



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y
FORESTALES**

Tesis Doctoral

**INTERACCIÓN DE *FUSARIUM*
EN TRIGO Y CEBADA BAJO
CONDICIONES DE TEMPERATURA
ACTUALES Y PROYECTADAS A FUTURO**

Ing. Agr. Martínez Mauro

Dr. Stenglein Sebastián Alberto

Director

Dr. Biganzoli Fernando

Co-Director

Dra. Mónaco Cecilia

Asesora Académica



Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES

SECRETARIA DE POSGRADO

Tesis Doctoral para optar al grado académico de Doctor de la Facultad
de Ciencias Agrarias y Forestales.
Acreditada por CONEAU. Categoría A. Res. 492/12.

Trabajo de Tesis Doctoral

INTERACCIÓN DE *FUSARIUM EN*
TRIGO Y CEBADA BAJO
CONDICIONES DE TEMPERATURA
ACTUALES Y PROYECTADAS A FUTURO

Ing. Agr. Martínez Mauro

Tesista

Dr. Sebastián A. Stenglein

Director

Dr. Biganzoli Fernando

Codirector

Comité Evaluador:

Dr. Barros, Germán

Dra. Rondanini, Deborah

Dra. Wolcan, Silvia

A mi compañera de vida, Flor.

A mis padres y mis hermanos.

A mi familia , amigos y compañeros.

A mi gran amigo, Mauro.

AGRADECIMIENTOS

✓ A mi director, Dr. Stenglein Sebastián, por ser una gran persona y un gran profesional, por darme la oportunidad de trabajar junto a él. Por la dedicación, el tiempo, la buena predisposición y el buen humor de siempre. Por trasmitirme su pasión y visión. Por confiar en mí, y delegarme con total confianza y seguridad la conducción de diversos ensayos. Por mostrarme el camino en este nuevo desafío, guiándome y posibilitando así sortear todos los obstáculos encontrados durante el desarrollo del mismo.

✓ A mi co-director, Dr. Biganzoli Fernando, por el tiempo brindado, el compromiso y la ayuda brindada durante todos estos años, en lo que respecta al diseño y análisis estadístico, junto con el asesoramiento y las buenas sugerencias aportadas. Por ser un excelente profesional y una gran persona.

✓ A todos mis compañeros del BIOLAB, por la ayuda incondicional y desinteresada brindada durante todo el transcurso de mi doctorado. Por guiarme en mis comienzos tanto en el diseño de ensayos como en la redacción de artículos y análisis de datos. Por trabajar codo a codo, sin importar día, horario o condiciones climáticas, compartiendo muy buenos momentos durante extensas jornadas laborales, cursos, congresos, muestreos, etc. Por enseñarme, que el éxito colectivo, el trabajo en equipo y la unión están siempre por sobre los logros individuales e intereses personales.

✓ Al Dr. Cogliatti Maximiliano y a la Dra. Lázaro Laura por permitirme el desarrollo como docente universitario, mostrándome el camino y guiándome en este nuevo recorrido.

✓ Por las diversas contribuciones al presente trabajo: a la Dra. Mónaco Cecilia, Prof. Oyarzabal Mariana, Ing. Agr. (Mg.Sc.) Moreyra Federico, Dr. García Guillermo, Dra. Fernández Pinto Virginia, Dra. Ramírez Albuquerque Diana, Dr. Cristos Diego y Dr. Dante Rojas.

✓ A todas aquellas personas que desinteresadamente prestaron su ayuda en tareas de vital importancia para la continuidad de los ensayos, tales como la preparación del suelo, la siembra, control de malezas, cuantificación de síntomas, cosecha, trilla, armado de carpas y procesamiento de muestras. Por los consejos y la ayuda prestada, por los buenos momentos compartidos, que generaron un muy buen clima de trabajo.

✓ A la Facultad de Agronomía de Azul, por los buenos años que pasé en dicha institución y por darme la posibilidad de completar mis estudios universitarios durante todos estos años. A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 213/2015) por financiar este trabajo y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

✓ A todas aquellas personas que de alguna manera colaboraron y me ayudaron en el transcurso de estos años, para que hoy pueda estar en esta instancia.

Declaración de Conflictos de Intereses

Declaro que el presente material no ha sido presentado, en forma parcial o total, como una tesis en esta u otra institución. Declaro que el material incluido a lo largo de este manuscrito es, a mi mejor saber y entender, original y producto del trabajo realizado durante el transcurso de las actividades doctorales desarrolladas.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	19
ABSTRACT.....	21
CAPÍTULO I	23
Introducción general	23
1. INTRODUCCIÓN	24
1.1. Cebada: conceptos generales	26
1.1.1. Características generales	26
1.1.2. Panorama mundial.....	29
1.1.3. Panorama nacional	31
1.1.4. Importancia y usos de la cebada cervecera.	33
1.2. Trigo: conceptos generales	35
1.2.1. Origen y dispersión.	35
1.2.2. Panorama mundial.....	36
1.2.3. Panorama nacional	39
1.2.4. Importancia y usos del trigo pan.....	41
1.2.5. Cebada y trigo: aspectos en común.	45
1.3. Generalidades de la fusariosis de la espiga.....	48
1.3.1. Sintomatología.	50
1.3.2. Agente etiológico.	55
1.3.3. <i>Fusarium graminearum</i> y <i>Fusarium poae</i>	57
1.3.4. Ciclo biológico y tipos de inóculo.	60
1.3.5. Manejo agronómico de la FE.....	63
1.3.6. Daños causados por la fusariosis de la espiga.....	66
1.3.7. Antecedentes de la fusariosis de la espiga en el mundo y en la Argentina.....	69
1.4. Micotoxinas.....	73
1.4.1. Tricotecenos	75
1.4.2. Biosíntesis de los tricotecenos	77
1.4.3. Micotoxinas de interés producidas por <i>Fusarium graminearum</i>	79
1.4.4. Micotoxinas de interés producidas por <i>Fusarium poae</i>	82
1.5. Cambio climático global	84
1.5.1. Panorama mundial.....	84
1.5.2. Panorama nacional y escenarios futuros	87
1.5.3. Impacto del cambio climático en la agricultura	91

HIPÓTESIS	92
OBJETIVOS GENERALES Y PARTICULARES	93
CAPÍTULO II: Materiales y Métodos Generales	94
2.1. Sitio experimental	95
2.2. Conducción general de los ensayos a campo.	96
2.2.1. Ensayos de interacción <i>F. graminearum</i> / <i>F. poae</i> en cebada/trigo	97
2.2.2. Ensayo a campo con aumento de la temperatura nocturna.....	97
2.3. Aislamientos de <i>Fusarium</i> utilizados.	100
CAPÍTULO III: Interacción de <i>Fusarium graminearum</i> y <i>F. poae</i> en cebada cervecera (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	104
3.1. Introducción.	105
3.2. Materiales y Métodos.	109
3.2.1. Genotipos de cebada.....	109
3.2.2. Conducción del ensayo y diseño experimental	110
3.2.3. Medición de variables.....	111
3.2.4. Análisis estadístico	115
3.3. Resultados	116
3.3.1. Condiciones climáticas	116
3.3.2. Parámetros de la enfermedad.....	117
3.3.3. Parámetros de rendimiento, proteína y germinación.....	120
3.3.4. Composición proteica.....	124
3.3.5. Contaminación con micotoxinas.....	128
3.4. Discusión.	130
CAPÍTULO IV: Interacción de <i>Fusarium graminearum</i> y <i>F. poae</i> en trigo pan (<i>Triticum aestivum</i> L.)	138
4.1. Introducción.	139
4.2. Materiales y Métodos.	142
4.2.1. Genotipos de trigo.	142
4.2.2. Conducción del ensayo y diseño experimental	143
4.2.3. Medición de variables.....	144
4.2.4. Análisis estadístico	147
4.3. Resultados	149
4.3.1. Condiciones climáticas	149
4.3.2. Parámetros de la enfermedad.....	151
4.3.3. Parámetros de rendimiento, proteína y germinación.....	153
4.3.4. Composición proteica.....	157

4.3.5. Contaminación con micotoxinas.....	163
4.4. Discusión.	165
CAPÍTULO V: Efecto del aumento de la temperatura nocturna y su impacto sobre la interacción <i>Fusarium</i> -cebada/trigo.....	173
5.1. Introducción.	174
5.2. Materiales y métodos.	178
5.2.1. Genotipos utilizados.	178
5.2.2. Conducción del ensayo y diseño experimental	179
5.2.3. Medición de variables.....	181
5.2.4. Análisis estadístico	186
5.3. Resultados.....	187
5.3.1. Condiciones climáticas.....	187
5.3.2. Parámetros de la enfermedad.....	190
5.3.3. Parámetros de rendimiento, proteína y germinación.....	193
5.3.4. Composición proteica.....	197
5.3.5. Contaminación con micotoxinas.....	202
5.4. Discusión.	205
CONCLUSIONES GENERALES	215
PERSPECTIVAS A FUTURO	222
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	224
ANEXO I.....	263
Norma de comercialización de cebada cervecera	264
Norma de comercialización de trigo pan	265
ANEXO II.....	2637
Medios de cultivos	267
Soluciones.....	268
ANEXO III: Artículos publicados o en revisión.....	269

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. A) Cebada de dos hileras y cebada de seis hileras. B) Estructura de un grano de cebada	31
Figura 2. Origen del trigo pan (<i>Triticum aestivum</i> L.)	39
Figura 3. Producción nacional de trigo pan.....	44
Figura 4. Esquema de un grano de trigo pan	45
Figura 5. Sub-regiones trigueras de la Argentina y sus respectivas fechas de siembra	49
Figura 6. A) Cultivo de trigo en antesis (Z. 60). B) Anteras extrusas, período durante el cual la espiga es susceptible a la infección. C) Escala decimal Zadoks para trigo pan (Zadoks et al., 1974).....	53
Figura 7. A) Determinación del nicho ecológico de las especies fúngicas, en función de la influencia de factores bióticos, abióticos y espacio geográfico. B) Factores que determinan la infección y el desarrollo de las enfermedades (“Triángulo de las enfermedades”).....	54
Figura 8. Síntomas de FE en granos de trigo. A) Síntomas observados en la espiga. B) Síntomas observados en las espiguillas .C) Granos infectados y granos sanos	55
Figura 9. A-B) Macroconidios de <i>F. graminearum</i> y cultivo en APG (2%), respectivamente. C-D) Microconidios de <i>F. poae</i> y cultivo en APG (2%), respectivamente	62
Figura 10. Ciclo biológico de <i>Fusarium</i> spp.....	63
Figura 11. Observación de síntomas y daños de <i>F. graminearum</i> y <i>F. poae</i> en espigas de cebada (cv. Stander).....	72
Figura 12. Mapas de predicción de la FE en la región pampeana durante la campaña agrícola 2018/2019. A) Fecha de floración temprana (fines de octubre). B) Fecha de floración media (inicios de noviembre). C) Fecha de floración tardía (primer quincen de noviembre)	75
Figura 13. Vía biosintética para la producción de tricotecenos en <i>Fusarium</i>	81
Figura 14. Estructura química de la molécula de deoxinivalenol	82
Figura 15. Estructura química de la molécula de nivalenol	85
Figura 16. A) Incremento de la concentración de GEI en la atmósfera. B) Incremento de la temperatura de la superficie terrestre a nivel mundial. C) Aumento del nivel del mar	89

- Figura 17. Temperaturas proyectadas bajo dos escenarios diferentes A-B) Futuro cercano (2015-2039) y futuro lejano (2075-2099) bajo escenario RCP 4.5. C-D) Futuro cercano (2015-2039) y futuro lejano (2075-2099) bajo escenario RCP 8.5 92
- Figura 18. Precipitaciones proyectadas bajo dos escenarios diferentes A-B) Futuro cercano (2015-2039) y futuro lejano (2075-2099) bajo escenario RCP 4.5. C-D) Futuro cercano (2015-2039) y futuro lejano (2075-2099) bajo escenario RCP 8.5 93
- Figura 19. A) Imagen satelital de los ensayos experimentales durante la campaña agrícola 2016/2017. B) Vista aérea del sitio experimental desde un dron agrícola (Noviembre 2017). En rojo: suelo desnudo. En verde: cultivo de trigo en floración.....98
- Figura 20. Ensayos de interacción en trigo y cebada, en diferentes estadios fenológicos: A) Macollaje. B) Madurez fisiológica. Ensayos de aumento de temperatura: C) Registrador de datos, ubicado a la altura de la espiga (“datalogger”, Cavadevices©). D) Equipos aditivos de control de temperatura (Cavadevices©)103
- Figura 21. A). Aislamientos de *F. poae* utilizados para la producción del inóculo en medio de cultivo APG (2%). B) Preparación del medio líquido de cultivo (CMC) para el crecimiento de los aislamientos de *F. graminearum*. C) Aislamientos de *F. graminearum* utilizados para la producción del inóculo en medio de cultivo APG (2%) 105
- Figura 22. A) Estado fenológico de aparición de aristas en plantas de cebada cervecera (*Hordeum vulgare* L.). B) Plena floración (antesis) en plantas de trigo pan (*Triticum aestivum* L.). C) Inoculación por asperjado con la suspensión de conidios (1×10^5 conidios/mL) hasta “punto de goteo” 106
- Figura 23. A) Granos de cebada malteados e infectados por *Fusarium* spp. B) Corte transversal. Se puede apreciar el crecimiento micelial (rosado) y la degradación del endosperma almidonoso..... 110
- Figura 24. Diseño experimental de los ensayos realizados en cebada durante los años 2014, 2015 y 2016. Fp: tratamiento con *F. poae*; Fg: tratamiento con *F. graminearum*, Fg/Fp: tratamiento con *F. poae* + *F. graminearum* 113
- Figura 25. A). Cuantificación de síntomas de FE al día 21 pos-inoculación en espiga de cebada cervecera. B) Fracción de gel de hordeina en poliacrilamida (SDS-PAGE). C) Granos de cebada sobre zaranda de 2,75 mm luego de 5 minutos de agitación..... 117
- Figura 26. Parámetros de la FE para los tres años evaluados, según los diferentes tratamientos. A) Incidencia. B) Severidad. C) FHB index..... 121
- Figura 27. Parámetros de la FE para los tres años evaluados, según los diferentes genotipos evaluados. A) Incidencia. B) Severidad. C) FHB index 122
- Figura 28. Degradación de las diferentes fracciones proteicas en granos de cebada sintomáticos. Se observan fracciones de geles de poliacrilamida (SDS-

- PAGE; T% = 13.5%) que muestran la abundancia relativa (intensidad de pxeles) y el patrón de bandas para las fracciones de D-hordeinas, C-hordeinas y B-hordeinas. Tratamientos: FP₁FG₀ (*F. poae*); FP₀FG₁ (*F. graminearum*), FP₁FG₁ (*F. poae* + *F. graminearum*) y FP₀FG₀ (tratamiento control)129
- Figura 29. Degradación de las diferentes fracciones proteicas de granos sintomáticos de cebada cervecera. Valores de abundancia relativa (intensidad de pixel). A) D-hordeinas. B) C-hordeinas. C) B-hordeinas. D). Contenido total de hordeinas. Tratamientos: FP₁FG₀ (*F. poae*); FP₀FG₁ (*F. graminearum*), FP₁FG₁ (*F. poae* + *F. graminearum*) y FP₀FG₀ (tratamiento control) 131
- Figura 30. A) Siembra de ensayo a campo durante el año 2014. B) Emergencia del cultivo. Se puede apreciar el diseño en parcelas divididas con cuatro bloques. C) Macollaje y encañazón del cultivo. D) Inoculación del cultivo en el estadio fenológico Z.60-Z.65 (50% antesis) con los cuatro inóculos correspondientes147
- Figura 31. Diseño experimental de los ensayos realizados en trigo pan durante los años 2014, 2015 y 2016. Fp: tratamiento con *F. poae*; Fg: tratamiento con *F. graminearum*, Fg/Fp: tratamiento con *F. poae* + *F. graminearum* 151
- Figura 32. Condiciones climáticas para los años evaluados: 2014, 2015 y 2016. Izquierda: Condiciones de humedad relativa (línea punteada) y precipitaciones (barras). Derecha: Temperaturas máximas, medias y mínimas, respectivamente153
- Figura 33. Parámetros de la FE para los diferentes años evaluados, según los diferentes tratamientos. A) Incidencia. B) Severidad. C) FHB index 155
- Figura 34. Degradación de las diferentes subunidades de proteínas en granos de trigo con síntomas de FE. A) Abundancia relativa y fracciones de geles de poliacrilamida (SDS-PAGE; T% = 13.5%) que muestran el patrón de bandas para las gluteninas de alto peso molecular (HMW) y de bajo peso molecular (LMW). B) Abundancia relativa y fracciones de geles de poliacrilamida (SDS-PAGE; T% = 13.5%) que muestran el patrón de bandas en las ω -gliadinas y α,β,γ -gliadinas. Tratamientos: *F. poae* (FP₁FG₀), *F. graminearum* (FP₀FG₁), *F. poae* + *F. graminearum* (FP₁FG₁) y tratamiento control (FP₀FG₀)..... 163
- Figura 35. Abundancia relativa de cada subunidad de proteína para diferentes tratamientos en granos sintomáticos de trigo. Tratamientos: *F. poae* (FP₁FG₀), *F. graminearum* (FP₀FG₁), (FP₁FG₁) y tratamiento control (FP₀FG₀). GLU: gluteninas; GLI: gliadinas; HMW: gluteninas de alto peso molecular; LMW: gluteninas de bajo peso molecular; ω -GLI: ω -gliadinas; $\alpha\text{-}\beta\text{-}\gamma$ -GLI: α,β,γ -gliadinas. Media \pm SEM.. Las columnas con letras diferentes son estadísticamente diferentes según el test de Tukey (p<0,05).165

