

## ÍNDICE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>RESUMEN .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>ABSTRACT .....</b>   | <b>2</b>  |
| <b>INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>   | <b>4</b>  |
| <b>Fusariosis de la Espiga de Trigo.....</b>  | <b>4</b>  |
| <b>Factores que favorecen el desarrollo de la enfermedad .....</b>  | <b>6</b>  |
| <b>Ciclo patológico de la enfermedad .....</b>  | <b>7</b>  |
| <b>Control integrado de la enfermedad .....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>OBJETIVO GENERAL.....</b>  | <b>11</b> |
| <b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>   | <b>12</b> |
| <b>HIPÓTESIS.....</b>   | <b>13</b> |
| <br>  |           |
| <b>SECCIÓN I: Aislamiento e identificación de <i>Fusarium</i> spp. a partir de granos de trigo. Relación entre ocurrencia de la especie y la incidencia de la enfermedad.....</b> | <b>15</b> |
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>   | <b>15</b> |
| <b>Importancia de la Fusariosis de la espiga de trigo (FET) en Argentina.....</b>   | <b>15</b> |
| <b>Taxonomía del género <i>Fusarium</i> .....</b>   | <b>16</b> |
| <b>Concepto de especie .....</b>  | <b>17</b> |
| <b>Caracterización morfológica .....</b>  | <b>17</b> |
| <b>Caracterización molecular.....</b>   | <b>19</b> |
| <b><i>Fusarium graminearum</i> Schwabe (telemorfo <i>Gibberella zeae</i>).....</b>  | <b>20</b> |
| <b>Modelos con base climática predictivos de la enfermedad .....</b>  | <b>21</b> |
| <b>1.1 Material biológico.....</b>  | <b>23</b> |
| <b>1.2 Aislamientos monospóricos de <i>Fusarium</i> spp. .....</b>  | <b>23</b> |
| <b>1.3 Caracterización de <i>Fusarium</i> spp. .....</b>  | <b>24</b> |
| 1.3.1 Identificación morfológica.....   | 24        |
| 1.3.2 Identificación molecular.....   | 24        |
| 1.3.2.1 Extracción de ADN .....   | 24        |
| 1.3.2.2 Reacción en cadena de polimerasa (PCR).....   | 25        |
| <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>  | <b>27</b> |
| <b>1.4 Identificación morfológica.....</b>  | <b>27</b> |
| <b>1.5 Identificación mediante el uso de primers específicos de especie .....</b>   | <b>29</b> |
| <b>1.6 Ocurrencia de <i>Fusarium</i> spp. en trigo en relación a los niveles de enfermedad estimados por modelos climáticos predictivos.....</b>                                  | <b>36</b> |
| <b>CONCLUSIONES .....</b>   | <b>38</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>SECCIÓN II: Diversidad genética de aislamientos de <i>F. graminearum</i> empleando marcadores moleculares y estructura poblacional.....</b> | <b>40</b> |
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>  | <b>40</b> |
| <b>Estudios poblacionales a partir del uso de marcadores moleculares .....</b>   | <b>40</b> |
| <b>Polimorfismos en la longitud de fragmentos de resticción (RFLP) de la región intergénica de ADN ribosomal .....</b>                         | <b>41</b> |
| <b>Microsatélites o Secuencias entre repeticiones de secuencias simples (ISSR)...</b>  | <b>42</b> |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>   | <b>45</b> |
| <b>2.1 Material biológico.....</b>   | <b>45</b> |
| <b>2.2 Amplificación de la región IGS del rDNA.....</b>  | <b>46</b> |
| <b>2.3 Digestión de la región IGS con enzimas de restricción (RFLP) .....</b>  | <b>46</b> |
| <b>2.4 Amplificación del marcador molecular ISSR.....</b>  | <b>46</b> |
| <b>2.5 Análisis de datos.....</b>  | <b>47</b> |
| <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>   | <b>48</b> |
