

PALACIOS, SOFIA ALEJ

Comportamientos de n:

73972

2014

73972



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

Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas

“Comportamiento de nuevos germoplasmas de trigo candeal ante la infección por *Fusarium* y contaminación con micotoxinas. Estudios de diversidad genética del patógeno”

Sofía Alejandra Palacios

Marzo 2014

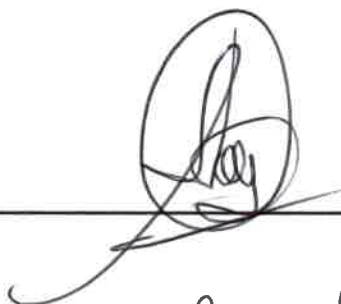
7.0072

MFN:
Clasif:
T. 939

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

Directora de la Tesis Doctoral:

Dra. Adriana M. Torres



Co-Directora de la Tesis Doctoral:

Dra. María Cecilia Farnochi



Miembros del Jurado:

Dra. Elizabeth Agostini



Dr. Sergio Alemano



Dr. Lucas González



Río Cuarto, 14 de Marzo de 2014

RESUMEN

La fusariosis de la espiga es una enfermedad fúngica que afecta al trigo mundialmente y es causada principalmente por *Fusarium graminearum*. Este patógeno puede ocasionar pérdidas de hasta un 50% bajo condiciones climáticas óptimas para el desarrollo de la enfermedad. Además de la disminución del rendimiento en la cosecha puede también producir granos de baja calidad que constituyen una amenaza para la salud humana y animal ya que pueden contener micotoxinas tales como el deoxinivalenol. El uso de cultivares resistentes es considerado una de las medidas más efectivas y ecocompatibles para prevenir la enfermedad. En el caso del trigo candeal, los cultivares existentes en nuestro país presentan en general niveles bajos de tolerancia a la fusariosis. El éxito de las estrategias de mejoramiento genético en trigo depende, principalmente, de considerar en la evaluación la variabilidad genética de las poblaciones del patógeno a fin de poder responder aspectos fundamentales como la adaptabilidad del patógeno a nuevas prácticas agrícolas o cultivares, el flujo de genes entre las poblaciones y la dispersión del inóculo entre campos y regiones. Estudios previos demostraron que durante los años no conductivos para la fusariosis, una de las principales especies de *Fusarium* aisladas de los granos de trigo fue *F. proliferatum*. Este hongo es un importante productor de fumonisinas. En base a estos antecedentes se formularon las hipótesis: 1) Materiales de trigo candeal existentes y de reciente obtención, por la incorporación de genes de resistencia, tienen buen comportamiento frente a la infección con especies de *Fusarium*, con la consecuente disminución de los niveles de contaminación con micotoxinas. 2) Existe una alta variabilidad genética en las poblaciones locales de *F. graminearum* y *F. proliferatum* aisladas de trigo candeal dada por un elevado "outcrossing" del patógeno en condiciones de campo. Para ello se evaluó la contaminación con especies de *Fusarium* y micotoxinas en muestras de trigo a cosecha. Luego se determinó la variabilidad genética y la capacidad de producir las toxinas, de las poblaciones de ambos patógenos aisladas. Se evaluó también el comportamiento de germoplasmas de trigo candeal (comerciales y experimentales) frente a la infección en condiciones de invernadero. Todas las muestras de trigo candeal analizadas presentaron contaminación con especies de *Fusarium*, sin embargo la incidencia de *F. graminearum* fue baja. El 38% de las muestras analizadas presentaron contaminación con deoxinivalenol mientras que solo el 54% de las muestras analizadas en 2009 presentaron contaminación con nivalenol. El 97% de las muestras de la campaña de 2007 presentaron contaminación con fumonisinas. La población de *F. proliferatum* aislada presentó una alta variabilidad intraespecífica y no existieron agrupamientos de cepas por origen, año de aislamiento o huésped, sin embargo se encontró en este estudio que los granos de trigo candeal también pueden estar contaminados con *F. verticillioides*, un importante productor de fumonisinas. Por su parte, la población de *F. graminearum* aislada presentó también una gran variabilidad genética que estaría dada por cruzamientos sexuales a campo. También se logró identificar a *F. cerealis*, otro patógeno asociado a la fusariosis que se encontró en los granos de trigo candeal infectados. En cuanto a la capacidad de producir toxinas, el 96% de las cepas de *F. proliferatum* fue capaz de producir fumonisinas en granos de trigo candeal mientras que el 100% de las cepas de *F. graminearum* fue capaz de producir deoxinivalenol y todas presentaron un genotipo de producción de toxina, 15 Ac-DON. Por último, los germoplasmas evaluados presentaron diferencias significativas en cuanto a la severidad de la enfermedad generada por *F. graminearum* y a la acumulación de deoxinivalenol. Sin embargo, no existió correlación entre la severidad de la enfermedad y la acumulación de toxina. Se encontraron germoplasmas tanto comerciales como experimentales con buen comportamiento frente a la enfermedad. Por su parte, *F. proliferatum* no causó síntomas visibles en las espigas pero sí afectó el desarrollo del grano de la espiguilla inoculada.

ABSTRACT

Fusarium head blight (FHB) is a fungal disease affecting wheat worldwide and it is caused by *Fusarium graminearum*. During optimal conditions for the establishment of the disease the highest losses could reach 50%. Besides reducing yield, it could also cause reduced grain quality and mycotoxin contamination, especially deoxinivalenol. The use of resistant cultivars is one of the most effective and non-contaminating strategy to prevent the disease. The durum wheat cultivars used at present in Argentina show low levels of fusarium head blight resistance. The success of breeding programs in wheat depend mainly on considering the genetic variability of the pathogen populations in order to respond to important issues like the pathogen adaptability to new agricultural practices or new cultivars, the gene flow between populations and the inoculum dispersal between regions or fields. Previous studies have demonstrated that during a non-FHB epidemic year, the main *Fusarium* species isolated from wheat was *F. proliferatum*, an important fumonisin producer. Taking all this background into account, the hypotheses were formulated: 1) existing and recently obtained durum wheat materials have a good performance against *Fusarium* infection and therefore a reduction in mycotoxin contamination. 2) A high genetic variability exists within *F. graminearum* and *F. proliferatum* populations isolated from durum wheat which is favored by a high outcrossing of the pathogen under field conditions. Durum wheat samples were analyzed for *Fusarium* and mycotoxin contamination. Also the genetic variability and mycotoxin production of both pathogen populations were studied. Finally, a greenhouse experiment was carried out to evaluate the FHB resistance of several durum wheat germoplasm (commercial and experimental ones). All durum wheat samples analyzed showed *Fusarium* contamination; however, *F. graminearum* incidence was low. Thirty-eight percent of the samples showed deoxinivalenol contamination while the 54% of the samples from 2009 harvest season only, show nivalenol contamination. On the other hand, 97% of the samples from 2007 harvest season showed fumonisin contamination. *Fusarium proliferatum* population showed a high intraspecific genetic variability and it was not observed a correlation to geographic origin, host or year of harvest. Also, it was demonstrated that durum wheat grains could be also contaminated with another fumonisin producer, *F. verticillioides*. *Fusarium graminearum* population also showed a high genetic variability which could be favored by sexual reproduction under field conditions. Moreover, it was isolated from scabby grains another pathogen associated to FHB, *F. cerealis*. Regarding toxin production, 96% of *F. proliferatum* strains were capable of producing fumonisins on durum wheat grains while 100% of *F. graminearum* strains were deoxinivalenol producers with a 15 Ac-DON genotype. Finally, durum wheat germoplasms evaluated showed significant differences in FHB severity and deoxinivalenol accumulation. However, there was not a positive correlation between the disease severity and the toxin accumulation. There were commercial and experimental germoplasms with a good performance against the disease. On the other hand, *F. proliferatum* did not cause visible symptoms on the inoculated spikes but did affect the grain development from the inoculated floret.

INDICE

I.	INTRODUCCION	1
I.1.	Trigo	1
I.1.1.	Generalidades	1
I.2.	Género <i>Fusarium</i>	5
I.2.1.	Concepto de especie en <i>Fusarium</i>	6
I.2.2.	Reproducción sexual	10
I.3.	<i>Fusarium graminearum</i>	12
I.3.1.	Complejo de especies de <i>Fusarium graminearum</i>	13
I.4.	<i>Fusarium proliferatum</i>	15
I.5.	Micotoxinas	17
I.5.1	Tricotecenos	18
I.5.1.a	Quimiotipo y genotipo de <i>Fusarium graminearum</i>	21
I.5.2.	Fumonisinias	23
I.6.	Fusariosis de la espiga del trigo	25
I.6.1.	Infeción y ciclo de la enfermedad	26
I.6.2.	Resistencia genética a la fusariosis de la espiga del trigo	28
I.7.	Estudio de la población de <i>Fusarium graminearum</i>	32
II.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	34
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	35
III.1.	Muestras	35
III.2.	Evaluación de la microbiota aislada de cultivares comerciales y experimentales	36
III.2.1.	Medios de cultivo y soluciones	36
III.2.2.	Aislamiento de las especies de <i>Fusarium</i>	37
III.2.3.	Identificación de las especies de <i>Fusarium</i>	38
III.3.	Determinación de la incidencia natural de deoxinivalenol y nivalenol en granos de trigo candeal	39
III.4.	Determinación de la incidencia natural de fumonisinias en granos de trigo candeal	40
III.4.1.	Determinación y cuantificación de fumonisinias	40
III.4.2.	Experimento de recuperación	41
III.4.3	Confirmación de la presencia de fumonisina B ₁ por HPLC-MS/MS	41
III.4.4.	Análisis estadístico	42

III.5.	Caracterización de la población de <i>Fusarium proliferatum</i> aislada de trigo candeal	42
III.5.1.	Estudio de la variabilidad genética de la población de <i>Fusarium proliferatum</i>	42
III.5.1.1.	Cepas	42
III.5.1.2.	Producción de biomasa fúngica de las cepas de <i>Fusarium proliferatum</i>	43
III.5.1.2.a	Medios de cultivo	43
III.5.1.2.b	Condiciones de crecimiento	43
III.5.1.3.	Extracción de ADN	43
III.5.1.4.	Amplificación de genes Calmodulina (caM), Factor de Elongación 1- alfa (EF-1 α) y FUM8 de cepas de <i>Fusarium proliferatum</i>	44
III.5.1.4.a	Materiales y condiciones de reacción	44
III.5.1.4.b	Metodología	44
III.5.1.5.	Secuenciamiento de genes Calmodulina (caM), Factor de Elongación 1- alfa (EF-1 α) y FUM8 de cepas de <i>Fusarium proliferatum</i>	45
III.5.2.	Determinación del tipo de apareamiento de las cepas de <i>Fusarium proliferatum</i> por amplificación de genes MAT	46
III.5.3.	Determinación de la capacidad toxicogénica de cepas de <i>Fusarium proliferatum</i> en granos de trigo candeal	46
III.5.3.1.	Cepas	46
III.5.3.2.	Producción de fumonisinas	47
III.5.3.3.	Detección y cuantificación de fumonisinas	47
III.5.3.4.	Preparación de soluciones estándares	48
III.6.	Caracterización de cepas de <i>Fusarium graminearum</i> aisladas de trigo candeal en Argentina	49
III.6.1.	Cepas	49
III.6.2.	Producción de biomasa fúngica de las cepas de <i>Fusarium graminearum</i>	49
III.6.2.1.	Medios de cultivos, soluciones y reactivos	49
III.6.2.2.	Condiciones de crecimiento	51
III.6.2.3.	Extracción y purificación del ADN	51
III.6.3.	Evaluación de la diversidad genética de cepas de <i>Fusarium graminearum</i> a través del uso de ISSR	52
III.6.3.1.	Optimización de un protocolo para estudiar la diversidad de <i>F. graminearum</i> utilizando el perfil ISSR	52
III.6.3.1.a	Cepas	52
III.6.3.1.b	Reacciones de PCR	52

III.6.3.1.c.	Análisis de los datos	53
III.6.4.	Análisis de las cepas de <i>Fusarium graminearum</i> a través de ISSR	54
III.6.5.	Secuenciación del gen Factor de Elongación 1- alfa (EF-1 α)	54
III.6.5.1.	Cepas	54
III.6.5.2.	Amplificación del gen EF-1 α de cepas de <i>Fusarium</i>	55
III.6.5.2.a	Materiales y condiciones de reacción	55
III.6.5.3.	Análisis preliminar de máxima parsimonia	56
III.6.6.	Estructura genética poblacional de <i>Fusarium graminearum</i> sensu stricto aislado de trigo candeal en Argentina	56
III.6.6.1.	Diversidad genotípica y análisis genético de la población	57
III.6.7.	Determinación del quimiotipo y genotipo de cepas de <i>Fusarium graminearum</i> sensu stricto aisladas de trigo candeal	57
III.6.7.1	Determinación del genotipo de las cepas de <i>Fusarium graminearum</i> por PCR múltiple	57
III.6.7.2.	Determinación de la capacidad toxicogénica de las cepas de <i>Fusarium graminearum</i> sensu stricto	59
III.6.7.2.a	Producción de micotoxinas	59
III.6.7.2.b	Análisis de DON, 3-ADON, 15-ADON y NIV por cromatografía en capa delgada	59
III.6.7.2.c.	Análisis de DON y NIV por cromatografía líquida de alta presión (HPLC)	60
III.7.	Evaluación del comportamiento de diferentes germoplasmas de trigo candeal ante la infección por <i>Fusarium graminearum</i> y <i>Fusarium proliferatum</i>	60
III.7.1.	Preparación de las plantas de trigo	60
III.7.2.	Preparación de inóculo	61
III.7.3.	Inoculación de las espigas en el estadio de antesis	62
III.7.4.	Análisis de la producción de micotoxinas en las espigas inoculadas en el ensayo de invernadero	62
III.7.4.	Análisis estadístico de los datos	64
IV.	RESULTADOS Y DISCUSION	65
IV.1.	Evaluación de la microbiota aislada de cultivares comerciales y experimentales	65
IV.2.	Determinación de la incidencia natural de deoxinivalenol y nivalenol en granos de trigo candeal	71
IV.3.	Determinación de la incidencia natural de fumonisinas en granos de trigo candeal	76
IV.4.	Caracterización de la población de <i>Fusarium proliferatum</i> aislada de trigo candeal	78
IV.4.1.	Estudio de la variabilidad genética de la población de <i>Fusarium proliferatum</i>	78
IV.4.2.	Determinación del tipo de apareamiento de las cepas de <i>Fusarium proliferatum</i> por	83

	amplificación de genes MAT	
IV.4.3.	Determinación de la capacidad toxicogénica de cepas de <i>Fusarium proliferatum</i> en granos de trigo candeal	83
IV.5.	Caracterización de cepas de <i>Fusarium graminearum</i> aisladas de trigo candeal en Argentina	85
IV.5.1.	Evaluación de la diversidad genética de cepas de <i>Fusarium graminearum</i> a través del uso de ISSR	85
IV.5.2.	Estructura genética poblacional de <i>Fusarium graminearum</i> sensu stricto aislado de trigo candeal en Argentina	92
IV.5.2.1.	Diferenciación de poblaciones	92
IV.5.3.	Determinación del quimiotipo y genotipo de cepas de <i>Fusarium graminearum</i> sensu stricto aisladas de trigo candeal	96
IV.5.4.	Determinación de la capacidad toxicogénica de las cepas de <i>Fusarium graminearum</i>	97
IV.6.	Evaluación del comportamiento de diferentes germoplasmas de trigo candeal ante la infección por <i>Fusarium graminearum</i> y <i>Fusarium proliferatum</i>	98
IV.6.1.	Evaluación del comportamiento de diferentes germoplasmas de trigo candeal ante la infección por <i>Fusarium graminearum</i> en condiciones de invernadero	98
IV.6.2.	Análisis de la producción de deoxinivalenol de espigas inoculadas en el ensayo de invernadero	101
IV.6.3.	Evaluación del comportamiento de diferentes germoplasmas de trigo candeal ante la infección por <i>Fusarium proliferatum</i> en condiciones de invernadero	103
V.	CONCLUSIONES	105
VI.	BIBLIOGRAFIA	107
VII.	ANEXO	130

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1. Épocas de siembra y cosecha del trigo	2
Figura I.2. Subregiones trigueras	2
Figura I.3. Peritecios maduros con cirro, ascosporas y ascos	11
Figura I.4. Estructuras de <i>Fusarium graminearum</i>	12
Figura I.5. Características microscópicas de <i>Fusarium proliferatum</i>	16
Figura I.6. Características macroscópicas de <i>Fusarium proliferatum</i>	16
Figura I.7. Estructura química de los tricotecenos tipo B	20
Figura I.8. Genes asociados a la biosíntesis de tricotecenos en cepas de <i>Fusarium graminearum</i> productoras de NIV y DON.	21
Figura I.9. Estructura química de la fumonisina B ₁	23
Figura I.10. Ciclo de la fusariosis de la espiga del trigo	27
Figura I.11. Espigas con síntomas de fusariosis	28
Figura III.1. Localidades de la zona triguera de candeal	35
Figura III.2. Contaminación de granos de trigo con especies de <i>Fusarium</i> en el medio Nash-Snyder.	38
Figura III.3. Rf de las soluciones testigos	60
Figura IV.1. Porcentaje de infección y distribución de especies de <i>Fusarium</i> en muestras de trigo candeal	66
Figura IV.2. Porcentaje de infección por <i>Fusarium</i> spp de muestras de trigo candeal provenientes de la localidad de Pieres, cosecha 2011.	67
Figura IV.3. Porcentaje de infección por <i>Fusarium</i> spp de muestras de trigo candeal provenientes de diferentes localidades de la zona productora de trigo candeal.	68
Figura IV.4. Concentración de deoxinivalenol en germoplasmas comerciales y experimentales de trigo candeal durante tres cosechas consecutivas	72
Figura IV.5. Contaminación con deoxinivalenol en germoplasmas comerciales de trigo candeal obtenidos de distintas localidades al sur de la provincia de Buenos Aires	73
Figura IV.6. Contaminación con deoxinivalenol de germoplasmas comerciales de trigo candeal	73
Figura IV.7. Contaminación con deoxinivalenol de germoplasmas comerciales de trigo candeal según la región donde se sembraron	74

Figura IV.8.	74
Figura IV.9. Árbol filogenético combinado de los genes caM y FE 1 α de cepas de <i>F. proliferatum</i> aisladas de trigo.	81
Figura IV.10. Producción de fumonisinas totales (FB1+FB2+FB3) por cepas de <i>F. proliferatum</i> aisladas de trigo candeal	85
Figura IV.11. Perfiles ISSR de las 9 cepas de <i>Fusarium</i> analizadas	86
Figura IV.12. Perfiles ISSR de 17 cepas de <i>F. graminearum</i> analizadas con el cebador ISSR6	88
Figura IV.13. Dendograma de cepas de <i>Fusarium</i> generado por el software NTSYS utilizando análisis de cluster UPGMA con el índice Dice	89
Figura IV.14. Uno de los 826 árboles mas parsimoniosos generados a partir de los datos combinados de las secuencias de EF 1 α de las 8 cepas de <i>Fusarium</i>	90
Figura IV.15. Cultivos de <i>F. graminearum</i> y <i>F. cerealis</i>	91
Figura IV.16. Comparación entre grano de trigo candeal sano (A) y grano de la espiguilla central infectado por <i>F. proliferatum</i> (B).	104

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1. Poblaciones de apareamiento dentro del complejo <i>Gibberella fujikuroi</i>	10
Tabla I.2. Especies filogenéticas dentro del complejo <i>Fusarium graminearum</i>	14
Tabla I.3. Principales micotoxinas implicadas en enfermedades en humanos y animales	19
Tabla III.1. Muestras de trigo candeal	36
Tabla III.2. Parámetros utilizados para la detección de FB ₁ por HPLC MS/MS	42
Tabla III.3. Secuencia de los cebadores utilizados para amplificar los genes caM, EF 1 α y FUM8	45
Tabla III.4. Gradientes de solventes de la fase móvil	48
Tabla III.5. Cepas de <i>Fusarium graminearum</i> utilizadas en el estudio	50
Tabla III.6. Secuencias y temperaturas de annealing de los cebadores ISSR usados como técnica fingerprint en <i>Fusarium graminearum</i>	53
Tabla III.7. Cepas seleccionadas para la secuenciación del gen EF-1 α	55
Tabla III.8. Secuencia de cebadores y fragmentos amplificados en los diferentes genotipos	58
Tabla III.9. Lista de germoplasmas de trigo candeal utilizados en el ensayo de invernadero	61
Tabla III.10. Parámetros utilizados para la detección de DON y derivados acetilados por HPLC-MS/MS	63
Tabla IV.1. Precipitaciones (mm) en las diferentes localidades durante el segundo semestre de cada año	69
Tabla IV.2. Concentración de fumonisinas en muestras de trigo candeal cosecha 07/08	79
Tabla IV.3. Tipo de apareamiento de las cepas de <i>F. proliferatum</i> aisladas de trigo	83
Tabla IV.4. Comparación de estadísticos de la diversidad genotípica de las dos poblaciones de <i>Fusarium graminearum</i> sensu stricto aisladas de Argentina, a partir de datos de ISSR.	94
Tabla IV.5. Parámetros de la diferenciación genética de población entre las poblaciones SF y CF de <i>F. graminearum</i> sensu stricto	94
Tabla IV.6. Determinación del genotipo, quimiotipo y producción de DON por cepas de <i>Fusarium graminearum</i> aisladas de trigo candeal	99
Tabla IV.7. Determinación del genotipo de producción de tricotecenos de cepas de <i>Fusarium cerealis</i> aisladas de trigo candeal	100
Tabla IV.8. Severidad media de infección por <i>F. graminearum</i> evaluada en 12 germoplasmas de trigo candeal.	102

Tabla IV.9. Concentración de deoxinivalenol y sus derivados acetilados en espigas de trigo candeal con síntomas de fusariosis en ensayos de invernadero.	103
Anexo Tabla III.1. Cepas de <i>Fusarium proliferatum</i> utilizadas en el estudio de diversidad genética	130
Anexo Tabla III.2. Cepas de <i>Fusarium proliferatum</i> y <i>F. verticillioides</i> utilizadas en la determinación de capacidad toxicogénica	132
Anexo Tabla IV.1. Incidencia natural de DON y NIV en muestras de trigo candeal	134
Anexo Tabla IV.2. Producción de fumonisinas por cepas de <i>F. proliferatum</i> y <i>F. verticillioides</i> aisladas de trigo candeal	135

Introducción



I. INTRODUCCION

I.1. Trigo

I.1.1. Generalidades

El trigo es una gramínea perteneciente a la tribu *Triticeae*, a la subtribu *Triticinae* y al género *Triticum*. Las especies de trigo más importantes en la agricultura son *Triticum aestivum* ssp. *aestivum* (trigo harinero o trigo pan) y *Triticum turgidum* ssp. *durum* (trigo fideo, duro o candeal). Genéticamente, el trigo candeal es un individuo tetraploide (posee 4 juegos de cromosomas, con un total de 28 cromosomas por célula), mientras que el trigo pan, es un individuo hexaploide (con 42 cromosomas por célula).

El trigo es una planta anual herbácea que puede medir hasta 1,2 m de altura. Los tallos son erectos y presentan estructura de caña, es decir están huecos en su interior excepto en los nudos. El crecimiento de los tallos no es apical sino que se produce por el estiramiento de los tejidos situados por encima de los nudos (meristemo) y las hojas nacen de ellos. Al igual que el resto de las gramíneas presentan dos partes: la vaina que rodea al peciolo y protege el meristemo o zona de crecimiento, y el limbo que tiene forma alargada y presenta nervios paralelos. Las flores se reúnen en espigas, cada espiga consta de un eje principal o raquis sobre las que se distribuyen lateralmente las espiguillas. Estas constan de un eje principal del que nacen unos filamentos terminados por las glumas que encierran las flores hasta que estas empiezan a madurar. Además de las glumas, las flores se encuentran protegidas por otras dos brácteas: la interior, denominada palea y la exterior, llamada lema. Esta última presenta una barba o aristas que confiere a la espiga de trigo su aspecto plumoso.

Cada flor femenina consta de un ovario del que salen dos estilos terminados en dos estigmas plumosos y pegajosos. Las flores masculinas presentan tres estambres que pueden ser dorados, verdes o violetas. La fecundación y maduración del ovulo produce el grano de trigo, un fruto del tipo cariósipide.

Mundialmente la siembra de trigo candeal se lleva a cabo preferentemente en regiones subhúmedas y semiáridas-áridas. En nuestro país se siembra en otoño-invierno, utilizándose variedades de hábito primaveral, y se cosecha a fines de primavera-principio de verano (Figura I.1). El ciclo del mismo oscila entre 130 y 210 días, según la variedad y época de siembra (MAGYP, 2013).



Figura I.1: Época de siembra y cosecha del trigo.

En general, el trigo se siembra en una extensa región, subdividida en nueve subregiones ecológicas típicas establecidas por el Ministerio de Agricultura y Ganadería de la Nación: Subregión Ecológica Triguera I, subregión Ecológica Triguera II-Norte, subregión Ecológica Triguera II-Sud, subregión Ecológica Triguera III, subregión Ecológica Triguera IV, subregión Ecológica Triguera V-Norte, subregión Ecológica Triguera V-Sud, subregión NOA y subregión NEA (Figura I.2). La división de la región triguera Argentina en subregiones ecológicas se basa principalmente en las características del suelo y del clima.

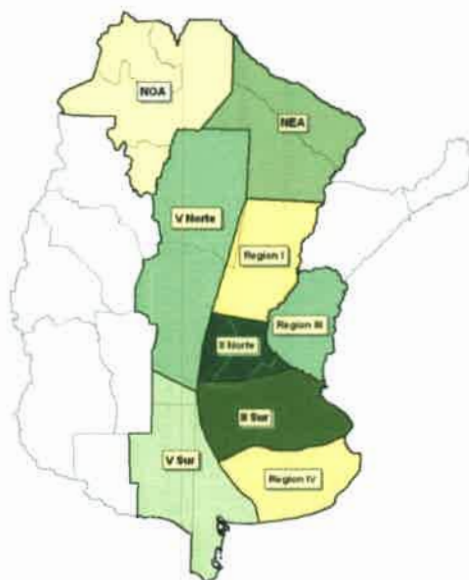


Figura I.2: Subregiones trigueras

En la actualidad, la principal área de cultivo de trigo candeal está limitada a una ancha faja al sur de la provincia de Buenos Aires que abarca gran parte de la Subregión Triguera IV y una fracción de la Subregión V Sur. La amplitud del área en cuestión determina que la misma sea subdividida en zonas con características agroecológicas contrastantes. También se lleva a cabo la siembra de este cultivo en las provincias de La Pampa, San Luis y Tucumán, pero siempre en menor escala.

La dureza y vitreosidad del grano, el contenido de proteína y la fuerza del gluten, hacen del trigo candeal el cereal más apropiado para la fabricación de pastas secas.

El origen del trigo se ubica al sudoeste de Asia; su domesticación data de unos 8000 años AC, en la mesopotamia del Tigris y el Éufrates, actual zona de Irak, Irán y Siria. El trigo fue el cultivo que aseguró la fundación de las civilizaciones occidentales, muy dependientes de una base cerealera para su abastecimiento. Se convirtió así en la principal fuente de nutrientes de las dietas occidentales. El trigo fue introducido en América desde Europa por los conquistadores españoles, quienes incluían el pan en su dieta diaria. En Argentina, este cultivo fue introducido en el año 1527, en la provincia de Santa Fe. Trescientos cincuenta años después, con el avance de la agricultura en la Región Pampeana, el trigo pan se pudo difundir masivamente, convirtiéndose en el motor de la expansión agrícola. Argentina se convertía en las primeras décadas del siglo XX en un importante exportador de trigo pan y maíz, junto con Rusia y los Estados Unidos. Por su parte, los orígenes de la siembra del trigo candeal se remontan a 1914 en la localidad de Tres Arroyos, provincia de Buenos Aires, cuando un inmigrante italiano, buscando mejorar la calidad de sus cultivos, comenzó a utilizar granos traídos de Italia. Sin embargo, el cultivo de trigo candeal a gran escala comenzó en la Argentina a fines de la década del 50, con una producción máxima en la campaña 1969/70 de 760.000 toneladas (419.700 hectáreas). En ese período la mayor parte de la producción se destinaba a la exportación. Hasta 1974 Italia fue el principal comprador de trigo candeal, variando los volúmenes de compra entre 240.535 y 521.044 toneladas. Si bien este país era productor de trigo candeal, se abastecía en la Argentina por la excelente calidad de gluten del grano. La superficie sembrada de trigo candeal en el total de trigo, representaba en la década del 60 entre un 6 y 8,5%, en las décadas del 70 y 80 no superaba el 1% (Acuña y col., 1982) y actualmente representa el 1% de la superficie total. La producción fue disminuyendo con ciertas variaciones entre años, llegando aproximadamente a 182.958 toneladas (64 mil ha) en 2011/12 (MAGyP, 2013).

Esta gran reducción en la superficie cosechada de trigo candeal hizo perder a la Argentina su tercer lugar como país exportador en el comercio internacional. Actualmente, el total de trigo candeal producido en el país se vuelca al mercado interno, por lo que no existe un saldo exportable, como en el caso de la variedad pan, y tampoco se registran importaciones. La disminución observada en los últimos años en la superficie destinada a este cultivo ha obligado a las industrias tales como molinos y fábricas de pastas a implementar el sistema de siembra por contrato, de modo de garantizar la cantidad de materia prima mínima necesaria para el funcionamiento anual. Las firmas fideeras, antes de comenzar la campaña de producción de trigo, planifican la producción anual de pastas secas con el fin de determinar los requerimientos de materia prima y de acuerdo a sus necesidades deciden la cantidad en hectáreas de trigo candeal que deben contratar con los productores. El productor se obliga a sembrar una cierta superficie y a vender toda la producción y el comprador se obliga a comprar toda la producción. De esta manera, la industria se asegura de contar con la cantidad de materia prima necesaria para su producción (Demarie y col., 1999).

Italia es el mayor consumidor y productor de pastas alimenticias del mundo. Su producción se focaliza en las pastas secas (95,7% en 2008) al igual que su consumo per capita (91,2% en 2008), que alcanza la cifra de 26 Kg/hab/año. En el ranking de consumo anual por habitante le siguen Venezuela y Túnez, con aproximadamente 12 kg y Grecia, Suiza y Estados Unidos con 9 kg. De acuerdo a las cifras de consumo de 2011, Argentina con 7,9 Kg per capita ocupa el puesto N° 13 en el mundo, por debajo de Chile (8,4 Kg) y de Perú (8,2 Kg), pero por encima de Brasil, cuya población consume 6,2 Kg (MAGyP, 2013).

La producción mundial de pasta ronda las 13,6 millones de toneladas. Italia produce alrededor de 3 millones de toneladas, seguida en segundo lugar por Estados Unidos con 2 millones y en tercer lugar se encuentra Brasil con aproximadamente 1 millón de toneladas. Dentro de Latinoamérica, el mayor productor es Brasil (10% mundial), seguido por México (4%), Venezuela (3,5%) y Argentina (3%). La producción nacional de pastas alimenticias en 2011 alcanzó las 324.437 toneladas, en su mayor parte correspondiente a pastas secas envasadas (alrededor del 78%) y las exportaciones ascendieron a 51 mil toneladas, lo que representó un ingreso de 44 millones de dólares. Los principales destinos de los envíos son Chile, Brasil y Angola, siendo este último el principal comprador (MAGyP, 2013).

El proceso por el cual fue disminuyendo la superficie sembrada puede atribuirse a

una combinación de factores: a) pérdida de mercados internacionales, b) nuevas demandas de variedades con calidades diferenciadas, c) avance de cultivos con mayor rentabilidad en la zona agrícola argentina d) disminución en el rendimiento y la calidad por enfermedades fúngicas.

En cuanto a este último punto, una de las principales enfermedades que afecta al trigo pan y al trigo duro es la fusariosis de la espiga de trigo (FET). Esta enfermedad fúngica es causada principalmente por *Fusarium graminearum* y el desarrollo de la misma en el cultivo es dependiente de las condiciones climáticas existentes al momento de la antesis, principalmente alta humedad relativa (HR) y temperaturas que oscilan los 25°C. Causa disminución del rendimiento en la cosecha, disminución de la calidad de los granos y la presencia del hongo puede generar la aparición de micotoxinas, tales como el deoxinivalenol, perjudiciales tanto para el hombre como para los animales.

Sin embargo, en estudios previos realizados en nuestro laboratorio en los cuales se estudió la incidencia de especies fúngicas y micotoxinas, focalizados al estudio de la FET y la presencia de deoxinivalenol, se vio que durante los años no conductivos para la fusariosis de la espiga, es decir, cuando las condiciones son de sequía, una de las principales especies de *Fusarium* aislada de los granos de trigo fue *F. proliferatum* (Palacios y col., 2011). Este hongo es un importante patógeno de maíz y también productor de fumonisinas. Existen diversos informes de la presencia de estas toxinas en granos de trigo y en productos derivados destinados al consumo humano (Castellá y col., 1999; Cirillo y col., 2003a; Cendoya y col., 2013).

1.2. Género *Fusarium*

Fusarium es un extenso género de hongos filamentosos de distribución universal, ubicuos y de gran importancia económica ya que algunas especies son fitopatógenos comunes de una gran variedad de plantas. También pueden generar infecciones en humanos y en animales domésticos. Este género pertenece al phylum Ascomycota, clase Ascomycetes, orden Hypocreales. El término *Fusarium* fue introducido por el micólogo alemán Link, en 1809, al describir un hongo que tenía esporas de forma fusiforme. Hasta la fecha existen alrededor de 80 especies de *Fusarium*. Las especies dentro de este género son capaces de producir una gran variedad de metabolitos secundarios, de los cuales algunos están asociados a enfermedades en plantas o cáncer y defectos de

crecimiento en animales y humanos. Como fitopatógenos son capaces de causar diversos tipos de enfermedades y con distinta severidad, también muchos de ellos pueden subsistir como endófitos sin causar síntomas en sus huéspedes. Dentro de las enfermedades que causan se encuentran la podredumbre de raíces o tallos, canchales, marchitamiento, podredumbre de frutos o semillas y enfermedades en las hojas (Leslie y Summerell, 2006).

Las especies dentro de este género producen tres tipos de esporas: macroconidios, microconidios y clamidosporas. Los macroconidios pueden ser producidos en monofialides y polifialides en el micelio aéreo o en monofialides de estructuras especializadas llamadas esporoquios. Una monofialide es una célula conidiógena con una sola apertura a partir de la cual se origina el conidio, mientras que una polifialide tiene diversos puntos a partir de los cuales se libera el conidio. Los microconidios pueden variar en tamaño y forma y son producidos en el micelio aéreo, tanto en monofialides como polifialides. Por último, las clamidosporas son estructuras de resistencia con paredes celulares engrosadas y alto contenido lipídico (Leslie y Summerell, 2006).

Tres teleomorfos se relacionan con los anamorfos del género *Fusarium*: *Gibberella*, *Haematonectria* y *Albonectria* (Samuels y Hallet, 1983; Rossman, 1996; Rossman y col., 1999; Samuels y col., 2001). *Gibberella* es el género más comúnmente asociado a la mayoría de las especies de *Fusarium* (Samuels y col., 2001) e incluye a los patógenos de plantas *Gibberella zeae* (*F. graminearum*), *G. moniliformis* (*F. verticillioides*) y otras especies incluidas en el complejo *G. fujikuroi*. El género *Haematonectria* incluye *H. haematococca* (*F. solani*), de distribución cosmopolita, patógeno de plantas de importancia económica tales como porotos, cítricos, soja, maní, pimienta, papa y calabaza. *Albonectria* se asocia con un número pequeño de especies de *Fusarium*, entre ellas la más importante es *F. decemcellulare*, patógeno en regiones tropicales y subtropicales asociado a canchales de varias especies de frutales, tales como cacao, aguacate, mango y guaraná.

1.2.1. Concepto de especie en *Fusarium*

El concepto de especie es central en biología y ha recibido considerable debate a lo largo del tiempo aunque aún no se ha llegado a una definición de especie acordada universalmente. Las diferentes definiciones de especie se han basado en similitudes

morfológicas, parámetros ecológicos, aislamiento reproductivo, principios evolutivos y combinaciones de todos estos (Taylor, 2000).

La correcta delimitación de las especies fúngicas es importante a la hora de establecer regulaciones, realizar ensayos de resistencia a patógenos en plantas, determinar especificaciones de organismos utilizados en la producción de medicamentos y en el desarrollo de patentes, y en la conservación de la biodiversidad y funciones del ecosistema (Brasier, 1997).

Los conceptos de especie comúnmente utilizados son el concepto de especie morfológica, el concepto de especie biológica y el concepto de especie filogenética. El concepto de especie más utilizado en micología es el morfológico ya que al menos casi 70000 de los hongos descritos han sido clasificados a través del uso de caracteres morfológicos (Hawksworth y col., 1996) o de otros caracteres fenotípicos como el crecimiento a diferentes temperaturas o actividades de agua (Pitt, 1979), la producción de metabolitos secundarios (Frisvad y Filtenborg, 1990) o la presencia de pigmentos (Besl y Bresinsky, 1997). La principal ventaja de la utilización de este concepto es que ha sido utilizado ampliamente, por lo tanto se pueden realizar comparaciones entre taxas existentes o entre éstas y nuevas taxas. La desventaja de este concepto es que muchas veces las especies identificadas por caracteres morfológicos en realidad comprenden más de una especie al identificarlas mediante los criterios de especie biológica o filogenética.

El concepto de especie biológica considera que una especie es un conjunto de individuos o poblaciones que tienen la capacidad de cruzarse sexualmente entre sí y que están aislados reproductivamente de otro grupo de individuos (Mayr, 1940). Este concepto es de gran importancia en micología, se lo ha utilizado para identificar grupos de individuos compatibles sexualmente y que por lo tanto formaban parte de la misma especie. Sin embargo, es imposible aplicar los ensayos de apareamiento a hongos que solo se reproducen asexualmente; aproximadamente el 20% de los hongos tienen este tipo de reproducción (Reynolds, 1993). Además, algunos hongos heterotálicos no llegan a aparearse sexualmente en cultivos en el laboratorio y otros hongos no pueden ser cultivados (Taylor, 2000).

La filogenia es el estudio de las relaciones evolutivas entre diferentes grupos de organismos. Según Cracraft, (1983) una especie filogenética es un grupo irreducible de organismos con características diagnósticas diferentes a las de otros grupos similares y que además exhibe un patrón de ancestro y descendencia. Las especies se definen, desde el punto de vista fenotípico, por el nivel de soporte de su estado monofilético.

Históricamente, estas relaciones filogenéticas se inferían a partir del análisis de datos generalmente morfológicos y en menor medida, anatómicos, químicos y cromosómicos. Actualmente, gracias a las técnicas moleculares basadas en PCR, estas relaciones se inferen a partir de la comparación de regiones del ADN de los organismos. Este concepto se puede aplicar tanto a hongos con reproducción sexual como asexual. Sin embargo, la principal desventaja de este concepto es que la delimitación de una especie es subjetiva teniendo en cuenta la información de la genealogía de un solo gen. Por esto, Taylor (2000) planteó el termino de reconocimiento de especies filogenéticas por concordancia genealógica (GCPSR), el mismo consiste en delimitar una especie teniendo en cuenta la concordancia de más de una genealogía de un gen.

Tanto el concepto de especie morfológica, como biológica y filogenética, contribuyen a formar un concepto de lo que es una especie dentro del género *Fusarium*.

El principal enfoque de la clasificación de *Fusarium* todavía es morfológico y la principal característica que se tiene en cuenta para la identificación del género es la presencia de la espora de reproducción asexual con forma de banana (macroconidio). Las diferencias existentes en la forma de estas esporas es la característica más importante para distinguir especies dentro del género. También, otras características como la presencia/ausencia de microconidios y su forma, la presencia/ausencia de clamidosporas y la característica de las células conidiogenas contribuyen a la identificación. Los taxónomos sugieren que para poder llegar a una correcta identificación morfológica de las especies, las cepas deben provenir de cultivos monospóricos y deben crecer en medios de cultivo especiales y bajo condiciones estandarizadas. La desventaja que presenta este concepto en *Fusarium* es que los caracteres morfológicos distintivos son limitados, probablemente están sujetos a selección y su expresión es sensible a las condiciones ambientales (Leslie y Summerell, 2006). Sin embargo, la separación de especies teniendo en cuenta características morfológicas es una herramienta útil para la clasificación inicial de la biodiversidad dentro del género. Los esquemas de clasificación de Gerlach y Nirenberg (1982) y Nelson y col. (1983) se basan en las características morfológicas y proveen un sistema de clasificación en secciones a partir del cual se basan los conceptos de especie biológica y filogenética. Debido a su continua utilización y a la necesidad de identificar rutinariamente cultivos de *Fusarium*, el concepto de especie morfológica continua siendo importante. Además, algunas de las especies de *Fusarium* más importantes tanto a nivel patogénico como toxicogénico, pueden ser identificadas morfológicamente.

El concepto de especie biológica cambia el enfoque desde los individuos hacia las poblaciones y define las especies en términos de cómo los miembros de las poblaciones interactúan y se relación entre sí, sin tener en cuenta la comparación con un individuo estándar. Dos poblaciones pertenecen a la misma especie biológica si son capaces de intercambiar información genética entre ellas y, dos individuos son miembros de la misma especie biológica si entre ellos pueden cruzarse y producir una progenie fértil. El concepto de especie biológica ha sido desarrollado para unas pocas especies dentro del género *Fusarium*, principalmente porque hay un alto nivel de reproducción asexual entre los miembros, las frecuencias relativas de los alelos de "tipo de apareamiento" (*MAT-1/MAT-2*) son diferentes y algunas cepas fallan en el cruzamiento con las cepas parentales testigos dando resultados falsos negativos (Leslie y Summerell, 2006). *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Ito in Ito y K. Kimura ha sido considerado por mucho tiempo el teleomorfo de varias especies de *Fusarium* que por características morfológicas habían sido agrupadas dentro de la sección *Lisæola* por Nelson y col. (1983). Dentro de esta sección se encontraban 4 especies que incluían a *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* y *F. anthophilum*. Por otra parte, Gerlach y Nirenberg (1982), identificaron 10 especies dentro de esta sección y adoptaron el nombre de *F. verticillioides* en lugar de *F. moniliforme*, como se utiliza actualmente. A partir de los estudios de cruzamientos sexuales, se ha determinado que dentro de esta sección delimitada por características morfológicas, existen 11 especies biológicas o poblaciones de apareamiento distintas (MPs) (Tabla I.1).

El concepto de especie filogenética está siendo ampliamente utilizado en *Fusarium* y es útil para determinar aquellas especies que no tienen reproducción sexual o que son principalmente o exclusivamente homotálicas (autofértiles). Los hongos homotálicos normalmente no intercambian genes con otros miembros de la misma "especie". Con respecto a *Gibberella fujikuroi*, a partir de estudios filogenéticos se ha podido determinar que las 11 especies biológicas determinadas por cruzamientos sexuales también forman clados monofiléticos en estos estudios, demostrando que existe congruencia entre los conceptos de especie morfológica, biológica y filogenética, al menos para este complejo de especies (Leslie y Summerell, 2006).

Tabla I.1. Poblaciones de apareamiento dentro del complejo *Gibberella fujikuroi*

Especie de <i>Fusarium</i>	Especie de <i>Gibberella</i>	Población de apareamiento
<i>F. verticillioides</i>	<i>G. moniliformis</i>	A
<i>F. sacchari</i>	<i>G. sacchari</i>	B
<i>F. fujikuroi</i>	<i>G. fujikuroi</i>	C
<i>F. proliferatum</i>	<i>G. intermedia</i>	D
<i>F. subglutinans</i>	<i>G. subglutinans</i>	E
<i>F. thapsinum</i>	<i>G. thapsina</i>	F
<i>F. nygamai</i>	<i>G. nygamai</i>	G
<i>F. circinatum</i>	<i>G. circinata</i>	H
<i>F. konzum</i>	<i>G. konza</i>	I
<i>F. gaditjirii</i>	<i>G. gaditjirii</i>	J
<i>F. xylarioides</i>	<i>G. xylarioides</i>	K

I.2.2. Reproducción sexual

A nivel de reproducción sexual, las especies dentro del género *Fusarium* pueden ser homotáticas o heterotáticas. Las especies homotáticas son aquellas que son autofértiles, es decir, un solo organismo es capaz de llevar a cabo la reproducción sexual, mientras que en las especies heterotáticas hace falta de dos individuos compatibles para que se lleve a cabo la misma. La reproducción sexual en los hongos está determinada por los genes de apareamiento o matying type (MAT), que en *Fusarium* es un único locus localizado en el cromosoma 6, con dos alelos idiomórficos, *MAT-1* y *MAT-2* (Leslie y Klein, 1996). Los alelos idiomórficos se encuentran en la misma posición en el cromosoma pero no tienen una secuencia similar y hasta pueden ser de diferente tamaño. La delección o inactivación de la secuencia de los alelos MAT puede llevar a la esterilidad del individuo (Leslie y Summerell, 2006).