Figura 36. Diferencias significativas para la contaminación con DON entre los diferentes genotipos evaluados.....	167
Figura 37. Mapa de predicción de FE para la región pampeana proyectadas para fines de siglo.....	180
Figura 38. Espigas de Apogee (A) y Stander (B) con síntomas característicos de FE	181
Figura 39. A) Armado de las estructuras de las carpas de madera, con listones de <i>Eucalipto saligna</i> de 2 x 2 plg y 2 x 1 plg (1,5 m ancho x 3 m de largo x 1,5m alto). B) Conexión de los equipos aditivos con los respectivos calentadores y los sensores de temperatura. C) Disposición del tratamiento “Carpa + Temperatura” sobre el cultivo. D) Colocación del nylon (200 µm) y finalización del armado	182
Figura 40. Diseño experimental de los ensayos de calentamiento nocturno para trigo (izquierda) y cebada (derecha) durante los años 2016, 2017 y 2018. Fp: tratamiento con <i>F. poae</i> ; Fg: tratamiento con <i>F. graminearum</i>	183
Figura 41. A) Evaluación de síntomas en trigo, luego de 21 dpi. B) Muestras de cebada trilladas luego de madurez de fisiológica. C-D) Energía y poder germinativo en granos de trigo. Se observan granos con síntomas de FE y crecimiento micelial (rosa). E) Determinación de peso de mil granos. F) Geles de poliacrilamida (SDS-PAGE, T=13,5%) en electroforesis vertical	187
Figura 42. Valores promedios de temperatura nocturna (°C) y precipitaciones (mm), para los diferentes tratamientos evaluados tanto en trigo como cebada. Los datos mostrados corresponden al período desde inoculación hasta 21 dpi, durante los años 2016, 2017 y 2018	191
Figura 43. Valores de FHB index e ISK para cada tratamiento de <i>Fusarium</i> spp. y su respectiva interacción (tratamiento carpas y año), en cebada (izquierda) y trigo (derecha). Las columnas con letras diferentes son estadísticamente diferentes según el test de Tukey (p<0,05).....	196
Figura 44. Degradación de las diferentes fracciones proteicas en granos de cebada (cv. Stander). Se observan fracciones de geles de poliacrilamida (SDS-PAGE; T% = 13,5%) que muestran la abundancia relativa (intensidad de pixeles) y el patrón de bandas para las fracciones de D-hordeinas, C-hordeinas y B-hordeinas. Tratamientos: Carpas (CT) y Testigo (T). Inoculos: <i>F. graminearum</i> , <i>F. poae</i> y tratamiento control.....	202
Figura 45. Degradación de las diferentes fracciones de gliadinas en granos de trigo (cv. Apogee). Se observan fracciones de geles de poliacrilamida (SDS-PAGE; T% = 13,5%) que muestran la abundancia relativa (intensidad de pixeles) y el patrón de bandas para las fracciones de ω-gliadinas y α,β,γ-gliadinas. Inóculos: <i>F. graminearum</i> , <i>F. poae</i> y tratamiento control.....	203
Figura 46. Degradación de las diferentes fracciones de gluteninas en granos de trigo (cv. Apogee). Se observan fracciones de geles de poliacrilamida (SDS-	

PAGE; T% = 13,5%) que muestran la abundancia relativa (intensidad de pixeles) y el patrón de bandas para las fracciones de gluteninas de bajo (LMW) y de alto peso molecular (HMW). Inóculos: <i>F. graminearum</i> , <i>F. poae</i> y tratamiento control.....	204
Figura 47. Diferencias significativas para la contaminación con micotoxinas (DON y 3-ADON) en granos de cebada (cv. Stander). Izquierda: diferencias entre los tratamientos carpas. Derecha: diferencia entre los distintos años evaluados	206
Figura 48. Diferencias significativas para la contaminación con micotoxinas (DON y 3-ADON) en granos de trigo (cv. Apogee). Izquierda: diferencias entre los tratamientos carpas. Derecha: diferencia entre los distintos años evaluados	208
Figura 49. Esquema general del presente plan de trabajo, junto con las hipótesis planteadas, los resultados principales obtenidos y las conclusiones generales.....	221

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Producción y uso de cebada a nivel mundial durante la campaña agrícola 2018/2019.....	33
Tabla 2. Producción y exportación de cebada en la Argentina durante las últimas 10 campañas	35
Tabla 3. Producción y uso de trigo a nivel mundial durante la campaña agrícola 2018/2019.....	40
Tabla 4. Aislamientos de <i>Fusarium</i> utilizados y su potencial toxicogénico	104
Tabla 5. Valores promedios de temperatura, humedad relativa y precipitaciones (acumuladas e históricas) durante los años 2014, 2015 y 2016, más específicamente durante el período floración-cosecha	119
Tabla 6. Análisis de la varianza para diferentes los parámetros evaluados. EG: energía germinativa; PG: poder germinativo; CP: concentración de proteínas; Cal: calibre bajo zaranda de 2,2 mm; PMG: peso de mil granos; g.l.: grados de libertad; Chisq: Test de Wald-Chi cuadrado tipo II	124
Tabla 7. Análisis de varianza para las diferentes fracciones de proteína en granos de cebada sintomáticos. g.l.: grados de libertad; Chisq: Test de Wald-Chi cuadrado tipo II	128
Tabla 8. Contaminación de las muestras de granos de cebada con deoxinivalenol (DON), 3-acetil deoxinivalenol (3-ADON), 15-acetil deoxinivalenol (15-ADON) y nivalenol (NIV) en cinco genotipos de cebada durante los años 2014, 2015 y 2016	132
Tabla 9. Genotipos de trigo seleccionados para realización de los experimentos.....	145
Tabla 10. Análisis de varianza para las diferentes variables analizadas. EG: energía germinativa; PG: poder germinativo; RG: rendimiento de grano; CP: concentración de proteínas; SDSS: prueba de sedimentación; PMG: peso de mil granos; GH%: gluten húmedo; g.l.: grados de libertad; Chisq: Test de Wald, tipo II.	157-159

Tabla 11. Sub-unidades de gluteninas de alto peso molecular (HMW) para cada genotipo, y su respectivo grupo de calidad (GDC)	160
Tabla 12. Análisis de la varianza para los diferentes parámetros de calidad de grano. GLI: gliadinas; GLU: gluteninas; HMW: gluteninas de alto peso molecular; LMW: gluteninas de bajo peso molecular; ó-GLI: ó-gliadinas; α , β , γ -GLI: α,β,γ -gliadinas; g.l.: grados de libertad; Chisq: Test de Wald-Chi cuadrado tipo II.....	161-162
Tabla 13. Contaminación de granos de trigo con deoxinivalenol (DON), 3-acetil deoxinivalenol (3-ADON), 15-acetil deoxinivalenol (15-ADON) y nivalenol (NIV) en cinco genotipos de trigo durante los años 2014, 2015 y 2016.....	167
Tabla 14. Análisis de varianza para las diferentes variables analizadas. EG: energía germinativa; PG: poder germinativo; PMG: peso de mil granos; RG: rendimiento de grano; CP: concentración de proteínas; Cal: calibre de granos (>2,5 mm); BZ: granos bajo zaranda de 2,2 mm; GH%: gluten húmedo; SDSS: prueba de sedimentación; g.l.: grados de libertad; Chisq: Test de Wald, tipo II.	198-199
Tabla 15. Análisis de la varianza para los diferentes parámetros de calidad de grano. GLI: gliadinas; GLU: gluteninas; HMW: gluteninas de alto peso molecular; LMW: gluteninas de bajo peso molecular; ó-GLI: ó-gliadinas; α , β , γ -GLI: α,β,γ -gliadinas; g.l.: grados de libertad; Chisq: Test de Wald-Chi cuadrado tipo II.....	201

SIGLAS Y ABREVIATURAS

ADE	Agua destilada estéril
α, β, γ-gli	Alfa, beta y gamma gliadinas
a.C.	Antes de Cristo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
a.m.	Antes del mediodía
APG	Agar papa glucosado
ARN	Ácido ribonucleico
BCR	Bolsa de Comercio de Rosario
BEA	Beauvericinas
CAA	Código Alimentario Argentino
CERE	Centro de Economía Regional
CIMA	Centro de Investigaciones del Mar y la Atmósfera
cm	Centímetros
CMC	Carboximetilcelulosa
CYMMIT	Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo
DAS	Diacetoxiscirpenol
DON	Deoxinivalenol
dpi	Días post-inoculación
DTT	Ditiotreitól
E.E.U.U.	Estados Unidos de América
EN	Eniáticas
FAN	<i>Free amino nitrogen</i>
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FDK	<i>Fusarium damaged kernel</i>
FUM	Fumonisinás
FUS	Fusarenona-X
g	Gramos

GDC	Grupo de calidad panadera
GEI	Gases de efecto invernadero
GLI	Gliadinas
GLU	Gluteninas
ha	Hectáreas
h	Horas
HL	Hectolitro
HMW	Sub-unidades de gluteninas de alto peso molecular
HR%	Porcentaje de humedad relativa
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
ISTA	<i>International Seed Testing Association</i>
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramos
km	Kilómetros
L	Litros
LMW	Sub-unidades de gluteninas de alto peso molecular
LOD	Limite de detección
LOQ	Limite de cuantificación
m	Metros
m²	Metros cuadrados
MAS	Monoacetocixcirpenol
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrómetros
mL	Mililitros
mm	Milímetros
min	minutos
MON	Moniliformina
Mt	Millones de Toneladas

n	Número de cromosomas
nM	nano molar
N	Tamaño de la muestra
NIV	Nivalenol
ó-gli	Omega gliadinas
pl	Plantas
p.m.	Después del mediodía
ppm	Partes por millón
p/v	Concentración peso en volumen
15-ADON	15-acetil-deoxinivalenol
RCP	<i>Representative Concentration Pathways</i>
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SCF	Comité Científico Europeo de Alimentos
SAGPyA	Secretaría de Ganadería, Agricultura y Pesca
SEM	Error estándar de la media
SIHA	Sistema Integrado de Información Agropecuaria
SMN	Servicio Meteorológico Nacional
TCA	Ácido tricloroacético
Tn	Tonelada
3-ADON	3-acetil-deoxinivalenol
U.E.	Unión Europea
UNCPBA	Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires
USDA	Departamento de Agricultura de los E.E.U.U.
v/v	Concentración volumen en volumen
X	Número básico de ploidía
Z	Estadío fenológico Zadoks
ZEA	Zearalenonas

RESUMEN

La cebada (*Hordeum vulgare* L.) y el trigo (*Triticum aestivum* L.) son dos de los cereales de invierno más importantes, tanto a nivel mundial como en la Argentina. Por otra parte, la enfermedad conocida como fusariosis de la espiga es una de las principales enfermedades de los cultivos mencionados, ocurriendo en todas las regiones cerealeras del mundo, causando daños cuantitativos, cualitativos y económicos. Actualmente, en la Argentina y en gran parte del mundo, se ha reportado que los principales agentes etiológicos de esta enfermedad son *Fusarium graminearum* y *Fusarium poae*, productores de micotoxinas tales como deoxinivalenol, sus derivados acetilados, y nivalenol, respectivamente. Con respecto a las condiciones ambientales, numerosos estudios proyectan que las mismas variarán en un futuro cercano y que la temperatura será una de las variables más afectadas por el cambio climático. Como consecuencia, esto no traería solamente aparejado problemas de variación en los rendimientos, sino un posible aumento en el riesgo de presencia de micotoxinas. Sin embargo, se desconoce cómo afectarán estos cambios la diversidad de cada especie fúngica en particular, siendo el potencial impacto del cambio climático sobre la productividad agrícola aún incierto.

Considerando los antecedentes mencionados previamente, el objetivo general del presente trabajo fue estudiar el efecto de la interacción entre *F. graminearum* y *F. poae* (especies de *Fusarium* con mayor prevalencia e interés agroalimenticio) en los dos cereales de invierno con mayor superficie sembrada en la Argentina (cebada y trigo), bajo condiciones de temperatura actuales y proyectadas a futuro. Para ello, se plantearon las siguientes hipótesis: (i) la interacción de los distintos genotipos de cebada y trigo con *F. graminearum* y *F. poae* se encuentra relacionada al genotipo y a la especie de *Fusarium* inoculada, siendo ésta significativamente mayor cuando los patógenos se inoculan de manera conjunta; (ii) el aumento de la temperatura nocturna favorece la colonización y producción de toxinas de *Fusarium*. Con este fin, en el presente trabajo se evaluó: (i) la interacción entre *F. graminearum*/*F. poae* en cebada/trigo, durante tres campañas agrícolas (2014/2015, 2015/2016 y 2016/2017) y bajo condiciones experimentales a campo; (ii) el potencial impacto del aumento de las temperaturas nocturnas (3°C) sobre la interacción *F. graminearum*/*F. poae* en cebada/trigo, durante tres campañas agrícolas (2016/2017, 2017/2018 y 2018/2019) y bajo condiciones experimentales a campo. En ambos casos, se evaluó el potencial impacto de cada patógeno sobre parámetros de patogenicidad, rendimiento, calidad de grano y contaminación con micotoxinas.

En primer lugar, los resultados obtenidos con respecto a la patogenicidad en ambos cultivos, sugieren que no existieron diferencias significativas que sustenten el sinergismo entre *F. graminearum* y *F. poae*. En cuanto al genotipo, se reportaron diferentes comportamientos con respecto a la infección por *Fusarium* y su impacto en variables de rendimiento y calidad, que podrían ser útiles para la

mejora genética en el futuro. Además, se observaron diferencias significativas en la degradación de las diferentes fracciones proteicas evaluadas, dependiendo de cada especie de *Fusarium*. Con respecto a la contaminación con micotoxinas, en ambos cultivos se registraron concentraciones de DON y 3-ADON por encima de los límites de tolerancia, aunque estas diferencias no fueron significativas, y por ende, no evidenciaron sinergismo en la producción de micotoxinas. Por lo tanto, según lo descrito anteriormente, la hipótesis (i) fue rechazada.

En cuanto a los experimentos llevados a cabo bajo condiciones proyectadas de cambio climático, los resultados obtenidos en ambos cultivos mostraron que el aumento de la temperatura nocturna (3°C) favoreció el desarrollo de *F. graminearum*, incrementando los valores de patogenicidad significativamente tanto en cebada (2-6%) como en trigo (15-17%). Además, durante los años en los cuales las condiciones ambientales fueron favorables para el desarrollo de la enfermedad, el aumento de la temperatura nocturna impactó negativamente disminuyendo el peso de mil granos, tanto para *F. graminearum* (4,6-5,6%) como para *F. poae* (0,4-5,2%) en cebada. Por otra parte, si bien el objetivo del presente trabajo no fue evaluar el impacto de las temperaturas nocturnas *per se*, se registraron disminuciones significativas en cuanto al calibre de los granos (cebada) y a la composición proteica (trigo). Respecto a la contaminación con micotoxinas, el impacto del calentamiento nocturno incrementó significativamente la concentración de micotoxinas tales como DON (75,7%) y 3-ADON (68,3%) en trigo. Por ende, de acuerdo con las evidencias expuestas anteriormente, la hipótesis (ii) fue aceptada.

Los resultados obtenidos a lo largo del presente trabajo, aportan conocimientos novedosos y promisorios en lo que respecta a la interacción *F. graminearum*/*F. poae*-cebada/trigo bajo condiciones climáticas actuales y futuras. Además, los resultados obtenidos establecen las bases para potenciales investigaciones futuras, principalmente en lo que respecta a estudios de cambio climático, bajo condiciones de campo. Es de destacar, que un mejor entendimiento del patosistema *Fusarium*-cebada/trigo en lo que respecta a parámetros de patogenicidad, rendimiento, composición proteica y contaminación con micotoxinas, posibilitará estimar el potencial impacto de esta enfermedad sobre la calidad maltera y panadera de los granos. Sin embargo, un monitoreo constante a lo largo de toda la cadena productiva (desde la cosecha, transporte y almacenamiento de los granos) es considerado necesario, con el fin de asegurar la inocuidad y seguridad alimentaria.

Palabras claves: cambio climático global, *Fusarium graminearum*, *Fusarium poae*, *Hordeum vulgare* L., micotoxinas, *Triticum aestivum* L.

ABSTRACT

Two of the most important winter crops are barley (*Hordeum vulgare* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.), while the disease known as Fusarium Head Blight is one of the most devastating cereal diseases. This fungal disease occurs in all cereal regions, producing quantitative, qualitative and economic losses. Currently, in most of the world and in Argentina the main etiological agents of this disease have been reported to be *Fusarium graminearum* and *Fusarium poae* (mycotoxins producers, such as: deoxinivalenol, its acetylated derivatives, and nivalenol, respectively). Regarding environmental conditions, several reports indicate that in the near future the temperature will be one of the most affected variables by climate change. As a consequence, this might lead not only to a significant decrease in grain yield, but also to a possible increase in the risk of mycotoxin contamination. However, it is unknown how these changes will affect the diversity of each particular *Fusarium* species. Thus, the potential impact of climate change on agricultural productivity is still uncertain.

In this way, the aim of the present work was to study the effect of the interaction between *F. graminearum* and *F. poae* in the most sown winter crops in Argentina (barley and wheat), under current and future temperature conditions. The hypotheses were: (i) “the interaction of the different barley/wheat genotypes with *F. graminearum* and *F. poae* is related to the genotype and the inoculated *Fusarium* species, being this significantly higher when the pathogens are inoculated together”; (ii) the increase of the night temperatures favors the colonization and production of *Fusarium* mycotoxins. Thus, in the present work the following experiments were conducted: (i) the interaction between *F. graminearum*/*F. poae* in barley/wheat, during three harvest seasons (2014/2015, 2015/2016 and 2016/2017); (ii) the potential impact of the increase in night temperatures (3°C) on the *F. graminearum*/*F. poae* in barley/wheat, during three harvest seasons (2016/2017, 2017/2018 and 2018/2019). In both cases, the experiments were carried out under field conditions, and the potential impact of each pathogen on pathogenicity, grain yield, grain quality and mycotoxin contamination was evaluated.

