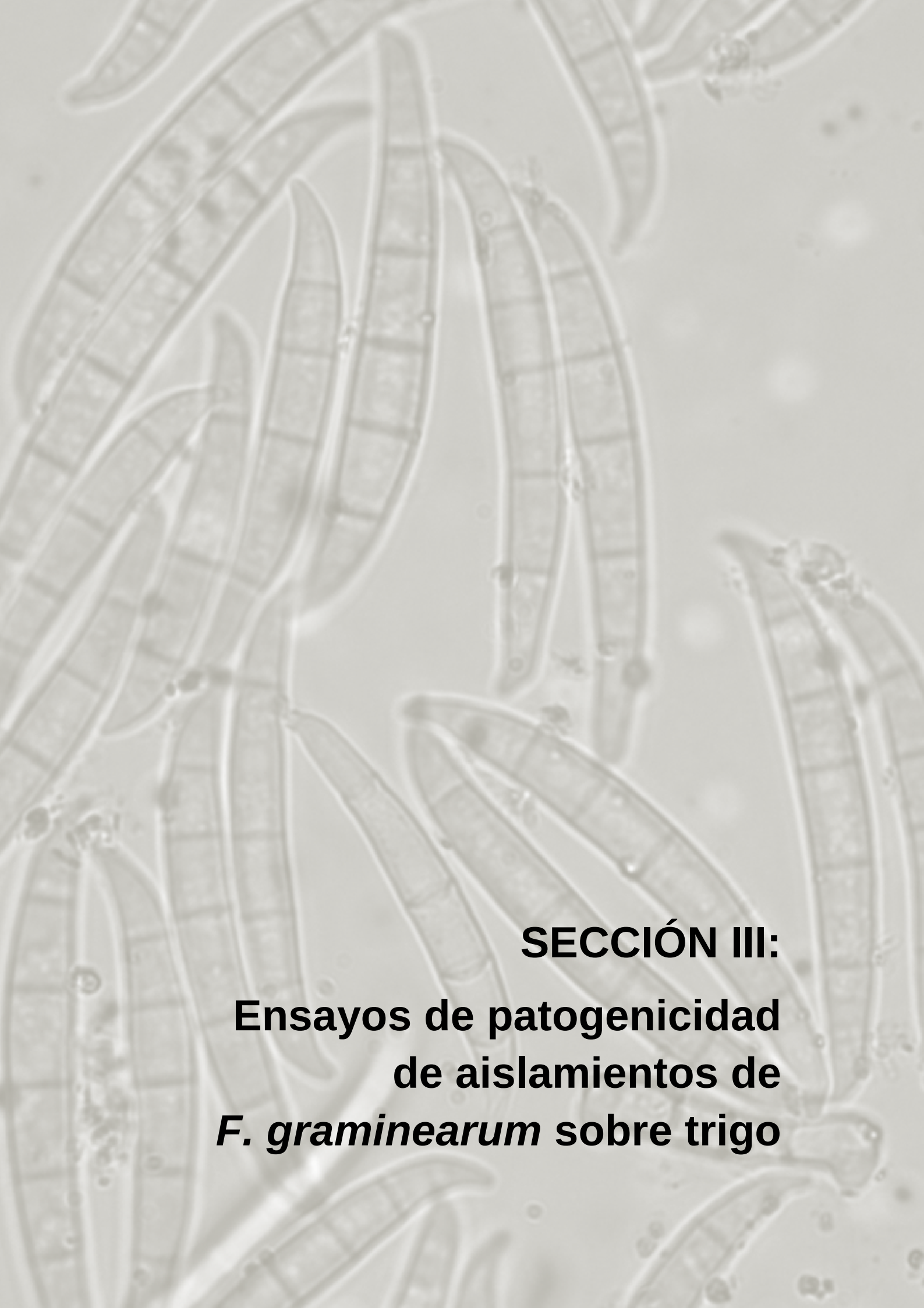


SECCIÓN III:

Ensayos de patogenicidad de aislamientos de *F. graminearum* sobre trigo

SECCIÓN III: Ensayos de patogenicidad de aislamientos de *F. graminearum* sobre trigo

INTRODUCCIÓN

Variabilidad en la agresividad de *F. graminearum*

La capacidad cuantitativa de una cepa de causar la enfermedad en una planta huésped susceptible en un patosistema específico se define como agresividad. La agresividad es un importante factor determinante de la capacidad potencial de una cepa de causar pérdidas de rendimiento.