Los hongos heterotáticos necesitan de otro individuo de tipo de apareamiento opuesto con el idiomorfo MAT compatible. Ambos alelos contienen los genes que controlan los diversos procesos que llevan a la reproducción sexual (identificación celular, fusión celular, formación del estado o fase dicariótica, fusión nuclear, meiosis y

esporulación). En hongos homotálicos estos genes también son requeridos para llevar a cabo una reproducción sexual exitosa, sin embargo no es necesario otro individuo compatible si no que ambos idiomorfos están presentes en el genoma o fusionados en un solo locus en el mismo individuo. Ambas formas de reproducción sexual son dinámicas y han evolucionado para satisfacer las necesidades de apareamiento de las distintas especies fúngicas (Ni y col., 2011). En *F. verticillioides* el locus *MAT-1* contiene tres genes (*MAT1-1*, *MAT1-2* y *MAT1-3*) mientras que el locus *MAT-2* contiene sólo uno (*MAT2-1*) (Yun y col., 2000). La función de los genes *MAT1-1* y *MAT2-1* sería controlar los procesos de apareamiento, mientras que los genes *MAT1-2* y *MAT1-3* probablemente estarían involucrados en la ascosporogénesis (Pöggeler, 2001).

En el hongo homotálico, *Gibberella zeae* la organización de los genes MAT es inusual ya que ambos idiomorfos están ubicados en un solo cluster de genes. Sin embargo, la orientación de los mismos es similar a la encontrada en *G. fujikuroi*.

Las regiones conservadas han sido usadas para desarrollar cebadores degenerados que se pueden usar para amplificar porciones diagnósticas de ambos idiomorfos MAT en la mayoría de las especies de *Fusarium* (Kerényi y col., 1999; Steenkamp y col., 2000).

El resultado de un cruzamiento sexual exitoso es la formación de estructuras de reproducción sexual llamadas peritecios con ascos y ascosporas maduras que derivan de procesos meióticos (Leslie y Summerell, 2006) (Figura I.3).

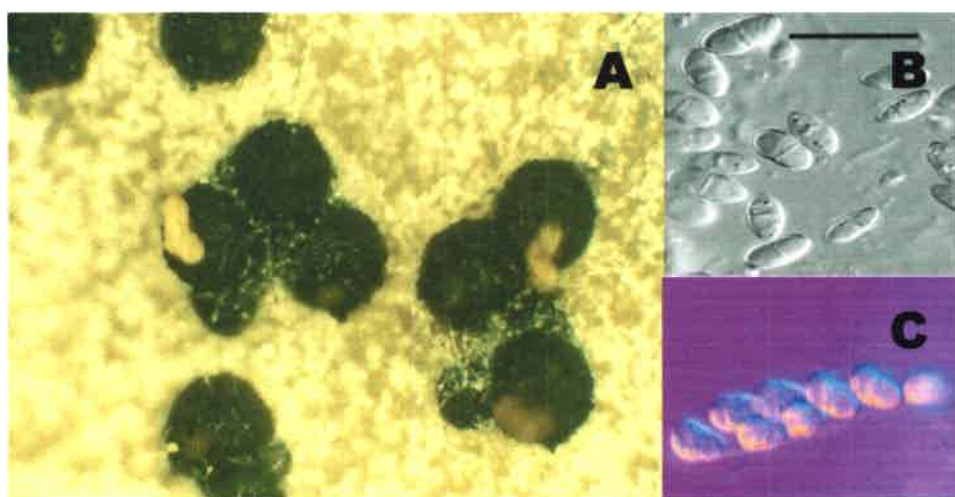


Figura I.3: A: Peritecios maduros con cirro; B: Ascosporas; C: Asco con ascosporas

1.3. *Fusarium graminearum*

Fusarium graminearum produce micelio color rojo carmín en sustratos con alto contenido de carbono, puede formar clamidosporas en el micelio y en algunos casos dentro de los macroconidios. Posee monofálides, a partir de las cuales se forman los macroconidios. La formación de macroconidios generalmente es escasa, son de pared gruesa, poseen de 5 a 6 septos, levemente curvados o casi rectos. La pared ventral es recta y la dorsal levemente arqueada. Los microconidios están ausentes. En agar hojas de clavel forma esporodocios de color anaranjado claro. Es un hongo homotálico y por lo tanto no necesita de cruzamientos para reproducirse sexualmente, el estado teleomorfo, *Gibberella zeae*, se evidencia por la presencia de peritecios conteniendo las ascosporas. Estas se forman comúnmente en agar hojas de clavel y agar zanahoria (Figura 1.4) (Leslie y Summerell, 2006).

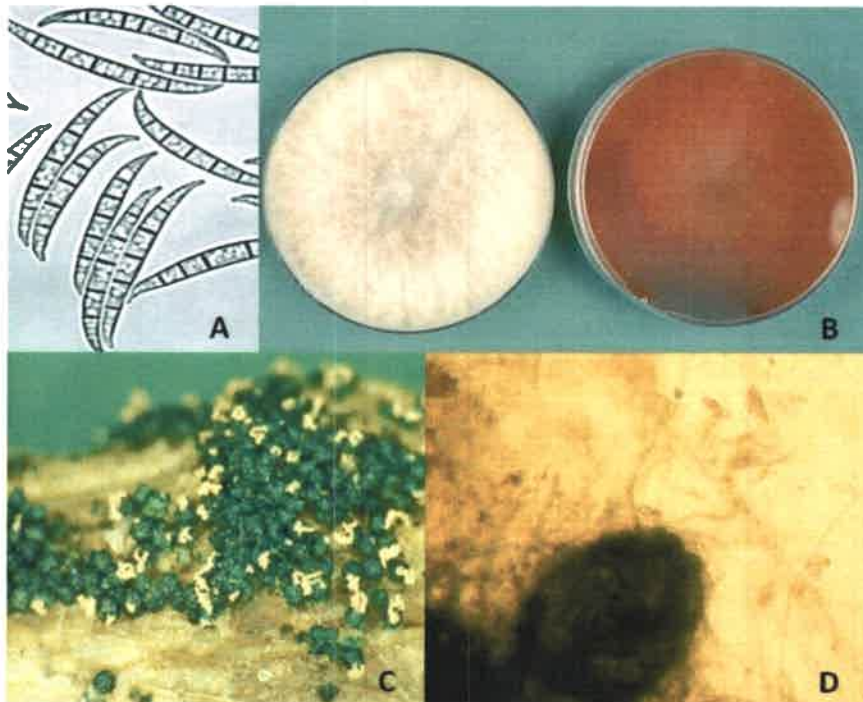


Figura 1.4: Estructuras de *Fusarium graminearum*. A: Macroconidios, B: Cultivo en APG (anverso y reverso), C: Peritecios con cirro y D: Peritecio con ascos y ascosporas.

Su distribución es cosmopolita y se lo encuentra en maíz, trigo, soja, cebada, avena, aunque también en plantas anuales y perennes. Es capaz de producir diferentes enfermedades en estos cultivos como fusariosis de la espiga en trigo, avena y cebada (Mathre, 1997; Gilbert y Fernando, 2004; Tekauz y col., 2004) y podredumbre de tallo y mazorca en maíz (White, 1999). Es un parásito facultativo y como tal, tiene la capacidad de sobrevivir como saprófito asociado a rastrojos de trigo, maíz y malezas de la familia de las gramíneas. Desarrolla con temperaturas que oscilan entre 20°C y 30°C y períodos de elevada humedad relativa ambiente, superior al 80% (Leslie y Summerell, 2006).

Este hongo puede ser muy agresivo y es capaz de producir micotoxinas en los granos que son nocivas para el hombre y los animales. *F. graminearum* es productor de tricotecenos tipo B como deoxinivalenol (DON), sus derivados acetilados 15-Ac-DON y 3-Ac-DON, nivalenol (NIV) y de otras toxinas como zearalenona (ZEA).

1.3.1. Complejo de especies de *Fusarium graminearum*

Este patógeno fue considerado por mucho tiempo como una sola especie, sin embargo a partir del año 2000 se lo ha reclasificado en un complejo de especies filogenéticas. A partir de la utilización de herramientas moleculares tales como el genotipado multilocus (multilocus genotyping, MLGT), combinado con el reconocimiento de especies filogenéticas por concordancia genealógica de 13 genes conservados, y diversos marcadores moleculares, a la fecha se ha logrado determinar la existencia de 16 especies filogenéticas, de las cuales 15 de ellas han sido descritas formalmente como especies (Tabla 1.2) (O'Donnell y col., 2000, 2004, 2008; Starkey y col., 2007; Yli-Mattila y col., 2009; Sarver y col., 2011; Aoki y col., 2012). *F. graminearum* sensu stricto es la especie comúnmente asociada a la enfermedad en todo el mundo, incluso en nuestro país (Ramírez y col., 2007; Álvarez y col., 2011).

O'Donnell y col. (2000) plantearon la existencia de 7 linajes dentro del complejo separados biogeográficamente y postularon que 5 de ellos eran endémicos del hemisferio sur (2 linajes pertenecientes a América del Sur/Central y 3 pertenecientes a África), mientras que 2 de ellos pertenecían al hemisferio norte.

Según los estudios llevados a cabo hasta la fecha, *F. austroamericanum*, *F. meridionale*, *F. cortaderiae* y *F. brasiliicum* parecerían ser endémicos de América del Sur (Starkey y col., 2007; Sampietro y col., 2011); *F. acaciae-meamsii* de Australia o menos

probable de África (O'Donnell y col., 2004), *F. asiaticum*, *F. vorosii* y *F. ussurianum* de Asia (O'Donnell y col., 2004); *F. aethiopicum* de África (O'Donnell y col., 2008), *F. boothii* y *F. mesoamericanum* de América Central (O'Donnell y col., 2004; 2008), y *F. gerlachii* de Estados Unidos (Starkey y col., 2007). Sin embargo, a lo largo de los años estas especies han ido distribuyéndose en todo el mundo debido al comercio de granos y cereales. Es por esto que se ha aislado *F. asiaticum* en granos de trigo en Estados Unidos (Gale y col., 2011), también en nuestro país se ha reportado el aislamiento de *F. meridionale* y *F. boothii* en maíz y soja (Sampietro y col., 2010; Barros y col., 2012). Asimismo, en Brasil se ha reportado la existencia de *F. meridionale* y *F. austroamericanum* en trigo y cebada (Astolfi y col., 2011, 2012). Mientras que en Sudáfrica se ha aislado *F. boothii* de maíz, trigo y cebada (Bougty y col., 2011).

Tabla I.2. Especies filogenéticas dentro del complejo *Fusarium graminearum*

Especie	Origen	Referencia
<i>F. austroamericanum</i>	América del Sur	O'Donnell y col., 2004
<i>F. meridionale</i>	América del Sur	O'Donnell y col., 2004
<i>F. boothii</i>	América Central	O'Donnell y col., 2004
<i>F. mesoamericanum</i>	América Central	O'Donnell y col., 2004
<i>F. acaciae-mearnsii</i>	Australia/África	O'Donnell y col., 2004
<i>F. asiaticum</i>	Asia	O'Donnell y col., 2004
<i>F. graminearum sensu stricto</i>	Hemisferio Norte	O'Donnell y col., 2004
<i>F. cortaderiae</i>	América del Sur	O'Donnell y col., 2004
<i>F. brasilicum</i>	América del Sur	O'Donnell y col., 2004
<i>F. gerlachii</i>	Estados Unidos	Starkey y col., 2007
<i>F. vorosii</i>	Japón	Starkey y col., 2007
<i>F. aethiopicum</i>	Etiopía	O'Donnell y col., 2008
<i>F. ussurianum</i>	Rusia	Yli-Mattila y col., 2009
<i>F. louisianense</i>	Estados Unidos	Sarver y col., 2011
<i>F. nepalense</i>	Nepal	Sarver y col., 2011

1.4. *Fusarium proliferatum*

Fusarium proliferatum se caracteriza por formar microconidios en cadenas y en falsas cabezas a partir de monofiálides y polifiálides (Figura 1.5). Las cadenas de microconidios son de longitud moderada y por lo general más cortas que las de *F. verticillioides*, patógeno importante por su capacidad de producir fumonisinas. Una característica importante que presenta esta especie es la ausencia de clamidosporas. En agar papa glucosado forma micelio blanco que con el tiempo se torna violáceo (Figura 1.6) (Leslie y Summerell, 2006). Es un hongo heterotálico y por lo tanto necesita de cruzamientos para reproducirse sexualmente. Su teleomorfo, *Gibberella intermedia*, pertenece al complejo de especies *Gibberella fujikuroi*, compuesto por especies biológicas aisladas reproductivamente. Su distribución es cosmopolita y coloniza una amplia variedad de huéspedes como bananas (Jiménez y col., 1993), pinos (Ocamp y col., 2002), palmeras (Abdalla y col., 2000), frutas cítricas (Hyun y col., 2000), espárragos (Elmer, 1995), cebolla, ajo (Stankovic y col., 2007) así como también arroz (Desjardins y col., 2000) y sorgo (Leslie y col., 1990). En trigo se lo ha identificado como un patógeno secundario de la fusariosis (Bottalico y Perrone, 2002) y en Estados Unidos se lo ha asociado al escudete negro (Desjardins y col., 2007). En maíz es uno de los patógenos más importantes causante de la podredumbre de la espiga, junto con *F. verticillioides*, (González y col., 1995; Chulze y col., 1996). En algunos de estos huéspedes puede encontrarse sin causar síntomas, es decir, endofíticamente (Proctor y col., 2010).

Fusarium proliferatum es capaz de producir micotoxinas en los granos que pueden ser nocivas para el hombre y los animales, se ha informado la capacidad de algunas cepas de producir fumonisinas, moniliformina, beauvericina, ácido fusárico, eniantinas, fusarina y fusaroproliferina. A pesar de que esta especie es productora de múltiples micotoxinas, hay una variación dentro de la especie con respecto a la producción de cada toxina, individualmente. Incluso cepas aisladas del mismo hospedador difieren en su perfil micotoxicogénico (Desjardins, 2006).

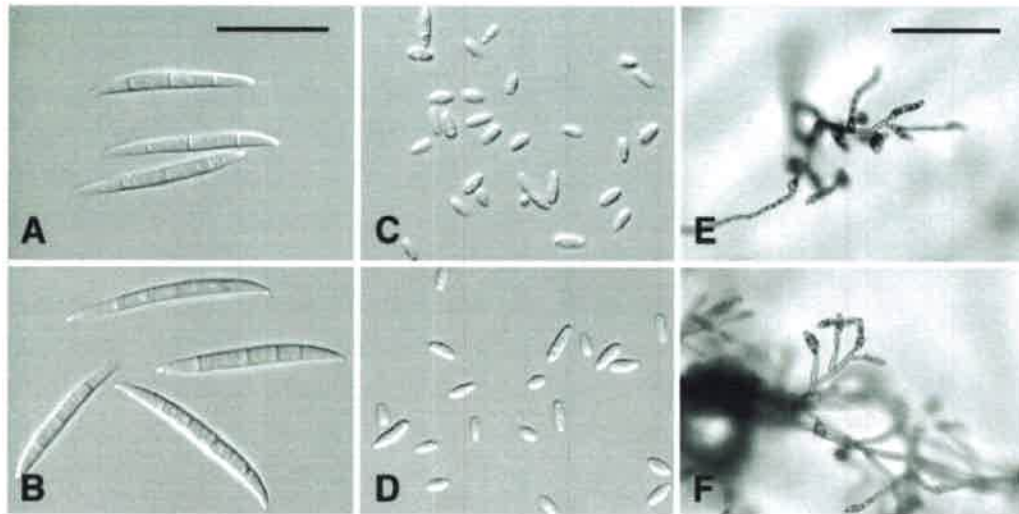


Figura I.5: Características microscópicas de *Fusarium proliferatum*. A y B: macroconidios; C y D: microconidios; E y F: microconidios *in situ* en CLA

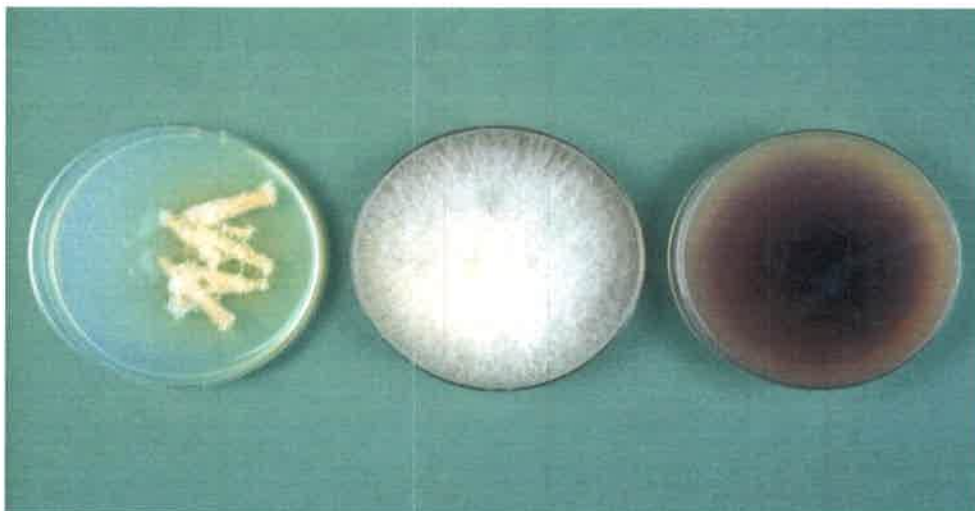


Figura I.6: Características macroscópicas de *Fusarium proliferatum* en CLA y PDA

1.5. Micotoxinas

Las micotoxinas son un grupo grande y diverso de toxinas producidas naturalmente por los hongos. Hasta la actualidad, se conocen aproximadamente más de 300 micotoxinas, sin embargo solo pocas de ellas han sido implicadas como agentes químicos causantes de enfermedades en humanos y animales (Tabla 1.3). Entre los principales géneros fúngicos productores de micotoxinas se encuentran *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Claviceps*, *Alternaria*, *Helminthosporium* y *Fusarium* (Steyn, 1971; Urughucki y Yamazahi, 1978). Son moléculas no proteicas, de bajo peso molecular y derivan principalmente de aminoácidos, del ácido shikímico, del ácido mevalónico o del malonil CoA. Son producto del metabolismo secundario de los hongos, es decir no son esenciales para el crecimiento del organismo. Generalmente, son producidas en el micelio del hongo pero también pueden acumularse en estructuras especializadas como conidios o esclerocios y también pueden ser liberadas al medio en el cual se encuentra el hongo (Bhatnagar y col., 2002). Se cree que estos compuestos cumplirían un rol ecológico para favorecer la competencia de las especies toxicogénicas y colonizar los diferentes nichos (Ciegler, 1983).

Estas toxinas pueden contaminar una gran variedad de alimentos destinados para consumo humano y animal, como cereales, legumbres, oleaginosas y también en frutas y vegetales. La presencia de estas toxinas en alimentos no solo representa un riesgo para la salud animal y humana sino que afectan a la economía y al comercio mundial (Cole y col., 1981).

La contaminación de los cultivos puede ocurrir en el campo, durante el transporte o durante el almacenamiento (Steyn, 1995), esto dependerá tanto de factores ambientales como de factores propios del hongo toxicogénico (potencial genético). Los factores ambientales que afectan la producción de micotoxinas son el sustrato, la actividad acuosa (humedad y HR), temperatura, disponibilidad de oxígeno, duración de la exposición a las condiciones de estrés por parte del hongo y la interacción entre insectos, microbios o animales (Bhatnagar y col., 2002).

Las micotoxinas pueden tener efectos tóxicos, mutagénicos, teratogénicos y carcinogénicos en animales y humanos. A estos efectos se los han denominado micotoxicosis y la severidad de los mismos depende del tipo de micotoxina, de la dosis ingerida, del tiempo de exposición y de factores propios del individuo como edad, estado de salud y estado nutricional. Las micotoxicosis afectan las células de diferentes órganos

como riñón, hígado, pulmones y los sistemas nervioso, endocrino e inmunológico. Estas pueden ser agudas o crónicas dependiendo de la cantidad de toxina ingerida y del tiempo de exposición a la misma. Bajas dosis por tiempo prolongado llevan a una intoxicación crónica (Bhatnagar y col., 2002).

1.5.1. Tricotecenos

Los tricotecenos constituyen una familia de más de 60 metabolitos producidos por un amplio número de géneros fúngicos entre los cuales se destacan *Fusarium*, *Myrothecium*, *Phomopsis*, *Stachybotrys*, *Trichoderma* y *Trichotecium*. Todos los tricotecenos contienen un esqueleto tetracíclico 12,13-epoxitricoteceno (Bennett y Klich, 2003), el grupo epóxido en las posiciones C_{12,13}, es el responsable de la actividad toxicológica (WHO, 2001). Han sido clasificados en cuatro grupos según el patrón de sustitución en el esqueleto: el Tipo A y el Tipo B se distinguen por la presencia o ausencia de un grupo carbonilo en la posición C₈, respectivamente. También estos últimos pueden diferir en la ausencia (Tipo A) o presencia (Tipo B) de una función hidroxilo en el C₇. El Tipo C (crotoxina, bacarina) posee un grupo epóxido adicional en las posiciones C_{7,8} o C_{9,10} y el tipo D (satratoxina, roridina) contienen un anillo macrocíclico entre las posiciones C_{4,15} (Logrieco y col., 2002).

Estas toxinas son inhibidores potentes de la síntesis de proteínas en eucariotas, pudiendo interferir en las etapas de iniciación, elongación o terminación. Se unen a la subunidad ribosomal 60S e interaccionan con la enzima peptidiltransferasa (Cundliffe y Davies, 1977; Murthy y col., 1985; Brown y col., 2001). El grupo epóxido en C_{12,13}, común en todos los tricotecenos, es necesario para la inhibición de la síntesis de proteínas (Feinberg y McLaughlin, 1989; Bennett y Klich, 2003).

Tabla I.3: Principales micotoxinas implicadas en enfermedades en humanos y animales

Micotoxina	Hongo productor	Efecto tóxico	Micotoxicosis
Alternariol, Acido tenuazónico	<i>Alternaria alternata</i>	Apoptosis Mutagénico	Desorden hematológico (Onyalaí)
Aflatoxinas	<i>Aspergillus flavus</i> <i>A. parasiticus</i>	Apoptosis Mutagénico Hepatotóxico Carcinogénico Teratogénico	Aflatoxicosis aguda Hepatocarcinogénesis Cirrosis Síndrome de Rye
Ocratoxina	<i>A. ochaceus</i> <i>A. carbonarius</i> <i>P. verrucosum</i> <i>P. nordicum</i>	Carcinógeno Nefrotóxico Inmunotóxico Teratogénico	Nefropatía endémica de los Balcanes
Tricotecenos	<i>F. graminearum</i> <i>Trichothecium spp</i>	Inhibidores de la síntesis de proteínas	Nauseas, vómitos, rechazo del alimento Retardo del crecimiento en niños Afecta la respuesta inmune
Fumonisinás	<i>F. verticillioides</i> <i>F. proliferatum</i> <i>A. niger</i>	Carcinogénico Hepatotóxico Nefrotóxico	Leucoencefalomalasia equina Edema pulmonar porcino Defectos del tubo neural Cáncer esofágico
Zearalenona	<i>F. graminearum</i>	Estrogénicos	Hiperestrogenismo en animales

Los tricotecenos de tipo A y B son los más importantes como contaminantes de alimentos. Dentro del grupo A se encuentran las toxinas T-2, HT-2, diacetoxiscirpenol (DAS) y neosolaniol (NEO) mientras que en el grupo B se encuentran el deoxinivalenol (DON), 3-acetil-DON y 15-acetil-DON, nivalenol (NIV) y fusarenona X (FX) (Figura 1.7). Las especies dentro del complejo *F. graminearum* normalmente expresan uno de tres fenotipos principales de producción de tricotecenos (quimiotipos): DON y 3-acetildeoxinivalenol (3-ADON), DON y 15-acetildeoxinivalenol (15-ADON) o NIV y sus derivados acetilados. Sin embargo, en los granos se encuentra generalmente la toxina no acetilada (DON) probablemente debido a que las esterasas de los granos o del hongo remueven la unidad acetilada del 3-ADON o del 15-ADON (Burlakoti y col., 2008).

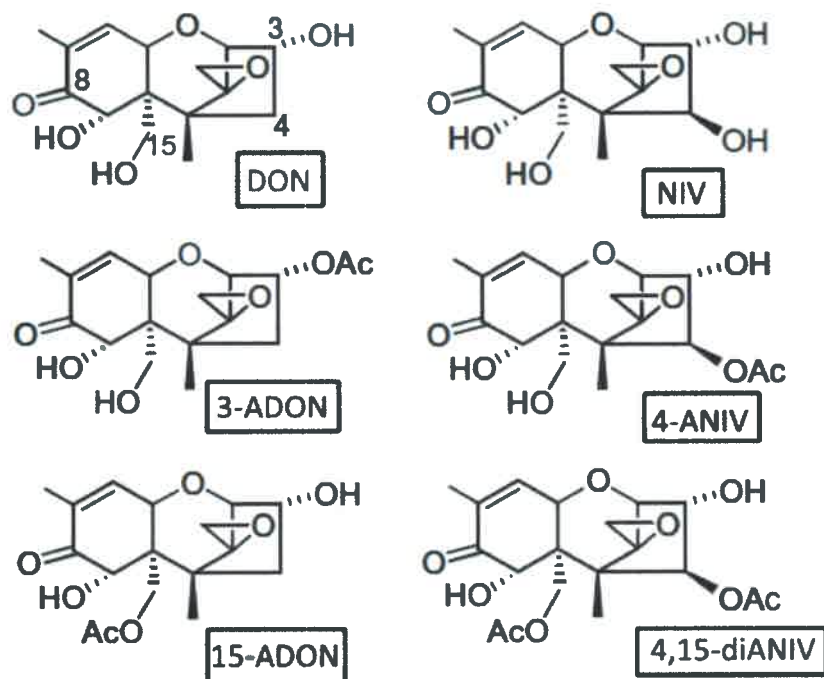


Figura 1.7: Estructura química de los tricotecenos tipo B

I.5.1.a. Quimiotipo y genotipo de *Fusarium graminearum*

En *F. graminearum*, las enzimas que catalizan las reacciones que resultan en la producción de tricotecenos están codificadas por genes (genes Tri) que se distribuyen en tres loci: un cluster de 12 genes (Brown y col., 2004), el locus de los genes TRI11 y TRI16 (Brown y col., 2003; Meek y col., 2003; Peplow y col., 2003) y el locus del gen TRI101 (Kimura y col., 1998). Mientras que la producción diferenciada de DON o NIV está regulada por el cluster de genes TRI13 y TRI7 (Lee y col., 2001; 2002). En las cepas productoras de NIV, el gen TRI13 codifica para una citocromo P450 monooxigenasa y el TRI7 para una acetiltransferasa. Ambas son funcionales y catalizan la hidroxilación en el C₄ y la acetilación de los tricotecenos (Lee y col., 2002). En cambio, en la cepas productoras de DON/ADON, los genes TRI13 y TRI7 tienen múltiples deleciones e inserciones que impiden la formación de enzimas funcionales (Figura I.8) (Brown y col., 2002; Lee y col., 2002). Como resultado, el DON y sus derivados carecen del grupo hidroxilo en el C₄. Polimorfismos en las secuencias de DNA de las regiones de los genes TRI3 y TRI12 se correlacionan con los quimiotipos 3-ADON y 15-ADON y se han utilizado como marcadores genéticos para detectar los quimiotipos en cepas de *F. graminearum* (Starkey y col., 2007).

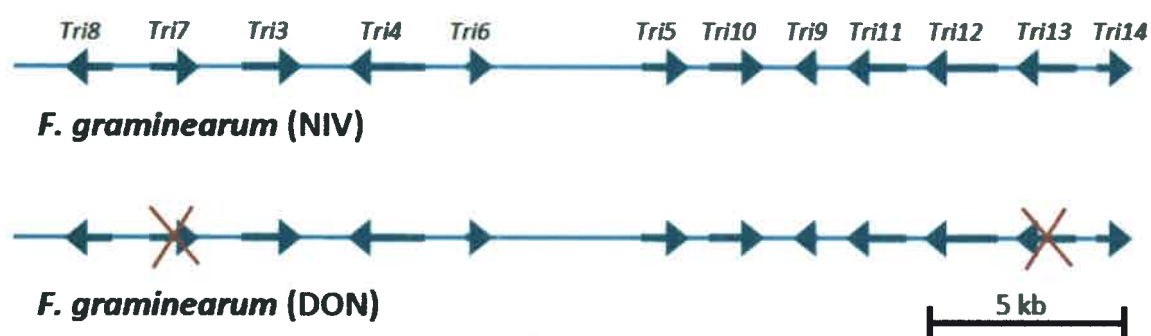


Figura I.8: Genes asociados a la biosíntesis de tricotecenos en cepas de *F. graminearum* productoras de nivalenol (NIV) y de deoxinivalenol (DON). Las flechas indican el tamaño y la dirección de la transcripción y las cruces, pseudogenes no funcionales.

A partir de la identificación de los genes responsables de la biosíntesis de tricotecenos, se han desarrollado métodos basados en PCR para lograr distinguir los genotipos asociados a la producción de toxinas (Lee y col., 2001; Chandler y col., 2003; Waalwijk y col., 2003; Jennings y col., 2004). Se han diseñado cebadores basados en las secuencias de los alelos de los genes Tri3, Tri5 y Tri7 para lograr diferenciar tres genotipos (3-ADON, 15-ADON y NIV; Quarta y col., 2006) y otros basados en los genes Tri7 y Tri13 para distinguir productores de DON o NIV (Lee y col., 2001; 2002).

Eriksen y col. (2004) determinaron que tanto DON como NIV poseen una citotoxicidad similar. Sin embargo, otros autores han observado que NIV posee mayor toxicidad, incluso hasta 10 veces mayor (Ueno, 1983; Ryu y col., 1987; Minervini y col., 2004). En el caso de los derivados acetilados, la información disponible es limitada y contradictoria, ya que se observó que 3-ADON duplicó en toxicidad al 15-ADON en ratones inyectados vía intraperitoneal, mientras que los valores relativos de toxicidad por administración oral para ambas toxinas fueron iguales (Yoshizawa y Morooka, 1973, 1974; Forsell y col., 1987). También se observó que 3-ADON fue resistente a la detoxificación por microorganismos del rumen (King y col., 1984). Sin embargo, la toxicidad relativa de los derivados acetilados no es de mayor importancia, ya que en los granos la toxina que se encuentra en mayor cantidad presentando un riesgo para la salud humana y animal es el DON. De todas maneras, lo que sí es importante determinar es el quimiotipo de las cepas que se encuentran contaminando los granos ya que se ha observado que aquellas que expresan el quimiotipo 3-ADON producen mayores cantidades de DON *in situ* y tienen mayores tasas de fecundidad y de crecimiento que las que poseen el quimiotipo 15-ADON (Ward y col., 2008).

Se cree que existe una distribución geográfica de los diferentes quimiotipos y ésta puede variar dentro del mismo espacio geográfico ya que la preferencia por el huésped, las diferentes áreas geográficas (llanura, montañas, valles, etc.) y la distancia al mar pueden afectar la composición de los quimiotipos de la población fúngica, incluso dentro de un mismo país (Prodi y col., 2009; 2011). En Norteamérica, el quimiotipo 15-ADON es el predominante al igual que en Europa Central y sur de Rusia (Abramson y col., 2001; Quarta y col., 2006; Yli-Mattila y Gagkaeva, 2010), en el Norte de Europa, China, Japón, Nueva Zelanda y Australia el quimiotipo predominante es el 3-ADON (Langseth y col., 1999; Guo y col., 2008; Yli-Mattila y col., 2009; Yli-Mattila 2010; Yli-Mattila y Gagkaeva, 2010). En Brasil, Uruguay y Argentina, el quimiotipo predominante en trigo es el 15-ADON (Reynoso y col., 2011; Astolfi y col., 2012; Pan y col., 2013).

1.5.2. Fumonisin

Estas toxinas son, químicamente, una serie de amino-poliol de cadena larga (20 carbonos) esterificados en los carbonos 14 y 15 con dos grupos de ácidos tricarbóxicos (Figura I.9). Estas micotoxinas son de estructura relativamente simple comparadas con otras micotoxinas como los tricotecenos y las aflatoxinas. Las fumonisin se pueden dividir en grupos distintos estructuralmente, que difieren en la longitud de la cadena carbonada y en la función de los grupos nitrógenos, cuatro grupos de ellos han sido nombrados A, B, C y P (Musser y Plattner, 1996). Las fumonisin del grupo B son las que mayormente se encuentran en granos naturalmente contaminados por *F. proliferatum* y *F. verticillioides*, siendo FB₁, FB₂ y FB₃ las más importantes. La estructura química de estas toxinas es similar a la esfingosina y pueden afectar el metabolismo de los esfingolipidos por inhibición de la enzima ceramida sintetasa. Esta inhibición puede tener diversos efectos como la acumulación de esfinganina, que es altamente tóxica y se cree, juega un rol importante en las toxicosis inducidas en los animales. Por otro lado, la inhibición de la síntesis de *novo* de esfingolipidos puede alterar las membranas y la función de receptores (Merril y col., 2001; Merrill, 2002).

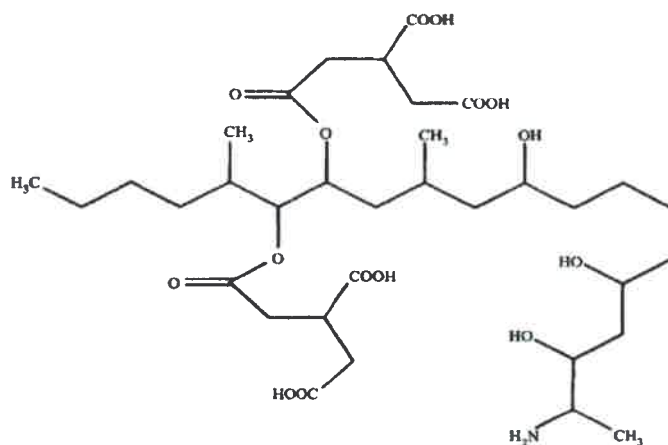


Figura I.9: Estructura química de la fumonisin B₁

Estas toxinas concentran la mayor atención ya que son contaminantes frecuentes de granos de maíz y su ingesta puede causar diversas patologías tanto en animales como en humanos, en caballos produce leucoencefalomalasia, edema pulmonar en cerdos, y hepatotoxicidad y hepatocarcinogenicidad en ratas. Con respecto a su toxicidad en humanos, estudios llevados a cabo en Sudáfrica, Irán, Italia y China han asociado el cáncer de esófago con el consumo de maíz contaminado con especies de *Fusarium* (Marasas, 1996; Desjardins, 2006). También puede causar defectos en el tubo neural en animales de experimentación y por lo tanto podría tener algún efecto en los casos humanos. Se cree que diversos casos de anencefalia y espina bífida ocurridos al sur de Texas pueden haber sido causados por el consumo de maíz contaminado con estas toxinas (Marasas y col., 2004; Missmer y col., 2006). Recientemente, la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer ha evaluado a la FB₁ como posible carcinógeno para humanos (clase 2B) (IARC, 2002).

El cluster de genes de la biosíntesis de las fumonisinas consiste en 17 genes regulados coordinadamente designados FUM1 – FUM3 y FUM6 – FUM8, FUM10, FUM11, y FUM13 – FUM21 (Proctor y col., 2003). Recientemente Proctor y col. (2008), determinaron la función del gen FUM8 utilizando mutantes de *F. verticillioides*. Este gen codifica para una α -oxoamino sintasa. Ellos observaron que aquellas cepas mutadas en este gen no producían la toxina, sin embargo mediante complementación con el gen proveniente de la misma especie, la producción se restablecía pero si incorporaban el mismo gen proveniente de la especie *F. oxysporum*, la producción de fumonisinas cambiaba a aquellas del grupo C.

Diversos trabajos indican que el maíz es el principal alimento contaminado con estas micotoxinas. En Argentina, se han encontrado diferentes niveles de contaminación en los granos de maíz y productos derivados de éste, dependiendo de la región (Chulze y col., 1996; Ramírez y col., 1996; Torres y col., 2010). Sin embargo, se ha reportado la presencia de estas toxinas en otros alimentos y cereales como arroz (Abbas y col., 1998), sorgo (Da Silva y col., 2000), espárragos (Liu y col., 2005), porotos (Tseng y Tu, 1997), alimento para animales (Castellá y col., 1999), té y plantas medicinales (Martins y col., 2001). También se han detectado fumonisinas en trigo pan (Stankovic y col., 2012; Cendoya y col., 2013) y trigo candeal (Palacios y col., 2011) así como también en sub-productos (Cirillo y col., 2003a; Cirillo y col., 2003b).

Aunque las fumonisinas pueden encontrarse en diversos alimentos y cultivos, solamente se encuentran reguladas para maíz y productos derivados. La Unión Europea

establece un límite de contaminación para fumonisinas totales ($FB_1 + FB_2$) en granos de maíz sin procesar de 4000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ mientras que para maíz destinado a consumo humano directo el máximo permitido es de 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Comisión Reguladora de la Unión Europea, 2007). En 2003, el comité a cargo de Alimentos de la Comisión Europea estableció un máximo tolerable de ingesta diaria para fumonisinas B_1 , B_2 y B_3 , en combinación o individualmente, de 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ (Comité Científico de la Unión Europea, 2003). La Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos también establece un máximo permitido de fumonisinas totales ($FB_1 + FB_2 + FB_3$) en granos de maíz destinados al consumo humano de 4000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ mientras que para maíz destinado a animales, este valor cambia dependiendo de la especie animal a la que se destina el alimento, para caballos el máximo permitido es de 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, para cerdos 20000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y para rumiantes es de 60000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (FDA, 2000).

1.6. Fusariosis de la espiga del trigo

La fusariosis de la espiga, también conocida como “golpe blanco”, “espiga blanca” o “tizón de la espiga”, es una enfermedad fúngica de distribución mundial, principalmente en áreas de cultivo húmedas y semi-húmedas (McMullen y col., 1997; Champeil y col., 2004). Esta enfermedad afecta cereales de granos pequeños como el trigo y la cebada. Fue descrita por primera vez en 1884 por WG Smith en el Reino Unido. Los granos afectados se vuelven pequeños, livianos y arrugados, esto lleva a grandes pérdidas económicas debido a la disminución del rendimiento en la cosecha y a la disminución de la calidad del grano (Osborne y Stein, 2007). Los principales patógenos asociados a esta enfermedad son *Fusarium graminearum* Schwabe teleomorfo *Giberella zeae* Schwein (Petch) y *F. culmorum* (W.G. Smith) Sacc., sin embargo otras especies como *F. poae* (Peck) Wollenv., *F. avenaceum* (Fr.) Sacc., *F. sporotrichoides* Scherb., y *Microdochium nivale* (Fr.) Samuels & I.C. Hallet, pueden encontrarse como patógenos secundarios (Stack y McMullen, 1985; Brenan y col., 2003). La predominancia de uno de estos dos patógenos dependerá de las condiciones climáticas de la región. *Fusarium graminearum* es el patógeno predominante en la mayor parte del mundo, especialmente en regiones templadas y cálidas como Estados Unidos, China y el hemisferio sur. Por su parte, *F. culmorum* se encuentra frecuentemente en regiones más frías como el Reino Unido, Europa del Norte y Canadá (Bottalico y Perrone, 2002; Akinsanmi y col., 2004).

En nuestro país el principal patógeno asociado a la enfermedad es *F. graminearum* (Dalcero y col., 1997; González y col., 1999; Lori y col., 2003; Ramírez y col., 2006). A lo largo de los años han ocurridos diversas epidemias en distintas regiones del país. En el área centro-norte de la región pampeana se han registrado epidemias en los años 1945-46, 1967, 1978, 1985, 1993 y 2001 (Galich y Galich, 1996; Carranza y col., 2008). En 1978, las pérdidas fueron entre el 10 y 30% (epidemia moderada) mientras que en 1993 las pérdidas llegaron al 50% (epidemia severa). En el área sur de la región pampeana, la principal zona de producción de trigo candeal, las epidemias fueron importantes registrándose en 1963, 1976, 1978, 1985 y 2001. Las pérdidas llegaron al 70% (Moschini y col., 2004; Carranza y col., 2008). La ocurrencia de las epidemias está influenciada por condiciones ambientales (lluvias, temperatura y HR), rotación de cultivos (en particular maíz), factores del huésped como estado fisiológico y susceptibilidad y por factores del patógeno como adaptabilidad y virulencia (Pomeranz y col., 1990; Osborne y Stein, 2007).

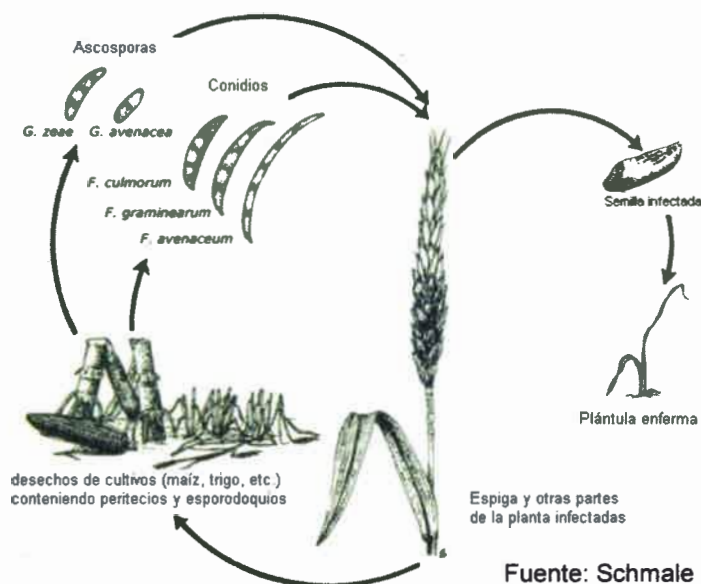
1.6.1. Infección y ciclo de la enfermedad

La principal fuente de inóculo de la enfermedad son las esporas fúngicas, tanto macroconidios como ascosporas son capaces de iniciar la infección. Las clamidosporas y los fragmentos de hifas también pueden ser una fuente de inóculo (Champeil y col., 2004). Las ascosporas son generadas en peritecios que se encuentran en restos de los cultivos previos que quedan en el suelo. Con el comienzo de la primavera, las condiciones de humedad y temperaturas cálidas favorecen el desarrollo y maduración de los peritecios. Las lluvias inducen la ruptura de la pared de los ascos y a medida que la HR aumenta también lo hace la presión dentro del peritecio, lo que lleva a que este descargue las ascosporas hacia el aire (Trail y col., 2002). Estas esporas pueden viajar largas distancias gracias a la acción del viento y también, junto con los macroconidios, son dispersadas por las lluvias y los insectos. Los macroconidios tienen paredes pegajosas que le permiten adherirse a la superficie de las plantas. Ambos tipos de esporas generan infecciones equivalentes (Scholz y Steffensen, 2001).

Una vez que la espora es depositada en la planta, comienza a germinar. Los macroconidios germinan aproximadamente en 3 h a 28 o 32°C, en condiciones de laboratorio. Las condiciones ambientales juegan un rol importante en la epidemiología de la enfermedad. El grado de desarrollo de la misma, luego de que se haya establecido la

infección, depende no solo del estado de desarrollo de la planta y la cantidad de inóculo, sino también de la duración de la exposición a humedad continua (superior a 80%) y a una determinada temperatura ($\geq 25^{\circ}\text{C}$). Las primeras etapas de desarrollo de la enfermedad parecen ser más dependientes de la humedad ya que ésta es necesaria para la germinación y la subsecuente infección (Andersen, 1948). El rango de temperatura óptima para que se produzca la infección es entre 20 y 30°C , ya que *F. graminearum* tiene un crecimiento óptimo a 28°C . Temperaturas por encima de los 25°C y humedad por periodos mayores a 24 h favorecen la infección (Sutton, 1982).