| <b>2.6 Diversidad genética entre aislamientos <i>F. graminearum</i>.....</b>   | <b>48</b> |
| 2.6.1 Amplificación y digestión con enzimas de restricción de la región IGS.....   | 48        |
| 2.6.2 Amplificación del marcador molecular ISSR.....   | 52        |
| <b>2.7 Relación filogenética entre los aislamientos de <i>F. graminearum</i>- Análisis de conglomerados .....</b>                              | <b>55</b> |
| <b>CONCLUSIONES .....</b>  | <b>61</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>SECCIÓN III: Ensayos de patogenicidad de aislamientos de <i>F. graminearum</i> sobre trigo .....</b> | <b>62</b> |
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>   | <b>63</b> |
| <b>Variabilidad en la agresividad de <i>F. graminearum</i>.....</b>                                     | <b>63</b> |
| <b>Pruebas de patogenicidad.....</b>  | <b>64</b> |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>  | <b>66</b> |
| <b>3.1 Material biológico.....</b>  | <b>66</b> |
| <b>3.2 Producción de inóculo.....</b>   | <b>66</b> |
| <b>3.3 Ensayo en invernáculo .....</b>  | <b>66</b> |
| 3.3.1 Diseño experimental .....   | 66        |
| 3.3.2 Análisis de variables patométricas y de rendimiento .....   | 67        |
| 3.3.3 Análisis estadístico .....  | 67        |
| <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>  | <b>68</b> |
| <b>CONCLUSIONES .....</b>   | <b>77</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>SECCIÓN IV: Diversidad fenotípica de aislamientos de <i>F. graminearum</i> aplicando espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).....</b> | <b>79</b>  |
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>   | <b>79</b>  |
| <b>Fundamentos de la espectroscopía infrarroja aplicada al estudio de sistemas biológicos.....</b>  | <b>79</b>  |
| <b>Espectroscopía FT-IR en materiales biológicos complejos .....</b>  | <b>81</b>  |
| <b>Discriminación microbiana.....</b>   | <b>85</b>  |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>  | <b>90</b>  |
| <b>4.1 Microorganismos .....</b>  | <b>90</b>  |
| <b>4.2 Cultivos, preparación de las muestras y registro de los espectros .....</b>  | <b>91</b>  |
| <b>4.3 Pretratamiento y análisis de los datos.....</b>  | <b>93</b>  |
| 4.3.1 Obtención de derivadas y test de calidad espectral (QT) .....   | 93         |
| 4.3.2. Normalización vectorial .....  | 95         |
| 4.3.3. Reproducibilidad .....   | 95         |
| 4.3.4. Quemometría. Aplicación de métodos estadísticos multivariantes. Análisis de clusters (CA) y construcción de dendrogramas.....                          | 97         |
| <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>  | <b>98</b>  |
| <b>4.4 Estandarización de la metodología.....</b>   | <b>98</b>  |
| 4.4.1 Selección de la metodología .....   | 98         |
| 4.4.2. Medio de cultivo .....   | 98         |
| 4.4.3 Preparación de una suspensión homogénea y secado de las muestras .....  | 99         |
| <b>4.5 Análisis de la composición química .....</b>   | <b>100</b> |
| <b>4.6 Discriminación fenotípica intraespecífica .....</b>  | <b>103</b> |
| <b>CONCLUSIONES .....</b>   | <b>109</b> |
| <br>  |            |
| <b>SECCIÓN V: Enzimas de <i>F. graminearum</i> relacionadas con los procesos de infección en trigo. ....</b>  | <b>111</b> |
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>   | <b>111</b> |
| <b>Pared celular de los vegetales .....</b>   | <b>111</b> |
