



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

---

**Trabajo de tesis doctoral**

*Caracterización de aislamientos de *Fusarium graminearum*  
y su relación con el deterioro de granos de trigo infectados*

---

*Lic. Leonel Maximiliano Ortega*

**Tesista**

*Dra. Teresa María Alconada Magliano*

**Directora**

*Dra. Andrea Luciana Astoreca*

**Codirectora**

2017



**TESIS DOCTORAL**

**Caracterización de aislamientos de  
*Fusarium graminearum*  
y su relación con el deterioro  
de granos de trigo infectados**

# Resumen

La Fusariosis de la espiga de trigo o Fusarium Head Blight en trigo es una enfermedad severa a nivel mundial, en Argentina al menos 20 epidemias de variable intensidad se han registrado en los últimos 50 años. *Fusarium graminearum sensu stricto* es el principal agente etiológico de la enfermedad para esta región. Como resultado de la infección, los granos de trigo ven modificada tanto su composición química como sus propiedades físicas con la consiguiente alteración de características de calidad en los productos de panificación. Los daños ocasionados por la infección se agravan por la presencia de micotoxinas, las cuales son perjudiciales tanto para la salud humana como animal. La constitución física de los granos se relaciona con su textura y dureza, y su composición química, define el valor nutricional y las propiedades tecnológicas de las harinas. Los mercados son cada vez más exigentes y se interesan por el contenido de proteínas, aminoácidos, almidón, aceites, lípidos y demás componentes, y paulatinamente se reduce la tolerancia a sustancias contaminantes y/o micotoxinas.

Dentro de los principales criterios para la determinación de la calidad de los granos se encuentran: el contenido y constitución de las proteínas, variables de rendimiento como ser la pérdida de peso en los granos por espiga y el peso de mil granos, y presencia de micotoxinas.

La calidad el gluten de las harinas de trigo depende de la constitución genética de la planta así como de diversos factores ambientales e interacciones con microorganismos. La variación alélica en las fracciones de gluteninas de alto peso molecular (HMW-GS) está directamente relacionada con las propiedades físicas de la masa elaborada a partir de estas harinas. La micotoxina deoxinivalenol (DON) es la que se relaciona en primer término con la enfermedad, por lo cual se la considera una toxina indicadora de infección.

Esta Tesis Doctoral aporta conocimientos relacionados con la diversidad genética de la especie *Fusarium graminearum* y el daño producido en granos de trigo, en cuanto a cambios composicionales y presencia de toxinas, en relación a cambios de calidad.

*A mi familia y amigos  
Sin quienes nada hubiese sido posible*

## INDICE GENERAL

<b>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1 - Cultivo de trigo y zonas productoras argentinas	2
2 - Morfología del trigo	4
3 - Estructura del grano de trigo	6
4 - Composición del grano de trigo	7
5 - Proteínas de trigo: gliadinas y gluteninas	9
6 - Variación alélica de las gluteninas de alto peso molecular	10
7 - Clasificación de los cultivares argentinos	12
8 - Fusariosis de la espiga de trigo	12
9 - Agentes causales de la Fusariosis de la espiga de trigo	13
10 - Complejo de especies <i>Fusarium graminearum</i>	14
11 - Variabilidad genética de <i>Fusarium graminearum</i>	14
12 - Agresividad: componentes y evaluación	15
13 - Micotoxinas	17
14 - Distribución geográfica de las especies del complejo <i>Fusarium graminearum</i> y quimiotipos	18
15 - Control integrado de la enfermedad	19
16 - Hipótesis	20
17 - Objetivo general	20
18 - Objetivos específicos	21
<b>CAPÍTULO II: CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS DE <i>FUSARIUM GRAMINEARUM</i></b>	<b>22</b>
<b>MARCO DE REFERENCIA</b>	<b>23</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>24</b>
1 - Material biológico	24
2 - Obtención de aislamientos	28
3 - Aislamientos monospóricos	28
4 - Identificación morfológica de especie	29
5 - Identificación molecular de especie y potencial toxicogénico	29

5.1 - Condiciones de cultivo	29
5.2 - Extracción de ADN	29
5.3 - Reacciones de PCR	30
6 - Determinación de la variabilidad genética	31
6.1 - Marcadores moleculares de intersecuencias repetitivas simples	31
6.2 - Análisis de la variabilidad genética	31
7 - Determinación de la capacidad toxicogénica	32
7.1 - Condiciones de cultivo	32
7.2 - Extracción de la toxina deoxinivalenol	32
7.3 - Detección y cuantificación por cromatografía líquida de alta eficacia de deoxinivalenol	33
RESULTADOS	33
1 - Ocurrencia de <i>Fusarium graminearum</i>	33
2 - Variabilidad genética	35
3 - Potencial y capacidad de producción de deoxinivalenol	37
CONCLUSIONES	38
CAPITULO III: ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA INFECCIÓN: AGRESIVIDAD, RENDIMIENTO Y TOXICIDAD	39
MARCO DE REFERENCIA	40
MATERIALES Y METODOS	41
1 - Aislamientos seleccionados	41
1.1 - Preparación del inóculo	41
2 - Ensayo a campo	41
2.1 - Siembra	42
2.2 - Inoculación	42
2.3 - Cosecha, trillado y molienda	43
3 - Evaluación de los efectos de la enfermedad	43
3.1 - Medidas de agresividad	44
3.1.1 - Incidencia	44

3.1.2 - Severidad	44
3.1.3 - Porcentaje de granos dañados	44
3.1.4 - Índice de Fusarium	45
3.1.5 - Índice ISK	45
3.2 - Medidas de rendimiento	45
3.2.1 - Peso de mil granos	45
3.3 - Medidas toxicológicas	45
3.3.1 - Extracción de deoxinivalenol	45
3.3.2 - Detección y cuantificación por cromatografía líquida de ultra-alta resolución de deoxinivalenol	46
4 - Análisis estadístico	46
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>47</b>
1 - Aislamientos seleccionados	47
2 - Evaluación de la enfermedad	49
2.1 - Incidencia	51
2.2 - Severidad	52
2.3 - Porcentaje de granos dañados	54
2.4 - Peso de mil granos	55
2.5 - Índice IF e ISK	57
2.6 - Contenido de deoxinivalenol	59
2.7 - Análisis de componentes principales	62
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>63</b>
<b>CAPITULO IV: ANÁLISIS DE PROTEÍNAS DEL GLUTEN</b>	<b>65</b>
<b>MARCO DE REFERENCIA</b>	<b>66</b>
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>67</b>
1 - Determinación de proteínas totales	67
2 - Análisis por espectrofotometría-UV de proteínas del gluten	67
3 - Análisis de las subunidades de gluteninas	68
3.1 - Cromatografía líquida de alta eficacia por fase reversa	68
3.2 - Electroforesis en geles de poliacrilamida	69

<b>4 - Análisis de calidad de las harinas</b>	<b>71</b>
<b>4.1 - Score de Payne</b>	<b>71</b>
<b>4.2 - Test de Zeleny</b>	<b>71</b>
<b>5 - Análisis estadístico</b>	<b>72</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>72</b>
<b>1 - Determinación de proteínas totales</b>	<b>72</b>
<b>2 - Análisis por espectrofotometría-UV de proteínas del gluten</b>	<b>74</b>
<b>2.1 - Análisis de la fracción monomérica</b>	<b>75</b>
<b>2.2 - Análisis de la fracción polimérica soluble</b>	<b>76</b>
<b>2.3 - Análisis de la fracción polimérica insoluble</b>	<b>78</b>
<b>3 - Análisis de gluteninas por cromatografía líquida de alta eficacia por fase reversa</b>	<b>79</b>
<b>3.1 - Análisis del cultivar Sy 200</b>	<b>81</b>
<b>3.2 - Análisis del cultivar AGP Fast</b>	<b>85</b>
<b>3.3 - Análisis del cultivar Klein Tigre</b>	<b>88</b>
<b>4 - Análisis de gluteninas de alto peso molecular por electroforesis en geles de poliacrilamida.</b>	<b>93</b>
<b>4.1 - Identificación alélica</b>	<b>94</b>
<b>4.2 - Análisis de la infección</b>	<b>95</b>
<b>4.2.1 - Análisis del cultivar Sy 200</b>	<b>95</b>
<b>4.2.2 - Análisis del cultivar AGP Fast</b>	<b>98</b>
<b>4.2.3 - Análisis del cultivar Klein Tigre</b>	<b>101</b>
<b>5 - Análisis de calidad de las harinas</b>	<b>104</b>
<b>5.1 - Score de Payne</b>	<b>104</b>
<b>5.2 - Test de Zeleny</b>	<b>106</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>106</b>
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	<b>108</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>109</b>
<b>ANEXO I: INDICE DE TABLAS Y FIGURAS</b>	<b>134</b>

<b>ANEXO II: DESARROLLO DE UN PCA</b>	<b>143</b>
<b>ANEXO III: MEDIOS DE CULTIVO</b>	<b>148</b>
<b>ANEXO IV: PRODUCCION CIENTIFICA</b>	<b>149</b>



**CAPITULO I:  
Introducción**

# Introducción

## 1 - Cultivo de trigo y zonas productoras argentinas

El trigo (*Triticum aestivum*) es uno de los tres cultivos más extendidos en el mundo, junto al maíz y el arroz, y el más ampliamente consumido por el hombre en la civilización occidental desde la Antigüedad. El origen del actual trigo cultivado se encuentra en la región asiática comprendida entre los ríos Tigris y Eúfrates, en la zona mesopotámica. Desde Oriente Medio el cultivo del trigo se difundió hacia todo el mundo. Las colonizaciones anglosajona y española fueron las responsables de introducir el cultivo en América, donde se expandió por las grandes llanuras del norte (cuenca del Missisipi-Missouri, Grandes Llanos), del sur (Llanura Pampeana) y en Australia, en la llanura de sudoeste australiano (Evans and Peacock 1981).

Actualmente, a nivel internacional, los principales países productores de este cultivo son China, Unión Europea, India, EEUU., Rusia, Europa Oriental, Canadá, Australia y Argentina, siendo los principales exportadores EEUU, Canadá, Unión Europea, Argentina y Australia. Argentina, aporta el 10% del volumen comercializado internacionalmente, lo que representa alrededor del 60% del total de su producción (FAO 2015).

En nuestro país, la producción anual triguera se mantiene entre los 10 y 16 millones de toneladas, exceptuando casos extraordinarios como la campaña 2014/2015 donde las condiciones meteorológicas desfavorables produjeron una caída brusca a alrededor de los 8 millones de toneladas (Trigo Argentino 2013).

La zona de cultivo comprende principalmente las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, Entre Ríos y La Pampa. Esta vasta zona se divide en cinco regiones de cultivo, cada una con características climáticas diferenciadas (Programa Nacional de Calidad de Trigo 2004), las cuales se detallan a continuación:

*Subregión I:* Esta región comprende el norte de la provincia de Santa Fe y parte de la provincia de Córdoba. De clima templado cálido, con una temperatura media anual de 18°C y precipitaciones que disminuyen de este a oeste de 1000 a 800 mm, con frecuentes sequías hasta inicios de primavera y excesos de

precipitaciones en los meses de octubre o noviembre, por lo que es frecuente la ocurrencia de defectos en la calidad del trigo.

*Subregión II (norte):* Comprendida principalmente por el sur de la provincia de Santa Fe y el este de la provincia de Córdoba. El clima es templado húmedo, con una temperatura media anual que oscila entre los 10 y 16°C, y las precipitaciones disminuyen de este a oeste de 950 a 700 mm.

*Subregión II (sur):* Región comprendida en el norte y centro de la provincia de Buenos Aires, el clima es templado húmedo, con precipitaciones que disminuyen de noreste a sudoeste de 900 a 700 mm y temperaturas medias anuales entre 15°C y 17°C con un mayor riesgo de heladas tardías que la subregión II norte.

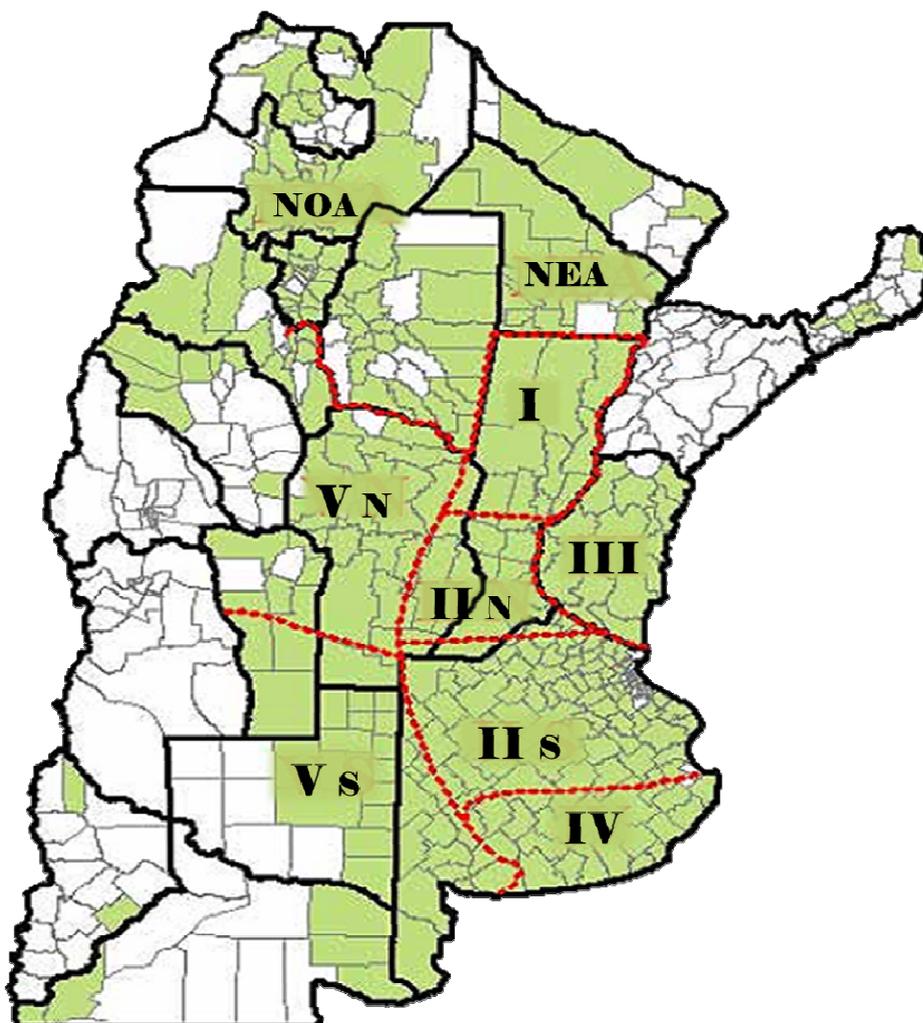
*Subregión III:* Esta región está comprendida por la provincia de Entre Ríos. Posee un clima templado cálido y húmedo, una temperatura media anual de 20°C y precipitaciones anuales abundantes pero con mala distribución, presentando sequías invernales y a veces excesos en primavera.

*Subregión IV:* Esta región comprendida en el sur este de la provincia de Buenos Aires, posee la media de producción más alta. El clima es templado a templado frío, con una temperatura media anual alrededor de 13-14°C. Los inviernos suelen ser largos y fríos y los veranos frescos y húmedos. En la zona atlántica el riesgo de heladas tardías se ve reducido por la acción moderadora del mar, pero con más probabilidades de lluvias en la época de madurez fisiológica del grano.

*Subregión V (norte):* Comprendido principalmente por la provincia de Córdoba y el norte de San Luis, el clima es continental semiárido con temperaturas invernales de 10 a 13°C. Las precipitaciones disminuyen de 700 a 600 mm de este a oeste con distribución estacional, por lo que son habituales los inviernos secos. La presencia en la región de vientos desecantes (zonda) también es un factor que produce alteraciones en la producción.

*Subregión V (sur):* Esta región se encuentra comprendida en la provincia de La Pampa y el sur de la provincia de San Luis. El clima es continental, con inviernos

fríos y secos. Es la región más fría y seca, con temperaturas medias de 14°C y precipitaciones que disminuyen hasta los 500 mm (concentradas en primavera y otoño).

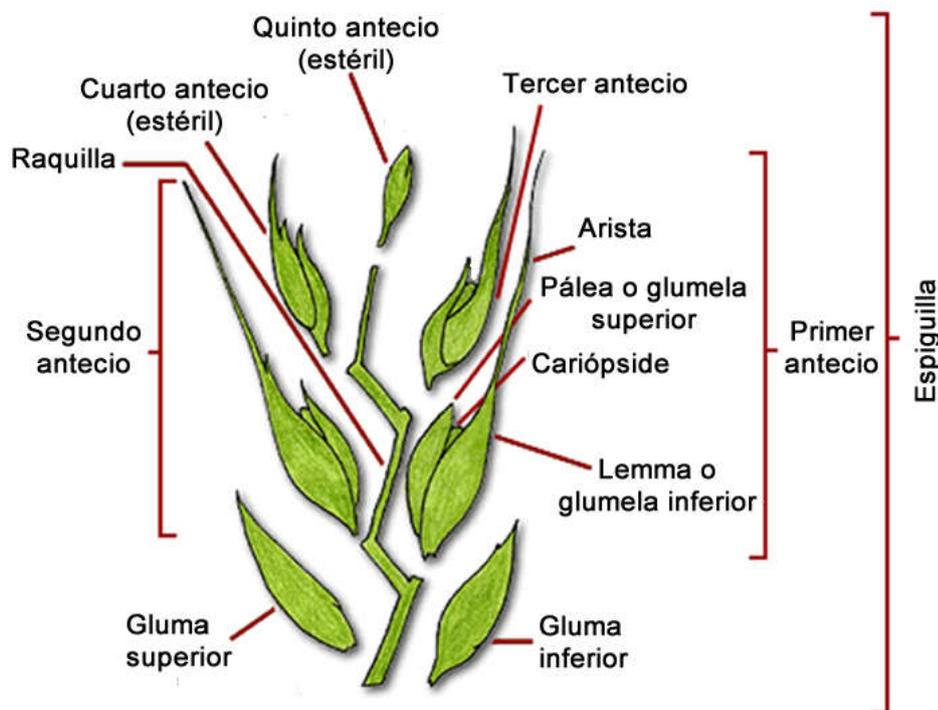


**Figura 1.1:** Mapa de las regiones trigueras de Argentina. El sombreado representa las zonas productoras.

## 2 - Morfología del trigo

El trigo pertenece a la familia de las gramíneas o poáceas (*Poaceae*), plantas generalmente herbáceas perteneciente al orden *Poales* de las monocotiledóneas. La planta de trigo posee una altura entre 0,7 a 1,2 m, con una raíz fasciculada (o raíz en cabellera), las cuales alcanzan en su mayoría una profundidad de 25 cm, y

un único tallo principal con típicamente 2-3 macollos por planta. Las hojas de trigo se forman en cada nodo e incluyen una vaina de la hoja que envuelve el tallo y la hoja. Poseen aurículas pequeñas, que se envuelven alrededor del tallo en el punto donde se reúne la vaina con el limbo de la hoja. La inflorescencia de las gramíneas es la espiga, compuesta por un raquis (o tallo central de entrenudos cortos), sobre el cual van dispuestas de 20 a 30 espiguillas en forma alterna. Cada espiguilla presenta externamente dos brácteas denominadas glumas y contiene tres a cinco antecios dispuestos sobre una raquilla. Cada uno de los antecios se compone de una lemma o glumela inferior, de una pálea o glumela superior y de una flor. Normalmente uno a dos antecios son estériles, generándose un máximo de dos a tres flores fértiles en cada espiguilla. En algunos cultivares las lemmas se prolongan en forma de arista, originándose espigas barbadas. El fruto típico de las gramíneas es la carióspside o comúnmente llamado grano. Es un fruto simple, formado a partir de un único carpelo, uniseminado, seco e indehiscente, en el cual el integumento y pericarpio se han fusionado, formando una piel protectora.



**Figura 1.2:** Esquema de una espiguilla de trigo.

### 3 - Estructura del grano de trigo

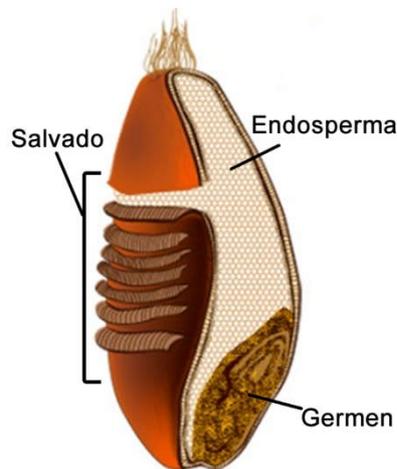
El tamaño del grano de trigo es muy dependiente de la variedad del mismo, así como de su posición en la espiga, teniendo una longitud media de 8 mm y un peso medio de 35 mg. En la estructura superficial, el mismo posee una parte dorsal redondeada con un surco que atraviesa toda su parte ventral, penetrando casi hasta el centro del grano. En el extremo superior presenta un grupo de pelos o tricomas, denominado pincel o cepillo. Tanto el cepillo como el surco ventral constituyen un factor a tener en cuenta a la hora de la manipulación del grano, ya que en los mismos es habitual que se alojen microorganismos y esporas, con un potencial riesgo de contaminación en el almacenado (Dimitri 1978; Tarabiono 1979). El grano de trigo puede separarse principalmente en tres fracciones:

*Salvado de trigo:* Constituido por las capas más superficiales del grano, comprendido por el pericarpio, la cubierta de la semilla, la epidermis nucelar y la capa de aleurona. El pericarpio está constituido por las capas más superficiales del grano representando el 5% del mismo. Su estructura celular está integrada por células intermedias, células cruzadas y células tubulares, que presentan una disposición cruzada, que deja mucho espacio intercelular (Mabille et al. 2001). Esta disposición favorece su remoción durante la molienda. La cubierta de la semilla y epidermis nucelar constituyen las capas intermedias. La cubierta de la semilla está fuertemente unida a las células tubulares del pericarpio (Kugler y Godoy 1964; Mabille et al. 2001). La capa de aleurona, es la capa exterior del endosperma y habitualmente posee el espesor de una célula (Kugler y Godoy 1964), la cual se elimina durante la molienda como componente del salvado (Antoine et al. 2002; Dupont and Altembach 2003). Las células de la capa de aleurona poseen un núcleo grande y numerosos gránulos proteicos y tienen un papel fundamental en la germinación (Ritchie et al. 2000) siendo el integrante del salvado con mayor actividad enzimática (Shewry and Halford 2002).

*Germen de trigo:* El germen de trigo representa alrededor del 3% del grano. Está constituido por el eje embrionario (predecesor de la raíz y el tallo) y el escutelo (tejido de almacenamiento). Esta fracción es relativamente rica en proteínas (25%), azúcares (18%, principalmente sacarosa y rafinosa) y cenizas (5%) y es la fracción

con mayor concentración de lípidos (16% en el eje embrionario y 32% en el escutelo) (Kugler y Godoy 1964).

*Endosperma:* Esta fracción es la que constituye la harina y es la más abundante en el grano. Las células que la conforman están repletas de gránulos de almidón incluidos en una matriz proteica (Hoseney 1991; Dupont and Altenbach 2003). La resistencia que ofrece a la molienda caracteriza a los granos como duros o blandos (Campbell et al. 2007). Si el endosperma es duro, se separa más fácilmente del salvado, produciendo mejores rendimientos al permitir separar más fácilmente a los contaminantes. En estos granos, el entrelazamiento entre el almidón y las proteínas es mayor, lo que le da su resistencia a la molienda.



**Figura 1.3:** Estructura del grano de trigo

#### **4 - Composición del grano de trigo**

El grano de trigo está compuesto principalmente por almidón, proteínas, minerales, vitaminas y lípidos (Matz 1999; Shewry and Halford 2002).

*Almidón:* El almidón está constituido básicamente por polímeros de  $\alpha$ -D-glucosa. Las cadenas poliméricas crecen radialmente dado que muchos grupos hidroxilos se atraen formando uniones de hidrógeno entre las moléculas adyacentes de amilosa y amilopectina (Dupont and Altenbach 2003; Ao and Jane 2007). El

almidón se encuentra en forma de gránulos que se forman en amiloplastos (un gránulo por cada amiloplasto). Se pueden encontrar dos tipos de gránulos: los grandes, lenticulares y los pequeños esféricos (Ao and Jane 2007).

*Celulosa:* En las plantas, la celulosa es el principal polisacárido estructural. Es un polímero formado por moléculas de D-glucosa unidas por enlaces  $\beta$  1-4, resultando en una estructura lineal, que se asocia fuertemente en una macroestructura muy insoluble. Esta estructura le brinda resistencia a muchos microorganismos y enzimas (Philippe 2006).

*Lípidos:* La composición lipídica del grano de trigo consta de un 70% de lípidos no polares, 20% de glicolípidos y 10% de fosfolípidos. La mayor proporción de los mismos se encuentra en el germen de trigo. Los presentes en el endosperma se dividen en almidonados y no almidonados, con diferente constitución: 9% lípidos no polares, 5% glicolípidos y 86% fosfolípidos para lípidos almidonados y 60% lípidos no polares, 25% glicolípidos y 15% fosfolípidos para lípidos no almidonados (Prabhasankar et al. 2000).

*Minerales y vitaminas:* Los minerales más importantes del grano son calcio, fósforo, hierro, magnesio y potasio (Liu et al. 2006), los cuales varían según el cultivar y las condiciones ambientales (Zhao et al. 2009). Los mismos se encuentran principalmente en el pericarpio. Las vitaminas más importantes presentes en el grano de trigo son vitaminas del grupo B y vitamina E (Liyana-Pathirana and Sahidi 2007).

*Proteínas:* El principal componente proteico en el trigo es el gluten, que conforma las proteínas de reserva del endosperma de los granos. El mismo está constituido por las gliadinas y gluteninas (Gianibelli et al. 2001; Gras et al. 2001; Dupont and Altenbach 2003). El gluten forma una red viscoelástica en el proceso de panificación, razón por la cual estas proteínas son responsables de la plasticidad y elasticidad de la masa (Daniel and Triboi 2000; Larroque et al. 2000; Dupont and Altenbach 2003; Wieser 2007).

Las proteínas del trigo se clasifican por su solubilidad de acuerdo a Osborne (1907) en cuatro fracciones, la cuales se detallan en la Tabla 1.1.

**Tabla 1.1:** Clasificación de las proteínas de trigo de acuerdo a su solubilidad.

<b>Fracción</b>	<b>Solubilidad</b>
Albúminas	Proteínas solubles en agua
Globulinas	Proteínas solubles en soluciones salinas diluidas
Gliadinas	Proteínas solubles en alcohol etílico al 70 %
Gluteninas	Proteínas solubles en ácidos o bases diluidas

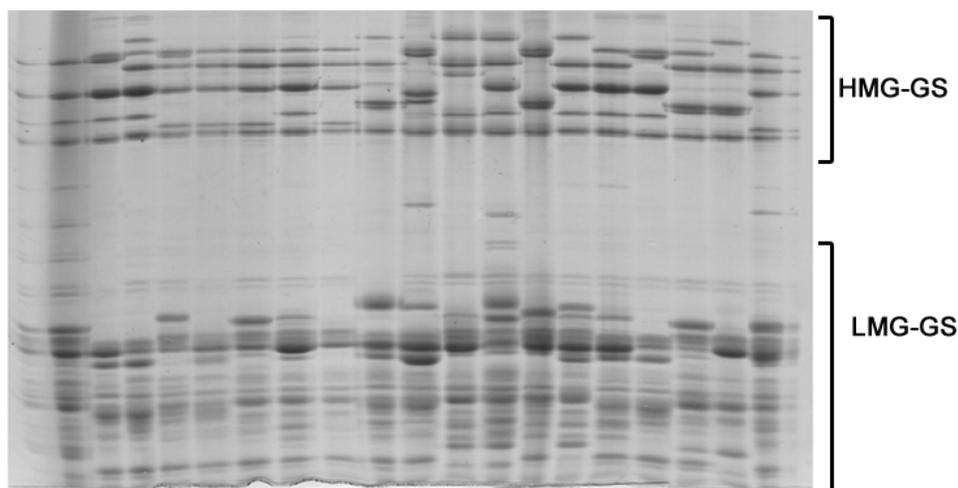
## **5 - Proteínas de trigo: gliadinas y gluteninas**

Las proteínas que conforman las gliadinas son polipéptidos monoméricos de aproximadamente 50 kD, mientras que las gluteninas consisten en grandes polipéptidos asociados por puentes disulfuro con pesos moleculares que varían entre 100.000 a millones de kD (Sapirstein and Fu 1998; Veraverbeke and Delcour 2002; Arfvidsson et al. 2004).

Las gliadinas, se clasifican en  $\omega$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de acuerdo con su movilidad en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Hamaizu et al. 1974). Al ser hidratadas, estas proteínas desarrollan cualidades de adhesión, sin embargo tienen poca o nula resistencia a la extensión. Estas cualidades son responsables en la masa de la viscosidad y extensibilidad, facilitando la fluidez y expansión de la misma, contribuyendo a aumentar el volumen de la pieza del pan (Khatkar and Schofield 2002a, b; Faergestad et al. 2004; Belton 2005).

Las gluteninas se pueden clasificar en subunidades de alto (HMW-GS) y bajo peso molecular (LMW-GS) (D'Ovidio and Masci 2004; Belton 2005). Su capacidad de entrecruzamiento contribuye a la textura y la reología de la masa, como a la calidad panadera de las harinas, dado que es responsable de la elasticidad y cohesividad de la masa (Payne et al. 1987; Shewry et al. 2001; Kamal et al. 2009).

La relación entre estos dos grupos de proteínas y el tamaño de los polímeros de gluteninas, a su vez son factores que afectan las propiedades reológicas de la masa (MacRitchie et al. 1990; Singh and MacRitchie 2001; He et al. 2005; Kamal et al. 2009).



**Figura 1.4:** Perfiles proteicos de distintos cultivares de trigo en SDS-PAGE. Tomado de Lerner y Ponzio (2003).

## 6 - Variación alélica de las gluteninas de alto peso molecular

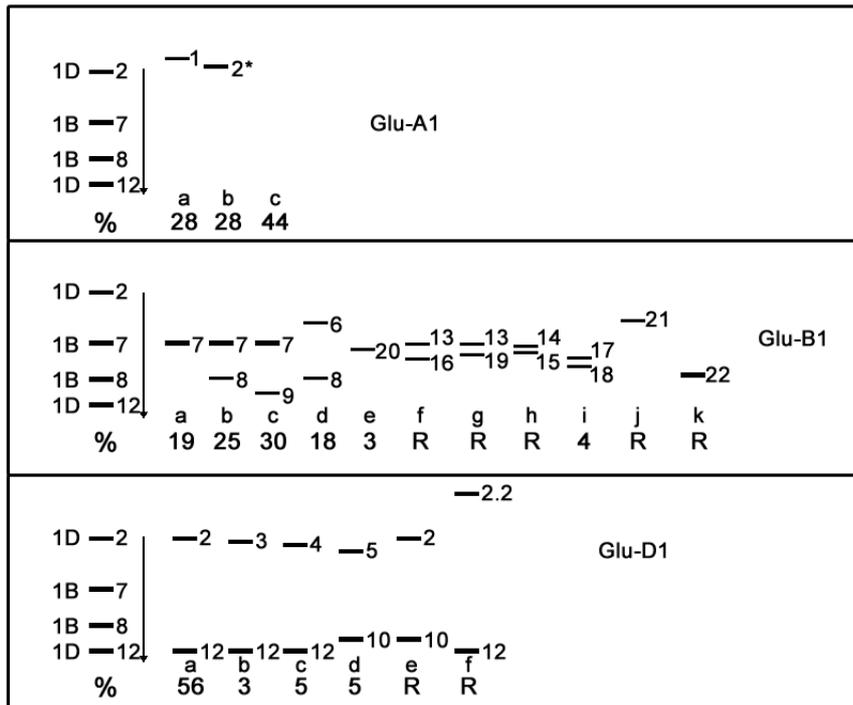
Los genes que codifican para las gluteninas de alto peso molecular están ubicados en tres locus distribuidos en el brazo más largo de los cromosomas A1, B1 y D1 (Figura 1.5), y entre todos conforman el grupo Glu-1 (Payne et al. 1987). Cada locus tiene una variación alélica diferente que se detalla en la Tabla 1.2 (Payne and Laurence 1983; Sutton 1991).

**Tabla 1.2:** Variación alélica de los genes de gluteninas de alto peso molecular

Cromosoma	Alelos
A1	1, 2*, Nulo
B1	7, 20, 21, 22, 6+8, 7+8, 7+9, 13+16, 13+19, 14+15, 17+18
D1	2+10, 2+11, 2+12, 3+12, 4+12, 5+10, 2.2+12

La variación alélica de estas subunidades está muy relacionada con los parámetros de calidad, por lo que Payne et al. (1984, 1987) generaron un score que asocia la variante alélica con los resultados de calidad de las pruebas de sedimentación en SDS (Tabla 1.3). Rogers et al. (1989) desarrollaron una modificación al score de Payne, debido a la pérdida de calidad panadera como

producto de la transgenia llamada “introgresión con centeno”. Por otro lado, en la interacción genotipo – ambiente existen factores tales como la disponibilidad de agua, nutrientes, variación de temperatura y condiciones pre y post cosecha, que pueden variar la calidad potencial, debido a un cambio en la relación gliadinas/gluteninas (Weegels et al. 1996; Don et al. 2006; Sapirstein et al. 2007; Kamal et al. 2009).



**Figura 1.5:** Polimorfismo de subunidades de gluteninas de alto peso molecular – HMW– en trigo pan.

**Tabla 1.3:** Puntaje de calidad del gluten de trigo para cada cromosoma.

Puntaje de calidad	Cromosoma		
	A1	B1	D1
4			5 + 10
3	1	17 + 18	
3	2*	7 + 8	
3		13 + 16	
2		7 + 9	2 + 12
2			3 + 12
1	nulo	7	4 + 12
1		6 + 8	
1		20	

## **7 - Clasificación de los cultivares argentinos**

En Argentina, los distintos cultivares de trigo se clasifican en tres grupos basándose en propiedades como el peso hectolítrico, proteína del grano, rendimiento en harina, cenizas, gluten húmedo, estabilidad farinográfica, volumen de pan y principalmente la fuerza panadera (W alveográfico) (Miranda 2001; Cuniberti 2003, 2004). El Grupo I (G1) incluye trigos para panificación industrial ( $340 < W < 600$ ); el Grupo II (G2) trigos aptos para panificación tradicional ( $240 < W < 340$ ), y el grupo III (G3) trigos que pueden ser usados en panificación directa ( $180 < W < 240$ ). Cada cultivar de trigo presenta valores dentro de un rango determinado de acuerdo a sus características, el cual puede resultar modificado de acuerdo a la localidad, año de campaña y a los efectos de la interacción genotipo – ambiente, por lo cual la clasificación debe actualizarse constantemente.

## **8 - Fusariosis de la espiga de trigo**

La Fusariosis de la espiga de trigo (FET) es una enfermedad fúngica causada por especies del género *Fusarium* que afecta a los cereales de grano pequeño como el trigo alrededor del mundo (McMullen et al. 1997; Monds et al. 2005) La colonización se inicia principalmente con el ingreso de esporas del patógeno a través de las anteras expuestas durante la floración (Pritsch et al. 2000). Luego de la germinación, las hifas se desarrollan en las superficies exteriores de flores y glumas, permitiendo al hongo crecer hacia los estomas y otros sitios sensibles de la inflorescencia (Bushnell et al. 2003). Luego el hongo crece inter e intracelularmente en el ovario y brácteas, propagándose de una espiguilla a las demás a través del raquis. La propagación de las hifas durante las etapas posteriores de la infección, es acompañada por desintegración de los orgánulos de la célula huésped, degeneración del citoplasma y colapso de células del parénquima (Wanjiru et al. 2002). El micelio bloquea el transporte de nutrientes, provocando una reducción en el número de granos por espiga, granos más pequeños, livianos y chuzos, reducción del rendimiento, peso hectolítrico, tenor proteico, poder germinativo y vigor de las semillas (Reis y Carmona 2002). Las regiones geográficas con alta humedad y temperatura, donde las lluvias frecuentes o rocíos coinciden con el

período de floración o el período temprano de llenado del grano de los cultivos, favorecen el desarrollo de esta enfermedad.

Debido a la extensa área de cultivo en Argentina, las epidemias no cubren todas las zonas productoras. En las últimas décadas se registraron epidemias en diferentes regiones en los años 1963, 1976, 1978, 1985, 1993, 2001 y 2012 llegando a provocar pérdidas de hasta el 50% del cultivo (Galich y Galich 1996, Moschini y Fortugno 1996; Malbrán et al. 2012; Alberione et al. 2016).

## **9 - Agentes causales de la Fusariosis de la espiga de trigo**

La FET es causada por diferentes miembros del género *Fusarium*, grupo de hongos imperfectos, siendo el principal agente etiológico *Fusarium graminearum* (teleomorfo: *Giberella zeae*, perteneciente al *Phyllum Ascomycota*, orden *Hypocreales*, familia *Hypocreaceae*). En general, los miembros de este género son saprófitos y parásitos facultativos capaces de colonizar tejidos vivos en cualquier etapa durante el ciclo de vida del hospedante y establecerse en tejidos senescentes o residuos de cultivos. La mayoría de las especies de *Giberella* son heterotálicas, de modo que requieren de la unión de dos talos compatibles para que se lleve a cabo la reproducción sexual (Ulloa and Hanlin 2006). *Fusarium spp.* se encuentra en diversos ambientes alrededor del mundo, pudiendo ser aislados de suelo, granos, frutos, residuos de cosecha, entre otros (Summerell et al. 2010). Las especies de *Fusarium* presentan diferentes condiciones óptimas de crecimiento e infección, por lo tanto, las especies dominantes presentes en un cereal pueden diferir entre estaciones y entre regiones. Sin embargo, las especies predominantes en todo el mundo son: *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* y *F. poae* (Reis y Carmona 2002). *F. graminearum* es la especie más extendida en todo el mundo, siendo predominante en regiones cálidas y húmedas, mientras que *F. culmorum* y *F. avenaceum* son comunes en Europa y *F. poae* es frecuente tanto en Europa como en América.

Las especies de *Fusarium* se identifican morfológicamente de acuerdo a características de las colonias, como pigmentación, tipo de micelio y esporas, entre otras. Los medios utilizados para la identificación morfológica son agar hoja de clavel (CLA) –debido a que favorece el desarrollo de conidios, clamidosporas, peritecios y otras estructuras morfológicas– y agar papa glucosado (PGA) –para observar características de las colonias– (Leslie and Summerell 2006). La

identificación molecular de la especie ha conllevado a su subdivisión en nuevas especies, denominadas complejo de especies *F. graminearum* (O'Donnell et al. 2004).

#### **10 - Complejo de especies *Fusarium graminearum***

La especie *Fusarium graminearum* fue dividida en 2004 en un complejo de especies, conocido como FGSC (*Fusarium graminearum* species complex), que comprende hasta la fecha 16 especies filogenéticas: *F. graminearum sensu stricto*, *F. austroamericanum*, *F. meridionale*, *F. boothii*, *F. mesoamericanum*, *F. acaciae-mearnsii*, *F. asiaticum*, *F. cortaderiae*, *F. brasiliicum*, *F. vorosii*, *F. gerlachii*, *F. aethiopicum*, *F. ussurianum*, *F. louisianense*, *F. empálense* y *F. spp.* (sin nombre asignado) (O'Donnell et al. 2004, 2008; Yli-Mattila et al. 2009; Sarver et al. 2011; Aoki et al. 2012).

Se han realizado intensas comparaciones morfológicas de una colección mundial del complejo FGSC, pero sólo seis especies y tres grupos de especies fueron resueltos dentro del complejo *F. graminearum*, lo cual refleja su similar morfología y el solapamiento de las características de los conidios (Aoki et al. 2012). Por dicho motivo, la diferenciación de especies del complejo de *F. graminearum* radica fundamentalmente en el empleo de métodos moleculares, como la amplificación de regiones conservadas y posterior secuenciación, y el empleo de primers específicos de especie como el Fg16N, que reconocen a *F. graminearum sensu lato*, y Fg16, que generan bandas de diferentes peso molecular para los distintos miembros del FGSC dentro de los cuales se encuentra *F. graminearum sensu stricto* (Nicholson et al. 1998).

#### **11 - Variabilidad genética de *Fusarium graminearum***

Poblaciones de *F. graminearum* han sido examinadas alrededor del mundo mostrando una gran variabilidad genética (Gilbert et al. 2001; Carter et al. 2002; Tóth et al. 2005; Akinsanmi et al. 2008). Los marcadores moleculares han demostrado ser de utilidad para abordar estudios polifásicos, tales como la asociación de genotipos con patogenicidad, toxicidad, ecología, etc. Varias técnicas moleculares se han utilizado para proporcionar información sobre su estructura poblacional, tales como RFLP (restriction fragment length polymorphism), RAPD

(random amplification of polymorphic DNA), ISSR (inter-simple sequence repeat) y AFLP (amplified fragment length polymorphism) (Leslie et al. 2007).

El análisis basado en marcadores moleculares ISSR resulta ser una técnica fiable en estudios de genética de población en diversos eucariotas, incluidos los hongos (Mishra et al. 2003). Dicha técnica consiste en la amplificación de secuencias de ADN repetidas entre microsatélites o SSR (simple sequence repeat) a través del anclaje o no de los primers homólogos SSR. Los microsatélites son repeticiones en tándem compuestas de uno a seis nucleótidos, los cuales son ubicuos, abundantes y altamente polimórficos en la mayoría de los genomas eucariotas. Las secuencias de ADN que flanquean los microsatélites son conservadas y utilizadas para diseñar primers específicos para PCR, lo cual amplifica el locus del microsatélite y permite la detección de diferentes alelos de un locus. Los ISSR no requieren de un previo conocimiento de secuencia y generan patrones reproducibles. En principio, este tipo de marcadores genera más información sobre polimorfismos que otras técnicas moleculares como RAPD, ya que son marcadores codominantes y aparecen distribuidos en todo el genoma.

## **12 - Agresividad: componentes y evaluación**

Los términos patogenicidad y agresividad suelen ser usados de manera indistinta, pero representan diferentes conceptos. De acuerdo con Schafer (1994) la patogenicidad es la capacidad de un patógeno de causar una enfermedad, una medida cualitativa, mientras que la agresividad es una medida cuantitativa de la misma (Vanderplank 1984; Shaner et al. 1992).

La agresividad se compone de distintos rasgos cuantitativos del ciclo de vida del patógeno, como la eficiencia de infección, velocidad de esporulación, tiempo de letargo, tamaño de lesión, entre otros. Su estimación, se realiza principalmente de acuerdo a la severidad de la enfermedad, medida como el porcentaje de espiguillas enfermas en una espiga. A su vez, esta variable puede relacionarse con la eficiencia de infección y el tamaño de la lesión (Pariaud et al. 2009). A nivel agronómico, otras variables como el porcentaje de granos dañados por espiga, o índices calculados a través de estas variables también son estimativos de la agresividad de la enfermedad (Alberione et al. 2016).