Variación en la agresividad, en el tipo de micotoxina y en el nivel de producción de la micotoxina DON fue encontrado entre aislamientos de muestras en un mismo país o incluso en un mismo campo (Miedaner *et al*., 2001; Gale *et al*., 2002; Zeller *et al*., 2003. Las causas de la amplia variación en la agresividad y la producción de DON en *F. graminearum* aún no están totalmente clarificadas.

Varios genes están implicados en la agresividad, pero el número exacto de genes y su interacción todavía no se han determinado con exactitud en *F. graminearum*, existiendo pocos antecedentes al respecto. Cumagun *et al*. (2004) detectaron por lo menos dos QTL (locus de rasgos cuantitativos) para la agresividad. Se ha demostrado que las vías activadas por mitógenos juega un papel importante en la patogenicidad de muchos hongos filamentosos (Mayorga and Gold 1999; Xu *et al*, 1998). Genes MAP quinasa regulan la producción de enzimas que degradan la pared celular, es decir, la regulación de la inducción temprana extracelular de endoglucanasas, xilanasas y proteasas, enzimas relacionadas con los procesos de infección (Jenczmionka and Schäfer 2005). Wanjiru *et al*. (2002) observaron la degradación de los componentes de la pared celular de trigo (xilano, celulosa, pectina) después de la infección con *F. graminearum*, proponiendo que la secreción de enzimas desempeña un papel importante en la penetración y el establecimiento de la enfermedad. Los hongos patógenos perjudican las células de su hospedador por la degradación de las paredes celulares del hospedador, la invasión de los tejidos y la destrucción de gránulos de almidón y proteínas de reserva del endosperma de los granos, lo cual conlleva a la pérdida o modificación de la calidad panadera (Snijders, 2004).

Su acción se magnifica con la capacidad de producir micotoxinas en granos infectados afectando la salud humana y animal a través del consumo de alimentos contaminados. Los tricotecenos son un grupo importante de micotoxinas producidos por ciertas especies del género *Fusarium* (Bennett and Klich 2003). Los tricotecenos se agrupan en cuatro tipos (A, B, C y D). *F. graminearum* produce tricotecenos tipo B, que incluyen el deoxinivalenol (DON), el nivalenol (NIV), y sus derivados acetilados. Los aislamientos de *F. graminearum* producen tres quimiotipos de tricotecenos (Ward *et al.*, 2002): (i) NIV, que producen nivalenol y derivados acetilados de nivalenol, (ii) 3-ADON, que producen deoxinivalenol y pricipalmente 3-acetildeoxinivalenol, (iii) 15-ADON, que producen deoxinivalenol y predominantemente 15-acetildeoxinivalenol. Sin embargo, el papel de los tricotecenos en la agresividad del hongo es controversial. Se ha encontrado una correlación positiva entre la producción de DON y la agresividad de aislamientos de *F. graminearum* y *F. culmorum* (Hestbjerg *et al*., 2002). Sin embargo otros estudios no mostraron dicha correlación (Walker *et al*., 2001). Mutantes deficientes de tricotecenos de *F. graminearum* mantuvieron su patogenicidad hacia trigo y maíz (Desjardins *et al*., 1996; Harris *et al*., 1999), pero el nivel de agresividad fue menor que las cepas salvajes. Bai *et al*. (2002) informaron que cepas no productoras de DON pueden causar infecciones iniciales en espigas de trigo pero no pudieron propagarse, lo que sugiere que la micotoxina es un factor de agresividad y no de patogenicidad (Proctor *et al.*, 1995). Otras investigaciones avalan la variabilidad en cuanto a la agresividad de aislamientos de *F. graminearum* sobre diversos cereales (Miedaner and Schilling 1996, Miedaner *et al*., 2001).

Pruebas de patogenicidad

Se utilizan varios parámetros para cuantificar los niveles de enfermedad en estudios epidemiológicos y de severidad. Síntomas visuales de necrosis / decoloración de los tejidos son evaluados en una escala de gravedad o como un porcentaje de espiguillas infectadas (Ribichich *et al*., 2001), ya sea en un solo punto en el tiempo o varias fechas para producir una curva de progreso de la enfermedad. El grano cosechado puede ser evaluado visualmente por decoloración y resequedad (Bai and Shaner, 1994) o por la pérdida de rendimiento (porcentaje de rendimiento o peso de 1000 granos en relación a los controles).

