J., Kim, Y., Yun, S. y Lee, Y. 2001. Identification of deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae* by using PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2966–2972.
- Lee, T., Han, Y., Kim, K., Yun, S. y Lee, Y. 2002. *Tri13* and *Tri7* determine deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 2148–2154.
- Leslie, J.F. y Summerell, B.A. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, Ames, USA.
- Leslie, J.F., Anderson, L.L., Bowden, R.L. y Lee, Y.W. 2007. Inter- and intra-specific genetic variation in *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 25–32.
- Li, H.-P., Wu, A.-B., Zhao, C.-S., Scholten, O., Löffler, H. y Liao, Y.-C. 2005. Development of a generic PCR detection of deoxynivalenol- and nivalenol-chemotypes of *Fusarium graminearum*. *FEMS Microbiological Letters*, 243: 505–511.
- Link, H. F. 1809. *Observationes in ordines plantarum naturalis*, Dissetatio I. Mag. Ges. Naturf. Freunde, Berlin 3: 3-42.
- Liu, W., Langseth, W., Skinner, H., Elen, O.N. y Sundheim, L. 1997. Comparison of visual head blight ratings, seed infection levels, and deoxynivalenol production

- for assessment of resistance in cereals inoculated with *Fusarium culmorum*. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 589–595.
- Long, G.G., Diekman, M., Tuite, J.F., Shannon, G.M. y Vesonder, R.F. 1982. Effects of *Fusarium roseum* corn culture containing zearalenone on early pregnancy in swine. *American Journal of Veterinary Research*, 43: 1599–1603.
- Lori, G.A., Carranza, M.R., Violante, A., Rizzo, I. y Alippi, H.E. 1992. *Fusarium* spp. en trigo, capacidad toxicogénica y quimiotaxonomía de las cepas aisladas en la Argentina. *Agronomie*, 12: 459–467.
- Lori, G.A., Sisterna, M.N., Haidukowski, M. y Rizzo, I., 2003. *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol contamination in the durum wheat area of Argentina. *Microbiological Research*, 158: 29-35.
- Lori, G.A., Sisterna, M.N., Sarandóon, S.J., Rizzo, I. y Chidichimo, H., 2009. Fusarium head blight in wheat: impact of tillage and other agronomic practices under natural infection. *Crop Protection*, 28: 495-502.
- Lu, W.H., Chen, S.H. y Wang, Y.Z. 2001. Research on Fusarium Head scab, Science Publisher, Beijing.
- Magliano, T.M.A. y Chulze, S.N. (Eds.). 2013. Fusarium Head Blight in Latin America. Springer.
- Maier, F.J., Miedaner, T., Hader, B., Felk, A., Salomon, S., Lemmens, M., Kassner, H. y Schäfer, W. 2006. Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (*Tri5*) gene in three field isolates of different chemotype and virulence. *Molecular Plant Pathology*, 7: 449–461.
- Malbrán, I., Mourellos, C.A., Girotti, J.R., Aulicino, M.B., Balatti, P.A. y Lori, G.A. 2012. Aggressiveness variation of *Fusarium graminearum* isolates from Argentina following point inoculation of field grown wheat spikes. *Crop Protection*, 42: 234–243.
- Malbrán, I., Mourellos, C.A., Girotti, J.R., Balatti, P.A. y Lori, G.A. 2014. Toxigenic capacity and trichothecene production of *Fusarium graminearum* isolates from Argentina and its relationship with aggressiveness and fungal expansion in the wheat spike. *Phytopathology*, 104: 357–364.
- Malihipour, A. y Gilbert, J. 2012. Molecular phylogenetic analysis, trichothecene chemotype patterns, and variation in aggressiveness of *Fusarium* isolates causing head blight in wheat. *Plant Disease*, 96: 1016–1025.

- Marasas, W.F.O., Nelson, P.E. y Toussoun, T.A. 1984. Toxigenic *Fusarium* Species, Identity and Mycotoxicology. The Pennsylvania State University, University Park, London.