*Fusarium* posee diferentes mecanismos para producir la infección que pueden influir en los niveles de agresividad, como la liberación de enzimas extracelulares

que degradan los componentes de la pared celular, entre ellas las celulasas, xilanasas y pectinasas. La liberación de este tipo de enzimas en los estadios tempranos de la enfermedad permiten el establecimiento y propagación de la enfermedad (Mesterhazy et al.1999; Kang and Buchenauer 2000; Wanjiru et al. 2002; Kang et al. 2005; Kikot et al. 2009). Junto a este grupo de enzimas, se producen las proteasas que degradan, en una fase inicial de la infección, las proteínas de la pared celular y posteriormente, las proteínas de reserva del grano (Nightingale et al. 1999; Barneix 2007; Brzozowski et al. 2008). Debe considerarse, que las condiciones fisiológicas tanto del patógeno como de la planta huésped son factores determinantes en el progreso y agresividad de una enfermedad (Pariaud et al. 2009). Por otro lado, Cumagun y Miedaner (2004) estimaron que la interacción del aislamiento con el ambiente representa un tercio de la variación en la agresividad. Las lluvias frecuentes, alta humedad y presencia de rocío durante los períodos de floración favorecen la infección y su desarrollo (Moschini et al. 2001). El efecto de la temperatura también fue ampliamente estudiado, ya que los patógenos poseen una temperatura óptima de esporulación, germinación y desarrollo de lesiones (Andersen 1948; Bai and Shaner 2004).

En condiciones óptimas para el desarrollo de la enfermedad la respuesta de agresividad del patógeno suele ser elevada y homogénea, por lo cual la variabilidad en la agresividad entre aislamientos se puede analizar más fácilmente en condiciones sub-óptimas (Pariaud et al. 2009). Reportes en otras enfermedades han demostrado diferencias en agresividad en aislamientos que incluso presentan pocas diferencias genéticas ante un marcado neutro (Carlisle et al. 2002; Mundt et al. 2002; Milus et al. 2006). Se ha reportado alrededor del mundo una amplia variabilidad genética no sólo entre diferentes especies del FGSC, sino también entre aislamientos de la misma especie (Carter et al. 2002; Gale et al. 2003; Zeller et al. 2003; Suga et al. 2008). Comparado con la genética de la resistencia a la enfermedad, la base genética de la agresividad así como su variabilidad está muy poco estudiada, aunque algunos trabajos indican que la misma es poligénica (Caten et al. 1984; Hawthorne et al. 1994). Cumagun et al. (2004) detectaron por lo menos dos QTL (locus de rasgos cuantitativos) para la agresividad.

### 13 - Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios perjudiciales para la salud tanto animal como humana, las cuales toman relevancia dado las frecuentes epidemias producidas por *Fusarium spp* sobre los cereales. Las principales micotoxinas producidas por miembros del género *Fusarium* son tricotecenos, sesquiterpenos tricíclicos que contienen un doble enlace entre los carbonos 9 y 10 y un anillo 12,13-epóxido. Los tricotecenos se pueden dividir en miembros del grupo A, (no tienen un grupo carbonilo en la posición del C-8), al que pertenecen el diacetoxiscirpenol (DAS) y la toxina T-2, y los miembros del grupo B, (que tienen un grupo carbonilo en el C-8), al que pertenecen el nivalenol (NIV) y deoxinivalenol (DON) y sus derivados acetilados 4-acetilnivalenol (4-ANIV), 3-acetildeoxinivalenol (3-ADON) y 15-acetildeoxinivalenol (15-ADON). Las especies del complejo *F. graminearum* tienen el potencial de producir tres diferentes quimiotipos: 15-ADON (con producción de DON y 15-ADON), 3-ADON (con producción de DON y 3-ADON), y NIV (Desjardins 2006).

Los tricotecenos se unen a los ribosomas eucarióticos inhibiendo la síntesis de proteínas al mismo tiempo que producen estrés oxidativo debido a la generación de radicales libres (Norred et al. 1996). Los síntomas más comunes en humanos y animales incluyen lesiones en la mucosa del tracto gastrointestinal, resultando en hemorragias y toxicidades hematológicas, vómitos y rechazo del alimento, y en casos crónicos anorexia, reducción de la ganancia de peso, cambios neuroendocrinos y daños inmunológicos (Larsen et al. 2004; Pestka and Smolinski 2005; Pestka 2007). Además, los tricotecenos tienen varios efectos fitotóxicos en una amplia variedad de plantas, tejidos de plantas y líneas celulares, provocando marchitez, clorosis, necrosis, entre otros (Desjardins 2006). Las micotoxinas son estables luego de procesos de elaboración de alimentos y bebidas y, por lo tanto, es posible encontrarlas también en los productos procesados (Lauren and Smith 2001).

El DON es la principal micotoxina regulada por la legislación internacional para la comercialización de granos de trigo y derivados, habiéndose establecido límites máximos para cada tipo de alimento. Actualmente, en Argentina no existe una regulación nacional de los niveles máximos permitidos para esta micotoxina para consumo interno, sin embargo, la industria triguera de exportación se rige por

los límites establecidos por la Unión Europea, que determinaron el contenido máximo de DON en 2 µg/g para granos enteros (FAO 2003).

#### **14 - Distribución geográfica de las especies del complejo *Fusarium graminearum* y quimiotipos**

Mientras que algunas especies del complejo FGSC comprenden sólo un quimiotipo, como *F. meridionale*, otras pueden contener dos o más quimiotipos diferentes dependiendo del origen geográfico de la población. Por otra parte, pese a que las especies del complejo FGSC presentan diferente origen geográfico y su distribución varía alrededor del mundo, ciertas especies se encuentran relacionadas con determinados hospedantes, por ejemplo, *F. asiaticum* en arroz, *F. boothii* y *F. meridionale* en maíz y *F. graminearum* s.s. en trigo, cebada y maíz (van der Lee et al. 2015).

Diversas investigaciones alrededor del mundo tratan acerca de la ocurrencia de este complejo y sus micotoxinas. En Europa, *F. culmorum* fue considerado el principal causante de FET en Holanda antes del año 2000, donde empezó a ser reemplazado por *F. graminearum* s.s. (Waalwijk et al. 2003). De igual manera *F. graminearum* s.s. era escasamente reportado en trigo y cebada en Dinamarca siendo cada vez más común en los últimos años (Nielsen et al. 2011; 2012). *F. culmorum* también fue reemplazado por *F. graminearum* s.s. como dominante en Luxemburgo (Beyer et al. 2014). Este miembro del complejo también se ha ubicado como el más abundante en Francia (Waalwijk et al. 2008), Alemania (Talas et al. 2011), Inglaterra (Jennings et al. 2004) e Italia (Prodi et al. 2009, 2011). El quimiotipo dominante hallado entre estos aislamientos fue el 15-ADON (Prodi et al. 2009, 2011; Boutigny et al. 2014; Somma et al. 2014). En el norte de Rusia y Finlandia, el quimiotipo dominante entre aislamientos de *F. graminearum* s.s. fue 3-ADON (Yli-Mattila et al. 2009) mientras que en el sur de Rusia fue 15-ADON (Davari et al. 2013). Por otro lado, las especies predominantes encontradas en Japón son *F. graminearum* s.s. en el norte, *F. asiaticum* en el sur, con una aparente co-ocurrencia en la zona central, siendo los quimiotipos encontrados 3-ADON y 15-ADON para *F. graminearum* s.s. y NIV para *F. asiaticum* (Yoshizawa and Jin 1995; Suga et al. 2008; van der Lee et al. 2015). En Norteamérica, la especie predominante es *F. graminearum* s.s. y se ha observado un reemplazo de los aislamientos con quimiotipo 15-ADON por los 3-ADON, sin embargo, también se ha

reportado la presencia de *F. asiaticum* con genotipo de NIV (van der Lee et al. 2015). Dentro de Sudamérica, el principal miembro del complejo FGSC hallado en el sur de Brasil es *F. graminearum* s.s. con quimiotipo 15-ADON (Scoz et al. 2009; Astolfi et al. 2011) y poca presencia de NIV (Scoz et al. 2009; Sampietro et al. 2010, 2011; Umpiérrez-Failache et al. 2013). En Argentina, el quimiotipo 15-ADON también es el más representativo (Reynoso et al. 2011; Castañares et al. 2014; Malbrán et al. 2014) aunque también fue hallado el quimiotipo 3-ADON (Alvarez et al. 2009).

## **15 - Control integrado de la enfermedad**

La complejidad de la FET y su amenaza multifacética, imponen el uso de múltiples e integradas estrategias de manejo de la enfermedad. Bai y Shaner (2004) consideran que la utilización de cultivares de trigo resistentes es crucial para reducir daños de la FET, en un enfoque integrado.

Se conocen actualmente 5 mecanismos de resistencia a la enfermedad: tipo I es la resistencia a la penetración del patógeno y el inicio de la enfermedad; tipo II es la resistencia a la propagación del patógeno en la planta una vez establecida la enfermedad; tipo III es la resistencia a la infección de los granos; tipo IV es la tolerancia por la que los rendimientos se mantienen a pesar de la presencia de enfermedad; y tipo V es la habilidad de la planta de degradar e inhibir las toxinas producidas por el hongo (Mesterhazy 1995). En la actualidad no están disponibles cultivares de trigo altamente resistentes a la enfermedad o tolerantes a las micotoxinas (Goswami and Kistler 2004), siendo el cultivar de origen chino Sumai 3 y sus derivados los que proveen actualmente el máximo grado de resistencia a la propagación de la enfermedad. Este hecho se fundamenta en la complejidad de la herencia de la resistencia, la pobre aptitud agronómica y la baja calidad de las principales fuentes de resistencia (Galich, 2004).

La imposibilidad de un control adecuado de la FET por medio de la rotación de cultivos (control cultural) se fundamenta en la marcada ubicuidad de las especies del género *Fusarium*, su amplia gama de hospedantes y la alta diseminación anemófila de las esporas, que pueden ser transportadas desde fuentes distantes (Reis y Carmona 2002; Saharan et al. 2004). Schaafsma et al. (2001) en Ontario (Canadá) encontraron que sólo el 27% de la variación del contenido de la micotoxina DON ligada a *Fusarium spp.* se asoció a los cultivares,

no habiendo detectado efectos por sistemas de labranza y tipo de fertilización nitrogenada (observaciones de 3 años en condiciones naturales de campo). En Argentina, Lori et al. (2009) concluyeron que las condiciones meteorológicas imperantes en 3 años sucesivos de ensayos de trigo fueron cruciales para explicar las variaciones en los niveles observados de la FET, comparado con el efecto de sistemas de labranza y otras prácticas agronómicas.

En relación al control químico, Bai y Shaner (2004) sostienen que los fungicidas pueden ser útiles cuando las condiciones meteorológicas, u otras asociadas a prácticas de cultivo, son particularmente favorables para el desarrollo epidémico. Los fungicidas aplicados en antesis pueden ayudar a prevenir pérdidas económicas pero su eficacia depende del momento de aplicación y tecnología para lograr una buena cobertura de la espiga (Del Ponte et al. 2004). Las infecciones establecidas no pueden ser revertidas con los fungicidas actuales (principalmente bencimidazoles y triazoles o sus mezclas), razón por la cual, las aplicaciones deben realizarse en forma preventiva (antes que ocurran) o semi-preventivas (máximo 2 a 3 días posteriores al evento infectivo). En este último caso pueden darse limitaciones de “piso” para que opere una máquina aplicadora terrestre, normalmente más eficiente que los tratamientos con aviones (Annone 2003).

## **16 - Hipótesis**

Los aislamientos de *Fusarium graminearum* producen diferencial daño sobre los granos de trigo dependiendo de su agresividad, alterando el rendimiento y la calidad de los mismos, en relación con la variabilidad en la interacción planta-patógeno.

## **17 - Objetivo general**

Aportar conocimientos relacionados con el daño producido por *Fusarium graminearum* en granos de trigo y cambios en la composición proteica y toxicidad en sus respectivas harinas, en relación a cambios de calidad.

## **18 - Objetivos específicos**

Caracterizar e identificar especies de *Fusarium* y determinar la diversidad genética intraespecífica de aislamientos de *F. graminearum* obtenidos a partir de granos de trigo provenientes de diversas localidades de la región pampeana a través de métodos convencionales y moleculares.

Evaluar variables de agresividad, rendimiento, y contenido de deoxinivalenol en cultivares de trigo infectados a campo bajo condiciones ambientales controladas.

Evaluar cambios composicionales de las fracciones proteicas en granos de trigo en relación con el grado de infección.

Evaluar la implicancia de la infección sobre parámetros proteicos relacionados con la calidad en trigo.

Analizar la respuesta de las variables evaluadas en la interacción planta-patógeno mediante el empleo del análisis de los componentes principales.



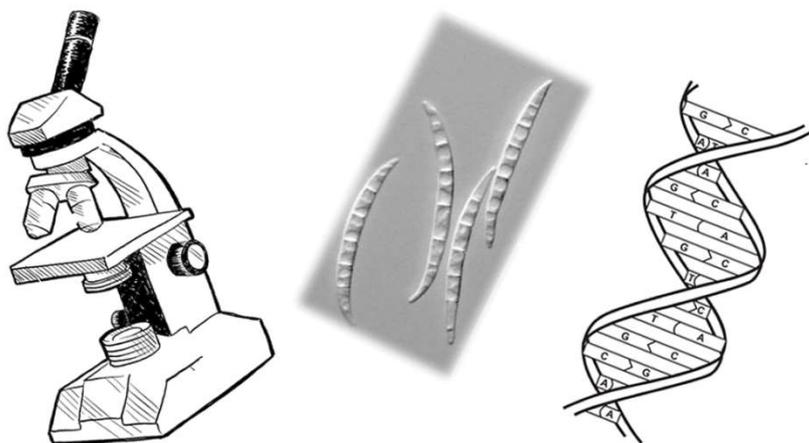
**CAPITULO II:**  
**Caracterización de Aislamientos**  
**de *Fusarium graminearum***

# Caracterización de Aislamientos de *Fusarium graminearum*

Dentro del complejo de especies de *Fusarium graminearum*, *F. graminearum sensu stricto* (s.s) es la especie que prevalece en la mayoría de las regiones del mundo afectadas por FET, lo cual sugiere que presenta buena adaptación a la variabilidad del medio ambiente. Si bien, se han realizado numerosas investigaciones acerca de la variabilidad genética y/o producción de micotoxinas entre aislamientos de este patógeno, estos estudios abarcan en general áreas de cultivo distantes geográficamente entre sí, siendo escasos los antecedentes dentro de una población pequeña o puntal.

Una técnica fiable en estudios de genética es el análisis basado en marcadores moleculares ISSR (inter simple sequence repeat). Dicha técnica consiste en la amplificación de secuencias de ADN repetidas entre microsatélites o SSR (simple sequence repeat) a través del anclaje o no de los primers homólogos SSR. Los microsatélites son repeticiones en tándem compuestas de uno a seis nucleótidos, los cuales son ubicuos, abundantes y altamente polimórficos en la mayoría de los genomas eucariotas. Los ISSR no requieren de un previo conocimiento de secuencia y generan patrones reproducibles.

La importancia del análisis de la variabilidad genética en relación a la producción de la toxina deoxinivalenol *in vitro* se fundamenta en que es la principal micotoxina monitoreada y cuantificada de acuerdo a las legislaciones comerciales internacionales, debido a sus efectos altamente perjudiciales sobre la salud tanto animal como humana.

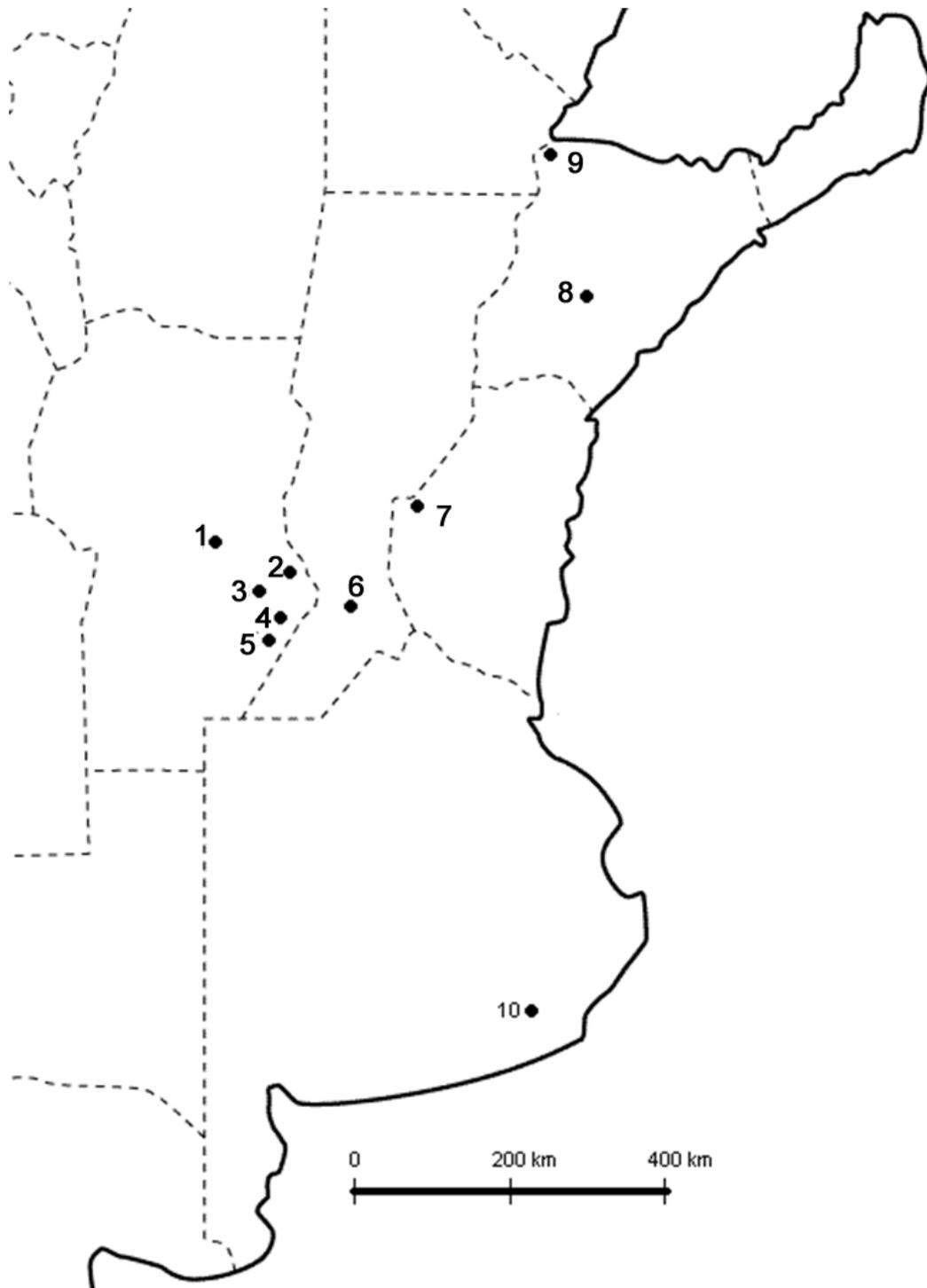


# MATERIALES Y METODOS

## 1 - Material biológico

Durante las campañas trigueras de los años 2009, 2010 y 2011 se recolectaron cien muestras de trigo provenientes de diversas localidades productoras argentinas (Figura 2.1). Las muestras fueron provistas por el INTA-Marcos Juárez (32° 42' S; 62° 06' O) pertenecientes al programa de mejoramiento de trigo.

Las muestras provinieron de cultivos realizados en una cama de siembra sobre suelo Arguidol con motocultivador habiéndose incorporado fertilizante nitrogenado (50 kg de urea/ha). Se hizo control preventivo aplicando insecticida clorpirifós en dosis de 500 mL/ha y se realizó desmalezado manual. Se siguieron las prácticas de rutina de la estación experimental del INTA. La cosecha se realizó ya sea a partir de cosechadoras automáticas, lo que se denomina cosecha a granel, o en forma manual, lo que permitió la evaluación de la espiga entera. En la Tabla 1.1 se enumeran las muestras utilizadas y sus características.



**Figura 2.1:** Ubicación de las zonas de muestreo: 1- Villa María ( $32^{\circ} 24' 37''$  S;  $63^{\circ} 13' 53''$  O); 2- Marcos Juárez ( $32^{\circ} 42'$  S;  $62^{\circ} 06'$  O); 3- Monte Buey ( $32^{\circ} 25' 00''$  S;  $62^{\circ} 21' 00''$  O); 4- Corral de Bustos ( $33^{\circ} 17' 00''$  S;  $62^{\circ} 12' 00''$  O); 5- Cavanagh ( $33^{\circ} 29' 00''$  S;  $62^{\circ} 21' 00''$  O); 6- Los Molinos ( $33^{\circ} 07' 00''$  S;  $61^{\circ} 20' 01''$  O); 7- Paraná ( $31^{\circ} 44' 40''$  S;  $60^{\circ} 31' 03''$  O); 8- Mercedes ( $29^{\circ} 12' 00''$  S;  $58^{\circ} 05' 00''$  O); 9- Corrientes ( $27^{\circ} 29' 00''$  S;  $58^{\circ} 49' 00''$  O); 10- Balcarce ( $37^{\circ} 49' 00''$  S;  $58^{\circ} 15' 00''$  O)

**Tabla 2.1:** Variedades de trigo utilizadas en este estudio.

<b>Variedad de trigo</b>	<b>Localidad</b>	<b>Tipo de Cosecha</b>	<b>Año</b>
sin identificar	Corral de Bustos	Espiguilla	2009
Bio INTA 3004	Los Molinos	Espiguilla	2009
Bio INTA 3006	Los Molinos	Espiguilla	2009
Klein PANTERA	Los Molinos	Espiguilla	2009
SUPER SERI con Lr 37	Marcos Juárez	Espiguilla	2009
sin identificar	Mercedes	Espiguilla	2009
Klein TIGRE cc	Mercedes	A granel	2009
Bio INTA 1001cc	Mercedes	A granel	2009
Bio INTA 1005cc	Mercedes	A granel	2009
N Baguette Premium 13cc	Mercedes	A granel	2009
ACA 903 B	Mercedes	A granel	2009
Klein LEON cc	Mercedes	A granel	2009
DM ATLAX cc	Mercedes	A granel	2009
ACA 901cc	Mercedes	A granel	2009
Buck 75 ANIVERSARIO cc	Mercedes	A granel	2009
Klein TAURO cc	Mercedes	A granel	2009
Buck AGP FAST cc	Mercedes	A granel	2009
Buck PUELICHE cc	Mercedes	A granel	2009
DM ONIX cc	Mercedes	A granel	2009
Bio INTA 1006 cc	Mercedes	A granel	2009
Klein ZORRO cc	Mercedes	A granel	2009
SURSEM LE 2294 cc	Mercedes	A granel	2009
DM CRONOX cc	Mercedes	A granel	2009
Klein CHAJA cc	Mercedes	A granel	2009
Klein NUTRIA cc	Mercedes	A granel	2009
Buck HUANCHEN cl	Mercedes	A granel	2009
Klein CASTOR cc	Mercedes	A granel	2009
Bio INTA 1002	Cavanagh	Espiguilla	2010
Bio INTA 1005	Cavanagh	Espiguilla	2010
Bio INTA 1006	Cavanagh	Espiguilla	2010
Bio INTA 3005	Cavanagh	Espiguilla	2010
B. METEORO	Cavanagh	Espiguilla	2010
K. TAURO	Cavanagh	Espiguilla	2010
SRM NOGAL	Cavanagh	Espiguilla	2010
J 1061	Marcos Juárez	Espiguilla	2010
J 10022	Marcos Juárez	Espiguilla	2010
J 10031	Marcos Juárez	Espiguilla	2010
Sy 100	Marcos Juárez	Espiguilla	2010
J 10035	Marcos Juárez	Espiguilla	2010
J 081002	Marcos Juárez	Espiguilla	2010
J 081014	Marcos Juárez	Espiguilla	2010
Sy 300	Marcos Juárez	Espiguilla	2010
J 10405	Marcos Juárez	Espiguilla	2010
J 10409	Marcos Juárez	Espiguilla	2010
J 10431	Marcos Juárez	Espiguilla	2010
J 10433	Marcos Juárez	Espiguilla	2010
J 10445	Marcos Juárez	Espiguilla	2010
J 10448	Marcos Juárez	Espiguilla	2010

J 10451	Marcos Juárez	Espiguilla	2010
J 10452	Marcos Juárez	Espiguilla	2010
J 10454	Marcos Juárez	Espiguilla	2010
J 10456	Marcos Juárez	Espiguilla	2010
J 10456	Marcos Juárez	Espiguilla	2010
J 10460	Marcos Juárez	Espiguilla	2010
J 10462	Marcos Juárez	Espiguilla	2010
Bio INTA 1005	Marcos Juárez	Espiguilla	2010
Bio INTA 1005	Paraná	Espiguilla	2010
Bio INTA 3004	Villa María	Espiguilla	2010
K. GUERRERO	Villa María	Espiguilla	2010
Vivero de VERANO 2011	Balcarce	Espiguilla	2011
ACA 906	Cavanagh	Espiguilla	2011
Bio INTA 1002	Cavanagh	Espiguilla	2011
Bio INTA 1005	Cavanagh	Espiguilla	2011
Bio INTA 1006	Cavanagh	Espiguilla	2011
Bio INTA 2004	Cavanagh	Espiguilla	2011
Bio INTA 3005	Cavanagh	Espiguilla	2011
JN 8019	Cavanagh	Espiguilla	2011
K LEON	Cavanagh	Espiguilla	2011
N Baguette 9	Cavanagh	Espiguilla	2011
Nogal 100	Cavanagh	Espiguilla	2011
ACA 903	Corral de Bustos	Espiguilla	2011
ACA 903	Corral de Bustos	Espiguilla	2011
Bio INTA 1002	Corral de Bustos	Espiguilla	2011
Bio INTA 1004	Corral de Bustos	Espiguilla	2011
Bio INTA 1005	Corral de Bustos	Espiguilla	2011
Bio INTA 3005	Corral de Bustos	Espiguilla	2011
JN 8019	Corral de Bustos	Espiguilla	2011
K LEON	Corral de Bustos	Espiguilla	2011
N Baguette 9	Corral de Bustos	Espiguilla	2011
Nogal 100	Corral de Bustos	Espiguilla	2011
Ensayo ITACABO	Corrientes	Espiguilla	2011
Ensayo RED	Corrientes	Espiguilla	2011
Ensayo RED - ACA 315	Marcos Juárez	Espiguilla	2011
Ensayo RED - Bio INTA 1002	Marcos Juárez	Espiguilla	2011
Ensayo RED - Bio INTA 2004	Marcos Juárez	Espiguilla	2011
Ensayo RED - Bio INTA 2006	Marcos Juárez	Espiguilla	2011
Ensayo RED - Bio INTA 3005	Marcos Juárez	Espiguilla	2011
Ensayo RED - K PANTERA	Marcos Juárez	Espiguilla	2011
Ensayo RED - LENOX	Marcos Juárez	Espiguilla	2011
Bio INTA 1002	Monte Buey	Espiguilla	2011
Bio INTA 1005	Monte Buey	Espiguilla	2011
Bio INTA 1006	Monte Buey	Espiguilla	2011
Bio INTA 3005	Monte Buey	Espiguilla	2011

## **2 - Obtención de aislamientos**

Para la obtención de los aislamientos de *F. graminearum*, se tomaron de cada variedad de trigo 60 granos al azar y se los desinfectó superficialmente sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio al 10% v/v durante 5 min. Luego, se lavaron utilizando agua destilada estéril y se traspasaron a cajas de Petri de 10 cm de diámetro que contenían un disco de papel Whatman N° 2 humedecido en agua destilada estéril. Se colocaron 12 granos por caja, y se incubó en oscuridad a 28°C durante 7 d. Trascurrido el tiempo de incubación, los granos que presentaron crecimiento fúngico con características macroscópicas de la especie se traspasaron a placas de Petri con medio agar papa dextrosa (PDA Oxoid Ltd., Cheshire, Inglaterra) y se incubaron nuevamente bajo las mismas condiciones.

## **3 - Aislamientos monospóricos**

A partir de los cultivos en PDA con características macro y microscópicas semejantes a *F. graminearum*, se realizaron cortes de 1 cm de diámetro con una punta de pipeta para inocular placas de Petri con medio agar sintético nutritivo (SNA). Las mismas fueron incubadas durante 15 d a temperatura ambiente con ciclos de luz blanca/UV de 12 h. Utilizando un asa en anillo se levantaron suavemente los conidios y se los traspasó a un Eppendorf de 1,5 mL con 1 mL de agua destilada estéril. Se verificó la presencia de conidios en suspensión utilizando un microscopio óptico de contraste de fases (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) con un aumento de 500X. Con el asa, se tomó una alícuota de la suspensión y se realizaron estrías en una placa de Petri de 10 cm de diámetro con medio agar agua (WA). Las placas se incubaron en oscuridad a 28°C por 24 h. Se observaron los cultivos con una lupa binocular (Leica L2, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania) para identificar un conidio germinado, y transferirlo con un bisturí a una placa de Petri con medio PDA. Las placas fueron incubadas en oscuridad a 28°C durante 7 d.

#### **4 - Identificación morfológica de especie**

Los aislamientos monospóricos obtenidos se caracterizaron de acuerdo con su tasa de crecimiento, pigmentación y aspecto del micelio aéreo a partir de cultivos en medio PDA. A partir de cultivos en placas con medio agar hoja de clavel (CLA), se observó la presencia y morfología de macroconidios, y la producción de peritecios utilizando un microscopio óptico de contraste de fases con un aumento total de 500X. Los aislamientos pertenecientes a la especie *Fusarium graminearum* fueron identificados de acuerdo a las claves taxonómicas de Gerlach y Nirenberg (1982), Burgess et al. (1994) y Leslie y Summerell (2006).

#### **5 - Identificación molecular de especie y potencial toxicogénico**

##### **5.1 - Condiciones de cultivo**

A partir de un cultivo en placa con medio PDA, se realizaron cortes desde los márgenes con la base de una punta estéril de una pipeta automática (1 cm de diámetro), para inocular Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo líquido papa dextrosa (PD). La incubación se realizó en oscuridad a 28°C con agitación orbital (150 rpm) durante tres d. Luego, se filtró el micelio con un embudo Büchner con papel de filtro Whatman N° 2 y una bomba de vacío. El micelio fue alicuotado en Eppendorf de 1,5 mL y liofilizado.

##### **5.2 - Extracción de ADN**

El micelio de cada aislamiento liofilizado se pulverizó con la ayuda de una espátula, y se trasvasó a otro Eppendorf hasta ocupar 500 µL de su capacidad. Se agregaron 750 µL de solución de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) 2X y 15 µL de β-mercaptoetanol. Se incubó por 30 min a 65°C, mezclando por inversión cada 8 min. Luego, se añadieron 300 µL de acetato de potasio 3M pH 4,8, se agitó suavemente y se incubó en hielo por 15 min. Transcurrida la incubación, se centrifugó por 5 min a 14000 rpm o hasta que la fase superior quedara transparente. Se recuperó la fase superior, a la que se le agregó 200 µL de fenol y

200 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se agitó suavemente. Se centrifugó por 5 min a 14000 rpm o hasta que la fase superior quedara transparente. Se transfirió la fase superior a un nuevo tubo, se añadieron 750 µL de isopropanol frío y se centrifugó. Se descartó suavemente el sobrenadante y el precipitado obtenido se lavó con 500 µL de etanol al 70%. Se dejó secar la muestra a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 µL de agua destilada estéril. Se verificó la integridad del ADN obtenido mediante una corrida electroforética en gel de agarosa al 1%. Se calculó la concentración del ADN utilizando un equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y se estandarizó la misma a 10 ng/µL.

### 5.3 - Reacciones de PCR

Se emplearon dos pares distintos de primers para la identificación molecular. En primer lugar se empleó el par de primers Fg16N F/R (Nicholson et al. 1998), los cuales distinguen entre los miembros del complejo de *Fusarium graminearum* y otros *Fusarium spp.* La mezcla de reacción constó de un volumen final de 20 µL que contenía 0,5 mM de cada primer, 1X de buffer (Invitrogen Carlsbad, CA), 1,5 mM de Cl<sub>2</sub>Mg, 0,2 mM de cada dNTP, 1U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen Carlsbad, CA) y 10 ng de ADN. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler (Eppendorf AG, Alemania). El programa de amplificación utilizado fue el que se detalla a continuación; desnaturalización inicial: 2 min a 94°C; multiplicación: 30 ciclos; desnaturalización: 30 s a 94°C; hibridación: 1 min a 62°C; extensión: 1 min a 72°C; extensión final: 5 min a 72°C.

Para la identificación de la especie dentro de los miembros del complejo *Fusarium graminearum* se utilizaron los primers Fg16 F/R (Nicholson et al. 1998). Los mismos amplifican fragmentos de distintos tamaños para distintos miembros del complejo. La mezcla de cada reacción fue la detallada en el caso anterior. El programa de amplificación utilizado fue el siguiente; desnaturalización inicial: 2 min a 94°C; multiplicación: 30 ciclos; desnaturalización: 30 s a 94°C; hibridación: 1 min a 60°C; extensión: 1 min a 72°C; extensión final: 5 min a 72°C.

Para el potencial toxicogénico se utilizaron los primers Tri13 F/R (Chandler et al. 2003). Los mismos amplifican un fragmento de 799 bp para aislamientos con la capacidad potencial de producir DON. La mezcla de reacción fue la detallada anteriormente. El programa de amplificación utilizado fue el siguiente;

desnaturalización inicial: 2 min a 94°C; multiplicación: 35 ciclos; desnaturalización: 30 s a 94°C; hibridación: 45 s a 58°C; extensión: 1 min a 72°C; extensión final: 5 min a 72°C.

## **6 - Determinación de la variabilidad genética**

### **6.1 - Marcadores moleculares de intersecuencias repetitivas simples**

Para los ensayos de intersecuencias repetitivas simples (ISSR) se utilizaron los siguientes primers: Biolab H: (GCC)<sub>5</sub>; Biolab D: (AG)<sub>8</sub>; Biolab F: CT(GA)<sub>8</sub>; Biolab J: (CAC)<sub>5</sub>; Biolab E: CTC(GT)<sub>8</sub>. La mezcla de reacción de los primers tuvo un volumen final de 25 µL, conteniendo 0,7 µM de cada primer, 1X de buffer (InbioHighway, Tandil, Buenos Aires), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 U de Taq DNA polimerasa (InbioHighway) y 10 ng de ADN. La reacción se llevó a cabo en un termociclador XP Thermal Cycler (Bioer Technology Co, LTD). El programa de amplificación utilizado fue el que se detalla a continuación; desnaturalización inicial: 7 min a 94°C; multiplicación: 32 ciclos; desnaturalización: 1 min a 94°C; hibridación: 75 s a 50°C; extensión: 4 min a 72°C; extensión final: 7 min a 72°C. Los fragmentos amplificados fueron sembrados en geles de agarosa al 2% conteniendo 4 µl de Gel Red<sup>TM</sup> (Biotium, Hayward, CA, USA) e inmersos en buffer TBE 1X. Las corridas electroforéticas se realizaron a una corriente de 80 voltios durante 2 h. La visualización de los fragmentos obtenidos se realizó por irradiación con luz UV. Los geles fueron registrados con el sistema de documentación digital DOC-6490 (Biodynamics S.R.L., Buenos Aires, Argentina).

### **6.2 - Análisis de la variabilidad genética**

Los datos obtenidos fueron analizados por una matriz binaria de presencia o ausencia de fragmentos. La similitud entre los genotipos se cuantificó aplicando el coeficiente de Dice. Se creó un dendograma a partir de la técnica de ligamiento promedio no ponderado (UPGMA). Para el análisis se utilizó el software NTSyS-pc 2.1.

## **7 - Determinación de la capacidad toxicogénica**

### **7.1 - Condiciones de cultivo**

Granos de trigo de aspecto sano fueron esterilizados por radiación en la Central Atómica de Ezeiza (CNEA) con una dosis mínima y máxima de 10–12 kGrays de radiación gamma, respectivamente. La ventaja principal de la irradiación de alimentos es que destruye la microflora natural de los granos sin afectar su germinación, viabilidad y valor nutritivo.

Para realizar una curva de absorción de humedad se agregó, a una cantidad conocida de trigo, distintos volúmenes de agua y se dejó estacionar durante 3 d con agitación diaria. Se midieron las diferentes actividades acuosas (aW) alcanzadas mediante un Aqualab Series 3 (Labcell Ltd., Basingstoke, Hants, UK), se realizó la correspondiente curva de absorción y se midió también la aW inicial de las muestras de trigo irradiado. Estas muestras fueron rehidratadas, de acuerdo a dicha curva para conseguir una aW de 0,995. Se pesaron 20 g de trigo en cajas de Petri (10 cm de diámetro). Las mismas se inocularon con cortes de cultivos de los aislamientos crecidos durante 7 d en medio PDA. Las placas se incubaron en oscuridad a 28°C por 28 d, dentro de un recipiente hermético conteniendo un vaso de precipitado con glicerol al 2,73% para mantener la correcta humedad relativa dentro del mismo a lo largo de todo el ensayo. Finalizada la incubación, las placas se colocaron en estufa a 60°C por 24 h. Los cultivos secos fueron molidos con un molinillo de café para obtener las respectivas harinas.

### **7.2 - Extracción de la toxina deoxinivalenol**

Para la extracción de la toxina se pesaron 15 g de cada muestra de harina en Erlenmeyers de 250 mL y se le agregaron 40 mL de una mezcla de acetonitrilo:metanol (14:1), luego se incubaron por 2 h con agitación orbital. Los sobrenadantes se filtraron utilizando papel Whatman N° 2. Se tomaron 2 mL de los sobrenadante para su limpieza a través de columnas fabricadas con jeringas descartables de 5 mL, a las cuales se les colocaron dos discos de papel de filtro Whatman N° 2, lana de vidrio hasta completar 1 mL de capacidad y 500 mg de una mezcla de alúmina:carbón activado (20:1). La elución fue por gravedad. Una vez absorbida la muestra por el empaquetado, se agregaron 500 mL de una mezcla de

acetonitrilo:metanol:agua (80:5:15). La totalidad del eluido (aproximadamente 2,5 mL) se recolectó, evaporó con flujo de nitrógeno y resuspendió en una solución de agua:metanol (88:12).

### **7.3 - Detección y cuantificación por cromatografía líquida de alta eficacia de deoxinivalenol**

Se utilizó un equipo Waters 717 adosado a un inyector automático (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Se inyectaron 20 µL de muestra en una columna C18 de fase reversa (4,6/250 mm, tamaño de partícula 5 µm, Waters) utilizándose como fase móvil una solución de agua:metanol (88:12) con un flujo de 1,5 mL/min. La detección se realizó mediante un detector por arreglo de diodos a 220 nm y para el procesamiento de los datos se utilizó el programa Empower software (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Se realizó la curva de calibración inyectando diluciones de 1, 2, 4, 5 µg/mL de DON preparados a partir de una solución patrón de 1 mg/mL (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA; pureza >99 %) obteniéndose un coeficiente de correlación (r) de 0,967 para el rango de las concentraciones utilizadas. Los límites de detección y cuantificación fueron 0,12 y 0,3 µg/g respectivamente. Se realizó un test de homogeneidad espectral utilizando el mismo programa para garantizar la pureza de la señal.

Para el análisis de los resultados obtenidos se clasificaron los aislamientos en 4 diferentes rangos de producción: No productor: sin señal detectable; Poco productor: señal menor a 50 µg/g; Productor medio: señal entre 50 y 150 µg/g; Muy productor: señal mayor a 150 µg/g.

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

### **1 - Ocurrencia de *Fusarium graminearum***

A partir de las 100 muestras de trigo analizadas, se obtuvieron 172 aislamientos que fueron caracterizados como miembros del complejo de especies *Fusarium graminearum* de acuerdo a los primers específicos de especie Fg16N. En la Tabla 2.2 se detalla la distribución de aislamientos por localidad.

**Tabla 2.2:** Distribución geográfica de los aislamientos de *Fusarium graminearum*

<b>Localidad</b>	<b>Nº de aislamientos</b>
Balcarce	4
Corral de Bustos	14
Cavanagh	13
Corrientes	0
Los Molinos	17
Marcos Juárez	105
Mercedes	11
Monte Buey	0
Paraná	0
Villa María	8
<b>Total</b>	<b>172</b>

A partir de la ocurrencia obtenida, se decidió continuar únicamente con la caracterización de los aislamientos de Marcos Juárez, y analizar por lo tanto la variabilidad entre aislamientos dentro de una única localidad, lo cual resulta novedoso de acuerdo a los antecedentes bibliográficos.

Cuando los aislamientos provenientes de Marcos Juárez fueron caracterizados con los primers específicos de especie Fg16, 68 amplificaron un fragmento de 400 pb (65%) correspondiente a la especie *Fusarium graminearum sensu stricto*. De los cultivos del año 2010, se obtuvieron 66 aislamientos, y de las campañas 2009 y 2011, solamente uno de cada una. (Tabla 2.3).

**Tabla 2.3:** Aislamientos obtenidos en la localidad de Marcos Juárez

<b>Año de cultivo</b>	<b>Nº de aislamientos</b>	
	<b>FGSC</b>	<b><i>F. graminearum</i> s.s.</b>
2009	1	1
2010	91	66
2011	13	1
<b>Total</b>	<b>105</b>	<b>68</b>

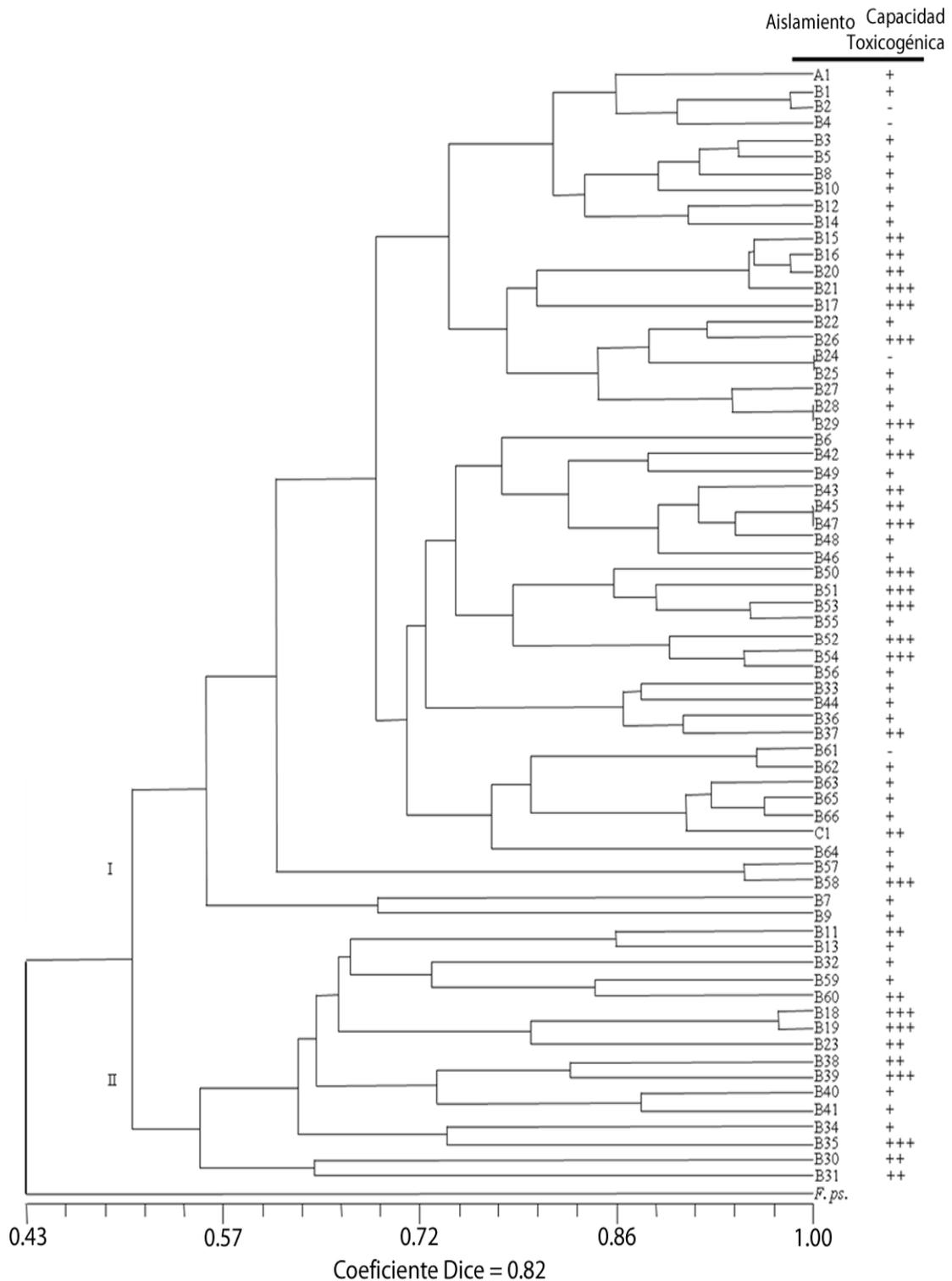
Nuestros resultados muestran la prevalencia de *Fusarium graminearum* s.s como agente causal de la FET, aunque nuestros porcentajes están por debajo de

los citados por otros autores en Argentina. Ramirez et al. (2007) y Alvarez et al. (2011), reportaron valores comprendidos entre 100 y 97% respectivamente. En Uruguay Pan et al. (2013) observaron similar presencia a la observada en esos trabajos. Por otro lado, valores cercanos a nuestros resultados se reportaron en el sur de Brasil por Astolfi et al. (2012), donde se encontró una presencia cercana al 74%.