| <b>Degradación enzimática de la pared celular vegetal y de las sustancias de reserva del grano. Relación con la patogenicidad.....</b>                        | <b>113</b> |
| <b>Rol de las poligalacturonasas en la patogénesis .....</b>  | <b>117</b> |
| <b>Resistencia genética al patógeno .....</b>   | <b>118</b> |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>  | <b>121</b> |
| <b>5.1 Material biológico.....</b>  | <b>121</b> |
| <b>5.2 Actividad enzimática poligalacturonasa (PG) .....</b>  | <b>121</b> |
| 5.2.1 Preparación del inóculo.....  | 121        |
| 5.2.2 Condiciones de cultivo - Toma de la muestra.....  | 121        |

|  |            |
|--|------------|
| 5.2.3 Valoración de la actividad enzimática .....  | 122        |
| 5.2.4 Caracterización de la actividad PG .....   | 122        |
| 5.2.4.2 pH óptimo y estabilidad al pH .....  | 122        |
| 5.2.4.3 Temperatura óptima y termoestabilidad.....   | 123        |
| 5.2.4.5 Efecto de iones metálicos y EDTA.....  | 123        |
| 5.2.4.6 Patrón de degradación de sustrato.....   | 123        |
| 5.2.5 Purificación de la actividad enzimática.....   | 124        |
| 5.2.5.1 Producción de crudo enzimático.....  | 124        |
| 5.2.5.2 Técnicas cromatográficas.....  | 124        |
| 5.2.5.2.1 Cromatografía de exclusión molecular .....   | 124        |
| 5.2.5.2.2 Cromatografía de intercambio iónico.....   | 125        |
| 5.2.6 Técnicas electroforéticas .....  | 125        |
| 5.2.6.1 SDS-PAGE.....  | 125        |
| 5.2.6.2 Isoelectroenfoque- Zimograma.....  | 125        |
| 5.2.7 Análisis de huellas peptídicas (Maldi TOF Ms/ Ms) .....  | 126        |
| <b>5.3 Actividad enzimática proteolítica.....</b>  | <b>127</b> |
| 5.3.1 Preparación del inóculo.....   | 127        |
| 5.3.2 Condiciones de cultivo -Toma de la muestra.....  | 127        |
| 5.3.3 Valoración de la actividad enzimática .....  | 127        |
| <b>5.4 Actividad enzimática lipasa .....</b>   | <b>128</b> |
| 5.4.1 Preparación del inóculo.....   | 128        |
| 5.4.2 Condiciones de cultivo. Toma de la muestra.....  | 128        |
| 5.4.3 Valoración de la actividad enzimática .....  | 128        |
| <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>   | <b>130</b> |
| <b>5.5 Detección de actividades enzimáticas durante el crecimiento vegetativo de <i>F. graminearum</i> .....</b>   | <b>130</b> |
| <b>5.6 Actividad PG .....</b>  | <b>132</b> |
| 5.6.1 Caracterización de la actividad PG en el extracto crudo .....  | 132        |
| 5.6.2 Purificación de la enzima PG .....   | 137        |
| 5.6.3 Análisis de huellas peptídicas (Maldi TOF Ms/Ms) .....   | 140        |
| 5.6.4 Caracterización de la actividad PG semipurificada.....   | 142        |
| <b>5.7 Análisis de resistencia en trigo a la FET, utilizando un aislamiento de <i>F. graminearum</i> seleccionado por su elevada producción enzimática como estimativo de agresividad.....</b> | <b>148</b> |
| 5.7.1 Evaluación de la resistencia en cultivares argentinos e internacionales.....   | 149        |
| 5.7.2 Evaluación de resistencia en líneas avanzadas de ensayos regionales del programa de mejoramiento INTA.....   | 153        |
| <b>CONCLUSIONES .....</b>  | <b>156</b> |
| <b>CONCLUSIONES GENERALES .....</b>  | <b>159</b> |
| <b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>   | <b>160</b> |

|                                   |            |
|-----------------------------------|------------|
| <b>REFERENCIAS .....</b>          | <b>162</b> |
| <b>PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....</b> | <b>184</b> |