El método de evaluación de la patogenicidad es un aspecto fundamental en este tipo de estudio. Un procedimiento de inoculación estándar es necesario para evaluaciones comparativas y reproducibles. Se han desarrollado métodos que implican la inoculación de los tejidos florales (Bai *et al*., 2001), tallos (Snijders 1990) y plántulas (Hare *et al*., 1999). La mayoría de los métodos de inoculación se llevan a cabo en la floración, estado de la planta en el cual es susceptible al ataque de este patógeno.

OBJETIVO

Evaluar la agresividad entre aislamientos de *F. graminearum* seleccionados por su diversidad genética a partir de pruebas de patogenicidad sobre cultivares de trigo.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material biológico

Se utilizaron 9 aislamientos de *F. graminearum* (69A,66C, 32B, 44B, 36D, 40B, 46, 67C, 30A) pertenecientes a distintas localidades y grupos genéticos según los marcadores moleculares ISSR y RFLP de la región IGS y 2 cultivares susceptibles de trigo BioINTA 1005 y Buck Halcon.

3.2 Producción de inóculo

A partir de cultivos de *F. graminearum* en cajas de Petri con medio de cultivo SNA, se cortaron trocitos de 0.5 x 0.5 cm y se sembraron en 50 ml de medio de cultivo agar- afrecho (40 g de afrecho de trigo por litro de agua, hervido durante 1 h) en Erlenmeyers de 500 ml de capacidad. Estos se mantuvieron por 2 días a 22℃ y luego por 10 días a temperatura ambiente bajo luz fluorescente. Se extrajeron los conidios de cada Erlenmeyer con lavados de agua destilada estéril con Tween 20 (1gota/ 100 ml agua) y se filtró con gasa estéril. Se llevó a una concentración de $1x10^5$ conidios/ml con la ayuda de una cámara cuentaglóbulos para inocular las espigas de trigo.

3.3 Ensayo en invernáculo

3.3.1 Diseño experimental

El diseño estadístico fue un diseño en alfa con efecto de filas y columnas con 4 repeticiones. La unidad experimental fueron macetas con 3 plantas en cada una de ellas. Las semillas fueron sembradas en diferentes fechas comenzando a fines de junio y a intervalos quincenales hasta fines de julio con la finalidad de obtener plantas de trigo en diferentes estados. Las plantas fueron cultivadas en invernáculo y se las fertilizó con nitrógeno durante la fase de crecimiento.

Un total de 4 macetas por aislamiento fueron inoculadas durante la etapa de la antesis. Aproximadamente 20 µl de la suspensión de esporas fueron inyectados en una espiguilla central a ambos lados de la espiga con una aguja hipodérmica (0,5 mm de espesor). Las macetas control fueron inyectadas con agua destilada estéril. Las plantas inoculadas fueron incubadas durante 72 h en una cámara de crecimiento de plantas (90% de humedad relativa, 20℃ y 12 h bajo luz fluorescente). A los 2 días de incubación, las plantas fueron transferidas al invernáculo nuevamente.

3.3.2 Análisis de variables patométricas y de rendimiento

Las variables patométricas analizadas fueron: incidencia (nº de espigas enfermas / total de espigas evaluadas x 100) sobre un número total de 12 espigas observadas por aislamiento y severidad (nº de espiguillas enfermas / total de espiguillas en cada espiga x 100) a los 6, 14 y 21 días después de la inoculación.

Cuando las espigas alcanzaron la madurez, se cosechó y trilló cada repetición por separado para la determinación de las variables de rendimiento: peso de espiga y peso de mil granos (PMG). Se contó y pesó la totalidad de los granos, por lo que con el peso de los granos de cada tratamiento se calculó el PMG y la reducción en el rendimiento. Se consideró como el 100% de peso las macetas control.

3.3.3 Análisis estadístico

Se analizaron estadísticamente las variables severidad (porcentaje de infección), peso de espiga y rendimiento del PMG a través de ANOVA de modelo mixto considerando el efecto de filas y columnas, con el fin de evaluar diferencias significativas entre los distintos aislamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las plantas de trigo de las variedades BioINTA 1005 y Buck Halcon fueron cultivadas en invernáculo (fig. III.1). Un total de 3 plantas por maceta y 4 macetas por aislamiento fueron inoculadas durante la etapa de la antesis. Las plantas inoculadas fueron incubadas durante 72 h en una cámara de crecimiento de plantas que controla la humedad y temperatura, condiciones necesarias para que se desarrolle la infección
(fig. III.2).

Fig. III.1. Plantas de trigo crecidas en invernáculo. La unidad experimental fueron macetas con 3 plantas en cada una de ellas

Fig. III.2. Plantas de trigo inoculadas con una suspensión de conidios de los distintos aislamientos e incubadas 72 h en cámara a temperatura y humedad controlada (20℃ y 90% humedad relativa).