Es de destacar que la ocurrencia de los miembros del complejo *Fusarium graminearum* a través del tiempo está fuertemente relacionada con la competencia entre los mismos, determinado por las condiciones ambientales imperantes, lo cual se refleja en el grado de severidad producido por la infección (Xu et al. 2007). Mientras las especies del complejo en general están circunscriptas a áreas geográficas específicas, *F. graminearum* s.s. es la especie que prevalece alrededor del mundo (O'Donnell et al. 2000, 2004, 2008; van der Lee et al. 2015).

## **2 - Variabilidad genética**

A partir del análisis con marcadores ISSR se observó que los aislamientos se agrupan en 65 haplotipos (Figura 2.2). La primera diferenciación se produjo con un promedio de similitud entre grupos del 51% formando dos clusters (denominados I y II). El aislamiento de *Fusarium pseudograminearum* usado como control se diferenció sólo, en un tercer grupo. La distribución de los aislamientos resultó en una dispersión homogénea, sin relación con el año ó capacidad toxicogénica del aislamiento. La variabilidad genética determinada por AMOVA mostró que el 99% de los aislamientos resultaron genéticamente diferentes entre sí. En trabajos previos en Argentina, Ramírez et al. (2007) y Alvarez et al. (2011) detectaron una variabilidad genética alrededor del 98 y 100% respectivamente, mientras que Astolfi et al. (2012) encontró un 93 % de variabilidad en aislamientos en el sur de Brasil. La mayoría de los estudios sobre variabilidad en esta especie se realizan a partir de aislamientos de diversas localidades (Alvarez et al. 2009, 2011; Sampietro et al. 2010; Boutigny et al. 2011, 2014; Qiu et al. 2014), por otro lado, son pocos los estudios que se han realizado a partir de un número limitado de localidades (Mishra et al. 2004; Ramirez et al. 2006b, 2007; Guo et al. 2008; Astolfi et al. 2012) o sobre una única localidad (Karugia et al. 2009). Nuestros resultados revelaron que al igual que entre diversas localidades, la variabilidad de aislamientos en un único sitio geográfico es elevada, similares resultados observó Karugia et al. (2009).



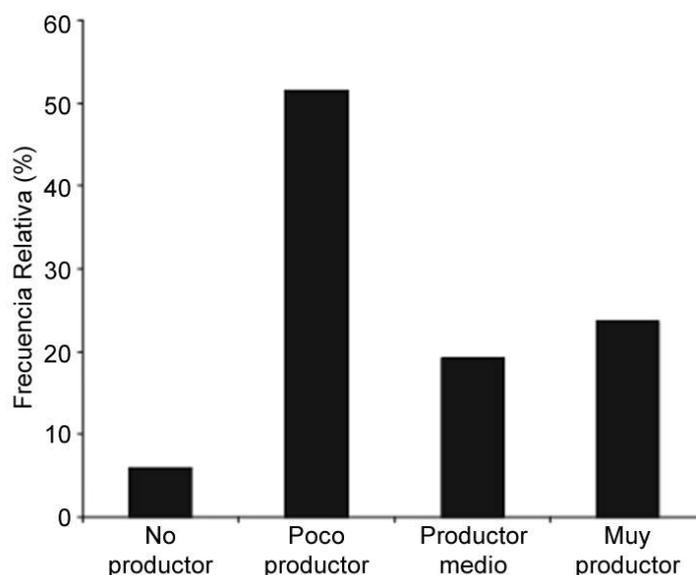
**Figura 2.2:** Dendrograma obtenido a partir de marcadores ISSR de agrupamiento de clusters entre aislamientos de *Fusarium graminearum* s.s. Aislamientos A: año 2009; B: año 2010; C: año 2011; *F.ps.*: aislamiento de *F. pseudograminearum* utilizado como control. (-): No productor; (+): Bajo productor; (++): Productor medio; (+++): Muy productor.

### 3 - Potencial y capacidad de producción de deoxinivalenol

El potencial toxicogénico determinado a partir de reacciones por PCR con el marcador *Tri13*, mostró que todos los aislamientos resultaron ser potenciales productores de DON, debido a que se amplificó el fragmento correspondiente de 282 pb en la totalidad de los aislamientos. Similares resultados fueron observados en reportes previos (Burlakoti et al. 2011; Castañares et al. 2014).

Por otro lado, la determinación de la capacidad de producción de DON de los aislamientos a partir de un cultivo inductor, mostró valores desde ND (no detectados) hasta 1741  $\mu\text{g/g}$ , lo que demuestra una gran variabilidad intraespecífica en el perfil toxicogénico de los mismos, por lo cual se decidió agruparlos en 4 rangos en cuanto a su producción. Sólo 4 aislamientos pertenecieron al grupo de no productores, mientras que el 51,5% de los mismos se agrupó en el rango de poco productores, 19,1% en el de productores medios y 23,5% fueron muy productores (Figura 2.3). El rango de poco productores ( $<50 \mu\text{g/g}$ ) fue el de mayor frecuencia, resultados similares para la Argentina se citan en previas investigaciones (Ramirez et al. 2006a; Palazzini et al. 2007; Alvarez et al. 2009).

La reacción de PCR muestra una capacidad potencial, mientras que la capacidad toxicogénica depende tanto del microorganismo, como del sustrato y de las condiciones ambientales, por lo cual los valores obtenidos pueden diferir (Castañares et al. 2014; Somma et al. 2014).



**Figura 2.3:** Frecuencia relativa de los aislamientos distribuidos en rangos de producción de DON.

## CONCLUSIONES

La ocurrencia observada de la especie *Fusarium graminearum* s.s en las muestras de trigo analizadas confirman su prevalencia como agente causal de la FET en la región triguera argentina.

Los resultados muestran que, incluso en una única localidad, la población de *F. graminearum* s.s. presenta una alta variabilidad en su pool genético.

El potencial de producción de deoxinivalenol a nivel genético estableció que la totalidad de los aislamientos podrían producir la micotoxina, lo cual estuvo en coincidencia con la capacidad toxicogénica de los aislamientos, dado que sólo un pequeño porcentaje no fue productor.

En concordancia con la elevada variabilidad genética establecida, la capacidad toxicogénica mostró valores dentro de un amplio rango de producción.

La elevada variabilidad de la especie puede ser considerada uno de los factores involucrados en la emergencia periódica de la enfermedad alrededor del mundo.

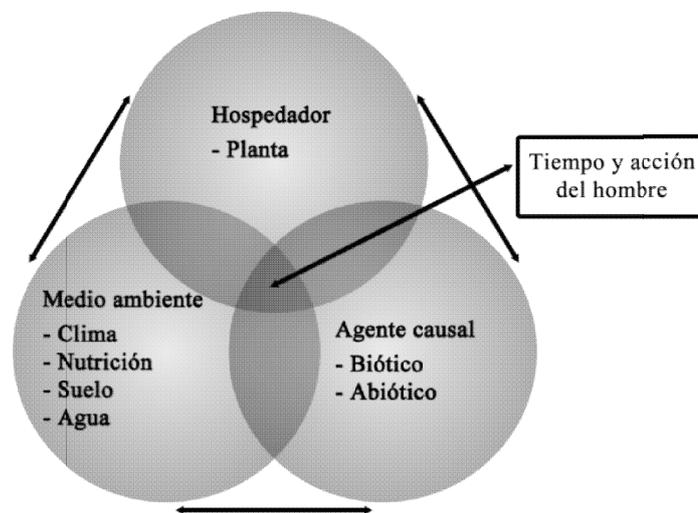
De los datos obtenidos se desprende la necesidad de un monitoreo continuo no sólo a nivel regional, sino también dentro de pequeñas áreas o campos, lo cual permitiría profundizar en el conocimiento de la dinámica de la enfermedad tendiente a reducir los daños ocasionados por la enfermedad.



**CAPITULO III:**  
**Análisis del Efecto de la Infección:**  
**Agresividad, Rendimiento y Toxicidad**

# Análisis del Efecto de la Infección: Agresividad, Rendimiento y Toxicidad

En la naturaleza, la enfermedad es una función combinada o interacción simultánea entre un hospedador susceptible, un patógeno virulento y un ambiente favorable, con lo que se conforma el llamado triángulo de la enfermedad. La intervención humana, al incorporar cultivos con sus prácticas de manejo y control, interacciona con estos componentes conformando un tetraedro.



La patogenicidad se define como la capacidad de un hongo en producir una enfermedad, siendo por lo tanto una medida cualitativa, mientras que la agresividad es una descripción cuantitativa del grado o nivel alcanzado por la enfermedad, la que conlleva a cambios de rendimiento y toxicidad en los granos. La abundancia del inóculo primario junto a condiciones meteorológicas predisponentes –duración de mojado y temperatura– son determinantes en el establecimiento de la enfermedad durante la antesis. Dentro del manejo integrado de una enfermedad, la detección de genotipos resistentes a la enfermedad, es uno de los desafíos más importantes. El comportamiento del trigo a la Fusariosis de la espiga de trigo (FET), es evaluada en los programas de mejoramiento por una escala propuesta por Kohli (1989), la cual comprende distintos rangos de severidad, atribuibles a diversas resistencias del trigo.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1 - Aislamientos seleccionados

Se emplearon 3 aislamientos de *F. graminearum* s.s para realizar las pruebas a campo. Los mismos fueron seleccionados a partir de una submuestra de 10 aislamientos provenientes de Marcos Juárez-Córdoba según valores estimativos de agresividad obtenida por caracterizaciones enzimáticas, toxicogénicas y capacidad de esporulación. Se midieron las actividades enzimáticas poligalacturonasa (PG) y proteasa según Kikot et al. 2012. La capacidad toxicogénica fue medida como se detalla en el capítulo II de este trabajo. Se determinaron rangos arbitrarios de acuerdo a los valores obtenidos y se eligieron aislamientos de comportamiento diferencial entre sí.

### 1.1 - Preparación del inóculo

A partir de cultivos de los aislamientos crecidos en placas de Petri con medio SNA de 7 d, se realizaron cortes de 0,5 x 0,5 cm en la periferia, los cuales fueron transferidos a Erlenmeyers de 250 mL conteniendo 50 mL de agar afrecho. Los mismos se mantuvieron durante 2 d a 22°C en estufa y 10 d a temperatura ambiente (25°C) con iluminación fluorescente continua. Los conidios se resuspendieron agregando agua destilada estéril a los Erlenmeyers, agitando suavemente y recuperando el sobrenadante. Las suspensiones pertenecientes a los mismos aislamientos se unificaron y se filtraron utilizando gasa estéril para retener los posibles residuos. Utilizando una cámara de Neubauer se midió la concentración de conidios, y se llevó a volumen necesario hasta lograr una concentración de  $3 \times 10^5$  conidios/mL (Alberione et al. 2016; Galich 1997).

## 2 - Ensayo a campo

Se utilizaron 8 variedades de trigo en el ensayo a campo de diverso ciclo de crecimiento y resistencia a la enfermedad pertenecientes al programa de mejoramiento de trigo del INTA-Marcos Juárez. Como controles se utilizaron las variedades internacionales resistentes Sumai 3 y Soba Komugi (Tabla 3.1).

**Tabla 3.1:** Listado de variedades de trigo utilizadas en el ensayo a campo.

<b>Cultivar</b>	<b>Origen</b>	<b>Ciclo de crecimiento</b>	<b>Sensibilidad</b>
SRM Nogal	Francia	Ciclo Largo	Susceptible
Sy 100	Francia	Ciclo Largo	Moderadamente resistente
BIOINTA 2005	México	Ciclo Intermedio	Moderadamente resistente
Sy 200	Francia	Ciclo Intermedio	Susceptible
Buck Meteoro	Argentina	Ciclo Intermedio	Moderadamente susceptible
BIOINTA 1005	Argentina	Ciclo Corto	Susceptible
AGP Fast	Estados Unidos	Ciclo Corto	Moderadamente susceptible
Klein Tigre	Argentina	Ciclo Corto	Moderadamente resistente
Sumai 3	China	Sin datos	Resistente
Soba Komugi	Japón	Sin datos	Resistente

## 2.1 - Siembra

El ensayo se realizó en jaulas de la estación experimental INTA-Marcos Juárez (32° 42' Sur; 62° 06' Oeste). La estructura de jaula permitió controlar el daño provocado por roedores y aves en el ensayo. Los cultivares de trigo se sembraron entre mayo y agosto del año 2013 de acuerdo a los ciclos de crecimiento, de manera que el momento de antesis se desarrolle coordinadamente en todas las plantas con una diferencia no mayor a una semana. La humedad fue controlada con un sistema automático de micro aspersión con temporizador (Green Mist, NaanDanJain, Israel) para proporcionar riego cada 25 min de 5 min. La cama de siembra se preparó con motocultivadora, siendo previamente fertilizada con urea (50 kg/ha) y tratada con insecticida de clorpirifós (500 mL/ha). El control de malezas se realizó de forma manual. El modelo de siembra utilizado fue en hill plots con diseño en bloques completamente aleatorizado colocando 5 a 10 semillas por surco en una disposición escalonada de acuerdo a Alberione et al. (2016). El experimento constó de 102 plantas, repartidas en 4 bloques de 25 plantas cada uno y 2 muestras controles sin infectar. Cada bloque fue armado con las 24 combinaciones resultantes entre los 3 aislamientos y los 8 cultivares de trigo, además de uno de los testigos resistentes.

## 2.2 - Inoculación

En cada hill plot se controló el crecimiento, hasta observar que el proceso de antesis (presencia de anteras expuestas) estuviera presente, en al menos, la mitad de las plantas. En ese momento se procedió a inocular las espigas con la suspensión de

conidios utilizando un pulverizador manual. A los 2 d se repitió la inoculación, para asegurar la infección de las espigas previamente inoculadas e infectar a aquellas que hubieran presentado una antesis retrasada. Debido al desfase natural entre cada hill plot, se llevó un control de infección utilizando un sistema de marcado con cintas coloreadas, para asegurar en cada uno la doble inoculación (Alberione et al. 2016).

### **2.3 - Cosecha, trillado y molienda**

La totalidad de las espigas de cada hill plot se cosecharon manualmente en noviembre del año 2013. Las mismas se guardaron en sobres de papel madera para su posterior observación y evaluación. Luego de evaluada la incidencia y la severidad sobre las espigas enfermas, las mismas se trillaron manualmente, separando los granos del resto de los componentes de la planta. Para lo cual, se tomaron individualmente, o de a pares, las espigas de las muestras colocándose entre dos hoja de papel, y por frotación se desarmó la espiga. Posteriormente se separaron manualmente los granos de la paja, diferenciando los granos enfermos de los sanos. No se utilizó el equipo de trillado automático disponible por que el mismo utiliza corrientes de aire para el separado que arrastran a su vez granos enfermos, por ser más livianos. Los granos se molieron utilizando un molinillo eléctrico hasta obtener las harinas correspondientes, y se tamizaron a través de un tamiz de apertura de 100  $\mu\text{m}$ .

### **3 - Evaluación de los efectos de la enfermedad**

El efecto de la infección o establecimiento de la enfermedad sobre el trigo se evaluó de acuerdo a distintas variables que se agruparon en cuatro categorías, a saber:

- *Medidas de agresividad*: se corresponden con variables directamente relacionadas con el desarrollo de la enfermedad. Las utilizadas en esta tesis doctoral, fueron: incidencia, severidad, número de granos dañados, índice de *Fusarium* (IF) e índice ISK.
- *Medidas de rendimiento*: como medida de rendimiento o producción de los granos se utilizó el peso de mil granos (PMG).

- *Medidas toxicológicas:* se corresponden a las medidas de las toxinas producidas por el patógeno. Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se midió la presencia de deoxinivalenol (DON).
- *Cambios en la constitución proteica del gluten:* dada la complejidad de este estudio, los resultados conforman un capítulo aparte.

La diferenciación entre granos sanos y enfermos ó dañados es necesaria para la determinación de la incidencia y la severidad de la enfermedad. Cuando la infección es considerable a simple vista se observa que los granos enfermos son pálidos, con coloración rosada, chuzos, de menor tamaño y más livianos en relación a los sanos. Cuando la infección es suave, y no presentan por lo tanto síntomas a simple vista, se toma el grano con una pinza y se lo observa a trasluz, comparándolo con un grano sano de la misma planta. La presencia de micelio fúngico opaca el paso de la luz a través del mismo, por lo que un grano sano es más traslucido que uno enfermo.

### **3.1 - Medidas de agresividad**

**3.1.1 - Incidencia:** Para cada muestra, se tomaron aleatoriamente 20 espigas. Se buscó, en cada espiga, la presencia de al menos un grano enfermo, y se calculó el porcentaje de incidencia de la siguiente manera:

$$\% \text{ Incidencia} = (\text{n}^\circ \text{ de espigas enfermas} \times 100) / 20$$

**3.1.2 - Severidad:** De cada muestra se tomaron aleatoriamente 8 espigas enfermas. Se contó el número total de espiguillas, y el número total de espiguillas enfermas (con presencia de al menos un grano enfermo). Usando esos valores se calculó para cada espiga el porcentaje de severidad utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ severidad} = (\text{n}^\circ \text{ de espiguillas enfermas} \times 100) / \text{n}^\circ \text{ de espiguillas totales}$$

**3.1.3 - Porcentaje de granos dañados (%GD):** En cada espiga utilizada para medir severidad se contabilizó el número total de granos y el de granos dañados. Se calculó el porcentaje de granos dañados utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{GD} = (\text{n}^\circ \text{ de granos enfermos} \times 100) / \text{n}^\circ \text{ de granos totales}$$

**3.1.4 - Índice de Fusarium (IF):** Se calculó el índice de *Fusarium* de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$IF = \% \text{ de Incidencia} \times \% \text{ de severidad} / 100$$

**3.1.5 - Índice ISK (Incidencia, Severidad y Granos Dañados):** El índice ISK se calculó utilizando la siguiente fórmula (Gilbert and Woods 2006).

$$ISK = (\% \text{ Incidencia} \times 0,3) + (\% \text{ severidad} \times 0,3) + (\% \text{GD} \times 0,4)$$

## **3.2 - Medidas de rendimiento**

**3.2.1 - Peso de mil granos (PMG):** Se cuantificó el número total de granos en cada muestra y se los pesó extrapolando al equivalente de mil granos.

## **3.3 - Medidas toxicológicas**

### **3.3.1 - Extracción de deoxinivalenol**

Para la extracción de DON se utilizaron columnas de extracción ISOLUTE MYCO (Biotage, D'Amico sistemas sociedad anónima, Argentina) y se siguieron las indicaciones descriptas por el fabricante. Se pesaron 5 g de harina a los que se agregaron 20 mL de agua destilada. Se incubó a temperatura ambiente, con agitación durante 30 min. Pasado ese tiempo se centrifugó durante 10 min a 3000 xg. Se tomaron 6 mL del sobrenadante y se llevó a un volumen final de 15 mL con agua destilada, para luego centrifugar nuevamente en iguales condiciones.

Previo a la limpieza, se acondicionaron las columnas haciendo pasar 2 mL de acetonitrilo y se equilibraron con 2 mL de agua destilada. Una vez acondicionadas, se pasaron 3 mL de la muestra a analizar, se lavó con 3 mL de agua destilada y se hizo eluir la toxina con 3 mL de una mezcla agua: acetonitrilo (90:10).

### **3.3.2 - Detección y cuantificación por cromatografía líquida de ultra-alta resolución de deoxinivalenol**

Para la detección de la micotoxina se utilizó un equipo de cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UPLC) Acquity H-Class con bomba cuaternaria, desgasificador, horno de columna e inyector automático FTN. La columna utilizada fue una Acquity BEH C18 de 2,1/100 mm con partículas de 1,7  $\mu\text{m}$  acoplado a una precolumna. La detección se realizó con un equipo de espectrometría de masas Acquity TQD – triple cuadrupolo en tándem provisto de una sonda de ionización por electrospray (ESI) operando en modo positivo (Waters, Milford, MA, USA). Los parámetros de fuente fueron los siguientes: voltaje capilar, 3,0 kV; tensión del extractor, 5 V. Como gas de nebulización y de disolvatación se utilizó nitrógeno calentado a temperaturas de 150°C y 200°C, respectivamente. Los caudales de gas de disolvatación y gas de cono se fijaron en 50 y 800 mL/min, respectivamente. La disociación inducida por colisión se realizó utilizando argón a 0,15 mL/min en la célula de colisión. Para la adquisición y el procesamiento de datos se utilizaron los programas MassLynx y QuanLynx versión 4.1 (Waters). Se realizó la curva de calibración inyectando diluciones de 5, 10, 20, 50 y 100 ng/ml de una solución patrón de 1 mg/mL (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA; pureza >99 %) obteniéndose un coeficiente de correlación ( $r$ ) de 0,969 para el rango de las concentraciones utilizadas. Los límites de detección y cuantificación fueron de 0,3 y 1,0 ng/mL respectivamente.

## **4 - Análisis estadístico**

Todos los datos se analizaron utilizando el programa ESTADISTICA 7. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) con un valor de significancia de 0,05, test de Fisher o LSD (low significant differences), test de correlación de Pearson, y análisis de componentes principales (PCA) para observar la relación e interacción entre las distintas variables estudiadas. Ver anexo al final de la tesis: “Desarrollo de un PCA”.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 1 - Aislamientos seleccionados

Dado que la capacidad de producir actividades enzimáticas por parte de los aislamientos, se relaciona con su poder de colonización en la planta, y pérdida de calidad de los granos, se midieron dos actividades enzimáticas, directamente relacionadas a estos procesos como la actividad poligalacturonasa (PG) y proteasa. (Kikot et al. 2009; Barneix 2007). Como se observa en la Tabla 3.2 el rango de producción de ambas actividades fue amplio, por lo cual se determinaron rangos y clasificaron a los aislamientos de acuerdo al nivel establecido.

**Tabla 3.2:** Rangos de producción enzimática de los aislamientos de *Fusarium graminearum*.

<b>Producción enzimática</b>	<b>PG</b>	<b>Proteasa</b>
Baja (+)	0,000-0,325	0,000-0,250
Moderadamente Baja (++)	0,326-0,650	0,251-0,500
Moderadamente Alta (+++)	0,651-0,975	0,501-0,750
Alta (++++)	0,975-1,300	0,751-1,000

Las lecturas en espectrofotómetro corresponden al día de mayor producción por parte de cada aislamiento. PG: a 520 nm; Proteasa: 280 nm.

Además, fue evaluada la capacidad toxicogénica de los aislamientos, dado que, es sabido que una vez establecida la enfermedad pueden liberarse micotoxinas que se relacionan con la propagación de la misma (Mesterhazy 2002), con efectos nocivos para la salud. Los rangos utilizados para la clasificación de los aislamientos de acuerdo a la producción de DON, fueron determinados en el capítulo II. En la Tabla 3.3 se detallan las clasificaciones adscriptas para los aislamientos analizados.

**Tabla 3.3:** Producción enzimática y de deoxinivalenol en los aislamientos de *Fusarium graminearum*.

Aislamiento	Actividad PG	Actividad Proteasa	Capacidad Toxicogénica
B3	+	++++	+
B5	++	+++	+
B7	++	++	+
B13	++	++	+
B19	++++	+++	+++
B24	++++	+++	-
B29	+	++++	+++
B47	++	+	+++
B61	++	++	-
C1	++	+++	++

A partir de los resultados obtenidos se seleccionaron 4 aislamientos con diferencial respuesta a los parámetros analizados (Tabla 3.4), la nomenclatura de los mismos fue reemplazada de acuerdo a los colores de las cintas con que fueron señaladas las plantas infectadas en el posterior ensayo a campo.

**Tabla 3.4:** Equivalencias en la nomenclatura de los aislamientos de *Fusarium graminearum* utilizados en el ensayo de agresividad.

Denominación del aislamiento		Comportamiento
Molecular	Campo	
B5	Am	Medianamente agresivo
B19	Az	Muy Agresivo
B29	R	Medianamente agresivo
B47	N	Poco Agresivo

Otra caracterización decisiva al momento de evaluar el aislamiento a utilizar en los ensayos a campo, es su capacidad para producir un inóculo adecuado para la infección de las plantas de trigo, lo cual está en relación con la capacidad de producir esporas. Los aislamientos seleccionados de acuerdo a su producción enzimática y toxicogénica produjeron una cantidad adecuada de conidios para la inoculación, a excepción del 16D, por lo cual no se utilizó en los ensayos a campo.

## **2 - Evaluación de la enfermedad**

El efecto de la enfermedad en los cultivos a campo, se analizó en laboratorio a partir de la cosecha de las espigas y posterior trillado de los 24 tratamientos por cuadruplicado. A continuación se muestra la Tabla con los valores obtenidos:

**Tabla 3.5:** Valores medios y desvíos estándar de las variables de agresividad y rendimiento para cada tratamiento.

Cultivar	Aislamiento	Tratamiento		Incidencia		Severidad		%GD		PMG		IF		ISK	
		Nº	Media	σ	Media	σ	Media	σ	Media	σ	Media	σ	Media	σ	Media
SRM Nogal	Am	1	41,25	14,93	25,98	7,24	15,94	3,17	29,44	1,73	11,51	7,21	26,54	7,1	
	Az	2	52,5	15	20,72	5,67	13,55	6,84	29,13	1,13	10,41	2,1	27,39	2,76	
	N	3	28,75	18,87	15,1	8,73	8,1	4,3	33,41	1,96	4,76	3,01	16,4	8,3	
Sy 100	Am	4	48,75	2,5	27,04	5,69	16,53	3,24	29,67	1,02	13,27	3,28	29,34	3,05	
	Az	5	27,5	11,9	30,19	13,12	20,32	10,2	26,85	2,85	7,47	3,45	25,43	6,22	
	N	6	32,5	17,07	15,94	2,47	12,65	3,84	27,87	1,22	5,31	2,82	19,59	6,62	
Bio INTA 2005	Am	7	35	10,8	21,79	10,38	15,15	4,79	30,63	3,87	8,27	5,91	23,1	7,81	
	Az	8	38,75	17,97	16,37	3,42	12	4,16	30,27	2,01	6,72	3,65	21,33	7,75	
	N	9	40	28,28	15,32	4,54	10,53	3,34	30,29	1,09	6,8	5,9	20,81	10,7	
Sy 200	Am	10	53,75	11,08	27,09	11,85	15,6	5,07	28,12	4,03	15,34	8,29	30,49	8,52	
	Az	11	32,5	33,04	21,62	9,75	15,75	9,57	28,71	2,95	7,55	8,54	22,53	12,3	
	N	12	21,25	18,87	9,1	7,79	5,59	4,07	31,12	3,31	3,03	3,73	11,34	9,56	
Buck Meteoro	Am	13	35	4,08	20,38	5,04	15,85	3,63	22,87	2,21	7,08	1,82	22,93	3,21	
	Az	14	38,75	16,52	15,02	1,24	11,63	2,39	23,77	1,94	5,82	2,57	20,78	4,62	
	N	15	31,25	20,96	21,38	11,4	12,67	7,69	23,67	5,15	7,61	5,98	20,86	10,7	
Bio INTA 1005	Am	16	67,5	23,97	31,2	9,65	24,26	9,37	27,79	2,74	21,08	9,05	39,31	8,62	
	Az	17	46,25	26,57	24,25	9,5	15,48	5,35	28,28	5,82	12,83	11,2	27,34	12,4	
	N	18	35	31,88	18,65	4,13	14,71	4,72	30,34	3,49	7,05	6,73	21,98	11,7	
AGP Fast	Am	19	53,75	11,08	25,05	4,81	17,4	3,64	28,81	1,26	13,5	3,91	30,6	4,7	
	Az	20	66,25	11,08	42,58	15,49	29,96	11,5	25,89	4,03	28,24	11,9	44,63	9,89	
	N	21	32,5	25,33	16,3	12,09	10,53	9,87	32,33	3,89	7,53	8,72	18,85	14	
Klein Tigre	Am	22	41,25	22,86	20,14	16,62	13,74	9,27	29,63	2,52	10,72	12,2	23,91	14,9	
	Az	23	42,5	37,08	27,85	11,38	19,08	10,8	28,32	4,92	14,68	18,5	28,74	18,4	
	N	24	36,66	15,27	19,83	9,14	11,06	0,52	29,46	0,83	6,37	0,51	21,37	2,12	

%GD: porcentaje de granos dañados; PMG: peso de mil granos; IF: índice de Fusarium; ISK: índice incidencia, severidad y granos dañados. σ: desvío estándar.

Luego, a partir de los datos obtenidos se confeccionó una matriz de correlación, con el propósito de observar las posibles tendencias entre las respectivas variables. Como se observa en la Tabla 3.6, las variables analizadas mostraron correlaciones significativas entre ellas. En estudios previos, se observaron resultados similares en Argentina (Alberione et al. 2016) y Estados Unidos (Hernández Nopsa et al. 2010).

**Tabla 3.6:** Matriz de correlación de Pearson entre las variables de agresividad y rendimiento analizadas.

	<b>Incidencia</b>	<b>Severidad</b>	<b>%GD</b>	<b>PMG</b>	<b>IF</b>	<b>ISK</b>
Incidencia	-	<b>0,51</b>	<b>0,47</b>	<b>-0,25</b>	<b>0,84</b>	<b>0,87</b>
Severidad	<b>0,51</b>	-	<b>0,88</b>	<b>-0,43</b>	<b>0,81</b>	<b>0,85</b>
%GD	<b>0,47</b>	<b>0,88</b>	-	<b>-0,54</b>	<b>0,74</b>	<b>0,82</b>
PMG	<b>-0,25</b>	<b>-0,43</b>	<b>-0,54</b>	-	<b>-0,36</b>	<b>-0,43</b>
IF	<b>0,84</b>	<b>0,81</b>	<b>0,74</b>	<b>-0,36</b>	-	<b>0,94</b>
ISK	<b>0,87</b>	<b>0,85</b>	<b>0,82</b>	<b>-0,43</b>	<b>0,94</b>	-

Se marcan en negrita las correlaciones que resultaron significativas. %GD: porcentaje de granos dañados; PMG: peso de mil granos; IF: índice de *Fusarium*; ISK: índice incidencia, severidad y granos dañados.

## 2.1 - Incidencia

Como se observa en la Tabla 3.5 los valores de incidencia estuvieron comprendidos entre un 21,25 y 67,50%. Alberione et al. (2016) reportaron para cultivares argentinos valores de incidencia entre 15,00 y 40,00%, con un promedio de 24,70% para cultivares resistentes y un promedio de 74,20% para cultivares susceptibles.

En la Tabla 3.6, se observa que la correlación de Pearson resultó significativa (0,51). En el caso de la variable de rendimiento PMG, como era de esperar, la correlación fue negativa (-0,25), dado que el comportamiento es inversamente proporcional entre ambas variables.

El análisis de varianza ANOVA fue empleado para evaluar el efecto del cultivar o el aislamiento sobre la incidencia (Tabla 3.7).

**Tabla 3.7:** Análisis de la varianza de la incidencia para el efecto aditivo entre tratamientos.

<b>Efecto</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intersección	153895,46	1	153895,47	374,36	<b>0,000</b>
Cultivar	3785,84	7	540,83	1,32	0,253
Aislamiento	3478,34	2	1739,17	4,23	<b>0,018</b>
Error	34120,48	83	411,09		

SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; CM: cuadrado medio. F: prueba F. Significancia  $p \leq 0,05$ .

Como se observa en la Tabla, no existe diferencia significativa para la incidencia de acuerdo al cultivar de trigo empleado. En cambio, si hubo diferencias significativas para esta variable, de acuerdo al aislamiento de *F. graminearum* utilizado en la infección. Los aislamientos resultaron agrupados de acuerdo al test LSD en dos grupos de significancia, uno conformado únicamente por el aislamiento caracterizado como “poco agresivo” (N) que arrojara a su vez el menor valor de incidencia (32,07 %) y otro grupo con los dos restantes aislamientos (Tabla 3.8).

**Tabla 3.8:** Asignación de grupo homogéneo para los aislamientos de *Fusarium graminearum* respecto a la incidencia, de acuerdo al test de LSD.

<b>Aislamiento</b>	<b>Media</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
N	32,07		****
Az	43,12	****	
Am	47,03	****	

1 y 2: grupos de significancia homogénea.

## 2.2 - Severidad

La evaluación de la variable severidad mostró valores para los tratamientos comprendidos entre 9,10 y 42,58% (Tabla 3.5). Trabajos anteriores en cultivares argentinos reportaron valores entre 50,97 y 84,93% (Álvarez et al. 2010) y entre 10,12 y 61,90% utilizando inoculación por aspersión (Alberione et al. 2016). Por otro lado, utilizando inoculación puntual Malbrán et al. (2012, 2014) reportaron valores entre 6,00 y 50,00% en cultivares argentinos, mientras que Umpiérrez-Failache et al. (2013)

reportaron valores de severidad entre 5,60 y 27,50% en ensayos de agresividad en cultivares de trigo uruguayos.

Si bien se obtuvo correlación entre todas las variables estudiadas de acuerdo a la matriz obtenida (Tabla 3.6), la mayor correlación se observó entre severidad y porcentaje de granos dañados (0,88) Para analizar el efecto del cultivar y/o aislamiento en relación a la respuesta de esta variable ante la enfermedad, se realizó un análisis de ANOVA, que se muestra en la Tabla 3.9.

**Tabla 3.9:** Análisis de la varianza de la severidad para el efecto aditivo entre tratamientos.

<b>Efecto</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intersección	45693,03	1	45693,03	487,63	<b>0,000</b>
Cultivar	1209,69	7	172,81	1,84	0,089
Aislamiento	1193,02	2	596,51	6,37	<b>0,003</b>
Error	7777,49	83	93,70		

SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; CM: cuadrado medio. F: prueba F. Significancia  $p \leq 0,05$ .

En este análisis se observó un resultado similar al obtenido para la incidencia, donde el efecto de los cultivares no fue significativo, y si el de los aislamientos. Luego se realizó un test de LSD que se muestra en la Tabla 3.10.

**Tabla 3.10:** Asignación de grupo homogéneo para los aislamientos de *Fusarium graminearum* respecto a la severidad, de acuerdo al test de LSD.

<b>Aislamiento</b>	<b>Media</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
N	16,78		****
Az	24,83	****	
Am	24,83	****	

1 y 2: grupos de significancia homogénea.

Se observa que el aislamiento N fue el de la media más baja (16,78) para esta variable, el cual a su vez resultó separado en un grupo de significancia homogénea diferente al de los otros dos aislamientos, mostrando el mismo comportamiento que para la incidencia. Diversos estudios alrededor del mundo confirman la elevada

variabilidad que suele presentar la severidad de la enfermedad, no sólo entre especies de *Fusarium* (Akinsanmi et al. 2004), sino incluso entre aislamientos de una misma especie (Walker et al. 2001; Carter et al. 2002; Malbrán et al. 2012).

### 2.3 - Porcentaje de granos dañados

Como se observa en la Tabla 3.5, el porcentaje de granos dañados (%GD) varió entre 5,59 y 29,96% entre tratamientos. Alberione et al. (2016) reportaron valores entre 4,56 y 91,7% en cultivares argentinos y valores entre 3,85 y 40,58% para cultivares extranjeros probados en Argentina. Gourdain y Rosengarten (2011) reportaron valores similares a nuestros resultados que promediaron entre 17 y 25%, al estudiar el efecto del momento de la inoculación en dos cultivares franceses. Por otro lado, Štočková et al. (2011) reportaron valores entre 61 y 91,83% al aplicar inoculación por aspersión sobre cinco variedades de trigo de invierno.

Al analizar el comportamiento de esta variable en relación a las demás (Tabla 3.6), se observa que el %GD posee una correlación significativa negativa con el PMG (-0,54), lo cual está en relación con la pérdida de peso en los granos enfermos.

Nuevamente se realizó un análisis de ANOVA para determinar el efecto cultivar y/o aislamiento, que se muestra en la Tabla 3.11.

**Tabla 3.11:** Análisis de la varianza del porcentaje de granos dañados para el efecto aditivo entre tratamientos.

<b>Efecto</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intersección	20890,10	1	20890,10	441,20	<b>0,000</b>
Cultivar	716,23	7	102,32	2,16	<b>0,046</b>
Aislamiento	701,77	2	350,89	7,41	<b>0,001</b>
Error	3929,88	83	47,35		

SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; CM: cuadrado medio. F: prueba F. Significancia  $p \leq 0,05$ .

En este caso, el análisis de ANOVA determinó que tanto el tipo de cultivar como el aislamiento analizado, tuvieron un efecto significativo sobre la variable. Por esta razón, se realizaron test de LSD para los cultivares y aislamientos (Tablas 3.12 y 3.13 respectivamente).

**Tabla 3.12:** Asignación de grupo homogéneo para los cultivares respecto al porcentaje de granos dañados, de acuerdo al test de LSD.

<b>Cultivar</b>	<b>Media</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Sy 200	12,32	****		
SRM Nogal	12,54	****		
BioINTA 2005	12,56	****		
Buck Meteoro	13,39	****	****	
Klein Tigre	15,35	****	****	****
Sy 100	16,50	****	****	****
BioINTA 1005	18,15		****	****
AGP Fast	20,64			****

1, 2 y 3: grupos de significancia homogénea.

Del análisis de grupo homogéneo por test de LSD se puede observar que los cultivares que muestran un comportamiento diferencial fueron SRM Nogal, BIOINTA 2005, Sy 200 (con las medias más bajas) y AGP Fast (con el valor más alto).

**Tabla 3.13:** Asignación de grupo homogéneo para los aislamientos de *Fusarium graminearum* respecto al porcentaje de granos dañados, de acuerdo a un test de LSD.

<b>Aislamiento</b>	<b>Media</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
N	10,93		****
Az	16,81	****	
Am	17,23	****	

1 y 2: grupos de significancia homogénea.

Como se observó para las anteriores variables, el aislamiento N presentó un comportamiento diferencial, separándose en un grupo homogéneo, y a su vez con un efecto sobre el valor medio de granos dañados muy por debajo al causado por los otros aislamientos.

## 2.4 - Peso de mil granos

El valor de PMG varió entre 22,87 y 33,41 g para todas las muestras analizadas (Tabla 3.5). Este valor se ha reportado a nivel nacional entre 30,33 y 36,82 g entre el año 2000 y la actualidad (Trigo Argentino 2013). Alberione et al. (2016) reportaron

valores de PMG entre 5,15 y 22,33 g para cultivares argentinos y valores entre 6,91 y 31,78% para cultivares internacionales crecidos en el país. Alvarez et al. (2010) observaron una reducción en el valor del PMG entre 10 y 60% como resultado de la infección artificial. A nivel internacional, Capouchová et al. (2012) observaron valores entre 38,87 y 41,97 g utilizando inoculación por aspersión en tres cultivares de invierno checos. Por otro lado, Horvat et al. (2014) reportaron para Croacia valores entre 22,6 y 54,0 g y entre 27,5 y 51,8 g al comparar genotipos con infección natural y artificial respectivamente.

La correlación de Pearson calculada entre la variable PMG y las demás variables dio para todos los casos un valor negativo (Tabla 3.6). Resultados similares se citan en diversos trabajos, en los cuales a mayor nivel de infección, se observó una reducción en el PMG (Dexter et al. 1996; Wang et al. 2005; Dvojkovich et al. 2007; Horvat et al. 2014).

Al realizar el análisis de ANOVA para determinar el efecto de las variables cultivar y/o aislamiento (Tabla 3.14) se observó que al igual que para el %GD, ambas variables poseen un efecto significativo.

**Tabla 3.14:** Análisis de la varianza del peso de mil granos para el efecto aditivo entre tratamientos.

<b>Efecto</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intersección	75566,23	1	75566,23	8154,07	<b>0,000</b>
Cultivar	425,35	7	60,76	6,56	<b>0,000</b>
Aislamiento	69,19	2	34,59	3,73	<b>0,028</b>
Error	769,19	83	9,27		

SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; CM: cuadrado medio. F: prueba F. Significancia  $p \leq 0,05$ .

Como se observa, si bien tanto el cultivar como el aislamiento tuvieron efecto sobre la infección, dado el valor de  $p$ , el efecto del cultivar fue mayor.

Se continuó el análisis utilizando test de LSD (Tabla 3.15 y Tabla 3.16) para observar el comportamiento de cada una de las variables.

**Tabla 3.15:** Asignación de grupo homogéneo para los cultivares de trigo respecto al peso de mil granos, de acuerdo a un test de LSD.

Cultivar	Media	1	2	3
Buck Meteoro	23,44			****
Sy 100	28,13	****		
AGP Fast	28,52	****	****	
BioINTA 1005	28,80	****	****	
Klein Tigre	29,17	****	****	
Sy 200	29,32	****	****	
BioINTA 2005	30,40	****	****	
SRM Nogal	30,66		****	

1, 2 y 3: grupos de significancia homogénea.

Respecto a los cultivares, puede observarse que Buck Meteoro es el que mostró un comportamiento diferencial en relación a los demás con los menores valores de PMG.

**Tabla 3.16:** Asignación de grupo homogéneo para los aislamientos de *Fusarium graminearum* respecto al peso de mil granos, de acuerdo al test de LSD.

Aislamiento	Media	1	2
Az	27,65	****	
Am	28,37	****	****
N	29,71		****

1 y 2: grupos de significancia homogénea.

Al analizar el comportamiento de los aislamientos, se observa en la distribución de grupo homogéneo que el aislamiento N sólo posee diferencias significativas con el aislamiento Az.