- Marchionatto, J.B. 1927. Memoria del Laboratorio de Patología Vegetal. Ministerio de Agricultura de la Nación, Buenos Aires, 9.
- Maresca, M. 2013. From the gut to the brain: journey and pathophysiological effects of the food-associated trichothecene mycotoxin deoxynivalenol. *Toxins*, 5: 784–820.
- Matuo, T. 1972. Taxonomic studies of phytopathogenic fungi in Japan. *Review of Plant Protection Research*, 5: 34-45.
- McMullen, M., Jones, R. y Gallemberg, D. 1997. Scab of wheat and barley: re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease*, 81: 1340-1348.
- Messiaen, C.M. y Cassini, R. 1968. Recherches sur la fusarioses. IV. La systématique des *Fusarium*. *Annales des Epiphyties*, 19: 387-454.
- Mesterházy, A. 1995. Types and components of resistance to *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Breeding*, 114: 377-386.
- Mesterházy, A., Bartók, T., Mirocha, C.G. y Komoróczy, R. 1999. Nature of wheat resistance to *Fusarium* head blight and the role of deoxynivalenol for breeding. *Plant Breeding*, 118: 97-110.
- Mesterházy, A. 2002. Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and in resistance to *Fusarium* head blight. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 675–684.
- Mesterházy, A. 2003. Breeding wheat for *Fusarium* head blight resistance in Europe. *En: Leonard, K.J. y Bushnell, W.R. (eds.) Fusarium Head Blight of wheat and barley*. APS Press, St. Paul, Minnesota, Pp. 211-240.
- Miedaner, T. y Perkowski, J. 1996. Correlations among *Fusarium culmorum* head blight resistance, fungal colonization and mycotoxin content in winter rye. *Plant Breeding* 115: 347–351.
- Miedaner, T. y Schilling, A.G. 1996. Genetic variation of aggressiveness in individual field populations of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* tested on young plants of winter rye. *European Journal of Plant Pathology*, 102:823-830.
- Miedaner, T. 1997. Breeding wheat and rye for resistance to *Fusarium* diseases. *Plant Breeding*, 116: 201–220.

- Miedaner, T., Reinbrecht, C. y Schilling, A.G. 2000. Association among aggressiveness, fungal colonization, and mycotoxin production of 26 isolates of *Fusarium graminearum* in winter rye head blight. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz*, 107: 124-134.
- Miedaner, T., Schilling, A.G. y Geiger, H.H. 2001. Molecular genetic diversity and variation for aggressiveness in populations of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* sampled from wheat fields in different countries. *Phytopathologische Zeitschrift - Journal of Phytopathology*, 149: 641-648.
- Miedaner, T., Moldovan, M. e Ittu, M. 2003. Comparison of spray and point inoculation to assess resistance to *Fusarium* head blight in a multienvironment wheat trial. *Phytopathology*, 93: 1068-1072.
- Miller, J.D. y Arnison, P.G. 1986. Degradation of deoxynivalenol by suspension cultures of *Fusarium* head blight resistant wheat cultivar Frontana. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 8: 47-150.
- Miller, J.D. 1994. Epidemiology of *Fusarium* ear disease of cereals. *En: Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxins*. Miller, J.D. y Trenholm, T.H. (eds). Eagan Press, St. Pauls, Minn. Pp. 19-36.
- Miller, J.D., Culley, J., Fraser, K., Hubbard, S., Meloche, F., Ouellet, T., Lloyd Seaman, W., Seifert, K.A., Turkington, K. y Voldeng, H. 1998. Effect of tillage practice on *Fusarium* head blight of wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 20: 95-103.
- Mishra, P.K., Tewari, J.P., Clear, R.M. y Turkington, T.K. 2004. Molecular genetic variation and geographical structuring in *Fusarium graminearum*. *Annals of Applied Biology*, 145: 299-307.
- Möller, E.M., Chelkowski, J. y Geiger, H.H. 1999. Species-specific PCR assays for the fungal pathogens *Fusarium moniliforme* and *Fusarium subglutinans* and their application to diagnose maize ear rot disease. *Journal of Phytopathology*, 147: 497-508.