Se evaluó la incidencia y severidad a los 6, 14 y 21 días después de la inoculación. Todos los aislamientos de *F. graminearum* causaron síntomas típicos de FET sobre los cultivares de trigo Buck Halcon y BioINTA (fig. III.3). La incidencia fue del 100%, es decir la totalidad de las espigas inoculadas presentaron síntomas de la enfermedad: color blanco y resequedad.

La propagación de la enfermedad en la espiga en el tiempo puede observarse en la tabla III.1. La variabilidad en la agresividad entre los aislamientos y sobre ambos cultivares resultó significativamente diferente. La severidad sobre el cultivar BioINTA 1005 osciló entre un mínimo de 16,29% a los 21 días post inoculación con el aislamiento 30A a un máximo de 100% a los 21 días post inoculación con los aislamientos 69A y 36D. Mientras que en el cultivar Buck Halcon varió entre un mínimo de 16,81% a los 21 días post inoculación con el aislamiento 30A a un máximo de 99,4% a los 21 días post inoculación con el aislamiento 69A (Tabla III.1). El aislamiento 30A produjo los valores más bajos de severidad en ambos cultivares y mostró diferencias significativas únicas con respecto a los demás aislamientos.

Tabla III.1: Valores de severidad de los 9 aislamientos de *F. graminearum* sobre los cultivares de trigo Buck Halcon y BioINTA 1005 a los 6, 14 y 21 días post inoculación.

	Buck Halcon			BioINTA 1005		
	Severidad (%)			Severidad (%)		
Aislamiento	día 6	día 14	día 21	día 6	día 14	día 21
69A	19,96[a]	76,66[a]	99,40[a]	12,16[b]	86,51[a]	100[a]
66C	13,31[b]	75,91[a]	94,04[a]	10,81[bc]	59,28[cd]	87,21[bc]
32B	11,56[b]	35,79[c]	83,58[ab]	18,71[a]	86,76[a]	98,96[ab]
44B	13,12[b]	60,46[ab]	80,67[ab]	9,66[bcd]	76,58[ab]	99,01[ab]
36D	12,31[b]	63,91[a]	80,23[ab]	9,62[bcd]	67,72[bc]	100[a]
40B	12,73[b]	33,85[cd]	67,67[bc]	7,81[cd]	47,66[d]	99,12[ab]
46	10,57[bc]	41,00[bc]	56,93[c]	11,59[b]	50,31[d]	79,80[cd]
67C	10,64[bc]	23,54[cde]	49,07[c]	7,62[cd]	25,01[e]	68,57[d]
30A	12,5[b]	14,61[def]	16,81[d]	9,11[bcd]	12,42[ef]	16,29[e]

[a,b,c,d,e,f] letras distintas indican diferencias significativas

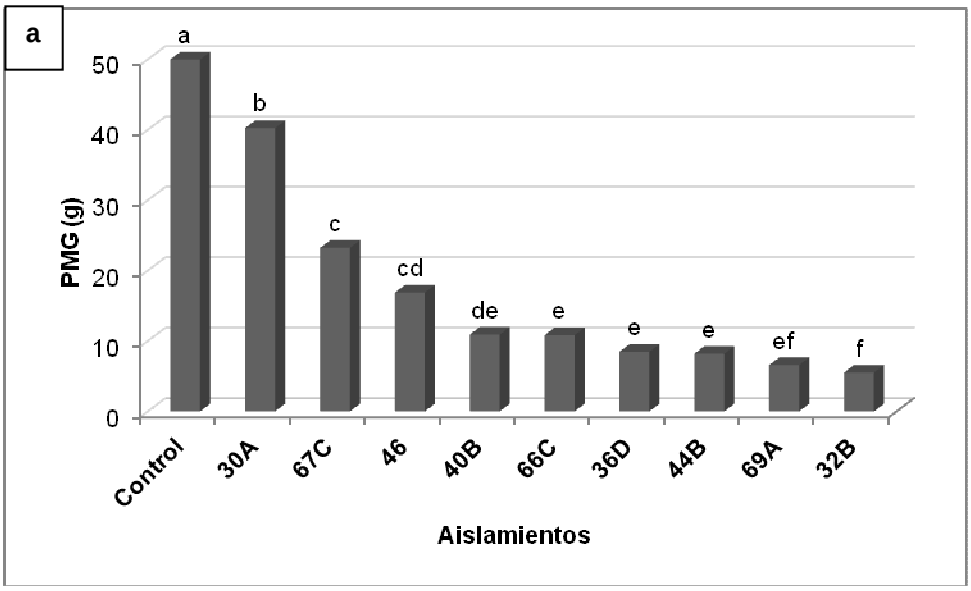
Fig. III.3 : Espigas de trigo infectadas con *F. graminearum* con distinto grado de severidad. Espiga control (derecha).