## 2.5 - Índice IF e ISK

Los valores calculados para los índices IF e ISK para los tratamientos bajo estudio, estuvieron comprendidos entre 3,03–28,24 y 11,34–44,63, respectivamente (Tabla 3.5). Como se observa en la Tabla 3.17, el análisis de ANOVA determinó que tanto el cultivar como el aislamiento muestran un efecto significativo en la infección para el índice IF.

**Tabla 3.17:** Análisis de la varianza del índice IF para el efecto aditivo entre tratamientos.

<b>Efecto</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intersección	9736,63	1	9736,63	156,79	<b>0,000</b>
Cultivar	925,62	7	132,23	2,13	<b>0,048</b>
Aislamiento	786,22	2	393,11	6,33	<b>0,002</b>
Error	5278,46	85	62,10		

SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; CM: cuadrado medio. F: prueba F. Significancia  $p \leq 0,05$ .

Luego se realizó un test de LSD para observar las diferencias entre cultivares (Tabla 3.18) y aislamientos (Tabla 3.19).

**Tabla 3.18:** Asignación de grupo homogéneo para los cultivares respecto al índice IF, de acuerdo al test de LSD.

<b>Cultivar</b>	<b>Media</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Buck Meteoro	6,84	****		
Bio INTA 2005	7,27	****	****	
Sy 200	8,65	****	****	
Sy 100	8,69	****	****	
SRM Nogal	8,89	****	****	
Klein Tigre	10,98	****	****	****
Bio INTA 1005	13,66		****	****
AGP Fast	16,43			****

1, 2 y 3: grupos de significancia homogénea.

A partir de la asignación de grupos homogéneos por el test LSD, se observa que los cultivares Buck Meteoro y AGP Fast, son los que presentan mayores diferencias.

**Tabla 3.19:** Asignación de grupo homogéneo para los aislamientos de *Fusarium graminearum* respecto al índice IF, de acuerdo a un test de LSD.

<b>Aislamiento</b>	<b>Media</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
N	6,05		****
Az	11,72	****	
Am	12,60	****	

1 y 2: grupos de significancia homogénea.

Al analizar el comportamiento de los aislamientos, se pudo observar que el aislamiento N presentó los valores más bajos para este índice.

El análisis de ANOVA también permitió observar el efecto sobre el índice ISK (Tabla 3.20). El mismo mostró que solamente el efecto del aislamiento produjo diferencias significativas, por eso se decidió realizar el test de LSD para esta variable (Tabla 3.21).

**Tabla 3.20:** Análisis de la varianza del índice ISK para el efecto aditivo entre tratamientos.

<b>Efecto</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intersección	58321,99	1	58321,99	611,50	<b>0,0000</b>
Cultivar	1185,30	7	169,33	1,78	0,1028
Aislamiento	1692,62	2	846,31	8,88	<b>0,0003</b>
Error	8106,92	85	95,38		

SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; CM: cuadrado medio. F: prueba F. Significancia  $p \leq 0,05$ .

**Tabla 3.21:** Asignación de grupo homogéneo para los aislamientos de *Fusarium graminearum* respecto al índice IF, de acuerdo a un test de LSD.

<b>Aislamiento</b>	<b>Media</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
N	18,82		****
Az	27,28	****	
Am	28,28	****	

1 y 2: grupos de significancia homogénea.

Es de destacar que para la totalidad de las variables analizadas a partir del test de LSD, el aislamiento N resultó ser el menos agresivo, separándose en un grupo homogéneo diferente, a excepción de los resultados para la variable PMG.

## 2.6 - Contenido de deoxinivalenol (DON)

Los valores de contenido de DON para los tratamientos, dada su distribución, se analizaron como rangos de producción y mediana (Tabla 3.22).

**Tabla 3.22:** Determinación de DON para los tratamientos bajo estudio.

Cultivar	Aislamiento	Rango (µg/g)	Mediana (µg/g)*
SRM Nogal	Am	nd - 13,18	5,48
	Az	nd - 8,26	0,47
	N	-	-
Sy 100	Am	-	-
	Az	nd - 1,66	0,00
	N	nd - 18,17	0,00
Bio INTA 2005	Am	nd - 5,33	2,22
	Az	nd - 5,84	0,00
	N	-	-
Sy 200	Am	nd - 3,06	1,05
	Az	-	-
	N	nd - 0,71	0,00
Buck Meteoro	Am	nd - 0,02	0,00
	Az	nd - 6,71	0,00
	N	nd - 4,22	0,00
Bio INTA 1005	Am	nd - 6,91	3,01
	Az	nd - 23,24	9,02
	N	nd - 1,23	0,00
AGP Fast	Am	-	-
	Az	nd - 18,56	3,80
	N	nd - 1,25	0,00
Klein Tigre	Am	nd - 48,55	0,74
	Az	nd - 0,29	0,00
	N	nd - 16,05	0,00

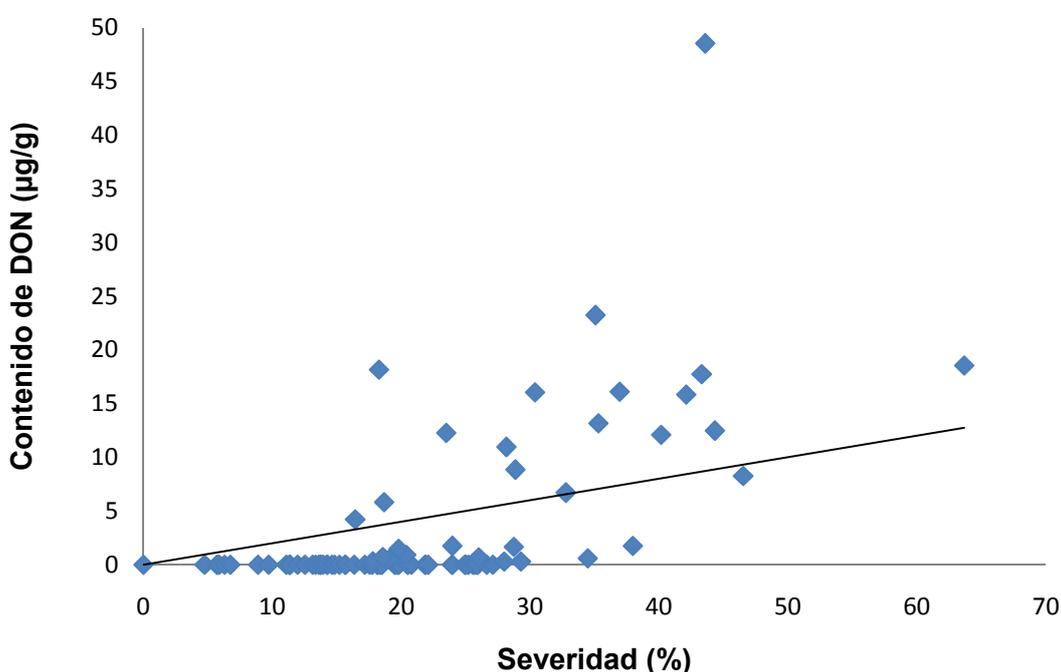
\*Para calcular el valor de la mediana, se considero al valor no detectados (nd) como 0.

Del total de muestras de trigo analizadas, el 32% de las muestras resultaron contaminadas con niveles de DON que variaron entre 0,02 y 48,55 µg/g, de las cuales sólo el 19% (18 casos) superaron los 2 µg/g, establecidos como valor límite de acuerdo a la legislación vigente (FAO 2003). Trabajos previos han mostrado valores similares en Argentina en infecciones naturales: Dalcero et al. (1997) reportó que un 12,5% de las muestras analizadas superaron este valor, mientras que Lori et al. (2003) reportaron una fluctuación entre dos años consecutivos del 10 al 39,58% para casos similares. Como producto de una infección artificial con *Fusarium graminearum* sobre trigo, Malbrán et al. (2014) reportaron que el 100% de las muestras analizadas superaron este límite. En análisis llevados a cabo alrededor del mundo como el de Cowger et al. (2009), se observó que el valor límite de acuerdo a la FAO, fue superado

por el 47,62-100% de las muestras, al estudiar el efecto de la fecha de inoculación en dos años consecutivos. Por otro lado, Gourdain y Rosengarten (2011) reportaron que el 64% de las muestras de trigo analizadas superaron dicho límite.

La mayor concentración de la micotoxina encontrada en nuestro trabajo fue de 48,55  $\mu\text{g/g}$ ; mientras que otros autores en nuestro país, reportaron valores cercanos: 31,4  $\mu\text{g/g}$  (Malbrán et al. 2014) y 53,82  $\mu\text{g/g}$  (Alvarez et al. 2010).

Para analizar la relación entre la acumulación de DON y la intensidad de la enfermedad de acuerdo a los valores de severidad, se graficaron los valores de las variables en un gráfico de coordenadas (Figura 3.1), lo cual mostró una relación positiva desarrollada en diferentes cultivares de trigo inoculados con aislamientos de *Fusarium graminearum*. Similares resultados fueron observados en nuestro país por Malbrán et al. (2014), quienes detectaron que a mayores valores de infección se incrementaba el contenido de DON. Por el contrario, Alvarez et al. (2010) al evaluar esas variables en trigo argentino, no observaron relación entre las cantidades de tricotecenos producidas y la intensidad de la enfermedad ocasionada sobre un mismo cultivar de trigo inoculado artificialmente.



**Figura 3.1:** Relación entre contenido de DON y severidad de la enfermedad.

Si bien la relación entre la intensidad de la enfermedad y la presencia de micotoxinas es controversial, numerosos estudios han informado una correlación positiva y significativa entre ellas, lo cual se relacionaría con su rol en la propagación o desarrollo de la enfermedad (Desjardins et al. 1996, 2000; Homdork et al. 2000; Bai et al. 2001; Mesterhazy et al. 2002; Miedaner et al. 2003). Contrariamente, existen otros autores que no observaron correlación entre estas variables (Alexander et al. 1997; Chen et al. 1995). Estas correlaciones positivas/negativas han originado un constante cuestionamiento acerca de los mecanismos involucrados en la producción de deoxinivalenol, dadas las contrastantes observaciones, por lo cual la intensidad de la enfermedad no siempre sería un indicador de la presencia DON (Bai et al. 2001; Hart and Schabenberger 2001; Erlanger et al. 2003; Shaner and Buechley 2004). Debe tenerse en cuenta en este tipo de análisis, que la variabilidad observada puede estar en relación a numerosos factores como ser diferencias en los genotipos de los cultivares y/o patógenos, las condiciones meteorológicas imperantes o las prácticas de manejo entre los diferentes estudios.

## 2.7 - Análisis de componentes principales

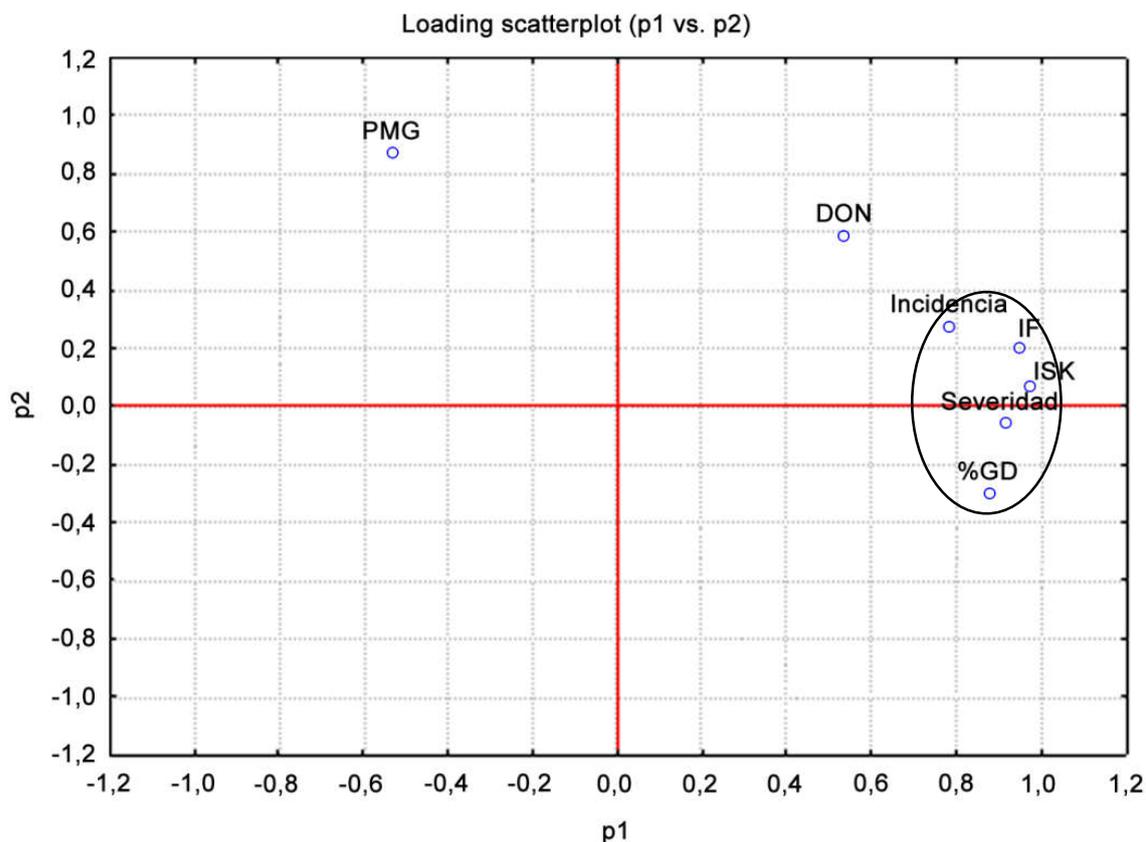
Para analizar el comportamiento de las variables estudiadas en este capítulo, se realizó un PCA con las mismas, que arrojó dos componentes principales que explicaron un 81,29% del total de la varianza. Estos resultados se muestran en la Tabla 3.23.

**Tabla 3.23:** Análisis de PCA para las variables de agresividad y rendimiento estudiadas.

Componente	Eigenvalues	Varianza	Eigenvalue acumulado	Varianza acumulada
1	4,62	66,01	4,62	66,01
2	0,93	15,29	5,55	81,30

En la Figura 3.2 se presenta la representación gráfica de los componentes obtenidos. Se observa que las variables de agresividad analizadas (Incidencia, Severidad, %GD, IF e ISK) conformaron un mismo grupo, la variable PMG se alejó de

este mientras que la variable DON, si bien quedo excluida del grupo, se situó cercano al mismo. Esto podría indicar una relación entre el contenido de DON y la severidad de la enfermedad.



**Figura 3.2:** Representación gráfica de los componentes 1 y 2, obtenidos por PCA de las variables de agresividad y rendimiento. %GD: porcentaje de granos dañados; PMG: peso de mil granos; IF: índice de Fusarium; ISK: índice incidencia, severidad y granos dañados.

## CONCLUSIONES

Los aislamientos seleccionados por su diferencial comportamiento para infectar trigo, mostraron diferentes efectos de acuerdo a las variables analizadas de agresividad y rendimiento. En particular, el aislamiento N caracterizado como “poco agresivo” en las pruebas de producción de actividades enzimáticas y capacidad toxicogénica, resultó ser el que produjo efectos más suaves de la enfermedad de

acuerdo a los valores de los parámetros analizados. Por lo tanto, los estudios preliminares realizados en los aislamientos para determinar su diferencial efecto sobre la infección, resultaron útiles para el análisis de la variabilidad de los daños producidos en el trigo.

El análisis de ANOVA de los cultivares de trigo infectados mostró que en las variables estudiadas, el efecto del genotipo del cultivar sobre la infección, produjo diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de granos dañados y en el peso de mil granos.

Las variables estudiadas para evaluar la infección, presentaron entre sí una alta correlación, tanto positiva –entre variables de agresividad–, como negativa –entre variables de agresividad y rendimiento–, lo cual indicaría que los efectos de la enfermedad, se relacionan estrechamente entre sí.

Un escaso porcentaje de las muestras analizadas superó el límite de contaminación por DON establecido para la comercialización de granos por la Unión Europea (2 µg/g), por lo cual se observa que en condiciones no predisponentes a la enfermedad, el trigo no presentaría niveles de contaminación con deoxivalenol que impliquen un alto riesgo para la salud tanto humana como animal.

Si bien el contenido de deoxivalenol fue disperso, su representación con respecto al grado de severidad mostró una tendencia positiva. A su vez, el análisis de componentes principales posicionó a la micotoxina cercana al grupo conformado por las variables de agresividad, lo que podría indicar una relación entre estas variables.

El análisis de PCA agrupó a las variables de agresividad correlacionadas positivamente entre ellas, quedando fuera del grupo el peso de mil granos, el cual se correlaciona negativamente con esas variables.

El análisis de PCA mostró ser una herramienta útil y complementaria a la estadística tradicional.



**CAPITULO IV:  
Análisis de Proteínas  
del Gluten**

# Análisis de Proteínas del Gluten



El contenido proteico del trigo es uno de los principales determinantes de su valor comercial, debido a que la calidad industrial del grano depende de la concentración y naturaleza de las proteínas que contenga. Las proteínas de reserva, gliadinas y gluteninas, son los constituyentes del gluten, trama viscoelástica necesaria para retener el gas durante el proceso de fermentación. Diversas técnicas y metodologías se utilizan en laboratorios e industrias para el análisis proteico de las harinas, a partir de los cuales se clasifican de acuerdo a su calidad y uso final. Técnicas como la cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa (RP-HPLC) o la electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) son técnicas fiables y que requieren de poca cantidad de muestra, por lo que son óptimas para su utilización en programas de mejoramiento. Por otro lado, los métodos espectrofotométricos-UV, los cuales se basan en un fraccionamiento secuencial de las proteínas del gluten, resultan complementarios y de gran utilidad para este tipo de análisis. La infección con *Fusarium spp.* es un problema habitual de la industria triguera. Una vez que la infección se establece, se liberan proteasas que degradan las proteínas de gluten, lo que conlleva a pérdidas en la calidad del grano.

# MATERIALES Y METODOS

## 1 - Determinación de proteínas totales

Las harinas utilizadas en los distintos análisis de este capítulo son las obtenidas en el ítem 2.3 de materiales y métodos del capítulo III.

A partir del método Kjeldahl se determinó el contenido de nitrógeno de las harinas como estimativo del contenido de proteínas total. El mismo se realizó según la metodología estandarizada ISO/FDIS 20483:2013 (ISO 2013). Para la cuantificación se partió de 1 g de harina, a la cual se le agregó 8 g de catalizador de digestión ( $\text{SeO}_2$ : 2,04%;  $\text{K}_2\text{SO}_4$ : 81,63%;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ : 16,33%), 12 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , y dos fragmentos pequeños de cerámico roto que cumplieron el rol de perlas de ebullición. Se digirió la muestra a 450°C hasta que la coloración de la misma se tornó verdosa (aproximadamente 30 min). Se dejó enfriar aproximadamente 15 min hasta que al tacto no queme (para evitar coagulación) y se agregaron a cada tubo 75 mL de agua destilada. Utilizando un equipo de destilación, se agregaron 50 mL de solución de NaOH al 40% en el tubo de digestión y se burbujeó vapor de una solución de agua bórax: ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ : 0,003%). Se recolectaron 150 mL de destilado en un Erlenmeyer de 250 mL que contenía 25 mL de reactivo de titulación (ácido bórico:  $\text{BO}_3\text{H}$  1% con titulantes verde de bromocresol y rojo de metilo). Se tituló el destilado usando una bureta con HCl 0,1N. Se convirtió el valor de contenido de nitrógeno a contenido proteico con el factor de conversión para trigo (5,7)

## 2 - Análisis por espectrofotometría-UV de proteínas del gluten

La metodología empleada para este análisis se basa en un fraccionamiento secuencial de las proteínas del gluten. Los datos proteicos obtenidos por espectrofotometría expresan valores relativos de manera porcentual, resultando una técnica rápida y fiable, siendo por lo tanto útil en Programas de Mejoramiento del Trigo.

La extracción a partir de las harinas de los distintos componentes proteicos del gluten para su análisis por espectrofotometría UV, se realizó de acuerdo al esquema de Hernández Espinosa et al. (2013). Las extracciones se realizaron por duplicado. Para la obtención de las distintas fracciones se procedió de la siguiente manera:

- *Fracción monomérica*: Se pesaron 10 mg de harina en un Eppendorf de 2 mL, se agregaron 1,8 mL de una solución 2,3% NaI y 3,75% 2-propanol y se incubó por 15 min a temperatura ambiente. Se centrifugó 3 min a 16500 xg y se recuperó el sobrenadante. Esta fracción es rica en albúminas y gliadinas de bajo peso molecular.

- *Fracción polimérica soluble*: Al precipitado resultante del paso de extracción anterior se le agregó 1,8 mL de una solución 2% SDS; 0,75% Tris; y 40% 2-propanol, incubando por 15 min a temperatura ambiente. Se centrifugó 3 min a 16500 xg y se recuperó el sobrenadante. Esta fracción es rica en gluteninas de bajo peso molecular.

- *Fracción polimérica insoluble*: Al precipitado resultante del paso de extracción anterior se le agregó 1,8 mL de una solución 0,2% DTT y 50% 2-propanol, y se incubó durante 75 min a 55°C. Se centrifugó 3 min a 16500 xg y se recuperó el sobrenadante. Esta fracción es rica en gluteninas de alto peso molecular.

Para obtener el valor de proteínas solubles total del gluten, se realizó la sumatoria de los valores obtenidos para cada una de las fracciones anteriores.

El contenido proteico de las respectivas fracciones se midió por lectura directa a 280 nm utilizando un espectrofotómetro T60 UV-Visible (PG instruments).

### **3 - Análisis de las subunidades de gluteninas**

Debido al rol preponderante de las gluteninas en la calidad de las harinas en la industria, se realizaron análisis más precisos de esta fracción.

#### **3.1 - Cromatografía líquida de alta eficacia por fase reversa**

La extracción proteica de gluteninas que a continuación se detalla es común para el análisis por RP-HPLC y SDS-PAGE. La misma se realizó por duplicado a partir de muestras de 50 mg de harina de acuerdo al protocolo propuesto por Naeem y Sapirstein (2007). La fracción de gliadinas se extrajo utilizando 500 µL de solución 1-propanol al 50% v/v, agitando con vórtex e incubando 15 min a

temperatura ambiente. Luego, las muestras fueron centrifugadas durante 3 min a 15000 xg. A partir del pellet obtenido, se realizó la extracción de la fracción gluteninas totales (alto y bajo peso molecular, HMW y LMW respectivamente), para lo cual se añadió 150 µL de buffer de extracción (0,08M Tris-HCl, 1-propanol al 50% v/v, pH 7,5), y DTT al 1% p/v y se incubó 30 min a 60°C. Luego, se agregó 150 µL de buffer de extracción, con 4-vinilpiridina al 4% v/v e incubó 30 min a 60°C. Se centrifugaron las muestras 3 min a 15000 xg. Una alícuota de 150 µL del sobrenadante fue inmediatamente inyectada en HPLC para su análisis. El sobrenadante restante fue fraccionado en alícuotas de 50 µL y liofilizado para su posterior análisis por SDS-PAGE. El equipo de HPLC-FR utilizado es modelo Waters 717 con una columna de fase reversa Aquapore RP-300 7m, (tamaño de poro: 300 µm, tamaño de partícula 7 µm). Como solventes de corrida se utilizaron: solvente A (1 L): 1 L de agua y 80 µL de ácido trifluoroacético (TFA); solvente B (1 L): 440 mL acetonitrilo (ACN), 560 mL agua destilada y 80 µL de TFA. El gradiente utilizado se detalla en la Tabla 4.1. La detección se realizó con un equipo de arreglo de diodos marca Waters a 206 nm.

**Tabla 4.1:** Gradiente de la fase móvil de la cromatografía en fase reversa.

Intervalo	Porcentaje final del solvente B
0-7 min	52%
7-54 min	100%
54-55 min	52%
55-65 min	52% (equilibrado)

### 3.2 - Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las electroforesis en geles de poliacrilamida se realizaron en condiciones desnaturizantes (Laemmli 1970). Cada gel estaba conformado por dos partes, un gel empaquetador (de poro grueso) en la parte superior, y el gel separador (al 8% de poliacrilamida) en la parte inferior. La preparación de los mismos se detalla en las Tablas 4.2 y 4.3.

Las muestras liofilizadas en el ítem anterior, se resuspendieron en 300  $\mu$ L de buffer de siembra con 4% SDS, 12% glicerol, 0,61% Tris-HCl, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol, 1% DTT y 0,01% Coomassie Brilliant Blue R 250, a pH 6,8. Se sonicaron por 30 min y luego se incubaron a 90°C por 5 min.

**Tabla 4.2:** Composición de los geles de poliacrilamida.

<b>Solución</b>	<b>Gel separador (8%)</b>	<b>Gel Empaquetador</b>
Acrilamida (30%) / Bis-acrilamida (0,8%)	1600 $\mu$ L	400 $\mu$ L
Agua bidestilada	2900 $\mu$ L	1500 $\mu$ L
Buffer separador	1500 $\mu$ L	-
Buffer stacking	-	620 $\mu$ L
Persulfato de amonio (APS) 10%	90 $\mu$ L	40 $\mu$ L
N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina (TEMED)	9 $\mu$ L	10 $\mu$ L

**Tabla 4.3:** Composición de las soluciones buffer utilizadas en los geles de poliacrilamida.

<b>Reactivo</b>	<b>Buffer separador</b>	<b>Buffer empaquetador</b>	<b>Buffer de corrida</b>
Tris	45,5 g	15,1 g	6 g
SDS	1 g	1 g	2 g
Glicina	-	-	28,8 g
Volumen final	250 mL	250 mL	2000 mL
pH	8,8	6,8	8,3

Se utilizó un equipo de electroforesis mini-PROTEAN Tetra cell (Bio-Rad), con un voltaje constante de 150 mV. Se sembraron 10  $\mu$ L de muestra por calle, y 1  $\mu$ L de marcador de peso molecular 10 - 180 kDa PageRuler (Thermo Fisher).

Para la tinción de los geles, se realizaron en primer lugar tres lavados consecutivos con solución de 1ª fijación (Tabla 4.4) de 30 min. Posteriormente se realizaron tres lavados consecutivos con solución de lavado de 20 min cada uno con agitación moderada descartando nuevamente el líquido entre cada paso. Finalmente se agregaron 50 mL de solución de 2ª fijación, se incubó por 30 min y se agregó 1,5% de volumen de una solución con 2% Coomassie coloidal (G-250).

Finalmente se incubó durante 12 h y posteriormente se realizó una captura fotográfica con un equipo de foto-documentación BioRad, utilizando el software Quantity One (BioRad).

**Tabla 4.4:** Composición de las soluciones de fijación de tinción.

<b>Reactivos</b>	<b>Solución de 1ª fijación</b>	<b>Solución de lavado</b>	<b>Solución de 2ª fijación</b>
Etanol (96%)	156,25 mL	-	46,9 mL
Ácido fosfórico (85%)	11,76 mL	11,76 mL	29,4 mL
Sulfato de amonio	-	-	37,5 g
Volumen Final	500 mL	500 mL	250 mL

El análisis del patrón de bandas se realizó utilizando el software GelAnalyzer 2010, que permitió la asignación de peso molecular, así como una comparación de los efectos entre los distintos tratamientos (observado como cambios en la densidad de la señal de las bandas obtenidas).

#### **4 - Análisis de calidad de las harinas**

##### **4.1 - Score de Payne**

A partir de los patrones obtenidos en los geles de poliacrilamida, se realizó un análisis de calidad de acuerdo al puntaje de calidad de gluteninas, o score desarrollado por Payne et al. (1987). Además, se estimó el efecto de la infección, de acuerdo a la reducción en las señales o bandas proteicas, medido por densitometría.

##### **4.2 - Test de Zeleny**

Como medida de calidad se empleó el índice de sedimentación de Zeleny de acuerdo al método estandarizado 56-61.02 de la AACC (2000). Se preparó una

solución de ácido láctico al 21,25%, y se la calentó con reflujo durante 6 h. Luego se mezcló 180 mL de esta solución con 200 mL de isopropanol y 620 mL de agua destilada (Solución 1). Se pesaron 3,2 g de harina en buretas de vidrio de 100 mL y se agregaron 50 mL de una solución de azul de bromofenol (4 mg/L). Utilizando un agitador de vaivén automático, se agitó por 5 min, luego de lo cual se agregaron 25 mL de la solución 1, y se agitó por 5 min. Cumplido este tiempo, se colocó la bureta en posición vertical, se dejó sedimentar y se tomó el volumen de sedimentación a los 5 min exactos.

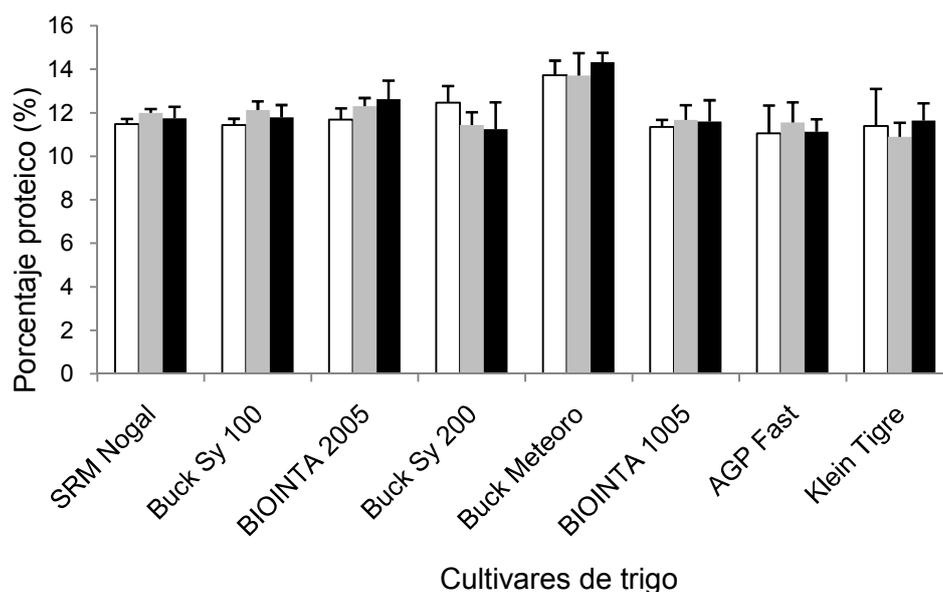
## **5 - Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se analizaron utilizando el programa ESTATISTICA 7 (StatSoft). Se realizaron análisis de varianza (ANOVA), test de Fisher o LSD (low significant differences), test de correlación de Pearson, y análisis de componentes principales (PCA), con la finalidad de analizar la posible correlación entre las variables estudiadas.

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## **1 - Determinación de proteínas totales**

La determinación de la concentración de proteínas totales por el método Kjeldahl nos permitió determinar un valor cuantitativo de referencia para la comercialización de los granos. Los valores proteicos de los tratamientos estuvieron comprendidos dentro del rango de 11,06–14,33%, con un valor promedio de 11,93%. (Figura 4.1). El valor promedio para cultivares de trigo nacionales de acuerdo a lo reportado para el año de cosecha 2013 (Trigo Argentino 2013), fue de 11,4%. Como se observa en la Figura 4.1, la mayoría de los cultivares mostraron valores superiores al promedio reportado en ese año, siendo sólo 5 tratamientos los que mostraron valores levemente menores.



**Figura 4.1:** Valores de proteína total obtenidos por método Kjeldahl en cultivares de trigo infectados por los aislamientos Am ( □ ); Az ( ■ ); N ( ■ ).

Por otro lado, fue analizada la concentración proteica en relación al grado de infección de las harinas, de acuerdo al análisis por ANOVA (Tabla 4.5). Este análisis mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores proteicos como efecto del genotipo del cultivar, sin modificaciones significativas al considerar el factor aislamiento *Fusarium graminearum* s.s. en la infección. Estos resultados son similares a los reportados por otros autores (Dexter et al. 1996; Prange et al. 2005; Wang et al. 2005; Terzi et al. 2007; Horvat et al. 2014), quienes como en nuestro caso no observaron alteraciones cuantitativas relevantes en las proteínas totales resultantes de la infección.

**Tabla 4.5:** Análisis estadístico del efecto aditivo entre el cultivar de trigo y el aislamiento de *F. graminearum* para la variable proteína total en los granos infectados.

Efecto	SC	GL	CM	F	p
Intersección	13486,30	1	13486,30	23245,67	<b>0,000</b>
Cultivar	67,89	7	9,70	16,72	<b>0,000</b>
Aislamiento	0,10	2	0,05	0,09	0,916
Error	49,31	85	0,58		

ANOVA del valor de proteína total por Kjeldahl. SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; CM: cuadrado medio. F: prueba F. Significancia  $p \leq 0,05$ .

En la Tabla 4.6 se resume la relación entre el contenido total de proteína y las variables analizadas en las plantas de trigo infectadas en cuanto a la agresividad y rendimiento. Uno de los objetivos principales en los Programas de Mejoramiento de Trigo, es la detección de cultivares que logren optimizar el rendimiento de producción (de acuerdo a la estimación del PMG) con la concentración proteica en sus granos. No obstante, la relación reportada de acuerdo a la bibliografía, resulta inversamente proporcional entre ambos parámetros (Kibite and Evans 1984; Guarda et al. 2004), la misma tendencia fue observada en este trabajo, donde la correlación entre ambos parámetros de acuerdo al test de Pearson fue de -0,42.

**Tabla 4.6:** Correlación de Pearson entre el valor de la proteína total y las variables de agresividad y rendimiento de los granos infectados.

<b>Variable</b>	<b>Correlación</b>
Incidencia	0,00
Severidad	-0,14
%GD	-0,10
PMG	<b>-0,42</b>
IF	-0,10
ISK	-0,07

%GD: porcentaje de grados dañados; PMG: peso de mil granos; IF: índice de *Fusarium*. ISK: índice de incidencia, severidad y granos dañados. Se marcan en negrita los valores significativos.

Como se muestra en la Tabla 4.6, si bien, para la totalidad de los parámetros analizados, la relación con el contenido de proteína total resulta inversamente proporcional, únicamente esa relación fue significativa para el valor de PMG o rendimiento.

## **2 - Análisis por espectrofotometría-UV de proteínas del gluten**

La extracción secuencial proteica realizada a partir de las harinas de los 24 tratamientos, para su análisis por espectrofotometría-UV, nos permitió un análisis semi-cuantitativo de la constitución proteica en los granos de trigo a partir de las tres fracciones obtenidas (Tabla 4.7).

**Tabla 4.7:** Relación porcentual de las fracciones proteicas del gluten para los diferentes cultivares.

Cultivar	FM		FPS		FPI	
	%	$\sigma$	%	$\sigma$	%	$\sigma$
SRM Nogal	28,05	0,55	8,71	1,00	63,24	0,82
Klein Tigre	28,44	1,45	8,90	0,55	62,66	1,46
Bio INTA 2005	30,06	1,71	8,52	0,65	61,42	1,70
Sy 200	28,58	1,17	8,38	0,42	63,05	1,56
AGP Fast	39,02	1,30	9,758	1,05	51,22	0,41
Buck Meteoro	36,17	1,17	10,43	1,19	53,41	2,24
Bio INTA 1005	36,16	0,17	10,48	1,61	53,35	1,60
Sy 100	35,57	3,14	9,67	0,67	54,76	3,10

FM: fracción monomérica, con prevalencia de gliadinas; FPS: fracción polimérica soluble, con prevalencia de gliadinas de alto peso molecular y gluteninas de bajo peso molecular; FPI: fracción polimérica insoluble, con prevalencia de gluteninas de alto peso molecular;  $\sigma$ : desvío standard.

En todos los cultivares bajo estudio, la fracción FPI resultó ser la más abundante, superando siempre el 50% del contenido proteico analizado. Esta proporción en las fracciones resultó ser diferente a la reportada anteriormente por Hernández Espinosa et al. (2013), donde el valor promedio reportado para la fracción FPI fue 39,2%, mientras que en las fracciones FPS y FM, se reportaron valores alrededor del 21% y el 39,8% respectivamente. En el trabajo de DuPont et al. (2005) observaron un valor promedio de 48% en la fracción correspondiente a las gluteninas, mediante métodos de extracción similares.

Debe tenerse en cuenta en este tipo de análisis, que las diferencias observadas pueden deberse tanto al genotipo de los cultivares, a las condiciones de extracción, como a las condiciones ambientales las cuales abarcan desde factores meteorológicos a infecciones fúngicas (Espitia Rangel et al. 2003; De La Olán et al. 2010). Cada fracción es analizada a continuación en forma independiente.

## 2.1 - Análisis de la fracción monomérica

El efecto de la interacción cultivar/aislamiento sobre la fracción monomérica fue analizada estadísticamente por el test de ANOVA. En la Tabla 4.8 se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 4.8:** Análisis de la varianza de la fracción monomérica para el efecto interacción cultivar-aislamiento en los tratamientos.

<b>Efecto</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intersección	9,91	1	9,91	5112,52	<b>0,000</b>
Cultivar	0,11	7	0,02	8,11	<b>0,000</b>
Aislamiento	0,00	2	0,00	0,19	0,831
Interacción cultivar x aislamiento	0,03	14	0,00	0,96	0,504
Error	0,14	71	0,00		

ANOVA factorial de la fracción FM. SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; CM: cuadrado medio. F: prueba F. Significancia  $p \leq 0,05$ .

De los resultados obtenidos se desprende que no se evidenció un efecto sinérgico en la infección, como resultado de la interacción entre el huésped y el patógeno. Por lo tanto, se decidió profundizar el análisis realizando un ANOVA de efecto aditivo, el cual se muestra en la Tabla 4.9.

**Tabla 4.9:** Análisis de la varianza de la fracción monomérica para el efecto aditivo de la interacción cultivar-aislamiento en los tratamientos.

<b>Efecto</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intersección	9,92	1	9,92	5153,96	<b>0,000</b>
Cultivar	0,11	7	0,02	8,11	<b>0,000</b>
Aislamiento	0,00	2	0,00	0,19	0,823
Error	0,16	85	0,00		

ANOVA aditivo de la fracción FM. SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; CM: cuadrado medio. F: prueba F. Significancia  $p \leq 0,05$ .

A partir del análisis de efecto aditivo, se determinó que la variación en la fracción monomérica se debió a un efecto significativo del cultivar analizado.

## 2.2 - Análisis de la fracción polimérica soluble

Al igual que para la fracción anterior, se analizó el efecto interacción planta/patógeno para la fracción FPS mediante un análisis de ANOVA (Tabla 4.10).

**Tabla 4.10:** Análisis de la varianza de la fracción polimérica soluble para el efecto interacción cultivar-aislamiento en los tratamientos.

<b>Efecto</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intersección	0,80	1	0,80	1604,67	<b>0,000</b>
Cultivar	0,01	7	0,00	1,83	0,094
Aislamiento	0,00	2	0,00	3,68	<b>0,030</b>
Interacción cultivar x aislamiento	0,01	14	0,00	1,01	0,453
Error	0,03	71	0,00		

ANOVA factorial de la fracción FPS. SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; CM: cuadrado medio. F: prueba F. Significancia  $p \leq 0,05$ .

Similar al análisis para la fracción proteica FM, no se evidenció un efecto sinérgico de la interacción entre la variedad de trigo y el aislamiento. Por esta razón se prosiguió con un análisis de efecto aditivo (Tabla 4.11).

**Tabla 4.11:** Análisis de la varianza de la fracción polimérica soluble para el efecto aditivo de la interacción cultivar-aislamiento en los tratamientos.

<b>Efecto</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intersección	0,80	1	0,80	1605,60	<b>0,000</b>
Cultivar	0,01	7	0,00	1,83	0,091
Aislamiento	0,00	2	0,00	3,67	<b>0,029</b>
Error	0,04	85	0,00		

ANOVA de la fracción FPS. SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; CM: cuadrado medio. F: prueba F. Significancia  $p \leq 0,05$ .

Como se observa en la Tabla 4.11, el efecto del aislamiento produjo diferencias significativas sobre la fracción FPS, por lo cual se analizó el efecto de la variable aislamiento a partir del test de Fisher (Tabla 4.12).

**Tabla 4.12:** Test de Fisher para el efecto del aislamiento de *Fusarium graminearum* sobre la fracción FPS.

<b>Aislamiento</b>	<b>Media</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
N	0,08	****	
Az	0,09	****	****
Am	0,10		****

1 y 2: grupos de significancia homogénea.

Como se observa, los aislamientos Am y N de acuerdo a este tipo de test estadístico poseen diferencias significativas en cuanto a su efecto sobre la fracción FPS, no así para el aislamiento Az.

### 2.3 - Análisis de la fracción polimérica insoluble

Los datos obtenidos del análisis de la fracción FPI de acuerdo a ANOVA, se observan en las Tablas 4.13 y 4.14.

**Tabla 4.13:** Análisis de la varianza de la fracción polimérica insoluble para el efecto interacción cultivar-aislamiento en los tratamientos.

<b>Efecto</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intersección	32,63	1	32,63	1513,53	<b>0,000</b>
Cultivar	0,31	7	0,04	2,09	0,056
Aislamiento	0,00	2	0,00	0,01	0,988
Interacción cultivar x aislamiento	0,05	14	0,00	0,17	1,000
Error	1,53	71	0,02		

ANOVA factorial de la fracción FPI. SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; CM: cuadrado medio. F: prueba F. Significancia  $p \leq 0,05$ .

**Tabla 4.14:** Análisis de la varianza de la fracción polimérica insoluble para el efecto aditivo de la interacción cultivar-aislamiento en los tratamientos.

<b>Efecto</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intersección	32,74	1	32,74	1757,73	<b>0,000</b>
Cultivar	0,31	7	0,04	2,41	<b>0,026</b>
Aislamiento	0,00	2	0,00	0,01	0,990
Error	1,58	85	0,02		

ANOVA de la fracción FPI SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; CM: cuadrado medio. F: prueba F. Significancia  $p \leq 0,05$ .