En trigo, la infección se produce durante la antesis o floración, cuando las espigas tienen sus partes florales expuestas al medio ambiente, esta es la etapa durante la cual el cultivo se encuentra más susceptible al ataque (Champeil y col., 2004). Las ascosporas o macroconidios transportados por el viento o dispersados por el agua de lluvia son depositados en las anteras, allí las esporas germinan y luego las hifas se propagan colonizando los tejidos (Figura I.10). Este último paso depende de distintos factores como la resistencia del cultivar, la temperatura y la humedad, en condiciones óptimas el período de incubación se reduce a sólo dos días. Los órganos afectados son la punta del ovario, las anteras y las espiguillas, la gluma y el raquis. Llega a invadir el grano a través del parénquima del pericarpio pudiendo producir aborto o un desarrollo anormal del mismo (Kang y Buchenauer, 2000).



Fuente: Schmale y Bergstrom, 2003

Figura I.10. Ciclo de la fusariosis de la espiga de trigo

Si las condiciones son las óptimas, los primeros síntomas se comienzan a observar entre los 2 y 4 días (Andersen, 1948). Las lesiones se observan en espigas y espiguillas con la presencia de zonas amarronadas, púrpuras o blanquecinas (Figura I.11). Según la resistencia de la variedad y las condiciones del ambiente, la infección puede limitarse a la espiguilla afectada, afectar a varias o tomar toda la espiga. El patógeno se dispersa de una espiguilla a la otra por el raquis. *Fusarium graminearum* es un patógeno hemibiótrofo, es decir, inicialmente forma una relación biotrófica con la planta, en la cual los tejidos invadidos permanecen vivos y completamente funcionales durante las primeras etapas de desarrollo de la enfermedad. Posteriormente, con el avance de la infección, cambia a un estado necrotrófico, en el cual crece abundantemente dentro de las células e induce clorosis, amarronamiento e incluso la muerte de las células. Se cree que el DON participa en el cambio de un estado al otro y que tiene un rol importante contribuyendo a la agresividad de *F. graminearum* (Bushnell y col., 2003). Durante una infección avanzada puede observarse, sobre las espigas, la formación de una masa rosada salmón, compuesta por los macroconidios.



Figura I.11: Espigas con síntomas de fusariosis

I.6.2. Resistencia genética a la fusariosis de la espiga del trigo

Para reducir el daño causado por la FET, el uso de cultivares resistentes es considerado una de las medidas más efectivas y ecocompatibles. Sin embargo, su disponibilidad es limitada y su efectividad no es completa (hasta el presente no se ha

observado resistencia de tipo completa o inmunidad). En el caso del trigo candeal, los cultivares existentes en nuestro país presentan en general niveles bajos de tolerancia a la FET. En un intento de disminuir la incidencia de *F. graminearum*, el cultivo ha sufrido un desplazamiento hacia zonas marginales, de condiciones ambientales menos predisponentes a la enfermedad pero de mayor rigor climático. Por esta razón, la incorporación de tolerancia a esta enfermedad podría incentivar nuevamente la siembra de trigo candeal en regiones con mayor estabilidad en los rendimientos como es el centro-sur de la provincia de Buenos Aires y al mismo tiempo reducir el control químico.

Para lograr el mejoramiento genético de los cultivos, se identifican las características deseadas en algunas plantas y se adaptan estas características al cultivo de interés mediante técnicas convencionales. Algunas de estas características, como la resistencia a enfermedades, pueden ser descritas como características cuantitativas ya que muestran variaciones continuas y tienen distribución normal en la población. El fenotipo de un rasgo cuantitativo es el resultado acumulado de la interacción de varios genes (poligenes). Para poder detectar el lugar o sitio más probable en el DNA de un individuo que contiene los genes que contribuyen a la variación observada de la característica deseada o fenotipo, se han desarrollado métodos estadísticos como el análisis de QTLs (Quantitative Trait Locus) o locus de un carácter cuantitativo que une dos tipos de información: información fenotípica (mediciones de rasgos o caracteres) e información genotípica (marcadores moleculares) con el objetivo de explicar las bases genéticas de la variación de rasgos complejos (Falconer y Mackay, 1996; Kearsey, 1998; Lynch y Walsh, 1998). Este tipo de análisis permite ligar ciertos fenotipos complejos a regiones específicas de los cromosomas.

Varios estudios (Ban, 2000; Kolb y col., 2001; Gervais y col., 2003) han demostrado la existencia de genes de resistencia en 18 cromosomas (1B, 2A, 3, 3B, 4B, 5A, 6B, 6D, 7A, 7B, etc). Las investigaciones sobre el tipo de reacción del trigo frente al patógeno han posibilitado identificar tres fuentes principales de resistencia a la enfermedad: (1) trigos invernales del este de Europa, (2) trigos primaverales de Brasil e Italia, (3) trigos primaverales de China y Japón (Ban, 2000). La fuente de resistencia más utilizada actualmente es Sumai3 (de China) que combina resistencia estable con características agronómicas deseables.

En trigo se han descrito cinco tipos de resistencia a la enfermedad que son utilizados en programas de mejoramiento genético. Schroeder y Christensen (1963) describieron dos tipos de resistencia: Tipo I: resistencia a la infección inicial y Tipo II:

resistencia a la colonización del hongo. Un tercer tipo de resistencia fue propuesto por Miller y col. (1985) basándose en la habilidad de ciertas plantas para prevenir la síntesis y/o estimular la degradación de DON. Por último, tipo IV: tolerancia a la FET, los cultivares de trigo mantienen el rendimiento a pesar de la presencia de la enfermedad y tipo V, resistencia a la toxina, puede ser por descomposición de la misma por la planta, tolerancia o insensibilidad a la toxina o limitación a la acumulación en los tejidos de la espiga (Mesterházy, 1995).

La resistencia a la infección inicial o resistencia tipo I se mide como incidencia de la enfermedad, es decir, el porcentaje de espigas con síntomas con respecto al total de espigas mientras que la resistencia tipo II se mide como severidad de la enfermedad, número de espiguillas con síntomas en el total de espiguillas. El patógeno se mueve de espiguilla a espiguilla por medio del raquis; en plantas con este tipo de resistencia esta movilidad está reducida.

La planta de trigo tiene ciertas características morfológicas y de desarrollo que la ayudan a protegerse de la infección. Aquellas variedades que tienen flores que se abren y cierran rápidamente a mitad del día, dan pocas oportunidades al patógeno de ingresar (Tu, 1950). También las variedades que no asoman sus anteras son menos susceptibles ya que las anteras no quedan expuestas a la colonización inicial del patógeno. Por otro lado, las plantas que son altas, las plantas sin aristas (barba) y las plantas con espigas flojas y alargadas tienden a tener menos probabilidades de infección natural que aquellas plantas que son bajas, con aristas y con espigas densas y comprimidas. Las plantas más bajas tienen mayores probabilidades de dispersar el inóculo hacia las espigas por salpicadura de agua, las aristas de las espigas aumentan las posibilidades de capturar esporas en suspensión o por salpicadura y por último, aquellas espigas más densas y compactas son capaces de mantener la humedad por más tiempo favoreciendo la infección (Mesterházy, 2003). Generalmente, los QTLs de resistencia coinciden con genes que controlan estas características morfológicas. Muchos de los rasgos asociados con la resistencia, limitan el número de esporas que pueden alcanzar los sitios de infección en las espigas o disminuyen las probabilidades de penetrar los tejidos (Bushnell y col., 2003).

La mayoría de los esfuerzos de mejoramiento han sido concentrados en la resistencia tipo II, la cual ha demostrado ser más estable y menos afectada por factores no genéticos. Se han identificado numerosos QTLs de resistencia a FET en *T. aestivum* (3BS, 5AS, 6BS, 4B y 2DL); sin embargo los que demostraron mayor repetitividad entre los distintos estudios fueron: 3BS (*Fhb1*), 5AS (Qfhs.ifa-5A) y 6BS (*Fhb2*) (Buerstmayr y col., 2009).

La fusariosis de la espiga es actualmente la enfermedad que mayores desafíos presenta para su control. Las estrategias de manejo basadas en el control cultural y la protección química que resultan exitosas para otras enfermedades, no han sido muy eficaces sobre la fusariosis. Dado que se han encontrado varias fuentes de resistencia en trigo pan como Sumai 3 (Anderson y col., 2001) y Frontana (Steiner y col., 2004) y en especies relacionadas (Rudd y col., 2001), lograr resistencia genética en candeal continúa siendo uno de las metas prioritarias. La Universidad Estatal de Dakota del Norte, a través de su programa de mejoramiento, ha lanzado una variedad moderadamente resistente de trigo candeal obtenida a partir germoplasmas utilizados en América del Norte (Elias y Manthey, 2007). Por otra parte, el germoplasma Langdon (Dic-3A) es una línea derivada de cruzamientos entre *T. turgidum* spp. durum var. Langdon y una especie de trigo salvaje conocida como farro, *T. turgidum* spp. dicoccoides ($2n = 4x = AABB$) (Otto y col., 2002) con conocida resistencia a la fusariosis (Stack y col., 2002). La variedad DGE-1 es una variedad derivada de Langdon con un par cromosómico extra proveniente de una gramínea salvaje emparentada al trigo, *Lophopyrum elongatum* ($2x = 69 EE$), que tiene mejor comportamiento que Langdon en cuanto a la incidencia y severidad de la infección (Jauhar y Peterson, 2008). Además, otras dos variedades que resultan prometedoras son DGE-2 y DGE-3, lanzadas recientemente, en las cuales el par de cromosomas 1E de *L. elongatum* reemplaza al par de cromosomas 1A en la variedad DGE-2 y al par 1B en la DGE-3 (Jauhar y Peterson, 2012; 2013). También se han encontrados otras fuentes de resistencia en líneas de trigo candeal de Túnez (Huhn y col., 2012) y del trigo farro *T. dicoccum* (Buerstmayer y col., 2012).

En nuestro país, en el INTA Castelar, se ha comenzado a realizar una serie de cruzamientos para transferir genes de resistencia a candeal desde *T. aestivum* y *T. dicoccoides*. Dichos genes no han sido aún incorporados a variedades de candeal de uso comercial. Por otra parte, en los últimos años, en la Universidad Nacional del Sur en conjunto con el Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS-CONICET), se han iniciado una serie de cruzamientos destinados a incorporar genes de resistencia a *Fusarium* en el germoplasma local. Con ese fin se han utilizado principalmente tres fuentes; la región *Qfhs.ndsu-3BS*, proveniente del cultivar *T. aestivum* cv Sumai (Bai y Shaner, 1994) que ya se encuentra transferida a variedades locales ACA 601 y ACA 303; la región *Qfhs.ndsu-3AS*, de *T. dicoccoides* (Otto y col., 2002), que ha sido introgresada en la variedad Langdon (LDN(Dic-3A)) de trigo candeal y la línea DGE-1, que deriva también de la variedad Langdon.

1.7. Estudio de la población de *Fusarium graminearum*

El éxito de las estrategias de mejoramiento genético depende principalmente de considerar en la evaluación la variabilidad genética de las poblaciones fúngicas. En los programas de mejoramiento genético de trigo es relevante conocer la estructura de la población de *G. zeae* a fin de poder responder aspectos fundamentales como la adaptabilidad del patógeno a nuevas prácticas agrícolas o cultivares, el flujo de genes entre las poblaciones y la dispersión del inóculo entre campos y regiones. Varios estudios de diversidad genética de *G. zeae* han sido realizados con cepas colectadas en diversas regiones que incluyen China (Gale y col., 2002; Gagkaeva & Yli-Mattila, 2004), Nepal (Carter y col., 2000), parte de Europa (Gagkaeva y Yli-Mattila; 2004, Tóth y col., 2005), Estados Unidos (Walker y col., 2001; Zeller y col., 2003a, 2004; Schmale y col., 2006), Canadá (Mishra y col., 2004; Fernando y col., 2006), Australia (Akinsanmi y col., 2006), y parte de Sudamérica (Brasil y Uruguay) (Zeller y col., 2003b; Astolfi y col., 2012). En nuestro país, Ramírez y col. (2007), caracterizaron genéticamente dos poblaciones de *G. zeae* obtenidas de campos comerciales de trigo en la provincia de Buenos Aires, mediante AFLP. Ellos observaron que ambas poblaciones fueron genéticamente similares y posiblemente formarían parte de una población mayor que se aparee al azar. Sin embargo, concluyeron que es necesario continuar el estudio de las poblaciones teniendo en cuenta la evolución temporal y espacial de las mismas.

Diversos marcadores moleculares se han utilizado para lograr este objetivo, desde el uso de polimorfismo de los fragmentos de restricción, (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Gale y col., 2002; Tóth y col., 2005), DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD, *Random Amplified Polymorphic DNA*) (Dusabenyagasani y col., 1999; Walker y col., 2001), polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP, *Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Zeller y col., 2003; Álvarez y col., 2011) y número variable de repetidos en tándem (VNTR, *Variable Number Tandem Repeats*) (Ward y col., 2008; Zhang y col., 2012). Sin embargo, en los últimos años se han comenzado a utilizar las Secuencias Intergénicas Simples Repetidas (ISSRs, *Inter Simple Sequence Repeats*) como una herramienta molecular potente que permite el estudio de poblaciones de diversos patógenos (Mishra y col., 2003; Martínez-Culebras y col., 2009; Dinolfo y col., 2010; Neal y col., 2011), entre ellos *F. graminearum* (Mishra y col., 2004). Este método combina muchas de las ventajas de los microsatélites y AFLP con la universalidad de RAPD. Sus principales ventajas son la rapidez, simpleza y robustez. Son altamente

polimórficos y reproducibles, gracias a que utilizan mayores temperaturas de *annealing*, y para diseñar los cebadores ISSR no es necesario conocer la secuencia del genoma del organismo en estudio. Pueden visualizarse tanto en geles de agarosa como de acrilamida, además no son costosos y no requieren altas concentraciones de ADN molde (Pradeep y col., 2002; González y Aguirre, 2007). Esta técnica permite obtener los niveles de variación en las regiones microsatélite que se encuentran dispersas en el genoma. Dichas regiones consisten en repeticiones en tándem de motivos simples como (CT) n o (CA) n , ubicadas entre secuencias no repetitivas del genoma nuclear eucarionte. En ocasiones, es posible agregar a esta secuencia un par de nucleótidos extras arbitrarios en el extremo 3' o en el 5', que jugarán el papel de "anclas" asegurando así que la amplificación inicie siempre en el extremo 5' o en el 3' del microsatélite, respectivamente (Zietkiewicz y col., 1994; Bornet y Branchard, 2001; Pradeep y col., 2002). Cuando dos secuencias repetidas se presentan dentro de una distancia amplificable y con una orientación invertida, el cebador complementario a ellas puede inducir la amplificación del segmento de ADN intermedio. La molécula generada, con un tamaño particular (peso molecular), se considera un "locus", que representa el segmento de ADN entre los microsatélites (González y Aguirre, 2007).

Hipotesis y Objetivos



II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

I.1. Hipótesis:

✓ 1) Materiales de trigo candeal existentes y de reciente obtención, por la incorporación de genes de resistencia, tienen buen comportamiento frente a la infección con especies de *Fusarium*, con la consecuente disminución de los niveles de contaminación con micotoxinas. 2) Existe una alta variabilidad genética en las poblaciones locales de *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) y *Fusarium proliferatum* (*Gibberella intermedia*) aisladas de trigo candeal dada por un elevado "outcrossing" del patógeno en condiciones de campo.

I.2. Objetivo general

✓ Evaluar la contaminación con *Fusarium graminearum* y *F. proliferatum*, la diversidad genética de las poblaciones aisladas y la resistencia a la contaminación con tricotecenos y fumonisinas, en germoplasmas (existentes y nuevos) de trigo candeal con el fin de contribuir a la selección de cultivares con características mejoradas de calidad e inocuidad.

II.2.1. Objetivos específicos

1. Evaluar el comportamiento de materiales existentes (comerciales) y nuevos (experimentales) de trigo candeal, en relación a la infección por *Fusarium* y a la contaminación con tricotecenos y fumonisinas, en condiciones de campo.
2. Evaluar la variabilidad genética de las poblaciones de *Fusarium* aisladas a partir de los diferentes cultivares de trigo candeal.
3. Determinar los genotipos y quimiotipos de las cepas de *Fusarium* aisladas de los diferentes germoplasmas.
4. Evaluar el comportamiento de diferentes germoplasmas de trigo candeal frente a la infección con *Fusarium* y a la acumulación de micotoxinas, en condiciones de invernáculo.

Materiales y Métodos



III. MATERIALES Y METODOS

III.1. Muestras

En el presente estudio se utilizaron muestras de cultivares comerciales y experimentales, bajo condiciones de infección natural a campo, provenientes del sur de la Provincia de Buenos Aires. Las muestras de la campaña 2008/09 (n=26) fueron obtenidas de la localidad de La Dulce, las muestras de la campaña 2009/10 (n=39) provenían de las localidades de Barrow, La Dulce, Miramar y Pieres mientras que las muestras de la cosecha 2010/11 (n=51) fueron obtenidas de las localidades de Barrow, La Dulce, Miramar, Pieres, Cabildo, Bordenave y Balcarce (Figura III.1). Los distintos materiales se sembraron en bloques completos aleatorizados con 3 ó 4 repeticiones (Tabla III.1).

Las variedades experimentales fueron denominadas con el prefijo TC para su designación en el laboratorio, los cruces que representan son confidenciales. Las muestras TC-6 y TC-28, corresponden a muestras experimentales de trigo pan que se utilizaron como control de la resistencia.

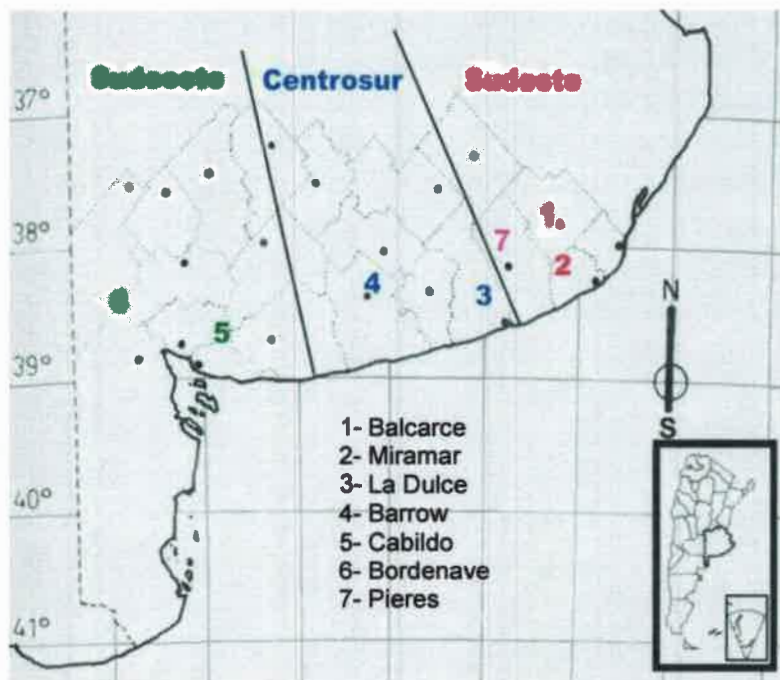


Figura III.1: Localidades de la zona triguera de candeal

Tabla III.1. Muestras de trigo candeal

Variedades Comerciales 2009	Variedades comerciales 2010 y 2011	Variedades experimentales 2009	Variedades experimentales 2010 y 2011
Bonaerense INTA Carilo (BICRL)	Bonaerense INTA Carilo (BICRL),	TC-6, TC-7, TC-8, TC-10,	TC-6
Bonaerense INTA Facon (BIFAC)	Bonaerense INTA Facon (BIFAC),	TC-11, TC-12, TC-13, TC-14, TC-15	-
Buck Platino (BPLT),	Buck Platino (BPLT),	TC-16, TC-17, TC-18	TC-16, TC-17, TC-18
Buck Topacio (BTOP),	Buck Topacio (BTOP),	TC-19, TC-20, TC-22, TC-23,	TC-19, TC-20, TC-22, TC-23
Kofa	Kofa	TC-24, TC-25, TC-26.	TC-24, TC-25, TC-26,
Ciccio	-	-	TC-28, TC-29
-	Buck Esmeralda (BESM)		
-	Amarillo		
	Buck Granate (BGNT)		
	ACA1801F		
	ACA1901F		

III.2. Evaluación de la microbiota aislada de cultivares comerciales y experimentales

III.2.1. Medios de cultivo y soluciones

Nash-Snyder: peptona 15 g; KH_2PO_4 1 g; MgSO_4 (7 H_2O) 0,5 g; pentacloronitrobenzeno 1 g; agar 20 g; agua destilada 1000 ml. Se ajusto el pH a un valor entre 5,5-6,5 y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121 °C, se dejó enfriar el medio a 45 °C y se agregaron 20 ml de sulfato de estreptomicina (solución stock) y 12 ml de sulfato de neomicina (solución stock) por litro.

Solución stock de sulfato de estreptomicina: 5 g de sulfato de estreptomicina en 1000 ml de agua destilada.

Solución stock de sulfato de neomicina: 1 g de sulfato de neomicina en 1000 ml de agua destilada.

Agar Nutritivo Sintético (SNA): sacarosa 0,2 g; KH_2PO_4 1 g; MgSO_4 (7 H_2O) 0,5 g; KNO_3 1 g; KCl 0,5 g; agar 20 g y agua destilada 1000 ml. Se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

Agar Agua (AA): agar 15 g y agua destilada 1000 ml. Se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

Agar Hojas de Clavel (AHC): hojas de clavel (1-5 hojas); agar 15 g y agua destilada 1000 ml. Se pesó el agar, se le agregó agua destilada y luego se procedió a esterilizar el medio en autoclave durante 15 minutos a 121 °C. Se fraccionó en placas de Petri de 6 cm por 15 mm y se colocaron las hojas de clavel estériles.

Agar Papa Glucosado (APG): papa 250 g; glucosa 20 g; agar 20 g y agua destilada 1000 ml. Las papas con cáscaras se lavaron, se cortaron en trozos y se hidrataron con 500 ml de agua, se hirvieron en autoclave a vapor fluente durante 45 minutos. Por otro lado se esterilizó el agar en 500 ml de agua destilada. Se filtró el caldo con papas a través de gasa y se adicionó al agar disuelto. La pulpa de la papa restante se homogeneizó para obtener un puré y la mitad de éste se adicionó al agar junto a la glucosa, luego se llevó a volumen con agua destilada (1000 ml). Se distribuyó el medio en tubos de ensayos y se esterilizó por autoclave a 115 °C durante 20 minutos.

III.2.2. Aislamiento de las especies de *Fusarium*

De cada muestra obtenida en las distintas cosechas se tomaron 100 granos que fueron desinfectados superficialmente con hipoclorito de sodio al 1% durante 1 minuto y luego lavados 3 veces con agua destilada estéril. Se colocaron 10 granos en placas de Petri, conteniendo medio de Nash-Snyder (Nash y Snyder, 1962), selectivo para el aislamiento de especies de *Fusarium* (Figura III.2). Las placas se incubaron a 24° C durante 7-10 días bajo ciclos de 12h/12h de luz blanca y luz negra respectivamente. Luego de la observación macroscópica de las colonias desarrolladas, se determinó el porcentaje de infección por el género *Fusarium* y se transfirieron las colonias con características de este género, al medio agar nutritivo sintético (SNA). Las mismas se incubaron durante 7 días a 24°C bajo ciclos de 12h\12h de luz blanca y luz negra, respectivamente, para su posterior identificación.



Figura III.2: Contaminación de granos de trigo con especies de *Fusarium* en el medio Nash – Snyder.

III.2.3. Identificación de las especies de *Fusarium*

A partir del medio SNA se realizaron aislamientos monospóricos, para lo cual se tomó una pequeña cantidad de propágulos fúngicos y se realizó una suspensión en 10 ml de agua destilada estéril. Luego de homogeneizar dicha suspensión se la transfirió a una placa de Petri con agar agua, se diseminó por rotación y se descartó. Las placas se incubaron inclinadas durante 16 a 18 h a 24°C para permitir la germinación de las esporas. Posteriormente, se procedió a la obtención de conidios germinados bajo lupa (40 X) mediante aguja histológica. Un conidio se transfirió a AHC en placas de Petri de 6 cm y, otro a tubos de ensayos con APG. Los cultivos se incubaron durante dos semanas con ciclos alternativos de luz blanca /luz negra de 12 h a 24°C. La identificación de las cepas se realizó siguiendo la metodología propuesta por Leslie y Summerell (2006).

Para la identificación de las especies de *Fusarium* se observaron las características microscópicas luego del desarrollo de las cepas en AHC y las características culturales en APG. El medio AHC favorece la esporulación sobre el desarrollo micelial, produciéndose

conidios y conidióforos en abundancia, uniformes en tamaño y forma, reduciendo así la variación fenotípica.

III.3. Determinación de la incidencia natural de deoxinivalenol y nivalenol en granos de trigo candeal

Para la extracción y detección de nivalenol y deoxinivalenol se utilizó la metodología propuesta por AOAC (1995). Cada muestra fue finamente molida y homogeneizada. Una submuestra (25 g) fue extraída con 100 ml de una mezcla de acetonitrilo:agua (84:16) y colocada en agitador de vaivén por 30 minutos. Posteriormente el extracto se filtró a través de papel de filtro (Whatman N° 2) y 8 ml del filtrado se pasaron por una columna de limpieza Mycosep 227 (Laboratorios Romer, USA). Se obtuvieron 4 ml del extracto a partir de la columna y se evaporaron a sequedad bajo un flujo de nitrógeno. Dichos extractos se conservaron a 4 °C hasta el análisis.

Para el análisis de los extractos por HPLC-UV los mismos se resuspendieron en 400 µl de metanol:agua (12:88). El sistema HPLC consistió en una bomba Hewlett Packard 1100 (Palo Alto, CA), conectada a un detector UV Hewlett Packard serie 1100. La cuantificación se realizó por medio de una estación de trabajo Hewlett Packard. La separación se realizó en columna de fase reversa C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm de tamaño de partícula, Luna-Phenomenex), conectada a una precolumna Supelguard LC-ABZ (20 x 4,6 mm, 5 µm de tamaño de partícula, Supelco). Para realizar la curva de calibración se utilizaron soluciones estándar de 0,5-0,25; 1,0-0,5; 2,0-1,0 y 4,0-2,0 µg/ml DON-NIV. La fase móvil consistió en una mezcla de metanol:agua 12:88 v/v a un flujo de 1,5 ml/min. La detección se realizó a 220 nm con una atenuación de 0,01 AUFS. El volumen inyectado fue de 50 µl, y el tiempo de retención promedio de nivalenol fue de 4 min y el de deoxinivalenol fue de 10 min. El límite de detección de la técnica fue de 50 ppb (µg/kg).

III.4. Determinación de la incidencia natural de fumonisinas en granos de trigo candeal

III.4.1. Detección y cuantificación de fumonisinas

Para el análisis de las fumonisinas se siguió la metodología propuesta por Shephard y col. (1990) modificada por Doko y col. (1995). A partir de 25 g de cada muestra previamente molida, se extrajeron las toxinas con 50 ml de metanol:agua (3:1). Se agitó el extracto 30 minutos en agitador rotatorio, luego se filtró a través de papel de filtro Whatman N°4. El filtrado (10 ml) se pasó a través de un cartucho SAX (*Bond Elut Strong Anion-Exchange*) previamente acondicionado por el pasaje sucesivo de metanol (5 ml) y metanol:agua (3:1, 5 ml). El cartucho se lavó con metanol:agua (3:1, 8 ml) seguido de metanol (3 ml). Las fumonisinas fueron eluidas con ácido acético al 0,5% en metanol (14 ml). El eluido se evaporó a sequedad a 40°C bajo un flujo de nitrógeno y se guardó a 4°C hasta el momento del análisis por HPLC.

Para la detección y cuantificación de las toxinas los residuos se redisolieron en 200 µl de acetonitrilo:agua (3:1), una alícuota de 50 µl del extracto fue derivatizado adicionándole 200 µl de una solución de O-ptaldialdehído (OPA). La solución derivatizante se preparó disolviendo 40 mg de OPA en 1 ml de metanol, 5 ml de tetraborato de Na 0,1M y 50 µl de 2-mercaptoetanol. Las fumonisinas derivatizadas fueron analizadas usando un sistema de detección de fluorescencia/HPLC fase reversa. El sistema HPLC consistió en una bomba Hewlett Packard 1100 (Palo Alto, CA), conectada a un detector UV Hewlett Packard serie 1100. La cuantificación se realizó por medio de una estación de trabajo Hewlett Packard. La separación se realizó en columna de fase reversa C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm de tamaño de partícula, Luna-Phenomenex), conectada a una precolumna Supelguard LC-ABZ (20 x 4,6 mm, 5 µm de tamaño de partícula, Supelco). Como fase móvil se usó metanol:fosfato de sodio dihidrogenado 0,1M (75:25), el pH de la solución se ajustó a 3,35 con ácido ortofosfórico. El flujo de la fase móvil fue de 1,5 ml/min. El rango de excitación y emisión usados fueron 335 y 440 nm, respectivamente. La cuantificación de las fumonisinas se basó en las medidas de los picos comparados con la medida de los picos de soluciones testigos de referencia de FB₁ y FB₂ (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA). Los tiempos de retención estimados fueron: 4,5 – 5 min para FB₁ y 10 min aproximadamente para FB₂.

III.4.2. Experimento de recuperación

El experimento de recuperación se llevó a cabo por triplicado enriqueciendo muestras de grano de trigo candeal molidos (25 g), libres de contaminación con fumonisinas (B₁ y B₂), en los siguientes niveles de concentración: 10, 100 y 500 ng/g. Las muestras enriquecidas se dejaron reposar bajo campana extractora toda la noche con el objeto de permitir la evaporación del solvente previo a su extracción. El recuperado medio para FB₁ y FB₂ fue de 98.98% y 94.9%, respectivamente. El límite de detección del método analítico fue de 10 ng/g para FB₁ y 15 ng/g para FB₂.

III.4.3. Confirmación de la presencia de fumonisina B₁ por HPLC-MS/MS

Todos los análisis fueron realizados en HPLC Waters Alliance 2695 (Waters Corporation, Milford, MA, USA) equipado con una bomba Waters Alliance 2685, un autoinyector Waters Alliance 2695, un detector de arreglo de diodos Waters 2996 PDA acoplado a un espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolos en tándem (Quattro Ultima Platinum) con fuente de electro spray ionización (ESI). La columna utilizada fue una A XBridge™ C18 3,5µm (2,1x150 mm) con precolumna.

La interface se trabajó en modo de ionización electrospray positiva. Como gas de nebulización y de desolvatación se utilizó nitrógeno calentado a temperaturas de 150°C y 200°C, respectivamente. El voltaje del capilar fue de 3,00 kV. El flujo de nitrógeno se ajustó a 104 L/h y 678 L/h para los gases de cono y desolvatación, respectivamente. Para la determinación de FB₁ se utilizó el método de monitoreo de reacciones múltiples (MRM). Se obtuvieron los cromatogramas correspondientes a las trazas de las transiciones del ión precursor de FB [M+H]⁺ a dos iones productos o hijas para dar cumplimiento a criterios cualitativos y cuantitativos. Las transiciones y condiciones de MRM se detallan en la Tabla III.2. La adquisición de los datos y el procesamiento de los mismos se realizaron mediante un software Mass Lynx V.4.1 – Copyright 2005, Waters INC.

La fase móvil utilizada consistió en un gradiente de ácido acético al 1% en agua y acetato de amonio 5mM (solvente A) y metanol al 0.1%-ácido acético al 1%- acetato de amonio 5mM (solvente B). La temperatura de la columna fue mantenida a 22°C. Alícuotas de 30µl de extractos fueron inyectados en la unidad HPLC. Cuatro puntos de identificación fueron usados para identificar FB₁, tiempo de retención 16,62 min, el precursor [M + H]⁺ de 722 amu y ambos productos iónicos (334 y 352 amu). Se realizó una curva de

calibración inyectando 10 μl de diferentes soluciones de FB_1 (0,25; 0,5; 1,0 y 2,0 $\mu\text{g/ml}$) en acetonitrilo:agua (1:1).

Tabla III.2. Parámetros utilizados para la detección de FB_1 por HPLC-MS/MS

Compuesto	$[\text{M}+\text{H}]^+$	t_R / min	Producciones (m/z)	CV (V)	CE (V)
FB_1	722	16,62	334	91	57
			352		55

$[\text{M} + \text{H}]^+$, Ion precursor; t_R , tiempo de retención; Producciones (m/z), iones productos o hijas; CV (V), cono de voltaje; CE (V), energía de colisión.

III.4.4. Análisis estadístico

Para determinar diferencias entre contenido de fumonisinas en relación al año de cosecha, se utilizó el test no paramétrico de una vía de Kruskal-Wallis. Para estimar la relación entre el contenido de fumonisinas y el promedio de lluvias, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson. El análisis de datos fue realizado usando el programa estadístico SigmaStat para Windows versión 2.03 (SPSS Inc.). El nivel de significancia usado fue de $P < 0,005$.

III.5. Caracterización de la población de *Fusarium proliferatum* aislada de trigo candeal

III.5.1. Estudio de la variabilidad genética de la población de *Fusarium proliferatum*

III.5.1.1. Cepas

Se seleccionaron al azar 62 cepas de *Fusarium proliferatum* previamente identificadas morfológicamente, aisladas de trigo candeal y correspondientes a distintas cosechas y localidades y se incluyeron además 9 cepas de *F. proliferatum* aisladas de maíz correspondientes a la cosecha 1996/97 de la provincia de Buenos Aires (Anexo Tabla III.1.). Las cepas fueron depositadas en el Istituto Tossine e Micotossine de Parasiti Vegetali (Italia) y fueron denominadas con código ITEM.

III.5.1.2. Producción de biomasa fúngica de las cepas de *Fusarium proliferatum*

III.5.1.2.a. Medios de cultivos

- ✓ Medio SNA: Descrito en el punto III.2.1
- ✓ Medio Wickerham: glucosa 40 g, peptona 5 g, extracto de levadura 3 g, extracto de malta 3 g y agua destilada 1000 ml. Se esterilizó durante 15-20 minutos a 121° C en autoclave.

III.5.1.1.b. Condiciones de crecimiento

A partir de cada una de las cepas desarrolladas en el medio SNA, se tomaron con sacabocado 3 tacos de la colonia en activo crecimiento y se transfirieron a frascos Erlenmeyer de 250 ml, que contenían 50 ml de medio Wickerham. Los cultivos se incubaron a 28° C durante 2 a 3 días en un agitador rotatorio (150 rpm) y se cosechó el micelio por filtración, lavándolo con agua destilada estéril y secándolo entre papel absorbente. Los micelios fueron liofilizados y almacenados a -20° C hasta el momento de realizar la extracción del ADN.

III.5.1.3. Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico total a partir de los micelios liofilizados se realizó moliendo los micelios mecánicamente con bolas metálicas de 5 mm en un agitador Mixer Mill MM 400 (Retsch) y luego se utilizó el kit comercial Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food (Promega) con algunas modificaciones, partiendo de 10 mg de micelio liofilizado. La calidad del ADN genómico se determinó por electroforesis y la cuantificación se realizó con un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop). Las muestras de ADN se conservaron a -20°C.

III.5.1.4. Amplificación de genes Calmodulina (caM), Factor de Elongación 1- alfa (EF-1 α) y FUM8 de cepas de *Fusarium proliferatum*

III.5.1.4.a. Materiales y condiciones de reacción

Mezcla de reacción de PCR para cada conjunto de cebadores: 0,2 mM dNTPs, Buffer PCR 1X (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl a pH 8,3; 1,5 mM MgCl₂), 1,5 U Taq DNA polimerasa (5PRIME), 0,3 μ M de cada cebador y 1 μ l de ADN templado (aproximadamente 20 ng); en un volumen final de 15 μ l.

Programa de PCR (cebador CL1/CL2A): 1 ciclo a 95° C por 2 min, seguido por 40 ciclos a 94° C por 30 seg, 55° C por 30 seg, 72° C por 50 seg. Se realizó una extensión final de 5 min a 72° C y se mantuvo a 4° C por 10 min.

Programa de PCR (cebador EF1/EF2): 1 ciclo a 94° C por 2 min, seguido por 35 ciclos a 94° C por 30 seg, 54° C por 40 seg, 72° C por 50 seg. Se realizó una extensión final de 5 min a 72° C y se mantuvo a 4° C por 10 min.

Programa de PCR (cebador fum8R/fum8F): 1 ciclo a 94° C por 2 min, seguido por 40 ciclos a 94° C por 30 seg, 56° C por 30 seg, 72° C por 50 seg. Se realizó una extensión final de 5 min a 72° C y se mantuvo a 4° C por 10 min.

III.5.1.4.b. Metodología

Las secuencias de los genes Calmodulina, Factor de Elongación 1- alfa y FUM8 fueron amplificadas por PCR según la metodología descrita por O'Donnell y col. (2000), para CL1 y CL2A, O'Donnell y col. (1998) para EF-1 y EF-2 y Proctor y col. (2008) para FUM8. La amplificación de las regiones se realizó usando los cebadores descritos en la Tabla III.3. Un control negativo que no contenía el ADN templado se incluyó en cada experimento a fin de probar posibles contaminaciones de los reactivos. La amplificación se realizó en un Termociclador 9700 (Applied Biosystems, Ontario, Canadá) con las condiciones descritas en el punto III.5.1.4.a. Los productos de amplificación se examinaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml) y fueron visualizados con un transiluminador UV. El tamaño de los fragmentos

obtenidos se estimó por comparación con ADN testigo (GeneRuler™ 1kb DNA Ladder) con bandas de referencia que oscilan entre 250-10000 pb.

Tabla III.3. Secuencia de los cebadores utilizados para amplificar los genes caM, EF-1 α y FUM8

Cebador	Secuencia
CL1	5'- GAAGTATCAAGGAGGCCTTCTC -3'
CL2	5'- TTTTGCATCATGAGTTGGAC -3'
EF1	5'- ATGGGTAAGGARGACAAGAC -3'
EF2	5'- GGARGTACCAGTSATCATGTT -3'
<i>fum8 F</i>	5'-GCAAGYTTYGTGGCYGATTGTCT-3'
<i>fum8 R</i>	5'-AGTGAGAGCATCATRGTATGRGCATC-3'

III.5.1.5. Secuenciación de genes Calmodulina (caM), Factor de Elongación 1- alfa (EF-1 α) y FUM8 de cepas de *Fusarium proliferatum*

Los productos de PCR fueron purificados utilizando la mezcla enzimática EXO/SAP (Exonuclease I, *E. coli* / Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Fermentas), utilizando el siguiente programa: 37°C, 15 min, seguido por 85°C, 15 min. Ambas cadenas se marcaron utilizando el BigDyeTerminator 3.1 kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). El programa de amplificación fue: 1 ciclo a 96 °C por 10 seg, seguido por 35 ciclos a 50 °C por 5 seg y una extensión de 4 min a 60 °C. Los productos de amplificación fueron purificados por filtración a través de gel Sephadex G-50 (Amersham Pharmacia Biotech). La secuenciación fue realizada utilizando el ABI PRISM 3730 DNA Sequencer (Applied Biosystems, USA), en el laboratorio de técnicas moleculares del Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari ISPA (Bari, Italia). Las secuencias de ambas cadenas de ADN de los productos de PCR se alinearon usando el programa BioNumerics versión 6.0 (Applied Maths NV). Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos en el GenBank (NCBI o *National Center for Biotechnology Information*) para determinar su homología con otras especies. El análisis filogenético se realizó mediante el método de máxima verosimilitud usando el programa MEGA5.

III.5.2. Determinación del tipo de apareamiento de las cepas de *Fusarium proliferatum* por amplificación de genes MAT

Las amplificaciones de los alelos *MAT-1* y *MAT-2* se realizaron en reacciones separadas. La amplificación del alelo *MAT-1* se realizó usando los cebadores **Gfmat1a** (5'- GTTCATCAAAGGGCAAGCG -3') y **Gfmat1b** (5'- TAAGCGCCCTCTTAACGCCT TC -3') mientras que en la del alelo *MAT-2* se usaron **Gfmat2c** (5'- AGCGTCAT TATTCGATCAAG -3') y **Gfmat2d** (5'- CTACGTTGAGAGCTGTACAG -3') (Steenkamp y col., 2000). Ambas mezclas de reacción contenían 0,2 mM de cada dNTPs, 1x Buffer PCR (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl a pH 8,3; 1,5 mM MgCl) (HotMaster Taq Buffer, 5PRIME), 0,3 µM de cada cebador, 1 – 20 ng de ADN genómico y 0,4 U de *Taq* polimerasa (5PRIME). Un control negativo (sin ADN templado) se incluyó en cada experimento a fin de probar posibles contaminaciones de los reactivos. La amplificación se realizó en un Termociclador 9700 (Applied Biosystems, Ontario, Canadá) con las siguientes condiciones: 1 ciclo a 94° C por 1 min, seguido por 30 ciclos a 94° C por 30 seg, 65° C por 45 seg, 72° C por 30 seg. Se realizó una extensión de 5 min a 72° C después de los 35 ciclos. Los productos de amplificación se examinaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio y se visualizaron con un transiluminador UV. El tamaño de los fragmentos obtenidos se estimó por comparación con ADN testigo (GeneRuler™ 1kb DNA Ladder) con bandas de referencia que oscilan entre 250-10000 pb.

III.5.3. Determinación de la capacidad toxicogénica de cepas de *Fusarium proliferatum* en granos de trigo candeal

III.5.3.1. Cepas

Teniendo en cuenta los resultados del estudio filogenético se seleccionaron 51 cepas de *Fusarium proliferatum* y 6 cepas de *F. verticillioides*, aisladas de trigo candeal y correspondientes a distintas cosechas y localidades (Anexo Tabla III.2).

III.5.3.2. Producción de fumonisinas

Para evaluar la capacidad de las cepas de producir fumonisinas se colocaron 30 g de trigo candeal en frascos Erlenmeyer de 250 ml, se hidrataron con 13,5 ml de agua destilada y se esterilizaron por autoclave a 121°C durante 15 minutos, 2 veces. Posteriormente se inoculó el trigo con 5 tacos obtenidos a partir de una colonia de la cepa en estudio desarrollada durante 7 días en el medio de cultivo APG. Las muestras se incubaron a 26°C durante 20 días en oscuridad. Luego del período de incubación las muestras se secaron a 55°C, se molieron y se almacenaron a -20°C hasta el análisis.

III.5.3.3. Detección y cuantificación de fumonisinas

Para la detección y cuantificación de las fumonisinas se siguió la metodología propuesta por AOAC Official Method 1995.15 y De Girolamo y col. (2011). A partir de 1 g de cada muestra previamente molida, se extrajeron las toxinas con 10 ml de metanol:agua (3:1). Se agitó el extracto 60 minutos en agitador rotatorio, luego se filtró a través de papel filtro Whatman N°4 y se ajustó el pH= 5,8 – 6,5 de cada muestra. Luego el filtrado (2 ml) se pasó a través de un cartucho SAX (Bond Elut Strong Anion-Exchange) previamente acondicionado por el pasaje sucesivo de metanol (5 ml) y metanol:agua (3:1, 5 ml). El cartucho se lavó con metanol:agua (3:1, 2 ml) seguido de metanol (2 ml). Las fumonisinas fueron eluidas con ácido acético al 1% en metanol (10 ml). El eluido se evaporó a sequedad a 50°C bajo un flujo de nitrógeno y se guardó a 4°C hasta el momento del análisis por HPLC.

Para la detección y cuantificación de las toxinas los residuos se redisolieron en 1 ml de acetronitrilo:agua (30:70). Una alícuota de 50 µl del extracto se derivatizó adicionándole 50 µl de una solución de O-ptaldialdehído (OPA), se mezcló por 30 seg utilizando el muestreador automático del equipo HPLC y se inyectaron 100 µl a *loop* lleno, 3 minutos después del agregado del OPA.

La solución derivatizante se preparó disolviendo 40 mg de OPA en 1 ml de metanol, 5 ml de tetraborato de Na 0,1M y 50 µl de 2-mercaptoetanol. Las fumonisinas derivatizadas fueron analizadas usando un sistema de detección de fluorescencia. El sistema HPLC consistió en un equipo Agilent serie 1100 (Agilent, Waldbronn, Germany), equipado con una bomba binaria G1312A, un inyector automático G1313A, un termostato de columna G1316A fijado a 30°C y un detector espectrofluorométrico G1321A. La separación se realizó en columna de fase reversa C18 SymmetryShield (150 x 4,6 mm, 5 µm de tamaño

de partícula, Waters, Milford, MA, USA), conectada a un prefiltro (0,5 μm x 3 mm diámetro, Rheodyne Inc., CA, USA). La fase móvil a utilizar consistió en un gradiente de ácido acético al 1% en agua (solvente A) y ácido acético al 1% en acetonitrilo (solvente B) (Tabla III.4).