Cuando las espigas alcanzaron la madurez, se cosechó y trilló cada repetición por separado para la determinación de peso de espiga y peso de mil granos. Los granos enfermos se diferenciaron de los sanos visualmente, por ser de menor tamaño, chuzos y blanquecinos (fig. n°III. 4).

Fig. III.4. Granos de trigo de la variedad Bio INTA 1005: sanos (izq) y enfermos (der) por presencia de *F. graminearum*.

Todos los tratamientos mostraron diferencias significativas en el peso de mil granos (PMG) en comparación con el de las plantas de control. La reducción del rendimiento varió entre el 19,5% para el aislamiento 30A y el 88,9% para el aislamiento 32A en la variedad BioINTA 1005 y entre el 5,77% para el aislamiento 30A y el 76,9% para el aislamiento 66C en la variedad Buck Halcon (fig. III.5). Se observaron también diferencias en el peso promedio de espiga en comparación con la de las plantas control, con una reducción en el peso entre el 23,2% para el aislamiento 30A y el 72,9% para el aislamiento 32B en la variedad BioINTA; y entre el 37,8% para el aislamiento 30A y el 67,2% para el aislamiento 69A en la variedad Buck Halcon (fig. III.6).

Los parámetros de rendimientos PMG calculados fueron menos afectados para el cultivar Buck Halcon que para el BioINTA 1005 (fig. III.7)



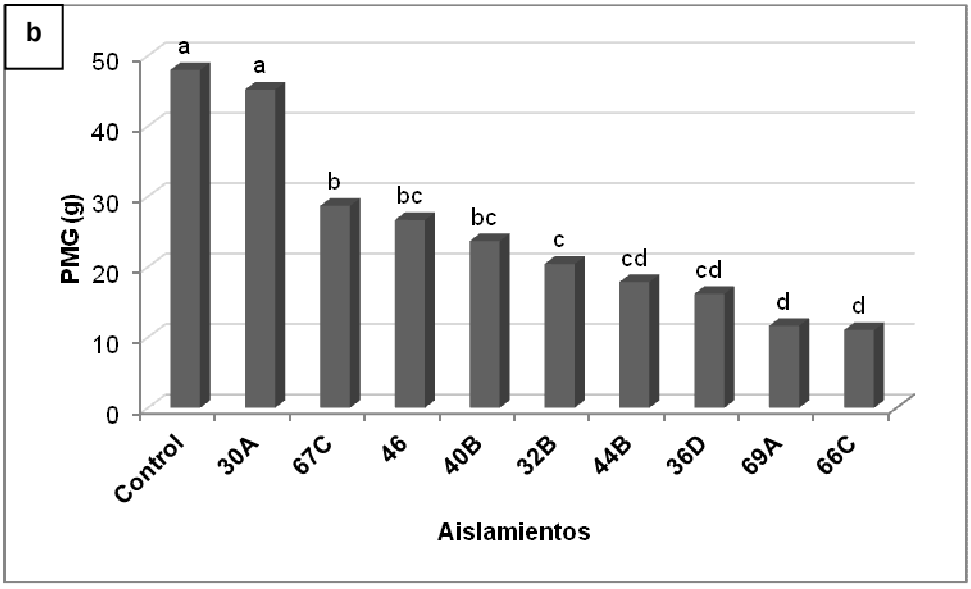
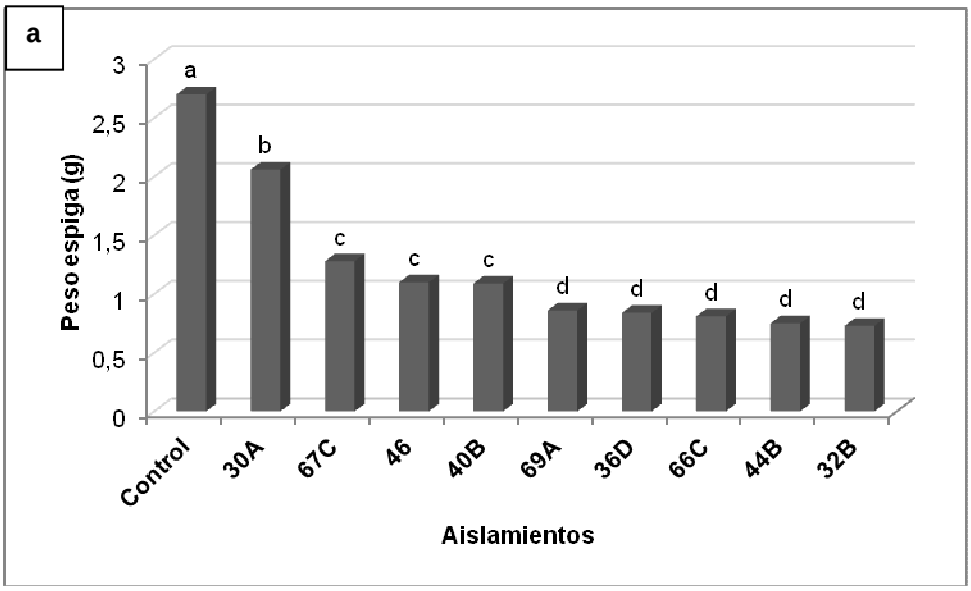