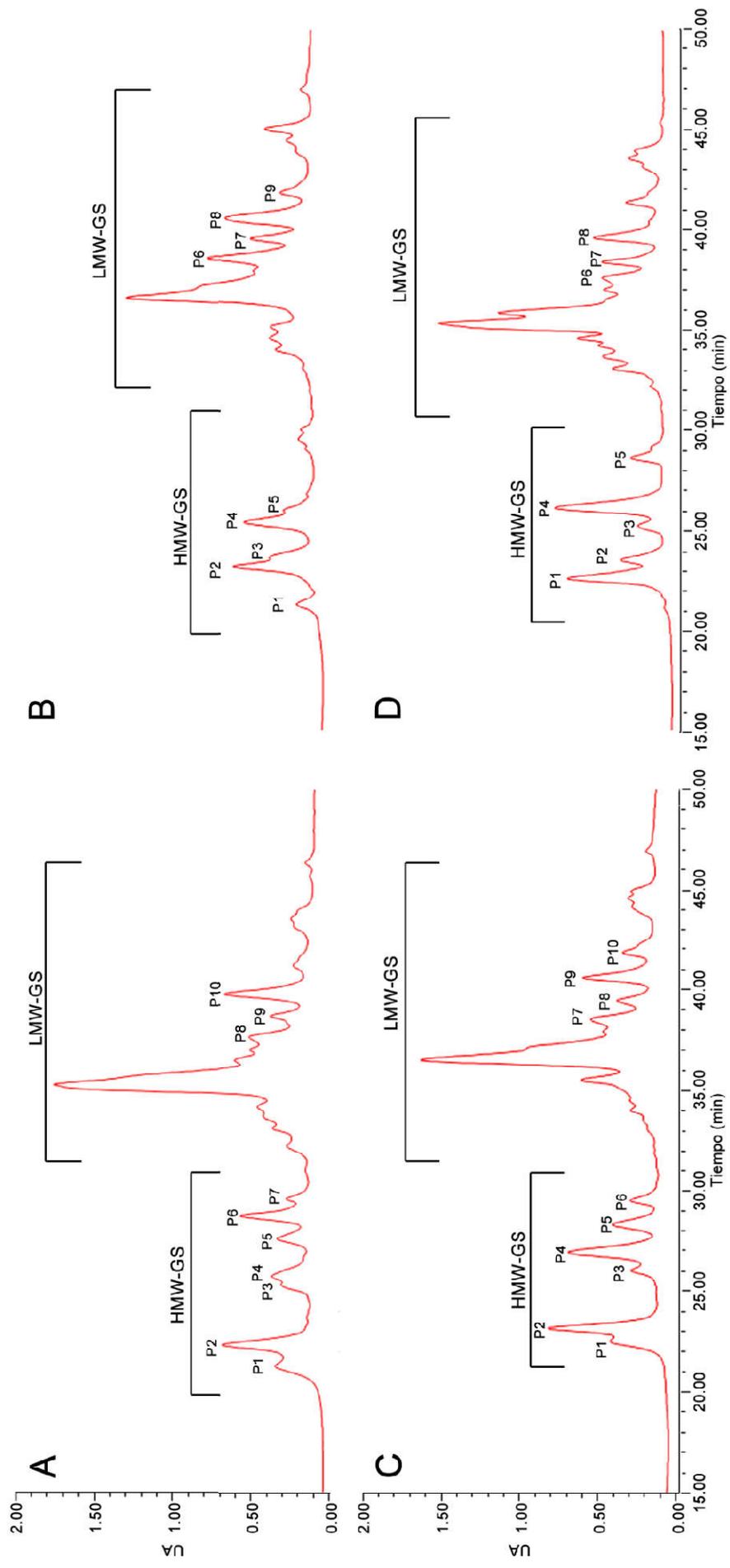
Al igual que para la fracción FM, en la fracción FPI se detectaron diferencias significativas debidas al tipo de cultivar empleado.

Como se observa, la fracción FPS mostró diferencias significativas entre los tratamientos debido al efecto del aislamiento, mientras las demás fracciones sólo mostraron diferencias debido al aporte genético del cultivar.

### **3 - Análisis de gluteninas por cromatografía líquida de alta eficacia por fase reversa**

Para el análisis de las proteínas gluteninas, fueron seleccionados los tratamientos pertenecientes a los cultivares Sy 200, AGP Fast y Klein Tigre en combinación con los tres aislamientos (tratamientos nº 10, 11, 12, 19, 20, 21, 22, 23 y 24 de la Tabla 3.5, Resultados y discusión, capítulo III). Los mismos se seleccionaron por presentar amplitud en la respuesta de severidad frente a la enfermedad, de manera de analizar los cambios proteicos en relación al grado de infección de las muestras.

A partir de los extractos proteicos obtenidos en el ítem 3.1 de materiales y método, se obtuvieron las muestras para analizar en HPLC. Los correspondientes cromatogramas mostraron una discriminación entre gluteninas de alto y bajo peso molecular, de acuerdo a lo reportado en diversos trabajos (Suchy et al. 2003; Naeem and Sapirstein 2007; Qian et al. 2008). Los picos proteicos fueron identificados de acuerdo al tiempo de retención, y se calcularon sus áreas correspondientes utilizando el programa Empower Software. A continuación se muestran 3 cromatogramas representativos del perfil proteico de los cultivares bajo estudio y un control (Figura 4.2).



**Figura 4.2:** Cromatografía en HPLC-RP de la fracción gluteninas de: A- Cultivar Sy 200; B- Cultivar AGP Fast; C- Cultivar Klein Tigre; D- Cultivar testigo SUMAI 3. HMW-GS: gluteninas de alto peso molecular; LMW-GS: gluteninas de bajo peso molecular. P<sub>1</sub>-P<sub>10</sub>: picos proteicos. UA: lecturas a 206 nm.

### 3.1 - Análisis del cultivar Sy 200

A partir de los valores de área obtenidos por la integración de picos proteicos en los cromatogramas resultantes del cultivar Sy 200 (tratamientos 10, 11 y 12) se confeccionó una matriz de correlación de Pearson, como se observa en la Tabla 4.15.

**Tabla 4.15:** Matriz de correlación de Pearson entre las áreas de picos proteicos obtenidos por HPLC en el cultivar Sy 200.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
P1	-	<b>0,97</b>	<b>0,92</b>	<b>0,91</b>	0,80	<b>0,92</b>	0,17	0,65	-0,32	<b>0,83</b>
P2	<b>0,97</b>	-	<b>0,90</b>	<b>0,96</b>	0,78	<b>0,95</b>	0,22	0,67	-0,33	0,76
P3	<b>0,92</b>	<b>0,90</b>	-	<b>0,83</b>	0,68	<b>0,85</b>	-0,09	0,50	-0,41	0,61
P4	<b>0,91</b>	<b>0,96</b>	<b>0,83</b>	-	<b>0,90</b>	<b>1,00</b>	0,30	0,59	-0,05	0,74
P5	0,80	0,78	0,68	<b>0,90</b>	-	<b>0,91</b>	0,36	0,48	0,31	<b>0,81</b>
P6	<b>0,92</b>	<b>0,95</b>	<b>0,85</b>	<b>1,00</b>	<b>0,91</b>	-	0,25	0,55	-0,05	0,73
P7	0,17	0,22	-0,09	0,30	0,36	0,25	-	0,74	0,39	0,57
P8	0,65	0,67	0,50	0,59	0,48	0,55	0,74	-	-0,21	0,80
P9	-0,32	-0,33	-0,41	-0,05	0,31	-0,05	0,39	-0,21	-	0,04
P10	<b>0,83</b>	0,76	0,61	0,74	<b>0,81</b>	0,73	0,57	0,80	0,04	-

Se marcan en negrita las correlaciones que resultaron significativas ( $p < 0,05$ ).

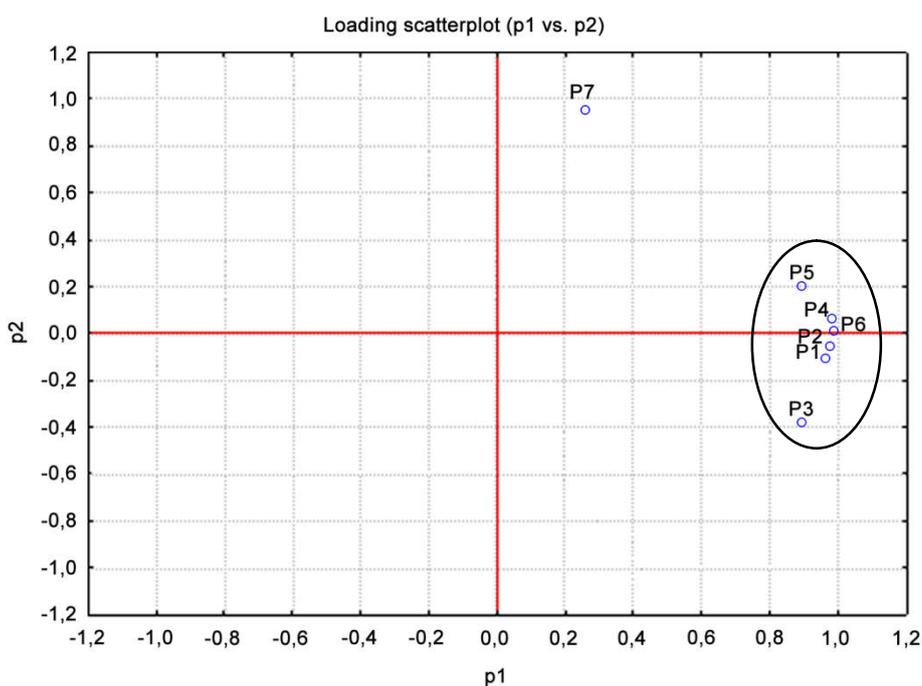
Los valores obtenidos a partir del cálculo de las áreas correspondientes a los picos proteicos del grupo lo gluteninas de alto peso molecular (P1-P7) mostraron alta correlación entre sí, lo cual evidencia un comportamiento similar entre los picos, por lo que un aumento o disminución en la señal en un pico es directamente proporcional al comportamiento de los demás. Por otro lado, los datos de integración obtenidos a partir de los picos proteicos de bajo peso molecular (P8-P10) no mostraron correlación entre ellos.

A partir del análisis de componentes principales (PCA) se observaron agrupaciones debido al comportamiento diferencial entre los mismos. Al utilizar solamente los picos correspondientes a la región de gluteninas de alto peso molecular se obtuvieron dos componentes que explicaron el 80,85% del comportamiento (Tabla 4.16).

**Tabla 4.16:** Análisis de componentes principales para los picos proteicos de gluteninas de alto peso molecular por HPLC del cultivar Sy 200.

Componente	Eigenvalues	Varianza	Eigenvalue acumulado	Varianza acumulada
1	4,66	66,52	4,66	66,52
2	1,00	14,33	5,66	80,85

Al realizar la representación de los vectores producto del análisis de PCA, se puede observar que para el primer componente el P7 presenta un comportamiento diferencial al resto, teniendo un valor más cercano a 0 que los demás. A su vez, respecto al segundo componente, los picos se agrupan alrededor de valores cercanos a 0, a excepción nuevamente del valor de P7 que se distancia. (Figura 4.3).



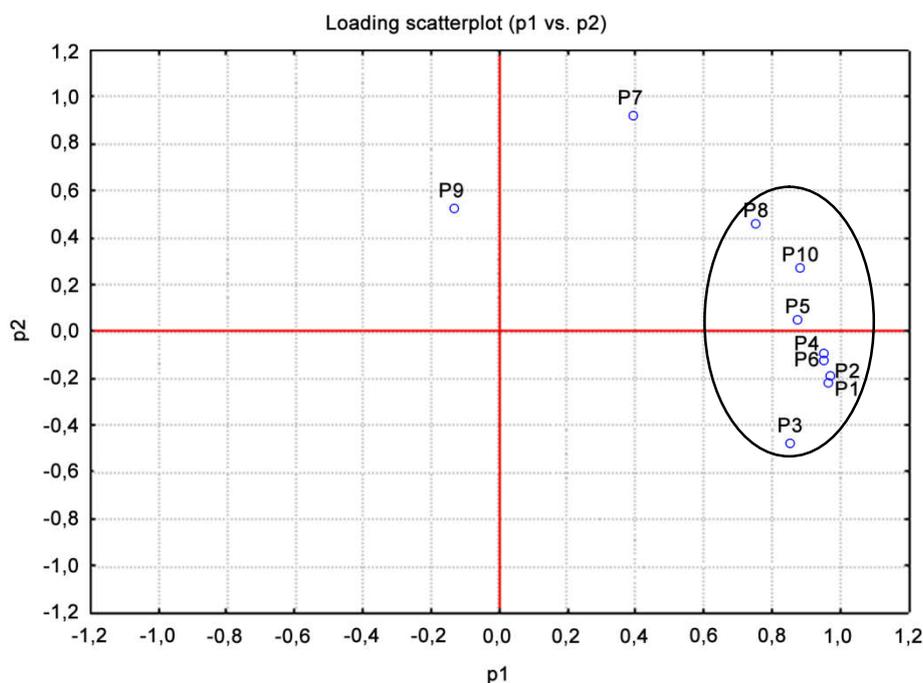
**Figura 4.3:** Representación gráfica de los componentes 1 y 2 obtenidos del análisis de PCA para los picos de gluteninas de alto peso molecular en el cultivar Sy 200.

Al agregar al análisis los datos correspondientes a los picos proteicos de la región de bajo peso molecular, se obtuvieron nuevamente dos componentes, pero que explicaron el 84,78% de la varianza (Tabla 4.17).

**Tabla 4.17:** Análisis de componentes principales para las áreas de los picos proteicos de gluteninas de alto y bajo peso molecular por HPLC del cultivar Sy 200.

Componente	Eigenvalues	Varianza	Eigenvalue acumulado	Varianza acumulada
1	6,71	61,01	6,71	61,01
2	2,61	23,77	9,33	84,78

Se observa en la distribución de los vectores, que los picos P7 y P9 se alejan del agrupamiento, mientras que el resto de los mismos quedaron agrupados (Figura 4.4). Es destacable que exceptuando P5 y P7, todos los picos correspondientes a HMW-GS dieron negativo para el segundo componente.



**Figura 4.4:** Representación gráfica de los componentes 1 y 2 obtenidos del análisis de PCA para todos los picos de HPLC en el cultivar Sy 200.

Para observar la posible relación entre los cambios proteicos analizados a partir de los cromatogramas obtenidos por HPLC y las variables de agresividad y rendimiento (ítem 3.1, Materiales y métodos, capítulo III) se confeccionó una matriz de correlación (Tabla 4.18).

**Tabla 4.18:** Correlación de Pearson entre las áreas de picos proteicos obtenidas por HPLC y variables de rendimiento y agresividad para el cultivar Sy 200.

Pico proteico	Proteína total	Incidencia	Severidad	%GD	PMG	IF	ISK
P1	0,21	<b>-0,83</b>	-0,44	-0,17	0,56	<b>-0,87</b>	-0,71
P2	0,09	-0,74	-0,47	-0,26	0,60	<b>-0,82</b>	-0,68
P3	0,22	-0,69	-0,50	-0,32	0,68	-0,76	-0,67
P4	0,23	-0,63	-0,49	-0,29	0,65	-0,70	-0,62
P5	0,60	-0,62	-0,51	-0,27	0,63	-0,61	-0,61
P6	0,27	-0,62	-0,50	-0,29	0,66	-0,69	-0,62
P7	0,20	-0,40	-0,55	-0,48	0,35	-0,41	-0,53
P8	0,11	<b>-0,83</b>	-0,74	-0,59	0,62	<b>-0,88</b>	<b>-0,89</b>
P9	0,64	0,26	-0,12	-0,13	0,08	0,36	0,11
P10	0,48	<b>-0,93</b>	-0,56	-0,28	0,53	<b>-0,90</b>	<b>-0,84</b>
HMW HPLC	0,24	-0,74	-0,51	-0,28	0,65	<b>-0,80</b>	-0,70
LMW HPLC	0,37	<b>-0,83</b>	-0,64	-0,43	0,53	<b>-0,83</b>	-0,83

%GD: porcentaje de grados dañados; PMG: peso de mil granos; IF: índice de *Fusarium*. ISK: índice de incidencia, severidad y granos dañados. Se marcan en negrita los valores significativos ( $p < 0,05$ ). Los valores de las variables HMW-GS y LMW-GS se obtuvieron sumando las áreas correspondientes a cada grupo.

Las correlaciones entre los valores de las áreas de los picos de HPLC y las variables de agresividad mostraron una tendencia negativa entre estos parámetros. Contrariamente, la correlación entre la variable de rendimiento (PMG) y los valores obtenidos por cromatografía mostraron una tendencia positiva.

Para comparar el efecto de los aislamientos sobre los valores proteicos se consideró como 100% de señal a los valores obtenidos para el aislamiento N (el menos agresivo), en relación a los valores de los otros aislamientos. En la Tabla 4.19 se observan diferencias significativas para los valores promedios de las proteínas de alto peso molecular para los picos proteicos P2, P4, P6 y P7. Los resultados obtenidos, adscriben una menor agresividad para el aislamiento N evidenciado por una menor degradación proteica.

**Tabla 4.19:** Comparación porcentual entre el efecto de los aislamientos Am y Az respecto al aislamiento N para las áreas de los picos proteicos obtenidos por HPLC en el cultivar Sy 200.

Pico	Efecto Am (%)	Efecto Az (%)	<i>p</i>
P1	82,65	85,20	0,152
P2	97,81	97,89	<b>0,042</b>
P3	79,01	79,07	0,079
P4	84,21	89,18	<b>0,030</b>
P5	89,09	80,38	0,294
P6	82,13	89,49	<b>0,033</b>
P7	82,97	66,46	<b>0,029</b>
P8	71,80	65,85	0,287
P9	86,55	73,14	0,702
P10	89,74	86,58	0,526
HMW-GS	87,47	88,14	<b>0,041</b>
LMW-GS	83,91	76,65	0,315

Los valores expresados en esta Tabla fueron considerados utilizando los valores del aislamiento N como el 100%. HMW-GS y LMW-GS se obtuvieron sumando las áreas correspondientes a cada grupo. El *p* fue calculado con un análisis de ANOVA. Se marcan en negrita los valores significativos ( $p < 0,05$ ).

### 3.2 - Análisis del cultivar AGP Fast

De igual manera que con el cultivar anterior, se realizó una matriz de correlación para comparar el comportamiento de los picos obtenidos por HPLC en el cultivar AGP Fast (Tabla 4.20).

**Tabla 4.20:** Matriz de correlación de Pearson entre las áreas de los picos proteicos obtenidos por HPLC en el cultivar AGP Fast.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
P1	-	<b>0,82</b>	<b>0,82</b>	<b>0,89</b>	<b>0,81</b>	-0,49	<b>0,81</b>	<b>0,81</b>	<b>0,83</b>
P2	<b>0,82</b>	-	<b>0,97</b>	<b>0,98</b>	<b>0,89</b>	0,00	0,62	0,57	0,64
P3	<b>0,82</b>	<b>0,97</b>	-	<b>0,96</b>	<b>0,92</b>	-0,02	0,56	0,60	0,66
P4	<b>0,89</b>	<b>0,98</b>	<b>0,96</b>	-	<b>0,94</b>	-0,15	0,68	0,63	0,69
P5	<b>0,81</b>	<b>0,89</b>	<b>0,92</b>	<b>0,94</b>	-	-0,28	<b>0,80</b>	<b>0,82</b>	<b>0,81</b>
P6	-0,49	0,00	-0,02	-0,15	-0,28	-	-0,51	-0,18	-0,21
P7	<b>0,81</b>	0,62	0,56	0,68	<b>0,80</b>	-0,51	-	<b>0,85</b>	<b>0,89</b>
P8	<b>0,81</b>	0,57	0,60	0,63	<b>0,82</b>	-0,18	<b>0,85</b>	-	<b>0,91</b>
P9	<b>0,83</b>	0,64	0,66	0,69	<b>0,81</b>	-0,21	<b>0,89</b>	<b>0,91</b>	-

Se marcan en negrita las correlaciones que resultaron significativas ( $p < 0,05$ ).

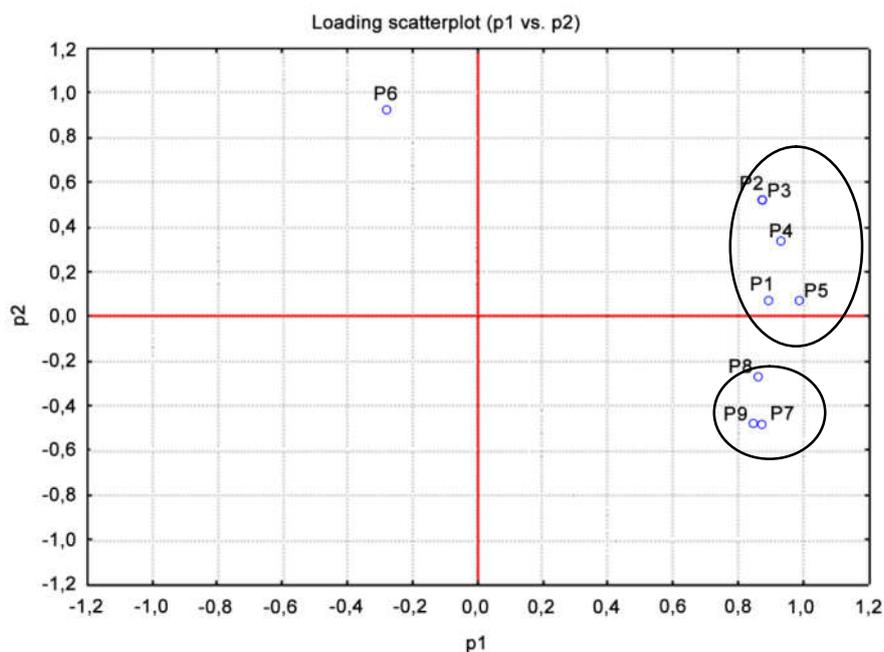
En esta matriz puede observarse que la mayoría de las áreas de los picos mostraron correlaciones significativas entre los valores correspondientes a las HMW-GS (P1-P5). Esta alta correlación también se muestra para las áreas de los picos de LMW-GS (P6-P9).

Al realizar un análisis de componentes principales utilizando solamente las áreas de los picos P1-P5 (HMW-GS), se obtuvo un único componente, por lo que se procedió a agregar al set de datos los valores correspondientes al P6-P9. Con esto se obtuvieron dos componentes, que explicaron el 88% de la varianza total (Tabla 4.21).

**Tabla 4.21:** Análisis de componentes principales para las áreas de los picos proteicos de gluteninas de alto y bajo peso molecular por HPLC del cultivar AGP Fast.

Componente	Eigenvalues	Varianza	Eigenvalue acumulado	Varianza acumulada
1	7,38	73,89	7,38	73,89
2	1,45	14,58	8,84	88,48

Al representar los vectores producto del análisis de PCA (Figura 4.5), se puede observar como las áreas de los picos de HMW-GS se agrupan. Los valores de los picos correspondientes a las LMW-GS también mostraron agrupamiento, cercano al de gluteninas de alto peso, pero se puede apreciar como el segundo componente generado diferencia a estos dos grupos asignándole valores de signos opuestos.



**Figura 4.5:** Representación gráfica de los componentes 1 y 2 obtenidos del análisis de PCA para todos los picos de HPLC en el cultivar AGP Fast.

Para analizar la relación entre la respuesta por HPLC y las variables de agresividad y rendimiento (ítem 3.1, Materiales y métodos, capítulo III) se confeccionó una matriz de correlación entre los parámetros (Tabla 4.22).

**Tabla 4.22:** Correlación de Pearson entre las áreas de picos proteicos obtenidas por HPLC y variables de rendimiento y agresividad para el cultivar AGP Fast.

Pico proteicos	Proteína total	Incidencia	Severidad	%GD	PMG	IF	ISK
P1	-0,59	-0,57	<b>-0,82</b>	<b>-0,83</b>	0,66	-0,74	-0,73
P2	-0,18	-0,67	<b>-0,86</b>	<b>-0,80</b>	0,69	-0,78	-0,78
P3	-0,13	-0,72	<b>-0,88</b>	<b>-0,83</b>	0,78	<b>-0,82</b>	<b>-0,82</b>
P4	-0,30	-0,66	<b>-0,91</b>	<b>-0,86</b>	0,76	<b>-0,82</b>	<b>-0,81</b>
P5	-0,39	<b>-0,83</b>	<b>-0,99</b>	<b>-0,97</b>	<b>0,88</b>	<b>-0,94</b>	<b>-0,94</b>
P6	<b>0,95</b>	0,23	0,27	0,41	-0,57	0,42	0,30
P7	-0,68	<b>-0,81</b>	<b>-0,86</b>	<b>-0,90</b>	0,74	<b>-0,88</b>	<b>-0,87</b>
P8	-0,29	<b>-0,86</b>	<b>-0,87</b>	<b>-0,87</b>	0,67	<b>-0,84</b>	<b>-0,89</b>
P9	-0,30	<b>-0,83</b>	<b>-0,87</b>	<b>-0,89</b>	0,70	<b>-0,86</b>	<b>-0,89</b>
HMW HPLC	-0,35	-0,73	<b>-0,96</b>	<b>-0,93</b>	<b>0,81</b>	<b>-0,88</b>	<b>-0,88</b>
LMW HPLC	-0,31	<b>-0,87</b>	<b>-0,89</b>	<b>-0,88</b>	0,64	<b>-0,85</b>	<b>-0,90</b>

%GD: porcentaje de grados dañados; PMG: peso de mil granos; IF: índice de *Fusarium*. ISK: índice de incidencia, severidad y granos dañados. Se marcan en negrita los valores significativos ( $p < 0,05$ ). Los valores de las variables HMW-GS y LMW-GS se obtuvieron sumando las áreas correspondientes a cada grupo.

En esta matriz, puede observarse una correlación negativa significativa alta entre los mismos, principalmente con las variables severidad y % GD.

Para comparar el efecto del aislamiento se procedió de la misma manera que con el cultivar anterior, considerando como 100% de señal a los valores obtenidos para el aislamiento N (el menos agresivo), en relación a los valores de los otros aislamientos. En la Tabla 4.23 se observan los datos obtenidos. El aislamiento Az produjo una menor intensidad de la señal, comparado con el aislamiento Am, mientras que el aislamiento N fue el que produjo menores cambios proteicos.

**Tabla 4.23:** Comparación porcentual entre el efecto de los aislamientos Am y Az respecto al aislamiento N para las áreas de los picos proteicos obtenidos por HPLC en el cultivar AGP Fast.

<b>Pico proteico</b>	<b>Efecto Am (%)</b>	<b>Efecto Az (%)</b>	<b><i>p</i></b>
P1	82,84	46,37	0,147
P2	71,29	49,97	0,103
P3	66,23	53,24	0,111
P4	62,42	22,82	<b>0,049</b>
P5	48,28	15,57	<b>0,009</b>
P6	75,20	125,70	0,472
P7	71,43	34,93	0,078
P8	25,33	15,25	0,077
P9	37,16	49,64	0,061
HMW-GS	68,26	41,10	<b>0,022</b>
LMW-GS	57,26	45,68	0,054

Los valores expresados en esta Tabla fueron considerados utilizando los valores del aislamiento N como el 100%. HMW-GS y LMW-GS se obtuvieron sumando las áreas correspondientes a cada grupo. El *p* fue calculado con un análisis de ANOVA. Se marcan en negrita los valores significativos.

### 3.3 - Análisis del cultivar Klein Tigre

A partir de los perfiles proteicos obtenidos por HPLC para el cultivar Klein Tigre, se calcularon las áreas de los picos proteicos, y se construyó la siguiente matriz de correlación de Pearson:

**Tabla 4.24:** Matriz de correlación de Pearson entre las áreas de los picos proteicos obtenidos por HPLC en el cultivar Klein Tigre.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
P1	-	0,76	-0,57	<b>0,80</b>	0,75	0,73	-0,38	0,58	0,42	-0,04
P2	0,76	-	-0,16	<b>0,96</b>	<b>0,84</b>	<b>0,81</b>	-0,19	0,46	0,69	0,60
P3	-0,57	-0,16	-	-0,09	-0,12	-0,23	0,54	-0,70	0,40	0,44
P4	<b>0,80</b>	<b>0,96</b>	-0,09	-	<b>0,95</b>	<b>0,91</b>	0,02	0,49	<b>0,82</b>	0,53
P5	0,75	<b>0,84</b>	-0,12	<b>0,95</b>	-	<b>0,97</b>	0,25	0,58	<b>0,85</b>	0,47
P6	0,73	<b>0,81</b>	-0,23	<b>0,91</b>	<b>0,97</b>	-	0,25	0,74	0,75	0,47
P7	-0,38	-0,19	0,54	0,02	0,25	0,25	-	0,01	0,48	0,32
P8	0,58	0,46	-0,70	0,49	0,58	0,74	0,01	-	0,12	0,13
P9	0,42	0,69	0,40	<b>0,82</b>	<b>0,85</b>	0,75	0,48	0,12	-	0,60
P10	-0,04	0,60	0,44	0,53	0,47	0,47	0,32	0,13	0,60	-

Se marcan en negrita las correlaciones que resultaron significativas.

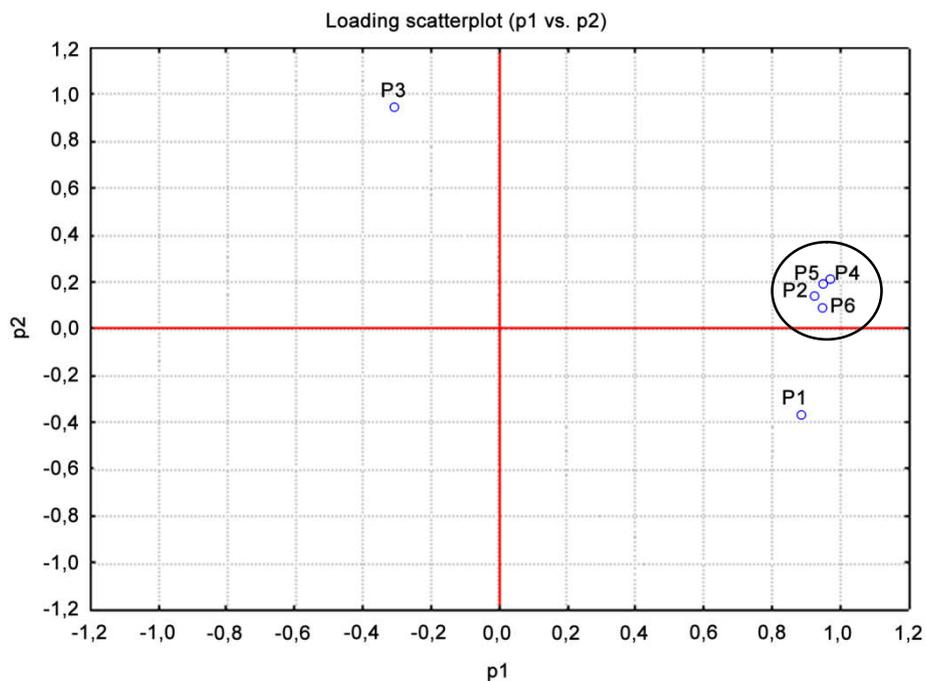
Similar a los resultados obtenidos para los demás cultivares bajo estudio, la matriz muestra una correlación significativa alta entre la mayoría de los picos correspondientes a las HMW-GS (P1-P6). Por otro lado, para los valores de los picos correspondientes a las LMW-GS la correlación fue positiva, aunque no significativa.

Al realizar el análisis de componentes principales de los picos de gluteninas de alto peso molecular (Tabla 4.25) se obtuvieron dos componentes que explicaron el 93,33% del total de la varianza.

**Tabla 4.25:** Análisis de componentes principales para las áreas de los picos proteicos de gluteninas de alto peso molecular por HPLC del cultivar Klein Tigre.

Componente	Eigenvalues	Varianza	Eigenvalue acumulado	Varianza acumulada
1	4,48	74,58	4,48	74,58
2	1,12	18,74	5,60	93,33

Al analizar los vectores generados por el análisis de PCA, se puede observar que el P3 muestra un valor diferencial debido al componente 1, mientras que el P1 muestra una posición diferencial en el componente 2. Esto puede observarse en la Figura 4.6.



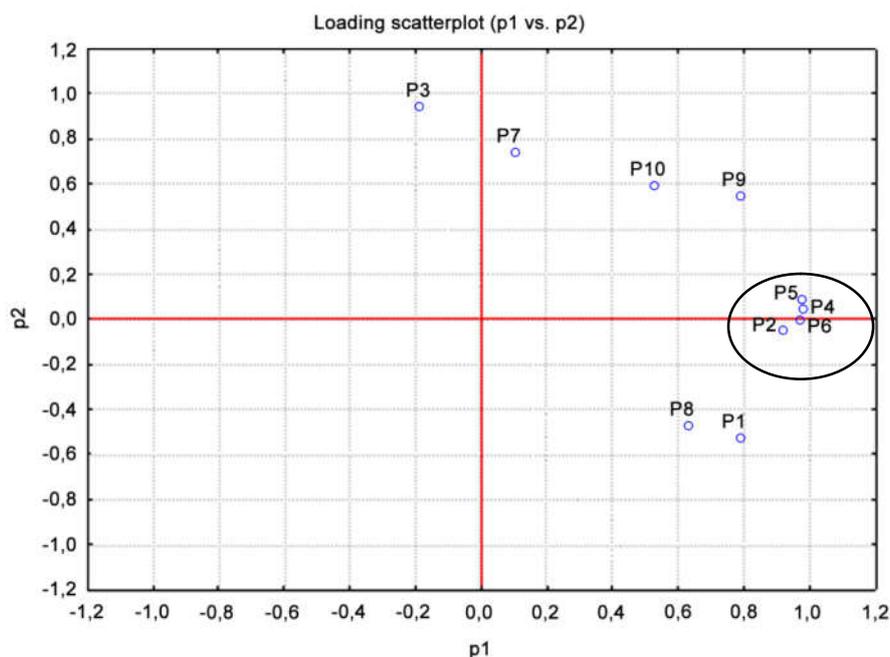
**Figura 4.6:** Representación gráfica de los componentes 1 y 2 obtenidos del análisis de PCA para los picos de gluteninas de alto peso molecular en el cultivar Klein Tigre.

Al agregar al análisis los valores de gluteninas de bajo peso molecular se generaron nuevamente 2 componentes que explicaron esta vez el 82,75% de la varianza (Tabla 4.26).

**Tabla 4.26:** Análisis de componentes principales para las áreas de los picos proteicos de gluteninas por HPLC del Klein Tigre.

Componente	Eigenvalues	Varianza	Eigenvalue acumulado	Varianza acumulada
1	5,67	56,74	5,67	56,74
2	2,60	26,01	8,27	82,75

Al realizar este análisis, los picos correspondientes a la gluteninas de alto peso molecular, conservaron la misma agrupación que cuando se analizaron solos. Los picos de bajo peso molecular se mostraron de manera dispersa (Figura 4.7).



**Figura 4.7:** Representación gráfica de los componentes 1 y 2 obtenidos del análisis de PCA para todos los picos de HPLC en el cultivar Klein Tigre.

A partir de los datos de las áreas calculadas de los perfiles proteicos obtenidos por HPLC, y los valores de agresividad y rendimiento se confeccionó la siguiente matriz de correlación (Tabla 4.27):

**Tabla 4.27:** Correlación de Pearson entre las áreas de picos proteicos obtenidas por HPLC y variables de rendimiento y agresividad para el cultivar Klein Tigre.

Pico proteico	Proteína total	Incidencia	Severidad	%GD	PMG	IF	ISK
P1	0,23	0,34	0,18	0,07	-0,13	0,23	0,25
P2	0,55	-0,04	-0,52	-0,53	0,37	-0,32	-0,30
P3	-0,34	<b>-0,94</b>	<b>-0,82</b>	<b>-0,92</b>	<b>0,99</b>	<b>-0,98</b>	<b>-0,98</b>
P4	0,25	-0,24	-0,49	-0,58	0,50	-0,44	-0,42
P5	-0,02	-0,46	-0,46	-0,60	0,59	-0,55	-0,53
P6	-0,02	-0,55	-0,58	-0,71	0,70	-0,66	-0,64
P7	-0,70	<b>-0,95</b>	-0,44	-0,55	0,73	-0,78	-0,79
P8	0,18	-0,69	<b>-0,99</b>	<b>-0,98</b>	<b>0,91</b>	<b>-0,91</b>	<b>-0,90</b>
P9	-0,13	-0,61	-0,55	-0,70	0,72	-0,69	-0,67
P10	0,40	-0,55	<b>-0,97</b>	<b>-0,92</b>	0,79	<b>-0,81</b>	<b>-0,80</b>
HMW HPLC	0,31	-0,06	-0,33	-0,42	0,33	-0,26	-0,23
LMW HPLC	-0,25	-0,78	-0,56	-0,67	0,73	-0,76	-0,75

%GD: porcentaje de grados dañados; PMG: peso de mil granos; IF: índice de *Fusarium*. ISK: índice de incidencia, severidad y granos dañados. Se marcan en negrita los valores significativos. Los valores de las variables HMW-GS y LMW-GS se obtuvieron sumando las áreas de picos correspondientes a cada grupo.

En esta matriz se puede observar que los valores de los picos decrecen a mayores niveles de severidad o incidencia (expresado como una correlación negativa entre estos parámetros). Este resultado es similar al obtenido con el cultivar para los otros cultivares analizados. De igual manera, la correlación entre los valores de HPLC y el de PMG dio positivas respondiendo similar a los anteriores cultivares.

Al analizar el efecto del aislamiento en cada uno de los picos (Tabla 4.28), se observa que exceptuando el P3 y el P7, todos valores obtenidos para los picos relacionados con los aislamientos Am y Az fueron menores en comparación con el aislamiento N.

**Tabla 4.28:** Comparación porcentual entre el efecto de los aislamientos Am y Az respecto al aislamiento N para las áreas de los picos proteicos obtenidos por HPLC en el cultivar Klein Tigre.

<b>Pico proteico</b>	<b>Efecto Am (%)</b>	<b>Efecto Az (%)</b>	<b>p</b>
P1	92,43	68,85	0,172
P2	82,10	50,59	<b>0,004</b>
P3	127,86	117,75	0,748
P4	86,24	55,94	<b>0,005</b>
P5	79,70	58,66	<b>0,034</b>
P6	74,43	52,43	<b>0,048</b>
P7	93,28	103,08	0,898
P8	26,97	22,09	0,413
P9	93,65	74,68	0,324
P10	85,78	75,83	0,580
HMW-GS	89,03	54,92	<b>0,008</b>
LMW-GS	67,21	65,84	0,166

Los valores expresados en esta Tabla fueron considerados utilizando los valores del aislamiento N como el 100%. HMW-GS y LMW-GS se obtuvieron sumando las áreas correspondientes a cada grupo. El *p* fue calculado con un análisis de ANOVA. Se marcan en negrita los valores significativos.

Resumiendo, los datos obtenidos para los tres cultivares mostraron que los valores de las áreas proteicas correspondientes a las HMW-GS resultaron en su mayoría agrupados de acuerdo al análisis de PCA. Esto indica que estas proteínas tuvieron un comportamiento similar ante el efecto de la enfermedad, lo que les permitió este agrupamiento. Por otro lado, el análisis de las proteínas LMW-GS mostró un comportamiento disperso para el cultivar Klein Tigre. Estos resultados estuvieron en

concordancia con los observados en las matrices de correlación, donde las proteínas de la fracción HMW-GS mostraron, en su mayoría, correlaciones altas y significativas.

La comparación entre las variables de agresividad y rendimiento y los valores obtenidos por HPLC para las gluteninas, mostró que la mayoría de los componentes de este grupo proteico tuvo una correlación significativa con las variables mencionadas como producto de la enfermedad. Esto quiere decir que para los cultivares estudiados, mayores niveles de infección (medidos como severidad o porcentaje de granos dañados) significaron menores niveles de gluteninas, que son responsables de la elasticidad y cohesividad de la masa. Resultados similares fueron reportados por Wang et al. 2005, quienes observaron que a mayores niveles de infección con *Fusarium culmorum*, disminuía el porcentaje de gluteninas, en especial las HMW-GS. Eggert et al. (2010) compararon los efectos entre una infección natural y una artificial, observando que esta última mostró valores proteicos más bajos para la mayoría de las fracciones estudiadas.

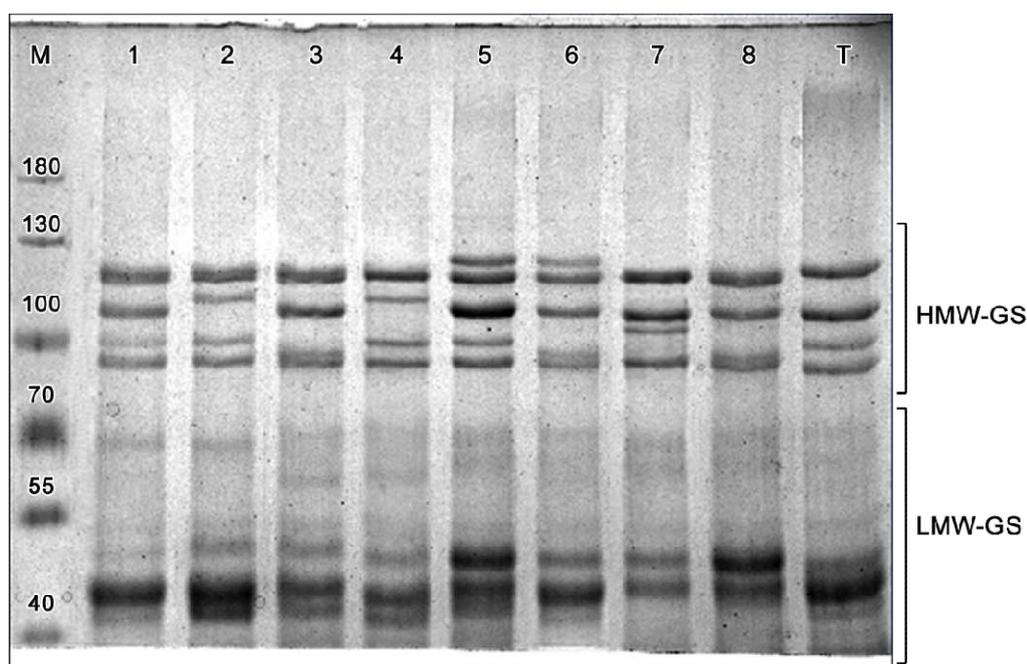
A partir de los datos obtenidos para los tratamientos analizados, se observó una concordancia en relación al grado de agresividad adscrito a los aislamientos en el capítulo III, de acuerdo a los valores medidos de la enfermedad en los cultivares bajo estudio. Por lo tanto, el aislamiento N mostró los valores de señal más altos para la mayoría de los picos proteicos analizados, lo cual indicaría una menor degradación proteica en el trigo.

#### **4 - Análisis de gluteninas de alto peso molecular por electroforesis en geles de poliacrilamida.**

Los extractos proteicos obtenidos de acuerdo a lo especificado en materiales y métodos fueron sembrados en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes. El análisis a partir de las bandas proteicas observadas en los geles, se realizó para las gluteninas de alto peso molecular. Con esta técnica se pudo identificar los alelos correspondientes de las bandas proteicas, comparar los efectos de la infección en las bandas de alto peso molecular en los tres cultivares estudiados en la sección de HPLC y determinar el score de calidad en las harinas.

#### 4.1 - Identificación alélica

En primer lugar se realizaron geles para la identificación alélica de las proteínas de alto peso molecular de los 8 cultivares bajo estudio y el testigo. A continuación se muestra un gel representativo de los perfiles obtenidos (Figura 4.8 y Tabla 4.29).



**Figura 4.8:** Perfil de gluteninas de cultivares de trigo bajo estudio. M: Marcador de peso molecular; 1: SRM Nogal; 2: Sy 100; 3: BioINTA 2005; 4: Sy 200; 5: Buck Meteoro; 6: BioINTA 1005; 7: AGP Fast; 8: Klein Tigre; T: Testigo Sumai 3.