- Morrison, T.B., Weis, J.J. y Wittwer, C.T. 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*, 24: 954-962.
- Moschini, R.C. y Fortugno, C. 1996. Predicting wheat head blight incidence using models based on meteorological factors in Pergamino, Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, 102: 211-218.
- Moschini, R.C., Pioli, R., Carmona, M. y Sacchi, O. 2001. Empirical predictions of wheat head blight in the Northern Argentinean Pampas region. *Crop Science*, 41: 1541-1545.

- Moschini, R.C. 2007. Clima y enfermedades de cultivos relevantes en Argentina. www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File895-trabajo_de_r_moschini.pdf (Último acceso 16.11.14).
- Mourellos, C.A., Malbrán, I., Balatti, P.A., Ghiringhelli, P.D. y Lori, G.A. 2014. Gramineous and non-gramineous weed species as alternative hosts of *Fusarium graminearum*, causal agent of Fusarium head blight of wheat, in Argentina. *Crop Protection*, 65: 100–104.
- Müller, E. y Loeffler, W. 1976. Micología, manual para naturalistas y médicos. Omega. Barcelona.
- Mullis, K. y Faloona, F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 55: 335-350.
- Nelson, P.E., Toussous, T.A. y Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park.
- Nelson, P.E. 1991. History of *Fusarium* systematics. *Phytopathology*, 81: 1045-1048.
- Nicholson, P., Simpson, D., Weston, G., Rezanoor, H., Lees, A.K., Parry, D.W. y Joyce, D. 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. *Physiological Molecular Plant Pathology*, 53: 17–37.
- Nicholson, P., Chandler, E., Draeger, R.C., Gosman, N.E., Simpson, D.R., Thomsett, M. y Wilson, A.H. 2003. Molecular tools to study epidemiology and toxicology of Fusarium head blight of cereals. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 691–703.
- Nicholson, P., Gosman, N., Draeger, R., Thomsett, M., Chandler, E. y Steed, A. 2007. The Fusarium head blight pathosystem. *En: Buck, H.T., Nisi, J.E., Salomón, N. (eds.), Wheat production in stressed environments*. Pp. 23–36.
- Nicolaisen, M., Suproniene, S., Nielsen, L.K., Lazzaro, I., Spliid, N.H. y Justesen, A.F. 2009. Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. *Journal of Microbiological Methods*, 76: 234–240.
- Nitsche, A., Steuer, N., Schmidt, C.A., Landt, O. y Siegert, W. 1999. Different real-time PCR formats compared for the quantitative detection of human cytomegalovirus DNA. *Clinical Chemistry*, 45: 1932–1937.
- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Tacke, B.K. y Casper, H.H. 2000. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 7905-7910.

- O'Donnell, K., Ward, T.J., Geiser, D.M., Corby Kistler, H. y Aoki, T. 2004. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genetics and Biology*, 41: 600–623.
- O'Donnell, K., Ward, T.J., Aberra, D., Kistler, H.C., Aoki, T., Orwig, N., Kimura, M., Bjørnstad, Å. y Klemsdal, S.S. 2008. Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. *Fungal Genetics and Biology*, 45: 1514–1522.
- Ortega, L.M., Kikot, G.E., Astoreca, A.L. y Alconada, T.M. 2013. Screening of *Fusarium graminearum* isolates for enzymes extracellular and deoxynivalenol production. *Journal of Mycology*, 2013: 1–7.
- Osborne, L.E. y Stein, J.M. 2007. Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 103–108.
- Ouellet, T. y Seifert, K.A. 1993. Genetic characterization of *Fusarium graminearum* strains using RAPD and PCR amplification. *Phytopathology*, 83: 1003–1007.
- Palazzini, J.M., Ramirez, M.L., Torres, A.M. y Chulze, S.N. 2007. Potential biocontrol agents for *Fusarium* head blight and deoxynivalenol production in wheat. *Crop Protection*, 26: 1702–1710.