Fig. III.5: Peso de mil granos obtenidos de las espigas infectadas con los aislamientos de *F. graminearum* de las variedades BioINTA 1005 (a) y Buck Halcon (b). [a], [b], [c, d, e], [f]: letras distintas indican diferencias significativas.



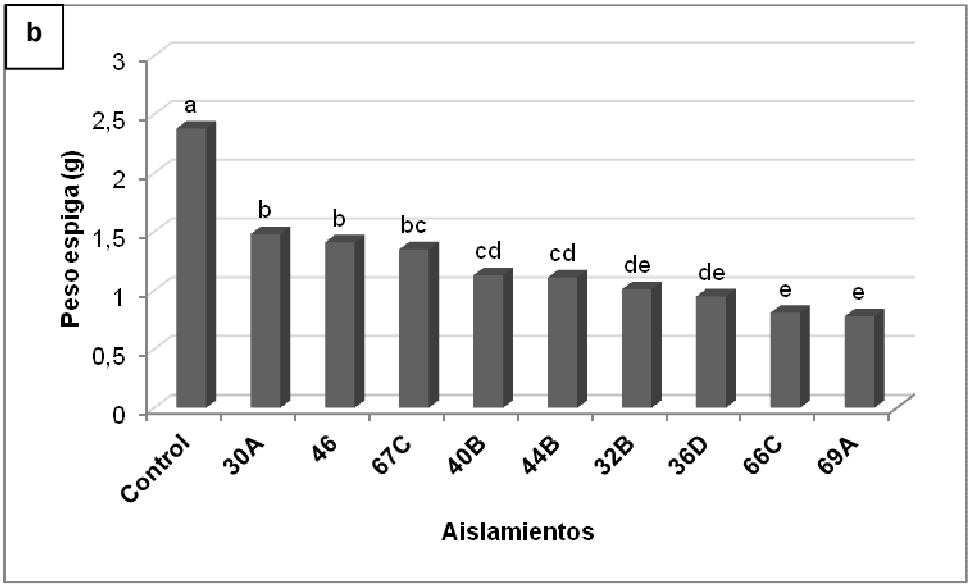


Fig. III.6: Peso promedio de las espigas infectadas de las variedades BioINTA (a) y BucK Halcon (b). [a], [b], [c, d, e], [f]: letras distintas indican diferencias significativas.