Tabla III.4. Gradiente de solventes de la fase móvil

Pasos	Tiempo	%B
1	0	43
2	5	43
3	21	54
4	25	58
5	30	58
6	31	61
7	37	61
8	38	43
9	43	43

El flujo de la fase móvil fue de 0,8 ml/min. El rango de excitación y emisión usados fueron 335 y 440 nm, respectivamente. La cuantificación de las fumonisinas se basó en las medidas de las áreas de los picos comparados con una curva de calibración obtenida de soluciones testigos de referencia de FB₁ y FB₂ (Biopure, Modena, Italia). FB₃ se cuantificó comparando las áreas de los picos con la curva de calibración de FB₂. Los tiempos de retención estimados fueron: 18 min para FB₁, 27 min para FB₂ y 28 min para FB₃. El límite de detección para cada una de las fumonisinas fue de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

III.5.3.4. Preparación de soluciones estándares

Las soluciones estándares de fumonisinas B₁ y B₂ se prepararon en acetonitrilo:agua (1:1 v/v) a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se realizaron diluciones de las soluciones estándares con la misma mezcla de solventes para obtener concentraciones finales de 25, 50, 100; 250; 500; 1000; 5000 ng/ml de fumonisina B₁ y fumonisina B₂. Todas las soluciones estándares fueron almacenadas a -18°C hasta su uso.

III.6. Caracterización de cepas de *Fusarium graminearum* aisladas de trigo candeal en Argentina

III.6.1. Cepas

Se utilizaron 51 cepas con características morfológicas correspondientes a *F. graminearum*, aisladas de los germoplasmas comerciales y experimentales de trigo candeal durante las tres cosechas consecutivas (Tabla III.5). Además se utilizaron 4 cepas de referencia de especies dentro del complejo de especies de *F. graminearum* (*F. meridionale* 11794, *F. cortaderiae* 29297, *F. boothii* 26916, *F. brasilicum* 31281), una cepa de *F. graminearum* sensu stricto (s.s.) RCFG6001 previamente identificada como tal por secuenciación del gen factor de elongación 1 α y 4 cepas de especies de *Fusarium* similares morfológicamente a *F. graminearum* (*F. avenaceum*, *F. cerealis*, *F. pseudograminearum* 11436 y *F. culmorum* 11452).

III.6.2. Producción de la biomasa fúngica y extracción de ADN

III.6.2.1. Medios de cultivo, soluciones y reactivos

- ✓ Medio SNA: Descrito en el punto III.2.1
- ✓ Medio Wickerham: Descrito en el punto III.5.1.2.a
- ✓ Buffer CTAB al 2%: 2% CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl. Se mezclaron todos los componentes y se le adicionó aproximadamente 350 ml de agua bidestilada mientras se agitó hasta que la solución se aclaró. Se ajustó el volumen a 500 ml con agua bidestilada y se conservó a 65°C.
- ✓ Buffer TE 1x: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8.0

Tabla III.5. Cepas de *Fusarium graminearum* utilizadas en el estudio

Cepa	Germoplasma	Origen geográfico	Año
RCFG6000	Buck Platino	La Dulce	2009
RCFG6001	Buck Platino	La Dulce	2009
RCFG6002	Buck Platino	La Dulce	2009
RCFG6003	Buck Platino	La Dulce	2009
RCFG6004	Buck Platino	La Dulce	2009
RCFG6005	Buck Platino	La Dulce	2009
RCFG6006	Buck Topacio	La Dulce	2009
RCFG6007	CICCIO	La Dulce	2009
RCFG6008	TC-6	La Dulce	2009
RCFG6009	TC-7	La Dulce	2009
RCFG6010	TC-13	La Dulce	2009
RCFG6011	TC-17	La Dulce	2009
RCFG6012	TC-18	La Dulce	2009
RCFG6013	TC-20	La Dulce	2009
RCFG6014	TC-20	La Dulce	2009
RCFG6015	Kofa	La Dulce	2009
RCFG6016	Kofa	La Dulce	2009
RCFG6017	BIFAC	Miramar	2010
RCFG6018	Buck Esmeralda	Miramar	2010
RCFG6019	BICRL	Miramar	2010
RCFG6020	Buck Platino	Miramar	2010
RCFG6023	BIFAC	La Dulce	2010
RCFG6024	TC-29	Miramar	2010
RCFG6025	Kofa	Pieres	2011
RCFG6026	Amarillo	Pieres	2011
RCFG6027	TC-16	Pieres	2011
RCFG6028	TC-18	Pieres	2011
RCFG6029	TC-24	Pieres	2011
RCFG6030	TC-19	Pieres	2011
RCFG6031	ACA1801F	Pieres	2011
RCFG6032	TC-22	Pieres	2011
RCFG6033	Buck Topacio	Pieres	2011
RCFG6034	ACA1801F	Pieres	2011
RCFG6035	BIFAC	Pieres	2011
RCFG6036	TC-20	Pieres	2011
RCFG6044	BIFAC	Barrow	2011
RCFG6045	ACA1801F	Barrow	2011
RCFG6047	Buck Topacio	La Dulce	2011
RCFG6048	BICRL	Miramar	2011
RCFG6049	ACA1801F	Miramar	2011
RCFG6050	Buck Topacio	Miramar	2011
RCFG6051	Buck Esmeralda	Miramar	2011
RCFG6052	BIFAC	Balcarce	2011
RCFG6053	Buck Topacio	Barrow	2011
RCFG6054	ACA1801F	Balcarce	2011
RCFG6055	BICRL	Balcarce	2011
RCFG6056	Buck Granate	Miramar	2011
RCFG6058	BIFAC	La Dulce	2011
RCFG6059	ACA1801F	Balcarce	2011
RCFG6060	ACA1801F	La Dulce	2011
RCFG6064	ACA1801F	Miramar	2011
RCFG6065	ACA1801F	La Dulce	2011

III.6.2.2. Condiciones de crecimiento

A partir de cada una de las cepas desarrolladas en el medio SNA, se tomaron con sacabocado 3 tacos de la colonia en activo crecimiento y se transfirieron a frascos Erlenmeyer de 250 ml, que contenían 50 ml de medio Wickerham. Los cultivos se incubaron a 28° C durante 2 a 3 días en un agitador rotatorio (150 rpm) y se cosechó el micelio por filtración, lavándolo con agua destilada estéril y secándolo entre papel absorbente. Los micelios fueron almacenados a -20° C hasta el momento de realizar la extracción del ADN.

III.6.2.3. Extracción y purificación del ADN

El micelio congelado de cada una de las cepas se pulverizó con nitrógeno líquido en mortero y se distribuyó en tubos Eppendorff. El ADN fue extraído con buffer CTAB siguiendo la metodología propuesta por Leslie y Summerell (2006). A los micelios congelados de cada una de las cepas en estudio (aproximadamente 1,5 a 2 g) se le adicionó 750 µl de buffer CTAB al 2% (a 65° C) y 2 µl de 2-mercaptoetanol. Se agitó cada tubo Eppendorf en Vortex por 2 min y se incubaron a 65° C durante 15 minutos. Luego del periodo de incubación, se agregó 520 µl de una solución de cloroformo:isoamilalcohol (24:1, v/v), se agitó la mezcla durante 1 min en Vortex y se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min. Se tomó 600 µl de la fase acuosa y los ácidos nucleicos crudos se precipitaron con un volumen igual de isopropanol y 300 µl de acetato de amonio 7,5 M. Luego se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se lavó con 500 µl de etanol frío al 70% (v/v), se centrifugaron nuevamente a 10.000 rpm por 10 min y se secaron a temperatura ambiente durante 2 ó 3 min. A continuación se disolvió cada pellet en 100 µl de buffer TE 1x (pH 8,0) y se conservaron las muestras a -20° C hasta el momento de usarse en los siguientes análisis. El ADN genómico se cuantificó por comparación visual usando ADN del bacteriófago λ digerido con HindIII como ADN testigo. Las muestras fueron separadas por electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

III.6.3. Evaluación de la diversidad genética de cepas de *Fusarium graminearum* aisladas de trigo candeal a través del uso de marcadores neutros, Secuencias Intergénicas Simples Repetidas (ISSRs)

III.6.3.1. Optimización de un protocolo para estudiar la diversidad de *F. graminearum* utilizando el perfil ISSR

Para la evaluación de la diversidad genética de las cepas de *F. graminearum* aisladas previamente se siguió la metodología propuesta por Giaj-Merlera y col. (2012).

III.6.3.1.a. Cepas

Para la optimización del protocolo para marcador molecular ISSR se evaluaron cepas de referencia dentro del complejo de especies de *F. graminearum* (*F. meridionale* 11794, *F. cortaderiae* 29297, *F. boothii* 26916, *F. brasiliicum* 31281), una cepa identificada por secuenciación del gen factor de elongación 1 α (EF-1 α) como *F. graminearum* s.s. RCFG6001 y cepas de referencia pertenecientes a otras especies de *Fusarium* similares morfológicamente a *F. graminearum* (*F. avenaceum*, *F. cerealis*, *F. pseudograminearum* 11436 y *F. culmorum* 11452).

III.6.3.1.b. Reacciones de PCR

Se utilizaron 5 cebadores seleccionados teniendo en cuenta la bibliografía existente (Tabla III.6). La concentración de ADN templado fue de aproximadamente 20 ng en un volumen final de 25 μ l. Un control negativo que no contenía el ADN templado se incluyó en cada experimento y cada reacción se realizó al menos dos veces. Los productos de amplificación se examinaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio, y fueron fotografiados usando un digitalizador de imágenes (MiniBIS Pro, DNR). El tamaño de los fragmentos obtenidos se estimó por comparación con ADN testigo (Invitrogen, 100-bp Ladder) con bandas de referencia que oscilan entre 100–2072 pb.

Tabla III.6. Secuencias y temperaturas de *annealing* de los cebadores ISSR usados como técnica *fingerprint* en *Fusarium graminearum*

Cebador ISSR	Secuencia 5'- 3'	Temperatura de <i>annealing</i>
1	(GAG)5CAG	53 °C
6	CTC(GT) ₈	53 °C
7	AG(CTC) ₅	51 °C
8	CT(GA) ₈	53 °C
10	(GA) ₈ C	47 °C

De acuerdo a los resultados obtenidos, se seleccionaron aquellos cebadores que permitieron una buena discriminación de las especies de *Fusarium*, principalmente en base al número e intensidad de bandas obtenidas y a su habilidad de amplificar consistentemente los mismos fragmentos dado el mismo aislado.

Mezcla de reacción de PCR optimizada (para una reacción): 0,2 mM dNTPs (Invitrogen), Buffer PCR 1X (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl a pH 8,3), 1,25 U Taq DNA polimerasa (Invitrogen), 2,5 mM MgCl₂, 0,7 μM de cada cebador (ISSR 1; ISSR 6; ISSR 7; ISSR 8; ISSR 10) y 2,5 μl de ADN templado (aproximadamente 20 ng); en un volumen final de 25 μl.

Programa de PCR ISSR: 1 ciclo a 94° C por 7 min, seguido por 33 ciclos a 94° C por 60 s, 53° C por 75 s (dependiendo del cebador utilizado Tabla III.6), 72° C por 4 min. Se realizó una extensión final de 7 min a 72° C y se mantuvo a 4° C por 10 min.

III.6.3.1.c. Análisis de los datos

Para analizar los perfiles de ISSR, se determinó la presencia o ausencia de las bandas en cada una de las cepas evaluadas. Se consideró que las bandas del mismo tamaño molecular en las diferentes cepas representan el mismo alelo y cada banda se trató como un único locus independiente con dos alelos. Cada fragmento amplificado fue considerado como un carácter y cada carácter con dos posibles estados, presencia (1) y ausencia (0), y se construyó una matriz binaria para cada cebador. Para estimar la

distancia genética entre los individuos, se calculó el coeficiente de similitud usando la fórmula $S = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, donde N_x y N_y representan el número de fragmentos amplificados en las cepas x e y , respectivamente y N_{xy} representa el número de fragmentos compartidos por ambas cepas (Nei y Li, 1979). La distancia genética se derivó del coeficiente de similitud como $D = 1 - S$. El dendograma resultante fue realizado utilizando el algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group* método de medias aritméticas) en el programa NTSYSpc 2.0 (Numerical Taxonomy System) (Rohlf, 1990). Los valores de bootstraps se determinaron usando el programa PAUP versión 4.0 (Swofford, 2000).

III.6.4. Análisis de las cepas de *Fusarium graminearum* a través de ISSR

Una vez optimizada la reacción en cuanto a la repetitibilidad y reproducibilidad, se analizaron las cepas de *F. graminearum* aisladas de trigo candeal. Se seleccionaron los cebadores ISSR 6, ISSR 7, ISSR 8 e ISSR 10 (Tabla III.6) los cuales permitieron una buena discriminación de las especies de *Fusarium*, principalmente en base al número e intensidad de bandas obtenidas y a su habilidad de amplificar consistentemente los mismos fragmentos dado el mismo aislado.

III.6.5. Secuenciación del gen Factor de Elongación 1- alfa (EF-1 α)

III.6.5.1. Cepas

Se seleccionaron 2 cepas de aquellas que agruparon con *F. graminearum* s.s. y también aquellas cepas que agruparon con la cepa patrón de *F. cerealis*, para realizar la secuenciación del gen factor de elongación 1 α con el fin de confirmar su identidad (Tabla III.7).

Tabla III.7. Cepas seleccionadas para la secuenciación del gen EF-1 α

Cepa	Germoplasma	Origen geográfico	Año
RCFG6017	BIFAC	Miramar	2010
RCFG6019	BICRL	Miramar	2010
RCFG6020	Buck Platino	Miramar	2010
RCFG6024	TC-29	Miramar	2010
RCFG6029	TC-24	Pieres	2011
RCFG6032	TC-22	Pieres	2011
RCFG6033	Buck Topacio	Pieres	2011
RCFG6045	ACA1801F	Barrow	2011
RCFG6053	Buck Topacio	Barrow	2011

III.6.5.2. Amplificación del gen EF-1 α de cepas de *Fusarium*

III.6.5.2.a. Materiales y condiciones de reacción

Mezcla de reacción de PCR: 0,2 mM dNTPs, Buffer PCR 1X (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl a pH 8,3; 1,5 mM MgCl₂), 1,5 U *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen), 0,3 μ M de cada cebador y 5 μ l de ADN templado (aproximadamente 20 ng); en un volumen final de 50 μ l.

Programa de PCR (cebadores EF1/EF2): 1 ciclo a 94° C por 2 min, seguido por 35 ciclos a 94° C por 30 seg, 54° C por 40 seg, 72° C por 50 seg. Se realizó una extensión final de 5 min a 72° C y se mantuvo a 4° C por 10 min.

Un control negativo que no contenía ADN templado se incluyó en cada experimento a fin de probar posibles contaminaciones de los reactivos. Las amplificaciones se realizaron en un Termociclador MJ Research PTC-200 (MJ Research Inc., Watertown, MA). Los productos de amplificación se examinaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% tiñendo con bromuro de etidio y se visualizó con un transiluminador UV. El tamaño de los fragmentos obtenidos se estimó por comparación con ADN testigo (Invitrogen, Inc., 100 bp Ladder) con bandas de referencia que oscilan entre 100 – 2072 pb. Los fragmentos amplificados se purificaron utilizando columnas de purificación de ADN (DNA Wizard DNA Clean-Up Kit, Promega, Madison, WI) siguiendo las instrucciones del fabricante. Ambas cadenas de ADN se secuenciaron con cada par de cebadores utilizados usando un secuenciador Applied

Biosystem ABI 3730 sequencer (Applied Biosystem). La secuenciación de los mismos se llevó a cabo en el Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA, Tucumán). Las secuencias de ambas cadenas de ADN de los productos de PCR se alinearon usando el programa BioEdit versión 7.0.9.0 <http://www.mbio.ncsu.edu/RNasaP/info/programs/BIOEDIT/bioedit.html> (Thompson y col., 1994). Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos en el GenBank (NCBI o National Center for Biotechnology Information) para determinar su homología con otras especies.

III.6.5.3. Análisis preliminar de máxima parsimonia

Para el análisis preliminar de máxima parsimonia se utilizaron secuencias de las diferentes especies dentro del complejo *Fusarium graminearum* y especies de *Fusarium* relacionadas, las mismas fueron obtenidas del GenBank. El alineamiento de las secuencias se realizó *on line* con el programa MAFFT versión 6. El análisis filogenético se realizó bajo el principio de máxima parsimonia, con pesos iguales, utilizando el programa TNT (Goloboff y col., 2008). La estrategia de búsqueda se llevó a cabo utilizando 1000 RAS (Random Addition Sequences) y posterior rearrreglo de ramas por el algoritmo de TBR (Tree Bisection Reconnection), guardando 10 árboles por réplica, utilizando una memoria total de 10000 árboles. Con el fin de evaluar el soporte de los grupos identificados se llevaron a cabo análisis de Bootstrap con 1000 replicas.

III.6.6. Estructura genética poblacional de *Fusarium graminearum* sensu stricto aislado de trigo candeal en Argentina

Teniendo en cuenta que las cepas de *F. graminearum* s.s. se obtuvieron tanto de años no predisponentes para la fusariosis de la espiga, como de un año en el cual hubo incidencia de esta enfermedad, se decidió comparar la población de *F. graminearum* s.s. aislada de años sin fusariosis (SF) con aquella obtenida de la campaña 2010/11, campaña de mayor incidencia de la enfermedad (CF). Para tal fin, se utilizaron los marcadores moleculares ISSR, descritos en el punto III.6.3. Se evaluaron un total de 44 cepas de *F. graminearum* s.s., 19 aisladas de años sin fusariosis (SF) y 25 aisladas de años con fusariosis (CF).

III.6.6.1. Diversidad genotípica y análisis genético de la población

Se utilizó el software PAUP 4.0 (Swofford, 2001) para identificar los haplotipos diferentes e iguales dentro de cada población. Los datos obtenidos se analizaron por el método de medias aritméticas (UPGMA). Se consideraron clones aquellos aislados con haplotipos que compartían $\geq 98\%$ de las bandas analizadas. Solo una cepa de cada clon se utilizó para los estudios siguientes.

La diversidad genotípica (G) para cada población se estimó según Milgroom (1996). Se estimó también: (1) la frecuencia alélica de los loci polimórficos y la diversidad de genes dentro y entre poblaciones según Nei (1973); (2) G_{ST} (Índice de fijación) según Nei (1973); (3) N_m (tasa de migración efectiva) según McDermott y McDonald (1993), y (4) la identidad genética entre poblaciones según Nei (1978), con el programa POPGENE versión 1.32 (Yeh y col., 1997). Todos los datos analizados con este programa se trataron como haploides con marcadores dominantes. Los índices G_{ST} y N_m se estimaron con el total de loci y con un número de loci para los cuales ambos alelos se encontraban presentes en una frecuencia $\geq 5\%$ en, al menos, una de las dos poblaciones. Los resultados de estos análisis se compararon para determinar si la inclusión de los loci con alelos raros modificaba los índices de diferenciación genética de las poblaciones. También se utilizó el programa POPGENE para estimar el desequilibrio gamético (o de ligamiento) para los loci si ambos alelos en ambos loci estaban presentes en la población a una frecuencia $\geq 5\%$. Se calculó el desequilibrio gamético para dos locus entre todos los pares de estos loci y se realizó el test de significancia de X^2 según Weir (1979).

III.6.7. Determinación del quimiotipo y genotipo de cepas de *Fusarium graminearum* sensu stricto aisladas de trigo candeal

III.6.7.1. Determinación del genotipo de las cepas de *Fusarium graminearum* por PCR múltiple

Para la determinación de los quimiotipos se realizó una PCR múltiple siguiendo la metodología de Quarta y col. (2005, 2006). La reacción de PCR se realizó en una mezcla de 50 μ l que contenía 0,2 μ M de cada dNTPs; 1x Buffer PCR; 1,5 mM $MgCl_2$, 2 U de *Taq* ADN polimerasa (Promega), 0,2 μ M de cada cebador Tri3 (Tri3F971, Tri3F1325 y Tri3R1679) y

0,1 μ M de cada cebador Tri7F340, Tri7R965, 3551H y 4056H y 10-25 ng de ADN genómico. Un control negativo que no contenía el ADN templado se incluyó en el experimento a fin de probar posibles contaminaciones de los reactivos y ADN de cepas con quimiotipos NIV, 3-ADON y 15-ADON conocidos se utilizaron como controles positivos. La secuencia de cada uno de los cebadores utilizados y el tamaño de los fragmentos amplificados se muestran en la Tabla III.8.

La amplificación se realizó en un Termociclador MJ Research PTC-2000 (MJ Research Inc., Watertown, MA) con las siguientes condiciones: 1 ciclo a 94°C por 3 min, seguido por 35 ciclos a 94°C por 30 seg, 53 °C por 30 seg, 72°C por 1 min. Se realizó una extensión de 10 min a 72 °C después de los 35 ciclos. Los productos de amplificación se examinaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml) y fueron visualizados con un transiluminador UV. El tamaño de los fragmentos obtenidos se estimó por comparación con ADN testigo (New England Biolabs, Inc., 100-bp Ladder) con bandas de referencia que oscilan entre 100-1500 pb.

Tabla III.8. Secuencia de cebadores y fragmentos amplificados en los diferentes genotipos

Cebador	Secuencia del cebador	Gen blanco	Producto (pb)	Genotipo
3551H	5'-ACTTTCCCACCGAGTATTTT-3'	Tri5	525	DON
4056H	5'-CAAAAAGTGTGTTCCACTGCC-3'			
Tri3F971	5'-CATCATACTCGCTCTGCTG -3'	Tri3	708	15-AcDON
Tri3R1679	5'-GCATTGGCTAACACATGA-3'			
Tri3F1325	5'-TT(AG)TAGTTTGCATCATT(AG)TAG-3'	Tri3	354	3-AcDON
Tri3R1679	5'-GCATTGGCTAACACATGA-3'			
Tri7F340	5'-ATCGTGTACAAGGTTTACG-3'	Tri7	625	NIV
Tri7R965	5'-TTCAAGTAACGTTGACAAT-3'			

III.6.7.2. Determinación de la capacidad toxicogénica de las cepas de *Fusarium graminearum* sensu stricto

Se evaluó la capacidad de las diferentes cepas de *F. graminearum* s.s. aisladas de producir NIV, DON, 3-ADON y 15-ADON.

III.6.7.2.a. Producción de micotoxinas

Las cepas de *F. graminearum* s.s. se cultivaron en Erlenmeyers de 250 ml conteniendo 15 g de arroz esterilizado por autoclave dos veces. Luego del primer proceso de esterilización, se adicionaron 10 ml de agua destilada estéril con la finalidad de que el arroz alcance un 40% de humedad. Posteriormente, cada frasco fue inoculado con un disco de la colonia en activo crecimiento en medio SNA a 25°C durante 7 días. Los frascos se incubaron durante 21-28 días a 25°C y fueron agitados a mano diariamente durante la primera semana de incubación. Luego, cada muestra se secó a 50°C durante 24 h, se molió finamente y se almacenó a -20°C hasta su análisis.

III.6.7.2.b. Análisis de DON, 3-ADON, 15-ADON y NIV por cromatografía en capa delgada (TLC)

La extracción de las micotoxinas se realizó siguiendo la metodología propuesta por Cooney y col. (2001), con algunas modificaciones. Cada muestra (15 g) fue extraída con 40 ml de acetonitrilo/metanol (14:1). Se agitó durante 1 h, se filtró a través de papel Whatman N° 4 y se pasó una alícuota de 2 ml de cada extracto por una columna de limpieza compuesta por una capa de lana de vidrio y 500 mg de alumina/carbón (20:1). Cada columna se lavó con 500 µl de una mezcla de acetonitrilo:metanol:agua (80:5:15, v/v/v) y el eluyente se evaporó luego a sequedad bajo flujo de nitrógeno gaseoso a 50°C en un bloque de calor (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

La detección de toxinas se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Molto y col. (1997). El residuo se disolvió en 500 µl de tolueno: acetonitrilo (95:5, v/v/v) y dicho extracto se aplicó junto con soluciones testigo de cada toxina a placas TLC (Merck 5553). La mezcla de desarrollo fue cloroformo: acetona: 2-propanol (8:1:1, v/v/v) y luego cada placa se roció con una solución de cloruro de aluminio al 20% en etanol y se calentó a 120°C durante

7 min. La presencia de cada micotoxina fue valorada por comparación visual del Rf (distancia recorrida por el soluto/distancia recorrida por el solvente) con las soluciones testigo de cada toxina (DON, 3-ADON, 15-ADON y NIV) bajo luz UV de 366 nm, en la figura III.3 se observa el Rf de las soluciones testigo.

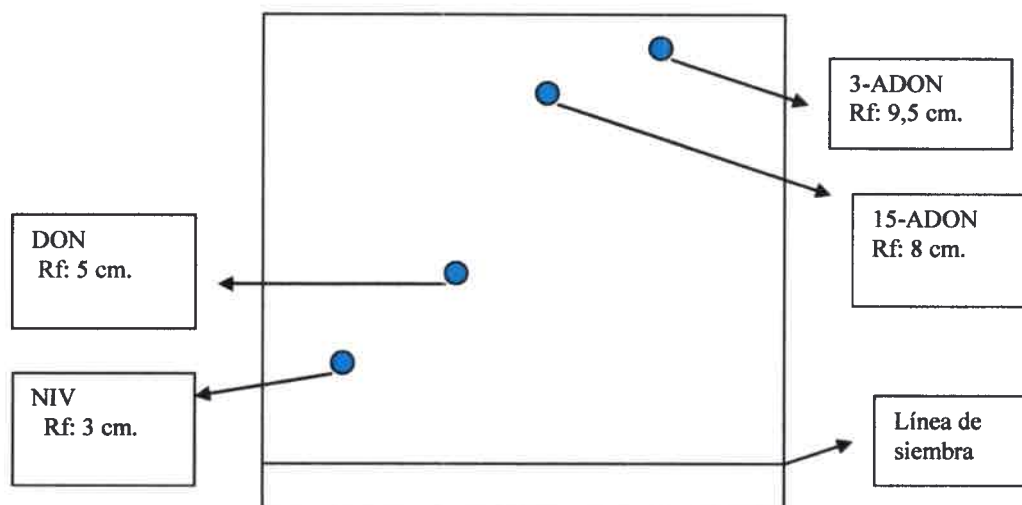


Figura III.3. Rf de las soluciones testigo

III.6.7.2.c. Análisis de DON y NIV por cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

La detección y cuantificación de DON y NIV se realizó según la metodología propuesta por AOAC (1995) descrita en el punto III.3.

III.7. Evaluación del comportamiento de diferentes germoplasmas de trigo candeal ante la infección por *Fusarium graminearum* y *Fusarium proliferatum*

III.7.1. Preparación de las plantas de trigo

Para los ensayos en invernadero se utilizaron 12 germoplasmas comerciales y experimentales de trigo candeal para el ensayo con *F. graminearum* y 5 germoplasmas

comerciales y experimentales para el ensayo con *F. proliferatum* (Tabla III.9). Se sembraron 4 semillas por maceta (20 cm de diámetro) en un sustrato conteniendo tierra, arena y turba (en partes iguales) previamente esterilizadas en autoclave (100°C) a vapor fluente por 60 min. Las plantas se regaron manualmente 2 ó 3 veces por semana durante todo su ciclo. El invernadero cuenta con luz artificial para ser utilizada en casos puntuales y así evitar retrasos en el crecimiento de las plantas. Las plantas se dejaron crecer hasta la etapa de antesis (12 semanas aproximadamente), período en el cual se realizó la inoculación.

Tabla III.9. Lista de germoplasmas de trigo candeal utilizados en el ensayo de invernadero

Germoplasmas	
Comerciales	Experimentales
Kofa	TC-6
Bonaerense INTA Facón (BIFAC)	TC-20
Ciccio	TC-28
ACA 1801F	Langdon (Dic-3A)
Buck Esmeralda (BESM)	DGE-1
Buck Platino (BPLT)	
Langdon	

III.7.2. Preparación del inóculo

Para el ensayo en invernadero se utilizaron las cepas de *F. graminearum* RCFG6001 y RCFG6011 y las cepas de *F. proliferatum* ITEM 15668 e ITEM 15670 aisladas previamente durante el presente trabajo de tesis. Para la producción de los macroconidios se utilizó el medio líquido SNA. Se obtuvieron 3 discos de cada colonia en activo crecimiento en el medio SNA y se inocularon en 100 ml de caldo SNA, por separado cada cepa. Los cultivos se incubaron por 14 días a 25°C en agitación (250 revoluciones por minuto, rpm). Finalizado el período de incubación, los cultivos se filtraron a través de gasa y algodón estéril y se centrifugaron por 5 min a 7000 rpm. El precipitado, conteniendo los macroconidios, se resuspendió en agua destilada estéril con el agregado de tween 80 (0,05% v/v). El recuento de los conidios se realizó en cámara de Neubauer y se ajustó la concentración a 1×10^5 conidios/ml.

III.7.3. Inoculación de las espigas en el estadio de antesis

Durante la antesis, se inocularon 10 µl de la suspensión de conidios en la espiguilla central de cada espiga. Para cada tratamiento se inoculó un mínimo de cuatro espigas por maceta en un diseño de bloques al azar. Como control negativo, se inocularon espigas con agua destilada estéril más el agregado de tween 80 (0,05% v/v) para cada germoplasma evaluado. El ensayo se realizó por triplicado (3 macetas conteniendo mínimo 4 espigas cada una, 12 espigas en total por tratamiento evaluado).

Las macetas con espigas inoculadas con las cepas de *F. graminearum* fueron mantenidas a 90% de humedad relativa por 2 ó 3 días para asegurar la colonización por el hongo. Para ello, inmediatamente luego de la inoculación, las plantas enteras se cubrieron con una bolsa de polietileno. En su interior se colocó un algodón embebido en agua destilada, la bolsa se cerró en la parte inferior para preservar la humedad y así favorecer la infección.

Se realizaron evaluaciones de la enfermedad a los 21 días luego de la inoculación y se determinó la severidad de la infección como nº de espiguillas sintomáticas/nº de espiguillas totales.

Las macetas con espigas inoculadas con las cepas de *F. proliferatum* fueron mantenidas con riego mínimo y se les brindó condiciones de humedad durante 1 día pos-inoculación. Se realizó un seguimiento de las espigas para ver la aparición de algún síntoma.

III.7.4. Análisis de la producción de deoxinivalenol en las espigas inoculadas en el ensayo de invernadero

Para la detección y cuantificación de DON y sus derivados acetilados se siguió la metodología propuesta por Lattanzio y col. (2011). A partir de 5 g de cada muestra previamente molida, se extrajeron las toxinas con 25 ml de acetonitrilo:agua (84:16, v/v). Se agitó el extracto 60 minutos en agitador rotatorio y se filtró a través de papel filtro Whatman Nº4. Luego, 5 ml del filtrado se evaporaron a sequedad bajo un flujo de aire a 40°C. Se redisolvió el residuo añadiendo 100 µl de metanol, luego se agitó mediante vortex por 1 min y luego se agregó 900 µl de agua para obtener una proporción de 10:90, v/v, y luego se agitó nuevamente en vortex por 1 min. A continuación el filtrado se pasó a través de un cartucho SPE (Oasis® HLB) previamente acondicionado por el pasaje sucesivo de metanol (2 ml) y

metanol:agua (10:90, 2 ml), a razón de 1 gota por segundo. El cartucho se lavó con metanol:agua (10:90, 1 ml) y luego se secó. Las toxinas fueron eluidas con 1 ml de metanol. El eluido se evaporó a sequedad a 40°C bajo un flujo de aire y se guardó a 4°C hasta el momento del análisis por HPLC. Para la detección y cuantificación de las toxinas los residuos se redisolieron en 400 µl de fase móvil.

Todos los análisis fueron realizados en el Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA, Italia). Para ello se utilizó un HPLC-MS/MS QTRAP® (AB SCIEX), la columna utilizada fue una Gemini RP C18 (150 x 2 mm, 5 µm, Phenomenex). La interfase se trabajó en modo de ionización electrospray negativa de 0-25 min, luego en modo de ionización electrospray positiva de 25-38 min y finalmente 38-56 min en modo de ionización electrospray negativa. Como gas de nebulización (GS1) se utilizó aire a 10 psi a 350°C. El voltaje del capilar fue de +4500 V y -4500 V para los modos positivo y negativo, respectivamente. Se utilizó el método de monitoreo de reacciones múltiples (MRM). Las transiciones y condiciones de MRM se detallan en la Tabla III.10. La fase móvil utilizada consistió en un gradiente de, ácido acético al 0,5% en agua y acetato de amonio 1mM (solvente A) y ácido acético al 0,5% en metanol y acetato de amonio 1mM (solvente B), el flujo de la misma fue de 200 µl/min. La temperatura de la columna fue mantenida a 40°C. Alícuotas de 20 µl de extractos fueron inyectados en la unidad HPLC.

Tabla III.10. Parámetros utilizados para la detección de DON y derivados acetilados por HPLC-MS/MS

Compuesto	Ion precursor	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
DON	[M+CH ₃ COO] ⁻	355,1	295,0	-23	-4,5	-17	-2,5
			59,0*			-40	-7,0
			59,0*			-70	-3,0
3-/15-AcDON	[M+CH ₃ COO] ⁻	397,2	337,2	-37	-2,6	-18	-5,0
			58,9*			-40	-1,0
			130,9*			-40	-2,0

* transiciones utilizadas para cuantificar

Q1: primer cuadrupolo

Q3: tercer cuadrupolo

DP: potencial de ruptura

EP: potencial de entrada

CE: energía de colisión

CXP: potencial de salida de la celda de colisión

III.7.4.1. Análisis estadístico de los datos

Los datos de severidad se analizaron mediante un ANOVA y las medias se compararon utilizando el test de Fisher ($P \leq 0,05$). Los valores de concentración de DON en las espigas se normalizaron utilizando la transformación escores normales previo al análisis de la varianza (ANOVA). El coeficiente de correlación de Pearson fue utilizado para estimar la relación entre la severidad y el contenido de DON. El análisis de los datos fue realizado usando el programa estadístico InfoStat para Windows versión 3.0 (SPSS Inc.).

Resultados y Discusión



IV. RESULTADOS Y DISCUSION

IV.1. Evaluación de la microbiota aislada de cultivares comerciales y experimentales de trigo candeal

Durante el primer año (2009), el 100% de las muestras, todas provenientes de la localidad de La Dulce, presentaron contaminación con especies del género *Fusarium*, el porcentaje de infección varió entre 8 y 66%. Los germoplasmas con mayor frecuencia de aislamiento de especies de *Fusarium* fueron variedades experimentales; la muestra TC-18 presentó un 66 % de infección, seguida por las muestras TC-26 (64%) y TC-19 (56%). De 463 cepas aisladas, las principales especies encontradas fueron *F. equiseti* (30,45%), *F. proliferatum* (26,57%), *F. oxysporum* (11,02%) y *F. semitectum* (10,15%), mientras que las especies aisladas con menor frecuencia fueron *F. verticillioides* (5,83%), *F. graminearum* (3,67%) y *F. subglutinans* (3,67%). Se aislaron también otras especies como *F. beomiforme*, *F. sporotrichoides*, *F. avenaceum*, *F. poae*, *F. culmorum* y *F. sambucinum* (Figura IV.1A). La incidencia de *F. graminearum* en los distintos germoplasmas, tanto comerciales como experimentales, fue baja, entre un 3,45 a 17%, habiendo germoplasmas de los cuales no se aisló esta especie.

En las muestras obtenidas en la campaña 2010, provenientes de la localidad de Pieres, se observó mayor porcentaje de infección con el género *Fusarium*, comparado con las muestras obtenidas en el año 2009. Este porcentaje varió entre 27 y 84%. Los germoplasmas que presentaron mayor infección fueron las variedades comerciales Amarillo, de origen francés (84%), Buck Esmeralda (81%) y Bonaerense INTA Carilo (80%). De 428 cepas aisladas, las principales especies encontradas fueron *F. equiseti* (55,37%), *F. semitectum* (11,68%), *F. oxysporum* (8,64%) y *F. acuminatum* (7,24%), mientras que las especies aisladas con menor frecuencia fueron *F. proliferatum* (3,27%) y *F. verticillioides* (3,04%). Se aislaron también otras especies como *F. polyphialidicum*, *F. chlamydosporum*, *F. avenaceum*, *F. poae*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. sambucinum* y *F. dimerum* (Figura IV.1B).

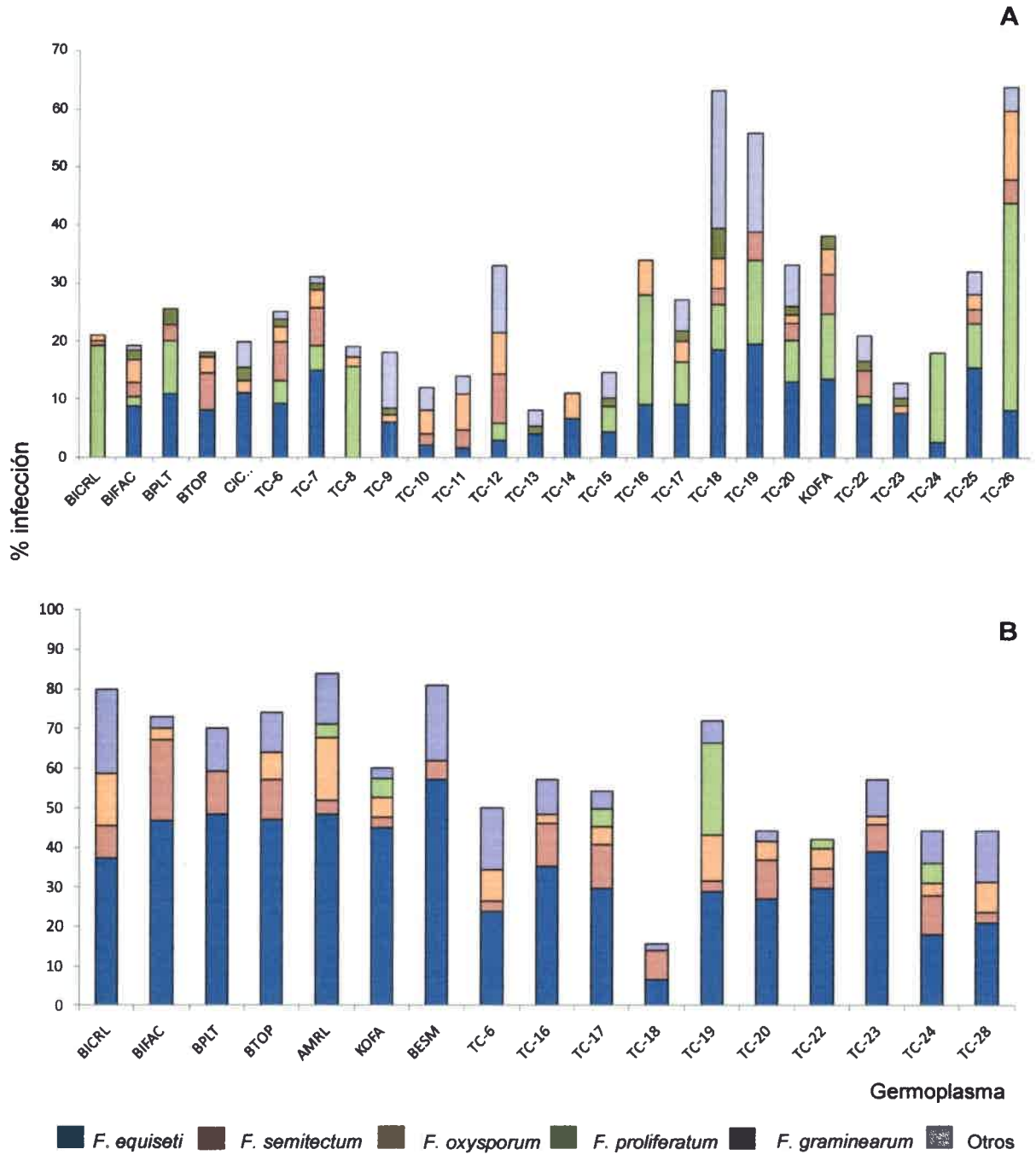


Figura IV.1: Porcentaje de infección y distribución de especies de *Fusarium* en muestras de trigo candeal. **A:** cosecha 08/09 y **B:** cosecha 09/10.

Las muestras de la campaña 2010, provenientes de las localidades de Miramar, La Dulce y Barrow, presentaron contaminación con especies de *Fusarium*. Los porcentajes de infección variaron entre 11 y 94%. Las muestras más contaminadas fueron aquellas provenientes de la localidad de Barrow (Figura IV.3A).

Durante la campaña 2011, el 100% de las muestras provenientes de la localidad de Pieres presentaron contaminación con especies del género *Fusarium*, el porcentaje de infección varió entre 29 y 93% (Figura IV.2). El 80% de las muestras presentaron porcentajes de infección superiores al 50%. Las muestras más contaminadas fueron AMR con un 93% y BTOP con un 86%.

Las muestras de la campaña 2011, provenientes de las localidades de Barrow, Balcarce, Bordenave, Miramar, La Dulce y Cabildo, presentaron porcentajes de infección que variaron entre el 2 y el 100%. También las muestras más contaminadas fueron aquellas provenientes de la localidad de Barrow (Figura IV.3B). Se puede observar que durante las últimas dos campañas, un mismo genotipo presentó diverso porcentaje de infección dependiendo de la localidad donde fue sembrado. Sin embargo, esta diferencia no puede ser atribuida a factores climáticos como las precipitaciones, ya que los niveles de lluvias alcanzados en la localidad de Barrow, donde se obtuvieron los mayores porcentajes de infección, fueron menores a los de Miramar o Balcarce (Figura IV.3; Tabla IV.1).

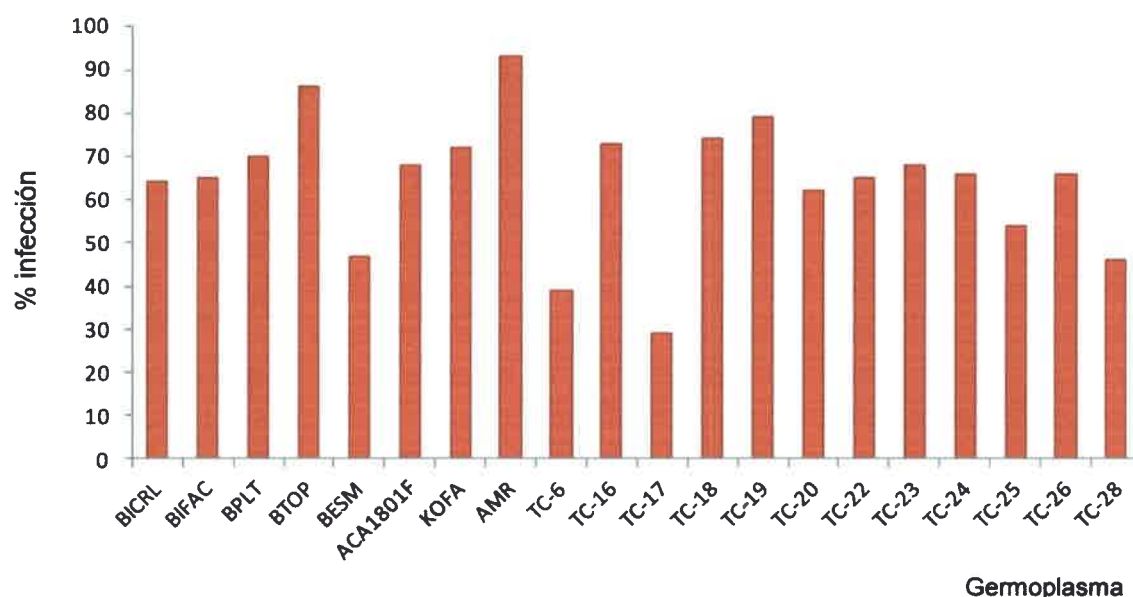


Figura IV.2: Porcentaje de infección por *Fusarium* spp de muestras de trigo candeal provenientes de la localidad de Pieres, cosecha 2011.