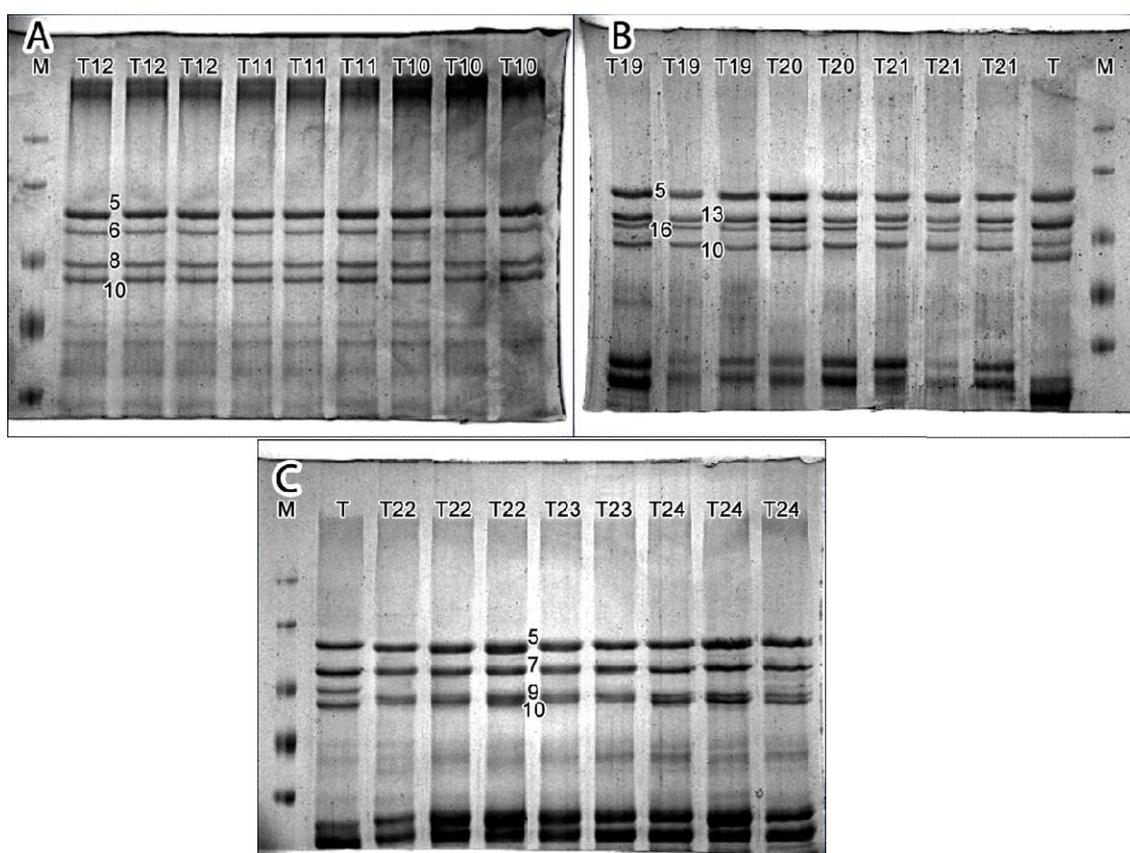
**Tabla 4.29:** Identificación alélica del perfil de gluteninas de alto peso molecular por SDS-PAGE.

Cultivar	A1	B1	D1
SMR Nogal	-	7+8	5+10
Sy 100	-	6+8	5+10
BioINTA 2005	-	7+9	5+10
Sy 200	-	6+8	5+10
Buck Meteoro	1	7+8	5+10
BioINTA 1005	1	7+9	5+10
AGP Fast	-	13+16	5+10
Klein Tigre	-	7+9	5+10

A1, B1 y D1 corresponden a los genes del complejo Glu-1.

## 4.2 - Análisis de la infección

Posteriormente se seleccionaron los mismos cultivares utilizados en el ensayo de HPLC (tratamientos n° 10, 11, 12, 19, 20, 21, 22, 23 y 24; Tabla 3.5, Resultados y discusión, capítulo III) para analizar el efecto de la infección, utilizando los valores de los densitograma correspondientes. Los resultados de cada cultivar se muestran en la Figura 4.9.



**Figura 4.9:** Geles de poliacrilamida para el análisis de densitometría. A: Perfiles del cultivar Sy 200; B: Perfiles del cultivar AGP Fast; C: Perfiles del cultivar Klein Tigre. Tratamientos: T10-T24. M: marcadores moleculares. T: testigo.

### 4.2.1 - Análisis del cultivar Sy 200

A partir del análisis de las bandas proteicas con el programa GelAnalyzer2010, se obtuvieron los valores de densidad de las mismas, lo cual permitió su análisis en relación a la magnitud de la señal. A partir de estos resultados se confeccionó una matriz de correlación de Pearson (Tabla 4.30).

**Tabla 4.30:** Matriz de correlación de Pearson para los valores de densidad obtenidos a partir de SDS-PAGE del cultivar Sy 200.

	5	6	8	10
5	-	<b>0,98</b>	<b>0,94</b>	<b>0,89</b>
6	<b>0,98</b>	-	<b>0,94</b>	<b>0,91</b>
8	<b>0,94</b>	<b>0,94</b>	-	<b>0,97</b>
10	<b>0,89</b>	<b>0,91</b>	<b>0,97</b>	-

5, 6, 8 y 10: Bandas de HMW-GS.

Se observan correlaciones positivas significativas entre los mismos, lo que indica una respuesta homogénea entre las bandas, es decir que cuando aumenta la señal de una de las bandas, aumenta la señal en todas las demás.

A partir de esta matriz se realizó una correlación de Pearson con datos de los ensayos de agresividad y rendimiento (Tabla 4.31).

**Tabla 4.31:** Correlación de Pearson entre los valores de densidad obtenidos a partir de SDS-PAGE y las variables de rendimiento y agresividad estudiadas para el cultivar Sy 200.

Banda proteica	Proteína total	Incidencia	Severidad	%GD	PMG	IF	ISK
5	-0,49	-0,74	<b>-0,84</b>	-0,67	<b>0,91</b>	<b>-0,79</b>	<b>-0,88</b>
6	-0,42	<b>-0,86</b>	<b>-0,78</b>	-0,58	<b>0,83</b>	<b>-0,91</b>	<b>-0,92</b>
8	-0,63	<b>-0,78</b>	-0,77	-0,55	0,78	<b>-0,78</b>	<b>-0,86</b>
10	-0,61	<b>-0,85</b>	<b>-0,80</b>	-0,59	0,74	<b>-0,83</b>	<b>-0,92</b>

%GD: porcentaje de grados dañados; PMG: peso de mil granos; IF: índice de *Fusarium*. ISK: índice de incidencia, severidad y granos dañados. Se marcan en negrita los valores significativos.

En esta matriz, se observa que los valores de HMW-GS obtenidos por SDS-PAGE muestran una correlación negativa con los valores de incidencia, severidad y porcentaje de granos dañados, resultado similar al observado por HPLC.

Para identificar si la diferencia entre las señales puede atribuirse al efecto del aislamiento utilizado, se realizó un análisis de ANOVA (Tabla 4.32). Las diferencias no resultaron significativas.

**Tabla 4.32:** Valores de  $p$  para los resultados de densitometría de las bandas proteicas obtenidas para el cultivar Sy 200.

<b>Banda proteica</b>	<b><math>p</math></b>
5	0,170
6	0,213
8	0,317
10	0,424
HMW-GS	0,249

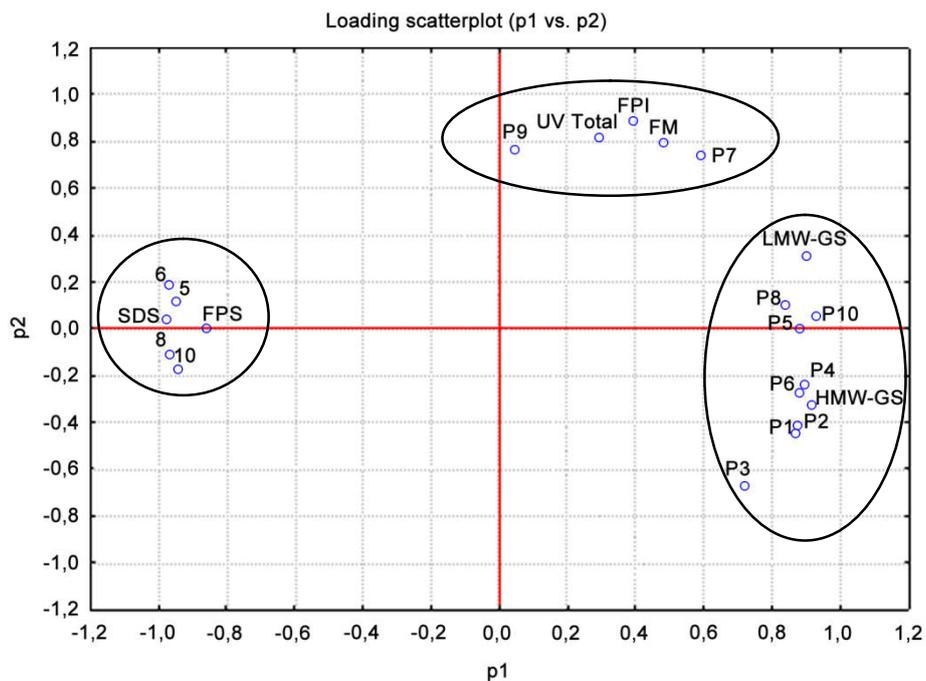
El valor HMW-GS se obtuvo de la sumatoria de todas las bandas.

Se realizó un análisis por PCA para evaluar los datos obtenidos a partir de todas las técnicas empleadas en cada una de las fracciones proteicas bajo estudio. Este análisis arrojó dos componentes que explicaron el 83% de la varianza (Tabla 4.33).

**Tabla 4.33:** Análisis de PCA para el cultivar Sy 200 de las fracciones proteicas obtenidas por espectrofotometría-UV, HPLC y SDS-PAGE.

<b>Componente</b>	<b>Eigenvalues</b>	<b>Varianza</b>	<b>Eigenvalue acumulado</b>	<b>Varianza acumulada</b>
1	13,65	62,03	13,65	62,03
2	4,61	20,97	18,26	83

Este análisis nos permitió observar el agrupamiento de la mayoría de los resultados de acuerdo a la técnica empleada (Figura 4.10). Los únicos valores que se separaron de sus respectivos grupos fueron los picos P7 y P9 de HPLC y la fracción FPS de espectrometría-UV.



**Figura 4.10:** Representación gráfica de los componentes 1 y 2, obtenidos por PCA de las fracciones proteicas obtenidas por espectrofotometría-UV (FM, FPI, FPS y UV Total), HPLC (P1-P10, HMW-GS y LMW-GS) y SDS-PAGE (5, 6, 8, 10 y SDS) para el cultivar Sy 200.

#### 4.2.2 - Análisis del cultivar AGP Fast

Se utilizó una matriz de correlación de Pearson para observar las tendencias entre los valores obtenidos por densitometría. (Tabla 4.34).

**Tabla 4.34:** Matriz de correlación de Pearson para los valores de densidad obtenidos a partir de SDS-PAGE del cultivar AGP Fast.

	5	13	16	10
5	-	0,76	0,75	0,66
13	0,76	-	0,70	0,24
16	0,75	0,70	-	0,78
10	0,66	0,24	0,78	-

5, 10, 13 y 16: Bandas de HMW-GS.

En este análisis se observan correlaciones positivas entre los valores asignados a las bandas proteicas para un cultivar, observándose disminuciones similares entre las señales de la bandas involucradas.

Los valores obtenidos por densitometría fueron a su vez analizados con respecto a los datos obtenidos en el ensayo de agresividad y rendimiento como se muestra en la Tabla 4.35.

**Tabla 4.35:** Correlación de Pearson entre los valores de densidad obtenidos a partir de SDS-PAGE y las variables de rendimiento y agresividad estudiadas para el cultivar AGP Fast.

Banda Proteica	Proteína total	Incidencia	Severidad	%GD	PMG	IF	ISK
5	-0,66	-0,21	-0,24	-0,26	0,48	-0,28	-0,24
13	-0,51	-0,53	-0,65	-0,62	0,77	-0,60	-0,60
16	-0,50	-0,43	-0,73	-0,71	<b>0,82</b>	-0,67	-0,60
10	-0,12	-0,38	-0,00	0,01	-0,04	-0,03	-0,18

%GD: porcentaje de grados dañados; PMG: peso de mil granos; IF: índice de *Fusarium*. ISK: índice de incidencia, severidad y granos dañados. Se marcan en negrita los valores significativos.

De igual manera que con el cultivar Sy 200, los valores de densidad de las bandas obtenidas por SDS-PAGE se correlacionaron negativamente con los valores de incidencia, severidad y porcentaje de granos dañados.

Para analizar si las diferencias entre las señales obtenidas de acuerdo a los valores de densidad de las bandas proteicas evidenciadas por SDS-PAGE son atribuibles al efecto del aislamiento utilizado, se realizó un análisis de ANOVA (Tabla 4.36).

**Tabla 4.36:** Valores de  $p$  para los resultados de densitometría de las bandas proteicas obtenidas para el cultivar AGP Fast.

Banda proteica	$p$
5	<b>0,016</b>
13	<b>0,049</b>
16	<b>0,046</b>
10	0,248
HMW-GS	<b>0,001</b>

El valor HMW-GS se obtuvo de la sumatoria de todos los demás.

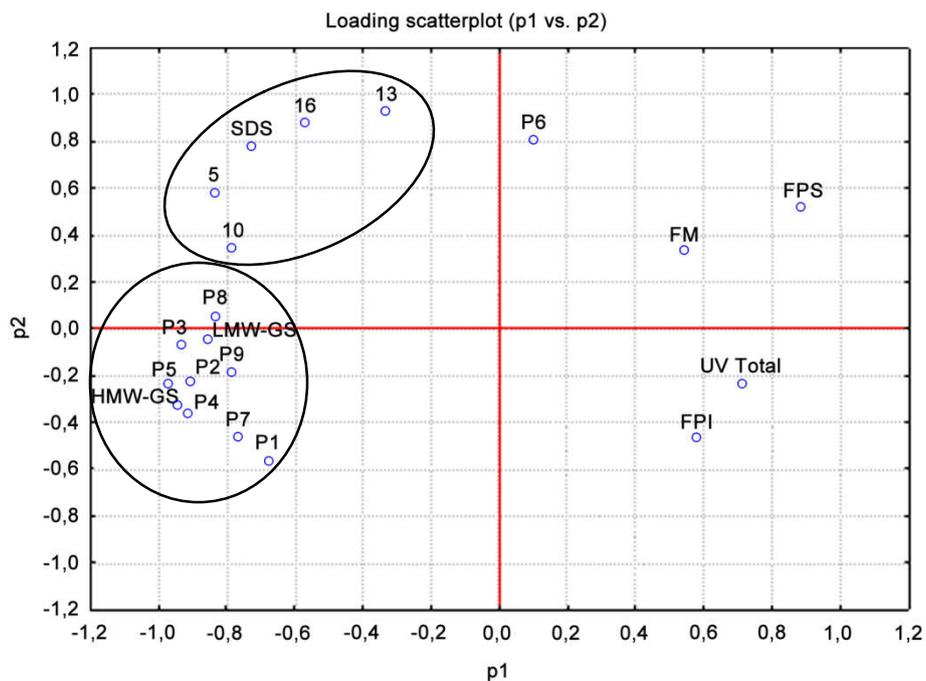
Este análisis arrojó que para las bandas estudiadas, el efecto del aislamiento produjo diferencias significativas en la señal de los mismos, excepto para la banda 10.

Para evaluar las diferentes fracciones proteicas de acuerdo a las diferentes técnicas utilizadas, se utilizó un análisis por PCA. Este análisis arrojó dos componentes que explicaron el 76% de la varianza (Tabla 4.37).

**Tabla 4.37:** Análisis de PCA para el cultivar AGP Fast de las fracciones proteicas obtenidas por espectrofotometría-UV, HPLC y SDS-PAGE.

<b>Componente</b>	<b>Eigenvalues</b>	<b>Varianza</b>	<b>Eigenvalue acumulado</b>	<b>Varianza acumulada</b>
1	11,05	58,15	11,04	58
2	3,36	17,71	14,41	76

En este análisis de PCA de las diferentes fracciones proteicas, se observa como las señales obtenidas por HPLC y SDS-PAGE se agrupan según la técnica de origen de los datos. Por otro lado, los valores obtenidos por espectrofotometría no mostraron una agrupación similar, aunque respondieron de igual manera en el componente 1 (Figura 4.11).



**Figura 4.11:** Representación gráfica de los componentes 1 y 2, obtenidos por PCA de las fracciones proteicas obtenidas por espectrofotometría-UV (FM, FPI, FPS y UV Total), HPLC (P1-P9, HMW-GS y LMW-GS) y SDS-PAGE (5, 10, 13, 16 y SDS) para el cultivar AGP Fast.

#### 4.2.3 - Análisis del cultivar Klein Tigre

Se realizó una matriz de correlación con los datos de densitometría obtenidos a por SDS-PAGE, que se muestra en la Tabla 4.38.

**Tabla 4.38:** Matriz de correlación de Pearson para los valores de densitometría obtenidos a partir de SDS-PAGE del cultivar Klein Tigre.

	5	7	9	10
5	-	0,63	0,64	-0,01
7	0,63	-	0,41	-0,40
9	0,64	0,41	-	0,47
10	-0,01	-0,40	0,47	-

5, 7, 9 y 10: Bandas de HMW-GS.

La matriz de correlación mostró que las bandas mostraron una tendencia positiva, a excepción de la banda 10.

A continuación se muestra la Tabla de la correlación de Pearson entre los valores de densidad obtenidos a partir de SDS-PAGE y los de las pruebas de agresividad y rendimiento (Tabla 4.39).

**Tabla 4.39:** Correlación de Pearson entre los valores de densidad de las bandas de SDS-PAGE y las variables de rendimiento y agresividad estudiadas para el cultivar Klein Tigre.

Banda proteica	Proteína total	Incidencia	Severidad	%GD	PMG	IF	ISK
5	-0,65	-0,26	-0,28	-0,30	-0,03	-0,06	-0,01
7	-0,02	-0,30	-0,38	-0,27	0,30	-0,31	-0,34
9	-0,69	-0,58	-0,02	-0,06	0,28	-0,31	-0,32
10	-0,26	-0,26	-0,13	-0,06	-0,04	-0,10	-0,09

%GD: porcentaje de grados dañados; PMG: peso de mil granos; IF: índice de *Fusarium*. ISK: índice de incidencia, severidad y granos dañados. Se marcan en negrita los valores significativos.

Al igual que con los cultivares anteriores, se observa una correlación negativa entre los resultados de SDS-PAGE con las variables de agresividad (Tabla 4.40).

**Tabla 4.40:** Valores de *p* para los resultados de densitometría de las bandas proteicas obtenidas para el cultivar Klein Tigre.

Banda proteica	<i>p</i>
5	<b>0,042</b>
7	0,643
9	<b>0,029</b>
10	0,568
HMW-GS	0,238

El valor HMW-GS se obtuvo de la sumatoria de todos los demás.

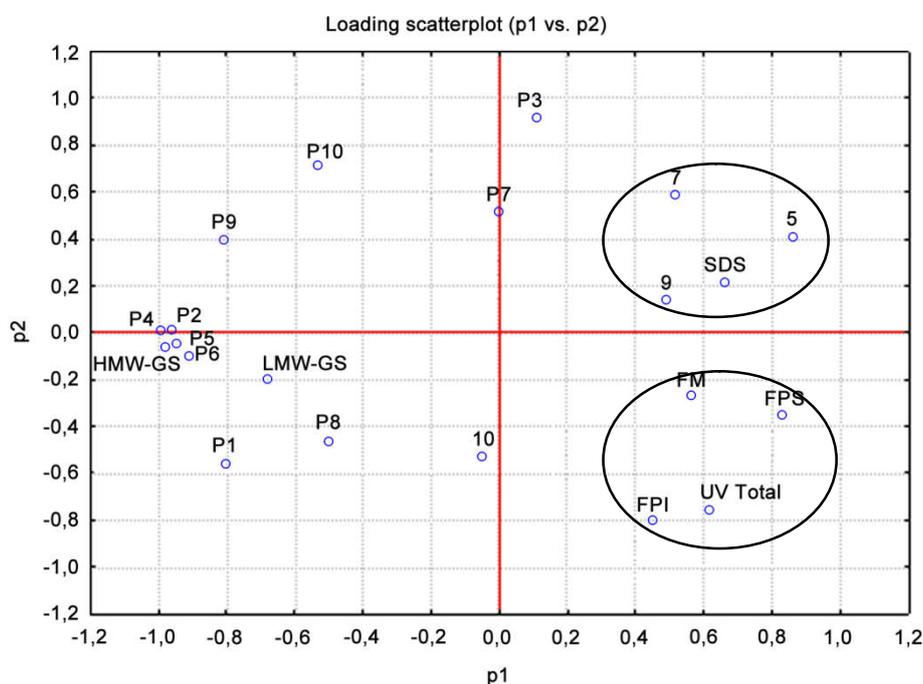
A partir del análisis de ANOVA se observó que hay un efecto significativo entre aislamientos para las señales de las bandas proteicas 5 y 9.

Para evaluar el comportamiento entre los diferentes tipos de proteínas de acuerdo a las técnicas ensayadas, se utilizó un análisis PCA que permitió explicar el 70,38% de la varianza. (Tabla 4.41).

**Tabla 4.41:** Análisis de PCA para el cultivar Klein Tigre de las fracciones proteicas obtenidas por espectrofotometría-UV, HPLC y SDS-PAGE.

Componente	Eigenvalues	Varianza	Eigenvalue acumulado	Varianza acumulada
1	10,17	48,42	10,17	48,42
2	4,61	21,96	14,78	70,39

En este análisis de PCA, se observa un agrupamiento de las variables de espectrofotometría-UV. De igual manera, la mayoría de los valores obtenidos a partir de SDS-PAGE también fueron agrupados en otro grupo, mientras que los valores de áreas obtenidos a partir de los cromatogramas por HPLC mostraron una distribución más dispersa (Figura 4.12).



**Figura 4.12:** Representación gráfica de los componentes 1 y 2, obtenidos por PCA de las fracciones proteicas obtenidas por espectrofotometría-UV (FM, FPI, FPS y UV Total), HPLC (P1-P10, HMW-GS y LMW-GS) y SDS-PAGE (5, 7, 9, 10 y SDS) para el cultivar Klein Tigre.

En resumen, los valores de densitometría obtenidos por SDS-PAGE entre bandas proteicas, mostraron una respuesta pareja frente a la enfermedad de acuerdo a la correlación estimada.

Se observó en el análisis de PCA, para la mayoría de las variables, un agrupamiento de acuerdo a la técnica de origen de los datos. Este tipo de análisis mostró ser una técnica fiable para observar el comportamiento de las diferentes fracciones proteicas frente a la enfermedad. Los antecedentes bibliográficos encontrados, versan sobre el estudio de los cambios proteicos totales, a diferencia del presente trabajo, donde se separan en el análisis los diversos tipos proteicos. Hernández Espinosa et al. (2013a) realizaron análisis de componentes principales para observar la dispersión de las combinaciones alélicas de las HMW-GS como conjunto, mientras que otros trabajos usaron esta técnica para observar la dispersión de cultivares respecto a parámetros de calidad de los mismos (Horvat et al. 2009, 2014).

Al igual que lo observado para HPLC, los resultados de SDS-PAGE mostraron correlaciones negativas con las variables de agresividad, coincidiendo con estudios previos donde se reportaba un efecto negativo de la infección sobre la fracción de gluteninas de alto peso molecular (Wang et al. 2005, Eggert et al. 2010; Horvat et al. 2014).

## **5 - Análisis de calidad de las harinas**

### **5.1 - Score de Payne**

La importancia del estudio y caracterización de la fracción proteica de las gluteninas de alto peso molecular, se refleja en los diversos estudios que han relacionado los alelos de esta fracción con un parámetro de calidad, a partir del cual se ha desarrollado un score de calidad basado en este perfil (Payne et al.1987). Este valor es de utilidad como indicador de la calidad del grano (Cornish et al. 2001; Park et al. 2003; Horvat et al. 2009). El cálculo del score para los cultivares analizados se muestra en la Tabla 4.42.

**Tabla 4.42:** Score de calidad para los cultivares de trigo obtenidos a partir de SDS-PAGE.

Cultivar	A1	Score A1	B1	Score B1	D1	Score D1	Score Total
SRM Nogal	nulo	1	7 + 8	3	5 + 10	4	8
Sy 100	nulo	1	6 + 8	1	5 + 10	4	6
BioINTA 2005	nulo	1	7 + 9	2	5 + 10	4	7
Sy 200	nulo	1	6 + 8	1	5 + 10	4	6
Buck Meteoro	1	3	7 + 8	3	5 + 10	4	10
BioINTA 1005	1	3	7 + 9	2	5 + 10	4	9
AGP Fast	nulo	1	13 + 16	3	5 + 10	4	8
Klein Tigre	nulo	1	7 + 9	2	5 + 10	4	7

La técnica de SDS-PAGE, nos permitió observar diferencias entre los diferentes tratamientos sobre el perfil proteico, de acuerdo a la variación de las señales. Para aproximar el efecto de la enfermedad sobre posibles cambios de calidad en las harinas estudiadas, se analizó la disminución de las señales correspondientes en bandas proteicas relevantes entre las muestras de mayor y menor severidad, de acuerdo al puntaje asignado en el score. Para lo cual, se calculó la variación en la señal de cada banda entre muestras con el mayor rango de severidad para cada caso. Los resultados se muestran en la Tabla 4.43.

**Tabla 4.43:** Variación en la señal proteica en SDS-PAGE de los cultivares de trigo.

SRM Nogal	nulo	5	7	8	10
Δ Señal	-	37,19%	48,58%	56,72%	53,47%
Sy 100	nulo	5	6	8	10
Δ Señal	-	37,76%	53,83%	55,79%	41,18%
BioINTA 2005	nulo	5	7	9	10
Δ Señal	-	29,58%	37,53%	50,62%	27,77%
Sy 200	nulo	5	6	8	10
Δ Señal	-	31,91%	47,48%	42,34%	35,86%
Buck Meteoro	1	5	7	8	10
Δ Señal	0,79%	13,53%	8,18%	15,26%	6,20%
BioINTA 1005	1	5	7	9	10
Δ Señal	46,73%	17,55%	42,13%	57,16%	39,17%
AGP Fast	nulo	5	13	16	10
Δ Señal	-	13,44%	23,72%	17,38%	21,66%
Klein Tigre	nulo	5	7	9	10
Δ Señal	-	25,67%	9,86%	40,32%	52,04%

En todos los cultivares de trigo se observó que para los tratamientos con mayor valor de severidad, las señales de las bandas proteicas analizadas perdieron intensidad. Por otro lado, el cultivar Buck Meteoro mostró ser el menos afectado al debilitamiento de las bandas resultante de la infección de acuerdo a los valores de severidad observados.

## 5.2 - Test de Zeleny

El método de sedimentación por ácido láctico, o test de zeleny resulta útil en análisis como el de esta Tesis, ya que permite aproximar la calidad panadera a partir de muestras pequeñas de harinas, y a su vez observar el eventual efecto de las infecciones. Los resultados se muestran en la Tabla 4.44. Para nuestro caso, los resultados obtenidos fueron erráticos, no presentando una tendencia clara entre la severidad de la infección, agresividad del aislamiento y el índice de sedimentación. De acuerdo a la bibliografía, los valores obtenidos resultaron considerablemente menores a valores de buena calidad (Shewry and Tatham 2000), aunque aquí debe considerarse una posible disminución en los valores, debido al efecto de la infección.

**Tabla 4.44:** Índice de sedimentación de Zeleny de los cultivares de trigo.

Cultivar	Media del índice de sedimentación	$\sigma$
SRM Nogal	12	4,24
Sy 100	20	1,41
BIOINTA 2005	17,5	0,71
Sy 200	17,33	5,69
Buck Meteoro	15,5	4,95
BIOINTA 1005	12	1,41
AGP Fast	11,5	3,54
Klein Tigre	9	2,00

$\sigma$ : desvío estándar.

## CONCLUSIONES

La determinación proteica estimada de acuerdo a la concentración de nitrógeno presente en las muestras con técnicas de rutina en el análisis del trigo, mostró que el valor cuantitativo proteico total no es afectado sustancialmente por el grado de

infección de los granos. A su vez se pudo observar una correlación inversamente proporcional entre contenido proteico y rendimiento.

La técnica de espectrofotometría-UV nos permitió la discriminación de distintas fracciones proteicas de manera sencilla y rápida así como un análisis semi-cuantitativo de su constitución. A partir de la relación porcentual entre los componentes, se determinó que la fracción FPI, la cual es rica en gluteninas de alto peso molecular, resultó ser la más abundante. Al analizar las diferencias halladas en las diferentes fracciones como producto de la enfermedad, se observó que la fracción FPS fue la que mostró diferencias significativas debido a la influencia del aislamiento, mientras que en las otras dos fracciones se encontraron diferencias significativas por el efecto del genotipo del cultivar.

La importancia de la caracterización de la fracción proteica de gluteninas, y en particular de las gluteninas de alto peso molecular, se basa en su elevada contribución a la calidad industrial de las harinas. Las técnicas analíticas empleadas en esta Tesis Doctoral para analizar la constitución cualitativa proteica fueron eficientes en la detección de cambios en las señales proteicas resultantes de los distintos grados de infección.

El análisis por HPLC permitió la obtención de perfiles proteicos o cromatogramas representativos de los cultivares analizados, así como el efecto de la infección. A partir del cálculo de las áreas de los respectivos picos proteicos en relación al diferencial grado de enfermedad, se determinó que las gluteninas son sensibles a la infección, pudiéndose observar que los valores de los picos decrecen a mayores niveles de severidad o incidencia. Además, la agresividad determinada en la selección los aislamientos, estuvo en relación a los cambios observados de acuerdo al valor de significancia obtenido. A partir del análisis de los componentes principales, se observó un comportamiento diferencial entre los valores correspondientes a las gluteninas de alto y bajo peso molecular, de acuerdo a la agrupación resultante.

El análisis proteico con SDS-PAGE, resultó una técnica útil tanto para la determinación de la huella proteica y posterior cálculo del score de calidad de los cultivares de trigo, como para el análisis del efecto de la infección a partir del debilitamiento de las señales.

El score calculado a partir de la presencia/ausencia de proteínas con diferente implicancia en la calidad del trigo, resulta un método rápido y sencillo. El cálculo de densidad de las bandas proteicas determinó cambios en relación al grado de infección, lo cual estaría relacionado con la pérdida de calidad.

# Perspectivas futuras

La calidad industrial de las harinas de trigo está relacionada con la composición cualitativa y cuantitativa de los componentes químicos o estructurales. Si bien la fracción de proteínas del gluten es decisiva en la calidad de las harinas, la fracción lipídica también está relacionada con los procesos de formación de la masa, siendo responsables de ciertas propiedades de cocción y organolépticas relacionadas con la estabilidad.

Dado los escasos antecedentes que existen sobre el efecto de la infección por *Fusarium* en la fracción lipídica del grano de trigo, y la importancia de su estudio en relación a la calidad de las harinas y productos elaborados, se proyecta continuar la presente investigación en la temática planteada. El tema de trabajo propuesto como becario postdoctoral es el siguiente: “Análisis de la composición química y cambio de calidad en harinas de trigo infectadas por *Fusarium graminearum*.”

La investigación propuesta se llevará a cabo en colaboración con la estación experimental del INTA Marcos Juárez, donde se realizarán los ensayos de trigo a campo, con el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Métodos Analíticos (LIDMA) de la facultad de ciencias exactas de la UNLP, donde se realizarán las detecciones lipídicas empleando cromatografía gaseosa – masa (GC-EI-MS), y con el Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, de la UBA, donde se realizarán análisis complementarios de contaminación con micotoxinas empleando un GC-Masa.

# Bibliografía

- Akinsanmi, Olufemi A., David A. Backhouse, Steven R. Simpfendorfer, and Sukumar Chakraborty. 2008. "Mycelial Compatibility Reactions of Australian *Fusarium Graminearum* and *F. Pseudograminearum* Isolates Compared with AFLP Groupings." *Plant Pathology* 57: 251–61.
- Akinsanmi, Olufemi A., Vivek Mitter, Steven R. Simpfendorfer, David A. Backhouse, and Sukumar Chakraborty. 2004. "Identity and Pathogenicity of *Fusarium* Spp. Isolated from Wheat Fields in Queensland and Northern New South Wales." *Australian Journal of Agricultural Research* 55 (1): 97–107. doi:10.1071/AR03090.
- Alberione, Enrique Javier, Leonel Maximiliano Ortega, Nicolas Salines, Andrea Luciana Astoreca, and Teresa María Alconada Magliano. 2016. "Genetic Behavior of Different Wheat Genotypes against *Fusarium Graminearum*." *Agrociencia* 50 (3): 335–46.
- Alexander, N. J., Robert H. Proctor, S. P. McCormick, and R. D. Plattner. 1997. "Generic and Molecular Aspects of the Biosynthesis of Trichothecenes by *Fusarium*." *Cereal Research Communications* 25: 315–320.
- Alvarez, Cora Lilia, Mariela Pamela Azcarate, and Virginia E. Fernández Pinto. 2009. "Toxicogenic Potential of *Fusarium Graminearum* Sensu Stricto Isolates from Wheat in Argentina." *International Journal of Food Microbiology* 135 (2): 131–35. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.037.
- Alvarez, Cora Lilia, Stefania Somma, Antonio Moretti, and Virginia E. Fernández Pinto. 2010. "Aggressiveness of *Fusarium Graminearum* Sensu Stricto Isolates in Wheat Kernels in Argentina." *Journal of Phytopathology* 158 (3). Blackwell Publishing Ltd: 173–81. doi:10.1111/j.1439-0434.2009.01596.x.
- Alvarez, Cora Lilia, Stefania Somma, Robert H. Proctor, Gaetano Stea, Giuseppina Mulè, Antonio Francesco Rancesco Logrieco, Virginia E. Fernández Pinto, and Antonio Moretti. 2011. "Genetic Diversity in *Fusarium Graminearum* from a Major Wheat-Producing Region of Argentina." *Toxins* 3: 1294–1309.

<http://www.mdpi.com/2072-6651/3/10/1294/htm>.

- Andersen, A. L. 1948. "The Development Of Gibberella-Zeae Headblight Of Wheat." *Phytopathology* 38 (8): 595–611.
- Annone, J. G. 2003. "Particularidades Del Control Químico de La FET." In *Seminario: Problemas Asociados a La Fusariosis En Trigo Y Estrategias Para Su Prevención*, 3–4. Bolsa de Cereales de Buenos Aires.
- Antoine, C., V. Lullien-Pellerin, J. Abecassis, and X. Rouau. 2002. "Nutritional Interest of the Wheat Seed Aleurone Layer." *Sciences Des Aliments* 22: 545–56.
- Ao, Z., and J. I. Jane. 2007. "Characterization and Modeling of the A- and B-Granule Starches of Wheat, Triticale, and Barley." *Carbohydrate Polymers* 67: 46–55.
- Aoki, Takayuki, Todd J. Ward, Harold Corby Kistler, and Kerry O'Donnell. 2012. "Systematics, Phylogeny and Trichothecene Mycotoxin Potential of Fusarium Head Blight Cereal Pathogens." *Mycotoxins* 62: 91–102.
- Approved Methods of the AACC*. 2000. St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists (AACC).
- Arfvidsson, C., K. G. Wahlund, and A. C. Eliasson. 2004. "Direct Molecular Weight Determination in the Evaluation of Dissolution Methods for Unreduced Glutenin." *Journal of Cereal Science* 39 (1): 1–8.
- Astolfi, P., Juliano dos Santos, Luana E. Schneider, Larissa B. Gomes, Cleilton N. Silva, Dauri José Tessmann, and Emerson Medeiros Del Ponte. 2011. "Molecular Survey of Trichothecene Genotypes of Fusarium Graminearum Species Complex from Barley in Southern Brazil." *International Journal of Food Microbiology* 148 (3): 197–201. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.019.
- Astolfi, P., María Marta Reynoso, María Laura Ramírez, Sofía Noemí Chulze, Tatiane Cristina Albuquerque Alves, Dauri José Tessmann, and Emerson Medeiros Del Ponte. 2012. "Genetic Population Structure and Trichothecene Genotypes of Fusarium Graminearum Isolated from Wheat in Southern Brazil." *Plant Pathology* 61 (2). Blackwell Publishing Ltd: 289–95. doi:10.1111/j.1365-

3059.2011.02515.x.

- Bai, Guihua, Ronald D. Plattner, Anne E. Desjardins, F. Kolb, and R. A. McIntosh. 2001. "Resistance to Fusarium Head Blight and Deoxynivalenol Accumulation in Wheat." *Plant Breeding* 120 (1): 1–6.
- Bai, Guihua, and Gregory Shaner. 2004. "Management and Resistance in Wheat and Barley to Fusarium Head Blight." *Annual Review of Phytopathology* 42: 135–61.
- Barneix, Atilio J. 2007. "Physiology and Biochemistry of Source-Regulated Protein Accumulation in the Wheat Grain." *Journal of Plant Physiology* 164 (5): 581–90. doi:10.1016/j.jplph.2006.03.009.
- Belton, P. S. 2005. "New Approaches to Study the Molecular Basis of the Mechanical Properties of Gluten." *Journal of Cereal Science* 41 (2): 203–211.
- Beyer, Marco, Friederike Pogoda, Marine Pallez, Joëlle Lazic, Lucien Hoffmann, and Matias Pasquali. 2014. "Evidence for a Reversible Drought Induced Shift in the Species Composition of Mycotoxin Producing Fusarium Head Blight Pathogens Isolated from Symptomatic Wheat Heads." *International Journal of Food Microbiology* 182: 51–56.
- Boutigny, Anne-Laure, Todd J. Ward, Nicolas Ballois, Gabriela Iancu, and Renaud Iloos. 2014. "Diversity of the Fusarium Graminearum Species Complex on French Cereals." *European Journal of Plant Pathology* 138 (1). Springer Netherlands: 133–48. doi:10.1007/s10658-013-0312-6.
- Boutigny, Anne-Laure, Todd J. Ward, G. J. Van Coller, B. Flett, S. C. Lamprecht, Kerry O'Donnell, and A. Viljoen. 2011. "Analysis of the Fusariumgraminearum Species Complex from Wheat, Barley and Maize in South Africa Provides Evidence of Species-Specific Differences in Host Preference." *Fungal Genetics and Biology* 48 (9): 914–20.
- Brzozowski, Bartosz, Karolina Dawidziuk, and Włodzimierz Bednarski. 2008. "Gliadin Degradation by Proteases of Fusarium Genus Fungi in Different in Vivo and in Vitro Conditions." *Polish Journal of Natural Science* 23 (1): 188–206. doi:10.2478/v10020-008-0014-2.

- Burgess, L. W., Brett A. Summerell, S. Bullock, K. P. Gott, and D. Backhouse. 1994. *Laboratory Manual for Fusarium Research*. 3rd ed. Sydney: University of Sydney.
- Burlakoti, Rishi Ram, Stephen M Neate, Tika B. Adhikari, Sanjaya Gyawali, Bacilio Salas, Brian J. Steffenson, and Paul B. Schwarz. 2011. "Trichothecene Profiling and Population Genetic Analysis of *Gibberella Zeae* from Barley in North Dakota and Minnesota." *Phytopathology* 101 (6): 687–95. doi:10.1094/PHYTO-04-10-0101.
- Bushnell, W. R., B. E. Hazen, and Clara Pritsch. 2003. "Histology and Physiology of *Fusarium* Head Blight." In *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*, edited by K. J. Leonard and W. R. Bushnell, 44–83. St. Paul: APS Press.
- Campbell, Grant M., Chaoying Fang, and I. I. Muhamad. 2007. "On Predicting Roller Milling Performance VI: Effect of Kernel Hardness and Shape on the Particle Size Distribution from First Break Milling of Wheat." *Food and Bioproducts Processing* 85 (1): 7–23.
- Capouchová, Ivana, Ludmila Papoušková, Marta Kostelanská, Evženie Prokinová, Alena Škeříková, Jana Hajšlová, Petr Konvalina, and Oldřich Faměra. 2012. "Effect of Different Intensities of *Fusarium* Infestation on Grain Yield, Deoxynivalenol Content and Baking Quality of Winter Wheat." *Romanian Agricultural Research* 29: 297–306.
- Carlisle, D. J., L. R. Cooke, S. Watson, and A. E. Brown. 2002. "Foliar Aggressiveness of Northern Ireland Isolates of *Phytophthora Infestans* on Detached Leaflets of Three Potato Cultivars." *Plant Pathology* 51 (4): 424–34.
- Carter, Jon P., H. N. Rezanoor, D. Holden, Anne E. Desjardins, Ronald D. Plattner, and Paul C. Nicholson. 2002. "Variation in Pathogenicity Associated with the Genetic Diversity of *Fusarium Graminearum*." *European Journal of Plant Pathology* 108 (6): 573–83.
- Castañares, Eliana, Diana Ramirez Albuquerque, María Inés Dinolfo, Virginia E. Fernández Pinto, Andrea Patriarca, and Sebastián Alberto Stenglein. 2014. "Trichothecene Genotypes and Production Profiles of *Fusarium Graminearum* Isolates Obtained from Barley Cultivated in Argentina." *International Journal of*

*Food Microbiology* 179: 57–63. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.024.

Caten, C. E., C. Person, J. V. Groth, and S. J. Dhahi. 1984. “The Genetics of Pathogenic Aggressiveness in Three Dikaryons of *Ustilago Hordei*.” *Canadian Journal of Botany* 62 (6): 1209–19.

Chandler, Elizabeth A, Duncan R Simpson, Martha A Thomsett, and Paul Nicholson. 2003. “Development of PCR Assays to Tri7 and Tri13 Trichothecene Biosynthetic Genes , and Characterisation of Chemotypes of *Fusarium Graminearum* , *Fusarium Culmorum* and *Fusarium Cerealis*.” *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62: 355–67. doi:10.1016/S0885-5765(03)00092-4.

Chen, Li-Feng, Y. Song, and Y. Xu. 1995. “In the Concentrations of Deoxynivalenol in the Spikes of Winter Wheat Infected by *Fusarium Graminearum* Schw.” *Acta Phytopathologica Sinica* 26 (1): 25–28.

Cornish, G.B., F. Békés, H.M. Allen, and D.J. Martin. 2001. “Flour Proteins Linked to Quality Traits in an Australian Doubled Haploid Wheat Population.” *Australian Journal of Agricultural Research* 52: 1339–48. doi:Doi 10.1071/Ar01060.

Cowger, Christina, Jennifer Patton-Ozkurt, Gina Brown-Guedira, and Leandro Perugini. 2009. “Post-Anthesis Moisture Increased *Fusarium* Head Blight and Deoxynivalenol Levels in North Carolina Winter Wheat.” *Phytopathology* 99 (4): 320–27. doi:10.1094/PHYTO-99-4-0320.

Cumagun, C. J. R., Robert L. Bowden, J. E. Jurgenson, John F. Leslie, and Thomas Miedaner. 2004. “Genetic Mapping of Pathogenicity and Aggressiveness of *Gibberella Zeae* (*Fusarium Graminearum*) toward Wheat.” *Phytopathology* 94 (5): 520–26.

Cumagun, C. J. R., and Thomas Miedaner. 2004. “Segregation for Aggressiveness and Deoxynivalenol Production of a Population of *Gibberella Zeae* Causing Head Blight of Wheat.” *European Journal of Plant Pathology* 110 (8): 789–99.

Cuniberti, Martha B. 2003. “Sistema de Clasificación de Variedades En Grupos de Calidad.” *AAPROTRIGO. INTA Marcos Juárez. Argentina*. INTA Marcos Juárez. Argentina.

Cuniberti, Martha B. 2004. “Propuesta de Clasificación Del Trigo Argentino.” *Revista*

*IDIA-INTA* 6: 21–25.