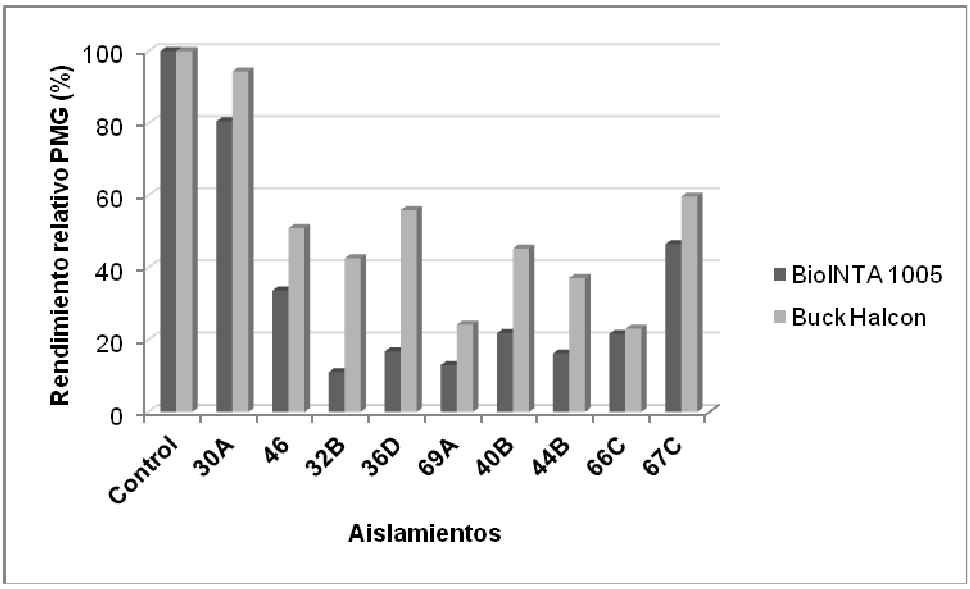
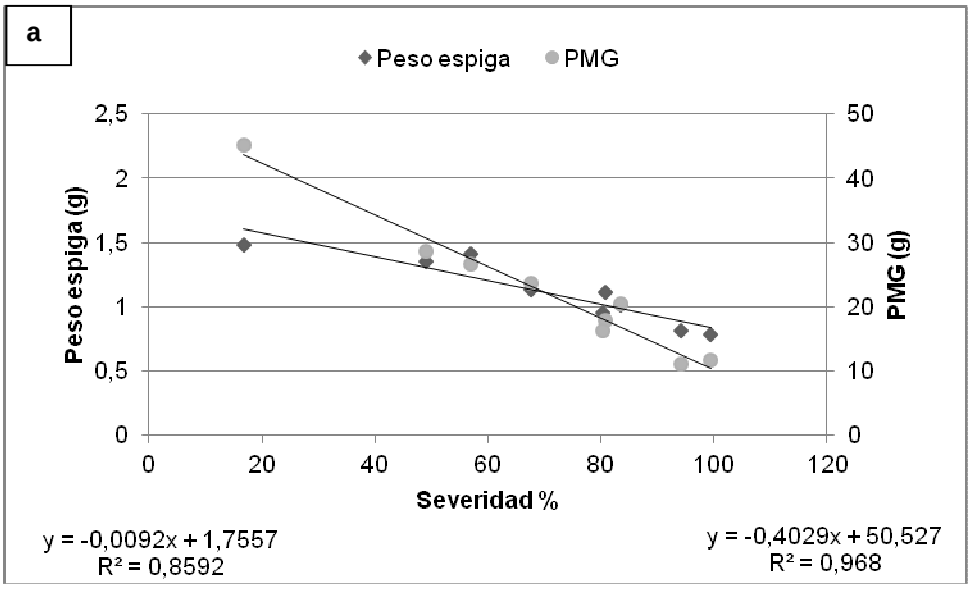


Fig. III.7: Rendimiento relativo del PMG de las espigas de dos tipos de cultivares de trigo infectadas con aislamientos de *F. graminearum* con respecto a las plantas control.

Se calcularon los coeficientes de correlación entre los datos de severidad a los 21 días post inoculación y los parámetros PMG y peso de espiga para cada variedad de trigo, mediante regresión lineal (fig. III.8). Los coeficientes para la variedad Buck Halcon entre PMG y severidad fue de r= 0,96 y entre peso de espiga y severidad de r= 0,85. Los coeficientes para la variedad BioINTA 1005 entre PMG y severidad fue de r= 0,96 y entre peso de espiga y severidad r= 0,90. En ambos casos, los datos de severidad y PMG obtuvieron coeficientes de correlación mayores que para el peso promedio de espiga. Sin embargo, estos últimos también resultaron altamente significativos.

Las correlaciones entre las variables PMG y peso de espiga con respecto a la severidad fueron negativas (fig. III.8). Por lo tanto, la manifestación de los síntomas tuvo una alta asociación con el nivel de infección de los granos. El PMG y peso de espiga fueron afectados negativamente como consecuencia de un aumento en la severidad y así, un aumento de la infección de los granos. El PMG fue más afectado en el cultivar BioINTA, el cual mostró mayor susceptibilidad a la enfermedad que el cultivar Buck Halcon.