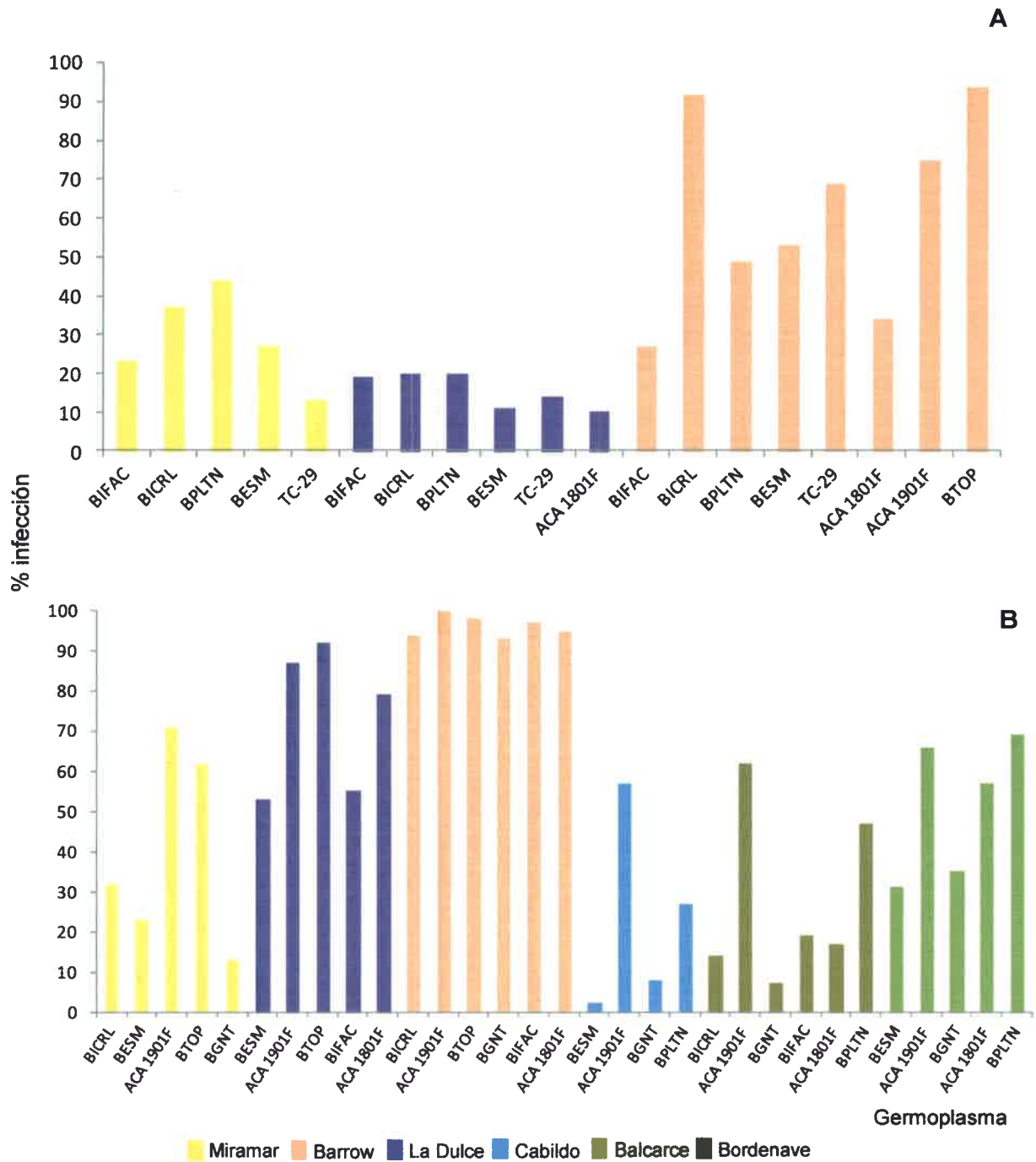


Figura IV.3: Porcentaje de infección por *Fusarium* spp. de muestras de trigo candeal provenientes de diferentes localidades de la zona productora de trigo candeal. A: cosecha 2010, B: cosecha 2011.

Tabla IV.1. Precipitaciones (mm) en las diferentes localidades durante el segundo semestre de cada año

Localidad	Cosecha 2009/10	Cosecha 2010/11
Balcarce	335,8	409,5
Miramar	284,5	403
La Dulce	240	336
Barrow	259,3	391,2
Cabildo	202	124
Bordenave	352	236
Pierres	318,5	356

En las campañas 2009 y 2010, los germoplasmas de trigo candeal, provenientes de la localidad de La Dulce y Pierres, respectivamente, presentaron una muy baja incidencia de *F. graminearum*, esto podría ser explicado por las condiciones climáticas, específicamente por las precipitaciones que durante ambas campañas fueron escasas. *Fusarium graminearum* es un patógeno que necesita de condiciones climáticas específicas para desarrollarse; temperaturas que oscilen entre los 20 y 30°C y periodos de elevada humedad relativa ambiente, superior al 80%. Por lo tanto, si estas condiciones no eran las prevalentes previo al momento de la floración, el hongo no desarrolla y no está presente para comenzar la infección. Además, las condiciones de humedad y temperaturas cálidas, favorecen el desarrollo y maduración de los peritecios que son una de las principales fuentes de inóculo (Trail y col., 2002). En 2008/2009 las precipitaciones alcanzaron una media de 123,8 mm durante el periodo julio-octubre y durante la campaña 2009/2010 el promedio de lluvias durante el mismo periodo alcanzó los 117,7 mm.

En Argentina, varias epidemias han ocurrido en los años 1963, 1976, 1978, 1985 (Moschini y col., 2004) y 2001 (Carranza y col., 2008), en la principal zona de producción de trigo candeal. En dichos años las lluvias promedio en el periodo julio-octubre (periodo de floración) variaron entre 238 y 386,1 mm.

Durante los años analizados en el presente trabajo, las condiciones ambientales en la región no han sido predisponentes para la enfermedad. Moschini y col. (2007a) analizaron la tendencia general en los niveles de la FET en Pergamino y compararon la ocurrencia de epidemias desde 1931 hasta 1969 versus el periodo 1970-2007. Para ello utilizaron un modelo predictivo basado en datos diarios de temperatura máxima y mínima y

precipitaciones. Ellos observaron que a partir de 1970 existe una tendencia negativa de ocurrencia de la enfermedad, impulsada por los niveles menores de incidencia de la FET desde el 2001. También llevaron a cabo otro estudio en la zona sur de la región pampeana, donde se cultiva el trigo fideo, para analizar el efecto de la variabilidad climática (antropogénica y natural) sobre la FET, durante la serie climática 1971-2006. A su vez, desdoblaron esta serie en dos periodos de 18 años: 1971/88 y 1989/06. En la serie climática 1989/2006 se observó una disminución de los niveles de incidencia de la FET mientras que para la serie 1971-1988 la variabilidad climática no fue regular ni respondió a un patrón espacial definido y homogéneo (Moschini y col., 2007b).

Diferentes autores han informado, en coincidencia con nuestro trabajo, el aislamiento de especies tales como *F. equiseti* y *F. proliferatum* a partir de granos de trigo. Ramírez y col. (2006b) encontraron que durante un año no conductivo para la fusariosis, las principales especies aisladas de trigo pan fueron *F. proliferatum* y *F. verticillioides*. *Fusarium proliferatum* es uno de los principales patógenos de maíz y uno de los responsables de la contaminación con fumonisinas en dicho cereal (Chulze y col., 1996), también se lo ha descrito como el causante de una enfermedad en el trigo llamada escudete negro. Los síntomas característicos son la coloración de marrón a negro del embrión del grano de trigo. Esta enfermedad ocasiona pérdidas en el rendimiento y harina de baja calidad (Rees y col., 1984; Lorenz, 1986; Conner y col., 1996). Otro problema asociado a la presencia de este patógeno en los granos de trigo podría ser la potencial contaminación de los mismos con fumonisinas (Desjardins y col., 2007).

Por otro lado, *Fusarium equiseti* es frecuentemente aislado de un amplio rango de sustratos como suelo, raíces de frutales y restos vegetales (Booth, 1971; Bosch y Mirocha, 1992). También ha sido aislado de cereales como cebada, soja (Barros y col., 2011), trigo pan y trigo candeal, generalmente como patógeno secundario de la FET. En Argentina, también ha sido aislado de granos de trigo pero siempre en baja proporción (<2%) (Lori y Sisterna, 2001; González y col., 2008). Kosiak y col. (2004) encontraron una muestra de cebada altamente contaminada con esta especie (67%) mientras que en trigo pan y trigo candeal no superó el 25% de infección. En Nepal, Desjardins y col. (2000) aislaron a partir de 27 muestras de trigo, *F. equiseti* en una frecuencia del 52%, seguido por *F. proliferatum* en un 37%. Este patógeno secundario está asociado a la producción de toxinas tales como 4-acetilnivalenol (FUS-X), 15-Ac-NIV, nivalenol (NIV), scirpentriol (SCIRP) y sus mono y diacetil derivados (MAS y DAS). También puede producir toxinas no pertenecientes a la familia de los tricotecenos, tales como zearalenona (ZEA), equisetina (EQ), butenolida y

fusarocromanona (FUSCHR) (Thrane, 1989; 2001; Wu y col., 1990; Langseth y col., 1999; Morrison y col., 2002).

Estos resultados son de gran importancia ya que sugieren que los granos de trigo podrían estar contaminados con otras micotoxinas, además de DON, producidas por las especies de *Fusarium* aisladas con alta frecuencia en este trabajo.

IV.2. Determinación de la incidencia natural de deoxinivalenol y nivalenol en granos de trigo candeal

Las muestras de germoplasmas comerciales y experimentales cosechadas en 2009 presentaron contaminación natural con nivalenol y deoxinivalenol. Nivalenol se presentó en el 54% de las muestras, en niveles que fluctuaron entre 132,16 y 925,62 µg/kg. Mientras que DON también se encontró en el 54% de las muestras en niveles que variaron desde 54,5 a 3860 µg/kg. No hubo diferencias significativas ($P < 0,005$) en el contenido de ambas toxinas entre germoplasmas comerciales y experimentales, salvo en un germoplasma comercial (BIFAC) que presentó el mayor nivel detectado de DON (Figura IV.4, Anexo Tabla IV.1). Por el contrario, en las muestras obtenidas durante 2010 en la localidad de Pieres, no se detectó la presencia de estas toxinas, esto coincide con la ausencia de *F. graminearum* en las muestras de ese año. Las diferentes muestras de germoplasmas comerciales y experimentales de la cosecha 2011 de la localidad de Pieres, presentaron contaminación natural solo con deoxinivalenol. El 25% de las mismas fueron positivas para esta toxina con niveles que variaron entre 142,9 y 355 µg/kg (Figura IV.4, Anexo Tabla IV.1).

A partir de las muestras obtenidas en la cosecha 2011, que provenían de distintas localidades de la zona triguera de candeal, se decidió analizar el comportamiento de los distintos germoplasmas comerciales y ver si existe influencia de la región donde se lo siembra. El 62,5% de las muestras presentaron contaminación natural con DON, en niveles que variaron entre 139,09 y 2833,02 µg/kg. El 100% de las muestras obtenidas en las localidades de Miramar (n=5), La Dulce (n=5) y Balcarce (n=5) presentaron contaminación con deoxinivalenol en niveles que variaron entre 224 y 2833 µg/kg, mientras que el 100% de las muestras obtenidas en la localidad de Bordenave (n=5) fueron negativas para esta toxina. Con respecto a las restantes localidades, tanto Barrow (n=6) como Cabildo (n=3) presentaron 3 y 2 muestras positivas, respectivamente (Figura IV.5). En la figura IV.6 se

puede observar el comportamiento frente a la acumulación de DON, de las variedades comerciales de trigo candeal, independientemente del lugar donde se sembraron.

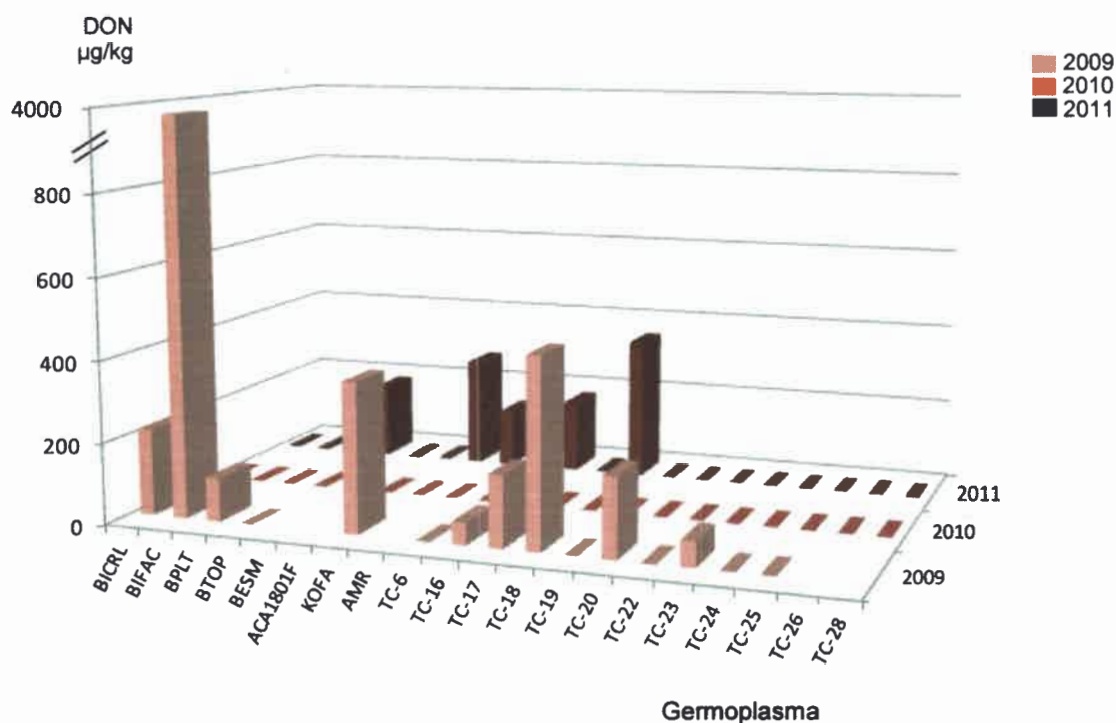


Figura IV.4: Concentración de deoxinivalenol en germoplasmas comerciales y experimentales de trigo candeal durante tres cosechas consecutivas.

El germoplasma ACA1901F fue el que mayor acumulación de DON presentó con un nivel medio de 929,89 µg/kg, que fue significativamente mayor ($p \leq 0,05$) que el resto, seguido por BESM y BTOP con niveles medios de 324,91 y 299,15 µg/kg, respectivamente. Para ver el efecto de la región sobre la acumulación de DON, se seleccionaron 4 germoplasmas que habían presentado diversos niveles de contaminación con DON. Se puede ver en la figura IV.7 que tanto ACA1901F como BESM presentaron contaminación con la toxina en las tres regiones donde fueron sembrados. Si bien, en general, los niveles encontrados no fueron elevados, la variedad ACA1901F presentó un nivel de contaminación con DON de 1934,15 µg/kg en la región Sudeste, siendo esta la región donde mayores niveles se encontraron y difirió significativamente ($p \leq 0,05$) del resto, en contraste con la región del Sudoeste donde se detectaron los niveles más bajos y muestras no contaminadas (Figura IV.8).

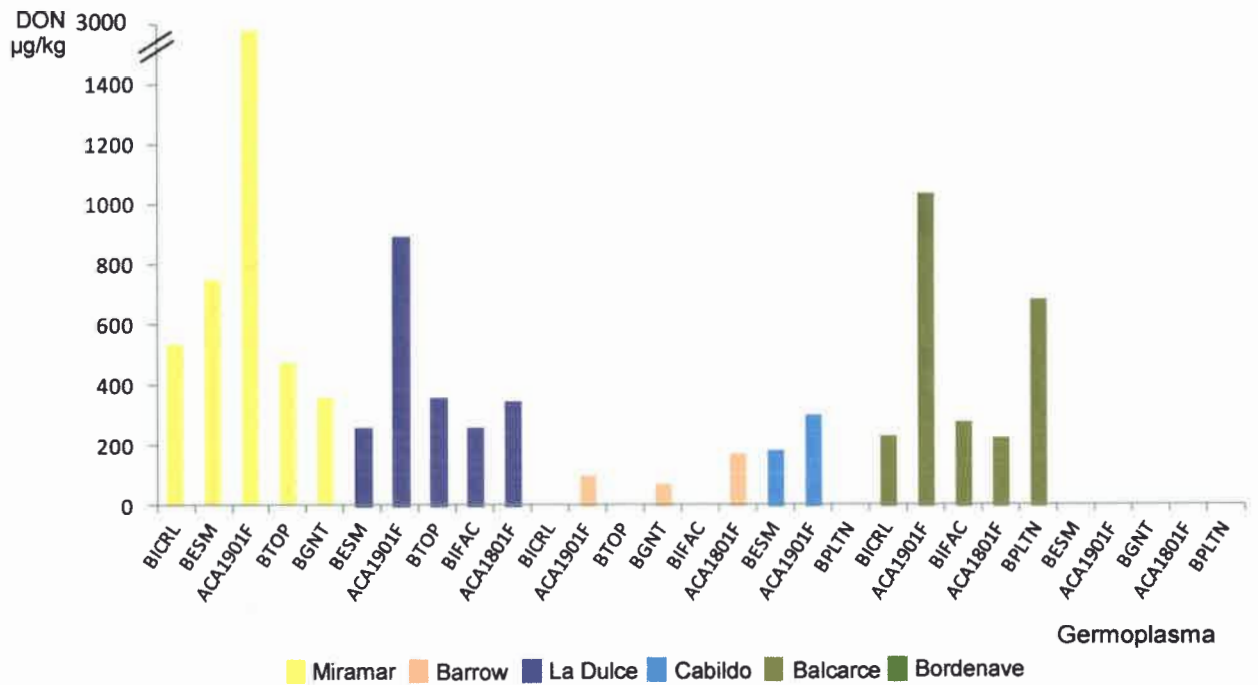


Figura IV.5: Contaminación con deoxinivalenol de germoplasmas comerciales de trigo candeal obtenidos de distintas localidades al sur de la Provincia de Buenos Aires.

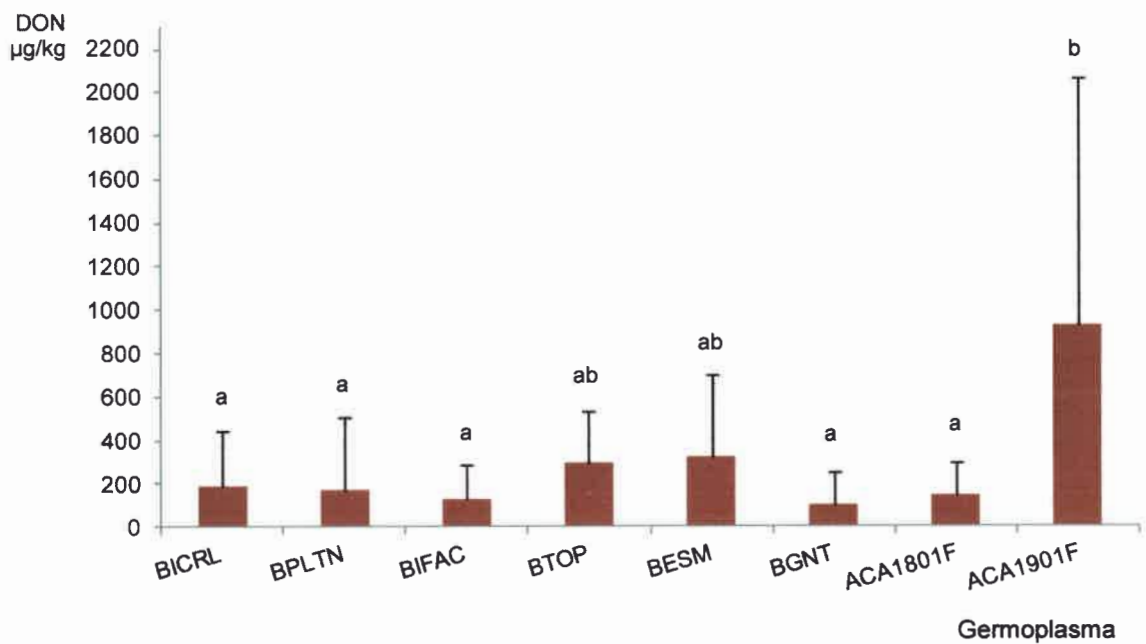


Figura IV.6: Contaminación con deoxinivalenol de germoplasmas comerciales de trigo candeal. Letras distintas indica diferencias significativas ($p < 0.05$) entre germoplasmas.

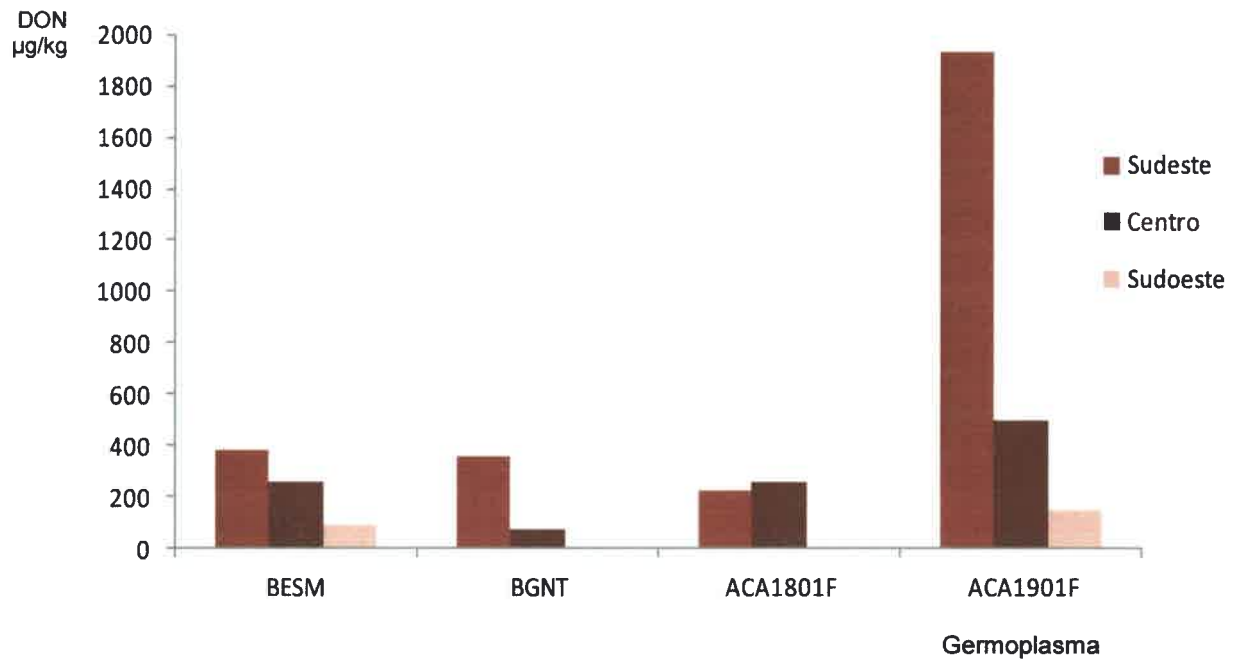


Figura IV.7: Contaminación con deoxinivalenol de germoplasmas comerciales de trigo candeal según la región donde se sembraron. Letras distintas indica diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre regiones. Sudeste: Balcarce, Miramar y Pieres; Centro: La Dulce y Barrow; Sudoeste: Cabildo y Bordenave.

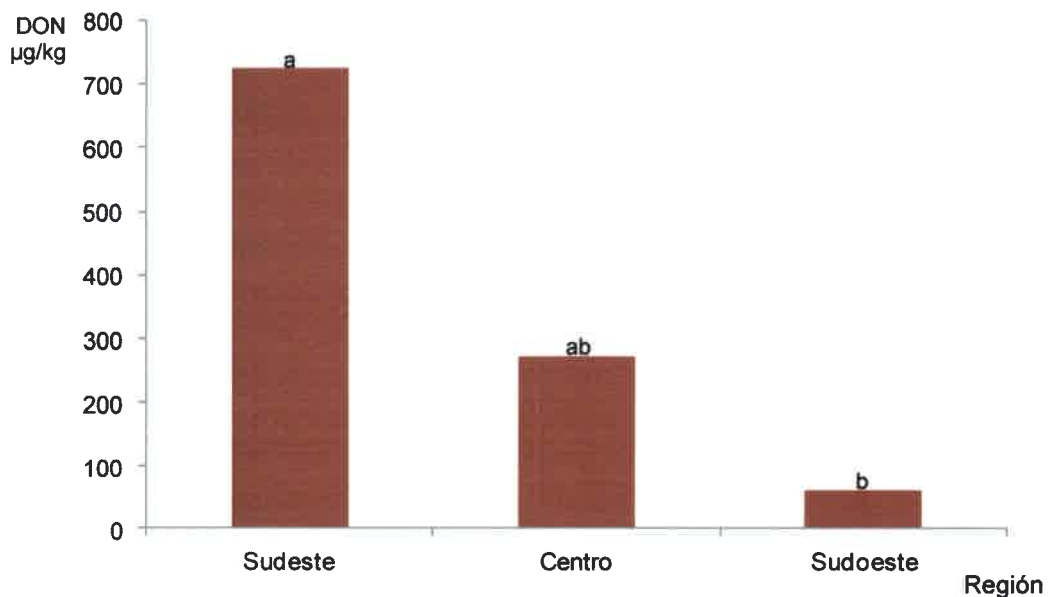


Figura IV.8. Niveles de contaminación con deoxinivalenol por región de siembra del trigo candeal. Letras distintas indica diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre regiones.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Lori y col. (2003) quienes llevaron a cabo un estudio sobre la presencia de *F. graminearum* y la contaminación con deoxinivalenol en granos de trigo candeal del sur de la provincia de Buenos Aires. Ellos encontraron que todas las localidades analizadas (Miramar, La Dulce, Balcarce, Barrow y Bordenave), a excepción de Bordenave, presentaban trigos con niveles de DON, llegando en algunos casos a los 8000 µg/kg. Ellos observaron que los niveles de DON y la infección por *F. graminearum* disminuía de este (Balcarce) a oeste (Bordenave), atribuyendo este cambio a las condiciones climáticas prevalentes en cada zona, ya que Miramar y Balcarce se encuentran en una zona húmeda, cercana al mar y Bordenave presenta un clima seco que no favorece la infección por *F. graminearum*. Las condiciones climáticas prevalentes durante el periodo de floración son un factor importante al momento de la infección por este hongo y por lo tanto para la producción de toxinas. Las epidemias severas se producen cuando la floración y las primeras etapas de formación del grano, coinciden con períodos de precipitaciones o llovizna frecuente y humedad relativa elevada y continua (superior a 80%) (Gilbert y Fernando, 2004).

La Comunidad Europea en 2006 estableció límites que regulan la concentración de DON permitida en cereales sin procesar, para trigo duro este límite fija una cantidad de 1750 µg/kg (Comisión Europea, 2006). En el presente trabajo solo 2 muestras superaron este valor, la variedad comercial BIFAC que presentó una contaminación de aproximadamente 4000 µg/kg en la campaña 2008/09, y la variedad ACA 1901F que presentó una contaminación de 2883 µg/kg cuando fue sembrada en Miramar durante la campaña 2010/11.

En Argentina, existen varios reportes de la presencia natural de DON y NIV en granos de trigo candeal y trigo pan. González y col. (1999) analizaron 60 muestras de trigo duro por TLC de las cuales 27 fueron positivas para DON, los niveles encontrados variaron desde 26 a 6400 µg/kg. Ellos encontraron una relación positiva entre la frecuencia de aislamiento de *F. graminearum* y la concentración de DON en la muestra. En otro estudio, González y col. (2008), buscando la presencia de distintas toxinas del género *Fusarium* en trigo pan por cromatografía gaseosa, observaron que solo una muestra estaba contaminada con NIV en una concentración de 50 µg/kg mientras que el 85% de las muestras estaban contaminadas con DON en niveles que variaron entre 7 y 2788 µg/kg, con una media de 450,7 µg/kg. Por otro lado, Fernández Pinto y col. (2008) analizando 19 muestras de trigo pan, encontraron que 15 de ellas fueron positivas para DON en niveles que variaron desde 30 a 70.000 µg/kg, y que solo 2 fueron positivas para NIV en concentraciones de 50 y 100 µg/kg. Los niveles de

DON encontrados en el presente trabajo, coinciden parcialmente con los encontrados en los estudios descritos anteriormente. Cabe destacar que en el presente trabajo se encontró un mayor número de muestras contaminadas con NIV y en niveles mayores a los reportados por otros autores en trigo en Argentina. Esto podría deberse a la presencia en las muestras de especies productoras de esta toxina como *F. equiseti* y *F. poae* (Bottalico, 1998; Morrison y col., 2002).

A nivel mundial, en Italia durante un programa de monitoreo en 1998-2008 sobre la ocurrencia de DON en trigo pan y trigo duro, se observó que las muestras provenientes del norte del país estaban más contaminadas que las del centro y sur, siendo las muestras de trigo duro las que presentaron mayores niveles de toxina, hasta 6465 µg/kg mientras que el trigo pan presentó niveles de hasta 3010 µg/kg. Al sur del país, las muestras de trigo duro presentaron niveles desde 300 a 800 µg/kg (Pascale y col., 2002; Gallo y col., 2008; Visconti y Pascale, 2010). Por otro lado, en Dakota del Norte, Estados Unidos, se detectó la ocurrencia de DON en muestras de trigo duro en un rango desde no detectado hasta 23000 µg/kg mientras que NIV no se detectó en ninguna muestra (Manthey y col., 2004). Recientemente, Benassi y col. (2010), en Túnez, encontraron que el 100% de 65 muestras de trigo candeal cosechadas en 2007, fueron positivas para DON por HPLC-UV, en niveles desde 7200 a 54000 µg/kg, por lo tanto todas las muestras excedían el límite fijado por la Comunidad Europea. El clima de Túnez, al ser un país Mediterráneo, favorece el desarrollo fúngico y la acumulación de micotoxinas. En 2007, las abundantes lluvias, la consecuente falta de secado de los granos durante la cosecha y las temperaturas fueron los principales factores que favorecieron la contaminación por *Fusarium* y la producción de DON.

La baja incidencia natural de DON durante las tres cosechas analizadas en este estudio puede deberse a que las precipitaciones que se dieron en las diferentes localidades no fueron las suficientes para favorecer un buen desarrollo del hongo y la consecuente producción de toxinas. Sin embargo, en aquellas localidades donde las lluvias fueron mayores, se encontraron niveles de deoxinivalenol en las muestras (Tabla IV.1).

IV.3. Determinación de la incidencia natural de fumonisinas en granos de trigo candeal

Debido a la alta frecuencia de aislamiento de *F. proliferatum* en las muestras de la campaña 2008/2009, y que en el laboratorio ya se había informado la misma situación en muestras de trigo candeal cosecha 2007/2008 (Farnochi y col., 2011), en conjunto con las

investigaciones llevadas a cabo por Desjardins y col. (2007), quienes sugirieron que el trigo podría ser una fuente potencial de contaminación con fumonisinas, se decidió evaluar la presencia de estas micotoxinas en muestras de trigo candeal de ambos períodos.

De un total de 30 muestras de trigo candeal provenientes de la campaña 2007/08, 29 (97%) fueron positivas para fumonisinas (B_1 y B_2) por HPLC-FD. El nivel de estas toxinas varió desde 10,5 a 1245,7 ng/g, solo una muestra fue superior a 1000 ng/g. El nivel de FB_1 varió desde 10,5 a 987,2 ng/g y el nivel de FB_2 varió desde 15 a 258,5 ng/g. La proporción FB_2/FB_1 varió desde 0,156 a 2,333. Cuatro muestras tuvieron más FB_2 que FB_1 , 3 muestras mostraron contaminación solo con FB_1 y 5 muestras mostraron niveles similares de ambas toxinas (Tabla IV.2). La presencia de FB_1 fue confirmada por HPLC-MS/MS. En la campaña 2008/09, de 25 muestras, solo 6 fueron positivas para FB_1 , confirmadas por HPLC MS/MS. Tres de ellas presentaron niveles de FB_1 entre 0,021 y 0,048 ng/g mientras que las otras tres presentaron solo trazas de toxinas (concentraciones entre el límite de detección, 0,01 ng/g y el límite de cuantificación 0,05 ng/g). Se realizó una comparación entre ambas cosechas y se detectaron diferencias significativas ($p \leq 0,005$) en cuanto al contenido de fumonisinas, también se encontró una correlación positiva ($R= 0,5$, $p \leq 0,0001$) entre el promedio de lluvias de los 2 años y los niveles de fumonisinas presentes en los granos. El hecho de que solo se encontraran fumonisinas en los granos de la cosecha 2007/08 puede explicarse por diferencias en la cantidad de lluvias durante las 2 cosechas. Los valores promedios de lluvias registrados desde julio a octubre fue de 332 y 124 mm para 2007 y 2008, respectivamente. Esta diferencia se debió a que el sur de la provincia de Buenos Aires sufrió durante el 2008 una gran sequía (Borda, 2009). Existen varios informes en la bibliografía sobre contaminación natural con fumonisinas de granos de trigo o de productos a base de trigo como pastas y también en especies relacionadas. En España, Castellá y col. (1999) estudiaron la incidencia natural de FB_1 y FB_2 en 17 muestras de trigo por HPLC y confirmaron estos resultados por LC/MS. Ellos encontraron que 8 de las 17 muestras presentaron FB_1 en niveles desde 200 a 8800 ng/g. En otro estudio llevado a cabo por Cirillo y col. (2003a) en Italia, se detectó la presencia de FB_2 en 17 muestras de pastas a base de trigo candeal, en un rango de 80 a 790 ng/g. La determinación se realizó por LC-MS. También en Italia, Castoria y col. (2005) reportaron la incidencia natural de FB_1 y FB_2 por HPLC-MS, en 5 de 8 muestras de Farro (*Triticum monococcum* L., *Triticum dicoccon* Schrank and *Triticum spelta* L.), en niveles de hasta 70 ng/g para FB_1 y FB_2 se encontró por debajo del nivel de cuantificación. Kushiro y col. (2009) encontraron contaminación natural de FB_1 en 1 de 47 muestras de trigo recolectadas en distintas zonas de Japón, por LC-MS/MS, a nivel

de trazas (entre el límite de detección y el límite de cuantificación). Los niveles de fumonisinas encontrados durante el presente trabajo son comparables con los niveles detectados en los trabajos mencionados anteriormente. Debido a que los métodos no cromatográficos generalmente pueden producir falsos positivos (Shephard y col., 2005), y que la detección de fumonisinas en trigo o sub-productos suele ser cuestionada, requiriendo una evaluación de los métodos analíticos a utilizar y la confirmación mediante métodos apropiados (Visconti y Pascale, 2010), en este trabajo utilizamos HPLC con posterior confirmación de muestras positivas por LC-MS/MS. Este es, a nuestro entender, el primer informe de fumonisinas en granos de trigo candeal en Argentina.

IV.4. Caracterización de la población de *Fusarium proliferatum* aislada de trigo candeal

IV.4.1. Estudio de la variabilidad genética de la población de *Fusarium proliferatum*

El análisis filogenético realizado a partir de la secuenciación de los genes calmodulina y factor de elongación 1 alfa de cepas de *F. proliferatum* identificadas morfológicamente, dio como resultado la separación de las mismas en 2 clados bien definidos (I y II) (99% de soporte) (Figura IV.9). El clado I incluyó a todas las cepas de la especie *F. proliferatum* junto con la cepa patrón (ITEM 7596) mientras que el clado II incluyó a cepas de *F. verticillioides* junto con las cepas patrones (ITEM 7581 e ITEM 7583). Esta aparición de cepas de *F. verticillioides* se debe a una incorrecta identificación morfológica de las mismas, ya que ambas especies pertenecen a la sección *Liseola* y son similares morfológicamente. Ambas presentan microconidios dispuestos en falsas cabezas y cadenas, con la diferencia que en *F. verticillioides* estas cadenas pueden ser de mayor longitud. La principal característica que los diferencia es la presencia de polifialides en *F. proliferatum* (Leslie y Summerell, 2006). Por décadas estas 2 especies fueron consideradas una sola, *F. moniliforme*, sin embargo con el tiempo se fueron viendo diferencias morfológicas, diferencias en la variedad de huéspedes a los que infectan y diferencias a nivel de especie biológica, que permitieron separarlas en las actuales especies *F. proliferatum* y *F. verticillioides* (Proctor y col., 2010).

Dentro del clado I, se pueden ver subclados, sin embargo estos grupos de cepas de *F. proliferatum* no están agrupadas de acuerdo a su origen geográfico, no están relacionadas por el año en el cual fueron aislados, ni tampoco se agrupan en función del huésped ya que las cepas originarias de maíz se encuentran distribuidas a lo largo del árbol junto con las cepas aisladas de trigo. Esta separación en subclados puede deberse a una variabilidad

genética propia de la especie. Diversos estudios filogenéticos utilizando cepas de distinto origen geográfico y aisladas de distintos huéspedes confirman una alta diversidad dentro de *F. proliferatum* (Desjardins, 2003).

Tabla IV.2. Concentración de fumonisinas en muestras de trigo candeal cosecha 07/08

Muestra	Concentración (ng/g)			Fumonisinas totales (ng/g)
	FB ₁	FB ₂	FB ₂ /FB ₁	
1	300,0	82,0	0,273	382,0
2	79,0	31,0	0,39	110,0
3	58,0	27,0	0,46	85,0
4	39,6	35,8	0,90	75,4
6	56,3	33,1	0,58	89,4
7	288,1	179,9	0,62	468,0
8	10,5	nd	-	10,5
9	75,7	20,6	0,27	96,3
10	399,6	84,8	0,21	484,4
11	36,1	30,8	0,85	66,9
12	16,2	19,1	1,17	35,3
13	12,0	28,0	2,33	40,0
14	18,3	nd	-	18,3
15	12,7	17,1	1,34	29,8
16	13,4	12,9	0,96	26,3
17	13,2	16,7	1,26	29,9
18	48,0	21,3	0,44	69,3
19	980,2	258,5	0,26	1245,7
20	nd	nd	-	nd
21	19,7	nd	-	19,7
22	241,9	82,9	0,34	324,8
23	721,8	204,6	0,28	926,4
24	70,4	25,1	0,35	95,5
25	786,9	137,8	0,17	924,7
26	307,3	47,9	0,15	355,2
27	18,8	19,7	1,04	38,5
28	599,8	141,8	0,23	741,6
29	14,0	15,9	1,13	29,9
30	372,0	92,4	0,24	464,4

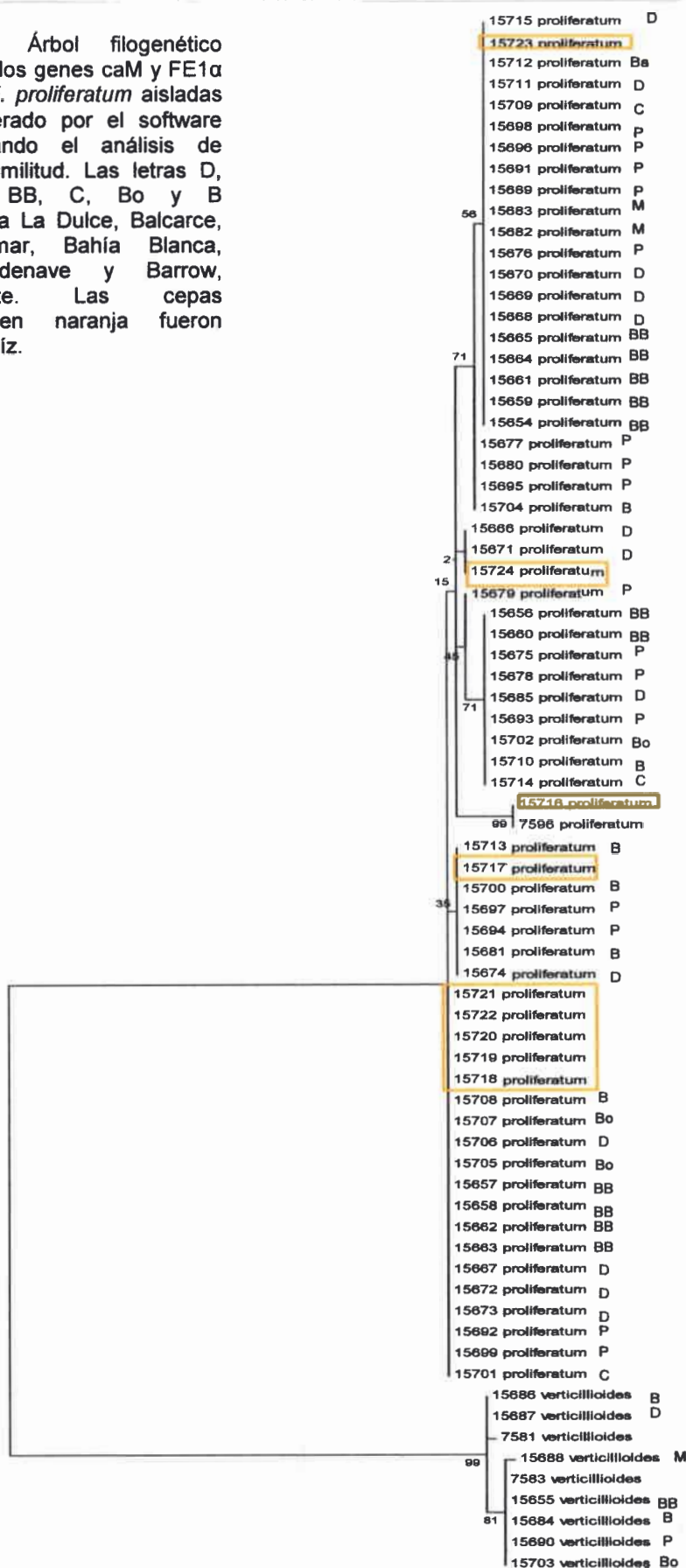
nd, no detectado, < 10 ng/g para FB₁ y <15 ng/g para FB₂

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por diversos autores. Jurado y col. (2010) realizaron un estudio de la secuencia del gen FE 1 alfa a partir del cual se dedujeron relaciones filogenéticas entre cepas de *F. proliferatum* aisladas de distintos huéspedes y de distinto origen geográfico. Ellos observaron una alta variabilidad intraespecífica en este hongo basada en el porcentaje de divergencia nucleotídica que fue de 3,6% comparado con la de *F. verticillioides* que fue de 0,06%. Además, el clado principal donde se agrupaban todas las cepas de *F. proliferatum* se separó a la vez en subclados, sin embargo tampoco lograron asociarse por origen geográfico ni por huésped. Asimismo observaron que las cepas aisladas de maíz se distribuyeron a lo largo de todo el clado principal, incluso cepas aisladas del mismo campo se separaron en distintos subclados.

Por otra parte, Stepien y col. (2011) utilizaron 38 cepas de *F. proliferatum* aisladas de distintos huéspedes y realizaron un estudio filogenético utilizando los genes FE 1 alfa y FUM1. Nuevamente, se vio que utilizando el gen FE 1 alfa, las cepas no se separaron en grupos dependiendo del origen geográfico ni del huésped. Sin embargo, con el gen FUM1 se vio una separación por huésped, aquellas cepas originarias de plantas tropicales y subtropicales se agruparon mientras que las provenientes de ajo formaron un grupo aparte al igual que las aisladas de espárragos. Pero junto con estas últimas agruparon las oriundas de maíz. Ellos atribuyen esto a la amplia distribución del cultivo de maíz y a la asociación de este sustrato con dicha especie, a partir del cual puede llegar a otros huéspedes.

Por último, von Bargen y col. (2009), realizaron un estudio de diversidad genética de cepas de *F. proliferatum* aisladas de espárragos en Austria y Alemania por RAPD y DAF (DNA Amplification Fingerprinting). Dichos autores encontraron 14 grupos con distinto patrón de fingerprinting, lo que demostró lo heterogénea que es esta especie, incluso cepas aisladas de la misma planta se agruparon en forma diversa. En este estudio, tampoco los grupos se correspondieron con el origen geográfico, ni con el año de aislamiento ni la variedad de espárrago.

Figura IV.9: Árbol filogenético combinado de los genes caM y FE1α de cepas de *F. proliferatum* aisladas de trigo, generado por el software MEGA, utilizando el análisis de máxima verosimilitud. Las letras D, Ba, P, M, BB, C, Bo y B corresponden a La Dulce, Balcarce, Pieres, Miramar, Bahía Blanca, Cabildo, Bordenave y Barrow, respectivamente. Las cepas remarcadas en naranja fueron aisladas de maíz.