- Palazzini, J.M., Groenenboom-de Haas, B.H., Torres, A.M., Köhl, J., y Chulze, S.N. 2013. Biocontrol and population dynamics of *Fusarium* spp. on wheat stubble in Argentina. *Plant Pathology*, 62: 859–866.
- Panisson, E., Reis, E.M. y Boller, W. 2003. Quantificação de danos causados pela *giberela* em cereais de inverno, na safra 2000, em Passo Fundo, RS. *Fitopatologia Brasileira* 28, 189–192.
- Parry, D.W., Pettitt, T.R., Jenkinson, P. y Lees, A.K. 1994. The cereal *Fusarium* complex. *En: Blakeman, P., Williamson, B., eds. Ecology of Plant Pathogens*. Wallingford, UK: CAB International, 301–320.
- Parry, D.W., Jenkinson, P. y Mcleod, L. 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals-a review. *Plant Pathology*, 44: 207–238.
- Parry, D.W. y Nicholson, P. 1996. Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. *Plant Pathology*, 45: 383–391.
- Pasquali, M. y Migheli, Q. 2014. Genetic approaches to chemotype determination in type B-trichothecene producing *Fusaria*. *International Journal of Food Microbiology*, 189: 164–182.

- Paulitz, T. 1996. Diurnal release of ascospores by *Gibberella zeae* in inoculated wheat plots. *Plant Disease*, 80: 674–678.
- Pereyra, S.A., Dill-Macky, R. y Sims, A.L. 2004. Survival and inoculum production of *Gibberella zeae* in wheat residue. *Plant Disease*, 88: 724–730.
- Pereyra, S.A. y Dill-Macky, R. 2008. Colonization of the residues of diverse plant species by *Gibberella zeae* and their contribution to Fusarium head blight inoculum. *Plant Disease*, 92: 800–807.
- Pereyra, S. y Lori, G.A. 2013. Crop residues and their management in the epidemiology of Fusarium head blight. *En: Alconada, T.M. y Chulze, S.N. (eds.). Fusarium head Bight in Latin American*, Springer, Pp. 143-156.
- Pioli, R., Benavídez, R., Morandi, E. y Brodero, M. 2000. Estudio epidemiológico de patógenos fúngicos asociados a semillas y frutos de soja. *Fitopatología*, 35: 111–118.
- Pioli, R.N., Mozzoni, L. y Morandi, E.N. 2004. First report of pathogenic association between *Fusarium graminearum* and soybean. *Plant Disease*, 88: 220.
- Postic, J., Cosic, J., Vrandecic, K., Jurkovic, D., Saleh, A.A. y Leslie, J.F. 2012. Diversity of *Fusarium* species isolated from weeds and plant debris in Croatia. *Journal of Phytopathology*, 160: 76–81.
- Proctor, R.H., Hohn, T.M. y McCormick, S.P. 1995. Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 8: 593–601.
- Quiroga, N., Resnik, S., Pacin, A., Martínez, E., Pagano, A., Riccobene, I., Neira, S. 1995. Natural occurrence of trichothecenes and zearalenone in Argentinean wheat. *Food Control*, 6: 201–204.
- Raillo, A. 1935. The diagnostic estimation of morphological and cultural characters of the species of the genus *Fusarium*. *Publ. All-Union Academy of Agricultural Sciences, Series 2 (Leningrad)*, 7: 1-98.
- Raillo, A. 1936. Systematics and methods for the determination of the species of the genus *Fusarium*. *Acta Botanica Institute of Academic Sciences USSR, Series 2*, 3: 803-857.
- Ramírez, M.L., Reynoso, M.M., Farnochi, M.C. y Chulze, S.N. 2006. Vegetative compatibility and mycotoxin chemotypes among *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) isolates from wheat in Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, 115: 139-148.

- Ramírez, M.L., Reynoso, M.M., Farnochi, M.C., Torres, A.M., Leslie, J.F. y Chulze, S.N. 2007. Population structure of *Gibberella zeae* isolated from wheat in Argentina. *Food Additives and Contaminants*, 24: 1115-1120.
- Rayner, R.W. 1970. A mycological color chart. Commonwealth mycological institute Kew, Surrey & British mycological society.