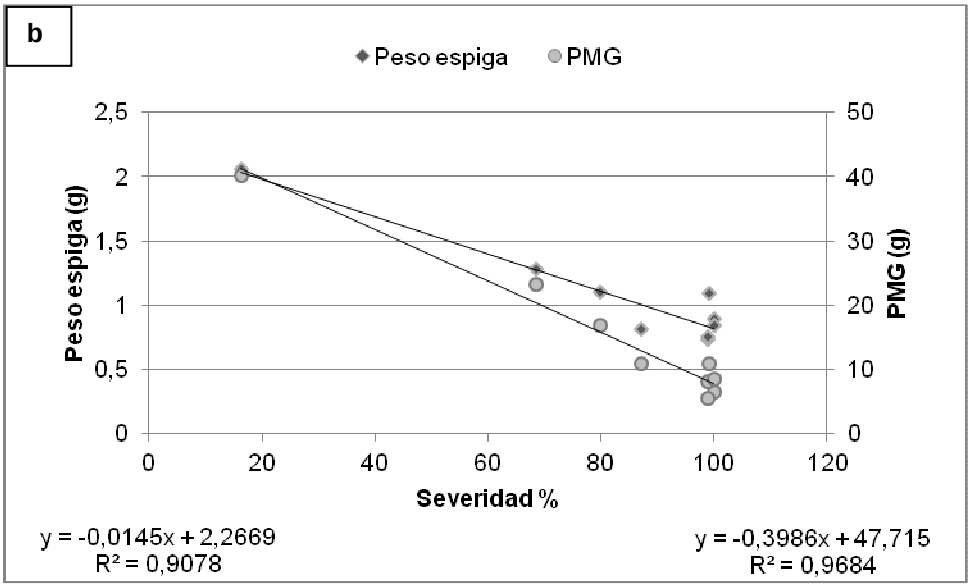


Fig. III.8: correlación entre los datos de PMG y peso de espiga con severidad obtenidos para las variedades Buck Halcon (a) y BioINTA (b).

Los valores de severidad mostraron diferencias entre los aislamientos. Dentro de los aislamientos pertenecientes a la misma localidad (69A, 66C y 67C de Paraná, 36D, 32B y 30A de Oliveros, 40B y 44B de Pergamino) se encontraron diferencias significativas en su agresividad sobre los dos cultivares de trigo. No se

observó relación entre el grado de agresividad y el origen geográfico. En cuanto a la relación entre los grupos genéticos obtenidos con los marcadores moleculares ISSR y RFLP y la agresividad, se observó que el aislamiento que resultó ser menos agresivo (30A) fue claramente separado del resto de los aislamientos a un coeficiente de similitud de 0,7.

Los porcentajes de reducción de rendimiento de acuerdo al PMG y peso de las espigas fueron coincidentes con los datos de severidad. Estos parámetros han mostrado una buena correlación en investigaciones previas (Mentewab *et al*, 2000; Lemmens *et al*, 2004). Sin embargo, en otros trabajos la estimación visual de la severidad no refleja las pérdidas de peso y mostraron gran dispersión (Brennan *et al*., 2005, Alvarez *et al.,* 2010). Numerosas investigaciones en diversos países han analizado si la variabilidad en la agresividad de *F. graminearum* está relacionada con la producción de micotoxinas, habiendo encontrado resultados contradictorios (Láday *et al.*, 2004; Walker *et al*., 2001; Carter *et al.*, 2002).

CONCLUSIONES

Los cultivares utilizados en los test de patogenicidad fueron seleccionados por ser sensibles a la infección. En nuestro estudio de acuerdo al análisis de los parámetros de rendimiento, el cultivar BioINTA 1005 resultó más sensible que el Buck Halcon.

Todos los aislamientos utilizados en los test de patogenicidad fueron capaces de infectar ambos cultivares de trigo, con diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la medición de severidad, y variables de rendimiento. Es de destacar el comportamiento del aislamiento 30A, que se separó en el análisis filogenético de todo el resto de los aislamientos a un coeficiente de similitud de 0,7, resultando ser el de menor agresividad, con valores marcamente inferiores a los demás.

La severidad de la infección afectó negativamente los parámetros de rendimiento peso de la espiga y PMG. En ambos cultivares, los datos de severidad y PMG obtuvieron coeficientes de correlación mayores que para el peso promedio de espiga. Siendo estos últimos también altamente significativos. Los porcentajes de reducción de rendimiento de acuerdo al PMG y peso de las espigas fueron coincidentes con los datos de severidad. Estos parámetros también han mostrado buena correlación en investigaciones previas, por lo cual este tipo de análisis resulta fiable en la estimación de la agresividad de los aislamientos de *F. graminearum*. A diferencia de la evaluación del contenido de micotoxinas, el cual no siempre refleja de manera fiable la variabilidad en la agresividad de *F. graminearum* de acuerdo a los antecedentes bibliográficos (Láday *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2000; Carter *et al.*, 2002).