En cuanto a la secuenciación del gen FUM8, todas las cepas, tanto de *F. proliferatum* como las de *F. verticillioides*, presentaron amplificación de este gen, lo que significaría que todas tienen la capacidad potencial de producir fumonisinas. Recientemente, genes y otras secuencias involucradas en el metabolismo secundario han ganado importancia en los estudios filogenéticos ya que se los puede utilizar en estudios combinados para el diagnóstico de especies productoras de micotoxinas (Proctor y col., 2009). Por lo tanto, genes del cluster de biosíntesis de las fumonisinas pueden ser utilizados en análisis filogenéticos de especies de *Fusarium* productoras de fumonisinas. En este estudio se utilizó el gen FUM8, que codifica para una α -oxoamino sintasa. Nuevamente, se obtuvo como resultado una clara separación de las especies en dos clados. El clado I formado por las cepas de *F. proliferatum* y el clado II formado por las cepas de *F. verticillioides*. El clado I se dividió en subclados pero nuevamente estos clados no se agruparon en función del huésped, origen geográfico o año de aislamiento. Von Bargen y col. (2009), en el mismo estudio, realizaron un análisis filogenético de cepas de *F. proliferatum* y de otras especies dentro del complejo *Giberella fijiikuroi* utilizando los genes FUM1 y FUM8 y vieron que los aislados se separaban claramente por especie, logrando diferenciar *F. proliferatum* de *F. verticillioides* entre otras.

La presencia de *F. verticillioides* en granos de trigo candeal no es de menor importancia ya que esta especie es productora de micotoxinas, entre ellas, fumonisinas. Por lo tanto sería importante continuar con estudios de incidencia de *F. proliferatum* y *F. verticillioides* en trigo candeal ya que en los últimos años han comenzado a aparecer como especies emergentes como consecuencia del cambio climático (Tirado y col., 2010), y también continuar con estudios de las poblaciones, ya que si el problema persiste en el tiempo se deberán desarrollar cultivares resistentes a estas especies productoras de fumonisinas. Para ello es de gran importancia conocer cómo se comportan las poblaciones en los cultivos con el fin de poder predecir posibles adaptaciones del patógeno a nuevas prácticas agrícolas o cultivares y determinar el flujo de genes entre las poblaciones debido a la reproducción sexual.

IV.4.2. Determinación del tipo de apareamiento de las cepas de *Fusarium proliferatum* por amplificación de genes MAT

Todas las cepas de *F. proliferatum* y las de *F. verticillioides* evaluadas presentaron uno de los alelos MAT-1 y MAT-2. La proporción de ambos alelos para *F. proliferatum* se puede ver en la Tabla IV.3, mientras que para las 6 cepas de *F. verticillioides* la proporción fue de 5:1 respectivamente.

Tabla IV.3. Tipo de apareamiento de las cepas de *F. proliferatum* aisladas de trigo

Año de aislamiento	Tipo de apareamiento
2008	MATD-1 (4)
	MATD-2 (1)
2009	MATD-1 (4)
	MATD-2 (5)
2010	MATD-1 (4)
	MATD-2 (6)
2011	MATD-1 (12)
	MATD-2 (13)

Teniendo en cuenta las proporciones en las que se encuentran cada alelo de la población de *F. proliferatum* se podría decir que existe una alta probabilidad de ocurrencia de reproducción sexual, sin embargo para confirmar esto se deberían llevar a cabo más estudios.

IV.4.3. Determinación de la capacidad toxicogénica de cepas de *Fusarium proliferatum* en granos de trigo candeal

Se analizó la capacidad de 51 cepas de *F. proliferatum* y 6 cepas de *F. verticillioides*, de producir fumonisinas en granos de trigo candeal. Cuarenta y nueve cepas de *F. proliferatum* produjeron fumonisinas en niveles que variaron entre 1,1 y 2072,4 µg/g (media = 165,19

µg/g), mientras que las 6 cepas de *F. verticillioides* fueron capaces de producir estas toxinas en niveles que variaron entre 30,10 y 301,10 µg/g (Anexo Tabla IV.2). Las 49 cepas de *F. proliferatum* produjeron FB₁ en niveles que variaron entre 0,6 µg/g y 1616 µg/g (media = 102,79 µg/g) y FB₂ en niveles que variaron entre 0,5 µg/g y 381,75 µg/g (media = 46,61 µg/g), mientras que 43 cepas produjeron FB₃ en niveles que variaron entre 0,5 µg/g y 151,95 µg/g (media = 15,79 µg/g). Siete cepas de *F. proliferatum* produjeron más FB₂ que FB₁ y 11 cepas produjeron más FB₃ que FB₂. Por otro lado, las cepas de *F. verticillioides* fueron capaces de producir las tres fumonisinas en niveles que variaron entre 18,5 y 97,65 µg/g (media = 40,53 µg/g) para FB₁, 3,2 y 43,50 µg/g (media = 19,54 µg/g) para FB₂ y 8,4 y 159,95 µg/g (media = 51,64 µg/g) para FB₃. Tres cepas de *F. verticillioides* produjeron más FB₃ que FB₁. Teniendo en cuenta los niveles de producción de fumonisinas totales de las cepas de ambas especies se puede ver que la mayoría de las cepas produjeron niveles entre 50 y 200 µg/g mientras que 18 cepas produjeron fumonisinas por debajo de los 50 µg/g, 9 cepas lo hicieron entre 200 y 500 µg/g y solo 2 por encima de los 500 µg/g (Figura IV.10). Los informes de producción de fumonisinas por cepas de *F. proliferatum* aisladas de trigo son escasos. Desjardins y col. (2007) probaron la capacidad de 9 cepas de *F. proliferatum* aisladas de trigo de producir fumonisinas en granos de maíz, los niveles obtenidos variaron entre 48 y 1060 µg/g. También probaron la capacidad de estas cepas de producir fumonisinas en espigas de trigo luego de ser inoculadas y vieron que la producción alcanzó un máximo de 140 µg/g. Por otro lado, Castellá y col. (1999) analizaron la producción de fumonisinas en granos de maíz por 2 cepas de *F. proliferatum* aisladas de trigo y encontraron que ambas cepas produjeron las toxinas en niveles que variaron entre 31,5 y 3247 µg/g.

En el presente trabajo, algunas cepas de *F. proliferatum* atípicas produjeron más FB₂ que FB₁ o más FB₃ que FB₂, y 3 cepas de *F. verticillioides* produjeron más FB₃ que FB₁. Resultados similares fueron obtenidos por Chulze y col. (1996) analizando la producción de fumonisinas por cepas de *F. proliferatum* aisladas de maíz, donde vieron que algunas de ellas producían más FB₂ que FB₁. También hubo 2 cepas no productoras de fumonisinas. Distintos trabajos han dado una posible respuesta a la existencia de estas cepas con fenotipo no productor. Cepas de *F. verticillioides* no productoras pueden deberse a una inactivación de tres genes FUM: FUM1, FUM6 y FUM8, los tres codifican para enzimas involucradas en la biosíntesis de estas toxinas (Proctor y col., 1999; Seo y col., 2001). Proctor y col. (2006) trabajando con cepas de *F. verticillioides* no productoras de fumonisinas vieron que este fenotipo no productor se debía a una mutación puntual en el gen FUM1 que

introducía un codón de stop. En el presente estudio, cuando se realizó la amplificación del gen FUM8 todas las cepas mostraron productos de amplificación del gen, por lo tanto se considera que la incapacidad de producir fumonisinas de estas cepas puede deberse a alteraciones en otros genes del cluster.

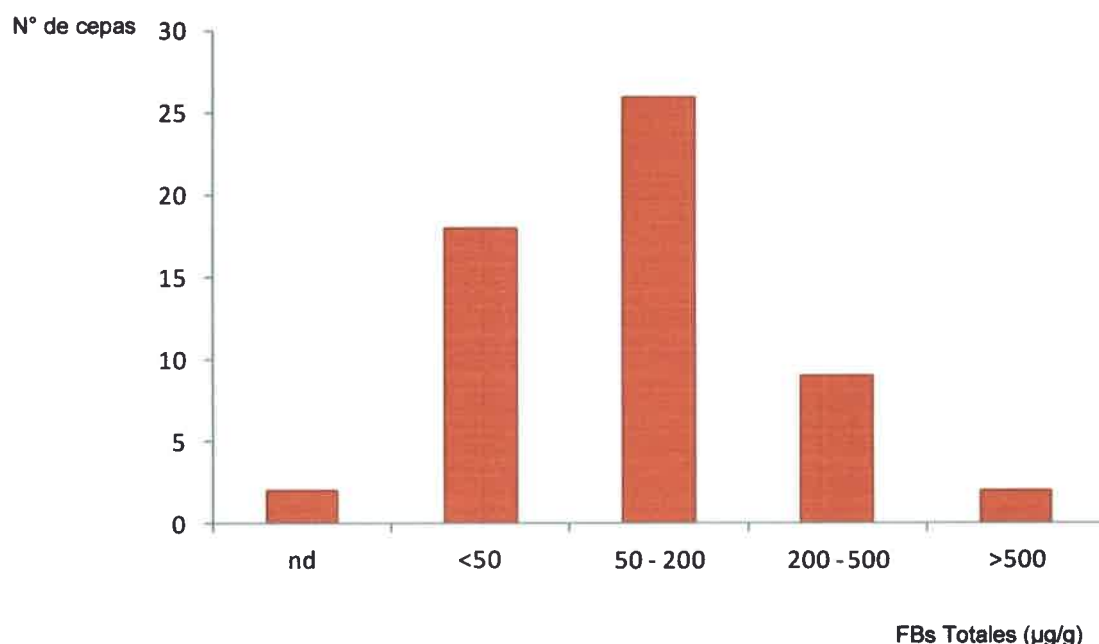


Figura IV.10: Producción de fumonisinas totales (FB₁ + FB₂ + FB₃) por cepas de *Fusarium proliferatum* aisladas de trigo candeal

IV.5. Caracterización de cepas de *Fusarium graminearum* aisladas de trigo candeal en Argentina

IV.5.1. Evaluación de la diversidad genética de cepas de *F. graminearum* aisladas de trigo candeal a través del uso de marcadores neutros, Secuencias Intergénicas Simples Repetidas (ISSRs)

Para la optimización del protocolo del marcador molecular ISSR se evaluaron cepas de referencia pertenecientes al complejo de especies de *F. graminearum* y cepas de referencia de *Fusarium* similares morfológicamente a *F. graminearum*.

Los 5 cebadores utilizados en el presente estudio fueron evaluados por su capacidad de producir patrones de bandas polimórficas y reproducibles en las diferentes cepas de *Fusarium*. El cebador ISSR 1 [(GAG)5CAG] generó bandas muy débiles. Los cebadores ISSR 6 [CTC(GT)8], ISSR 7 [AG(CTC)5], ISSR 8 [CT(GA)8] e ISSR 10 [(GA)8C] presentaron buenos resultados ya que los patrones de bandas obtenidos fueron polimórficos y permitieron su análisis. Estos últimos 4 cebadores se seleccionaron para analizar la variabilidad genética en cepas de *F. graminearum* aisladas de trigo candeal.

La reproducibilidad de las bandas amplificadas con estos 4 cebadores se confirmó al menos dos veces obteniéndose idénticos resultados en todas las experiencias. A pesar de su característica de semiarbitrariedad, la técnica ISSR no está fuertemente influenciada por los cambios del número de ciclos de amplificación de PCR o por las amplificaciones llevadas a cabo en diferentes termocicladores, como sí ocurriría con la técnica RAPD. A modo de ejemplo en la Figura IV.11 se muestra el perfil de bandas de las 9 cepas patrones evaluadas utilizando el cebador ISSR 6.



Figura IV.11: Perfiles ISSR de las 9 cepas de *Fusarium* analizadas: Línea 1-2: *F. graminearum* sensu stricto RCFG6001; 3-4: *F. meridionale* 11794; 5-6: *F. boothii* 26916; 7-8: *F. cortaderiae* 29297; 9-10: *F. brasiliicum* 31281; 11: Marcador de peso molecular (Marcador 100pb DNA Ladder Invitrogen); 12-13: *F. avenaceum*; 14-15: *F. cerealis*; 16-17: *F. pseudograminearum* 11436; 18-19: *F. culmorum* 11452; 20: Control negativo sin DNA.

Los 4 cebadores seleccionados amplificaron 78 bandas reproducibles entre 200 y 2500 pb aproximadamente; 49 de ellas (63 %) resultaron polimórficas. El cebador ISSR 6 generó 23 bandas de las cuales 14 (61%) fueron polimórficas. El cebador ISSR 7 generó 22 bandas, 17 (77%) fueron polimórficas y los cebadores ISSR 8 y ISSR 10 generaron 20 y 13 bandas, respectivamente, de las cuales 10 (50%) y 7 (54%) fueron polimórficas (Figura IV.12).

En general, los 4 cebadores ISSR seleccionados fueron capaces de separar los aislados de *F. graminearum* s.s. del resto de las especies relacionadas. La mayoría de las cepas aisladas a partir de granos de trigo candeal se agruparon en un gran cluster junto con la cepa RCFG6001, previamente identificada por secuenciación como *F. graminearum* s.s., separadas de las especies relacionadas y de las demás especies dentro del complejo *F. graminearum* (Figura IV.13). Cabe destacar que 7 cepas aisladas de trigo candeal se separaron fuera de este cluster principal y se agruparon en otro cluster junto a la cepa de referencia de *F. cerealis*. Por tal motivo, a dichas cepas se les realizó la secuenciación del gen del factor de elongación 1- α para confirmar su identidad. Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias del GenBank y las mismas mostraron 100% de identidad con *F. cerealis*. Para confirmar este resultado se realizó un análisis preliminar de máxima parsimonia con las secuencias obtenidas y con secuencias descargadas del GenBank. Las cepas identificadas como *F. cerealis* agruparon con la cepa patrón de esta especie (100% de soporte) y las dos cepas identificadas por secuenciación como *F. graminearum* s.s. agruparon con el patrón de esta especie (100% de soporte) (Figura IV.14). Se puede observar en la figura IV.13 que el cluster principal de las cepas aisladas se divide en varios subclusters, sin embargo, las cepas de *F. graminearum* s.s. no se separaron por origen geográfico ni por año de aislamiento. Esta separación en subclusters puede deberse a que existe una gran variabilidad intraespecífica entre las cepas aisladas.

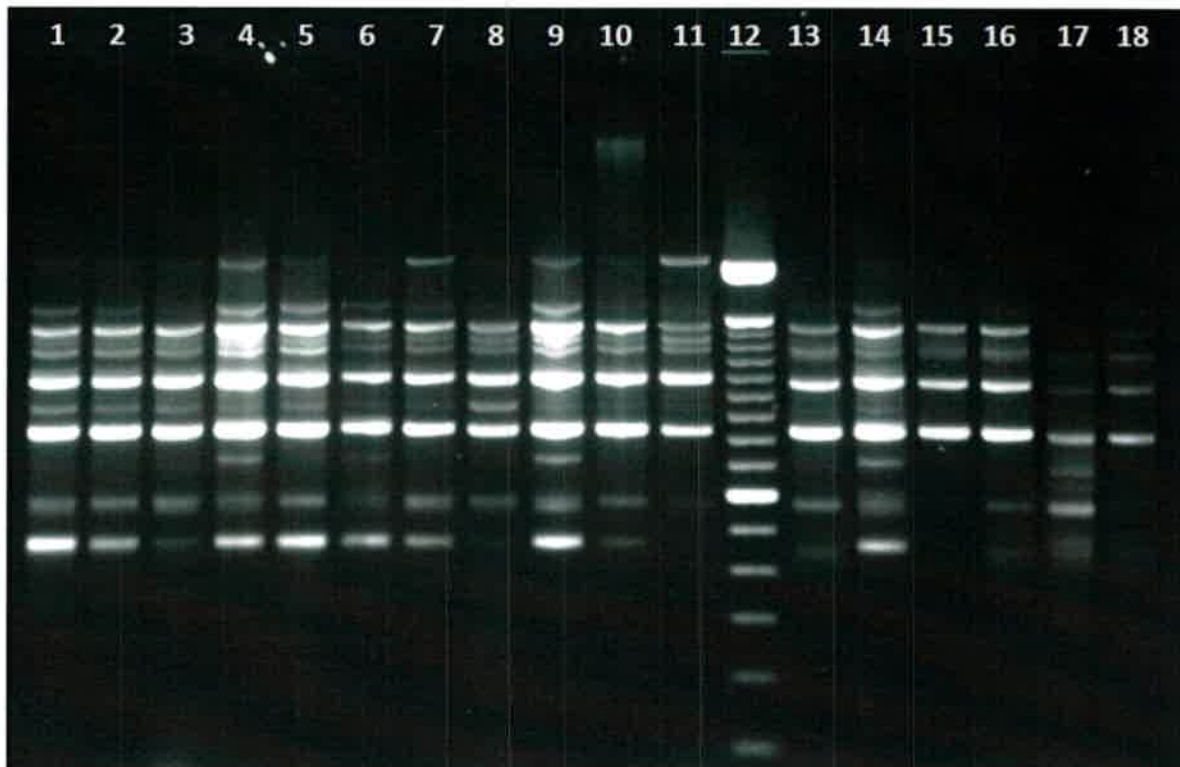


Figura IV.12: Perfiles ISSR de 17 cepas de *F. graminearum* analizadas con el cebador ISSR6. Líneas 1: RCFG6000; 2: RCFG6002; 3: RCFG6004; 4: RCFG6006; 5: RCFG6008; 6: RCFG6009; 7: RCFG6011; 8: RCFG6013; 9: RCFG6014; 10: RCFG6015; 11: cepa patrón *F. graminearum* s.s. RCFG6001; 12: Marcador de peso molecular (Marcador 100pb DNA Ladder Invitrogen); 13: RCFG6017; 14: RCFG6018; 15: RCFG6019; 16: RCFG6020; 17: RCFG6024; 18: RCFG6029.

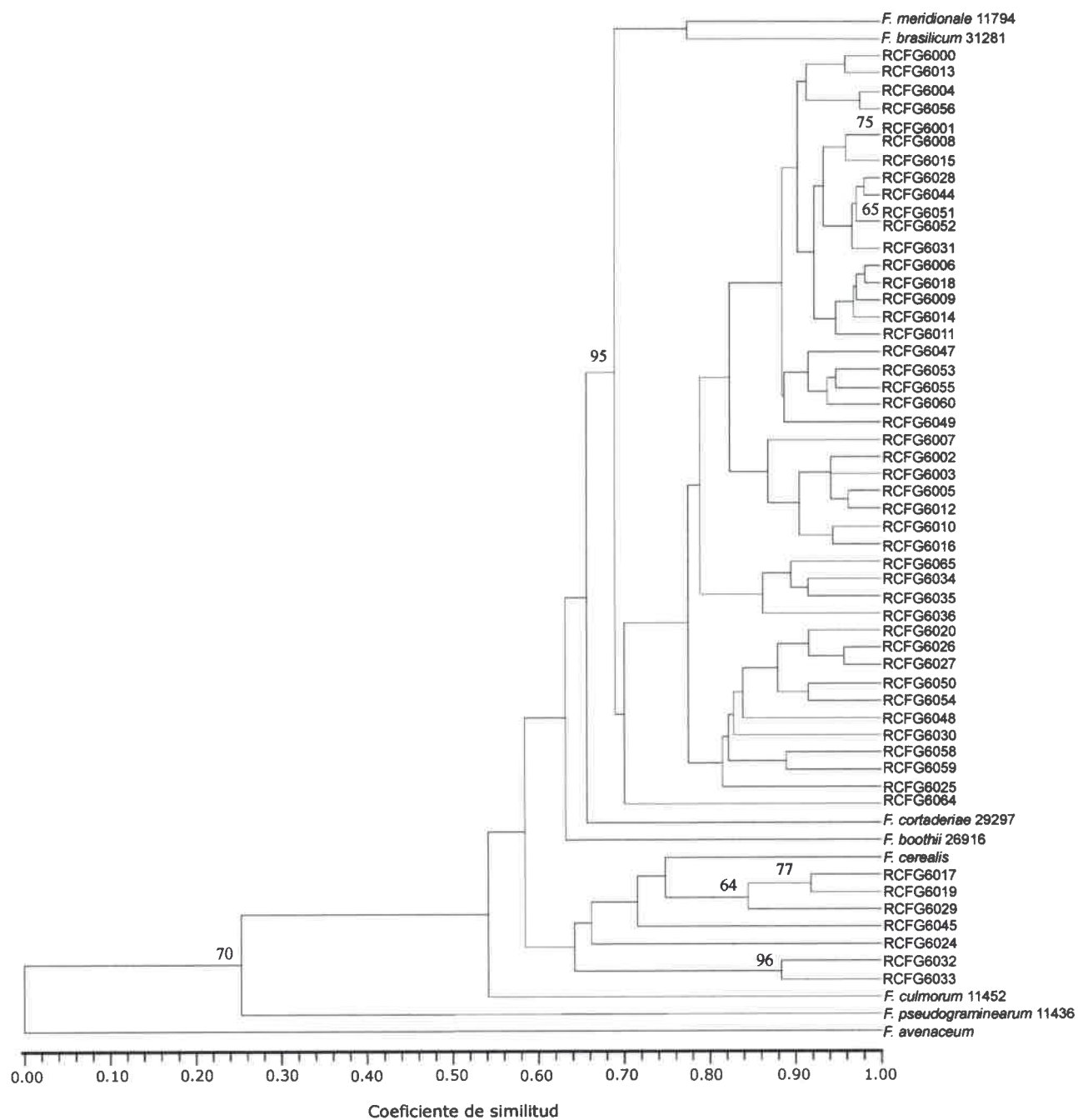


Figura IV.13: Dendrograma de cepas de *Fusarium* generados por el software NTSYS utilizando análisis de cluster UPGMA con el índice de similitud Dice. Los valores de bootstrap mayores al 50% se muestran en la parte superior de las ramas.

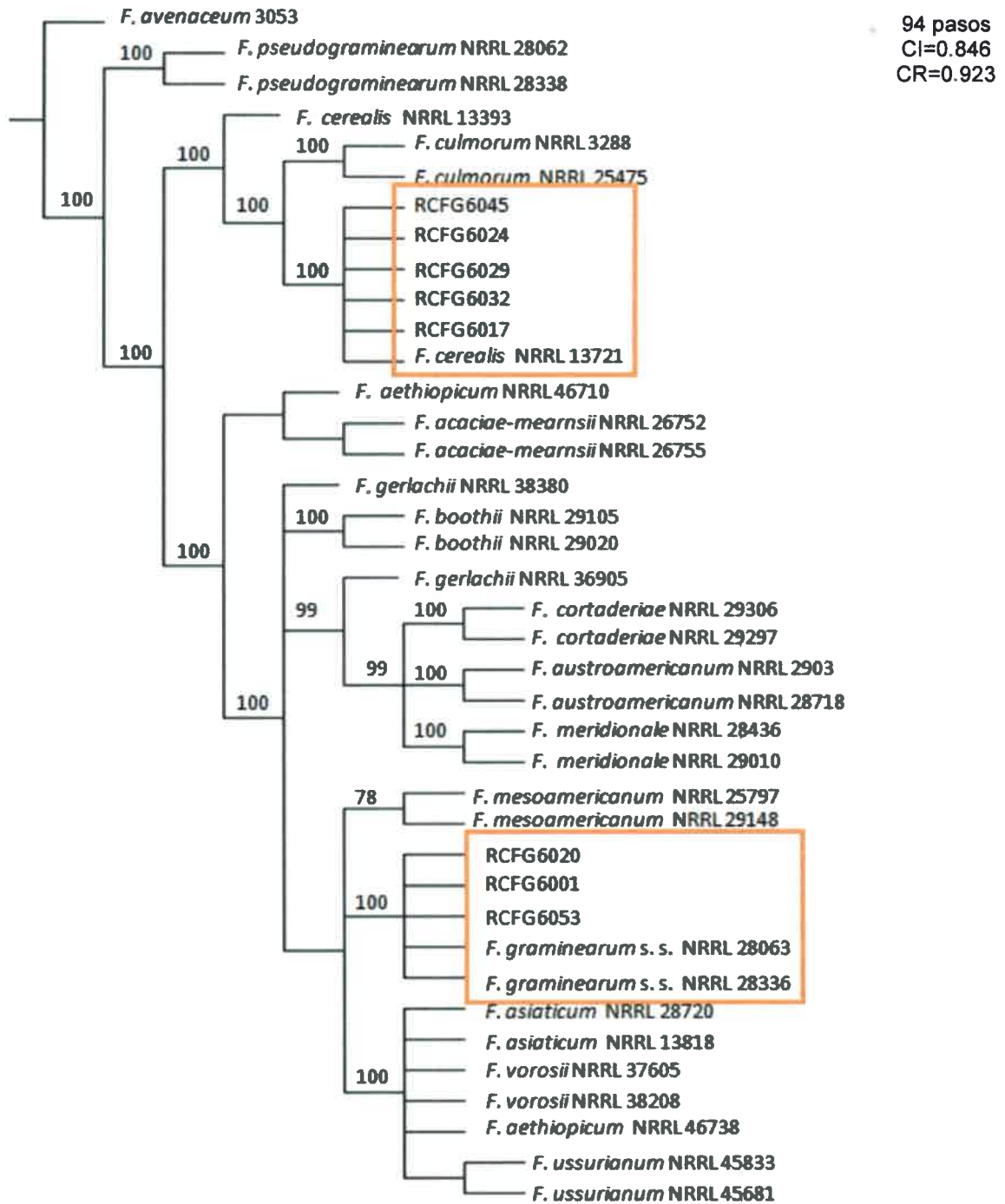


Figura IV.14: Uno de los 826 árboles más parsimoniosos generados a partir de los datos combinados de las secuencias del gen EF-1 α de las 8 cepas de *Fusarium* utilizadas en el presente estudio y de especies relacionadas cuyas secuencias fueron obtenidas del GenBank. La cepa *F. avenaceum* 3053 se usó como grupo externo. Los valores de bootstrap mayores al 50% se muestran en la parte superior de las ramas.

En el presente trabajo, se identificaron 7 cepas de *F. cerealis*, todas obtenidas de granos con síntomas. *Fusarium cerealis* (Cooke) Sacc. (1886) (synonym *F. crookwellense* L.W. Burgess, P.E. Nelson y Toussoun (1983)) es considerado uno de los patógenos secundarios causantes de la fusariosis en cereales de grano pequeño, entre ellos el trigo. Diversos autores han reportado el aislamiento de esta especie de trigo pero siempre en bajo porcentaje (Gale 2003; Álvarez y col., 2011; Schmale y col., 2011). Sin embargo, recientemente se ha visto que es capaz por sí solo de causar la enfermedad en cebada. Zhang y col. (2011), recolectaron espigas de trigo y cebada con síntomas de fusariosis y realizaron el aislamiento de las especies causantes de la enfermedad. Mediante genotipado multilocus ellos lograron identificar como *F. cerealis* a 21 de 23 cepas obtenidas de los granos infectados. A través de ensayos de patogenicidad comprobaron que esta especie era la causante de la fusariosis en cebada. En nuestro país, Castañares y col. (2013) han reportado por primera vez la ocurrencia de esta especie en cebada y llevaron a cabo los postulados de Koch para comprobar la patogenicidad de esta especie. *Fusarium cerealis* es productor de micotoxinas como nivalenol y zearaleona. Morfológicamente es muy similar a *F. graminearum*, siendo difícil su correcta identificación (Leslie y Summerell, 2006) (Figura IV.15). Es posible que un mayor número de cepas que no se incorporaron al presente estudio también sean *F. cerealis*. Por lo tanto, sería importante lograr confirmar la identidad de estos aislados debido a la importancia que se le está dando a este patógeno en el último tiempo.

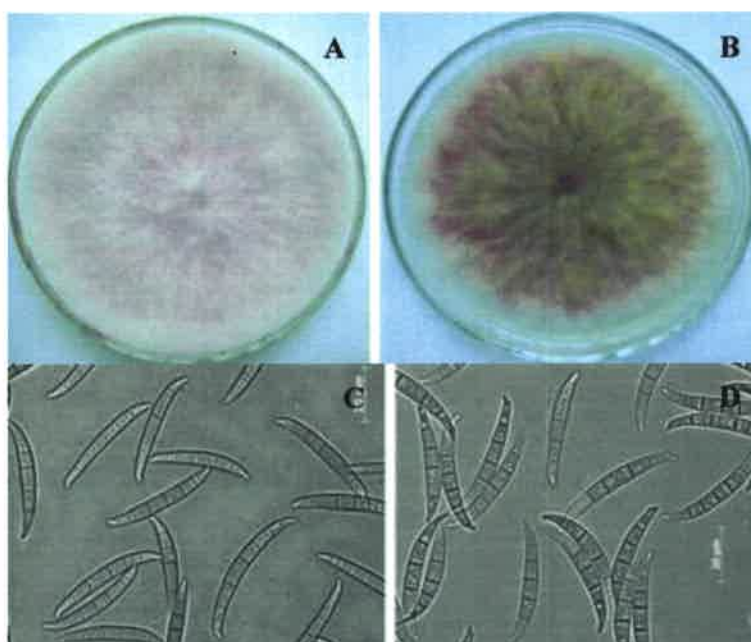


Figura IV.15: A y B: Cultivos de *F. graminearum* (A) y *F. cerealis* (B) en SNA. B y C: Macroconidios de *F. graminearum* (C) y *F. cerealis* (D)

IV.5.2. Estructura genética poblacional de *Fusarium graminearum* sensu stricto aislado de trigo candeal en Argentina

IV.5.2.1. Diferenciación de poblaciones

Teniendo en cuenta que las cepas de *F. graminearum* sensu stricto se aislaron tanto de años durante los cuales no hubo fusariosis de la espiga como de un año donde la incidencia de esta enfermedad fue mayor, se decidió realizar un análisis de estructura de población para comparar la población de *F. graminearum* s.s. aislada de años sin fusariosis con aquella obtenida de la campaña 2010/11, campaña de mayor incidencia de la enfermedad. Se evaluaron un total de 44 cepas de *F. graminearum* s.s., 19 aisladas de años sin fusariosis (SF) y 25 aisladas de años con fusariosis (CF).

En el análisis del marcador ISSR de las 44 cepas de *F. graminearum* s.s. se obtuvieron 78 bandas, originadas con los 4 cebadores elegidos. De estas 78 bandas (loci), el 65% fueron polimórficas en la población SF mientras que el 81% lo fueron en la población CF (Tabla IV.4).

Las cepas con el mismo haplotipo (clones) fueron raras y solo 4 de ellas tuvieron un patrón de bandas igual al de otra cepa, un par de cepas (RCFG6001 y RCFG6008) correspondientes a la población SF y otro par (RCFG6051 y RCFG6059) de la población CF. No se encontraron cepas con el mismo haplotipo en años distintos. Este bajo número de clones encontrados indicaría que las poblaciones de *F. graminearum* estarían cruzándose frecuentemente para mantener este nivel de heterogeneidad en la población.

En general, la frecuencia alélica fue bastante similar en ambas poblaciones así como la diversidad génica promedio (H_s) (Tabla IV.4). Para el total de los loci polimórficos (37 loci), la diversidad de genes promedio fue 0,205 considerando todas las cepas de ambas poblaciones. En la población SF la diversidad de genes promedio fue de 0,175, mientras que en la población CF fue 0,235 (Tabla IV.4). La mayor diversidad de genes en la población CF puede deberse a que ésta presenta un mayor número de loci polimórficos (30 loci, 81%) con respecto a la población SF (25 loci, 65%), esta diferencia se puede atribuir a la diferencia de tamaño entre ambas poblaciones. Cuando se eliminaron los 10 loci con alelos polimórficos raros (frecuencia del alelo raro <5% en ambas poblaciones) del análisis, la diversidad génica promedio estimada aumentó de 0,205 a 0,265. Hubo 7 loci con alelos privados (ambas formas alélicas presentes en una población pero no en la otra) en la población SF de los cuales 3 presentaron ambos alelos con una frecuencia

>5%. En la población CF hubo 13 alelos privados, 6 de ellos presentaron una frecuencia >5% (Tabla IV.4). La frecuencia alélica de los 20 alelos privados de ambas poblaciones fue aproximadamente 12%.

Para el total de los 37 loci polimórficos, los valores de G_{ST} (diferenciación entre poblaciones debido a la subdivisión de la población) para cada loci individual, varió de 0 (no hay divergencia o igual frecuencia alélica) a 0,407. El valor de G_{ST} analizando los 37 loci fue de 0,111 y el número de individuos migrantes (Nm) fue ~ 4 . Similares resultados se obtuvieron al analizar los 27 loci ($G_{ST}=0,116$ y $Nm=3,881$) (Tabla IV.5).

Un valor de $G_{ST}=0$ indica panmixia, es decir, que no existe subdivisión entre las subpoblaciones, dándose apareamientos aleatorios, intercambio de migrantes y no produciéndose divergencia genética en la metapoblación. Mientras que un valor de $G_{ST}=1$, indica aislamiento reproductivo, es decir, una subdivisión extrema. En el presente trabajo el valor de G_{ST} fue igual a 0,111, esto significa que aproximadamente el 11% de la variabilidad es entre las poblaciones, mientras que el 89% de la diversidad es dentro de las poblaciones.

Si dos poblaciones son parte de una única población más grande existe poca variación entre ellas (valores de G_{ST} pequeños y Nm grandes). Por lo tanto, hay un alto nivel de flujo de genes entre ellas. De acuerdo a Wright (1951) las poblaciones con flujo de genes superiores a 4 se pueden considerar como parte de una única población.

Si existe alto flujo de genes (G_{ST} bajo y Nm alto) entre las subpoblaciones, entonces todas evolucionaron juntas. Si existe poco flujo de genes (G_{ST} alto y Nm bajo) entre las subpoblaciones, entonces cada subpoblación evolucionó en forma casi independiente, lo que puede contribuir al aislamiento reproductivo y al establecimiento de linajes (individuos) evolutivamente independientes.

Para calcular el porcentaje de pares de locus cuyos genotipos estaban presentes en frecuencias estadísticamente distinguibles a las esperadas de equilibrio gamético (de ligamiento) se realizó una prueba de χ^2 ($P<0,01$ y $P<0,05$). Se compararon un total de 666 posibles pares de locus entre los 37 loci evaluados. Se rechazó la hipótesis nula (dos pares de locus se encuentran en equilibrio gamético, $P<0,01$) a favor de la hipótesis alternativa (dos pares de locus se encuentran en desequilibrio gamético, $P<0,01$) en 13 pares de loci (1,95%) en la población SF y en 27 loci (4,05%) en la población CF. Usando un nivel de significancia $P<0,05$, se rechazó la hipótesis nula en 20 loci (3%) en la población SF, en 49 loci (7,4%) en la población CF y en 64 loci (9,6%) en las poblaciones combinadas.

Tabla IV.4. Comparación de estadísticos de la diversidad genotípica de las dos poblaciones de *Fusarium graminearum* sensu stricto aisladas de Argentina, a partir de datos de ISSR.

Población	Todas las poblaciones	Sin fusariosis	Con fusariosis
Tamaño de muestra	44	19	25
Porcentaje de loci polimórficos		65	81
No. de haplotipos		18	24
No. de alelos privados		7	13
Frec. media de alelos privados		0,165	0,102
Rango de alelos privados		(0,053 – 0,579)	(0,040 – 0,440)
Diversidad de genes (media) ^a			
37 loci		0,175	0,235
27 loci		0,225	0,305

^a Calculado según Nei (1973).

Tabla IV.5. Parámetros de la diferenciación genética de población entre las poblaciones SF y CF de *F. graminearum* sensu stricto calculados a partir de todos los loci polimórficos y a partir de los 27 loci en los cuales la frecuencia alélica fue >5%.

Parámetros	37 loci	27 loci
Diversidad de genes (media) ^a	0,231	0,299
Rango	0,039 – 0,490	0,039 – 0,490
Índice de fijación (G_{ST}) ^a	0,111	0,116
Rango	0,000 – 0,407	0,000 – 0,407
Número efectivo de migrantes (Nm) ^b	3,996	3,881
Rango	0,727 – 2000	0,727 – 2000
Identidad genética ^c	0,942	0,942

^a Calculado según Nei (1973).

^b Calculado según McDermott & McDonald (1993).

^c Calculado según Nei (1978).

El flujo de genes previene el aislamiento genético que se puede producir gracias a la deriva génica. Las identidades genéticas (Nei, 1978) de las dos poblaciones evaluadas son cercanas a 1. Los valores de G_{ST} indican una mínima subdivisión entre las poblaciones y los valores de Nm cercanos a 4 para todos los loci indican que el nivel de flujo génico que existe entre las poblaciones es aproximadamente cuatro veces mayor al necesario para evitar que las poblaciones diverjan gracias a la deriva génica (Slatkin, 1981). Según Wright (1951), las poblaciones que tienen un flujo génico mayor a 4, pueden considerarse parte de una única población. En el presente estudio, el Nm es cercano a 4, por lo que se encontraría en el límite. Otro dato importante para analizar el intercambio genético entre y dentro las poblaciones es el desequilibrio gamético. Tomando en cuenta $P < 0,05$, el 3% de los pares de loci de la población SF y el 7,4% en la población CF estaban en desequilibrio gamético. Estos resultados concuerdan con los reportados para poblaciones de *F. graminearum* de América del Norte (Zeller y col., 2003, 2004; Schmale y col., 2006) en las cuales no más del 10% y por lo general menos del 5% de los pares de locus examinados estaban en desequilibrio gamético. Los valores obtenidos de este parámetro también indicarían que la población se está reproduciendo sexualmente al azar, de lo contrario los porcentajes encontrados serían mucho más grandes. A partir de los datos expuestos se podría decir que ambas poblaciones (SF y CF) formarían parte de una única población de mayor tamaño que se aparee al azar. Esto concuerda con la mayoría de los trabajos publicados hasta la fecha en los cuales se analiza la estructura poblacional de *F. graminearum* sensu stricto en diversas partes del mundo como China, Estados Unidos, Canadá y Australia (Gale y col., 2002; Zeller y col., 2003a; Fernando y col., 2006; Akinsanmi y col., 2006). Ramírez y col. (2007) compararon mediante el uso de AFLP, dos poblaciones de *Gibberella zeae* aisladas de trigo, obtenidas de dos localidades distantes entre sí en nuestro país y arribaron a la conclusión de que ambas poblaciones eran genéticamente similares y ambas formaban parte de una única población. Por su parte, Astolfi y col. (2012) compararon, mediante AFLP, tres poblaciones geográficamente separadas de *F. graminearum* s.s. en el estado de Rio Grande do Sul, Brasil. Ellos también concluyeron que las tres poblaciones forman parte de una única población. Lo mismo fue observado por Mishra y col. (2004), quienes utilizando marcadores ISSR compararon tres poblaciones de *F. graminearum* s.s. de distintas provincias de Canadá.

Sin embargo, es importante considerar el número de alelos privados encontrados en este estudio (20/37 loci), lo que significa que los niveles de migración observados reflejarían un flujo de genes histórico más que actual entre las poblaciones. Posiblemente,

estos alelos privados encontrados en mayor número en la población CF podrían pertenecer a genes vinculados en la patogenicidad de *F. graminearum*. Akinsanmi y col. (2007), analizaron el comportamiento saprofítico y patogénico de cepas de *F. graminearum* y *F. pseudograminearum* patógenas de trigo al inocularlas a diferentes huéspedes y concluyeron que ambos comportamientos son controlados por complejos de genes diferentes.

IV.5.3 Determinación del quimiotipo y genotipo de cepas de *Fusarium graminearum* aisladas de trigo candeal

Generalmente las cepas de *F. graminearum* se pueden clasificar de acuerdo al tipo de tricotecenos que producen en tres genotipos/quimiotipos: (i) nivalenol y sus derivados acetilados (genotipo/quimiotipo NIV) (ii) deoxinivalenol y 3-acetildeoxinivalenol (genotipo/quimiotipo 3-ADON), y (iii) deoxinivalenol y 15-acetildeoxinivalenol (genotipo/quimiotipo 15-ADON) (Ward y col., 2002). Los términos genotipo y quimiotipo han sido propuestos por Desjardins (2008) para expresar los datos relacionados a los perfiles toxicológicos de las cepas. Genotipo se refiere al análisis por PCR de los genes Tri (involucrados en la vía de producción de tricotecenos) y quimiotipo se refiere solo a los datos químicos de producción de toxina. En el presente trabajo, los ensayos de PCR múltiple mostraron que todas las cepas de *F. graminearum* analizadas (n=41) presentaron genotipo 15-AcDON ya que amplificaron dos fragmentos de 525 y 708 pb. Ninguna de las cepas analizadas mostró genotipo NIV o 3-AcDON (Tabla IV.6). Por otro lado, las cepas de *F. cerealis* aisladas presentaron genotipo NIV ya que amplificaron un fragmento de 625 pb correspondiente al alelo de Tri7 (Tabla IV.6). Estos resultados coinciden con los aportados en nuestro país por Reynoso y col. (2011), quienes estudiaron el genotipo y quimiotipo presente en 116 cepas de *F. graminearum* aisladas de trigo en distintas localidades. El 92% de las cepas presentaron genotipo y quimiotipo 15-AcDON mientras que las restantes presentaron el genotipo DON/NIV, sin embargo solo fueron capaces de producir DON químicamente. También Álvarez y col. (2009) analizaron el potencial toxicogénico de 144 cepas de *F. graminearum* provenientes de distintas regiones y de distintos años y encontraron que la mayoría de ellas pertenecían al quimiotipo 15-AcDON mientras que un porcentaje menor era quimiotipo 3-AcDON y otras eran capaces de producir ambos derivados acetilados. En Norteamérica el quimiotipo 15-AcDON también

es el predominante al igual que en Europa Central y sur de Rusia (Abramson y col., 2001; Quarta y col., 2006; Yli-Mattila y Gagkaeva, 2010). Por otra parte, los resultados obtenidos de las cepas de *F. cerealis* coinciden con diversos autores que han reportado que las cepas de esta especie presentan el quimiotipo NIV (Yli-Mattila y Gagkaeva, 2010; Zhang y col., 2011, Castañares y col., 2013)

Teniendo en cuenta estos resultados, el uso de PCR múltiple de genes *Tri* resulta una herramienta adecuada y útil que permite mejorar el conocimiento de los genotipos presentes en la población de este patógeno en nuestro país. Esta información es de suma importancia para predecir la posible contaminación con micotoxinas, en la implementación de programas de mejoramiento y en la identificación de nuevas poblaciones de este patógeno fúngico.

IV.5.4. Determinación de la capacidad toxicogénica de las cepas de *Fusarium graminearum*

Se analizó la capacidad de 41 cepas de *F. graminearum* aisladas de trigo candeal de producir deoxinivalenol y sus derivados acetilados. La producción de estos últimos se analizó por cromatografía en capa delgada (TLC). La mayoría de las cepas (80,5%) fueron capaces de producir 15-AcDON mientras que a 8 de ellas no se les detectó producción de ningún derivado acetilado. La no detección de algún derivado acetilado puede deberse a que la técnica utilizada (TLC) tiene un límite de detección alto y las cepas podrían producir la toxina por debajo de ese nivel ya que por análisis de PCR todas presentan los genes de producción de esta toxina.

La producción de deoxinivalenol y nivalenol se analizó por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Todas las cepas fueron capaces de producir DON en niveles que variaron entre 4,56 y 2383,52 mg/kg, con una media de 286,3 mg/kg, ninguna de ellas fue capaz de producir nivalenol, esto concuerda con los resultados obtenidos en la determinación del genotipo de producción de tricotecenos por PCR (Tabla IV.7). Nuestros resultados son similares a los reportados en la bibliografía, Mugarib de Kuppler y col. (2011) analizaron la capacidad de producir DON sobre granos de arroz, de cepas de *F. graminearum* oriundas de Alemania y Francia, los valores de toxina detectados oscilaron entre 11,4 y 230,4 mg/kg. Por otro lado, Puri y col. (2010) en Estados Unidos analizaron la producción de DON por cepas de *F. graminearum* sobre granos de arroz y los resultados

obtenidos variaron entre no detectado (nd) y 398,5 mg/kg. En nuestro país diversos autores han estudiado la capacidad de las cepas de este patógeno de producir la toxina en granos de arroz. Álvarez y col. (2009) obtuvieron resultados que oscilaron entre 0,046 y 250,17 mg/kg y Fernández-Pinto y col. (2008), obtuvieron niveles que variaron entre 0,1 y 708 mg/kg. En el presente trabajo la media de producción de la toxina fue de 286,3 mg/kg, sin embargo 3 cepas fueron capaces de producir niveles de DON por encima de los 1000 mg/kg. Este dato es de suma importancia, ya que se cree que el DON es un factor de virulencia del patógeno (Bai y col., 2001; McCormick, 2003). Por lo tanto, estas cepas capaces de producir altos niveles de la toxina podrían desempeñarse como mejores patógenos.