- Reis, E.M. 1988a. Doenças do Trigo III: *Giberela*. San Paulo. 2ª Edicao. Pp. 13.
- Reis, E.M. 1988b. Quantificação de propágulos de *Gibberella zeae* no ar através de armadilhas de esporos. *Fitopatologia Brasileira*, 13: 324-327.
- Reis, E.M., Fernandes, J.M.C. y Picinini, E.C. 1988. Estrategias para o controle de doenças do trigo. EMBRAPA-CNPT, Passo Fundo, 50 pp., Documentos, 7.
- Reis, E.M. 1989. Fusariosis: Biología y epidemiologia de *Gibberella zeae* en trigo. *En: Kholi, M.M. (ed.). Taller sobre fusariosis de la espiga en América del Sur. CIMMYT, Mexico. Pp. 97-102.*
- Reis, E.M. 1990. Integrated disease management– The changing concepts of controlling headblight and spot blotch. *En: Saunders, D.A. (Ed.), Wheat for the Nontraditional Warm Areas. Proceeding of the International Conference. CIMMYT, México D.F. Pp. 165-177.*
- Reis, E.M. y Carmona, M.A. 2013. Integrated Disease Management of Fusarium Head Blight. *En: Alconada, T.M. y Chulze, S.N. (eds.). Fusarium head Bight in Latin American, Springer. Pp. 159-173.*
- Reis, E.M. y Zoldan, S. 2014. Enfermedades de importancia económica en el cultivo de trigo en Brasil y optimización de prácticas de manejo utilizando como caso de estudio, la fusariosis de la espiga de trigo. Libro de Resúmenes del 3º Congreso Argentino de Fitopatología, Pp. 35-40.
- Reynoso, M.M., Ramirez, M.L., Torres, A.M. y Chulze, S.N. 2011. Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* strains isolated from wheat in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 145: 444-448.
- Ribichich, K.F., Lopez, S.E. y Vegetti, A.C. 2000. Histopathological spikelet changes produced by *Fusarium graminearum* in susceptible and resistant wheat cultivars. *Plant Disease*, 84: 794-802.
- Rizzo, I., Lori, G., Vedoya, G., Carranza, M., Haidukowski, M., Varsavsky, E., Frade, H., Chiale, C. y Alippi, H. 1997. Sanitary factors and mycotoxin contamination in the argentinian wheat crop 1993/94. *Mycotoxin Research*, 13: 67-72.
- Rocha, O., Ansari, K. y Doohan, F.M., 2005. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review. *Food Additives and Contaminants*, 22: 369-378.

- Rossi, V., Ravanetti, A., Patteri, E. y Giosue, S. 2001. Influence of temperature and humidity on the infection of wheat spikes by some fungi causing Fusarium head blight. *Journal of Plant Pathology*, 83: 189–198.
- Ryu, J.C., Ohtsubo, K., Izurniyarna, N., Nakamura, K., Tanaka, T., Yamarnura, H. y Ueno, Y. 1988. The acute and chronic toxicities of nivalenol in mice. *Fundamental and Applied Toxicology*, 11: 38–47.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Sampietro, D.A., Díaz, C.G., Gonzalez, V., Vattuone, M.A., Ploper, L.D., Catalan, C.A.N. y Ward, T.J. 2011. Species diversity and toxigenic potential of *Fusarium graminearum* complex isolates from maize fields in northwest Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 145: 359–364.
- Sarlin, T., Yli-Mattila, T., Jestoi, M., Rizzo, A., Paavanen-Huhtala, S. y Haikara, A. 2006. Real-time PCR for quantification of toxigenic *Fusarium* species in barley and malt. *European Journal of Plant Pathology*, 114: 371–380.
- Sarver, B.A.J., Ward, T.J., Gale, L.R., Broz, K., Kistler, C., Aoki, T., Nicholson, P., Carter, J. y O'Donnell, K. 2011. Novel *Fusarium* head blight pathogens from Nepal and Louisiana revealed by multilocus genealogical concordance. *Fungal Genetics and Biology*, 48: 1096–1107.