Regarding pathogenicity, results showed that in both crops there were no significant differences that support synergism between *F. graminearum* and *F. poae*. Furthermore, different responses were observed regarding *Fusarium* infection between the different genotypes evaluated. Results showed significant differences on grain yield and grain quality parameters, which could be useful for future genetic improvement. In addition, significant differences were observed in the degradation of the different protein fractions, depending mainly on each species of *Fusarium*. As to mycotoxin contamination, in both winter crops concentrations of DON and 3-ADON were registered above tolerance levels. However, these differences were not significant, and no synergism in mycotoxins

production was detected. Therefore, as described above, the hypothesis (i) was rejected.

Concerning the experiments performed under simulated conditions of climate change, the results obtained in both crops showed that the increase in the night temperature (3°C) was favourable to the development of *F. graminearum*. Thus, the pathogenicity values increased significantly both in barley (2-6%) and in wheat (15-17%). In addition, during the years in which the environmental conditions were favourable for the development of the disease, the increase in the night temperature impacted negatively reducing the thousand kernel weight, for *F. graminearum* (4.6-5.6%) and for *F. poae* (0.4-5.2%) in barley. Although the objective of the present work was not to evaluate the impact of night temperatures *per se*, significant decreases were registered in terms of screening percentage (barley) and protein composition (wheat). As to mycotoxin contamination, the impact of warm nights significantly increased the mycotoxin concentration in 75.7% (DON) and 68.3%(3-ADON) only in wheat. Therefore, as described above, the hypothesis (ii) was accepted.

The results obtained along the present work provide novel information in relation to the interaction between *F. graminearum*/*F. poae*-barley/wheat, under current and future climatic conditions. In addition, the results obtained provide the basis for potential future research related to climate change studies under field conditions. A better understanding of the *Fusarium*-barley/wheat pathosystem in terms of pathogenicity, grain yield, grain quality and mycotoxin contamination parameters will make it possible to estimate the potential impact of this disease on the grains destined for malting and baking industry. However, a constant monitoring throughout the entire production chain (from harvest to transport and the storage of grains) is deemed necessary in order to ensure food safety.

Keywords: global climate change, *Fusarium graminearum*, *Fusarium poae*, *Hordeum vulgare* L., mycotoxins, *Triticum aestivum* L.

CAPÍTULO I

Introducción

General

1. INTRODUCCIÓN.

Numerosas investigaciones destacan que no existe consenso sobre la antigüedad de la agricultura. Sin embargo, restos arqueológicos sugieren que la historia de la agricultura no tiene más de 10.000 años. A lo largo de la historia y en la mayor parte del mundo, la humanidad obtuvo la energía necesaria para sobrevivir de dos grandes grupos de alimentos: los cereales y los tubérculos (Ladizinsky, 1985; Burenhult, 1992). En la actualidad, la importancia de los tubérculos como fuente de energía (almidón) ha sido relegada a un segundo plano, siendo las principales especies cultivadas a nivel mundial la papa (*Solanum tuberosum*), la batata (*Ipomoea batatas*) y la mandioca (*Manihot esculenta*). En cuanto a la importancia de los cereales, la misma radica principalmente en que ha sido la base alimentaria de las primeras grandes civilizaciones, acompañando el desarrollo de la humanidad hasta el momento. Actualmente, de su producción y distribución depende mayoritariamente la alimentación en el mundo, siendo la calidad e inocuidad de los mismos, parámetros importantes para la población mundial (Ponzio, 2010).

Actualmente, en gran parte del mundo, el principal suplemento de energía de la dieta humana es aportado por un pequeño grupo de cereales, tales como el arroz, el maíz y el trigo, los cuáles componen la base de la alimentación humana. Sin embargo, el aporte de cereales menores tales como la avena, la cebada y el centeno entre otros, suplen actualmente gran parte de la demanda mundial de alimentos. Características tales como la plasticidad fenotípica, el ciclo vegetativo anual y su facilidad de siembra-cosecha, han permitido el cultivo de estos cereales invernales a nivel mundial. Además, características de los frutos obtenidos, tales como la alta digestibilidad y el bajo contenido de humedad han

posibilitado el almacenamiento por períodos prolongados y su incorporación dentro la dieta humana (Ponzio, 2010).

Los cereales pertenecen a la familia *Poaceae*. Son plantas anuales y herbáceas, con un ciclo vegetativo de aproximadamente cuatro a nueve meses. Dentro de esta familia, tenemos especies relevantes para la alimentación como *Avena sativa* L. (Avena), *Hordeum vulgare* L. (Cebada), *Oriza sativa* L. (Arroz), *Triticum aestivum* L. (Trigo), *Zea mays* L. (Maíz), entre otras especies (Bianco, 2007). Debido a que los granos de dichos cereales son alimentos fundamentalmente energéticos, han sido excepcionalmente aptos para el consumo humano desde tiempos remotos. En su composición se destaca la presencia de hidratos de carbono, proporciones moderadas de proteínas y lípidos, y una considerable proporción de fibra, siempre y cuando no se elimine el salvado. Debido a su amplia plasticidad, estas especies son de amplia difusión mundial, ya que pueden adaptarse a una gran variedad de regiones agroclimáticas, desde zonas frías como el Norte de Europa, zonas templadas como América del Sur, hasta zonas tropicales como África. Además, es muy amplia la gama de altitudes en las que se los puede encontrar, desde el nivel del mar hasta los 4.000 m de altura (Evans y Peacock, 1981).

1.1. Cebada: conceptos generales.

1.1.1. Características generales.

Dentro de los cereales de importancia mundial, se encuentra la cebada (*Hordeum vulgare L.*) siendo el cuarto cereal del mundo por volumen de producción, detrás del arroz, el maíz y el trigo. Una de las principales particularidades que posee el cultivo de cebada es su amplia adaptación a las diferentes condiciones climáticas y geográficas. Por ende, podemos encontrar cultivos de cebada en bajas latitudes (zonas tropicales y subtropicales) o en regiones distales como Escandinavia y Canadá, con latitudes mayores a 50°. De la misma manera que el trigo, se adapta también a altitudes contrastantes, desde el nivel del mar hasta más de 3.000 m de altura, constituyendo una de las principales fuentes de carbohidratos para los pueblos originarios de la región andina de Sudamérica (Miralles et al., 2011).

Taxonómicamente, la cebada es una planta monocotiledónea anual perteneciente a la familia de las *Poaceae* (gramíneas), más específicamente a la tribu Triticea. El género *Hordeum* está formado por un complejo de especies, que al igual que el trigo, comparten los mismos centros de origen (Asia Central y Próximo Oriente). Sin embargo, la cebada que es cultivada actualmente descende de la cebada silvestre (*Hordeum spontaneum* K. Koch), atribuyendo su región de origen al antiguo Egipto, siendo domesticada hace alrededor de 10.000 a.C. (Benavidez Mendoza et al., 2010). Dentro de los tipos cultivados de cebada, existen principalmente dos: la cebada de dos hileras (o cervecera) y la cebada de seis hileras (o forrajera) (Fig. 1A). La cebada de dos hileras posee menor contenido de proteínas que la de seis hileras, por lo que es destinada más

convenientemente para la producción de malta, mientras que la cebada de seis hileras es más adecuada para la alimentación animal (FAO, 2009).

El grano de cebada está compuesto principalmente por el embrión, el endosperma y el pericarpio (Fig. 1B). El embrión (o germen) representa un 3,5% del peso seco del grano, conteniendo altos porcentajes de azúcares tales como sacarosa, rafinosa y fructosanos. El endosperma (78,5%) es fundamentalmente de tipo harinoso, siendo la matriz proteica que envuelve a los gránulos fácilmente degradable, lo que facilita la accesibilidad y fermentabilidad del almidón. El restante 18% corresponde al pericarpio, el cual está moderadamente lignificado. Cabe resaltar que el grano de cebada posee una baja proporción de lípidos (2%), un bajo contenido de pigmentos, vitaminas liposolubles y vitamina B₁₂. En cambio, es una excelente fuente de algunas vitaminas del grupo B, tales como tiamina, riboflavina y ácido pantoténico. En cuanto a las proteínas, la proporción de proteínas solubles (albuminas y globulinas) es alta, mientras que las prolaminas (hordeinas) representan un 52% del contenido del grano (FEDNA, 2019).

A diferencia del grano de trigo, el grano de cebada posee las glumelas (pálea y lemma) soldadas al cariopse, denominándose al fruto “grano vestido” (Fig. 1B). El porcentaje de cáscaras (glumelas) generalmente representa del 7 al 13% del peso seco del grano, influyendo directamente en parámetros cerveceros, tales como el extracto de mosto (INIA, 1991). Además, la presencia de las glumelas en el grano, implican un elevado contenido de fibra, estando compuesta en mayor medida por β -glucanos y pentosanos en proporciones muy variables (1,6-8,3% y 4,4-8,7%, respectivamente), dependiendo del genotipo, región de procedencia y condiciones agroclimáticas. El contenido medio de β -glucanos es

similar al de otros granos vestidos como la avena, pero superior al contenido encontrado en cereales tales como el centeno, el maíz y el trigo (FEDNA, 2019).

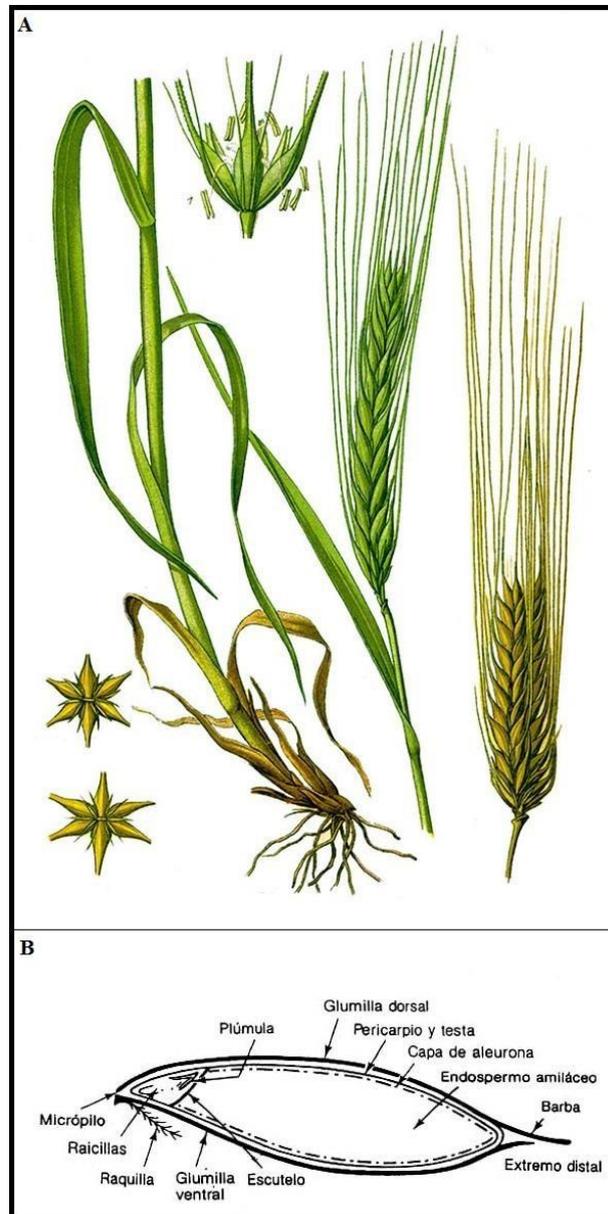


Figura 1. A) Cebada de dos hileras (izquierda) y cebada de seis hileras (derecha). B) Estructura de un grano de cebada. (Fuente: PSB Producción Vegetal).

1.1.2. Panorama mundial.

En las últimas décadas, el aumento mundial de la demanda de cebada cervecera, se encontró directamente relacionado con el aumento de la producción mundial de cerveza. Contrariamente a lo que ocurre en la Argentina, donde un elevado porcentaje de la producción posee destino maltero, a nivel mundial, el principal destino de la producción de cebada es para su utilización como forrajera. Así, cerca del 73% de la producción mundial de cebada se destina a alimentación animal, solo el 20% se utiliza como cebada maltera, destinándose el restante 7% al consumo humano directo u otros usos industriales (Cattáneo, 2011).

Con respecto a los volúmenes de cerveza producidos a nivel mundial, los mismos aumentaron considerablemente en los últimos años, pasando de 1.300 millones de hL en 1998 a 1.800 millones de hL durante 2008. En la actualidad, los volúmenes de cerveza producidos a nivel mundial se han estabilizado en alrededor de los 2.000 millones de hL, siendo Asia, Europa y América responsables de más del 90% de la producción (Cebada Cervecera, 2019). Países emergentes en cuanto al consumo de cerveza, tales como China y Rusia, han traccionado este mercado considerablemente siendo responsables de más del 50% de dicho incremento. A modo de ejemplo, el consumo en China durante el período 1998-2008 creció de 170 millones de hL a 410 millones de hL, mientras que en Rusia el consumo aumento de 30 millones de hL a 100 millones de hL. De la misma manera, el consumo en Asia y Sudamérica se incrementó durante la década del 90' en aproximadamente 115% y 74%, respectivamente (Cattáneo, 2011).

Con respecto a la producción mundial de cebada cervecera, durante la campaña 2018/2019 se alcanzó una producción de alrededor de 141.254 Mt (USDA, 2019). Actualmente, los principales productores son la Unión Europea (55,96 Mt), Rusia (16,74 Mt), Canadá (8,40 Mt), Australia (8,30 Mt) y Ucrania (7,60 Mt), entre otros (Tabla 1). De esta manera, los productores mencionados anteriormente son responsables de alrededor del 70% de la producción mundial de cebada. En cuanto al balance de importación/exportación, cabe resaltar que el principal país importador de cebada a nivel mundial ha sido tradicionalmente Arabia Saudita (7,6 Mt) destinando dicho volumen para la alimentación animal; mientras que países como China (6,5 Mt) y Japón (1,1 Mt) importan cebada con destino a maltería. Como contraparte, los principales exportadores son la Unión Europea (5 Mt), Rusia (4,8 Mt) y Ucrania (4,2 Mt), abasteciendo el 55% de la demanda mundial de cebada (USDA, 2019).

Tabla 1. Producción y uso de cebada a nivel mundial durante la campaña agrícola 2018/2019

Campaña agrícola 2018/2019	Producción (Mt)	Importación (Mt)	Consumo Interno (Mt)	Exportación (Mt)
<i>Producción mundial</i>	140.304	26,36	s.d.	26,36
<i>Mayores productores/exportadores</i>				
U.E.	55,96	0,40	52,00	5,00
Rusia	16,74	s.d.	12,20	4,80
Canadá	8,40	s.d.	6,80	2,20
Australia	8,30	s.d.	3,80	4,60
Ucrania	7,60	s.d.	4,00	4,20
Argentina	4,50	s.d.	s.d.	3,10
E.E.U.U.	3,33	0,12	3,48	0,10
<i>Mayores importadores</i>				
Irán	2,80	3,00	6,10	s.d.
China	1,85	6,50	8,30	s.d.
Arabia Saudita	s.d.	7,60	8,03	s.d.
Japón	s.d.	1,10	s.d.	s.d.
Brasil	s.d.	0,65	s.d.	s.d.

s.d.: Sin datos

(Fuente: USDA, 2019).

1.1.3. Panorama nacional.

Durante los últimos 20 años, la producción de cebada en la Argentina ha crecido considerablemente, acompañando dicho crecimiento la ampliación de la distribución geográfica del cultivo. La posibilidad de adelantar 15 días la siembra de soja de segunda, debido a que la cebada posee un ciclo más corto que el trigo, junto con los excelentes rendimientos obtenidos en comparación con el trigo, han favorecido el incremento de su área de siembra. Cabe resaltar, que el cultivo de cebada depende directamente y está impulsado activamente por las malterías y cervecerías, que establecen previamente un contrato con el productor con el fin de producir un genotipo determinado, en base a ciertas características específicas (Savin y Aguinaga, 2011).

En relación a los genotipos utilizados, durante muchos años Scarlett fue el más sembrado, dominando el mercado nacional campaña tras campaña, abarcando alrededor del 70 al 80% del área de siembra, debido a su reconocimiento mundial y a su buena calidad industrial. Sin embargo, esta dependencia monovarietal obligó a los programas nacionales de mejoramiento genético a trabajar esforzadamente con el fin de introducir nuevos genotipos, con mejores comportamientos sanitarios y aceptables aptitudes para maltería (Cattáneo, 2011). De esta manera, genotipos tales como Andreia, abarcando el 72% del área de siembra de la campaña 2018/2019 y Shakira (24%) fueron reemplazando poco a poco a Scarlett en cuanto a superficie de siembra, junto con otros genotipos de reciente introducción tales como Overture (3%) y Traveler (1%) (INASE, 2019).