IV.6. Evaluación del comportamiento de diferentes germoplasmas de trigo candeal ante la infección por *Fusarium graminearum* y *Fusarium proliferatum*

IV.6.1. Evaluación del comportamiento de diferentes germoplasmas de trigo candeal ante la infección por *Fusarium graminearum* en condiciones de invernadero

Se evaluó el comportamiento de 12 germoplasmas (comerciales y experimentales) de trigo candeal frente a la infección por *F. graminearum* y a la acumulación de deoxinivalenol en condiciones de invernadero. El germoplasma Langdon no pudo evaluarse debido a que las plantas no llegaron a término. Todos los germoplasmas inoculados mostraron síntomas de la enfermedad pero difirieron en la severidad de la misma. La severidad, calculada como el porcentaje de espiguillas sintomáticas sobre el total de espiguillas a los 21 días post-inoculación, varió desde el 25,21 al 82,79% y se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los distintos germoplasmas (Tabla IV.8). Solo 2 germoplasmas (Kofa y Ciccio) mostraron una severidad superior al 60% y fueron considerados como variedades susceptibles a la infección mientras que se consideró que los germoplasmas Langdon Dic 3A, TC-20 y TC-6 tuvieron un comportamiento intermedio frente a la enfermedad, ya que la severidad de la misma varió entre un 57 y 42%. Por último, los germoplasmas BESM, DGE, ACA1801F, BIFAC, TC-28 y BPLTN mostraron tener mejor comportamiento frente a la infección y dispersión del patógeno ya que la severidad varió entre 37 y 25%. La variedad Ciccio es de origen

italiano, se cultiva al sur de Italia y tiene una conocida susceptibilidad a la fusariosis (Aureli y col., 2009; Nocente, 2013).

Tabla IV.6. Determinación del genotipo, quimiotipo y producción de DON por cepas de *Fusarium graminearum* aisladas de trigo candeal

Cepa	Genotipo	Quimiotipo	Producción de DON (mg/kg)
RCFG6000	15 AcDON	15 AcDON	786,04
RCFG6001	15 AcDON	15 AcDON	2383,52
RCFG6004	15 AcDON	15 AcDON	436,81
RCFG6006	15 AcDON	15 AcDON	289,73
RCFG6007	15 AcDON	nd	21,73
RCFG6008	15 AcDON	15 AcDON	56,84
RCFG6009	15 AcDON	15 AcDON	565,01
RCFG6010	15 AcDON	nd	154,61
RCFG6011	15 AcDON	15 AcDON	658,10
RCFG6013	15 AcDON	15 AcDON	172,46
RCFG6014	15 AcDON	15 AcDON	472,51
RCFG6015	15 AcDON	15 AcDON	26,27
RCFG6016	15 AcDON	15 AcDON	292,59
RCFG6018	15 AcDON	15 AcDON	206,98
RCFG6020	15 AcDON	15 AcDON	289,03
RCFG6025	15 AcDON	15 AcDON	7,12
RCFG6026	15 AcDON	15 AcDON	260,61
RCFG6027	15 AcDON	15 AcDON	42,51
RCFG6028	15 AcDON	15 AcDON	697,11
RCFG6030	15 AcDON	nd	5,12
RCFG6031	15 AcDON	nd	20,15
RCFG6034	15 AcDON	15 AcDON	6,59
RCFG6035	15 AcDON	nd	175,21
RCFG6036	15 AcDON	15 AcDON	4,56
RCFG6044	15 AcDON	15 AcDON	175,70
RCFG6045	15 AcDON	nd	18,66
RCFG6047	15 AcDON	15 AcDON	237,19
RCFG6048	15 AcDON	15 AcDON	108,25
RCFG6049	15 AcDON	nd	28,56
RCFG6050	15 AcDON	15 AcDON	278,26
RCFG6051	15 AcDON	15 AcDON	180,48
RCFG6052	15 AcDON	15 AcDON	638,69
RCFG6053	15 AcDON	15 AcDON	1491,18
RCFG6054	15 AcDON	15 AcDON	109,04
RCFG6055	15 AcDON	15 AcDON	166,91
RCFG6056	15 AcDON	15 AcDON	1272,09
RCFG6058	15 AcDON	15 AcDON	277,89
RCFG6059	15 AcDON	nd	6,59
RCFG6060	15 AcDON	15 AcDON	88,45
RCFG6064	15 AcDON	15 AcDON	91,36
RCFG6065	15 AcDON	15 AcDON	523,79

Nd: no detectado
LOD: 0,05 mg/kg

Tabla IV.7. Determinación del genotipo de producción de tricotecenos de cepas de *Fusarium cerealis* aisladas de trigo candeal

Cepa	Germoplasma	Origen geográfico	Año	Genotipo
RCFG6017	BIFAC	Miramar	2010	NIV
RCFG6019	BICRL	Miramar	2010	NIV
RCFG6024	TC-29	Miramar	2010	NIV
RCFG6029	TC-24	Pieres	2011	NIV
RCFG6032	TC-22	Pieres	2011	NIV
RCFG6033	Buck Topacio	Pieres	2011	NIV
RCFG6045	ACA1801F	Barrow	2011	NIV

Por otro lado, la variedad Kofa es muy difundida al sudeste de Estados Unidos ya que posee características agronómicas que la hacen una variedad de alta calidad para la fabricación de pastas. En el presente estudio, la susceptibilidad a la infección y dispersión por *F. graminearum*, de esta variedad fue elevada. Con respecto a los germoplasmas que mostraron un comportamiento intermedio, la variedad Langdon Dic3A es una variedad experimental con conocida resistencia a la fusariosis (Stack y col., 2002). Sin embargo, en el presente trabajo presentó una severidad media de 57%. Por último, las variedades DGE y TC-28 mostraron un buen comportamiento frente a la enfermedad. Ambas son líneas experimentales con mayor resistencia a la fusariosis, DGE tiene un cromosoma extra proveniente de *Lophopyrum elongatum* (Jauhar y Peterson, 2008) mientras que TC-28 tiene incorporada un gen de resistencia proveniente de Sumai3. Por lo tanto, estos resultados concuerdan con la bibliografía existente. Además, los germoplasmas comerciales BESM, ACA1801F y BIFAC también mostraron tener un buen comportamiento frente a la infección por *F. graminearum* en condiciones de invernadero. Es importante tener en cuenta que para concluir que una variedad es resistente, se deben llevar a cabo los mismos experimentos 2 ó 3 veces, de lo contrario las conclusiones pueden ser erróneas, ya que esta enfermedad se ve muy influenciada por parámetros ambientales y también se ha visto que la variabilidad entre individuos dentro de un mismo germoplasma puede ser tan grande como entre germoplasmas. Por lo tanto, es importante utilizar réplicas y reevaluar los germoplasmas para obtener repetitividad de los resultados (Bai y Shaner, 1994; Mesterházy, 2003).

IV.6.2. Análisis de la producción de deoxinivalenol de espigas inoculadas en el ensayo de invernadero

Se detectaron niveles de DON y sus derivados acetilados en todos los germoplasmas evaluados. Los niveles de DON encontrados variaron entre 14,36 y 341,75 mg/kg mientras que los niveles de 3/15 Ac-DON encontrados variaron entre 0,29 y 5,21 mg/kg (Tabla IV.9). El análisis estadístico de los datos sobre la acumulación de DON demostró que existen diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los germoplasmas evaluados. El germoplasma que presentó mayor nivel de contaminación con DON y sus derivados acetilados fue Ciccio con 341,75 y 5,21 mg/kg, respectivamente. Mientras que el germoplasma que presentó menor contaminación con las toxinas fue TC-27 con 14,36 y 0,29 mg/kg. No se observó correlación significativa entre la severidad de la enfermedad y el contenido de DON ($r=0,548$ $P<0,081$). Es decir que un porcentaje de severidad alto no necesariamente indica un alto contenido de toxina. Un ejemplo de ello es el germoplasma Kofa que fue el que mayor porcentaje de severidad presentó pero no presentó el mayor nivel de toxina, si no que presentó una concentración de 165,50 mg/kg, mientras que el germoplasma BPLT tuvo un 37% de severidad y uno de los niveles más alto de DON (258,49 mg/kg). Sin embargo, el germoplasma experimental TC-27 fue el que menor porcentaje de severidad presentó y también menor concentración de toxina. Según Bai y col. (2001), la observación de síntomas severos en las espigas no siempre está asociado a altos niveles de DON, especialmente en cultivares con una resistencia moderada. Sin embargo, un bajo porcentaje de severidad observado en cultivares resistentes, si estaría indicando un bajo contenido de toxina. Si bien el DON es considerado un factor de virulencia del patógeno, no es necesario para establecer la infección (Bai y col., 2001b).

Los resultados obtenidos coinciden con la bibliografía, Bai y col. (2001a) evaluaron la resistencia a la fusariosis de 116 cultivares comerciales y experimentales en condiciones de invernadero, mediante inoculación puntual. Los niveles de DON encontrados variaron desde trazas a 283 mg/kg. Mientras que Gautman y Dill-Macky (2012) analizaron en condiciones de invernadero, la producción de deoxinivalenol por *F. graminearum* en tres cultivares de trigo con diferentes grados de resistencia a la fusariosis y observaron que los niveles de producción variaron entre 3 y 397 mg/kg. Por otra parte, Audenaert y col. (2013) analizaron la producción de DON en cinco variedades de trigo en condiciones de invernadero y detectaron niveles que variaron desde 4,18 a 26,24 mg/kg. Es importante considerar que si bien los niveles detectados son elevados y superan el límite establecido

por la Unión Europea de 1750 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para granos de trigo candeal, en el ensayo de invernadero se realizó la inoculación puntual del patógeno que le permitió ingresar a la planta y luego se le brindaron todas las condiciones ambientales necesarias para que se establezca la enfermedad. Sin embargo, a campo deben darse todas las condiciones ambientales y el hongo tiene que ser capaz de ingresar a la planta para que se genere la infección y la consecuente producción de toxinas.

Teniendo en cuenta estos resultados se puede concluir que el germoplasma experimental TC-28 fue el que mejor comportamiento mostró frente a la enfermedad ya que presentó el menor porcentaje de severidad (25,21%) y la menor acumulación de deoxivalenol (14,36 mg/kg) en condiciones de invernadero. También, el germoplasma experimental DGE mostró un buen comportamiento frente a la fusariosis ya que presentó un 33% de severidad y una concentración de toxinas de 65,79 mg/kg . Dentro de las variedades comerciales, las que mostraron mejor comportamiento frente a la enfermedad fueron BIFAC y ACA1801F con un 28% y 30% de severidad y 33,54 y 36,96 mg/kg de DON, respectivamente. Por lo tanto, se demostró que existen germoplasmas con potenciales características de resistencia a la fusariosis en nuestro país.

Tabla IV.8. Severidad media de infección por *F. graminearum* evaluada en 12 germoplasmas de trigo candeal. Letras distintas indica diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre germoplasmas

Genotipo	N° de espigas	Severidad	
		Media	Fisher
TC-28	33	25,21	A
BIFAC	20	28,70	AB
ACA1801F	23	30,27	AB
DGE	12	33,84	AB
BESM	21	34,91	AB
BPLTN	26	37,85	AB
TC-6	23	42,10	BC
TC-20	26	54,84	CD
Langdon Dic 3A	30	57,18	D
Ciccio	21	78,50	E
Kofa	25	82,79	E

Tabla IV.9. Concentración de deoxinivalenol y sus derivados acetilados en espigas de trigo candeal con síntomas de fusariosis en ensayos de invernadero.

Germoplasma	Toxina		
	DON (mg/kg)	3/15 Ac-DON (mg/kg)	Fisher (DON)
TC-28	14,36	0,29	A
TC-6	21,06	0,52	B
BIFAC	33,54	1,37	C
ACA1801F	36,96	1,22	C
Langdon Dic 3A	51,82	2,05	D
DGE	65,79	2,30	DE
Kofa	165,50	2,38	E
BESM	233,57	2,15	F
TC-20	248,16	4,30	F
BPLTN	258,49	3,03	F
Ciccio	341,75	5,21	G

IV.6.3. Evaluación del comportamiento de diferentes germoplasmas de trigo candeal ante la infección por *Fusarium proliferatum* en condiciones de invernadero

Se evaluó el comportamiento de 5 germoplasmas de trigo candeal frente a la infección por *F. proliferatum* en condiciones de invernadero. Los germoplasmas evaluados fueron BIFAC, Ciccio, ACA1801F, Kofa y TC-28. Ninguno de ellos presentó síntomas visibles de infección luego de la inoculación salvo una mancha necrótica en el punto de inoculación. Luego de la cosecha se evaluó la apariencia de los granos y se vio que el grano formado en la espiguilla inoculada presentaba una coloración oscura similar a una mancha negra, era de menor peso y tenía apariencia arrugada (Figura IV.16). Por lo tanto podemos decir que el patógeno afectó solo el desarrollo del grano de la espiguilla inoculada. Estos resultados son similares a los observados por Desjardins y col. (2007) quienes evaluaron la capacidad de *F. proliferatum* de causar escudete negro y producir fumonisinas en trigo, en condiciones de invernadero. Ellos no observaron síntomas visibles durante el desarrollo del cultivo pero si vieron síntomas en los granos luego de la

cosecha. Algunos granos presentaban decoloración o coloración amarronada y aquellos más afectados presentaban una apariencia arrugada y micelio del hongo. A pesar de los síntomas, no se vio afectado el rendimiento ni la germinación de los granos.



Figura IV.16: Comparación entre grano de trigo candeal sano (A) y grano de la espiguilla central infectado por *F. proliferatum* (B).

Conclusiones



V. CONCLUSIONES

- La incidencia de *Fusarium graminearum* y de deoxinivalenol durante las tres campañas agrícolas evaluadas fue baja. Esto se vio fuertemente influenciado por las condiciones climáticas, que no fueron predisponentes para la fusariosis.
- Bajo condiciones de infección natural, no se observaron diferencias significativas en el comportamiento frente a la acumulación de deoxinivalenol y nivalenol, entre los germoplasmas comerciales y experimentales de trigo candeal.
- La mayoría de los germoplasmas comerciales de trigo candeal, que se utilizan actualmente, tuvo buen comportamiento frente a la acumulación de DON, ya que los niveles detectados no superaron el máximo permitido por la Unión Europea.
- La acumulación en granos de DON de los germoplasmas comerciales se vio influenciada por la región donde fueron sembrados. Esto está ligado a las condiciones climáticas de cada región.
- Se detectó la presencia de fumonisinas en los granos de trigo candeal, siendo este el primer informe de incidencia de dicha toxina en trigo candeal en Argentina.
- La población de *Fusarium proliferatum* aislada de trigo candeal es variable genéticamente. Esta variabilidad es propia de la especie, no existiendo agrupaciones de cepas que se separen por origen geográfico, por huésped o año de aislamiento.
- En el presente estudio se determinó que el trigo candeal también puede estar contaminado con *Fusarium verticillioides*, otra especie productora de fumonisinas.
- Las cepas de *Fusarium proliferatum* y *F. verticillioides* aisladas de trigo candeal son productoras de fumonisinas, presentando un potencial riesgo de contaminación para los granos.
- En el presente estudio se aisló *Fusarium cerealis* de granos con síntomas, siendo esta especie otro de los patógenos que pueden estar asociados a la fusariosis en nuestro país.
- Existe una gran variabilidad genética dentro de las poblaciones de *Fusarium graminearum* sensu stricto que está dada por la heterogeneidad de los individuos que las componen. Las poblaciones de *F. graminearum* estarían cruzándose frecuentemente a campo para mantener esta heterogeneidad que existe entre los individuos.
- Todas las cepas de *Fusarium graminearum* aisladas de trigo candeal presentaron quimiotipo 15AcDON y fueron capaces de producir DON, algunas de ellas en niveles muy altos.

- Los germoplasmas evaluados en invernadero presentaron diferencias significativas en cuanto a la severidad de la enfermedad generada por *Fusarium graminearum* y a la acumulación de deoxinivalenol. Los germoplasmas que presentaron mejor comportamiento fueron los germoplasmas experimentales TC-28 y DGE y los germoplasmas comerciales BIFAC y ACA1801F.
- En ensayos de patogenicidad en invernadero, *Fusarium proliferatum* no causó síntomas visibles en las espigas. Sin embargo, afectó el desarrollo del grano de la espiguilla inoculada



Bibliografía



VI. BIBLIOGRAFÍA

- Audenaert, K.; De Boevre, M.; Vanheule, A.; Callewaert, J.; Bekaert, B.; Höfte, M. ; De Saeger, S. ; Haesaert, G. 2013. Mycotoxin glucosylation in commercial wheat varieties: Impact on resistance to *Fusarium graminearum* under laboratory and field conditions. *Food Control* 34: 756-762.
- Abbas, H. K.; Cartwright, R. D.; Shier, W. T.; Abouzied, M. M.; Bird, C. B.; Rice, L. G.; Ross, P. F.; Sciumbato, G. L.; Meredith, F. I. 1998. Natural occurrence of fumonisins in rice with *Fusarium* sheath rot disease. *Plant Dis.* 82: 22–25.
- Abdalla, M. Y.; Al-Rokibah, A.; Moretti A.; Mulè G. 2000. Pathogenicity of toxigenic *Fusarium proliferatum* from date palm in Saudi Arabia. *Plant Dis.* 84: 321-324.
- Abramson, D.; Clear, R. M.; Gaba, D.; Smith, D. M.; Patrick, S. K.; Saydak, D. 2001. Trichothecene and moniliformin production by *Fusarium* species from western Canadian wheat. *J. Food Prot.* 64: 1220–1225.
- Acuña, A.; Ghezan, G.; Scheggia, N.; Berlanga, P. 1982. Algunos aspectos de la producción y comercialización de trigo fideo. Boletín Técnico N° 89, INTA, EEA Balcarce.
- Akinsanmi, O. A.; Mitter, V.; Simpfendorfer, S., Backhouse, D.; Chakraborty, S. 2004. Identity and pathogenicity of *Fusarium* spp. isolated from wheat fields in Queensland and northern New South Wales. *Aust. J. Agr. Res.* 55: 97–107.
- Akinsanmi, O. A.; Backhouse, D.; Simpfendorfer, S.; Chakraborti, S. 2006. Genetic diversity of Australian *Fusarium graminearum* and *F. pseudograminearum*. *Plant Pathol.* 55: 494–504.
- Akinsanmi, O. A.; Chakraborty, S.; Backhouse, D.; Simpfendorfer, S. 2007. Passage through alternative hosts changes the fitness of *Fusarium graminearum* and *Fusarium pseudograminearum*. *Environ Microbiol* 9: 512–520.
- Álvarez, C. L.; Azcarate, P. M.; Fernández Pinto, V. 2009. Toxigenic potential of *Fusarium graminearum* sensu stricto isolates from wheat in Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* 135: 131–135.
- Álvarez, C. L., Somma, S.; Proctor, R. H.; Stea, G.; Mule, G.; Logrieco, A. F.; Fernandez Pinto, V.; Moretti, A. 2011. Genetic diversity in *Fusarium graminearum* from a major wheat producing region of Argentina. *Toxins* 3: 1249–1309.
- Andersen, A. L. 1948. The development of *Gibberella zeae* head blight of wheat. *Phytopatology* 38: 585-611.

- Anderson, J. A.; Stack, R. W.; Liu, S.; Waldron, B. L.; Fjeld, A. D.; Coyne, C., Moreno Sevilla, B.; Mitchell Fetch, J.; Song, Q.J.; Cregan, P. B.; Froberg, R. C. 2001. DNA markers for *Fusarium* head blight resistance QTLs in two wheat populations. *Theor. Appl. Genet.* 102: 1164–1168.
- AOAC. 1995. Sections 975.35, 976.22 in Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD.
- AOAC. 1995. Sections 995.15 in Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD.
- Aoki, T.; Ward, T.J.; Kistler, H.C.; O'Donnell, K. 2012. The *Fusarium graminearum* species complex comprises at least 16 phylogenetically distinct head blight pathogens. Meeting Abstract.
- Astolfi, P.; Dos Santos, J.; Schneider, L. y col. 2011. Molecular survey of trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* species complex from barley in Southern Brazil. *Int J Food Microbiol.* 148: 197–201.
- Astolfi, P.; Reynoso M. M.; Ramírez M. L.; Chulze S. N.; Tessmann D. J.; Del Ponte E. M. 2012. Genetic diversity of *Fusarium graminearum* populations isolated from wheat in Southern Brazil. *Plant Pathol.* 61: 289–295.
- Aureli, G.; Quaranta, F.; Amoriello, T.; Melloni, S.; Desiderio, E.; D'Egidio, M.G. 2009. Studio triennale sulla contaminazione da deossinivalenolo (DON) nel frumento duro in coltivazione biologica e convenzionale. *Rivista di Scienza dell'Alimentazione* 2: 1-14.
- Bai, G.; Shaner, G. 1994. FHB of wheat: perspective and control. *Plant Dis.* 78: 760-766.
- Bai, G.; Plattner, R.; Desjardins, A.; Kolb, F. 2001a. Resistance to *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat. *Plant Breeding.* 120: 1-6.
- Bai, G.; Desjardins, A.; Plattner, R. 2001b. Deoxynivalenol nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. *Mycopathologia* 153: 91-98.
- Ban, T. 2000. Studies on the genetics of resistance to *Fusarium* head blight caused by *Fusarium graminearum* in wheat, in: J. Raupp, Z. Ma, P. Chen, D. Liu (Eds.), Proceedings of the International Symposium on Wheat Improvement for Scab Resistance. Section II. Genetic Analysis and Gene Mapping for Scab Resistance, China, pp. 5–10.
- Barros, G.; Alaniz Zanon, M. S.; Abod, A.; Oviedo, M. S.; Ramírez, M. L.; Torres, A.; Chulze, S. 2012. Natural deoxynivalenol occurrence and genotype and chemotype

determination of a field population of the *Fusarium graminearum* complex associated with soybean in Argentina. *Food Addit Contam* 29: 293-303.

- Bennett, J.; Klich, M. 2003. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 497-516.
- Bensassi, F.; Zaie, C.; Abi, S.; Rabeh Hajlaou, M.; Bach, H. 2010. Occurrence of deoxynivalenol in durum wheat in Tunisia. *Food Control.* 21: 281-285.
- Besl, H.; Bresinsky, A. 1997. Chemosystematics of *Suillaceae* and *Gomphidiaceae* (suborder *Suillineae*). *Plant Syst. Evol.* 206: 223-242.
- Bhatnagar, D.; Yu, J.; Ehrlich, K. 2002. Toxins of filamentous fungi. En: Fungal Allergy and Pathogenicity. Breitenbach M, Cramer R, Lehrer SB (eds). *Chem Immunol. Basel*, Karger, vil. 81, pp: 167-206.
- Booth, C. 1971. Methods of isolation, culture and stimulation of sporulation. Chapter 2. En: The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. Pp: 19-23.
- Borda, M. Las sequías históricas, Carpeta Cosecha fina 2008/09, CEI Barrow. http://www.inta.gov.ar/barrow/info/documentos/agrometeo/otrostrabajos/sequias_2008.pdf
- Bornet B.; Branchard M. 2001. Non anchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Mol. Bio Rep.* 19: 209-215.
- Bosch, U.; Mirocha, C. J. 1992. Toxin production by *Fusarium* species from sugar beets and natural occurrence of zearalenone in beets and beet fibers. *Appl Environ Microbiol* 58: 3233-3239.
- Bottalico, A. 1998. *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. *J. Plant Pathol.* 80: 85-103.
- Bottalico, A.; Perrone, G. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 611-624.
- Boutigny, A.; Ward, T.; Van Coller, G.; Flett, B.; Lamprecht, S.; O'Donnell K.; Viljoen, A. 2011. Analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat, barley and maize in South Africa provides evidence of species-specific differences in host preference. *Fungal Genet Biol.* 48: 914-920.
- Brasier, C. M. 1997. Fungal species in practice: identifying species units in fungi. En *Species: The Units of Biodiversity*. Claridge, M. F.; Dawah, H. A. and Wilson, M. R. Eds. Chapman & Hall, London. pp. 135-170.

- Brennan, J.M.; Fagan, B.; Van Maanen, A.; Cooke, B.M.; Doohan, F.M. 2003. Studies on *in vitro* growth and pathogenicity of European *Fusarium* fungi. *Eur. J. Plant Pathol.* 109: 577–587.
- Brown, D.; McCormick, S.; Alexander, N.; Proctor, R.; Desjardins, A. 2001. A genetic and biochemical approach to study trichothecene diversity in *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*. *Fungal Gen. Biol.* 32: 121-133.
- Brown, D.W.; McCormick, S.P.; Alexander, N.J.; Proctor, R.H.; Desjardins, A.E. 2002. Inactivation of a cytochrome P-450 is a determinant of trichothecene diversity in *Fusarium* species. *Fungal Genet. Biol.* 36: 224–233.
- Brown, D.W.; Proctor, R.H.; Dyer, R.B.; Plattner, R.D. 2003. Characterization of a *Fusarium* 2-gene cluster involved in trichothecene C-8 modification. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7936–7944.
- Brown, D.W.; Dyer, J.M.; McCormick, S.P.; Kendra, D.F.; Plattner, R.D. 2004. Functional demarcation of the *Fusarium* core trichothecene gene cluster. *Fungal Genet. Biol.* 41: 454–462.
- Buerstmayr, H.; Ban, T.; Anderson, J. 2009. QTL mapping and marker-assisted selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat: a review. *Plant Breed.* 128:1-26.
- Buerstmayr, M.; Hube, K.; Heckmann, J.; Steiner, B.; Nelson, J.; Buerstmayr, H. 2012. Mapping of QTL for *Fusarium* head blight resistance and morphological and developmental traits in three backcross populations derived from *Triticum dicoccum* x *Triticum durum*. *Theor. Appl. Genet.* 125: 1751-1765.
- Burlakoti, R.R.; Shaukat, A.; Secor, A.; Neate, S.M.; McMullen, M.P.; Adhikari, T.B.; 2008. Comparative mycotoxin profiles of *Gibberella zeae* populations from barley, wheat, potatoes, and sugar beets. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 6513–6520.
- Bushnell, W.; Hazen, B.; Pritsch, C. 2003. Histology and physiology of *Fusarium* head blight. En: *Fusarium Head Blight of wheat and barley*. Leonard K and Bushnell W. Eds. The American Phytopathological Society, St Paul, MN, USA.
- Carranza, M.; Lori, G.; Sisterna, M. 2008. Wheat *Fusarium* head blight 2001 epidemic in the southern Argentinean pampas. *Summa Phytopathol.* 34: 93-94.
- Carter, J. P.; Rezanoor, H. N.; Desjardins, A. E.; Nicholson, P. 2000. Variation in *Fusarium graminearum* isolates from Nepal associated with their host of origin. *Plant Pathol.* 49: 452–460.
- Castañares, E.; Dinolfo, M.; Moreno, M.; Beron, C.; Stenglein S. 2013. *Fusarium cerealis* associated with barley seeds in Argentina. *Phytopathol.* 161: 586–589.

- Castellá, G.; Bragulat, M. R.; Cabanes, F. J. 1999. Surveillance of fumonisins in maize-based feeds and cereals from Spain. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4707-4710.
- Castoria, R.; Lima, G.; Ferracane, R.; Ritieni, A. 2005. Occurrence of mycotoxin in farro samples from southern Italy. *J Food Prot.* 68: 416-420.
 - Cendoya, E.; Monge, M.; Palacios, S.; Chiacchiera, S.; Torres, A.; Farnochi, M.; Ramirez, M. 2013. Fumonisin occurrence in naturally contaminated wheat grain harvested in Argentina. *Food Control* 37: 56-61.
- Champeil, A.; Doré, T.; Fourbet, J.F. 2004. *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. *Plant Sci.* 166: 1389-1415.
- Chandler, E. A.; Simpson, D. R.; Thomsett, M. A.; 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*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 62: 355-367.
- Chulze, S. N.; Ramirez, M. L.; Farnochi, M. C.; Pascale, M.; Visconti, A.; March, G. 1996. *Fusarium* and fumonisins occurrence in Argentina corn at different ear maturity stages. *J. Agricult. Food Chem.* 44: 2797-2801.
- Ciegler, A. 1983. Do mycotoxins function in ecological processes? *Journal of Food Safety* 5: 23-30.
- Cirillo, T.; Ritieni, A.; Galvano, F.; Cocchieri Amodio, R. 2003a. Natural co-occurrence of deoxynivalenol and fumonisins B₁ and B₂ in Italian marketed foodstuffs. *Food Addit. Contam.* 20: 566 - 571.
- Cirillo, T.; Ritieni, A.; Visone, M.; Amodio Cocchieri, R. 2003b. Evaluation of conventional and organic Italian foodstuffs for deoxynivalenol and fumonisins B1 and B2. *J. Agric. Food Chem.* 51: 8128-8131.
- Cole, R. J.; Cox, R.H. 1981. En: Handbook of toxic fungal metabolites, Academic Press, New York.
- Comisión Reguladora de la Unión Europea. 2007. Regulation (EC) N° 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards *Fusarium* toxins in maize and maize products. Official Journal of the European Union.
- Comité Científico de la Union Europea. 2003. Updated opinion of the ScientiWc Committee on Foods on Fumonisin B1, B2 and B3. SCF/CS/CNTM/MYC/ 28 Final. Directorate – ScientiWc Opinions. European commission, Brussels, Belgica.

- Commission Europea. 2006. Commission regulation N° 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Union, L 364, 5.
- Conner, R. L.; Hwang, S.; Stevens, R. 1996. *Fusarium proliferatum*: A new causal agent of black point in wheat. *Can. J. Plant Pathol.* 18: 419–423.
- Cooney, J. M.; Lauren, D. R.; di Menna, M. E. 2001. Impact of competitive fungi on trichothecene production by *Fusarium graminearum*. *J. Agric. Food Chem.* 49: 522-526.
- Cracraft, J. 1983. Species concepts and speciation analysis. En Current Ornithology. Plenum Press, New York. Vol. 1, pp. 159–187.
- Cundliffe, E.; Davies, J.E. 1977. Inhibition of initiation, elongation, and termination of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11:491-499.
- Da Silva, J. B.; Pozzi, C. R.; Mallozzi, A. B.; Ortega, E.M.; Correa, B. 2000. Mycoflora and occurrence of aflatoxin B1 and fumonisin B1 during storage of Brazilian sorghum. *J. Agric. Food Chem.* 48: 4352–4356.
- Dalcero, A.; Torres, A.; Etcheverry, M.; Chulze, S.; Varsavsky, E. 1997. Occurrence of deoxynivalenol and *Fusarium graminearum* in Argentinean wheat. *Food Addit. Contam.* 14: 11–14.
- De Girolamo, A.; Pascale, M.; Visconti, A. 2011. Comparison of methods and optimisation of the analysis of fumonisins B₁ and B₂ in masa flour, an alkaline cooked corn product. *Food Addit. Contam.* 28: 667-75.
- Demarie, G.; Viteri, L.; Ghezan, G. 1999. Agricultura de contrato en el cultivo de trigo candeal.
<http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/econo/indus/agriculturadecontrato.htm>
- Desjardins, A.; Manandhar, G.; Plattner, R.; Maragos, C.; Shrestha, K.; McCormick, S. 2000. Occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in Nepalese maize and wheat and the effect of traditional processing methods on mycotoxin levels. *J. Agr. Food Chem.* 48: 1377–1383.
- Desjardins A. 2003. *Giberella* from A (venaceae to Z(eae). *Annu Rev Phytopathol.* 41: 177–198.
- Desjardins, A. *Fusarium Mycotoxins: Chemistry, Genetics and Biology*; APS Press, St. Paul, MN, 2006.

- Desjardins, A.; Busman, M.; Proctor, R.; Stessman, R. 2007. Wheat kernel black point and fumonisin contamination by *Fusarium proliferatum*. *Food Addit. Contam. Part A*, 24: 1131 – 1137.
- Desjardins, A. 2008. Natural product chemistry meets genetics: When is a genotype a chemotype? *J Agric. Food Chem.* 56: 7587-7592.
- Dinolfo, M. I.; Stenglein, S. A.; Moreno, M. V.; Nicholson, P.; Jennins, P.; Salerno, G. 2010. ISSR markers detect high genetic variation among *Fusarium poae* isolates from Argentina and England. *Eur J Plant Pathol.* 127: 483-491.
- Doko, M. B.; Rapior, S.; Visconti, A.; Schjoth, J. E. 1995. Incidence and levels of fumonisin contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa. *J. Agr. Food Chem.* 43: 429-434.
- Dusabenyagasani, M.; Dostaler, D.; Hamelin, R.C. 1999. Genetic diversity among *Fusarium graminearum* strains from Ontario and Quebec. *Can. J. Plant Pathol.* 21: 308–314.
- Elias, E. M.; Manthey, F. A. 2007. Registration of 'Divide' durum wheat. *J. Plant Regist.* 1: 7-8.
- Elmer, W. H. 1995. A single mating population of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium proliferatum*) predominates in asparagus fields in Connecticut, Massachusetts, and Michigan. *Mycologia* 87: 68-71
- Eriksen, G. S.; Pettersson, H.; Lundh, T. 2004. Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites. *Food Chem. Toxicol.* 42: 619-624.
- Falconer, D. S.; Mackay, T. F. C. 1996. Introduction to Quantitative Genetics, 4th ed. London, Prentice Hall.
- Farnochi, M. C.; Ramírez, M. L.; Cabrera Zalazar, M.; Palacios, S.; Torres, A.; Chulze, S. 2011. *Fusarium* species in durum wheat from Argentina. Mycored Africa 2011 Conference. Fecha: 04 al 06 de Abril. Ciudad Del Cabo, Sudáfrica.
- FDA Regulatory Guidance for Toxins and Contaminants. 2000. Food and Drug Administration.
- Feinberg, B.; McLaughlin, C.S. 1989. Biochemical mechanism of action of trichothecene mycotoxins. En: *Trichothecene Mycotoxicosis: Pathophysiological Effects*. Beasley, V.R. Ed. CRC Press, Boca Raton, FL, USA Pp. 27–35.

- Fernandez Pinto, V.; Terminiello, L.A.; Basílico, J.C.; Ritieni, A. 2008. Natural occurrence of nivalenol and mycotoxigenic potential of *Fusarium graminearum* strains in wheat affected by head blight in Argentina. *Braz. J. Microb.* 39: 157-162.
- Fernando, W. G. D.; Zhang, J. X.; Dusabenyagasani, M.; Guo, X. W.; Ahmed, H.; McCallum B. 2006. Genetic diversity of *Gibberella zeae* Isolates from Manitoba. *Plant Dis.* 90: 1337–1342.
- Forsell, J.H.; Jensen, R.; Tai, J.H.; Witt, M.; Lin, W.S.; Pestka, J.J.; 1987. Comparison of acute toxicities of deoxynivalenol (vomitoxin) and 15- acetyldeoxynivalenol in the B6C3F1 mouse. *Food Chem. Toxicol.* 25: 155–162.
- Frisvad, J. C.; Filtenborg, O. 1990. Secondary metabolites as consistant criteria in *Penicillium* taxonomy and a synoptic key to *Penicillium* subgenus *Penicillium*. En *Modern Concepts in Penicillium and Aspergillus Classification*. Samson, R. A. and Pitt, J. I., Eds., Plenum Press, New York, USA. Pp: 373–384.
- Gagkaeva, T. Y.; Yli-Mattila T. 2004. Genetic diversity of *Fusarium graminearum* in Europe and Asia. *Eur. J. Plant Pathol.* 110: 551–562.
- Gale, L. R.; Chen, L. F.; Hernick, C.A.; Takamura, K.; Kistler, H.C. 2002. Population analysis of *Fusarium graminearum* from wheat fields in eastern China. *Phytopathology* 92: 1315–1322.
- Gale, L. R. 2003. Population biology of *Fusarium* species causing head Blight of grain crops. En: *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*. Leonard, K. J. and Bushnell, W. R. Eds. APS Press, St Paul, MN, USA. Pp: 120–143.
- Gale, L. R.; Harrison, S. A.; Ward, T. y col., 2011. Nivalenol-type populations of *Fusarium graminearum* and *F. asiaticum* are prevalent on wheat in Southern Louisiana. *Phytopathology*. 101: 124–34.
- Galich, A.N.; Galich, M.T.V. de. 1996. Enfermedades del trigo en el área central norte de la región cerealera argentina. EEA INTA Marcos Juárez. Informe Técnico N° 121.pp 1-25.
- Gallo, G.; LoBianco, M.; Bognanni, R.; Saimbene, G. 2008. Mycotoxins in durum wheat grain: Hygienic-health quality of Sicilian production. *J. Food Sci.* 73: 42-47.
- Gautam, P.; Dill-Macky, R. 2012. *Fusarium* head blight development and trichothecene accumulation in point inoculated *Fusarium* infected wheat heads. *World Mycotoxin J.* 5: 45-55.

- Gerlach, W.; Nirenberg, H. 1982. The genus *Fusarium* – A pictorial atlas. *Mitteilungen aus der Biologischen undesanstalt Für Land- und Forstwirtschaft (Berlin – Dahlem)* 209: 1-405.
- Gervais, L. ; Dedryver, F. ; Morlais, J.Y. ; Bodusseau, V. ; Negre, S.; Bilous, M. ; Groos, C.; Trottet, M. 2003. Mapping of quantitative trait loci for field resistance to *Fusarium* head blight in an European winter wheat. *Theor. Appl. Genet.* 106: 961–970.
- Giaj-Merlera, G.; Torres, A.M.; Reynoso, M.M. 2012. Use of ISSR-PCR analysis to discriminate ochratoxigenic species in the *Aspergillus* section *Nigri*. 7th Conference of The World Mycotoxin Forum and the XIIIth IUPAC International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Rotterdam, The Netherlands. Book of abstracts.
- Gilbert, J.; Fernando, W.G.D. 2004. Epidemiology and biological control of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*). *Can. J. Plant Pathol.* 26: 464–472.
- Goloboff P. A., Farris J.; Nixon K. 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24: 774–786.
- González, A.; Aguirre, X. 2007. Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs) Andrea González y Xitlali Aguirre. En: *Ecología Molecular*, cap. 19. México, 2007.
- González, H. H. L.; Resnik, S. L.; Boca, R. T.; Marasas, W. F. O. 1995. Mycoflora of Argentinian corn harvested in the main production area in 1990. *Mycopathologia.* 130: 29-36
- González, H. H. L.; Martínez, E. J.; Pacin, A.; Resnik, S. L. 1999. Relationship between *Fusarium graminearum* and *Alternaria alternata* contamination and deoxynivalenol occurrence on Argentinean durum wheat. *Mycopathologia.* 144: 97–102.
- González, H. H. L.; Molto, G. A.; Pacin, A.; Resnik, S. L.; Zelaya, M. J.; Masana, M.; Martinez, E. J. 2008. Trichothecenes and mycoflora in wheat harvested in nine locations in Buenos Aires province, Argentina. *Mycopathologia.* 165: 105–114.
- Guo, X.W.; Fernando, W.G.D.; Seow-Brock, H.Y. 2008. Population structure, chemotype diversity, and potential chemotype shifting of *Fusarium graminearum* in wheat fields of Manitoba. *Plant Dis.* 92: 756–762.
- Hawksworth, D.; Kirk, P.; Sutton, B.; Pegler, D. 1996. *Ainsworth's and Bisby's Dictionary of the Fungi*, 8th ed. CABI, Wallingford, UK.
- Huhn, M.; Elias E.; Ghavami, F.; Kianian, S.; Chao, S.; Zhong, S.; Alamri, M.; Yahyaoui, A.; Mergoum, M. 2012. Tetraploid Tunisian wheat germplasm as a new source of *Fusarium* head blight resistance. *Crop Sci.* 52: 136-145.

- Hyun, J.W.; Lee, S.C.; Kim, D.H.; Ko, S.W.; Kim, K.S. 2000. *Fusarium* fruit rot of citrus in Jeju Island. *Mycobiology* 28: 158-162.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). 2002. Fumonisin B₁. En IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene; IARC: Lyon, France. 82: 301-366.
- Jauhar, P. P.; Peterson, T. S. 2008. Registration of DGE-1, a durum alien disomic addition line with resistance to *Fusarium* head blight. *J. Plant Regist.* 2: 167-168.
- Jauhar, P. P.; Peterson, T. S. 2012. Registration of DGE-2, a durum wheat disomic alien substitution line 1E(1A) involving a diploid wheatgrass chromosome. *J. Plant Regist.* 6: 221-226.
- Jauhar, P. P.; Peterson, T. S. 2013. Registration of DGE-3, a durum wheat disomic substitution line 1E(1B) involving a wheatgrass chromosome. *J. Plant Regist.* 7: 257-259.
- Jennings, P.; Coates, M. E.; Turner, J. A.; Chandler, E. A.; Nicholson, P. 2004. Determination of deoxynivalenol and nivalenol chemotypes of *Fusarium culmorum* isolates from England and Wales by PCR assay. *Plant Pathol.* 53: 182-190.
- Jimenez, M.; Logrieco, A.; Bottalico, A. 1993. Occurrence and pathogenicity of *Fusarium* species in banana fruits. *J Phytopathol.* 137: 214-220.
- Jurado, M.; Marín, P.; Callejas, C.; Moretti, A.; Vázquez, C.; González Jaén, M.T. 2010. Genetic variability and fumonisin production by *Fusarium proliferatum*. *Food Microbiol.* 27: 50-57.
- Kang, Z.; Buchenauer H. 2000. Ultrastructural and immunocytochemical investigation of pathogen development and host responses in resistant and susceptible wheat spikes infected by *Fusarium culmorum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 57: 255-268.
- Kearsey, M. J. 1998. The principles of QTL analysis (a minimal mathematics approach). *J Ex Bot.* 49: 1619-1623.
- Kerényi, Z.; Zeller, K.; Hornok, L.; Leslie, J. 1999. Standardization of mating-type terminology in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Applied Environ Microb.* 65: 4071-4076.
- Kimura, M.; Matsumoto, G.; Shingu, Y.; Yoneyama, K.; Yamaguchi, I. 1998. The mystery of the trichothecene 3-O-acetyltransferase gene analysis of the region around Tri101 and characterization of its homologue from *Fusarium sporotrichioides*. *FEBS Lett.* 435: 163-168.

- King, R.R.; McQueen, R.E.; Levesque, D.; Greenhalgh, R.E. 1984. Transformation of deoxynivalenol (vomitoxin) by rumen microorganisms. *J. Agric. Food Chem.* 32: 1181–1183.
- Kolb, F.L.; Bai, G.H.; Muehlbauer, G.J.; Anderson, J.A.; Smith, K.; Fedak G. 2001. Host plant resistance genes for *Fusarium* head blight: mapping and manipulation with molecular markers. *Crop Sci.* 41: 611–619.
- Kosiak, B.; Torp, M.; Skjerve, E.; Andersen, B. 2004. *Alternaria* and *Fusarium* in Norwegian grains of reduced quality—a matched pair sample study. *Int. J. Food Microbiol.* 93: 51–62.
- Kushiro, M.; Zheng, Y.; Nagata, R.; Nakagawa, H.; Nagashima, H. 2009. Limited surveillance of fumonisins in brown rice and wheat harvested in Japan. *J. Food Prot.* 72: 1327–1331.
- Langseth, W.; Bernhoft, A.; Rundberget, T.; Kosiak, B.; Gareis, M. 1999. Mycotoxin production and cytotoxicity of *Fusarium* strains isolated from Norwegian cereals. *Mycopathologia.* 144: 103–113.
- Lattanzio, V. M. T., Della Gatta, S., Suman, M., Visconti, A. 2011. Development and in house validation of a robust and sensitive solid-phase extraction – LC-MS/MS method for the quantitative determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, ochratoxin A, deoxynivalenol, zearalenone, T-2 and HT-2 toxins in cereal based foods. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 25: 1–12.
- Lee, T.; Oh, D. W.; Kim, H. S.; Lee, J.; Kim, Y. H.; Yun, S-H.; Lee, Y-W. 2001. Identification of deoxynivalenol and nivalenol producing chemotypes of *Gibberella zeae* by using PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2966–2972.
- Lee, T.; Han, Y-K; Kim, K-H; Yun, S. H.; Lee, Y-W. 2002. Tri 13 and Tri7 determine deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2148–2154.
- Leslie, J. F.; Pearson, C. A.; Nelson, P. E.; Toussoun, T. A. 1990. *Fusarium* species from corn, sorghum and soybean fields in the central and eastern United States. *Phytopathology* 88: 343–350.
- Leslie, J. F.; K. K. Klein. 1996. Female fertility and mating-type effects on effective population size and evolution in filamentous fungi. *Genetics* 144: 557–567.
- Leslie, J.F.; Summerell, B.A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Professional, Ames, Iowa, USA.