- Schaafsma, A.W., Tamburic-Illic, L., Miller, J.D. y Hooker, D.C. 2001. Agronomic consideration for reducing deoxynivalenol in wheat grain. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 23: 279–285.
- Schilling, A.G., Moller, E.M. y Geiger, H.H. 1994. RAPDs of *Fusarium culmorum* and *F. graminearum*. Application for genotyping and species identification. En: Schots, A., Dewey, F.M. Oliver, R.P. (eds.). *Modern Assays for Plant Pathogenic Fungi*, CAB International, Oxford, UK. Pp. 47–56.
- Schilling, A.G., Moller, E.M. y Geiger, H.H. 1996. Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* and *F. avenaceum*. *Phytopathology*, 86: 515–522.
- Schilling, A.G., Miedaner, T. y Geiger, H.H. 1997. Molecular variation and genetic structure in field populations of *Fusarium* species causing head blight in wheat. *Proceedings of the Fifth European Fusarium. Seminar, Szeged, Hungary*. *Cereal Research Communications* 25, 549–54.
- Schroeder, H.W. y Christensen, J.J. 1963. Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*. *Phytopathology*, 53: 831–838.

- Seaman, W.L. 1982. Epidemiology and control of mycotoxigenic *Fusaria* on cereal grains. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 4: 187-190.
- Sepúlveda Díaz, M.L. 2014. Estudio comparativo de la variabilidad del potencial toxicogénico de cepas de *Fusarium graminearum* aislados de trigo, cebada y maíz cultivados en Argentina. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Shaner, G. y Finney, R.E. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology*, 67: 1051–1056.
- Sieber, T., Riesen, T.K., Müller, E. y Fried, P.M. 1988. Endophytic fungi in four winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) differing in resistance against *Stagonospora nodorum* (Berk.) Cast. and Germ. = *Septoria nodorum* (Berk.) Berk. *Journal of Phytopathology*, 122: 289-306.
- Singh, Y., Singh, B.y. Timsina, J. 2005. Crop residue management for nutrient cycling and improving soil productivity in rice-based cropping systems in the tropics. *Advances in Agronomy*, 85: 269–407.
- Smith, W.G. 1884. Diseases of field and garden crops chiefly such as are caused by fungi. Mc Millan. (Ed.). Londres.
- Snyder, W.C. y Hansen, H.N. 1945. The species concept in *Fusarium* with reference to *Discolor* and other sections. *American Journal of Botany*, 32: 657–666.
- Stack, R. W. y McMullen, M. P. 1995. A visual scale to estimate severity of *Fusarium* head blight in wheat. North Dakota State University Extension Service, Pp 1095.
- Stack, R.W. 1999. Return of an old problem: *Fusarium* head blight of small grains. *APSnet Plant Pathology Online* <http://www.apsnet.org/online/feature/FHB/Top> (Último acceso 16.11.14).
- Starkey, D.E., Ward, T.J., Aoki, T., Gale, L.R., Kistler, H.C., Geiser, D.M., Suga, H., Tóth, B., Varga, J. y O'Donnell, K. 2007. Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity. *Fungal Genetics and Biology*, 44: 1191–1204.
- Sturtz, A.V., Carter, M.R. y Johnston, H.W. 1997. A review of plant disease, pathogen interactions and microbial antagonism under conservation tillage in temperate humid agriculture. *Soil and Tillage Research*, 41:169–189.
- Suga, H., Karugia, G.W., Ward, T., Gale, L.R., Tomimura, K., Nakajima, T., Miyasaka, A., Koizumi, S., Kageyama, K. y Hyakumachi, M. 2008. Molecular characterization of the *Fusarium graminearum* species complex in Japan. *Phytopathology*, 98: 159–166.

- Sumíková, T., Gabrielová, L., Kucera, L., Zabka, M. y Chrpová, J. 2013. Mycotoxin production, chemotypes and diversity of czech *Fusarium graminearum* isolates on wheat. Czech Journal of Food Sciences, 31: 407–412.
- Sutton J.C. 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. Canadian Journal of Plant Pathology, 4: 195–209.