Actualmente, la Argentina se ubica como el octavo productor a nivel mundial de cebada, con aproximadamente 4,5 Mt producidas y una superficie de siembra destinada de alrededor de 1 millón de ha durante la última campaña. Cabe resaltar, que durante la campaña 2012/2013, la Argentina se colocó como el segundo exportador mundial de cebada, destinando aproximadamente el 25% de la producción nacional al mercado interno (malterías) y exportando el restante 75% como grano cervecero, forrajero o malta. Así, una de las ventajas comparativas que posee la Argentina dentro de Sudamérica, es su potencial como exportador de malta, a países tales como Brasil y Venezuela, que poseen una demanda anual de alrededor de 1,2 Mt (Cattáneo, 2011). De esta manera, nuestro país se ubica como el quinto exportador a nivel mundial de cebada, exportando 1,1 Mt como cebada cervecera con aptitud para el malteo, 1,7 Mt como cebada con fines forrajeros, y las restantes 1,7 Mt destinadas al mercado interno. Dentro del volumen destinado al mercado interno, 120.000 Tn fueron destinadas para producción de semilla, aproximadamente 500.000 Tn para consumo animal y 1.050.000 Tn destinadas para la industria (840.000 Tn para maltería) (Tabla 2).

Tabla 2. Producción y exportación de cebada en la Argentina durante las últimas 10 campañas

Campaña	Producción (Tn)	Exportación (Tn)	
		Cervecera	Forrajera
2009/10	1.700.000	400.000	100.000
2010/11	2.700.000	1.100.000	400.000
2011/12	4.400.000	1.100.000	1.700.000
2012/13	5.000.000	800.000	2.900.000
2013/14	5.050.000	900.000	2.300.000
2014/15	2.800.000	850.000	600.000
2015/16	4.700.000	1.000.000	1.700.000
2016/17	3.200.000	900.000	1.100.000
2017/18	3.700.000	1.150.000	1.300.000
2018/19	4.500.000	1.100.000	1.700.000

(Fuente: www.cebadacervecera.com.ar)

1.1.4. Importancia y usos de la cebada cervecera.

Como se mencionó anteriormente, a nivel mundial el principal uso de la cebada es con fines forrajeros, en la alimentación y suplementación animal, al ser un grano que aporta altos contenidos de fibra y poseer una alta digestibilidad. Sin embargo, en la Argentina, el principal destino de la cebada es para la industria de la elaboración de malta y cerveza. Debido a que la elaboración de malta es un proceso fundamentalmente biológico, en el cual la germinación desempeña un rol clave, es importante considerar todas las variables que puedan afectar la estructura de los granos. A modo de ejemplo, un secado inadecuado, un almacenamiento con exceso de humedad o la presencia de insectos, pueden deteriorar la calidad del grano y por ende la calidad de la malta final (Castañares, 2016). Así, luego de la cosecha, los granos de cebada deben cumplir con determinados estándares en parámetros de calidad que puedan influenciar sobre posteriores etapas industriales y/o durante el proceso de malteo (Anexo I). Parámetros tales como poder germinativo, calibre del grano, humedad y porcentaje de proteína son determinantes a la hora de determinar el recibo de la partida de granos con destino a maltería o su rechazo y posterior comercialización como cebada forrajera.

La modificación del endosperma debido a la acción de enzimas hidrolíticas, junto con la acción de otras enzimas como proteolíticas y amilolíticas, son aspectos fundamentales durante la elaboración de malta (Savin y Aguinaga, 2011). Las etapas claves en este proceso incluyen:

- ✓ Remojo: se realiza con el fin de elevar la humedad de los granos en un breve período (18 a 36 h), desde un 12% a un 40-42%. Al finalizar este proceso se obtiene la “malta verde”, en el cual el proceso de

germinación se inicia luego de reiterados ciclos de remojo y aireación.

- ✓ Germinación: durante este período se generan los cambios metabólicos más importantes dentro del grano. En primer instancia, se activa el transporte de giberelinas, que desencadenan la liberación de enzimas hidrolíticas, produciendo luego la disolución de la estructura física del endosperma.
- ✓ Secado: el objetivo de esta etapa es llevar la malta obtenida desde 45-46% de contenido de humedad en el grano a una humedad final de 4-4,5%. Esto se logra con un secado gradual y escalonado, con incrementos suaves de la temperatura de secado, para así conservar la actividad biológica de las enzimas sintetizadas previamente (Savin y Aguinaga, 2011).

Una vez obtenida la malta, las etapas para la obtención final de cerveza son las siguientes:

- ✓ Molienda: para aumentar la superficie de contacto durante la elaboración del mosto, y facilitar la extracción de azúcares simples.
- ✓ Maceración: consiste en la elaboración del mosto, a partir del agregado de agua a aproximadamente 65°C a una mezcla de distintos tipos de maltas, según el tipo de cerveza a elaborar.
- ✓ Cocción y hervido: etapa en la cual se agrega el lúpulo, con el fin de aportar un sabor amargo y astringente, además de distintos tipos aromas según el tipo de lúpulo.
- ✓ Fermentación: luego del enfriado rápido del mosto (aproximadamente de 100°C a 20-25°C en menos de 30 min) se adiciona levadura al mosto resultante con el fin de convertir los azúcares simples extraídos en alcohol etílico y CO₂ (Daniels, 2006).

1.2. Trigo: conceptos generales.

1.2.1. Origen y dispersión.

Actualmente, uno de los cereales invernales de mayor relevancia en el mundo es el trigo. Taxonómicamente, el trigo pertenece a la familia *Poaceae* (gramíneas), más específicamente a la tribu Tritícea, donde comparte características principalmente morfológicas con otros géneros como *Aegilops*, *Elymus*, *Hordeum* y *Secale* (Dewey, 1985). El género *Triticum* está formado por un complejo de especies cuyo origen radica en los centros de origen de Asia Central (Turkestán) y Oriente Próximo (de Egipto al Cáucaso y Persia), según diversas clasificaciones originadas a partir de los estudios de Vavilov a principios del siglo XX (Harlan, 1971). Restos de granos de esta especie han sido encontrados carbonizados al este de Irak, los cuáles datan del período 6.500-7.500 a.C., indicando aproximadamente el inicio de la domesticación de estos cereales en dicha región (Heiser, 1990). La domesticación de dichas especies silvestres, junto con el proceso de *selección intuitiva* (o *automática*) de las primeras civilizaciones sedentarias posibilitaron a éstas asentarse en las zonas de regadío de la Mesopotamia, supliendo parte de los requerimientos alimenticios (Cubero, 2003). El trigo pan (*Triticum aestivum* L.) fue una de las especies que posibilitó dicha transición del nomadismo al sedentarismo, originándose esta especie alohexaploide ($2n=6X=42$) a causa de la hibridación espontánea de un híbrido interespecífico natural (*Triticum turgidum*, $2n=4X=28$, genoma AABB) con una especie diploide (*Aegilops tauschii*, $2n=2X=14$, genoma DD) (Fig. 2) (Zohary et al., 2012).

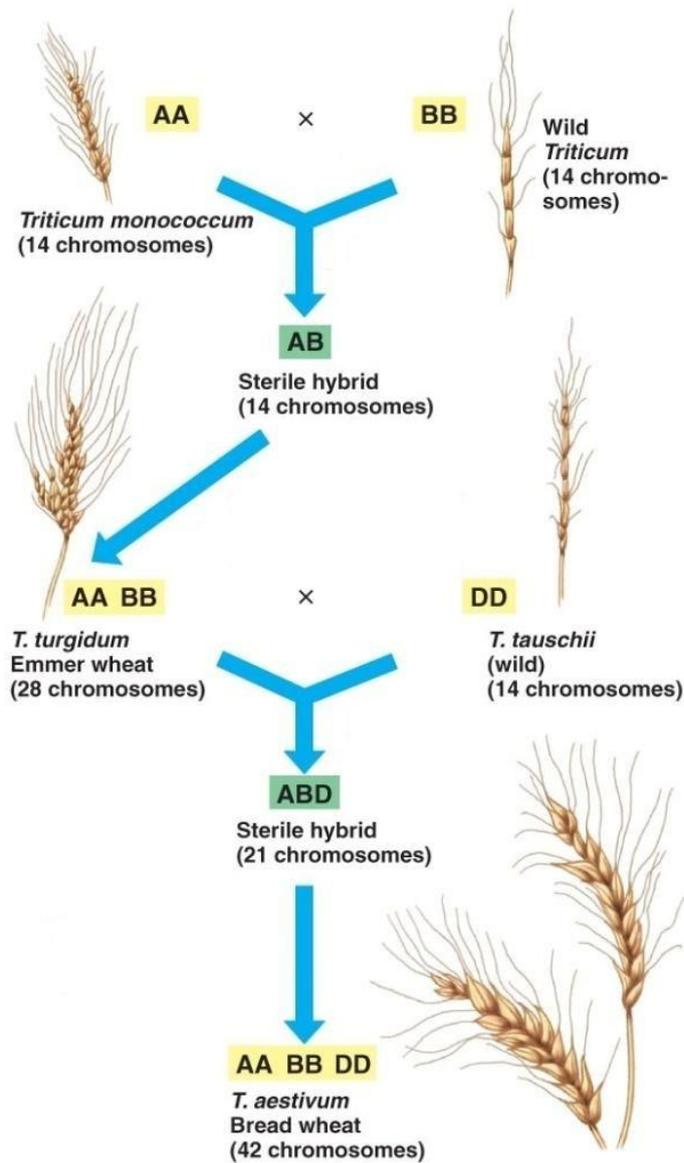


Figura 2. Origen del trigo pan (*Triticum aestivum* L.).

(Fuente: Pearson Education Inc.).

1.2.2. Panorama mundial.

Uno de los cereales invernales más sembrados a nivel mundial es el trigo, sin embargo el ingreso al mercado internacional varía dependiendo del hemisferio en que se cultiva. La combinación de caracteres tales como la sensibilidad fotoperiódica, la vernalización y la precocidad intrínseca de cada genotipo, posibilitan dicha adaptabilidad y plasticidad a diferentes regiones agroclimáticas y

a distintos tipos de manejos agronómicos (Slafer et al., 2009). Por ende, actualmente la producción a nivel mundial, se encuentra diversificada ampliamente a través de las distintas regiones agroclimáticas. Según el Departamento de Agricultura de los E.E.U.U. (USDA), la producción de trigo para la campaña agrícola 2018/2019 fue de 733 Mt, con un *stock* de partida de 279,61 Mt y un balance de comercialización (importación/exportación) de alrededor de 176-178 Mt (Tabla 3).

Tabla 3: Producción y uso de trigo a nivel mundial durante la campaña agrícola 2018/2019.

Campaña agrícola 2018/2019	Stock Inicial (Mt)	Producción (Mt)	Importación (Mt)	Consumo Interno (Mt)	Exportación (Mt)	Stock Final (Mt)
<i>Producción mundial</i>	279,61	733,00	176,53	142,07	178,91	270,53
Mayores Productores y Exportadores						
E.E.U.U.	29,91	51,29	3,95	2,18	26,26	28,72
U.E.	14,13	137,60	6,20	52,50	23,00	10,43
India	13,20	99,70	0,10	5,00	0,50	17,50
Rusia	11,87	71,69	0,50	18,00	37,00	6,55
Canadá	5,92	31,80	0,45	4,30	24,00	4,87
Australia	5,87	17,30	0,15	5,70	10,00	4,12
Pakistán	4,83	25,50	0,01	1,20	1,70	3,33
Kazajistán	2,37	13,95	0,06	1,80	8,50	1,27
Ucrania	1,24	25,00	0,06	2,40	16,50	1,10
Argentina	0,94	19,50	0,01	0,05	14,20	0,60
Mayores Importadores						
China	131,26	131,43	3,50	20,00	1,20	139,99
Oriente Medio	14,56	17,88	17,18	3,56	0,54	11,24
Norte de África	14,51	21,01	26,70	2,25	0,70	15,44
Sudeste Asiático	5,03	0,00	25,50	8,04	1,06	4,13
Brasil	1,31	5,43	7,50	0,50	0,80	1,34

(Fuente: USDA, 2019).

Analizando la producción global del trigo (Tabla 3), se observa que los principales productores de trigo a nivel mundial son la Unión Europea (137,60 Mt), China (131, 43 Mt) e India (99,70 Mt), siendo responsables de más del 50% de la producción global. Con respecto a la exportación, podemos observar que los distintos niveles de consumo interno afectan las cantidades finales exportadas, por lo que los principales exportadores no son necesariamente los principales productores. Así, Rusia (37,00 Mt) se ubica en el primer lugar del *ranking* de exportadores, E.E.U.U (26,26 Mt) en el segundo y Canadá (24 Mt) en el tercer lugar, mientras que a la Argentina (14,20 Mt) le corresponde el sexto lugar (USDA, 2019).

Como contracara, países tales como Brasil y China, y regiones como el norte de África (Algeria, Egipto, Libia, Marruecos, y Túnez), Oriente Medio (Arabia Saudita, Líbano, Irak, Irán, Israel, etc.) y el sudeste Asiático (Indonesia, Filipinas, Malasia, Tailandia y Vietnam) deben importar elevadas cantidades de trigo para cubrir su demanda y mercado interno (USDA, 2019). Cabe resaltar, que las importaciones de trigo de Brasil representan casi el 5% de las compras internacionales, por lo que constituye uno de los principales compradores de la Argentina, destinándose más del 40% de las exportaciones de trigo hacia este país (Ministerio de Hacienda, 2018).

1.2.3. Panorama nacional.

En la Argentina, las primeras semillas de trigo sembradas datan de alrededor del año 1528, en uno de los primeros establecimientos rurales españoles (Fuerte *Sancti Spiritu*) a orillas del río Carcarañá, dentro del actual departamento de San Jerónimo en la provincia de Santa Fé (Colobig et al., 2017). Sin embargo, no fue hasta 1850 que comenzó la verdadera expansión del cultivo de trigo en la Argentina, dando inicios así a la agricultura extensiva y desencadenando una profunda transformación en la agricultura pampeana. Desde entonces, se registró un constante crecimiento de la producción de trigo, llegando al autoabastecimiento a nivel país en el año 1878, año durante el cual las exportaciones superaron por primera vez a las importaciones. De esta manera, para fines del siglo XIX, la Argentina ya se había transformado en un país con perfil exportador neto, alcanzando los niveles de producción de trigo de la actualidad (SAGPyA, 2006).

Con la introducción de la soja, el trigo fue el cultivo que más terreno perdió. Desde los '70, el área del cultivo ha disminuido en un 50% aproximadamente, alcanzando su declive máximo durante la campaña 2012/2013, en la cual se sembró menos de 4 millones de ha (Fig. 3). Este fenómeno coincidió con un período de 15 campañas consecutivas con descenso en la superficie de siembra, teniendo en cuenta que durante las campañas 1996/97 y 2000/01, la superficie implantada promedio fue de 6,3 millones de ha. Las causas de dicho decrecimiento en la superficie de siembra fueron problemas climáticos, tales como sequías e inundaciones sumado a restricciones a la exportación durante este período. Sin embargo, a pesar de esta caída en el área sembrada, la producción se incrementó en casi un 60%

debido a los avances tecnológicos, que permitieron éste notable incremento en los rendimientos (SIIA, 2019).

Actualmente, se estima que la superficie agrícola que posee la Argentina ronda las 35 millones de ha, representando el trigo alrededor del 18% (4,6 millones de ha) del área sembrada durante la última campaña (Fig. 3). Los genotipos más sembrados en la misma, fueron Baguette 802, abarcando un 9% de la superficie sembrada, seguido por Meteoro (5%), SY 200 (4%), Rayo (4%) y Algarrobo (4%) (INASE, 2019). En cuanto a la distribución del área sembrada de trigo, el promedio de las últimas campañas indica a Buenos Aires como la principal provincia productora (46%), seguida de Córdoba (21%), Santa Fé (16%), Entre Ríos (7%) y el resto del país (10%) (Ministerio de Hacienda, 2018).

En relación a la producción total de trigo, la misma alcanzó valores de 19,5 Mt en la última campaña, con un rendimiento promedio de 3070 kg/ha (Fig. 3)(BCR, 2019). Con respecto al consumo interno en los últimos años, el mismo ha sido estable, con un consumo per cápita de alrededor de 78 kg de harina/habitante/año, totalizando aproximadamente entre 5,5 a 6 Mt de trigo destinados a la molienda cada año. El saldo exportable (14,20 Mt) producto del bajo consumo interno y la elevada producción total, posiciona a la Argentina como el principal exportador de trigo de Sudamérica (Ministerio de Hacienda, 2018; USDA, 2019).

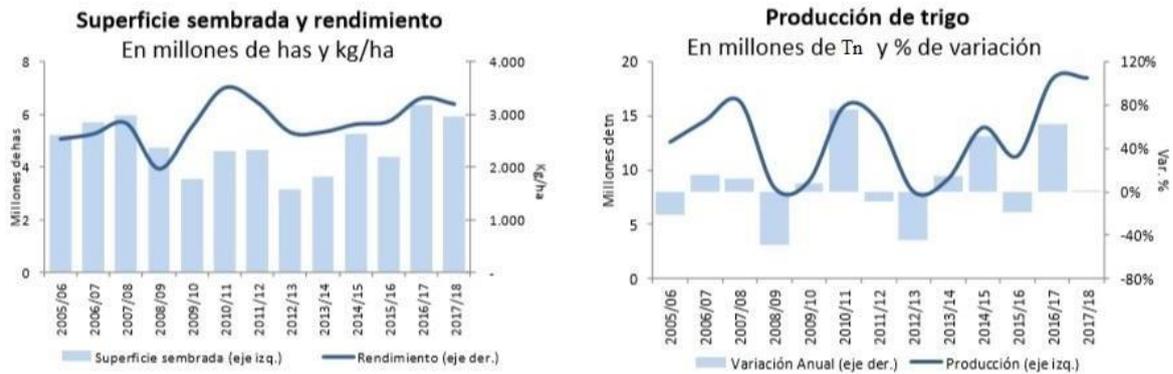


Figura 3. Producción nacional de trigo pan.