- D'Ovidio, Renato, and Stefania Masci. 2004. "The Low-Molecular-Weight Glutenin Subunits of Wheat Gluten." *Journal of Cereal Science* 39 (3): 321–39. doi:10.1016/j.jcs.2003.12.002.
- Dalcerio, A., Adriana Mabel Torres, M. Etcheverry, Sofía Noemí Chulze, and E. Varsavsky. 1997. "Occurrence of Deoxynivalenol and Fusarium Graminearum in Argentinian Wheat." *Food Additives and Contaminants* 14 (1): 11–14.
- Daniel, Catherine, and E. Triboui. 2000. "Effects of Temperature and Nitrogen Nutrition on the Grain Composition of Winter Wheat: Effects on Gliadin Content and Composition." *Journal of Cereal Science* 32 (1): 45–56.
- Davari, Mahdi, S. H. Wei, A. Babay-Ahari, M. Arzanlou, Cees Waalwijk, Theo A. J. van der Lee, R. Zare, A. H. G. Gerrits van den Ende, G.S. de Hoog, and A. D. van Diepeningen. 2013. "Geographic Differences in Trichothecene Chemotypes of Fusarium Graminearum in the Northwest and North of Iran." *World Mycotoxin Journal* 6: 137–150.
- De La Olán, Micaela, Eduardo Espitia Rangel, Héctor Eduardo Villaseñor Mir, José Domingo Molina Galán, Higinio López Sánchez, Amalio Santacruz Varela, and Roberto Javier Peña Bautista. 2010. "Proteínas Del Gluten Y Reología de Trigos Harineros Mexicanos Infueciados Por Factores Ambientales Y Genotípicos." *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 45 (9): 989–96. doi:10.1590/S0100-204X2010000900008.
- Del Ponte, Emerson Medeiros, J. M. C. Fernandes, C. R. Pierobom, and G. C. Bergstrom. 2004. "Giberela Do Trigo—aspectos Epidemiológicos E Modelos de Previsão." *Fitopatologia Brasileira* 29 (6): 587–605.
- Desjardins, Anne E. 2006. *Fusarium Mycotoxins. Chemistry, Genetics, and Biology*. St. Paul, Minnesota, USA: APS Press.
- Desjardins, Anne E., G. Manandhar, Ronald D. Plattner, C. M. Maragos, K. Shrestha, and S. P. McCormick. 2000. "Occurrence of Fusarium Species and Mycotoxins in Nepalese Maize and Wheat and the Effect of Traditional Processing Methods on Mycotoxin Levels." *Journal of Agricultural and Food*

*Chemistry* 48 (4): 1377–83.

Desjardins, Anne E., Ronald D. Plattner, and Robert H. Proctor. 1996. "Linkage among Genes Responsible for Fumonisin Biosynthesis in *Gibberella fujikuroi* Mating Population A." *Applied and Environmental Microbiology* 62 (7): 2571–76.

Dexter, James E., Randall M. Clear, and Ken R. Preston. 1996. "Fusarium Head Blight: Effect on the Milling and Baking of Some Canadian Wheats." *Cereal Chemistry* 73 (6): 695–701.

Dimitri, Milán J. 1978. "Familia Gramíneas." In *Enciclopedia Argentina de Agricultura Y Jardinería*, 3rd ed., 145–49.

Don, C., G. Mann, F. Bekes, and R. J. Hamer. 2006. "HMW-GS Affect the Properties of Glutenin Particles in GMP and Thus Flour Quality." *Journal of Cereal Science* 44: 127–136.

DuPont, Frances M., and Susan B Altenbach. 2003. "Molecular and Biochemical Impacts of Environmental Factors on Wheat Grain Development and Protein Synthesis." *Journal of Cereal Science* 38: 133–46.

DuPont, Frances M., Ronald Chan, Rocio Lopez, and William H. Vensel. 2005. "Sequential Extraction and Quantitative Recovery of Gliadins, Glutenins, and Other Proteins from Small Samples of Wheat Flour." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (5). American Chemical Society: 1575–1584. doi:10.1021/JF048697L.

Dvojkovic, Krešimir, Georg Drezner, Daniela I. Horvat, D. Novoselovic, and Valentina Spanic. 2007. "Fusarium Head Blight Influence on Agronomic and Quality Traits of Winter Wheat Cultivars." *Cereal Research Communications* 35 (2): 365–68.

Eggert, Kai, Herbert Wieser, and Elke Pawelzik. 2010. "The Influence of Fusarium Infection and Growing Location on the Quantitative Protein Composition of (Part I) Emmer (*Triticum dicoccum*)." *European Food Research and Technology* 230 (6). Springer-Verlag: 837–47. doi:10.1007/s00217-010-1229-3.

Erlanger, K. Y., Thomas Miedaner, B. Schneider, and Hartwig H. Geiger. 2003.

- “Deoxynivalenol (DON) Content and Fusarium Head Blight Resistance in Segregating Populations of Winter Rye and Winter Wheat.” *Crop Science* 43 (2): 519–26.
- Espitia Rangel, E., J. Huerta Espino, A. Limón Ortega, R. J. Peña Bautista, and H. E. Villaseñor Mir. 2003. “Calidad Industrial de Trigos Harineros Mexicanos Para Temporal. I. Comparación de Variedades Y Causas de La Variación.” *Revista de Fitotecnia Mexicana*.
- Evans, L. E., and W. J. Peacock. 1981. *Wheat Science. Today and Tomorrow*. Cambridge University Press.
- Færgestad, E. M., K. M. Tronsmo, A. Aamodt, F. Bjerke, E. M. Magnus, G. Dingstad, and P. Baardseth. 2004. “The Effect of Protein Size Distribution and Dough Rheology on Hearth Bread Characteristics Baked at Different Processes and Scales.” *Journal of Food Sciences* 69: 524–35.
- FAO. 2003. “Worldwide Regulations for Mycotoxins in Food and Feed.” In 2003. *FAO Food and Nutrition Paper No. 81. Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO. 2015. <http://www.fao.org/publications/soco/2015/es/>.
- Gale, Liane Rosewich, Todd J. Ward, Virgilio Balas, and Harold Corby Kistler. 2003. “Population Subdivision in *Fusarium Graminearum* Lineage 7 in the U.S. Is Correlated with Toxin Chemotype.” *Fungal Genetics Newsletter* 50: 145.
- Galich, A. N., and M. T. V. Galich. 1996. “Enfermedades Del Trigo En El Área Central Norte de La Región Cerealera Argentina.”
- Galich, M. T. V. 1997. “Fusarium Head Blight in Argentina.” In *Fusarium Head Scab: Global Status and Future Prospects*, edited by H. J. Dubin, J. Gilchrist, and A. Reeves and Mc Nab. CIMMYT.
- Galich, M. T. V. 2004. “Fusariosis de La Espiga Del Trigo. Desarrollo de Cultivares Resistentes.” *IDIA* 21 (6): 50–51.
- Gerlach, Wolfgang, and Helgard Nirenberg. 1982. “The Genus *Fusarium* –a Pictorial

Atlas." *Mitteilungen Aus Der Biologischen Bundesanstalt Fur Land-Und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem* 209: 1–406.

Gianibelli, María Cristina, Oscar R. Larroque, Finlay MacRitchie, and Colin W. Wrigley. 2001. "Biochemical, Genetic, and Molecular Characterization of Wheat Glutenin and Its Component Subunits." *Cereal Chemistry* 78 (6): 635–46. doi:10.1094/CCHEM.2001.78.6.635.

Gilbert, Jeannie A., D. Abramson, Brent D. McCallum, and Randall M. Clear. 2001. "Comparison of Canadian *Fusarium Graminearum* Isolates for Aggressiveness, Vegetative Compatibility, and Production of Ergosterol and Mycotoxins." *Mycopathologia* 153: 209–15.

Gilbert, Jeannie A., and S. M. Woods. 2006. "Strategies and Considerations for Multi-Location FHB Screening Nurseries." *The Global Fusarium Initiative for International Collaboration: A Strategic Planning Workshop Held at CIMMYT, El Batan, Mexico, March 14-17, 2006*, no. Figure 2: 93–102.

Goswami, Rubella S., and Harold Corby Kistler. 2004. "Heading for Disaster: *Fusarium Graminearum* on Cereal Crops." *Molecular Plant Pathology* 5 (6): 515–25.

Gourdain, Emmanuelle, and Prune Rosengarten. 2011. "Effects of Infection Time by *Fusarium Graminearum* on Ear Blight, Deoxynivalenol and Zearalenone Production in Wheat." *Plant Breeding and Seed Science* 63 (1): 67–75. doi:10.2478/v10129-011-0017-y.

Gras, P. W., R. S. Anderssen, M. Keentok, Frank Békés, and Rudi Appels. 2001. "Gluten Protein Functionality in Wheat Flour Processing: A Review." *Australian Journal of Agricultural Research* 52: 1311–23.

Guarda, Giovanni, Silvano Padovan, and Giovanni Delogu. 2004. "Grain Yield, Nitrogen-Use Efficiency and Baking Quality of Old and Modern Italian Bread-Wheat Cultivars Grown at Different Nitrogen Levels." *European Journal of Agronomy* 21 (2): 181–92. doi:10.1016/j.eja.2003.08.001.

Guo, X. W., W. G. Dilantha Fernando, and H. Y. Seow-Brock. 2008. "Population Structure, Chemotype Diversity, and Potential Chemotype Shifting of *Fusarium*

- Graminearum in Wheat Fields of Manitoba.” *Plant Disease* 92 (5). The American Phytopathological Society: 756–62. doi:10.1094/PDIS-92-5-0756.
- Hamauzu, Zen Ichiro, Tetsuo Toyomasu, and Daizo Yonezawa. 1974. “Molecular Weight Determination of Gliadin Fractions in Gel Filtration by SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Sedimentation Equilibrium.” *Agricultural and Biological Chemistry* 38 (12): 2445–50.
- Hart, P., and O. Schabenberger. 2001. “Early Detection of Deoxynivalenol in Wheat Grain.” In *National Fusarium Head Blight Forum Proceedings*, 164–67.
- Hawthorne, B. T., R. D. Ball, and J. Rees-George. 1994. “Genetic Analysis of Variation of Pathogenicity in *Nectria Haematococca* (*Fusarium Solani*) on *Cucurbita* Sp.” *Mycological Research* 98 (10): 1183–91.
- He, Zhong Hu, Li Ya Liu, Xian Chun Xia, Jian Jun Liu, and Roberto Javier Peña Bautista. 2005. “Composition of HMW and LMW Glutenin Subunits and Their Effects on Dough Properties, Pan Bread, and Noodle Quality of Chinese Bread Wheats.” *Cereal Chemistry* 82 (4): 345–50.
- Hernández Espinosa, Nayelli, Gabriel Posadas Romano, Fausto Cervantes López, Hector I. Gonzalez Santoyo, Amalio Santacruz Varela, Ignacio Benítez Riquelme, and Roberto J. Pena Bautista. 2013. “Protein Fraction Distribution and Their Contribution To Quality Characteristics in Wheat.” *Revista Fitotecnia Mexicana* 36 (2): 137–45.
- Hernández Espinosa, Nayelli, Gabriel Posadas Romano, Fausto Cervantes López, Héctor I. González Santoyo, Amalio Santacruz Varela, Ignacio Benítez Riquelme, and Roberto Javier Peña Bautista. 2013. “Contribución de Combinaciones de Gluteninas a Las Características Del Gluten En Poblaciones Recombinantes de Trigo.” *Revista de Fitotecnia Mexicana* 36 (1): 45–51.
- Hernandez Nopsa, John Fredy. 2010. “Fusarium Head Blight: Winter Wheat Cultivar Responses and Characterization of Pathogen Isolates.” In .
- Homdork, S., H. Fehrmann, and R. Beck. 2000. “Effects of Field Application of Tebuconazole on Yield, Yield Components and the Mycotoxin Content of

- Fusarium-Infected Wheat Grain." *Journal of Phytopathology* 148 (1): 1–6.
- Horvat, Daniela I., Želimir Kurtanjek, Georg Drezner, Gordana Šimić, and Damir Magdić. 2009. "Effect of HMM Glutenin Subunits on Wheat Quality Attributes." *Food Technology and Biotechnology* 47 (3): 253–59.
- Horvat, Daniela I., Valentina Spanic, Krešimir Dvojkovic, Gordana H. Simic, Damir N. Magdic, and A. Nevistic. 2014. "The Influence of Fusarium Infection on Wheat ( *Triticum Aestivum* L.) Proteins Distribution and Baking Quality." *Cereal Research Communications* 43 (1). Akadémiai Kiadó: 61–71. doi:10.1556/CRC.2014.0023.
- Hoseney, R. Carl. 1991. *Principios de Ciencia Y Tecnología de Los Cereales*. Edited by Acribia.
- "International Organization for Standardization." 2013.
- Jennings, Philip A., M. E. Coates, Kathryn V. Walsh, Judith A. Turner, and Paul C. Nicholson. 2004. "Determination of Deoxynivalenol- and Nivalenol-Producing Chemotypes of *Fusarium Graminearum* Isolated from Wheat Crops in England and Wales." *Plant Pathology* 53 (5): 643–52. doi:10.1111/j.1365-3059.2004.01061.x.
- Kamal, Abu Hena Mostafa, Ki-Hyun Kim, Kwang-Hyun Shin, Hyung-Seok Seo, Hisashi Tsujimoto, Hwa-Young Heo, Jong-Soon Choi, Chul-Soo Park, and Sun-Hee Woo. 2009. "Diversity of Novel Glutenin Subunits in Bread Wheat (*Triticum Aestivum* L.)." *Journal of Plant Biology* 52 (6): 533–42.
- Kang, Z., and H. Buchenauer. 2000. "Ultrastructural and Cytochemical Studies on Cellulose, Xylan and Pectin Degradation in Wheat Spikes Infected by *Fusarium Culmorum*." *Journal of Phytopathology* 148 (5): 263–75.
- Kang, Z., I. Zingen-Sell, and H. Buchenauer. 2005. "Infection of Wheat Spikes by *Fusarium Avenaceum* and Alterations of Cell Wall Components in the Infected Tissue." *European Journal of Plant Pathology* 111 (1): 19–28.
- Karugia, G. W., H. Suga, L. R. Gale, T. Nakajima, K. Tomimura, and M. Hyakumachi. 2009. "Population Structure of the *Fusarium Graminearum* Species Complex from a Single Japanese Wheat Field Sampled in Two

- Consecutive Years.” *Plant Disease* 93 (2): 170–74.
- Khatkar, Bhupendar S., and J. David Schofield. 2002a. “Dynamic Rheology of Wheat Flour Dough. I. Non-Linear Viscoelastic Behaviour.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82 (8): 827–29.
- Khatkar, Bhupendar S., and J. David Schofield. 2002b. “Dynamic Rheology of Wheat Flour Dough. II. Assessment of Dough Strength and Breadmaking Quality.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82 (8): 823–26.
- Kibite, Solomon, and L. E. Evans. 1984. “Causes of Negative Correlations between Grain Yield and Grain Protein Concentration in Common Wheat.” *Euphytica* 33 (3): 801–10. doi:10.1007/BF00021906.
- Kikot, Gisele Eleonora. 2012. “Caracterización Bioquímica, Fenotípica Y Molecular de Aislamientos de *Fusarium Graminearum* Provenientes de La Región Pampeana En Relación a La Patogenicidad.” UNLP.
- Kikot, Gisele Eleonora, Roque Alberto Hours, and Teresa María Alconada Magliano. 2009. “Contribution of Cell Wall Degrading Enzymes to Pathogenesis of *Fusarium Graminearum*: A Review.” *Journal of Basic Microbiology* 49 (3): 231–41.
- Kohli, M. M. 1989. “Análisis de La Fusariosis Del Trigo En El Cono Sur.” In *Taller Sobre La Fusariosis de La Espiga En América Del Sur.*, edited by M. M. Kohli, 1–6. Asunción, Paraguay: CIMMYT.
- Kugler, W. F., and E. F. Godoy. 1964. “Cereales Mayores.” In *Enciclopedia Argentina de Agricultura Y Jardinería*. Buenos Aires: Editorial ACME SACI.
- Laemmli, U. K. 1970. “Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.” *Nature* 227: 680–85.
- Larroque, Oscar R., María Cristina Gianibelli, M. Gomez Sanchez, and Finlay MacRitchie. 2000. “Procedure for Obtaining Stable Protein Extracts of Cereal Flour and Whole Meal for Size-Exclusion Hplc Analysis.” *Cereal Chemistry* 77 (4): 448–50. doi:10.1094/CCHEM.2000.77.4.448.
- Larsen, John Christian, J. Hunt, I. Perrin, and P. Ruckenbauer. 2004. “Workshop on

- Trichothecenes with a Focus on DON: Summary Report.” *Toxicology Letters* 153 (1): 1–22.
- Lauren, D. R., and W. A. Smith. 2001. “Stability of the Fusarium Mycotoxins Nivalenol, Deoxynivalenol and Zearalenone in Ground Maize under Typical Cooking Environments.” *Food Additives and Contaminants* 18 (11): 1011–16.
- Leslie, John F., Laurel L. Anderson, Robert L. Bowden, and Yin-Won Lee. 2007. “Inter- and Intra-Specific Genetic Variation in Fusarium.” *International Journal of Food Microbiology* 119 (1): 25–32. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.059.
- Leslie, John F., and Brett A. Summerell. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Backwell Publishing.
- Liu, Z. H., H. Y. Wang, X. E. Wang, G. P. Zhang, P. D. Chen, and D. J. Liu. 2006. “Genotypic and Spike Positional Difference in Grain Phytase Activity, Phytate, Inorganic Phosphorus, Iron, and Zinc Contents in Wheat (*Triticum Aestivum* L.).” *Journal of Cereal Science* 44: 212–219.
- Liyana-Pathirana, Chandrika M., and Fereidoon Shahidi. 2007. “Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of Whole Wheat and Milling Fractions.” *Food Chemistry* 101: 1151–57.
- Lori, Gladys A., Marina Noemí Sisterna, Miriam Haidukowski, and Inés Rizzo. 2003. “Fusarium Graminearum and Deoxynivalenol Contamination in the Durum Wheat Area of Argentina.” *Microbiological Research* 158: 29–35. doi:10.1078/0944-5013-00173.
- Lori, Gladys A., Marina Noemí Sisterna, Santiago Javier Sarandón, Inés Rizzo, and Hugo Oscar Chidichimo. 2009. “Fusarium Head Blight in Wheat: Impact of Tillage and Other Agronomic Practices under Natural Infection.” *Crop Protection* 28 (6): 495–502. doi:10.1016/j.cropro.2009.01.012.
- Mabille, F., J. Gril, and J. Abecassis. 2001. “Mechanical Properties of Wheat Seed Coats.” *Cereal Chemistry* 78 (3): 231–35.
- MacRitchie, F., D. L. Du Cros, and C. W. Wrigley. 1990. “Flour Polypeptides Related to Wheat Quality.” In *Advances in Cereal Science and Technology*, edited by Y. Pomeranz, 79–145. American Association of Cereal Chemists.

- Malbrán, Ismael, Cecilia A. Mourellos, Juan R. Girotti, Mónica B. Aulicino, Pedro Alberto Balatti, and Gladys A. Lori. 2012. "Aggressiveness Variation of *Fusarium Graminearum* Isolates from Argentina Following Point Inoculation of Field Grown Wheat Spikes." *Crop Protection* 42: 234–43. doi:10.1016/j.cropro.2012.05.025.
- Malbrán, Ismael, Cecilia A. Mourellos, Juan R. Girotti, Pedro Alberto Balatti, and Gladys A. Lori. 2014. "Toxicogenic Capacity and Trichothecene Production by *Fusarium Graminearum* Isolates from Argentina and Their Relationship with Aggressiveness and Fungal Expansion in the Wheat Spike." *Phytopathology* 104 (4): 357–64. doi:10.1094/PHYTO-06-13-0172-R.
- Matz, S. 1999. *Bakery Technology and Engineering*. Edited by S. Matz. PanTech International.
- McMullen, Marcia P., Roger K. Jones, and D. Gallemborg. 1997. "Scab of Wheat and Barley: A Re-Emerging Disease of Devastating Impact." *Plant Disease* 81: 1340–48.
- Mesterházy, Ákos. 1995. "Types and Components of Resistance to *Fusarium* Head Blight of Wheat." *Plant Breeding* 114 (5): 377–86. doi:10.1111/j.1439-0523.1995.tb00816.x.
- Mesterházy, Ákos. 2002. "Role of Deoxynivalenol in Aggressiveness of *Fusarium Graminearum* and *F. Culmorum* and in Resistance to *Fusarium* Head Blight." In *Mycotoxins in Plant Disease*, edited by Antonio Francesco Rancesco Logrieco, L. Corazza, and B. Mike Cooke, 675–84. Springer Netherlands.
- Mesterházy, Ákos, Tibor Bartók, C. G. Mirocha, and R. Komoróczy. 1999. "Nature of Wheat Resistance to *Fusarium* Head Blight and the Role of Deocynivalenol for Breeding." *Plant Breeding* 118: 97–110.
- Miedaner, Thomas, B. Schneider, and Hartwig H. Geiger. 2003. "Deoxynivalenol (Don) Content and *Fusarium* Head Blight Resistance in Segregating Populations of Winter Rye and Winter Wheat." *Crop Science* 43: 519–526.
- Milus, E. A., E. Seyran, and R. McNew. 2006. "Aggressiveness of *Puccinia Striiformis* F.sp. *Tritici* Isolates in the South-Central States." *Plant Disease* 90:

847–852.

- Miranda, R. 2001. "Calidad Comercial E Industrial." In *Trigo. Cuaderno de Actualización 63 de AACREA*, 113–17.
- Mishra, Prashant K., Jalpa P. Tewari, Randall M. Clear, and T. Kelly Turkington. 2004. "Molecular Genetic Variation and Geographical Structuring in *Fusarium Graminearum*." *Annals of Applied Biology* 145 (3): 299–307. doi:10.1111/j.1744-7348.2004.tb00387.x.
- Mishra, Prashant K., Roland T.V. Fox, and Alastair Culham. 2003. "Inter-Simple Sequence Repeat and Aggressiveness Analyses Revealed High Genetic Diversity, Recombination and Long-Range Dispersal in *Fusarium Culmorum*." *Annals of Applied Biology* 143: 291–301. doi:10.1111/j.1744-7348.2003.tb00297.x.
- Monds R. D., M. G. Cromey, D. R. Lauren, M. di Menna and J. Marshall. 2005. "*Fusarium graminearum*, *F. cortaderiae* and *F. pseudograminearum* in New Zealand: molecular phylogenetic analysis, mycotoxin chemotypes and coexistence of species." *Mycological Research* 109(4):410–420.
- Moschini, Ricardo Carlos, and C. Fortugno. 1996. "Predicting Wheat Head Blight Incidence Using Models Based on Meteorological Factors in Pergamino, Argentina." *European Journal of Plant Pathology* 102: 211–18.
- Moschini, Ricardo Carlos, R. Pioli, Marcelo Carmona, and O. Sacchi. 2001. "Empirical Predictions of Wheat Head Blight in the Northern Argentinean Pampas Region." *Crop Science* 41: 1541–45.
- Mundt, C. C., L. P. Nieva, and C. M. Vera Cruz. 2002. "Variation for Aggressiveness within and between Lineages of *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae*." *Plant Pathology* 51: 163–68.
- Naeem, Hamid A., and Harry D. Sapirstein. 2007. "Ultra-Fast Separation of Wheat Glutenin Subunits by Reversed-Phase HPLC Using a Superficially Porous Silica-Based Column." *Journal of Cereal Science* 46 (2): 157–68. doi:10.1016/j.jcs.2007.01.002.
- Nicholson, Paul C., D.R Simpson, G Weston, H. N. Rezanoor, A.K Lees, D.W Parry,

- and D Joyce. 1998. "Detection and Quantification of *Fusarium Culmorum* and *Fusarium Graminearum* in Cereals Using PCR Assays." *Physiological and Molecular Plant Pathology* 53 (1). Academic Press: 17–37. doi:10.1006/pmpp.1998.0170.
- Nielsen, Linda Kærgaard, J. D. Jensen, G. C. Nielsen, J. E. Jensen, N. H. Spliid, I. K. Thomsen, A. F. Justesen, D. B. Collinge, and L. N. Jørgensen. 2011. "Fusarium Head Blight of Cereals in Denmark: Species Complex and Related Mycotoxins." *Phytopathology* 101: 960–969.
- Nielsen, Linda Kærgaard, J. D. Jensen, A. Rodríguez, L. N. Jørgensen, and A. F. Justesen. 2012. "TRI12 Based Quantitative Real-Time PCR Assays Reveal the Distribution of Trichothecene Genotypes of *F. Graminearum* and *F. Culmorum* Isolates in Danish Small Grain Cereals." *International Journal of Food Microbiology* 157: 384–392.
- Nightingale, Michael J., Brian A. Marchylo, Randall M. Clear, James E. Dexter, and Ken R. Preston. 1999. "Fusarium Head Blight: Effect of Fungal Proteases on Wheat Storage Proteins." *Cereal Chemistry* 76 (1). The American Association of Cereal Chemists, Inc.: 150–58. doi:10.1094/CCHEM.1999.76.1.150.
- Norred, W. P., R. T. Riley, F. I. Meredith, C. W. Bacon, and K. A. Voss. 1996. "Time- and Dose-Response Effects of the Mycotoxin, Fumonisin B1 on Sphingoid Base Elevations in Precision-Cut Rat Liver and Kidney Slices." *Toxicology in Vitro* 10 (3): 349–58.
- O'Donnell, Kerry, Harold Corby Kistler, Beth K. Tacke, and Howard H. Casper. 2000. "Gene Genealogies Reveal Global Phylogeographic Structure and Reproductive Isolation among Lineages of *Fusarium Graminearum*, the Fungus Causing Wheat Scab." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (14): 7905–10. doi:10.1073/pnas.130193297.
- O'Donnell, Kerry, Todd J. Ward, Dereje Aberra, Harold Corby Kistler, Takayuki Aoki, Nathane Orwig, Makoto Kimura, Åsmund Bjørnstad, and Sonja Sletner Klemsdal. 2008. "Multilocus Genotyping and Molecular Phylogenetics Resolve a Novel Head Blight Pathogen within the *Fusarium Graminearum* Species Complex from Ethiopia." *Fungal Genetics and Biology* 45 (11). Elsevier Inc.:

1514–22. doi:10.1016/j.fgb.2008.09.002.

O'Donnell, Kerry, Todd J. Ward, David M. Geiser, Harold Corby Kistler, and Takayuki Aoki. 2004. "Genealogical Concordance between the Mating Type Locus and Seven Other Nuclear Genes Supports Formal Recognition of Nine Phylogenetically Distinct Species within the *Fusarium Graminearum* Clade." *Fungal Genetics and Biology* 41 (6): 600–623. doi:10.1016/j.fgb.2004.03.003.

Osborne, Thomas Burr. 1907. "The Proteins of the Wheat Kernel." *Carnegie Institution of Washington* 84.

Palazzini, Juan Manuel, María Laura Ramírez, Adriana Mabel Torres, and Sofía Noemí Chulze. 2007. "Potential Biocontrol Agents for *Fusarium* Head Blight and Deoxynivalenol Production in Wheat." *Crop Protection* 26 (11): 1702–10. doi:10.1016/j.cropro.2007.03.004.

Pan, Dinorah, Natalia Calero, Ana Mionetto, and Lina Bettucci. 2013. "Trichothece Genotypes of *Fusarium Graminearum* from Wheat in Uruguay." *International Journal of Food Microbiology* 162 (1): 120–23.

Pariaud, Bénédicte, Virginie Ravigné, Fabien Halkett, Henriette Goyeau, Jean Carlier, and Christian Lannou. 2009. "Aggressiveness and Its Role in the Adaptation of Plant Pathogens." *Plant Pathology* 58 (3): 409–24. doi:10.1111/j.1365-3059.2009.02039.x.

Park, Chul Soo, Byung Hee Hong, and Byung Kee Baik. 2003. "Protein Quality of Wheat Desirable for Making Fresh White Salted Noodles and Its Influences on Processing and Texture of Noodles." *Cereal Chemistry* 80 (3): 297–303. doi:10.1094/cchem.2003.80.3.297.

Payne, Peter I., E. A. Jackson, and L. M. Holt. 1984. "The Association between  $\gamma$ -Gliadin 45 and Gluten Strength in Durum Wheat Varieties: A Direct Causal Effect or the Result of Genetic linkage?No Title." *Journal of Cereal Science* 2 (2): 73–81.

Payne, Peter I., and Gregory J. Lawrence. 1983. "Catalogue of Alleles for the Complex Gene Loci, Glu-A1, Glu-B1, and Glu-D1 Which Code for High-Molecular-Weight Subunits of Glutenin in Hexaploid Wheat." *Cereal Research*

*Communications* 11 (1): 29–35. doi:catalogue.

- Payne, Peter I., Mark A. Nightingale, Anatole F. Krattiger, and Linda M. Holt. 1987. "The Relationship between HMW Glutenin Subunit Composition and the Bread-Making Quality of British-Grown Wheat Varieties." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 40 (1). John Wiley & Sons, Ltd: 51–65. doi:10.1002/jsfa.2740400108.
- Pestka, James J. 2007. "Deoxynivalenol: Toxicity, Mechanisms and Animal Health Risks." *Animal Feed Science and Technology* 137 (3–4): 283–98. doi:10.1016/j.anifeedsci.2007.06.006.
- Pestka, James J., and Alexa T. Smolinski. 2005. "Deoxynivalenol: Toxicology and Potential Effects on Humans." *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 8 (1): 39–69. doi:10.1080/10937400590889458.
- Philippe, S., L. Saulnie, and F. Guillon. 2006. "Arabinoxylan and (1/3),(1/4)-Bglucan Deposition in Cell Walls during Wheat Endosperm Development." *Planta* 224: 449–461.
- Prange, Alexander, Barbara Birzele, Johannes Krämer, Anja Meier, Hartwig Modrow, and Peter Köhler. 2005. "Fusarium-Inoculated Wheat: Deoxynivalenol Contents and Baking Quality in Relation to Infection Time." *Food Control* 16 (October): 739–45. doi:10.1016/j.foodcont.2004.06.013.
- Prabhasankar P., Kumar M. Vijaya, B. R. Lokesh and Rao P. Haridas. 2000 "Distribution of free lipids and their fractions in wheat four milled streams." *Food Chemistry* 71:97–103.
- Pritsch, Clara, G. J. Muehlbauer, W. R. Bushnell, Daryl A. Somers, and C. P. Vance. 2000. "Fungal Development and Induction of Defense Response Genes during Early Infection of Wheat Spikes by *Fusarium Graminearum*." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13 (2): 159–69.
- Prodi, A., W. Purahong, S. Tonti, D. Salomoni, P. Nipoti, L. Covarelli, and A. Pisi. 2011. "Difference in Chemotype Composition of *Fusarium Graminearum* Populations Isolated from Durum Wheat in Adjacent Areas Separated by the Apennines in Northern-Central Italy." *The Plant Pathology Journal* 27 (4): 354–

Prodi, A., S. Tonti, P. Nipoti, D. Pancaldi, and A. Pisi. 2009. "Identification of Deoxynivalenol and Nivalenol Producing Chemotypes of *Fusarium Graminearum* Isolates from Durum Wheat in a Restricted Area of Northern Italy." *Journal of Plant Pathology*, 727–31.

*Programa Nacional de Calidad de Trigo*. 2004. SAGPyA.

Qian, Yuwei, Ken R. Preston, Oleg Krokhin, Jean Mellish, and Werner Ens. 2008. "Characterization of Wheat Gluten Proteins by HPLC and MALDI TOF Mass Spectrometry." *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 19 (10): 1542–50. doi:10.1016/j.jasms.2008.06.008.

Qiu, Jianbo, Jianhong Xu, and Jianrong Shi. 2014. "Molecular Characterization of the *Fusarium Graminearum* Species Complex in Eastern China." *European Journal of Plant Pathology* 139 (4). Springer Netherlands: 811–23. doi:10.1007/s10658-014-0435-4.

Ramírez, María Laura, Sofía Noemí Chulze, and Naresh Magan. 2006. "Temperature and Water Activity Effects on Growth and Temporal Deoxynivalenol Production by Two Argentinean Strains of *Fusarium Graminearum* on Irradiated Wheat Grain." *International Journal of Food Microbiology* 106 (3): 291–96. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.09.004.

Ramírez, María Laura, María Marta Reynoso, María Cecilia Farnochi, and Sofía Noemí Chulze. 2006. "Vegetative Compatibility and Mycotoxin Chemotypes among *Fusarium Graminearum* (*Gibberella Zeae*) Isolates from Wheat in Argentina." *European Journal of Plant Pathology*. doi:10.1007/s10658-006-0009-1.

Ramírez, María Laura, María Marta Reynoso, María Cecilia Farnochi, Adriana Mabel Torres, John F. Leslie, and Sofía Noemí Chulze. 2007. "Population Genetic Structure of *Gibberella Zeae* Isolated from Wheat in Argentina." *Food Additives and Contaminants* 24 (10). Taylor & Francis Group: 1115–20. doi:10.1080/02652030701546487.

Reis, E., and Marcelo Carmona. 2002. "Fusariosis Del Trigo. Biología,

Epidemiología Y Estrategias Para Su Manejo.” *BASF Argentina SA*.

Reynoso, María Marta, María Laura Ramírez, Adriana Mabel Torres, and Sofía Noemí Chulze. 2011. “Trichothecene Genotypes and Chemotypes in *Fusarium Graminearum* Strains Isolated from Wheat in Argentina.” *International Journal of Food Microbiology* 145 (2): 444–48. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.020.

Ritchie, S., S. J. Swanson, and S. Gilroy. 2000. “Physiology of the Aleurone Layer and Starchy Endosperm during Grain Development and Early Seedling Growth: New Insights from Cell and Molecular Biology.” *Seed Science Research* 10: 193–212.

Rogers, W. J., P. I. Payne, and K. Harinder. 1989. “The HMW Glutenin Subunits and Gliadin Compositions of German-Grown Wheat Varieties and Their Relationship with Bread-Making Quality.” *Plant Breeding* 103: 89–100.

Saharan, Mahander Singh, Jagdish Vinay Kumar, A. K. Sharma, and S. Nagarajan. 2004. “*Fusarium* Head Blight (FHB) or Head Scab of Wheat—a Review.” *Proceedings of the Indian National Science Academy. Part B, Biological Sciences* 70: 255–68.

Sampietro, Diego Alejandro, Carolina G. Díaz, Victoria González, Marta Amelia Vattuone, Leonardo Daniel Ploper, César Atilio Nazareno Catalán, and Todd J. Ward. 2011. “Species Diversity and Toxigenic Potential of *Fusarium Graminearum* Complex Isolates from Maize Fields in Northwest Argentina.” *International Journal of Food Microbiology* 145 (1). Elsevier B.V.: 359–64. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.021.

Sampietro, Diego Alejandro, Patricia Marín, Juliana Iglesias, Daniel Alberto Presello, Marta Amelia Vattuone, César Atilio Nazareno Catalán, and María Teresa González-Jaén. 2010. “A Molecular Based Strategy for Rapid Diagnosis of Toxigenic *Fusarium* Species Associated to Cereal Grains from Argentina.” *Fungal Biology* 114 (1): 74–81. doi:10.1016/j.mycres.2009.10.008.

Sapirstein, Harry D., P. David, Ken R. Preston, and James E. Dexter. 2007. “Durum Wheat Breadmaking Quality: Effects of Gluten Strength, Protein Composition, Semolina Particle Size and Fermentation Time.” *Journal of Cereal Science* 45: 150–161.

- Sapirstein, Harry D., and Bin Xiao Fu. 1998. "Intercultivar Variation in the Quantity of Monomeric Proteins, Soluble and Insoluble Glutenin, and Residue Protein in Wheat Flour and Relationships to Breadmaking Quality." *Cereal Chemistry* 75 (4). The American Association of Cereal Chemists, Inc.: 500–507. doi:10.1094/CCHEM.1998.75.4.500.
- Sarver, Brice A.J., Todd J. Ward, Liane Rosewich Gale, Karen Broz, Harold Corby Kistler, Takayuki Aoki, Paul C. Nicholson, Jon P. Carter, and Kerry O'Donnell. 2011. "Novel Fusarium Head Blight Pathogens from Nepal and Louisiana Revealed by Multilocus Genealogical Concordance." *Fungal Genetics and Biology* 48 (12): 1096–1107. doi:10.1016/j.fgb.2011.09.002.
- Schaafsma, A. W., L. T. Ilinic, J. D. Miller, and D. C. Hooker. 2001. "Agronomic Considerations for Reducing Deoxynivalenol in Wheat Grain." *Canadian Journal of Plant Pathology* 23 (3): 279–85.
- Schafer, Wilhelm. 1994. "Molecular Mechanisms of Fungal Pathogenicity to Plants." *Annual Review of Phytopathology* 32 (1): 461–77.
- Scorz, L. B., P. Astolfi, D. S. Reartes, David G. Schmale III, Marcelo G. Moraes, and Emerson Medeiros Del Ponte. 2009. "Trichothecene Mycotoxin Genotypes of *Fusarium Graminearum* Sensu Stricto and *Fusarium Meridionale* in Wheat from Southern Brazil." *Plant Pathology* 58 (2). Blackwell Publishing Ltd: 344–51. doi:10.1111/j.1365-3059.2008.01949.x.
- Shaner, Gregory, and G. Buechley. 2004. "Relation between Head Blight Severity and DON in Natural Epidemics of FHB." In *2nd International Symposium on Fusarium Head Blight*, 518. Orlando, FL.
- Shaner, Gregory, E. L. Stromberg, G. H. Lacy, K. R. Barker, and T. P. Pirone. 1992. "Nomenclature and Concepts of Pathogenicity and Virulence." *Annual Review of Phytopathology* 30 (1): 47–66.
- Shewry, P. R., and N. G. Halford. 2002. "Cereal Seed Storage Proteins: Structures, Properties and Role in Grain Utilization." *Journal of Experimental Botany* 53: 947–958.
- Shewry, P. R., Yves Popineau, Domenico Lafiandra, and P. S. Belton. 2001. "Wheat

- Glutenin Subunits and Dough Elasticity: Findings of the Eurowheat Project.” *Trend in Food Science & Technology* 11: 433–41.
- Shewry, P. R., and A. S. Tatham. 2000. *Wheat*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Singh, H., and Finlay MacRitchie. 2001. “Application of Polymer Science to Properties of Gluten.” *Journal of Cereal Science* 33 (3): 231–43.
- Somma, Stefania, A. L. Petruzzella, Antonio Francesco Rancesco Logrieco, G. Meca, O. S. Cacciola, and Antonio Moretti. 2014. “Phylogenetic Analyses of *Fusarium Graminearum* Strains from Cereals in Italy, and Characterisation of Their Molecular and Chemical Chemotypes.” *Crop and Pasture Science* 65 (1): 52–60.
- Štočková, L., J. Bradová, and Jana Chrpová. 2011. “Influence of *Fusarium* Infection on Qualitative and Quantitative Changes in Wheat Protein.” *Climate Change: Challenges and Opportunities in Agriculture. AGRISAFE Final Conference, 21-23 March 2011, Budapest, Hungary.*, 269–72.
- Suchy, Jerry, Odean M. Lukow, and Bin Xiao Fu. 2003. “Quantification of Monomeric and Polymeric Wheat Proteins and the Relationship of Protein Fractions to Wheat Quality.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83 (10). John Wiley & Sons, Ltd.: 1083–90. doi:10.1002/jsfa.1438.
- Suga, Haruhisa, Gladys Wairimu Karugia, Todd J. Ward, Liane Rosewich Gale, Kenta Tomimura, Takash Nakajima, Atsushi Miyasaka, Shinzo Koizumi, Koji Kageyama, and Mitsuro Hyakumachi. 2008. “Molecular Characterization of the *Fusarium Graminearum* Species Complex in Japan.” *Phytopathology* 98 (2). The American Phytopathological Society: 159–66. doi:10.1094/PHYTO-98-2-0159.
- Summerell, Brett A., Matthew H. Laurence, Edward C. Y. Liew, and John F. Leslie. 2010. “Biogeography and Phylogeography of *Fusarium*: A Review.” *Fungal Diversity* 44 (1). Springer Netherlands: 3–13. doi:10.1007/s13225-010-0060-2.
- Sutton, K. H. 1991. “Qualitative and Quantitative Variation among High Molecular Weight Subunits of Glutenin Detected by Reversed-Phase High-Performance

- Liquid Chromatography.” *Journal of Cereal Science* 14 (1). Academic Press Limited: 25–34. doi:10.1016/S0733-5210(09)80015-5.
- Talas, Firas, H. K. Parzies, and Thomas Miedaner. 2011. “Diversity in Genetic Structure and Chemotype Composition of *Fusarium Graminearum* Sensu Stricto Populations Causing Wheat Head Blight in Individual Fields in Germany.” *European Journal of Plant Pathology* 131: 39–48.
- Tarabiono, C. 1979. *Manuale Pratico per La Macinazione Del Grano*. Editorial CHIRIOTTI.
- Terzi, Valeria, Caterina Morcia, Primetta Faccioli, Nadia Faccini, Vittorio Rossi, Manuela Cigolini, Maria Corbellini, Diego Scudellari, and Giovanni Delogu. 2007. “*Fusarium* DNA Traceability along the Bread Production Chain.” *International Journal of Food Science & Technology* 42 (12): 1390–96.
- Tóth, Beáta, Ákos Mesterházy, Zoltán Horváth, Tibor Bartók, Mónika Varga, and János Varga. 2005. “Genetic Variability of Central European Isolates of the *Fusarium Graminearum* Species Complex.” *European Journal of Plant Pathology* 113 (1): 35–45. doi:10.1007/s10658-005-0296-y.
- “Trigo Argentino.” 2013. <http://www.trigoargentino.com.ar/Promedio/Promedio?Idioma=Esp&i=1&IdCampe=17>.
- Ulloa, Miguel, and Richard T. Hanlin. 2006. *Nuevo Diccionario Ilustrado de Micología*.
- Umpiérrez-Failache, M., Gabriela Garmendia, Silvia A. Pereyra, Alejandra Rodríguez-Haralambides, Todd J. Ward, and Silvana Vero. 2013. “Regional Differences in Species Composition and Toxigenic Potential among *Fusarium* Head Blight Isolates from Uruguay Indicate a Risk of Nivalenol Contamination in New Wheat Production Areas.” *International Journal of Food Microbiology* 166 (1): 135–40. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.029.
- van der Lee, Theo, Hao Zhang, Anne van Diepeningen, and Cees Waalwijk. 2015. “Biogeography of *Fusarium Graminearum* Species Complex and Chemotypes: A Review.” *Food Additives and Contaminants* 32 (4). Taylor & Francis: 453–60.

doi:10.1080/19440049.2014.984244.

Vanderplank, J. E. 1984. *Disease Resistance in Plants*.

Veraverbeke, Wim S., and Jan Arsène Delcour. 2002. "Critical Reviews in Food Science and Nutrition Wheat Protein Composition and Properties of Wheat Glutenin in Relation to Breadmaking Functionality Wheat Protein Composition and Properties of Wheat Glutenin in Relation to Breadmaking." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 42 (3): 179–208.

Waalwijk, Cees, Ineke M. de Vries, Jürgen Köhl, X. Xu, Theo A. J. van der Lee, and Gert H. Kema. 2008. "Development of Quantitative Detection Methods for Fusarium in Cereals and Their Application." In *Mycotoxins: Detection Methods, Management, Public Health and Agricultural Trade*, edited by John F. Leslie, R. Bandyopadhyay, and Angelo Visconti, 195–205. Wallingford: CAB International.