- Syamkumar, S., Jose, M. y Sasikumar, B. 2005. Isolation and PCR amplification of genomic DNA from dried capsules of cardamon (*Elettaria cardamomum* M.). Plant Molecular Biology Reporter, 23: 417a–417e.
- Talas, F., Kalih, R. y Miedaner, T. 2012. Within-field variation of *Fusarium graminearum* isolates for aggressiveness and deoxynivalenol production in wheat head blight. Phytopathology, 102: 128–134.
- Tekle, S., Dill-Macky, R., Skinnies, H., Tronsmo, A.M. y Bjørnstad, Å. 2012. Infection process of *Fusarium graminearum* in oats (*Avena sativa* L.). European Journal of Plant Pathology, 132: 431–442.
- Thompson, W.L. y Wannemacher, R.W. 1986. Structure-function relationships of 12,13-epoxytrichothecene mycotoxins in cell culture: Comparison to whole animal lethality. Toxicon, 24: 985-994.
- Tombetta, E.E., y Nisi, J.E. 1998. 100 años del Trigo Argentino. Evolución del mejoramiento, calidad y producción. INTA.
- Tóth, B., Mesterházy, Á., Horváth, Z., Bartók, T., Varga, M. y Varga, J. 2005. Genetic variability of Central European isolates of the *Fusarium graminearum* species complex. European Journal of Plant Pathology, 113: 35–45.
- Trail, F. y Common, R. 2000. Perithecial development by *Gibberella zeae*: a light microscopy study. Mycologia, 92, 130–138.
- Trail, F., Gaffoord, I. y Vogel, S. 2005. Ejection mechanics and trajectory of the ascospores of *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). Fungal Genetics and Biology, 42: 528–533.
- Trail, F. 2009. For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics Era. Plant Physiology, 149: 103–110.
- Trigo, E., Cap, E., Malach, V. y Villarreal, F. 2009. The case of zero-tillage technology in Argentina e IFPRI Discussion Paper 00915. Disponible en: <http://www.ifpri.org/sites/default/files/publications/ifpridp00915.pdf> (último acceso 16.11.14).
- Tschanz, A.T., Horst, R.K. y Nelson, P.E. 1975. Ecological aspects of ascospore discharge in *Gibberella zeae*. Phytopathology, 65: 597–599.

- Tschanz, A.T., Horst, R.K. y Nelson, P.E. 1976. The effect of environment on sexual reproduction of *Gibberella zeae*. *Mycologia*, 68: 327–340.
- Turner, A.S., Lees, A.K., Rezanoor, H.N. y Nicholson, P. 1998. Refinement of PCR-detection of *Fusarium avenaceum* and evidence from DNA marker studies for phenetic relatedness to *Fusarium tricinctum*. *Plant Pathology*, 47: 278-288.
- Tusa, C., Munteanu, I., Capetti, E., Pirvu, T., Bunescu, S., Sin, G.L., Nicolae, H., Tianu, A., Caea, D., Romascanu, O. y Stoika, V. 1981. Aspects of the *Fusarium* attacks on wheat in Romania. *Probleme de Protectia Plantelor*, 9: 15-31.
- Ueno, Y., Nakajima, M., Sakai, K., Ishii, K., Sato, N. y Shimada, N., 1973. Comparative toxicology of trichothecene mycotoxins: Inhibition of protein synthesis in animal cells. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*, 74: 285–296.
- Umpiérrez, M., Garmendia, G., Cabrera, M., Pereyra, S. y Vero, S. 2013. Diversity of pathogen populations causing Fusarium head blight of wheat in Uruguay. *En: Alconada, T.M. y Chulze, S.N. (eds.). Fusarium head Bight in Latin American*, Springer. Pp. 31-44.
- Van der Plank, J.E. 1968. Disease resistance in plants. Academic Press, New York, USA.
- Vincelli, P. y Tisserat, N. 2008. Nucleic acid–based pathogen detection in applied plant pathology. *Plant Disease* 92: 660–669.