(Fuente: Ministerio de Hacienda, 2018)

1.2.4. Importancia y usos del trigo pan.

Botánicamente, el grano de trigo es un fruto de tipo cariopse. Posee forma elíptica, más o menos redondeada, de fractura almidonosa, no quebradiza. El peso de mil granos, generalmente ronda lo 30-40 g, mientras que el gluten húmedo es elástico y extensible, otorgándole buenas propiedades reológicas (CAA, 2004). Dependiendo el genotipo, en el mercado actual existe una amplia gama de variedades que difieren en cuanto a la dureza del grano, el contenido de proteínas o las características del gluten, propiedades que determinan la calidad panadera.

El grano de trigo está compuesto principalmente por el embrión, el endosperma y el pericarpio (Fig. 4) (Knudsen, 2014). El embrión (o germen de trigo), contiene altas concentraciones de lípidos, proteínas y vitaminas del grupo B y E; y generalmente no supera el 2% del peso seco total del grano. Por otra parte, el pericarpio es uno de los componentes del salvado de trigo, contiene altos contenidos de fibra, minerales y proteínas, y ronda valores cercanos al 15% del grano. En cuanto al endosperma, el mismo ocupa alrededor del 80% del peso seco del grano, conteniendo un bajo contenido de

vitaminas y minerales con respecto a las fracciones mencionadas anteriormente, ya que está formado principalmente por almidón y proteínas (Simmonds, 1989).

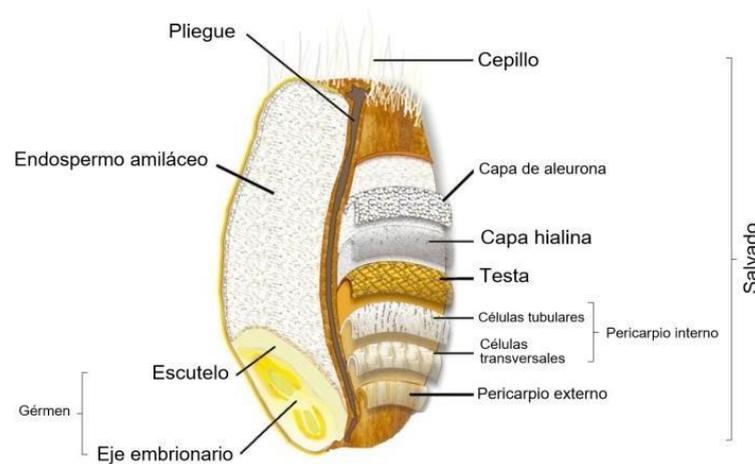


Figura 4. Esquema de un grano de trigo pan.

(Fuente: Knudsen, 2014)

La importancia del trigo pan en los sistemas agrícolas radica en sus potenciales usos, siendo gran parte de la producción destinada preferentemente para el consumo humano y en menor proporción para el uso forrajero (Miralles et al., 2014). Productos tales como harinas, sémolas y sus respectivos subproductos (cereales de desayuno, galletas, pan, pasta, etc.) pueden obtenerse luego de la molienda del grano (Arata, 2009). De esta manera, de la molienda industrial de los granos de trigo y la separación de sus distintas fracciones, se obtienen finalmente distintos tipos de harinas blancas, con diferentes granulometrías, porcentajes de cenizas y aptitudes requeridas por la industria alimenticia (León y Rossell, 2007). Además, el almidón extraído de los granos

de trigo posee diferentes usos industriales, tales como en la industria del papel (como adhesivo) o en la elaboración de alcohol (Satorre et al., 2003).

Con respecto al rendimiento industrial de la harina de trigo, la misma es de aproximadamente el 75%, siendo los principales subproductos de la industria molinera el afrechillo y el germen de trigo. El afrechillo de trigo es destinado para la alimentación animal, mientras que el germen de trigo es utilizado principalmente en la industria aceitera y farmacéutica. En las últimas campañas, el volumen total de harina producido en la Argentina alcanzó alrededor de 4,5 Mt, existiendo 180 establecimientos molineros capaces de procesar dichos volúmenes. En cuanto a la distribución de la harina producida, actualmente se destina el 80% al mercado interno, en donde el 70% es destinado a la elaboración de panificados, 10% a la elaboración de pastas alimenticias, 10% a la elaboración de pre-mezclas, 7% a la elaboración de galletitas y el 3% restante destinado a la elaboración de otros subproductos y derivados farináceos (Ministerio de Hacienda, 2018).

La aptitud panadera del trigo es un atributo multidimensional, determinando así su calidad industrial, y está definida por características genotípicas, estructurales del grano y de las sustancias de reserva que almacena en el endosperma (almidón y proteínas) (Peña et al., 2008). Comercialmente, existen aspectos muy importantes que inciden en la calidad panadera del trigo, tales como el contenido de proteína, la tolerancia en granos quebrados y el porcentaje de cuerpos extraños, entre otros (Anexo I). En primer lugar, el contenido de proteína es una condición necesaria e indispensable al momento de que un determinado genotipo de trigo exprese su calidad panadera, por lo que valores óptimos de proteína son necesarios para garantizar su comportamiento y su calidad industrial durante el proceso de panificación. Adicionalmente, el peso hectolítrico posee

gran incidencia al momento de establecer la calidad comercial del trigo, fijar el precio, estimar capacidades de almacenamiento y particularmente asociarlo con el rendimiento de molienda y la calidad industrial (Matz, 1999; Shewry y Halford, 2002).

Cabe resaltar, que a las características comerciales mencionadas anteriormente, se le debe adicionar la inocuidad de los granos, requisito básico de la calidad de los mismos y por ende de sus subproductos. En la Argentina, se menciona en el artículo 643 del Código Alimentario que los cereales destinados a la alimentación humana deben presentarse libres de impurezas, productos extraños, materias terrosas, parásitos y en perfecto estado de conservación y no se hallarán alterados, averiados o fermentados (CAA, 2004).

1.2.5. Cebada y trigo: aspectos en común.

Dada la gran diversidad genética y plasticidad fenotípica que presentan tanto la cebada como el trigo, estas especies pueden crecer y desarrollarse en diversos ambientes, donde los climas van desde húmedos, con precipitaciones que rondan un promedio de 800 mm anuales, a semiáridos, con precipitaciones promedio de 600 mm anuales. En la actualidad, dichos cultivos se realizan en una amplia zona, las cuales abarcan las regiones comprendidas entre los 30-40° de latitud sur y 57-68° de longitud oeste (Lerner et al., 2004). De esta manera, estas regiones se clasifican principalmente en cinco grandes zonas, encontrándose la fecha de siembra y el ciclo del genotipo seleccionados estrechamente relacionados, ya que determinan los regímenes de precipitaciones y humedad, temperatura y fotoperíodo (Fig. 5).

Actualmente, los genotipos de trigo comercializados presentan respuestas al fotoperíodo con distinto grado de sensibilidad. Con respecto a los requerimientos de vernalización, en la Argentina solo algunos genotipos de trigo poseen dichos requerimientos, mientras que los genotipos de cebada sembrados solamente poseen respuesta al fotoperíodo. En cuanto a las fechas de siembra para ambas especies, las mismas oscilan entre principios de mayo y principios de julio para genotipos de ciclo intermedio-largo, mientras que para materiales de ciclo intermedio-corto las fechas de siembra varían entre la segunda quincena de junio y principios de agosto (Miralles et al., 2014). En la Argentina, las fechas de siembra más tempranas generalmente corresponden a localidades ubicadas más al norte de la zona triguera, mientras que las fechas más tardías se observan en localidades más al sur (Fig. 5). En relación a la densidad de siembra, la misma oscila entre 150 a 350 pl/m², incrementándose

en siembras tardías y/o con genotipos de ciclo intermedio-corto. Contrariamente, en siembras tempranas o ante situaciones de baja disponibilidad de agua durante el ciclo del cultivo, la densidad de siembra suele reducirse. En cuanto a la cosecha, la misma generalmente se realiza para ambos cultivos durante los meses de noviembre, diciembre y principios de enero (Miralles et al., 2014).



Figura 5. Sub-regiones trigueras de la Argentina y sus respectivas fechas de siembra. (Fuente: Miralles et al., 2014).

Como se mencionó anteriormente, tanto la cebada como el trigo son cultivos que comparten los lugares de siembra, en lo que respecta a la región pampeana. Cabe resaltar, que durante los últimos años, importantes cambios se dieron en cuanto a la elección del cultivo de cosecha fina. En gran parte del área de siembra ocupada anteriormente por el trigo, el cultivo de cebada lo fue reemplazando gradualmente, en años en donde las restricciones comerciales y el

panorama económico nacional fueron desfavorables para el trigo (Molfese y Seghezzo, 2013). Si bien, en las zonas cultivadas ambos cultivos suelen estar antecidos principalmente por maíz, sorgo, girasol o soja, los cultivos de trigo y cebada suelen estar expuestos a distintos tipos de estrés en lo que respecta a su interacción con el medio ambiente. De esta manera, básicamente se puede mencionar dos tipos de estrés: (i) abióticos, como los causados principalmente por la temperatura y las condiciones hídricas; (ii) bióticos, principalmente atribuidos a enfermedades causadas por distintos tipos de virus, hongos y/o bacterias (Dinolfo, 2014a). Dentro de las enfermedades, las de origen fúngico representan actualmente la mayor amenaza para la agricultura, causando pérdidas significativas de rendimiento, calidad y económicas en los cultivos a nivel mundial. Un ejemplo de ello, en los sistemas agrícolas de la Argentina y en todo el mundo, es la enfermedad conocida como fusariosis de la espiga (FE), causada por especies del género *Fusarium*, enfermedad que no solo causa pérdidas significativas de rendimiento, sino que también, afecta la calidad e inocuidad de los granos obtenidos, ya sea bajo condiciones de campo o durante el transporte y/o almacenado del grano (Bianchini et al., 2015).

Actualmente, se estima para la próxima campaña agrícola 2019/2020 un área de siembra de trigo de alrededor de 6,4 millones de ha, con una producción de 20 Mt y un saldo exportable de 14 Mt, mientras que para el cultivo de cebada también se observa un tendencia creciente, con aproximadamente 1 millón de ha, una producción de 4 Mt y un saldo exportable de 2,7 Mt (PAS, 2019; USDA, 2019). Teniendo en cuenta dichas estimaciones para las próximas campañas, sumado a la creciente adopción de los sistemas de siembra directa en la Argentina,

es de vital importancia conocer el impacto potencial de la FE sobre los sistemas agrícolas (Aapresid, 2016).

1.3. Generalidades de la fusariosis de la espiga.

Una de las enfermedades fúngicas más importantes de los cereales a nivel mundial, es la fusariosis de la espiga (FE). Esta enfermedad se encuentra distribuida mundialmente, radicando su importancia en su impacto sobre los rendimientos de los cultivos, junto con el potencial de producción de micotoxinas en los granos y subproductos derivados durante la cosecha, transporte y/o almacenamiento (Bianchini et al., 2015). Actualmente, existe una extensa bibliografía destacando la importancia de la FE tanto a nivel mundial como regional, como así también la importancia de conocer su ciclo biológico, los agentes etiológicos, la interacción con otros microorganismos, junto la evaluación de las diferentes herramientas de control y la disponibilidad de modelos predictivos acerca de la ocurrencia de la enfermedad y la producción de micotoxinas (Gilbert y Haber, 2013; Prandini et al., 2009; Van der Lee et al., 2015; Xue et al., 2019).

En los comienzos del siglo XX, esta enfermedad fue considerada de importancia secundaria durante muchos años. Sin embargo, debido al aumento de su frecuencia de aparición y severidad, se ha convertido en una de las principales enfermedades del trigo, cebada y de otros cereales menores tales como avena, centeno y triticale (Arseniuk et al., 1999; Dinolfo et al., 2019; Martin et al., 2018; Martínez et al., 2019; McMullen et al., 1997). Con respecto a la ocurrencia de la FE, la misma se ha incrementado en países tales como Argentina, Brasil, Canadá, China, E.E.U.U., Japón, Paraguay, Uruguay y países del centro-oeste de Europa (Mazzilli et al. 2007). Este incremento ha sido vinculado a la creciente adopción

de sistemas de labranza conservacionista, específicamente al aumento de la siembra directa, al manejo agronómico (manejo de rastrojos, hospedantes alternativos, aplicación de fungicidas, fertilizantes, entre otros) y al cambio climático global, que influye directamente sobre el patrón de precipitaciones, humedad relativa, temperaturas y ocurrencia de eventos extremos (Alexander et al., 2006; Beres et al., 2018; Lori et al., 2009; McMullen et al., 1997). La tendencia al mínimo laboreo, la mayor participación de los cereales en la rotación de los cultivos y los cambios en los procesos de producción agrícola, entre otras modificaciones, han aumentado el riesgo de incidencia de la FE durante la década de los 90' (Maiorano et al., 2007). Sumado a esto, en las últimas décadas la Argentina ha experimentado un incremento significativo en la superficie bajo siembra directa, representando en la actualidad el 92% de la superficie agrícola bajo cultivo (Aapresid, 2016). De esta manera, bajo este tipo de sistemas de labranza, la cantidad y el tipo de residuos de cosecha colonizados por el hongo desempeñan un rol clave, ya que forman parte como fuente de inóculo. Sumado a esto, semillas infectadas al momento de la siembra, partículas de suelo, hospedantes alternativos (“malezas” y “especies puente”) ofrecen una fuente secundaria de supervivencia y abundante esporulación para la siguiente estación de crecimiento del cultivo (Sutton, 1982; Xu, 2003).

Cabe destacar, que las epifitias más severas de la FE han sido confirmadas en regiones con climas más húmedos y con moderadas a altas temperaturas, coincidiendo con el estadio de floración de los cultivos. Por este motivo, es considerada una enfermedad de infección floral al ingresar a través de las anteras en el estadio fenológico de Zadoks 60 (Fig. 6).

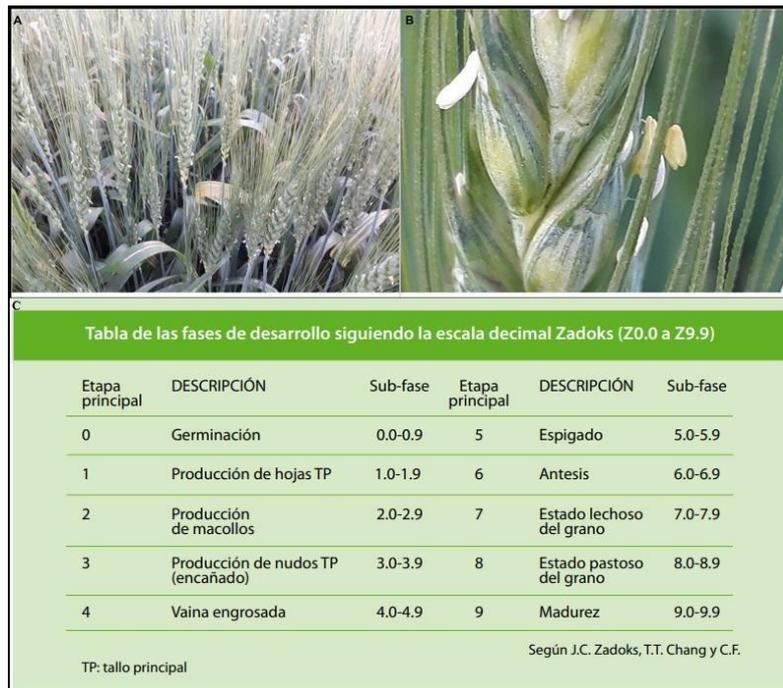


Figura 6. A) Cultivo de trigo en antesis (Z. 60). B) Anteras extrusas, período durante el cual la espiga es susceptible a la infección. C) Escala decimal Zadoks para trigo pan (Zadoks et al., 1974).

1.3.1. Sintomatología.

Generalmente, el contacto entre el patógeno y el hospedante no asegura la producción de la enfermedad en la planta (Agrios, 1999). Para que sea posible el desarrollo del patógeno en el hospedante, deben existir un conjunto de condiciones ambientales favorables que determinan el nicho ecológico para cada especie. El mismo, es un espacio multidimensional determinado por cada variable climática que incide en el desarrollo del patógeno, sumado a la acción de otros factores bióticos, abióticos y a la distribución espacial de dicha especie (Fig. 7A). Por lo tanto, estos tres componentes (patógeno, hospedante y condiciones ambientales), componen lo que se denomina como “triángulo de las enfermedades”, en donde cada arista del triángulo representa cada uno de los factores (Fig. 7B). Cabe mencionar, que existe un cuarto componente en este esquema, que es la acción antrópica sobre el ambiente y sobre la interacción

planta-patógeno. Así, la acción del hombre puede modificar los tres factores principales mediante prácticas de manejo tales como, el tipo de labranza (convencional vs siembra directa), manejo de rastrojos, utilización de genotipos susceptibles, siembra de semillas infectadas, elección, momento de aplicación y dosis de fungicidas, entre otros factores (Agrios, 1999; Reis y Carmona, 2002).