Waalwijk, Cees, Pieter Kastelein, Ineke de Vries, Zoltan Kerényi, Theo van der Lee, Tamara Hesselink, Jürgen Köhl, and Gert Kema. 2003. "Major Changes in Fusarium Spp. in Wheat in the Netherlands." *European Journal of Plant Pathology* 109. Dordrecht: Springer Netherlands: 743–54. doi:10.1007/978-94-017-1452-5\_9.

Walker, Scott L., S. Leath, W. M. Hagler, and J. P. Murphy. 2001. "Variation among Isolates of Fusarium Graminearum Associated with Fusarium Head Blight in North Carolina." *Plant Disease* 85 (4): 404–10.

Wang, Jinhua, Herbert Wieser, Elke Pawelzik, Joachim Weinert, Anna J. Keutgen, and Gerhard A. Wolf. 2005. "Impact of the Fungal Protease Produced by Fusarium Culmorum on the Protein Quality and Breadmaking Properties of Winter Wheat." *European Food Research and Technology* 220 (5–6): 552–59. doi:10.1007/s00217-004-1112-1.

Wanjiru, W. M., K. Zhensheng, and H. Buchenauer. 2002. "Importance of Cell Wall Degrading Enzymes Produced by Fusarium Graminearum during Infection of Wheat Heads." *European Journal of Plant Pathology* 108 (8): 803–10.

Weegels, P. L., R. J. Hamer, and D. Schofield. 1996. "Critical Review. Functional

- Properties of Wheat Glutenin." *Journal of Cereal Science* 23: 1–18.
- Wieser, Herbert. 2007. "Chemistry of Gluten Proteins." *Food Microbiology* 24 (2): 115–19. doi:10.1016/j.fm.2006.07.004.
- Xu, Xiang Ming, Paul C. Nicholson, and Alberto Ritieni. 2007. "Effects of Fungal Interactions among Fusarium Head Blight Pathogens on Disease Development and Mycotoxin Accumulation." *International Journal of Food Microbiology* 119 (1–2): 67–71. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.027.
- Yli-Mattila, Tapani, Tatiana Gagkaeva, Todd J. Ward, Takayuki Aoki, Harold Corby Kistler, and Kerry O'Donnell. 2009. "A Novel Asian Clade within the Fusarium Graminearum Species Complex Includes a Newly Discovered Cereal Head Blight Pathogen from the Russian Far East." *Mycologia* 101 (6): 841–52. doi:10.3852/08-217.
- Yoshizawa, Tukumii, and Yin-Zhe Jin. 1995. "Natural Occurrence of Acetylated Derivatives of Deoxynivalenol and Nivalenol in Wheat and Barley in Japan." *Food Additives and Contaminants* 12 (5): 689–94.
- Zeller, Kurt A., Robert L. Bowden, and John F. Leslie. 2003. "Diversity of Epidemic Populations of Gibberella Zeae from Small Quadrats in Kansas and North Dakota." *Phytopathology* 93 (7). The American Phytopathological Society: 874–80. doi:10.1094/PHYTO.2003.93.7.874.
- Zhao, F. J., Y. H. Su, S. J. Dunhama, M. Rakszegi, Z. Bedo, S. P. McGrath, and P. R. Shewry. 2009. "Variation in Mineral Micronutrient Concentrations in Grain of Wheat Lines of Diverse Origin." *Journal of Cereal Science* 49: 290–295.

## ANEXO I: INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1:</b> Mapa de las regiones trigueras de Argentina. El sombreado representa las zonas productoras	<b>4</b>
<b>Figura 1.2:</b> Esquema de una espiguilla de trigo	<b>5</b>
<b>Figura 1.3:</b> Estructura del grano de trigo	<b>7</b>
<b>Figura 1.4:</b> Perfiles proteicos de distintos cultivares de trigo en SDS-PAGE	<b>10</b>
<b>Figura 1.5:</b> Polimorfismo de subunidades de gluteninas de alto peso molecular – HMW– en trigo pan	<b>11</b>
<b>Figura 2.1:</b> Ubicación de las zonas de muestreo: 1- Villa María (32° 24' 37" S; 63° 13' 53" O); 2- Marcos Juárez (32° 42' S; 62° 06' O); 3- Monte Buey (32° 25' 00" S; 62° 21' 00" O); 4- Corral de Bustos (33° 17' 00" S; 62° 12' 00" O); 5- Cavanagh (33° 29' 00" S; 62° 21' 00" O); 6- Los Molinos (33° 07' 00" S; 61° 20' 01" O); 7- Paraná (31° 44' 40" S; 60° 31' 03" O); 8- Mercedes (29° 12' 00" S; 58° 05' 00" O); 9- Corrientes (27° 29' 00" S; 58° 49' 00" O); 10- Balcarce (37° 49' 00" S; 58° 15' 00" O)	<b>25</b>
<b>Figura 2.2:</b> Dendrograma obtenido a partir de marcadores ISSR de agrupamiento de clusters entre aislamientos de <i>Fusarium graminearum</i> s.s. Aislamientos A: año 2009; B: año 2010; C: año 2011; <i>F.ps.</i> : aislamiento de <i>F. pseudograminearum</i> utilizado como control. (-): No productor; (+): Bajo productor; (++) : Productor medio; (+++): Muy productor	<b>36</b>
<b>Figura 2.3:</b> Frecuencia relativa de los aislamientos distribuidos en rangos de producción de DON	<b>37</b>
<b>Figura 3.1:</b> Correlación entre contenido de DON y severidad de la enfermedad	<b>61</b>
<b>Figura 3.2:</b> Representación gráfica de los componentes 1 y 2, obtenidos por PCA de las variables de agresividad y rendimiento. %GD: porcentaje de	<b>63</b>

granos dañados; PMG: peso de mil granos; IF: índice de Fusarium; ISK: índice incidencia, severidad y granos dañados

**Figura 4.1:** Valores de proteína total obtenidos por método Kjeldahl en cultivares de trigo infectados por los aislamientos Am (□); Az (■); N (■) **73**

**Figura 4.2:** Cromatografía en HPLC-RP de la fracción gluteninas de: A- Cultivar Sy 200; B- Cultivar AGP Fast; C- Cultivar Klein Tigre; D- Cultivar testigo SUMAI 3. HMW-GS: gluteninas de alto peso molecular; LMW-GS: gluteninas de bajo peso molecular. P<sub>1</sub>-P<sub>10</sub>: picos proteicos. UA: lecturas a 206 nm **80**

**Figura 4.3:** Representación gráfica de los componentes 1 y 2 obtenidos del análisis de PCA para los picos de gluteninas de alto peso molecular en el cultivar Sy 200 **82**

**Figura 4.4:** Representación gráfica de los componentes 1 y 2 obtenidos del análisis de PCA para todos los picos de HPLC en el cultivar Sy 200 **83**

**Figura 4.5:** Representación gráfica de los componentes 1 y 2 obtenidos del análisis de PCA para todos los picos de HPLC en el cultivar AGP Fast **87**

**Figura 4.6:** Representación gráfica de los componentes 1 y 2 obtenidos del análisis de PCA para los picos de gluteninas de alto peso molecular en el cultivar Klein Tigre **90**

**Figura 4.7:** Representación gráfica de los componentes 1 y 2 obtenidos del análisis de PCA para todos los picos de HPLC en el cultivar Klein Tigre **91**

**Figura 4.8:** Perfil de gluteninas de cultivares de trigo bajo estudio. M: Marcador de peso molecular; 1: SRM Nogal; 2: Sy 100; 3: BioINTA 2005; 4: Sy 200; 5: Buck Meteoro; 6: BioINTA 1005; 7: AGP Fast; 8: Klein Tigre; T: Testigo Sumai 3 **94**

**Figura 4.9:** Geles de poliacrilamida para el análisis de densitometría. A: Perfiles del cultivar Sy 200; B: Perfiles del cultivar AGP Fast; C: Perfiles del cultivar Klein Tigre. Tratamientos: T10-T24. M: marcadores moleculares. T: **95**

testigo

**Figura 4.10** Representación gráfica de los componentes 1 y 2, obtenidos por PCA de las fracciones proteicas obtenidas por espectrofotometría-UV (FM, FPI, FPS y UV Total), HPLC (P1-P10, HMW-GS y LMW-GS) y SDS-PAGE (5, 6, 8, 10 y SDS) para el cultivar Sy 200 **98**

**Figura 4.11:** Representación gráfica de los componentes 1 y 2, obtenidos por PCA de las fracciones proteicas obtenidas por espectrofotometría-UV (FM, FPI, FPS y UV Total), HPLC (P1-P9, HMW-GS y LMW-GS) y SDS-PAGE (5, 10, 13, 16 y SDS) para el cultivar AGP Fast **1 01**

**Figura 4.12:** Representación gráfica de los componentes 1 y 2, obtenidos por PCA de las fracciones proteicas obtenidas por espectrofotometría-UV (FM, FPI, FPS y UV Total), HPLC (P1-P10, HMW-GS y LMW-GS) y SDS-PAGE (5, 7, 9, 10 y SDS) para el cultivar Klein Tigre **103**

## INDICE DE TABLAS

**Tabla 1.1:** Clasificación de las proteínas de trigo de acuerdo a su solubilidad **9**

**Tabla 1.2:** Variación alélica de los genes de gluteninas de alto peso molecular **10**

**Tabla 1.3:** Puntaje de calidad del gluten de trigo para cada cromosoma **11**

**Tabla 2.1:** Variedades de trigo utilizadas en este estudio **26**

**Tabla 2.2:** Distribución geográfica de los aislamientos de *Fusarium graminearum* **34**

**Tabla 2.3:** Aislamientos obtenidos en la localidad de Marcos Juárez **34**

**Tabla 3.1:** Listado de variedades de trigo utilizadas en el ensayo a campo **42**

**Tabla 3.2:** Rangos de producción enzimática de los aislamientos de **47**

*Fusarium graminearum*

<b>Tabla 3.3:</b> Producción enzimática y de deoxinivalenol en los aislamientos de <i>Fusarium graminearum</i>	<b>48</b>
<b>Tabla 3.4:</b> Equivalencias en la nomenclatura de los aislamientos de <i>Fusarium graminearum</i> utilizados en el ensayo de agresividad	<b>48</b>
<b>Tabla 3.5:</b> Valores medios y desvíos estándar de las variables de agresividad y rendimiento para cada tratamiento	<b>50</b>
<b>Tabla 3.6:</b> Matriz de correlación de Pearson entre las variables de agresividad y rendimiento analizadas	<b>51</b>
<b>Tabla 3.7:</b> Análisis de la varianza de la incidencia para el efecto aditivo entre tratamientos	<b>52</b>
<b>Tabla 3.8:</b> Asignación de grupo homogéneo para los aislamientos de <i>Fusarium graminearum</i> respecto a la incidencia, de acuerdo al test de LSD	<b>52</b>
<b>Tabla 3.9:</b> Análisis de la varianza de la severidad para el efecto aditivo entre tratamientos	<b>53</b>
<b>Tabla 3.10:</b> Asignación de grupo homogéneo para los aislamientos de <i>Fusarium graminearum</i> respecto a la severidad, de acuerdo al test de LSD	<b>53</b>
<b>Tabla 3.11:</b> Análisis de la varianza del porcentaje de granos dañados para el efecto aditivo entre tratamientos	<b>54</b>
<b>Tabla 3.12:</b> Asignación de grupo homogéneo para los cultivares respecto al porcentaje de granos dañados, de acuerdo al test de LSD	<b>55</b>
<b>Tabla 3.13:</b> Asignación de grupo homogéneo para los aislamientos de <i>Fusarium graminearum</i> respecto al porcentaje de granos dañados, de acuerdo a un test de LSD	<b>55</b>
<b>Tabla 3.14:</b> Análisis de la varianza del peso de mil granos para el efecto aditivo entre tratamientos	<b>56</b>

<b>Tabla 3.15:</b> Asignación de grupo homogéneo para los cultivares de trigo respecto al peso de mil granos, de acuerdo a un test de LSD	<b>57</b>
<b>Tabla 3.16:</b> Asignación de grupo homogéneo para los aislamientos de <i>Fusarium graminearum</i> respecto al peso de mil granos, de acuerdo al test de LSD	<b>57</b>
<b>Tabla 3.17:</b> Análisis de la varianza del índice IF para el efecto aditivo entre tratamientos	<b>58</b>
<b>Tabla 3.18:</b> Asignación de grupo homogéneo para los cultivares respecto al índice IF, de acuerdo al test de LSD	<b>58</b>
<b>Tabla 3.19:</b> Asignación de grupo homogéneo para los aislamientos de <i>Fusarium graminearum</i> respecto al índice IF, de acuerdo a un test de LSD	<b>58</b>
<b>Tabla 3.20:</b> Análisis de la varianza del índice ISK para el efecto aditivo entre tratamientos	<b>59</b>
<b>Tabla 3.21:</b> Asignación de grupo homogéneo para los aislamientos de <i>Fusarium graminearum</i> respecto al índice IF, de acuerdo a un test de LSD	<b>59</b>
<b>Tabla 3.22:</b> Determinación de DON para los tratamientos bajo estudio	<b>60</b>
<b>Tabla 3.23:</b> Análisis de PCA para las variables de agresividad y rendimiento estudiadas	<b>62</b>
<b>Tabla 4.1:</b> Gradiente de la fase móvil de la cromatografía en fase reversa	<b>69</b>
<b>Tabla 4.2:</b> Composición de los geles de poliacrilamida	<b>70</b>
<b>Tabla 4.3:</b> Composición de las soluciones buffer utilizadas en los geles de poliacrilamida	<b>70</b>
<b>Tabla 4.4:</b> Composición de las soluciones de fijación de tinción	<b>71</b>
<b>Tabla 4.5:</b> Análisis estadístico del efecto aditivo entre el cultivar de trigo y el aislamiento de <i>F. graminearum</i> para la variable proteína total en los granos infectados	<b>73</b>

<b>Tabla 4.6:</b> Correlación de Pearson entre el valor de la proteína total y las variables de agresividad y rendimiento de los granos infectados	<b>74</b>
<b>Tabla 4.7:</b> Relación porcentual de las fracciones proteicas del gluten para los diferentes cultivares	<b>75</b>
<b>Tabla 4.8:</b> Análisis de la varianza de la fracción monomérica para el efecto interacción cultivar-aislamiento en los tratamientos	<b>76</b>
<b>Tabla 4.9:</b> Análisis de la varianza de la fracción monomérica para el efecto aditivo de la interacción cultivar-aislamiento en los tratamientos	<b>76</b>
<b>Tabla 4.10:</b> Análisis de la varianza de la fracción polimérica soluble para el efecto interacción cultivar-aislamiento en los tratamientos	<b>77</b>
<b>Tabla 4.11:</b> Análisis de la varianza de la fracción polimérica soluble para el efecto aditivo de la interacción cultivar-aislamiento en los tratamientos	<b>77</b>
<b>Tabla 4.12:</b> Test de Fisher para el efecto del aislamiento de <i>Fusarium graminearum</i> sobre la fracción FPS	<b>77</b>
<b>Tabla 4.13:</b> Análisis de la varianza de la fracción polimérica insoluble para el efecto interacción cultivar-aislamiento en los tratamientos	<b>78</b>
<b>Tabla 4.14:</b> Análisis de la varianza de la fracción polimérica insoluble para el efecto aditivo de la interacción cultivar-aislamiento en los tratamientos	<b>78</b>
<b>Tabla 4.15:</b> Matriz de correlación de Pearson entre las áreas de picos proteicos obtenidos por HPLC en el cultivar Sy 200	<b>81</b>
<b>Tabla 4.16:</b> Análisis de componentes principales para los picos proteicos de gluteninas de alto peso molecular por HPLC del cultivar Sy 200	<b>82</b>
<b>Tabla 4.17:</b> Análisis de componentes principales para las áreas de los picos proteicos de gluteninas de alto y bajo peso molecular por HPLC del cultivar Sy 200	<b>83</b>
<b>Tabla 4.18:</b> Correlación de Pearson entre las áreas de picos proteicos obtenidas por HPLC y variables de rendimiento y agresividad para el	<b>84</b>

cultivar Sy 200

<b>Tabla 4.19:</b> Comparación porcentual entre el efecto de los aislamientos Am y Az respecto al aislamiento N para las áreas de los picos proteicos obtenidos por HPLC en el cultivar Sy 200	<b>85</b>
<b>Tabla 4.20:</b> Matriz de correlación de Pearson entre las áreas de los picos proteicos obtenidos por HPLC en el cultivar AGP Fast	<b>85</b>
<b>Tabla 4.21:</b> Análisis de componentes principales para las áreas de los picos proteicos de gluteninas de alto y bajo peso molecular por HPLC del cultivar AGP Fast	<b>86</b>
<b>Tabla 4.22:</b> Correlación de Pearson entre las áreas de picos proteicos obtenidas por HPLC y variables de rendimiento y agresividad para el cultivar AGP Fast	<b>87</b>
<b>Tabla 4.23:</b> Comparación porcentual entre el efecto de los aislamientos Am y Az respecto al aislamiento N para las áreas de los picos proteicos obtenidos por HPLC en el cultivar AGP Fast	<b>88</b>
<b>Tabla 4.24:</b> Matriz de correlación de Pearson entre las áreas de los picos proteicos obtenidos por HPLC en el cultivar Klein Tigre	<b>89</b>
<b>Tabla 4.25:</b> Análisis de componentes principales para las áreas de los picos proteicos de gluteninas de alto peso molecular por HPLC del cultivar Klein Tigre	<b>89</b>
<b>Tabla 4.26:</b> Análisis de componentes principales para las áreas de los picos proteicos de gluteninas por HPLC del Klein Tigre	<b>90</b>
<b>Tabla 4.27:</b> Correlación de Pearson entre las áreas de picos proteicos obtenidas por HPLC y variables de rendimiento y agresividad para el cultivar Klein Tigre	<b>91</b>
<b>Tabla 4.28:</b> Comparación porcentual entre el efecto de los aislamientos Am y Az respecto al aislamiento N para las áreas de los picos proteicos obtenidos por HPLC en el cultivar Klein Tigre	<b>92</b>

<b>Tabla 4.29:</b> Identificación alélica del perfil de gluteninas de alto peso molecular por SDS-PAGE	<b>94</b>
<b>Tabla 4.30:</b> Matriz de correlación de Pearson para los valores de densidad obtenidos a partir de SDS-PAGE del cultivar Sy 200	<b>96</b>
<b>Tabla 4.31:</b> Correlación de Pearson entre los valores de densidad obtenidos a partir de SDS-PAGE y las variables de rendimiento y agresividad estudiadas para el cultivar Sy 200	<b>96</b>
<b>Tabla 4.32:</b> Valores de $p$ para los resultados de densitometría de las bandas proteicas obtenidas para el cultivar Sy 200	<b>97</b>
<b>Tabla 4.33:</b> Análisis de PCA para el cultivar Sy 200 de las fracciones proteicas obtenidas por espectrofotometría-UV, HPLC y SDS-PAGE	<b>97</b>
<b>Tabla 4.34:</b> Matriz de correlación de Pearson para los valores de densidad obtenidos a partir de SDS-PAGE del cultivar AGP Fast	<b>98</b>
<b>Tabla 4.35:</b> Correlación de Pearson entre los valores de densidad obtenidos a partir de SDS-PAGE y las variables de rendimiento y agresividad estudiadas para el cultivar AGP Fast	<b>99</b>
<b>Tabla 4.36:</b> Valores de $p$ para los resultados de densitometría de las bandas proteicas obtenidas para el cultivar AGP Fast	<b>99</b>
<b>Tabla 4.37:</b> Análisis de PCA para el cultivar AGP Fast de las fracciones proteicas obtenidas por espectrofotometría-UV, HPLC y SDS-PAGE	<b>100</b>
<b>Tabla 4.38:</b> Matriz de correlación de Pearson para los valores de densitometría obtenidos a partir de SDS-PAGE del cultivar Klein Tigre	<b>101</b>
<b>Tabla 4.39:</b> Correlación de Pearson entre los valores de densidad de las bandas de SDS-PAGE y las variables de rendimiento y agresividad estudiadas para el cultivar Klein Tigre	<b>102</b>
<b>Tabla 4.40:</b> Valores de $p$ para los resultados de densitometría de las bandas proteicas obtenidas para el cultivar Klein Tigre	<b>102</b>

<b>Tabla 4.41:</b> Análisis de PCA para el cultivar Klein Tigre de las fracciones proteicas obtenidas por espectrofotometría-UV, HPLC y SDS-PAGE	<b>103</b>
<b>Tabla 4.42:</b> Score de calidad para los cultivares de trigo obtenidos a partir de SDS-PAGE	<b>105</b>
<b>Tabla 4.43:</b> Variación en la señal proteica en SDS-PAGE de los cultivares de trigo	<b>105</b>
<b>Tabla 4.44:</b> Índice de sedimentación de Zeleny de los cultivares de trigo	<b>106</b>

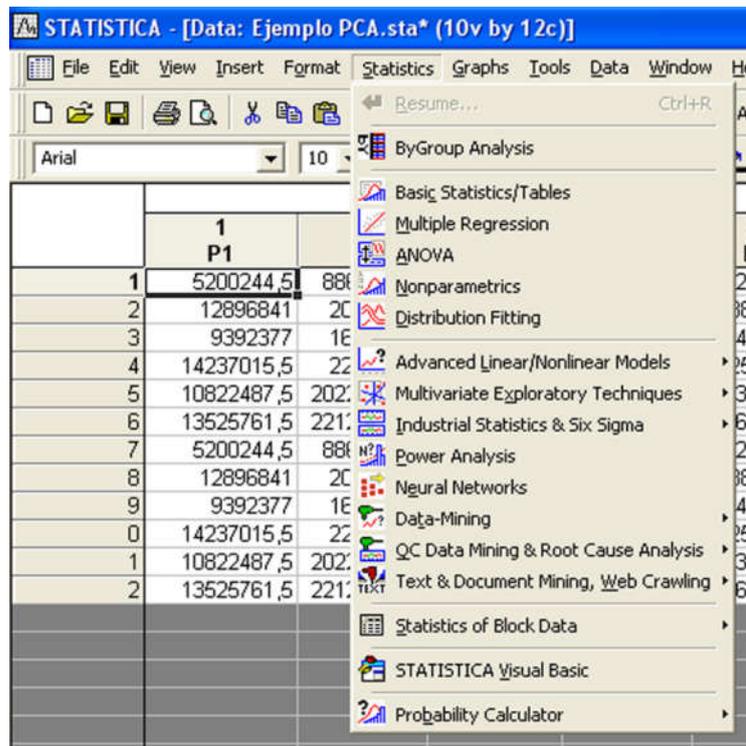
## ANEXO II: DESARROLLO DE UN PCA

El análisis de componentes principales es una técnica estadística muy útil que facilita encontrar patrones en bases de datos de gran magnitud. En este anexo se indicará como realizar un PCA utilizando el programa STATISTICA7.

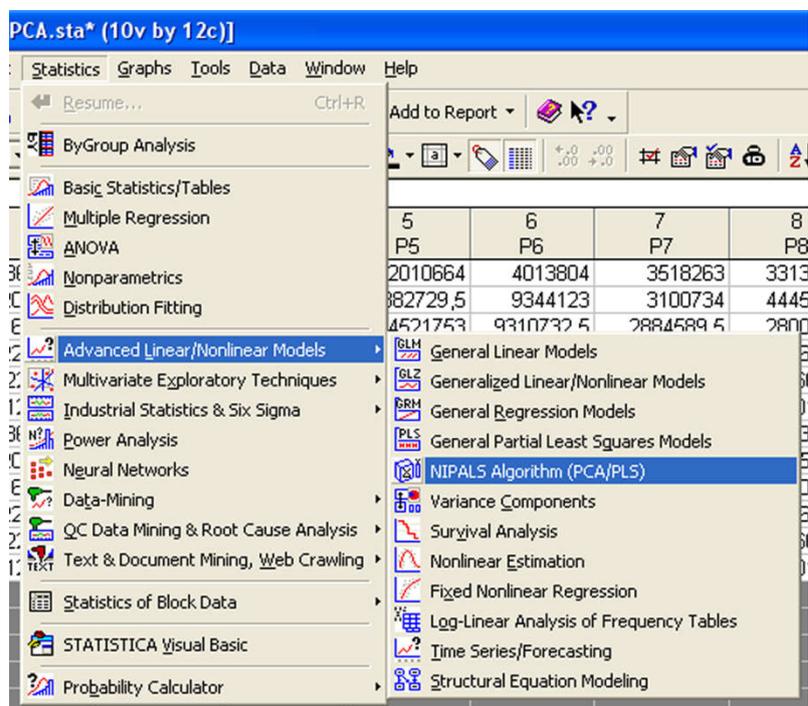
Se debe partir de una base de datos de al menos 6 casos para cada variable:

	1 P1	2 P2	3 P3	4 P4	5 P5	6 P6	7 P7	8 P8	9 P9	10 P10
1	5200244,5	8860926,5	1495715	3481234,5	2010664	4013804	3518263	3313435,5	3011273,5	12280191,5
2	12896841	20909373	3859454,5	7998664	3882729,5	9344123	3100734	4445768,5	2451264	14567109,5
3	9392377	16718588	2929158	7955246	4521753	9310732,5	2884589,5	2800286,5	3043237,5	12089796,5
4	14237015,5	22272116	3365550	9241039,5	5253521,5	10558702,5	3283458,5	3976792,5	2693314,5	16023127,5
5	10822487,5	20228743,5	2739950,5	8477818	3676153	9407281,5	4012599,5	4601469	2668711	13839914,5
6	13525761,5	22128593,5	3338561	10252178	6733113	11693527,5	4415191	5014702	3220275	17490506
7	5200244,5	8860926,5	1495715	3481234,5	2010664	4013804	3518263	3313435,5	3011273,5	12280191,5
8	12896841	20909373	3859454,5	7998664	3882729,5	9344123	3100734	4445768,5	2451264	14567109,5
9	9392377	16718588	2929158	7955246	4521753	9310732,5	2884589,5	2800286,5	3043237,5	12089796,5
0	14237015,5	22272116	3365550	9241039,5	5253521,5	10558702,5	3283458,5	3976792,5	2693314,5	16023127,5
1	10822487,5	20228743,5	2739950,5	8477818	3676153	9407281,5	4012599,5	4601469	2668711	13839914,5
2	13525761,5	22128593,5	3338561	10252178	6733113	11693527,5	4415191	5014702	3220275	17490506

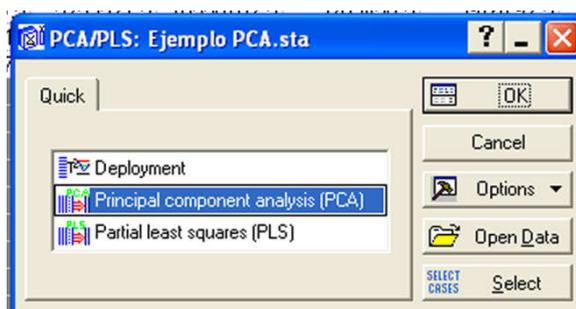
En las barra de herramientas, se abre la pestaña Statistics:



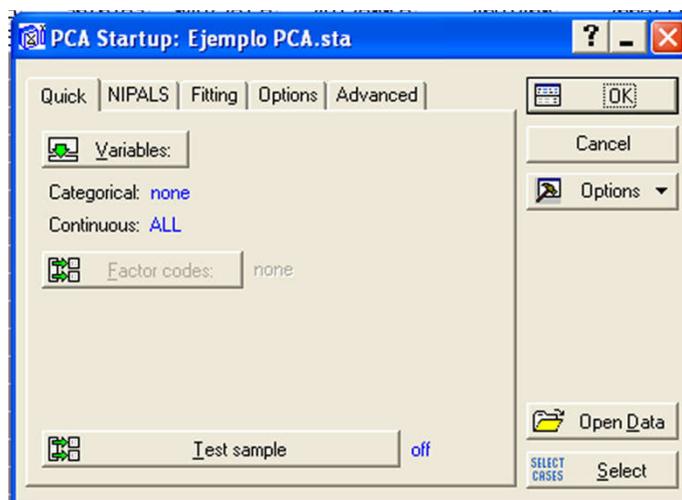
Se busca la opción “Advanced Linear/Nonlinear Models”, sub opción “NIPALS Algorithm (PCA/PLS)”



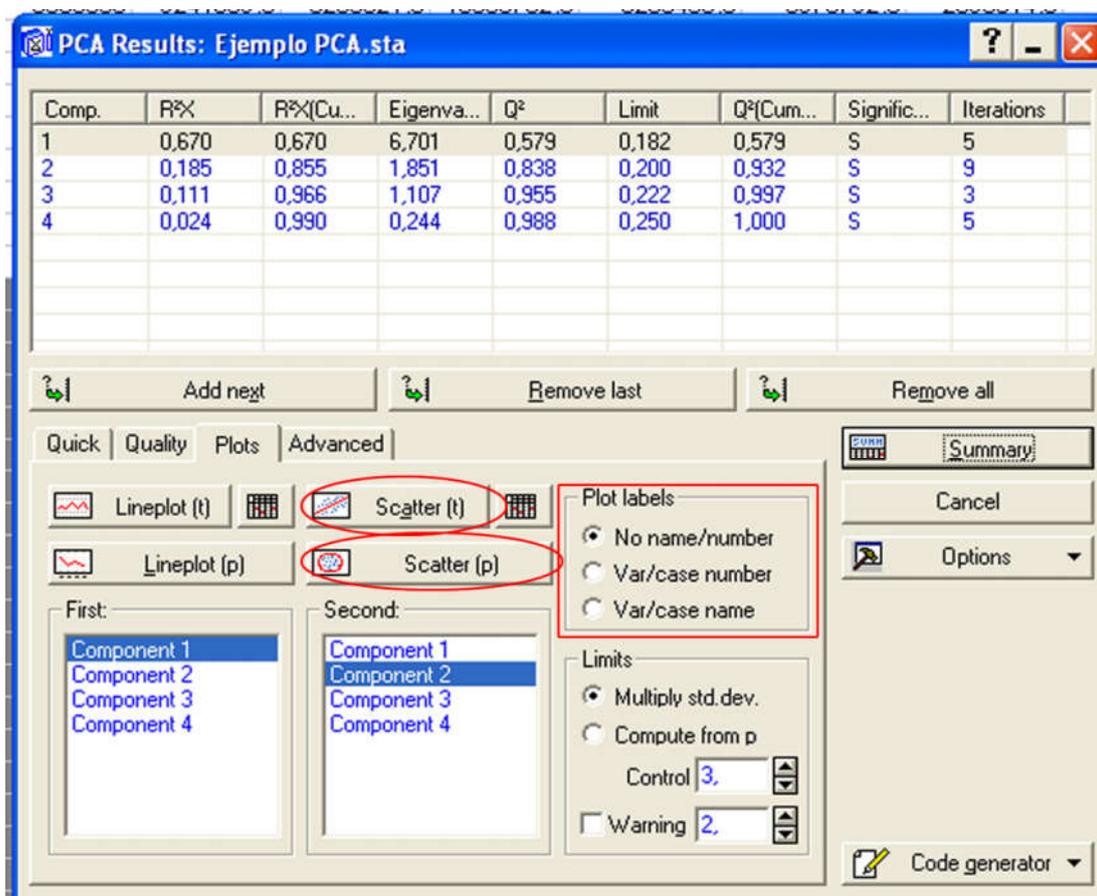
Se desplegará un cuadro donde se debe seleccionar la opción “Principal component analysis (PCA)” y confirmar con el ok.



Se desplegará un nuevo cuadro, donde se seleccionarán las variables de interés en la opción “Variables”, y se acepta con el ok.



Se desplegará un cuadro donde estará el resultado del análisis

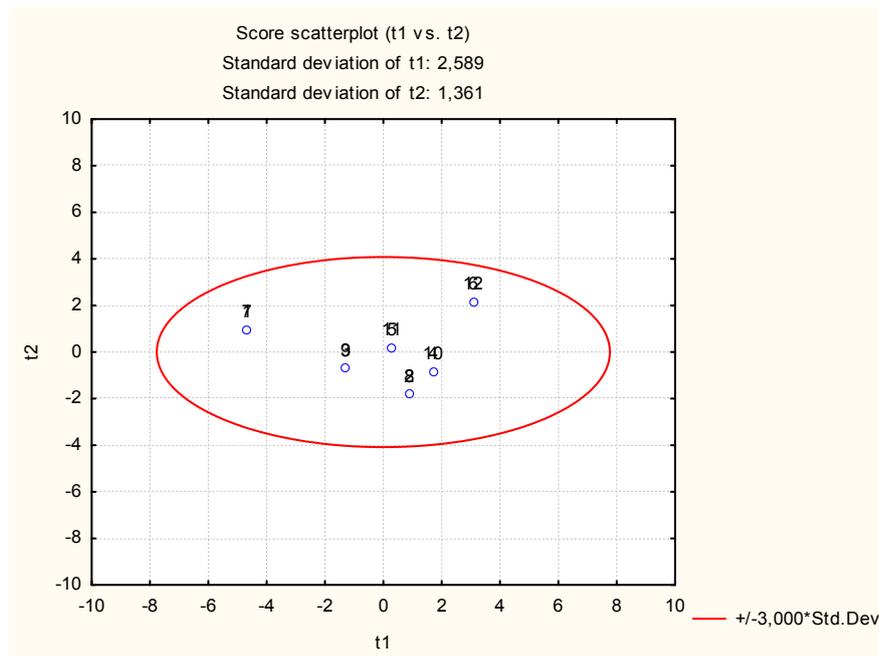


En este caso observamos que el análisis arrojó cuatro componentes significativos, que explicaron el 99% de la varianza ( $R^2X$  Cumulative).

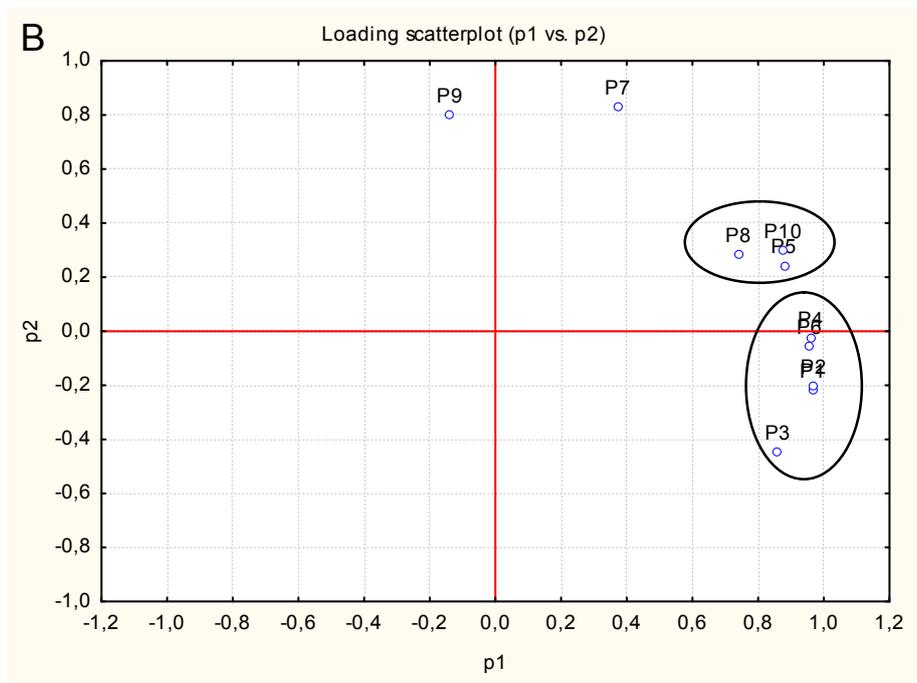
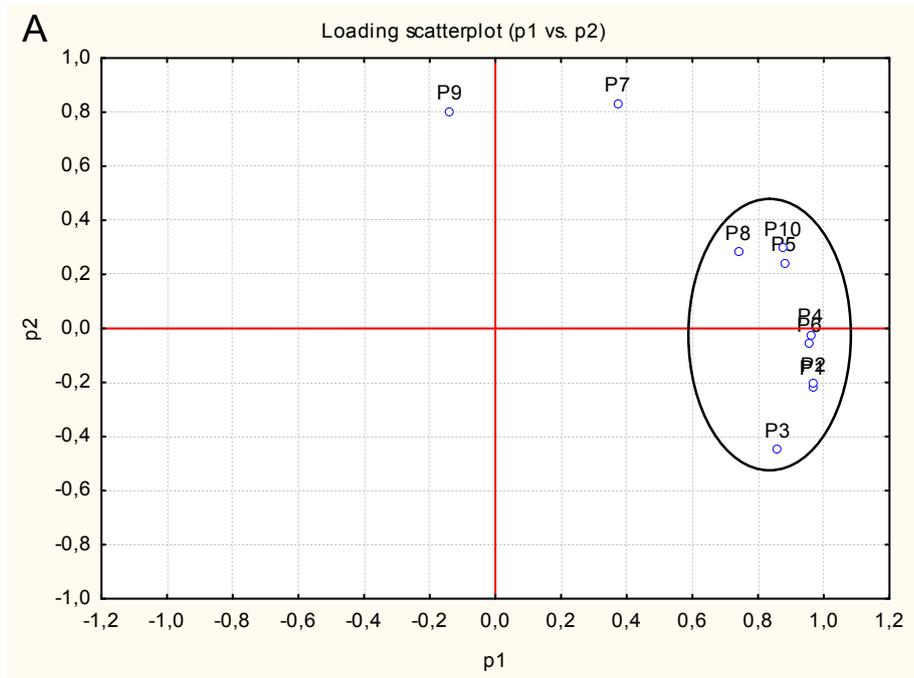
En el ángulo inferior izquierdo de la ventana se visualizan los componentes generados, cuatro en este caso, los cuales se seleccionarán de acuerdo a la combinación a analizar, para generar su representación gráfica. Si se quiere que en el gráfico figuren los nombres de las variables o los casos, se debe seleccionar la opción en el recuadro "Plot labels".

La opción "Scatter (t)" nos permite ver la distribución de los casos, mientras que la opción "Scatter (p)" nos grafica los vectores de los componentes para cada variable.

En el siguiente gráfico se observa la distribución de los casos analizados, determinándose de forma automática el límite de confianza de tres desvíos estándar, representado por el óvalo. Si el valor de confianza de interés se desea distinto, se cambia en la opción "Limit".



La determinación de los límites de los agrupamientos es una función del operador, de acuerdo a la temática bajo estudio, para el siguiente gráfico se muestran dos decisiones distintas A y B.



## **ANEXO II: MEDIOS DE CULTIVO**

### **Agar afrecho**

Para preparar este medio se colocan 40 g de afrecho de trigo en 500 mL de agua destilada y se hierve por 1 h. Luego se filtra con gasa y se recupera el líquido. Se agregan 20 g de agar y se lleva a un volumen final de 1 L. Se esteriliza en autoclave a 121°C y 1 atm de presión, durante 15 min.

### **Agar agua 2% (WA)**

Para preparar este medio se agregan 20 g de agar a 1 L de agua destilada. Se esteriliza en autoclave a 121°C y 1 atm de presión, durante 15 min.

### **Agar hoja de clavel (CLA)**

Para preparar este medio se prepara agar agua 2% (20 g de agar en 1 L de agua destilada) y se colocan piezas de hoja de clavel estériles de 5 mm<sup>2</sup>. Una vez gelificado, se añade con una pinza estéril una pieza cada 2 mL de medio, siendo así 5 o 6 piezas en una caja de Petri de 60 mm de diámetro y 11 o 12 en una caja de Petri de 100 mm de diámetro.

### **Agar papa dextrosa (PDA)**

Para preparar este medio se puede partir de papas naturales o de puré deshidratado. Si se parte de papas naturales, se debe lavar 300 g de papa, cortarla en trozos (no es necesario pelarlas) y hervirlas hasta comprobar que estén blandas. Si se parte del deshidratado de papa, se colocan 300 g de polvo en 1 L de agua y se hierve por 30 min. Luego se las prensa entre tres o cuatro capas de gasa y recuperar el filtrado en un matraz. Se agregan 20 g de agar y 20 g de dextrosa y llevar a un volumen final de 1 L. Se esteriliza en autoclave a 121°C y 1 atm de presión, durante 15 min.

### **Agar sintético nutritivo (SNA)**

Este medio es pobre en nutrientes, por lo que se promueve la esporulación. Para prepararlo se agregan 1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g de KNO<sub>3</sub>, 0,5 g de MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0,5 g de KCl, 0,2 g de glucosa, 0,2 g de sacarosa, 20 g de agar en 1 L de agua destilada. Se esteriliza en autoclave a 121°C y 1 atm de presión, durante 15 min.

## ANEXO IV: PRODUCCION CIENTIFICA

A continuación se enumeran las publicaciones obtenidas a partir de la presente tesis doctoral y de colaboraciones realizadas durante su transcurso:

Leonel M. Ortega, Gisele E. Kikot, Andrea L. Astoreca and Teresa M. Alconada (2013). "Screening of *Fusarium graminearum* Isolates for Enzymes Extracellular and Deoxynivalenol Production." *Journal of Mycology*. 2013:1-7. doi:10.1155/2013/358140.

Leonel M. Ortega, Gisele E. Kikot, Natalia L. Rojas, Laura López, Andrea L. Astoreca, Teresa M. Alconada (2014). "Characterization and identification using proteomic tools of a polygalacturonase from *Fusarium graminearum*." *Journal of Basic Microbiology*. 53:1-8.

Verónica F. Consolo, Leonel M. Ortega, Graciela Salerno, Andrea L. Astoreca, Teresa M. Alconada (2015). "Genetic diversity analysis of *Fusarium graminearum* isolates associated to Fusarium Head Blight from diverse geographical locations of Argentina." *Revista Argentina de Microbiología*. 47(3): 245-250.

Leonel M. Ortega, María I. Dinolfo, Andrea L. Astoreca, Enrique J. Alberione, Sebastián A. Stenglein, Teresa M. Alconada (2016). "Mycotoxin and molecular characterization of *Fusarium graminearum* isolates obtained from the experimental fields belonging to national wheat breeding program in Argentina." *Mycological Progress*. 15(1): 1-8.

Enrique J. Alberione, Leonel M. Ortega, Nicolás Salines, Andrea L. Astoreca, Teresa M. Alconada (2016). "Genetic behavior of different wheat genotypes against *Fusarium graminearum*." *Agrociencia Mexicana*. 50:335-346.

Andrea L. Astoreca, Leonel M. Ortega, Cecilia Fígoli, Miguel Cardós, Laura Cavaglieri, Alejandra Bosch, Teresa M. Alconada (2016). "Comparative study of alternative techniques for deoxynivalenol determination in wheat samples

for commercial products.” World Mycotoxin Journal. ISSN 1875-0796 online, DOI 10.3920/WMJ2016.2121.

**Capítulos de libro:**

Teresa M. Alconada, Leonel M. Ortega, Andrea L. Astoreca, Clara Pritsch (2013) “Proteomic to analysis wheat-Fusarium graminearum interaction.” In Fusarium Head Blight in Latin America. Springer-Verlag New York, LLC. Alconada Teresa M. and Chulze Sofía N. (Eds) ISBN: 978-94-007-7090-4 (Print) 978-94-007-7091-1 (Online) pp 123-140.

Andrea L. Astoreca, Teresa M. Alconada, Leonel M. Ortega. (2013) “Fusarium Mycotoxins. An Overview of Chemical.haracterization and Techniques for its Determination from Agricultural Products.” In Fusarium Head Blight in Latin America. Springer-Verlag New York, LLC. Alconada Teresa M. and Chulze Sofía N. (Eds) ISBN: 978-94-007-7090-4 (Print) 978-94-007-7091-1 (Online) pp 75-96.