- Liu, C.; Liu, F.; Xu, W.; Kofoet, A.; Humpf, H. U.; Jiang, S. 2005. Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in asparagus from Shandong province, P. R. China. *Food Addit. Contam.* 22: 673–676.
- Logrieco, A.; Mule, G.; Moretti, A.; Bottalico, A. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* 108:597-609.
- Lorenz, K. 1986. Effects of black point on grain composition and baking quality of New Zealand wheat. *N. Z. J. Agric. Res.* 29: 711-718.
- Lori, G.A.; Sisterna, M.N. 2001. Occurrence and distribution of *Fusarium* spp. associated with durum wheat seed from Argentina. *J. Plant Pathol.* 83: 63-67.
- Lori, G.; Sisterna, M.; Haidukowsky, M.; Rizzo, I. 2003. *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol contamination in the durum wheat area of Argentina. *Microbiol. Res.* 158: 1–7.
- Lynch, M.; Walsh, B. 1998. Genetics and Analysis of Quantitative Traits. Sunderland, MA, Sinauer.
- Manthey, F. A.; Wolf-Hall, C. E.; Yalla, S.; Vijayakumar, C.; Carlson, D. 2004. Microbial loads, mycotoxins, and quality of durum wheat from the 2001 harvest of the northern plains region of the United States. *J. Food Prot.* 67: 772-80.
- Marasas, W. F. O. 1996. Fumonisins: history, world-wide occurrence and impact. En Fumonisins in Food. Jackson, L.; DeVries, J. W.; Bullerman, L. B. Eds. Plenum Press: New York, USA. Pp 1-16.
- Marasas W. F. O.; Riley R. T.; Hendricks, K. A.; Stevens, V. L. y col. 2004. Fumonisins disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *J Nutr.* 134: 711-716.
- Martínez-Culebras, P. V.; Sempere, C. A.; Hervás, S. M.; Elizaquivel, P.; Aznar, R.; Ramón D. 2009. Molecular characterization of the black *Aspergillus* isolates responsible for ochratoxin A contamination in grapes and wine in relation to taxonomy of *Aspergillus* section Nigri. *Int J Food Microbiol.* 132: 33–41.
- Martins, M. L.; Martins, H. M.; Bernardo, F. 2001. Fumonisins B₁ and B₂ in black tea and medicinal plants. *J. Food Prot.* 64: 1268–1270.
- Mathre, D. 1997. Compendium of barley diseases, 2nd ed. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Mayr, E. 1940. Speciation phenomena in birds. *Am. Naturalist* 74: 249–278.

- McCormick, S. 2003. The role of DON in pathogenicity. En: *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*. K. J. Leonard y W. R. Bushnell, Eds. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, USA. pp: 165-183.
- McDermott, J. M.; McDonald, B. A. 1993. Gene flow in plant pathosystems. *Annu Rev Phytopathol* 31: 353–373.
- McMullen, M.; Jones, R.; Gallenberg, D. 1997. Scab of wheat and barley: A re-emerging disease of devastating impact. *Plant Dis.* 81: 1340-1348.
- Meek, I.B.; Peplow, A.W.; Ake, C.; Phillips, T. D.; Beremand, M.N. 2003. Tri1 encodes the cytochrome P450 monooxygenase for C-8 hydroxylation during trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides* and resides upstream of another new *Tri* gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1607–1613.
- Merrill, A. H. Jr.; Sullards, M. C.; Wang, E.; Voss, K. A.; Rilet, R. T. 2001. Sphingolipid metabolism: Roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environ. Health Perspec.* 109: 283-289.
- Merrill, A. H. Jr. 2002. De novo sphingolipid biosynthesis: A necessary, but dangerous, pathway. *J. Biol. Chem.* 227: 25843-25846.
- Mesterházy, A. 1995. Types and components of resistance to *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Breeding.* 114: 377–386.
- Mesterházy, A. 2003. Breeding wheat for *Fusarium* head blight resistance in Europe, Capítulo 9. En: *Fusarium Head Blight of wheat and barley*. Leonard, K. and Bushnell, W. The American Phytopathological Society, St Paul, MN, USA. pp: 211-240.
- Milgroom, M. G. 1996. Recombination and the multilocus structure of fungal populations. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34: 457-477.
- Miller, J. D.; Young, J. C.; Sampson, D. R. 1985. Deoxynivalenol and *Fusarium* head blight resistance in spring cereals. *J Phytopathol.* 113: 359–367.
- Minervini, F.; Fornelli, F.; Flynn, K. M. 2004. Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and fumonisin B₁ in a human erythroleukemia cell line. *Toxicol. Vitro* 18: 21-28.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Republica Argentina. 2013. <http://www.minagri.gob.ar>
- Mishra, P. K; Fox, R. T. V.; Culham, A. 2003. Inter-simple sequence repeat and aggressiveness analyses revealed high genetic diversity, recombination and long range dispersal in *Fusarium culmorum*. *Ann App Biol* 143: 291-301

- Mishra, P. K.; Tewari, J. P.; Clear, R. M.; Turkington, T. K. 2004. Molecular genetic variation and geographical structuring in *Fusarium graminearum*. *Ann App Biol* 145: 299-307.
- Missmer, S.A.; Suarez, L.; Felkner, M.; Wang, E.; Merrill, A. H. Jr.; Rothman, K. J.; Hendricks, K. A. 2006. Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas-Mexico border. *Environ. Health Persp.* 114: 237-41.
- Molto, G.A.; Gonzalez, H.H.; Resnik, S.L.; Pereyra-Gonzalez, A. 1997. Production of trichothecenes and zearalenone by isolates of *Fusarium* spp. from Argentinian maize. *Food Addit. Contam.* 14: 263-268.
- Morrison, E.; Rundberget, T.; Kosiak, B.; Aastveit, A. H.; Bernhoft, A. 2002. Cytotoxicity of trichothecenes and fusarochromanone produced by *Fusarium equiseti* strains isolated from Norwegian cereals. *Mycopathologia.* 153: 49– 56.
- Moschini, R.C.; Carranza, M.R.; Carmona, M. 2004. Meteorological-based predictions of wheat head blight epidemic in the southern Argentinean pampas region. *Cereal Res Commun.* 32: 45-52.
- Moschini, R. C.; Bischoff, S.; Martínez, M. I. 2007a. Variabilidad climática y enfermedades. Caso de estudio: fusariosis de la espiga de trigo.
- Moschini, R. C.; Canteros N.; Martínez, M. 2007b. Modelos predictivos basados en variables meteorológicas procesadas entre umbrales de acumulación térmica. Inédito
- Mugrabi de Kuppler A. L.; Steiner U.; Sulyok M.; Krska R.; Oerke E.-C. 2011. Genotyping and phenotyping of *Fusarium graminearum* isolates from Germany related to their mycotoxin biosynthesis. *Int J Food Microbiol* 151: 78–86
- Murthy, M. R.; Radouco-Thomas, S.; Bharucha, A. D.; Levesque, G.; Pandian, S.; Radouco-Thomas, C. 1985. Effects of trichothecenes (T-2 toxin) on protein synthesis *in vitro* by brain polysomes and messenger RNA. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 9: 251–258.
- Musser, S. M.; Plattner, R. D. 1996. Identification of a new series of fumonisins containing 3-hydroxypyridine. *J. Nat. Prod.* 59: 970-972
- Nash, S. N.; Snyder, W.C. 1962. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean rot *Fusarium* in field soils. *Phytopathology.* 73: 458-462.
- Neal, C.; Richardson, A.; Hurst, S.; Tortorano, A.; Viviani, A.; Stevens, D.; Balajee, S. 2011. Global population structure of *Aspergillus terreus* inferred by ISSR typing reveals geographical subclustering. *Bmc Microbiology* 11: 203.

- Nei, M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 3321–3323.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583–590.
- Nei, M.; Li, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 10: 5269–5273.
- Nelson, P. E.; Toussoun, T. A.; Marasas, W. F. O. 1983. *Fusarium* species An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State. University Press. University Park.
- Ni, M.; Feretzaki, M.; Sun, S.; Wang, X.; Heitman, J. 2011. Sex in Fungi. *Annu Rev Genet.* 45: 405–430.
- Nocente, F. 2013. Sicurezza delle produzioni cerealicole: relazioni tra fusariosi della spiga e presenza di micotossine nelle cariosidi. Tesis Doctoral. Università Campus Bio-Medico di Roma, Roma, Italia.
- O'Donnell, K.; Cigelnik, E.; Nirenberg, H. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90: 465–493.
- O'Donnell, K.; Kistler, H. C.; Tacke, B. K.; Casper, H. H. 2000. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 7905–7910.
- O'Donnell, K.; Ward, T. J.; Geiser, D. M.; Kistler, H. C.; 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. *Fung. Genet. Biol.* 41:600–623.
- O'Donnell, K.; Ward, T. J.; Abera, D.; Kistler, H. C.; Aoki, T.; Orwig, N.; Kimura, M.; Bjørnstad Å.; Klemsdal, S. S. 2008. Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. *Fung. Genet. Biol.* 45: 1514–1522.
- Ocamb, C.; Juzwik, M. J.; Martin, F. B. 2002. *Fusarium* spp. and *Pinus strobus* seedlings: Root disease pathogens and taxa associated with seed. *New Forests* 24: 67–79.
- Osborne, L.; Stein, J. 2007. Epidemiology of *Fusarium* head blight on samall-grain cereals. *Int. J. Food Micro.* 119: 103–108.

- Otto, C. D.; Kianina, S. F.; Elias, E. M.; Stack, R. W.; Joppa, L. R. 2002. Genetic dissection of a major *Fusarium* head blight QTL in tetraploid wheat. *Plant Mol. Biol.* 48: 625-632.
- Palacios, S.; Ramírez, M.L.; Cabrera Zalazar, M.; Farnochi, M.C.; Zappacosta, D.; Chiacchiera, S.; Chulze, S.N.; Torres, A.M. 2011. Occurrence of *Fusarium* spp. and fumonisin in durum wheat grains. *J. Agricult. Food Chem.* 59: 12264–12269.
- Pan, D.; Calero N.; Mionetto A.; Bettucci L. 2013. Trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* from wheat in Uruguay. *Int Food Microbiol* 162:120–123.
- Pascale, M.; Bottalico, A.; Pancaldi, D.; Perrone, G.; Visconti, A. 2002. Occurrence of deoxynivalenol in cereals from experimental fields in various Italian regions. *Petria.* 12: 123-129.
- Peplow, A.W.; Meek, I.B.; Wiles, M.C.; Phillips, T.D.; Beremand, M.N. 2003. Tri16 is required for esterification of position C-8 during trichothecene mycotoxin production by *Fusarium sporotrichioides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5935–5940.
- Pitt, J. I. 1979. The Genus *Penicillium* and Its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London.
- Pöggeler, S. 2001. Mating-type for classical strain improvements of ascomycetes. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 56: 589-601.
- Pomeranz, Y.; Bechtel, D.B.; Sauer, D.B.; Seitz, L.M. 1990. *Fusarium* head blight (scab) in cereal grains. *Adv. Cereal Sci. Technology.* 10: 373-433.
- Pradeep, R.; Sarla, N.; Siddiq, E. A. 2002. Inter simple sequence repeats (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17
- Proctor, R. H.; Desjardins, A. E.; Plattner, R. D.; Hohn, T. M. 1999. A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Fungal Genet Biol.* 27: 100–112.
- Proctor, R. H.; Brown, D. W.; Plattner, R. D.; Desjardins, A. 2003. Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. *Fungal Genet Biol.* 38: 237–249.
- Proctor, R. H.; Plattner, R. D.; Desjardins, A. E.; Busman, M.; Butchko, R. A. E. 2006. Fumonisin production in the maize pathogen *Fusarium verticillioides*: genetic basis of naturally occurring chemical variation. *J Agric Food Chem.* 54: 2424–2430.
- Proctor, R. H.; Busman, M.; Seo, J.A.; Lee, Y. W.; Plattner, R. D. 2008. A fumonisin biosynthetic gene cluster in *Fusarium oxysporum* strain O-1890 and the genetic basis for B versus C fumonisin production. *Fungal Genet Biol.* 45: 1016–1026.

- Proctor, R. H.; McCormick, S. P.; Alexander, N. J.; Desjardins, A. E. 2009. Evidence that a secondary metabolic biosynthetic gene cluster biosynthesis has grown by gene relocation during evolution of the filamentous fungus *Fusarium*. *Mol Microbiol.* 74: 1128-1142.
- Proctor, R. H.; Desjardins, A. E.; Moretti, A. 2010. Biological and Chemical Complexity of *Fusarium proliferatum*. En: *The Role of Plant Pathology in Food Safety and Food Security*. Strange, R.N. and Gullino, M.L. Eds. Plant Pathology in the 21st Century Vol 3, pp: 97-111.
- Prodi, A.; Tonti, S.; Nipoti, P.; Pancaldi, D.; Pisi, A. 2009. Identification of deoxynivalenol and nivalenol producing chemotypes of *Fusarium graminearum* isolates from durum wheat in a restricted area of Northern Italy. *J. Plant Pathol.* 91: 611-615.
- Prodi, A.; Purahong, W.; Tonti, S.; Salomoni, D.; Nipoti, P.; Covarelli, L.; Pisi, A. 2011. Difference in Chemotype Composition of *Fusarium graminearum* Populations Isolated from Durum Wheat in Adjacent Areas Separated by the Apennines in Northern-Central Italy. *Plant Pathol. J.* 27: 354-359.
- Puri, K. D.; Zhong, S. 2010. The 3ADON population of *Fusarium graminearum* found in North Dakota is more aggressive and produces a higher level of DON than the prevalent 15ADON population in spring wheat. *Phytopathology* 100: 1007-1014.
- Quarta, A., Mita, G., Haidukowski, M., Santino, A., Mule, G., Visconti, A. 2005. Further data on trichothecene chemotypes of European *Fusarium culmorum* isolates. *Food Add. Contam.* 22: 309-315.
- Quarta, A.; Mita, G.; Haidukowski, M.; Logrieco, A.; Mule, G.; Visconti, A. 2006. Multiplex PCR assay for the identification of nivalenol 3 and 15 acetyl deoxynivalenol chemotypes in *Fusarium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 259: 7-13.
- Ramírez, M. L.; Pascale, M.; Chulze, S.; Reynoso, M. M.; March, G.; Visconti, A. 1996. Natural occurrence of fumonisins and their correlation to *Fusarium* contamination in commercial corn hybrids growth in Argentina. *Mycopathologia* 135: 29-34.
- Ramírez, M. L.; Reynoso, M. M.; Farnochi, M. C.; Chulze S. 2006. Vegetative compatibility and mycotoxin chemotypes among *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) isolates from wheat in Argentina. *Eur. J. Plant Pathol.* 115: 139-148.
- Ramírez, M. L.; Oviedo, M. S.; Farnochi, M. C.; Chulze, S. N. 2006b. Mycological and mycotoxin survey on wheat during a non epidemic FHB year in Argentina. En *Proceeding of 9th European Fusarium Seminar*, Wageningen, The Netherlands, September 12-22. p. 34.

- Ramírez, M. L.; Reynoso, M. M.; Farnochi, M. C.; Torres, A. M.; Leslie, J. F.; Chulze, S. N. 2007. Population genetic structure of *Giberella zeae* isolated from wheat in Argentina. *Food Addit. Contam.* 24: 1115-1120.
- Rees, R. G.; Martin, D. J.; Law, D. P. 1984. Black point in bread wheat: effects on quality and germination, and fungal associations. *Aust. J Exp. Agric. Anim. Husb.* 24: 601-605.
- Reynolds, D. R. 1993. The fungal holomorph: An overview. En: *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*. Reynolds, D. R. and Taylor, J. W. Eds. CAB International, Wallingford, UK. Pp: 15–25.
- Reynoso, M. M.; Ramírez, M. L.; Torres, A.; Chulze, S. 2011. Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* strains isolated from wheat in Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* 145: 444–448.
- Rohlf, F. J. 1990. Fitting curves to outlines. En: *Proceedings of the Michigan morphometrics workshop*. Spec. Publ. No. 2. Rohlf, F. J. and Bookstein, F. L. Eds. University of Michigan Museum of Zoology, Ann Arbor. Pp: 167-177.
- Rossman, A.Y. 1996. Morphological and molecular perspectives on systematics of the *Hypocreales*. *Mycologia* 89: 1-19.
- Rossman, A. Y.; Samuels, G. J.; Rogerson, C. T.; Lowen, R. 1999. Genera of *Bionectriaceae*, *Hypocreaceae* and *Nectriaceae* (*Hypocreales*, *Ascomycetes*). *Stud Mycol.* 42: 1-248.
- Rudd, J.; Horsley, R.; McKendry, A.; Elias, E. 2001. Host plant resistance genes for *Fusarium* head blight: sources, mechanisms and utility in conventional breeding systems. *Crop Sci.* 41: 620–627.
- Ryu J. C.; Ohtsubo K.; Izumiyama N.; Mori M.; Tanaka T.; Ueno Y. 1987. Effects of nivalenol on the bone marrow in mice. *Journal of Toxicology* 12: 11-21.
- Sampietro D.; Marin P.; Iglesias J.; Presello D.; Vattuone M.; Catalan C.; Gonzalez Jaen M. T. 2010. A molecular based strategy for rapid diagnosis of toxigenic *Fusarium* species associated to cereal grains from Argentina. *Fungal Biology* 114: 74-81.
- Sampietro, D.; Díaz, C. G.; Gonzalez, V. y col. 2011. Species diversity and toxigenic potential of *Fusarium graminearum* complex isolates from maize fields in northwest Argentina. *Int J Food Microbiol* 145: 359–364.
- Samuels, G. J.; Hallet, I. C. 1983. *Microdochium stoveri* and *Monographella stoveri*, new combinations for *Fusarium stoveri* and *Micronectriella stoveri*. *T Brit Mycol Soc* 81: 473-483.

- Samuels, G. J.; Nirenberg, H. I.; Seifert, K. A. 2001. Perithecial species of *Fusarium*. En: Summerell, B. A., Leslie, J. F., Backhouse, D., Bryden, W. L., Burgess, L. W. Eds. *Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. pp: 1-14.
- Sarver, B.; Ward, T.; Gale, L.; Broz, K.; Kistler, H. C.; Aoki, T.; Nicholson, P.; Carter, J.; O'Donnell, K., 2011. Novel *Fusarium* head blight pathogens from Nepal and Louisiana revealed by multilocus genealogical concordance. *Fungal Genet Biol* 48: 1096–1107.
- Schmale III, D.G.; Bergstrom, G.C. 2003. *Fusarium* head blight in wheat. The Plant Health Instructor. DOI:10.1094/PHI-I-2003-0612-01.
- Schmale, D. G.; Leslie, J. F.; Zeller, K. A.; Saleh, A. A.; Shields, E. J.; Bergstrom, G. C. 2006. Genetic structure of atmospheric populations of *Gibberella zeae*. *Phytopathology*. 96: 1021–1026.
- Schmale, D. G.; Wood-Jones, A. K.; Cowger, C.; Bergstrom, G. C.; Arellano, C. 2011. Trichothecene genotypes of *Gibberella zeae* from winter wheat fields in the eastern USA. *Plant Pathol*. 60: 909–917.
- Scholz, U.; Steffensen, B. 2001. Effect of *Gibberella zeae* ascospores and *Fusarium graminearum* conidia on *Fusarium* Head Blight severity and deoxynivalenol production in barley. En [Proc.] 2001 National *Fusarium* Head Blight Forum, 8-10 Diciembre 2001, Erlanger, KY, pp: 147-150.
- Schroeder, H. W.; Christensen, J. J. 1963. Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*. *Phytopathology* 53: 831–838.
- Seo, J.-A.; Proctor, R. H.; Plattner, R. D. 2001. Characterization of four clustered and coregulated genes associated with fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet. Biol.* 34: 155-165.
- Shephard, G. S.; Sydenham, E. W.; Thiel, P. G.; Gelderblom, W. C. A. 1990. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Liq. Chromatogr.* 13: 2077- 2080.
- Shephard, G. S.; Van Der Westhuizen, L.; Gatyeni, P. M.; Katerere, D. R.; Marasas, W. F. O. 2005. Do fumonisin mycotoxins occur in wheat? *J. Agric. Food Chem.* 53: 9293-9296.
- Slatkin, M. 1981. Estimating levels of gene flow in natural populations. *Genetics* 99: 323-335.
- Stack, R. W.; McMullen, M. P. 1985. Head blighting potential of *Fusarium* species associated with spring wheat heads. *Can. J. Plant Pathol.* 7: 79–82.

- Stack, R. W.; Elias, E. M.; Fetch, J. M.; Miller, J. D.; Joppa, L. R. 2002. *Fusarium* head blight reaction of Langdon durum - *Triticum dicoccoides* chromosome substitution lines. *Crop Sci.* 42: 637- 642.
- Stankovic, S.; Levic, J.; Petrovic, T.; Logrieco, A.; Moretti, A. 2007. Pathogenicity and mycotoxin production by *Fusarium proliferatum* isolated from onion and garlic in Serbia. *Eur J Plant Pathol.* 118: 165–172
- Stankovic, S.; Levic, J.; Ivanovic, D.; Krnjaja, V.; Stankovic, G.; Tancic, S. 2012. Fumonisin B₁ and its co-occurrence with other fusariotoxins in naturally-contaminated wheat grain. *Food Control* 23: 384-388.
- Starkey, D. E.; Ward, T. J.; Takayuki, A. y col. 2007. Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity. *Fungal Genet Biol.* 44: 1191–1204.
- Steenkamp, E. T.; Wingfield, B. D.; Coutinho, T. A.; Zéller, K. A.; Wingfield, M. J.; Marasas, W. F. O.; Leslie, J. F. 2000. PCR-based identification of *MAT-1* and *MAT-2* in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Appl Environ Microb.* 66: 4378-4382.
- Steiner, B.; Lemmens, M.; Griesser, M.; Scholz, U.; Schondelmaier, J.; Buerstmayr, H. 2004. Molecular mapping of resistance to *Fusarium* head blight in the spring wheat cultivar Frontana. *Theor. Appl. Gen.* 109: 215-224.
- Stępień, Ł.; Koczyk, G.; Waśkiewicz, A. 2011. Genetic and phenotypic variation of *Fusarium proliferatum* isolates from different host species. *J Appl Genetics* 52: 487–496.
- Steyn, P.S. 1971. Fungal toxins. En: Microbiol toxins. Ciegler, A.; Kadis, S.; Ajl, S. J. Eds. Academic Press, New York, USA. Pp: 179-205.
- Steyn, P. S. 1995. Mycotoxins, general view, chemistry and structure, *Toxicol. Lett.* 82: 843-854.
- Sutton, J.C. 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Can. J. Plant Pathol.* 4: 195–209.
- Swofford, D. L. 2001. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods), version 4.0*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
- Taylor, J. W.; Jacobson D. J.; Kroken, S.; Kasuga, T.D.; Geiser, M.; Hibbett, D. S.; Fisher M. C. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet Biol.* 31: 21-32.
- Tekauz, A.; McCallum B.; Ames N.; Fetch J. M. 2004. *Fusarium* head blight of oat – Current status in western Canada. *Can J Plant Pathol.* 26: 473-479.

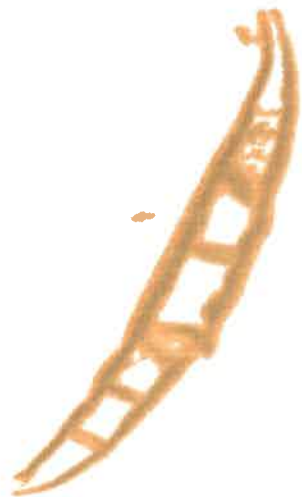
- Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673–4680.
- Thrane, U. 1989. *Fusarium* species and their specific profiles of secondary metabolites. En: *Fusarium-Mycotoxins, taxonomy and pathogenicity*. Chelkowski, J. Ed. Elsevier, Amsterdam. Pp: 199-226.
- Tirado, M.C.; Clarke, R.; Jaykus L.A.; McQuatters-Gollop, A.; Frank, J.M. 2010. Climate change and food safety: A review. *Food Res Int.* 43: 1745–1765.
- Torres, A.; Ramirez, M. L.; Chulze, S. 2010. *Fusarium* and fumonisins in maize in South America. En *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons*. Rai, M.; Varma, A. Eds. Springer-Verlag, Berlin, Alemania. Pp: 179-200.
- Tóth, B.; Mesterhazy, A.; Horvath, Z.; Bartok, T.; Varga, M.; Varga, J. 2005. Genetic variability of central European isolates of the *Fusarium graminearum* species complex. *Eur J Plant Pathol.* 113: 35–45.
- Trail, R.; Xu, H.; Loranger, R.; Gadoury, D. 2002. Physiological and environmental aspects of ascospore discharge in *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). *Mycologia* 94: 181-189.
- Tseng, T. C.; Tu, J. C. 1997. Mycoflora and mycotoxins in adzuki and mung beans produced in Ontario, Canada. *Microbios.* 90: 87–95.
- Tu, C. 1950. Factors affecting the reaction of wheat varieties to head blight infection caused by *Gibberella zeae*. Tesis Doctoral, Universidad de Ohio, Columbus, OH. p 155.
- Ueno Y. 1983. En: *Trichothecenes: Chemical, Biological and Toxicological Aspects*. Ueno Y. Ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. Pp: 135-146.
- Urughucki, K.; Yamazahi, M. 1978. Toxicology, biochemistry and pathology of mycotoxins. Beltsville Symposia in Agricultural Research Kodansha scientific books. Halsted Press, Tokio.
- Visconti, A.; Pascale, M. 2010. An overview on *Fusarium* mycotoxins in the durum wheat pasta production chain. *Cereal Chem.* 87: 21–27.
- von Bargen, S.; Martínez, O.; Schadock, I.; Eisold, A. M.; Gossmann, M.; Büttner, C. 2009. Genetic variability of phytopathogenic *Fusarium proliferatum* associated with crown rot in *Asparagus officinalis*. *J Phytopathol.* 157: 446–456

- Waalwijk, C.; Kastelein, P.; De Vries, I.; Kerényi, Z.; Van der Lee, T.; Hesselink, T.; Köhl, J.; Kema, G. H. J. 2003. Major changes in *Fusarium* spp. in wheat in the Netherlands. *Eur J Plant Pathol.* 109: 743–754.
- Walker, S. L.; Leath, S.; Hagler, W. M.; Murphy, J. P. 2001. Variation among isolates of *Fusarium graminearum* associated with Fusarium head blight in North Carolina. *Plant Dis.* 85: 404–410.
- Ward, T. J.; Bielawski, J. P.; Kistler, H. C.; Sullivan, E.; O'Donnell, K. 2002. Ancestral polymorphism and adaptative evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99: 9278–9283.
- Ward, T. D.; Clear, R. M.; Rooney, A. P.; O'Donnell, K.; Gaba, D.; Patrick, S.; Starkey, D. E.; Gilbert, J.; Geiser, D. M.; Nowicki, T. W. 2008. An adaptive evolutionary shift in *Fusarium* head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America. *Fungal Gen Biol.* 45: 473–484.
- Weir, B. S. 1979. Inferences about linkage disequilibrium. *Biometrics* 53: 235–254.
- White, D. G. 1999. Compendium of Corn Diseases, 3rd ed. White, D. G. Ed. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- WHO. 2001. T-2 and HT-2 toxins. En: *Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food* Canady, R. A.; Coker, R. D.; Egan, S. K.; Krska, R.; Olsen, M.; Resnik, S.; Schlatter, J. Eds. Food Additives Series N° 47, Geneve, Switzerland. Pp: 557-680.
- Wright, S. 1951. The genetic structure of populations. *Ann Eugen.* 15: 323-354.
- Wu, W. D.; Nelson, P. E.; Cook, M. E.; Smalley, E. B. 1990. Fusarochromanone production by *Fusarium* isolates. *Appl Environ. Microbiol.* 56: 2989-2993.
- Yeh, F. C.; Yang, R. C.; Boyle, T. B. J.; Ze, Z. H.; Mao, J. X. 1997. POPGENE: Microsoft Windows_ Based Freeware for Population Genetic Analysis, Version 1.32. Edmonton, Canada: University of Alberta.
- Yli-Mattila, T.; Gagkaeva, T.; Ward, T. J.; Aoki, T.; Kistler, H. C.; O'Donnell, K. 2009. A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the far east of Russia. *Mycologia* 101: 841–852.
- Yli-Mattila, T. 2010. Ecology and evolution of toxigenic *Fusarium* species in cereals in northern Europe and Asia. *J. Plant Pathol.* 92: 7–18.
- Yli-Mattila, T.; Gagkaeva, T. 2010. Molecular chemotyping of *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. cerealis* isolates from Finland and Russia. En: *Molecular Identification*

of Fungi. Gherbawy, Y. and Voigt, K. Eds. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp: 159–178.

- Yoshizawa, T.; Morooka, N. 1973. Deoxynivalenol and its monoacetate: new mycotoxins from *Fusarium roseum* and moldy barley. *Agric. Biol. Chem.* 37: 2933–2934.
- Yoshizawa, T.; Morooka, N. 1974. Studies on the toxic substances in the infected cereals. III. Acute toxicities of new trichothecene mycotoxins: deoxynivalenol and its monoacetate. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 15: 261–269.
- Yun, S. H.; Arie, T.; Kaneko, I.; Yoder, O. C.; Turgeon, B. G. 2000. Molecular organization of mating type loci in heterothallic, homothallic, and asexual *Gibberella/Fusarium* species. *Fungal Genet Biol.* 31: 7-20.
- Zeller, K. A.; Bowden, R. L.; Leslie, J. F. 2003a. Diversity of epidemic populations of *Gibberella zeae* from small quadrants in Kansas and North Dakota. *Phytopathology* 93: 874–880.
- Zeller, K. A.; Vargas, J. I.; Valdovinos-Ponce, G.; Leslie, J. F.; Bowden, R. L. 2003b. Population genetic differentiation and lineage composition among *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) in north and South America. *Fungal Gen. Newsl.* 50: 143.
- 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. *Mol. Ecol.* 13: 563-571.
- Zhang, H.; Chen, W. Q.; Xu, J.; Xu, J. S.; Feng, J. 2011. First report of *Fusarium cerealis* causing Fusarium head blight on barley in China. *Plant Dis.* 95: 774.
- Zhang, H.; Van der Lee, T.; Waalwijk, C.; Chen, W.; Xu, J. y col. 2012. Population Analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat in China show a shift to more aggressive isolates. *PLoS ONE* 7:31722. doi:10.1371/journal.pone.0031722
- Zietkiewicz, E.; Rafalski, A.; Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-218.

Anexos



VII. ANEXO

Tabla III.1. Cepas de *Fusarium proliferatum* utilizadas en el estudio de diversidad genética

Cepa ITEM	Huésped	Origen geográfico	Año
15654	Trigo	Bahía Blanca	2008
15655	Trigo	Bahía Blanca	2008
15656	Trigo	Bahía Blanca	2008
15657	Trigo	Bahía Blanca	2008
15658	Trigo	Bahía Blanca	2008
15659	Trigo	Bahía Blanca	2008
15660	Trigo	Bahía Blanca	2008
15661	Trigo	Bahía Blanca	2008
15662	Trigo	Bahía Blanca	2008
15663	Trigo	Bahía Blanca	2008
15664	Trigo	Bahía Blanca	2008
15665	Trigo	Bahía Blanca	2008
15666	Trigo	La Dulce	2009
15667	Trigo	La Dulce	2009
15668	Trigo	La Dulce	2009
15669	Trigo	La Dulce	2009
15670	Trigo	La Dulce	2009
15671	Trigo	La Dulce	2009
15672	Trigo	La Dulce	2009
15673	Trigo	La Dulce	2009
15674	Trigo	La Dulce	2009
15675	Trigo	Pieres	2010
15676	Trigo	Pieres	2010
15677	Trigo	Pieres	2010
15678	Trigo	Pieres	2010
15679	Trigo	Pieres	2010
15680	Trigo	Pieres	2010
15681	Trigo	Barrow	2010
15682	Trigo	Miramar	2010
15683	Trigo	Miramar	2010
15684	Trigo	Barrow	2010
15685	Trigo	La Dulce	2010
15686	Trigo	Barrow	2010
15687	Trigo	La Dulce	2010
15688	Trigo	Miramar	2010
15689	Trigo	Pieres	2011
15690	Trigo	Pieres	2011
15691	Trigo	Pieres	2011
15692	Trigo	Pieres	2011

15693	Trigo	Pieres	2011
15694	Trigo	Pieres	2011
15695	Trigo	Pieres	2011
15696	Trigo	Pieres	2011
15697	Trigo	Pieres	2011
15698	Trigo	Pieres	2011
15699	Trigo	Pieres	2011
15700	Trigo	Barrow	2011
15701	Trigo	Cabildo	2011
15702	Trigo	Bordenave	2011
15703	Trigo	Bordenave	2011
15704	Trigo	Barrow	2011
15705	Trigo	Bordenave	2011
15706	Trigo	La Dulce	2011
15707	Trigo	Bordenave	2011
15708	Trigo	Barrow	2011
15709	Trigo	Cabildo	2011
15710	Trigo	Barrow	2011
15711	Trigo	La Dulce	2011
15712	Trigo	Balcarce	2011
15713	Trigo	Barrow	2011
15714	Trigo	Cabildo	2011
15715	Trigo	La Dulce	2011
15716	Maíz	Buenos Aires	1996/97
15717	Maíz	Buenos Aires	1996/97
15718	Maíz	Buenos Aires	1996/97
15719	Maíz	Buenos Aires	1996/97
15720	Maíz	Buenos Aires	1996/97
15721	Maíz	Buenos Aires	1996/97
15722	Maíz	Buenos Aires	1996/97
15723	Maíz	Buenos Aires	1996/97
15724	Maíz	Buenos Aires	1996/97

Tabla III.2. Cepas de *Fusarium proliferatum* y *F. verticillioides* utilizadas en la determinación de capacidad toxicogénica

Cepa ITEM	Especie	Huésped	Origen geográfico	Año
15655	<i>F. verticillioides</i>	Trigo	Bahía Blanca	2008
15656	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Bahía Blanca	2008
15657	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Bahía Blanca	2008
15658	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Bahía Blanca	2008
15659	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Bahía Blanca	2008
15661	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Bahía Blanca	2008
15662	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Bahía Blanca	2008
15663	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Bahía Blanca	2008
15664	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Bahía Blanca	2008
15666	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	La Dulce	2009
15667	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	La Dulce	2009
15668	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	La Dulce	2009
15669	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	La Dulce	2009
15670	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	La Dulce	2009
15671	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	La Dulce	2009
15672	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	La Dulce	2009
15673	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	La Dulce	2009
15674	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	La Dulce	2009
15675	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Pieres	2010
15676	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Pieres	2010
15677	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Pieres	2010
15678	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Pieres	2010
15679	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Pieres	2010
15680	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Pieres	2010
15682	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Miramar	2010
15683	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Miramar	2010
15684	<i>F. verticillioides</i>	Trigo	Barrow	2010
15685	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	La Dulce	2010
15686	<i>F. verticillioides</i>	Trigo	Barrow	2010
15687	<i>F. verticillioides</i>	Trigo	La Dulce	2010
15688	<i>F. verticillioides</i>	Trigo	Miramar	2010
15689	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Pieres	2011
15690	<i>F. verticillioides</i>	Trigo	Pieres	2011
15691	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Pieres	2011
15692	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Pieres	2011
15693	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Pieres	2011
15694	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Pieres	2011
15695	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Pieres	2011
15696	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Pieres	2011

15697	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Pieres	2011
15698	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Pieres	2011
15699	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Pieres	2011
15700	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Barrow	2011
15701	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Cabildo	2011
15702	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Bordenave	2011
15703	<i>F. verticillioides</i>	Trigo	Bordenave	2011
15705	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Bordenave	2011
15706	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	La Dulce	2011
15707	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Bordenave	2011
15708	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Barrow	2011
15709	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Cabildo	2011
15710	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Barrow	2011
15711	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	La Dulce	2011
15712	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Balcarce	2011
15713	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Barrow	2011
15714	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	Cabildo	2011
15715	<i>F. proliferatum</i>	Trigo	La Dulce	2011

Tabla IV.1. Incidencia natural de DON y NIV en muestras de trigo candeal

Muestra	Cosecha 2008/09		Cosecha 2010/11
	Concentración NIV ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	Concentración DON ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	Concentración DON ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)
BICRL	278,71 ^a	214,15 ^b	nd
BIFAC	234,79 ^a	3860 ^a	nd
BPLT	132,16 ^a	215,19 ^b	nd
BTOP	925,62 ^a	107,595 ^b	188
KOFA	nd ^c	367,85 ^b	274
TC-6	237 ^a	nd ^c	nd
TC-16	257 ^a	54,5 ^b	179,6
TC-17	200,5 ^a	175 ^b	nd
TC-18	203 ^a	459,5 ^b	355
TC-19	nd ^c	nd ^c	nd
TC-20	143 ^a	194,5 ^b	nd
TC-22	nd ^c	nd ^c	nd
TC-23	nd ^c	61,7 ^b	nd
TC-24	nd ^c	nd ^c	nd
TC-25	nd ^c	nd ^c	nd
CICCIO	580 ^a	272,81 ^b	-
TC-7	365,26	nd ^c	-
TC-8	nd ^c	nd ^c	-
TC-9	nd ^c	507 ^b	-
TC-10	nd ^c	nd ^c	-
TC-11	nd ^c	nd ^c	-
TC-12	nd ^c	60 ^b	-
TC-13	752 ^a	nd ^c	-
TC-14	650 ^a	nd ^c	-
TC-15	179 ^a	nd ^c	-
TC-26	-	-	nd
TC-27	-	-	nd
TC-28	-	-	nd
AMR	-	-	142,9
BESM	-	-	nd

nd: no detectado < 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Tabla IV.2. Producción de fumonisinas por cepas de *F. proliferatum* y *F. verticillioides* aisladas de trigo candeal

Cepa ITEM	Especie	FB ₁ (µg/g)	FB ₂ (µg/g)	FB ₃ (µg/g)	FBs totales (µg/g)
15655	<i>F. verticillioides</i>	97,65	43,50	159,95	301
15656	<i>F. proliferatum</i>	3,40	0,70	1,00	5
15657	<i>F. proliferatum</i>	n.d.	n.d.	n.d.	-
15658	<i>F. proliferatum</i>	0,90	0,50	n.d.	1
15659	<i>F. proliferatum</i>	7,25	0,65	0,85	8
15661	<i>F. proliferatum</i>	6,50	44,65	0,55	51
15662	<i>F. proliferatum</i>	139,30	89,40	23,75	252
15663	<i>F. proliferatum</i>	0,60	0,50	n.d.	1
15664	<i>F. proliferatum</i>	11,35	82,65	n.d.	94
15666	<i>F. proliferatum</i>	6,25	1,30	2,05	9
15667	<i>F. proliferatum</i>	167,60	104,65	40,20	312
15668	<i>F. proliferatum</i>	744,25	199,20	151,95	1095
15669	<i>F. proliferatum</i>	41,60	8,75	6,70	57
15670	<i>F. proliferatum</i>	1616,35	381,75	74,30	2072
15671	<i>F. proliferatum</i>	58,20	13,70	1,35	73
15672	<i>F. proliferatum</i>	9,50	3,45	0,70	13
15673	<i>F. proliferatum</i>	50,65	34,35	7,65	92
15674	<i>F. proliferatum</i>	2,35	15,55	n.d.	17
15675	<i>F. proliferatum</i>	85,30	30,70	29,30	145
15676	<i>F. proliferatum</i>	9,70	76,25	0,85	86
15677	<i>F. proliferatum</i>	106,75	29,10	19,55	155
15678	<i>F. proliferatum</i>	12,60	2,55	3,30	18
15679	<i>F. proliferatum</i>	102,85	16,95	25,40	145
15680	<i>F. proliferatum</i>	39,00	18,05	15,75	72
15682	<i>F. proliferatum</i>	20,75	9,90	5,45	36
15683	<i>F. proliferatum</i>	78,30	56,50	38,65	173
15684	<i>F. verticillioides</i>	194,70	103,15	22,45	320
15685	<i>F. proliferatum</i>	25,20	5,95	8,25	39
15686	<i>F. verticillioides</i>	27,65	8,75	11,75	48
15687	<i>F. verticillioides</i>	18,50	3,20	8,40	30
15688	<i>F. verticillioides</i>	43,25	19,00	35,10	97
15689	<i>F. proliferatum</i>	69,20	30,05	21,05	120
15690	<i>F. verticillioides</i>	30,60	27,80	63,85	122
15691	<i>F. proliferatum</i>	20,65	7,60	3,10	31
15692	<i>F. proliferatum</i>	88,35	51,05	28,95	168
15693	<i>F. proliferatum</i>	55,60	31,65	7,65	94
15694	<i>F. proliferatum</i>	136,50	41,75	12,70	190
15695	<i>F. proliferatum</i>	179,10	78,70	16,00	273
15696	<i>F. proliferatum</i>	4,90	40,85	n.d.	45
15697	<i>F. proliferatum</i>	19,85	151,30	n.d.	171

15698	<i>F. proliferatum</i>	152,80	42,70	21,30	216
15699	<i>F. proliferatum</i>	151,75	82,55	30,70	265
15700	<i>F. proliferatum</i>	6,55	3,10	2,55	12
15701	<i>F. proliferatum</i>	160,85	65,75	19,80	246
15702	<i>F. proliferatum</i>	93,25	22,45	40,70	156
15703	<i>F. verticillioides</i>	25,50	15,00	30,80	71
15705	<i>F. proliferatum</i>	164,80	50,05	27,20	242
15706	<i>F. proliferatum</i>	21,00	10,45	9,30	40
15707	<i>F. proliferatum</i>	52,00	27,55	9,05	88
15708	<i>F. proliferatum</i>	75,30	57,40	13,80	146
15709	<i>F. proliferatum</i>	43,50	19,90	25,05	88
15710	<i>F. proliferatum</i>	n.d.	n.d.	n.d.	-
15711	<i>F. proliferatum</i>	111,30	51,75	23,45	186
15712	<i>F. proliferatum</i>	2,25	0,80	0,95	4
15713	<i>F. proliferatum</i>	54,20	17,90	10,25	82
15714	<i>F. proliferatum</i>	2,30	0,55	0,55	3
15715	<i>F. proliferatum</i>	35,00	160,60	0,95	196

nd: no detectado < 50 µg/kg

Estadística Resultados punto IV.6.1. Evaluación del comportamiento de diferentes germoplasmas de trigo candeal ante la infección por *Fusarium graminearum* en condiciones de invernadero

Test de Normalidad

C:\Users\Sofia\Dropbox\Tesis\RESULTADOS\tabla Invernadero.IDB2:

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Severidad	33	0,00	7,18	0,97	0,8532

Homogeneidad de varianza

C:\Users\Sofia\Dropbox\Tesis\RESULTADOS\tabla Invernadero.IDB2:

Análisis de la varianza

Variable	N	R ^a	R ^a Aj	CV
RABS Severidad	33	0,46	0,22	79,62

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	335,59	10	33,56	1,89	0,1028
Genotipo	335,59	10	33,56	1,89	0,1028
Error	390,93	22	17,77		
Total	726,52	32			

ANOVA

Error	1651,51	22	75,07
Total	13485,85	32	

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=14,67118

Error: 75,0684 gl: 22

Genotipo Medias n E.E.

3	25,21	3	5,00	A
7	28,70	3	5,00	A B
5	30,27	3	5,00	A B
11	33,84	3	5,00	A B
8	34,91	3	5,00	A B
9	37,85	3	5,00	A B
4	42,10	3	5,00	B C
2	54,84	3	5,00	C D
10	57,18	3	5,00	D
6	78,50	3	5,00	E
1	82,79	3	5,00	E

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

Estadística resultados punto IV.6.2. Análisis de la producción de deoxinivalenol de espigas inoculadas en el ensayo de invernadero

ANOVA con datos transformados

C:\Users\Sofia\Dropbox\Tesis\RESULTADOS\toxina invernadero.IDB2:

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
NSC Toxina	33	0,96	0,95	668559,71

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	26,25	10	2,62	60,00	<0,0001
Columnal	26,25	10	2,62	60,00	<0,0001
Error	0,96	22	0,04		
Total	27,21	32			

10	-0,21	3	0,12	D
11	-0,01	3	0,12	D E
1	0,22	3	0,12	E
8	0,60	3	0,12	F
2	0,74	3	0,12	F
9	0,90	3	0,12	F
6	1,60	3	0,12	G

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

Correlación entre Severidad y Concentración de DON en las espigas

Pearson Product Moment Correlation

Data source: Data 1 in Notebook

Cell Contents:

DON cont.

Severidad

Correlation Coefficient: 0,549

P Value: 0,0804

Number of Samples: 11

There are no significant relationships between any pair of variables in the correlation table (P > 0,050).