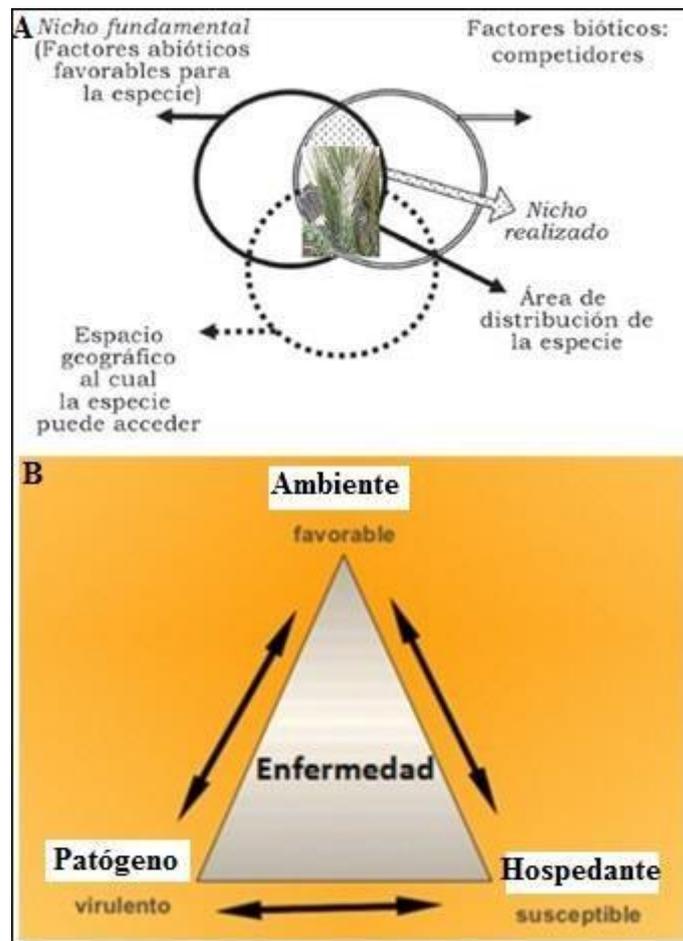


Figura 7. A) Determinación del nicho ecológico de las especies fúngicas, en función de la influencia de factores bióticos, abióticos y espacio geográfico. B) Factores que determinan la infección y el desarrollo de las enfermedades (“Triángulo de las enfermedades”) (Fuente: Agrios, 1999).

Tanto en trigo como en cebada, los síntomas de la FE son fácilmente diagnosticados mediante observación visual, apareciendo los primeros indicios a los pocos días después de la infección, observándose manchas en las glumas, de aspecto húmedo, a veces asociado a coloración castaño oscura. Sin embargo, los síntomas más evidentes, se observan inmediatamente después y corresponden a la decoloración de espiguillas individuales que se tornan blanquecinas (Figs. 8A-8B), y contrastan con las no afectadas (Bai y Shaner, 1994; Wiese, 1977). Con respecto a los granos infectados, los mismos presentan un aspecto rugoso, con apariencia áspera, y en ocasiones con crecimiento superficial de micelio, que le otorga un aspecto rosado-blanquecino (Fig. 8C).



Figura 8. Síntomas de FE en granos de trigo. A) Síntomas observados en la espiga. B) Síntomas observados en las espiguillas .C) Granos infectados (izquierda) y granos sanos (derecha).

Los síntomas varían ligeramente de un tipo de cereal a otro, según si se trata de avena, cebada, centeno, trigo o triticale. Los síntomas de la FE dependen básicamente del momento de infección, de las condiciones ambientales durante el desarrollo de la enfermedad y de la especie de *Fusarium* en cuestión (Reis y Carmona, 2002). En coincidencia con lo anteriormente expuesto, a pesar de las

diferencias fisiológicas entre los cultivos de trigo y cebada, el ingreso de esporas es similar en estos dos cultivos. Sin embargo, el trigo es más susceptible que la cebada a la deposición de esporas dispersadas por el aire (Stenglein et al., 2014). Dicha susceptibilidad es explicada por la extrusión de anteras por fuera de la espiguilla y el tiempo de exposición de las mismas. Mientras que en trigo este fenómeno es visible y ocurre durante la plena floración del cultivo (50% de las plantas en antesis), en cebada rara vez se observan las anteras por fuera de la espiguilla, debido a que la floración ocurre durante el estadio fenológico de aparición de aristas (Miralles et al., 2011).

En cuanto a la magnitud de los síntomas, el impacto de la FE puede cuantificarse registrando solo dos variables: incidencia y severidad de la enfermedad. Mientras que la incidencia se evalúa a través del porcentaje de espigas afectadas por parcela, la severidad se calcula como el porcentaje de espiguillas enfermas sobre el total de la espiga. Estas dos variables pueden ser medidas estimando visualmente o cuantificando a través de un conteo, con el fin de determinar el nivel de infección del cultivo y estimar el desarrollo de la enfermedad (Kohli et al., 1995).

El desarrollo de la FE se ve favorecido por condiciones ambientales tales como temperaturas medias a altas, lluvias frecuentes y períodos con alta humedad relativa, coincidentes con el período de floración (McMullen et al., 1997). Dichas condiciones para la germinación de esporas y posterior infección varían dependiendo de qué especie fúngica se encuentre presente (Xu y Nicholson, 2009). En cuanto al período crítico de la infección, este generalmente abarca desde antesis hasta grano pastoso, siendo la principal causa de infección la permanencia de las anteras senescentes, expuestas luego de la polinización

(Leonard y Bushnell et al., 2003; McMullen et al., 1997). A nivel mundial, las grandes epifitias de FE generalmente coinciden con períodos de mojado mayores a 48-72 h durante la antesis. La probabilidad de infección del cultivo aumenta considerablemente cuando se considera la duración de la floración a nivel de cultivo. A modo de ejemplo, en cereales como el trigo, las anteras permanecen expuestas por un período en la espiga (aproximadamente 4 días), esta “ventana de infección” o período de susceptibilidad aumenta si consideramos la planta individual (12 días) o el cultivo a nivel de canopeo (30 días) (Reis, 1989).

Si bien el patógeno generalmente ingresa mediante las anteras expuestas en el estadio de floración, también puede ingresar ocasionalmente por penetración directa o por los estomas presentes en las glumas, pálea, lemma o raquilla. Finalmente, el patógeno puede colonizar el raquis y otras espiguillas (Ireta Moreno y Bekele, 1989; Strange y Smith, 1978). Así, la importancia de las anteras radica en que actúa como “puente de entrada” para el patógeno, siendo este hecho relacionado con la composición química de las mismas. Diversos estudios relacionaron la mayor susceptibilidad de los tejidos de las anteras con la presencia de un estimulante de crecimiento fúngico. Así, durante la década del 70', Strange et al. (1974) aislaron e identificaron dos compuestos (colina y betaína) como los dos principales componentes “promotores” del crecimiento fúngico, presente en las anteras y en el germen de trigo.

1.3.2. Agente etiológico.

La FE, también conocida como “golpe blanco de la espiga” o “Fusarium head blight” (FHB, por sus siglas en inglés) es una enfermedad causada por un complejo de hongos filamentosos del género *Fusarium*. El mismo pertenece al Phylum *Ascomycota*, orden *Hypocreales*, familia *Hypocreaceae*. El género fue introducido por el micólogo Link en 1809, como *Fusisporium*, identificando las especies que comprendía dicho género como agente causal de enfermedades en plantas, humanos y animales domésticos (Marasas et al., 1984; Vismer et al., 2002).

En general, los hongos causantes de la FE son saprofitos y parásitos facultativos, necrotróficos, no específicos, y poseen requerimientos simples, siendo la principal limitante para el desarrollo del patógeno la baja humedad relativa. Además, la mayor parte de las especies del género *Fusarium* habitan en el suelo, siendo capaces muchos de ellos, de sobrevivir como saprofitos tanto en materia orgánica como en plantas vivas, tejidos senescentes o residuos vegetales (Reis, 1988). Desde el punto de vista reproductivo, la mayoría de las especies de *Fusarium* son heterotálicas, encontrándose los órganos sexuales masculinos y femeninos en diferentes talos; o bien ambos órganos sexuales se pueden encontrar en el mismo talo, siendo este autoestéril (autocompatibilidad). Por ende, es necesaria la unión de dos talos compatibles para que la reproducción sexual se lleve a cabo (Nuevo Diccionario Ilustrado de Micología, 2006).

A nivel mundial, las especies de *Fusarium* más aisladas de granos sintomáticos, son cinco: *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. avenaceum* y *F. nivale* (Parry et al., 1995; Reis y Carmona, 2002). La especie de mayor ocurrencia a nivel mundial es *F. graminearum*, la cual conforma un complejo de

especies (FGSC-*Fusarium graminearum species complex*) formado por al menos 16 especies filogenéticamente diferentes. *Fusarium graminearum* sensu stricto (s.s.) es el miembro más común y extendido del complejo de especies, prevalente en América y Europa, pero también reportado en todo el mundo. (Reynoso et al. 2011; Castañares et al. 2016). Luego, podemos mencionar a *F. culmorum* como la especie de índole secundaria más frecuente en Europa, mientras que *F. poae* lo es en América. En cuanto a las dos especies restantes, *F. avenaceum* y *F. nivale*, son aisladas esporádicamente. Tradicionalmente, la identificación de las distintas especies de *Fusarium* ha sido sumamente compleja, debido principalmente a la gran variación de características tanto morfológicas como fisiológicas y genéticas. Para discriminar las distintas especies de este género, el procedimiento clásico consiste en observar la morfología de la colonia, su pigmentación, su tasa de crecimiento, las características de los conidios (micro, meso y macroconidios) y su presencia/ausencia, tamaño de los mismos y presencia o ausencia de clamidosporas (Windels, 1991). Para ello, los medios de cultivo más utilizados y recomendados son el Agar Agua Clavel (CLA) y el Agar Papa Glucosado (APG) (Anexo II). Mientras el medio de cultivo APG se utiliza para observar las características macroscópicas, el medio CLA favorece el desarrollo consistente de conidios, clamidosporas y demás estructuras morfológicas para su observación e identificación. Sin embargo, los métodos tradicionales de identificación, pueden ser dificultosos al momento de discriminar entre especies de *Fusarium* similares, para lo cual existen herramientas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). De esta manera, este tipo de herramientas nos permiten corroborar los análisis micológicos de rutina (Dinolfo, 2014b).

1.3.3. *Fusarium graminearum* y *Fusarium poae*.

Como se mencionó anteriormente, dos de las especies más aisladas mundialmente, tanto de granos de trigo como de cebada, son *F. graminearum* y *F. poae* (Fig. 9). Ambas especies son patógenos cosmopolitas, infectando una amplia gama de especies vegetales avena, arroz, cebada, centeno, trigo, triticale, entre otros (Dinolfo et al., 2019; Leslie y Summerell, 2006; Martínez et al., 2019; Stenglein et al., 2009).

Fusarium graminearum (Schw.) fue descrito por primera vez en 1838 como el estado asexual de *Gibberella zeae* (Schw.) Petch, el cual fue aislado de maíz (*Zea mays* L.) por el micólogo americano Lewis David von Schweinitz en 1822 (Saccardo, 1886). Contrariamente a la mayoría de las especies de *Fusarium*, su ciclo de vida es homotálico, por lo que la reproducción sexual ocurre en un solo talo, siendo este autocompatible. La fuente principal de inóculo es el rastrojo colonizado por el patógeno, con peritecios que producen y liberan ascosporas. Estas se dispersan en el ambiente y ocasionan la infección de las plantas. Según la clasificación de Wollemweber y Reinking, *F. graminearum* pertenece a la sección *Arthrosporiella*. En APG las colonias se caracterizan por un rápido crecimiento, con grandes cantidades de micelio denso, cuyo color varía desde un naranja pálido a amarillento, mientras que el medio se tiñe de coloraciones rojizas (Fig. 9B). Los esporodoquios generalmente están dispersos, pudiendo ser observados luego de un período de incubación de más de 30 días, siendo de color marrón-rojizo. Por otra parte, en CLA *F. graminearum* forma macroconidios delgados, con 5 a 6 septos, de forma falcada y con una célula basal en forma de pie (Fig. 9A). Los microconidios generalmente se encuentran ausentes, mientras que la formación de

clamidosporas es variable y su formación suele ser muy lenta (Leslie y Summerell, 2006).

Actualmente, *F. graminearum* es considerado un complejo de especies conocido como “*Fusarium graminearum species complex*” (FGSC), comprendiendo 16 especies filogenéticas: *F. austroamericanum*, *F. meridionale*, *F. boothii*, *F. mesoamericanum*, *F. acaciae-mearnsii*, *F. asiaticum*, *F. graminearum sensu stricto*, *F. cortaderiae*, *F. brasiliicum*, *F. vorosii*, *F. gerlachii*, *F. aethiopicum*, *F. ussurianum*, *F. louisianense*, *F. nepalense* y *Fusarium* spp (sin nombre asignado) (Aoki et al., 2012). Cabe destacar, que actualmente la diferenciación de estas especies del complejo, radica fundamentalmente en el empleo de métodos moleculares, principalmente la amplificación de regiones conservadas y posterior secuenciación, debido a la dificultad y complejidad de su separación a nivel morfológico.

Con respecto a *F. poae* (Peck) Wollenweber, esta especie fue descrita por primera vez por Wollenweber y Reinking en 1935. Actualmente, no se conoce su estadio sexual, siendo su ciclo de vida posiblemente heterotálico (Dinolfo et al., 2014a). El tipo principal de inóculo de *F. poae*, son los microconidios ovales (Fig. 9C) ubicados en conidióforos ramificados, por lo que este hongo fue primeramente descrito dentro del género *Sporotrichum*, hasta que se logró obtener el cultivo puro del mismo, logrando así observar la producción de macroconidios (Summerell et al., 2001). Sin embargo, la abundante producción de microconidios globosos posiciona a *F. poae* en la sección *Sporotrichiella* de Wollenweber (Nelson et al., 1983). En cuanto al crecimiento de *F. poae* en APG, el mismo produce un micelio aéreo denso, con

colores que van del blanco al rojo e incluso marrón rojizo, mientras que el color debajo del micelio puede variar desde el blanco-amarillento hasta un denso rojo carmín (Fig. 9D). Además, en el medio de cultivo CLA, *F. poae* desarrolla conglomerados de monofiálides con pequeñas ramificaciones o sin ellas, de 5 a 18 μm . Generalmente, los microconidios son abundantes y globosos, con forma oval o piriforme, pudiendo tener o no varios septos; mientras que los macroconidios no son frecuentes de observar, poseen forma de hoz, 2 a 5 septos, de 18 a 38 μm de longitud, y con una célula basal en forma de pie (Desjardins, 2006; Leslie y Summerell, 2006). Cabe resaltar, que *F. poae* es estable en cultivo artificial y frecuentemente produce un aroma frutal característico similar a amil-acetato.

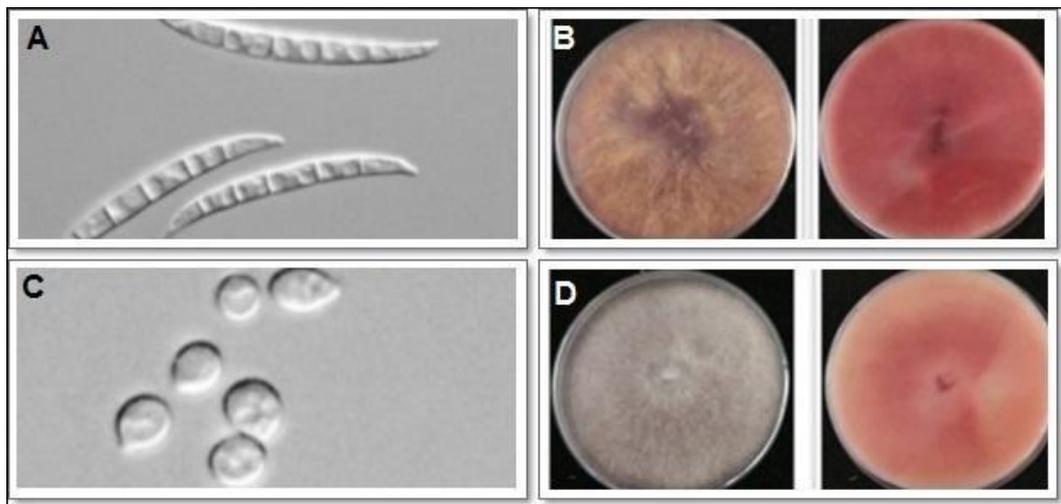


Figura 9. A-B) Macroconidios de *F. graminearum* y cultivo en APG, respectivamente. C-D) Microconidios de *F. poae* y cultivo en APG, respectivamente (Fuente: Leslie y Summerell, 2006; Bellesi et al., 2018).

1.3.4. Ciclo biológico y tipos de inóculo.

Especies tales como *Fusarium graminearum* y *F. poae* ingresan al hospedante (en este caso, trigo o cebada) durante la floración del cultivo, generalmente a través de las anteras. Como se ha mencionado anteriormente, la mayoría de las especies de *Fusarium* capaces de infectar los cereales, son capaces de sobrevivir saprofiticamente sobre los residuos de cosecha. Para el caso particular de las especies de *Fusarium* con fase sexual conocida (ej. *F. graminearum*), el inóculo puede estar compuesto por conidios, clamidosporas, fragmentos de hifas y ascosporas (Fig. 10). Las ascosporas producidas por el patógeno y liberadas a partir de los peritecios, junto con los micro y macroconidios liberados de los esporodocios, son los responsables de la infección (Reis y Carmona, 2002).

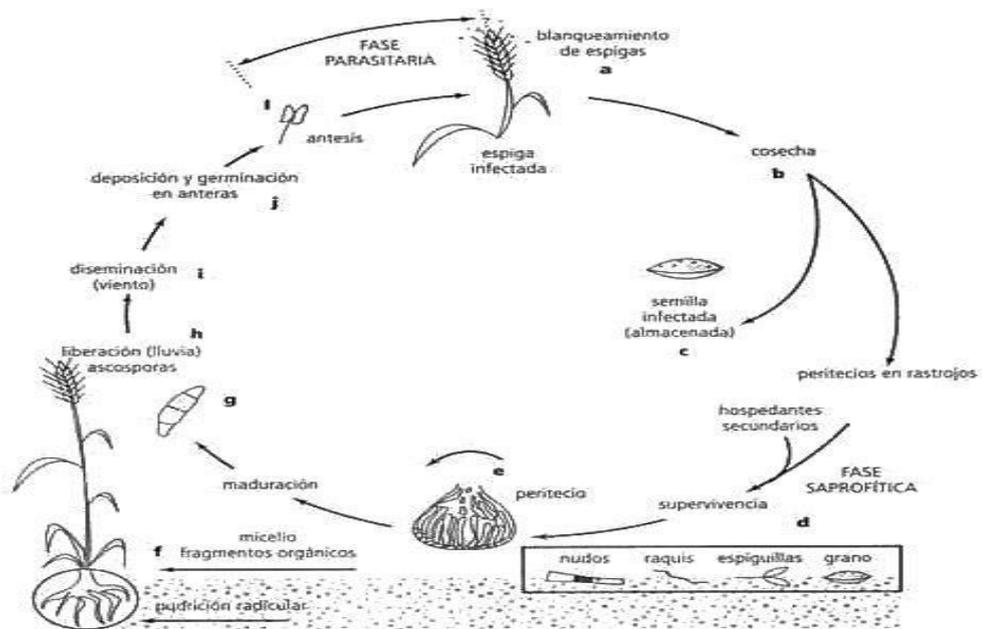


Figura 10. Ciclo biológico de *Fusarium graminearum* (Fuente: Reis y Carmona, 2002).