- Voronin, M. 1890. About intoxicating corn in the South- Ussuriiskij region. *Botanical notes*. SPb, Russia, 3: 13–21.
- Waalwijk, C., Kastelein, P., De Vries, I. y Ker, Z. 2003. Major changes in *Fusarium* spp. in wheat in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 743–754.
- Walker, S.L., Leath, S., Hagler, W.M.Jr. y Murphy, J.P. 2001. Variation among isolates of *Fusarium graminearum* associated with Fusarium head blight in North Carolina. *Plant Disease*, 85: 404-410.
- Wang, Y.Z. y Miller, J.D. 1988. Screening techniques and sources of resistance to Fusarium head blight. *En: Wheat Production Constraints in Tropical Environments*. A. R. Klatt (ed.). CIMMYT, Mexico, D.F. Pp. 239-250.
- Wang, Y., Liu, W., Hou, Z., Wang, C., Zhou, X., Jonkers, W., Ding, S., Kistler, H.C. y Xu, J.-R. 2011. A novel transcriptional factor important for pathogenesis and ascosporogenesis in *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 24: 118–128.

- Wanjiru, W.M., Zhensheng, K. y Buchenauer, H. 2002. Importance of cell wall degrading enzymes produced by *Fusarium graminearum* during infection of wheat heads. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 803–810.
- Ward, T.J., Bielawski, J.P., Kistler, H.C., Sullivan, E. y O'Donnell, K. 2002. Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 99: 9278–9283.
- WHO. 2001. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. WHO food additives series 47, FAO food and nutrition paper 7, Presented at the 56th meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), WHO, Geneva, Pp.557.
- Windels, C.E. 2000. Economic and social impacts of *Fusarium* head blight: changing farms and rural communities in the northern Great Plains. *Phytopathology*, 90: 17-21.
- Wollenweber, H.W. y Reinking, O.A. 1935. *Die Fusarien*, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung. Berlin: Paul Parey.
- Xu, X. 2003. Effects of environmental conditions on the development of *Fusarium* ear blight. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 683-689.
- Yli-Mattila, T., Gagkaeva, T., Ward, T.J., Aoki, T., Kistler, H.C. y O'Donnell, K. 2009. A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East. *Mycologia*, 101: 841–852.
- Yoder, W.T. y Christianson, L.M. 1998. Species-specific primers resolve members of *Fusarium* section *Fusarium*. Taxonomic status of the edible “Quorn” fungus reevaluated. *Fungal Genetics and Biology*, 23: 68–80.
- Yoshida, S., Ohba, A., Liang, Y., Koitabashi, M. y Tsushima, S. 2012. Specificity of *pseudomonas* isolates on healthy and *Fusarium* head blight infected spikelets of wheat heads. *Microbial Ecology*, 64: 214–225.
- Yoshizawa, T. y Morooka, N. 1974. Studies on the toxic substances in the infected cereals. III. Acute toxicities of new trichothecene mycotoxins: deoxinivalenol and its monoacetates. *Journal of Food Hygienic Society of Japan*, 15: 261-269.
- Yoshizawa T. y Morooka, N. 1977. Trichothecenes from mold infested cereals in Japan. *En: Rodricks, J.V., Hesseltine, C.W. y Mehlman, M.A. (eds.) Mycotoxins in human and animal health. Park Forest South Il: Pathotox Publ.*
- Zadoks, J.C, Cheng, T.T. y Konzak, C.F. 1974. A decimal code for the growth stage of cereals. *Weed Research*, 14: 415-421.

- Zadoks, J.C. y Schein, R.D. 1979. Epidemiology and plant disease management. Oxford University Press (Ed.). P. 427.
- Zeller, K. A., Bowden, R.L. y Leslie, J.F. 2003. Diversity of epidemic populations of *Gibberella zeae* from small quadrats in Kansas and North Dakota. *Phytopathology*, 93: 874–880.
- Zeller, K.A., Bowden, R.L., Leslie, J.F. 2004. Population differentiation and recombination in wheat scab populations of *Gibberella zeae* in the United States. *Molecular Ecology*, 13: 563–571.