En el caso de las ascosporas, algunos autores sugieren que en presencia de lluvias o alta humedad, estas son liberadas desde los peritecios junto con una sustancia mucilaginosa. Tanto los conidios como las ascosporas requieren de una adecuada temperatura para su formación y maduración. A modo de ejemplo, para *F. graminearum* se ha observado una producción óptima de ascosporas a 28°C, mientras que la producción de macroconidios es máxima a 32°C (Pereyra y Lori, 2013). Cabe aclarar que para la formación y maduración de las ascas es necesario un período de precipitaciones, mientras que para la dispersión de las ascosporas a través del aire es necesario un período de sequedad y baja humedad relativa (Manstretta et al., 2016; Parry et al., 1995; Paulitz, 1996). Por otra parte, debido a la naturaleza hidrofílica y gelatinosa, los conidios requieren precipitaciones o salpicaduras junto con viento para ser transportados a distancias cortas (Reis y Carmona, 2002).

Ambos tipos de inóculos (conidios y ascosporas) se encuentran también en hospedantes alternativos, tales como malezas, principalmente gramíneas (Malaissi, 2016; Mourellos et al., 2014). Así, las mismas actúan como “especies puente” o reservorio de inóculo durante la época desfavorable para el patógeno o durante períodos en el cual no se encuentra el hospedante implantado, en el caso de los cultivos anuales. Posteriormente, luego de ser liberadas y transportadas hasta los órganos florales, las esporas germinan y colonizan las anteras, junto con los granos en formación, las brácteas florales y el raquis de la espiga. Además, ocasionalmente el patógeno puede también infectar el trigo de manera directa, penetrando por las glumas, aunque esta vía de infección pareciera ser menos importante que la realizada por las anteras (Bai y Shaner, 1994; Reis, 1988).

Con respecto a la cebada, el ingreso del patógeno a través de las anteras es menos importante que en trigo, debido a que en la cebada las anteras son excertas después de la dehiscencia del polen, contrariamente a lo que ocurre en trigo (Miralles et al., 2014; Stenglein et al., 2014). Otra de las vías de entrada del patógeno, es a través a las flores mediante las grietas formadas principalmente entre las glumelas (pálea y lemma), debido a que poseen células epidérmicas con paredes celulares muy delgadas y por ende susceptibles a la infección (Lewandowski et al., 2006).

Una vez que el patógeno ingresó al hospedante, el grado de desarrollo de la enfermedad depende no solo del estado de desarrollo del hospedante y de la cantidad de inóculo al cual ha sido expuesto, sino también de la duración de dicha exposición durante las condiciones de alta humedad relativa (>80%) y de las temperaturas adecuadas para el desarrollo del hongo (alrededor de 25°C) (Parry et al., 1995; Reis y Carmona, 2002). No obstante, se ha observado que prolongadas condiciones de humedad pueden ocasionar que la enfermedad desarrolle con temperaturas menores al óptimo de la especie y con bajos niveles de inóculo (McMullen et al., 1997).

Es de destacar la importancia que tienen las prácticas agronómicas tales como el uso de semilla limpia y sana, junto con el manejo de residuos, las rotaciones agrícolas y el tipo de labranza, en la carga de esporas de un determinado ambiente. Si bien, el uso de semillas infectadas con *Fusarium* (durante campañas previas) como simiente puede causar pudriciones radiculares o muerte de plántulas durante la implantación (*Damping off*), la misma fuente de inóculo no es importante para la infección posterior de las

espigas durante floración. La siembra directa, distintos tipos de labranzas conservacionistas y las rotaciones agrícolas basadas en especies gramíneas, favorecen considerablemente la continuidad del ciclo biológico del patógeno y su supervivencia en los residuos de cosecha (Pereyra y Lori, 2013; Reis y Carmona, 2013).

1.3.5. Manejo agronómico de la FE.

La estrecha relación de la FE con las condiciones climáticas, hacen de esta enfermedad una de las más difíciles de manejar. Una de las principales herramientas de manejo de la FE es el control químico, mediante la utilización de diversos fungicidas provenientes de las familias químicas de los benzimidazoles, estrobirulinas y triazoles. Si bien estas moléculas han sido ampliamente utilizadas a nivel mundial, su efectividad es limitada, debido principalmente a las diferentes respuestas observadas entre diferentes genotipos, condiciones climáticas, estados fenológicos al momento de la aplicación y dosis. Otro de los factores de importancia al momento de elegir un determinado control químico, es el retorno económico en rendimiento que obtiene el productor por unidad de producto aplicado (Dweba et al., 2017). Numerosos trabajos evaluaron diferentes combinaciones de fungicidas, sugiriendo que las moléculas más efectivas para combatir la FE pertenecen a la familia de los benzimidazoles (benomyl, carbendazim o procloraz) sumado a un triazol, siendo el tebuconazole el más efectivo (Haidukowski et al., 2005; Jones et al., 2000).

Otra de las prácticas para disminuir el impacto de la FE es la labranza del suelo, la cual provoca que los residuos de cosecha queden debajo del suelo removido, reduciendo la fuente de inóculo ya que la ausencia de luz impide la

formación de los peritecios. Como desventaja, la erosión del suelo se incrementa, por lo que otra de las alternativas para reducir la fuente de inóculo es la rotación de cultivos. Si bien, existen resultados divergentes con respecto a esta última alternativa, algunos autores sugieren que un período de dos años de rotación de cultivos, con especies no susceptibles a la FE, es suficiente para la eliminación del patógeno presente en los residuos del suelo (Pereyra y Lori, 2013). Además, se ha registrado una disminución en la fuente de inóculo en aquellos sistemas agrícolas que utilizan la alternancia de labranza como práctica de manejo (Watkins y Boosalis, 1994). En cambio, otros autores sostienen que la FE puede ocurrir de igual manera, ya que las ascosporas se encuentran presentes en el aire durante todo el año, siendo transportadas a grandes distancias y asegurando así la presencia de inóculo durante el período de floración del cultivo (Reis y Carmona, 2013).

Adicionalmente, las técnicas empleadas en el control biológico, particularmente utilizadas en cultivos orgánicos, utilizan microorganismos tales como bacterias u otros hongos que actúan como antagónicos contra diversas especies de *Fusarium*. Dichos organismos antagónicos compiten por el mismo sustrato o incluso sintetizan sustancias inhibitoras del crecimiento fúngico (fungistáticos), siendo utilizados como reemplazo del control químico, solo cuando las condiciones ambientales predisponentes pueden conducir a la enfermedad (Castañares, 2016). Además, recientemente se han incorporado diversos tipos de productos biológicos en base a elicitores, como por ejemplo, proteínas extraídas de *Acremonium strictum*. Estas proteínas, en contacto con la planta, activan las vías de señalización de defensa, mediante la activación de la

síntesis de diferentes hormonas tales como el ácido salicílico, jasmónico y etileno (Chalfoun, et al. 2013, 2018; González Montaner, 2019).

En un futuro cercano, diversas herramientas como el mejoramiento genético vegetal y la modelización de escenarios climáticos futuros, podrían estar disponibles para disminuir el potencial impacto de la FE; o bien disponibles para decidir el momento óptimo para realizar un control químico/biológico en cierto estadio fenológico. Sin embargo, el desarrollo de genotipos tolerantes o resistentes a la FE, tanto en trigo como cebada, es una tarea muy compleja desde el punto de vista del mejoramiento genético vegetal, ya que la FE es una enfermedad controlada por múltiples genes, cada uno de ellos con un aporte muy pequeño a la resistencia (resistencia poligénica). Además, el genotipo logrado luego debe cumplir con una cierta cantidad de características agronómicas y de calidad, ya sea para la industria harinera (trigo) o maltera (cebada) (Steffenson, 1999). La utilización de genotipos de ciclo más corto y con resistencia al frío, posibilitaría que el período de floración (o sea, el momento en el cual se produce la infección) ocurra cuando las condiciones climáticas son menos favorables para el desarrollo de la enfermedad, con temperaturas menores a 20°C (Reis y Carmona, 2013).

Es de destacar, que el manejo antrópico de los sistemas agrícolas, sumado a las condiciones climáticas, pueden favorecer o perjudicar de manera indirecta el desarrollo de una especie por sobre la otra; en este caso particular, la interacción entre *F. graminearum* y *F. poae*. De esta manera, Vogelgsang et al. (2019) observó una alta incidencia de *F. graminearum* en muestras de granos de trigo provenientes de campos que poseían maíz como cultivo antecesor, con labranzas mínimas, con un uso de genotipos con pobre resistencia a la FE y un control químico basado en estrobirulinas. Contrariamente, altos niveles de incidencias de

F. poae fueron observados en muestras provenientes de campos arados, con cultivos previos como canola, sugiriendo así la existencia de diferentes nichos ecológicos y de requerimientos divergentes en lo que respecta al crecimiento e infección de ambas especies de *Fusarium* (Vogelgsang et al., 2019).

1.3.6. Daños causados por la fusariosis de la espiga.

En términos generales, los daños causados por la enfermedad pueden ser de dos tipos: cuantitativos y cualitativos. En primer lugar, los daños cuantitativos observados son la reducción del rendimiento junto con una caída del peso hectolítrico del grano, del poder germinativo y del vigor de las semillas. Por otra parte, en trigo, los daños cualitativos se presentan con una disminución del contenido proteico y del gluten, disminuyendo así la calidad de las harinas (Mesterházy y Bartók, 1996; Reis y Carmona, 2002). Este fenómeno se debe a que el patógeno es capaz de degradar los gránulos de almidón, las paredes celulares y las proteínas del endosperma, afectando así la calidad industrial al disminuir en última instancia el rendimiento de molienda notablemente (Betchel et al., 1985; Phalip et al., 2005). En cuanto a los daños cualitativos en cebada, los mismos consisten en actividades metabólicas que ocurren durante el proceso de malteo, como la disminución del poder germinativo, y la degradación de diferentes fracciones de prolaminas (Pekkarinen et al., 2003; Sarlin et al., 2005; Schwarz et al., 2002).

Adicionalmente, a las pérdidas de calidad mencionadas anteriormente, se le suma la potencial producción de micotoxinas por parte del hongo. Estas micotoxinas, al ser nocivas tanto para la salud del hombre y de los animales

(principalmente monogástricos), disminuyen la calidad e inocuidad de las harinas destinadas a la alimentación. Por ende, concentraciones elevadas de micotoxinas impiden que los granos sean aptos para la alimentación y formulación de balanceados, dificultando posteriormente la comercialización, exportación y procesamiento de los mismos (McMullen et al., 1997).

Las condiciones principalmente de humedad y temperatura, generadas durante la cosecha, post-cosecha, transporte y almacenamiento poseen también considerable importancia al momento de la determinación de la inocuidad alimentaria. Esto se debe a que los patógenos fúngicos que se desarrollan sobre granos almacenados, como los pertenecientes al género *Fusarium*, tienen la capacidad de crecer bajo un amplio rango de condiciones ambientales (Bartosik et al., 2012; Bianchini et al., 2015).

Tanto en cebada como en trigo, se pueden evidenciar también daños secundarios producto de la presencia de *F. graminearum* y *F. poae* (Fig. 11). A modo de ejemplo, durante el proceso de panificación Nightingale et al. (1999), observaron que las enzimas proteolíticas encontradas en muestras de granos contaminadas con *Fusarium*, hidrolizan las proteínas del endosperma durante el proceso de mezclado y fermentación de la masa. De esta manera, el resultado final del proceso de panificación son masas muy débiles y una disminución en el volumen de pan. Por otra parte, en cultivos de cebada también se observan efectos indeseables, como disminución del rendimiento y de la calidad de la malta producida, junto con la excesiva producción de espuma en la cerveza (*gushing*) (Papadopoulou-Bouraoui et al., 2004; Schwarz et al., 2002). La ocurrencia de este fenómeno generalmente es atribuida a la presencia de hidrofobinas, proteínas activas sintetizadas por los hongos filamentosos con fines de crecimiento y

dispersión. Estructuralmente, estas moléculas poseen características anfífilas (una región hidrofóbica y otra región hidrofílica), lo que posibilita su interacción con el CO₂ y las proteínas de la espuma de la cerveza, desestabilizándola en última instancia y provocando su salida abrupta de la botella (Santa Cecilia Motilva, 2014).

Actualmente, en la Argentina, existen problemas sanitarios de fusariosis, principalmente en cultivos de trigo y cebada, ocurriendo epifitias de manera discontinuada debido fundamentalmente a las variaciones climáticas en cada una de las sub-regiones cerealeras. Las pérdidas de rendimiento en trigo durante epifitias moderadas alcanzan valores de entre un 10 a 20%. Sin embargo, se han registrado durante epifitias severas y en genotipos muy susceptibles pérdidas de hasta un 50% del rendimiento (Annone et al., 1994; Kohli et al., 1995; Villar de Galich, 2002). En cebada, si bien las pérdidas son menores en cuanto al rendimiento, la enfermedad puede afectar seriamente la calidad maltera (Nielsen et al., 2014).

Con respecto a los daños económicos que la FE produce a nivel mundial, en la actualidad se han desarrollado modelos que simulan y estiman las pérdidas en rendimiento ocasionadas por la enfermedad, sumado al costo de los tratamientos con fungicidas, limpieza de la semilla, descuentos y penalizaciones de comercialización. A modo de ejemplo, para la campaña agrícola 2015/2016 se estimaron pérdidas de aproximadamente 1,47 billones de dólares solo para E.E.U.U., siendo las pérdidas en trigo de alrededor de 1.176 billones de dólares y de 293 millones de dólares para cebada cervecera (Wilson et al., 2018).



Figura 11. Observación de síntomas y daños de *F. graminearum* (izquierda) y *F. poae* (derecha) en espigas de cebada (cv. Stander).

1.3.7. Antecedentes de la fusariosis de la espiga en el mundo y en la Argentina.

Durante los primeros años del siglo XX, la FE fue considerada como la mayor amenaza del trigo y la cebada en Europa, siendo descrita por primera vez en 1884 en Inglaterra (Muriuki, 2001) y años más tarde reportada en los E.E.U.U. (Arthur, 1891). Actualmente, es una enfermedad importante en el norte-centro de Europa (Alemania, Italia y Polonia, entre otros) y Asia, principalmente en China y Japón donde la enfermedad es considerada endémica (Birr et al., 2019; Bilska et al., 2018; Infantino et al., 2012). Además, la enfermedad está presente en la zona norte de África, E.E.U.U. y sur de Canadá, altiplanos de México, así como en Sudamérica, principalmente en la Argentina, sur de Brasil, Paraguay y Uruguay (Ireta-Moreno y Gilchrist 1994; Kohli 1989). Históricamente, algunas de las

epifitias más importantes de la FE, con valores mayores al 10% de severidad, se registraron en: Canadá (1980), China (1984-1991), E.E.U.U. (1993,1994,1995, 2003), Japón y Corea (1940-1960), India (1988), Irlanda (1942), Reino Unido (1884) y Uruguay (1977, 1990-1992) (Bianchini et al., 2015; Dubin et al., 1996; Bottalico y Perrone, 2002; McMullen et al., 1997; Pirgozliev et al., 2003).

En la Argentina, la primer observación de *Fusarium graminearum* en trigo, fue realizada en el año 1927 por el fitopatólogo Juan Bautista Marchionatto, encontrándose asociada a un síndrome de pudrición radicular. De esta manera, los síntomas sobre la espiga, denominado como “*Golpe Blanco*” recién comenzaron a difundirse a principios de 1930. Sin embargo, no fue hasta las campañas comprendidas entre 1945 y 1956 que los síntomas de esta enfermedad fueron observados de manera generalizada en el país. A mediados de la década del 60', el patógeno ya era considerado una seria restricción para la producción de trigos harineros en el área centro-norte de la región triguera argentina, mientras que para los trigos candeales en el sur-este de esta región (Kohli et al. 1995).

Con respecto al cultivo de cebada, no fue hasta la campaña 1991/1992 que se realizó uno de los primeros relevamientos de enfermedades a nivel país de importancia, en el cual se registró una incidencia promedio del 90% de mancha en red (*Pyrenophora teres*), 22% de escaldadura (*Rynchosporium secalis*) y 20,4% de roya de la hoja (*Puccinia hordei*). Con respecto a la FE, la misma ocupó un rol secundario con valores de incidencia leves que rondaron entre el 5 al 8,1% (Carmona et al., 1992). Sin embargo, en los últimos años la incidencia de esta enfermedad se ha incrementado considerablemente, encontrándose ampliamente distribuida en toda la región cerealera de la Argentina, aislándose no solamente a *F. graminearum* como agente causal de la FE, sino también a *F. poae* (Nogueira

et al., 2018). Este incremento en la incidencia de la FE en cebada se debe principalmente al aumento de la superficie agrícola, el cual varió desde menos de 100.000 ha en 1985 a 1,8 millones de ha durante la campaña 2011/2012 (CERE, 2017); sumado al incremento de labranzas mínimas y la siembra directa, rotaciones agrícolas inadecuadas (incremento de la participación del maíz) y a potenciales cambios climáticos en la región en cuanto a la distribución de precipitaciones y temperaturas.

En la actualidad, las últimas epifitias de FE de mayor relevancia en la Argentina ocurrieron durante las campañas 2012/2013 y 2018/2019 (Alberione et al., 2015, Martínez et al., 2014; Martínez y Moschini, 2018;), junto con las epifitias anteriores ocurridas en los años 1927, 1945, 1950, 1960, 1963, 1967, 1977, 1978, 1985, 1993, 1997 y 2001 (Moschini y Fortugno, 1996). Comúnmente, las regiones más afectadas campaña tras campaña son el norte y el sudeste de la provincia de Buenos Aires, sudeste de Córdoba, sur de Santa Fé y sur de Entre Ríos, debido a que las condiciones ambientales son las propicias para la ocurrencia de dicha enfermedad (Fig. 12). Pérdidas de aproximadamente el 20-30% del rendimiento fueron registradas para las epifitias más severas ocurridas en la Argentina durante: 1945, 1946, 1978, 1985 y 1993 (Dubin et al., 1996).

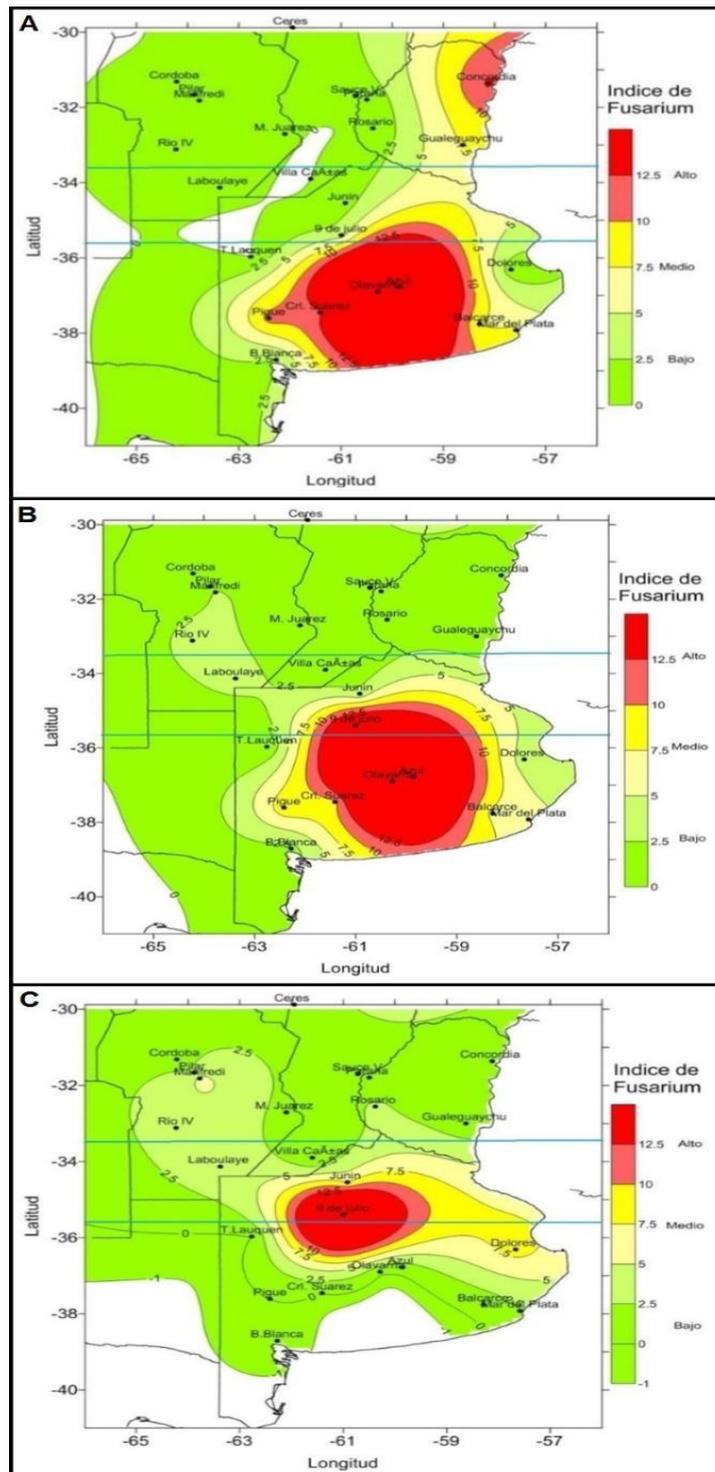


Figura 12. Mapas de predicción de la FE en la región pampeana durante la campaña 2018/2019. A) Fecha de floración temprana (fines de octubre). B) Fecha de floración media (inicios de noviembre). C) Fecha de floración tardía (primer quincena de noviembre) (Fuente: Martínez y Moschini, 2018).

1.4. Micotoxinas.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por ciertos géneros de hongos, cuya ingesta, inhalación o absorción cutánea reducen la actividad, enferman o causan la muerte de animales, aves y personas (Pitt, 1996). Actualmente, las micotoxinas son consideradas uno de los contaminantes más importantes de los alimentos, debido a su impacto negativo sobre la salud pública, la seguridad alimentaria y la economía de muchos países, principalmente los países en desarrollo (FAO, 2003). Específicamente, afectan una amplia gama de productos agrícolas, como cereales, frutos secos, granos de café, nueces y semillas de oleaginosas, entre otros.

Dentro de los diferentes géneros de hongos que pueden producir micotoxinas, podemos citar a: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Claviceps*, *Fusarium* y *Penicillium* (Steyn, 1995). Como característica común, muchas de las especies pertenecientes al género *Fusarium* son capaces de sintetizar más de una toxina en simultáneo. Las mismas pueden ser sintetizadas en plantas infectadas a campo, antes de la cosecha, o en el grano ya maduro durante el transporte y/o almacenamiento (Bottalico, 1998). En regiones templadas, *Fusarium* es el género de hongos toxicogénicos más importante, debido a que es posible encontrar diferentes especies de este género en distintos cereales y otros alimentos de consumo. Las micotoxinas producidas por estos patógenos, son toxinas naturales que aún después de sufrir procesos de elaboración de alimentos y bebidas, permanecen estables. Por ende, es posible detectarlas no solo en alimentos sin procesar, sino también en los alimentos ya procesados (Gutleb et al., 2002). Sin embargo, el tipo y la cantidad de micotoxinas producidas por una especie varían de año a año, dependiendo fundamentalmente de los factores ambientales, de la

especie de planta cultivada y del almacenamiento de los granos (Placinta et al., 1999).

En la actualidad, la contaminación con micotoxinas en los granos de cereales tales como el trigo y la cebada, es de gran preocupación en todo el mundo, debido a que su presencia en todo tipo de alimentos parece inevitable (Stenglein, 2010). Se estima que más del 25% de la producción mundial de alimentos se encuentra contaminada en un cierto grado con micotoxinas (Lawlor y Lynch, 2001). Esta problemática mundial incide directamente sobre la inocuidad de los alimentos, la cual es un requisito básico de la calidad de los mismos. Por definición, la inocuidad de los alimentos implica la ausencia de contaminantes, adulterantes, toxinas y/o cualquier otra sustancia que pueda convertir el alimento en nocivo para la salud, ya sea de manera aguda o crónica. Así, se puede considerar la calidad como una característica compleja de los alimentos que determina su aceptabilidad o no, por parte del consumidor (FAO, 1999). De aquí la importancia y relevancia del estudio de las micotoxinas y su impacto sobre la calidad de los alimentos, más aún tratándose de cereales tan importantes a nivel mundial, como lo son el trigo y la cebada.

1.4.1. Tricotecenos.

Dentro de los más de 80 tipos de toxinas que es capaz de producir el género *Fusarium*, se destacan principalmente los tricotecenos, los cuales fueron aislados por primera vez en 1948 de *Trichothecium roseum* (Summerell et al., 2001). Son metabolitos sesquiterpenoides, biológicamente activos, de bajo peso molecular y anfipáticos, característica que le permite moverse pasivamente a través de las membranas celulares. Además, poseen una elevada termoestabilidad, siendo tóxicos potentes de las células eucarióticas, causando lesiones dérmicas, alteraciones de la respuesta inmunológica e inhibición de la síntesis de macromoléculas, con acción letal en dosis altas (Desjardins, 2006).

Estructuralmente, los tricotecenos se caracterizan por poseer patrones variables de oxigenación y esterificación en las posiciones C-3, C-4, C-7, C-8 y C-15, dando origen a diferentes derivados. Así, este tipo de toxinas puede ser clasificado en cuatro grandes grupos, de los cuales dos de ellos (tricotecenos de tipo A y B) son producidos por el género *Fusarium*. La diferencia principal entre los tricotecenos de tipo A y los de tipo B, radica en que los primeros son conocidos por ser más tóxicos (Rotter et al., 1996). Los tricotecenos tipo de A están caracterizados por poseer en el C-8 un grupo funcional distinto a una cetona, a diferencia de los tricotecenos tipo B los cuales poseen una cetona como grupo funcional en el C-8 (Gutleb et al., 2002). A modo de ejemplo, tricotecenos tales como el diacetoxiscirpenol (DAS); monoacetoxiscirpenol (MAS); T-2 y el HT-2, pertenecen al tipo A, y son responsables de causar irritaciones en la piel, vómitos, diarreas, abortos, alteraciones hematológicas y cáncer (Lori et al., 1992). En cambio, tricotecenos tales como el deoxinivalenol (DON); nivalenol (NIV); fusarenona-X (FUS) y sus derivados, pertenecen al tipo B. Las mismas son

causantes de alteraciones digestivas y vómitos, que motivan la inapetencia y disminuyen la ganancia de peso en monogástricos, principalmente en cerdos (Lori et al., 1992; Miller, 1989).

Dos de los tricotecenos con efectos marcadamente tóxicos para animales y humanos, son el NIV y el DON, debido a que son rápidamente absorbidos en el tracto intestinal y distribuidos en todo el organismo, produciéndose rápidamente un pico de concentración en intestinos, hígado, riñón y sangre. Por otra parte, en humanos las altas dosis de ingesta de tricotecenos, se manifiesta generalmente con vómitos y rechazo de los alimentos contaminados (Williams et al., 1989). Ocasionalmente, la ingesta de estos tricotecenos puede producir también anorexia, lesiones orales, gastro-intestinales y lesiones renales, entre otros daños al organismo (Desjardins, 2006).

Diversos tipos y concentraciones de tricotecenos pueden ser producidas por las especies del género *Fusarium*. Por ejemplo, especies aisladas con mayor frecuencia a nivel mundial como *F. graminearum* y *F. culmorum* son conocidas como productoras de tricotecenos del tipo B (DON, NIV, FUM, etc.); mientras que especies secundarias aisladas esporádicamente tales como, *F. sporotrichioides* y *F. langsethiae* producen tricotecenos del tipo A (MAS, DAS, T-2). En cuanto a *F. poae*, la misma es una especie capaz de producir ambos tipos de tricotecenos, A y B (Stenglein, 2009; Thrane et al., 2004). A modo de ejemplo, en la Argentina Álvarez et al. (2009) observaron que el principal tricoteceno producido por *F. graminearum* en trigo es el DON; mientras que Nogueira et al. (2018) reportaron en cebada la predominancia de especies tales como *F. graminearum* y *F. poae*, encontrando concentraciones considerables de DON y NIV.

1.4.2. Biosíntesis de los tricotecenos.

La vía biosintética de los tricotecenos en las especies de *Fusarium* comienza con la ciclación de una molécula de pirofosfato de farnesilo, el primer intermediario metabólico, para formar una molécula de tricodieno (Fig. 13). Esta reacción se encuentra codificada por el gen *TRI5*, el cual fue reportado por primera vez en la toxina T-2 producida por un aislamiento de *F. sporotrichioides* (Hohn y Beremand, 1989). En segunda instancia, luego de la secuenciación del genoma de *F. graminearum* realizada en 2003, se determinó que los genes “*TRI*” que regulan la biosíntesis de los tricotecenos se encuentran agrupados principalmente en tres loci (Desjardins, 2006). El primero de ellos contiene la mayoría de los genes que controlan la biosíntesis de tricotecenos, tales como los genes *TRI8*, *TRI7*, *TRI3*, *TRI4*, *TRI6*, *TRI5*, *TRI10*, *TRI9*, *TRI11*, *TRI12*, *TRI13*, *TRI14* (Brown et al., 2004); mientras que el segundo “cluster” está conformado por los genes *TRI1-TRI16* (Peplow et al., 2003), siendo el último grupo formado únicamente por el gen *TRI101* (Kimura et al., 1998).

La acetilación y la hidroxilación desempeñan un papel muy importante en la determinación de los tricotecenos de tipo B. A pesar de compartir la misma ruta de biosíntesis, la mayor diferencia entre DON y NIV se encuentra dada por la presencia o ausencia de un grupo hidroxilo en la posición del C-4. Dicha producción de DON vs NIV es controlada por los genes *TRI13* y *TRI7* (Lee et al., 2002).

Por otra parte, se ha reportado la producción de derivados acetilados del DON, tales como el 3-acetil-deoxinivalenol (3-ADON) y el 15-acetil-deoxinivalenol(15-ADON), difiriendo entre sí, solamente en la presencia de un grupo acetilo en el C-3 o en el C-15, respectivamente. La presencia y/o ausencia de los grupos acetilos en las posiciones C-3 y C-15, pueden estar controladas por tres genes: (i) el gen *TRI101*, que codifica la acetilación en C-3 de isotricodermol a isotricodermin; (ii) el gen *TRI3*, que codifica una enzima que cataliza la acetilación en el C-15; y 3) el gen *TRI8*, que cataliza la eliminación del grupo acetilo en el C-3 (Desjardins, 2006). También, se ha hipotetizado que la falta de expresión o función del *TRI3* o *TRI8* puede provocar la formación de 3-ADON (Kimura et al., 2003).

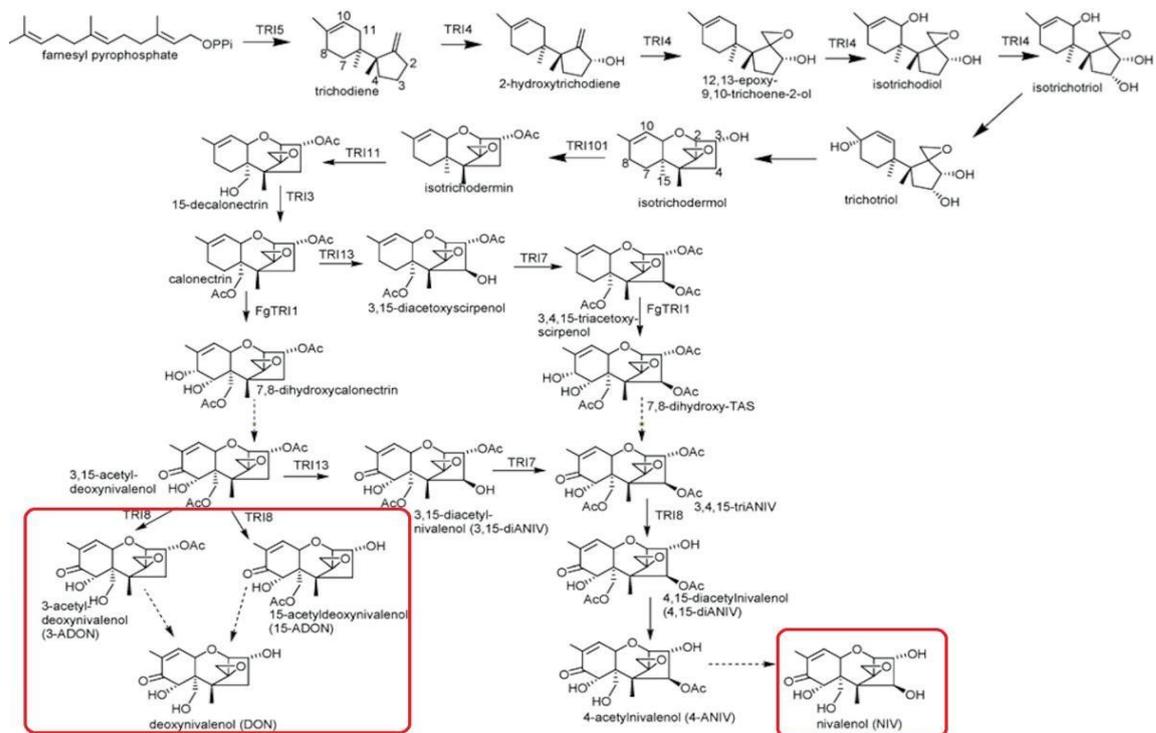


Figura 13. Vía biosintética para la producción de tricotecenos en *Fusarium*

(Fuente: McCormick et al., 2011).

1.4.3. Micotoxinas de interés producidas por *Fusarium graminearum*.

Fusarium graminearum es una de las principales especies productoras de DON y sus derivados acetilados (3-ADON y 15-ADON). Como se detalló anteriormente, el DON es un tricoteceno de tipo B, siendo estructuralmente un sesquiterpenoide cíclico (Fig. 14). El DON es un compuesto muy estable, ya sea durante el procesado y cocción de los alimentos, como durante el transporte y almacenamiento de los mismos. En los tejidos de la planta, condiciones de temperatura de entre 21°C y 29°C junto con elevada humedad son óptimas para la síntesis de DON por *Fusarium* (Glenn, 2007). Otra de las propiedades que posee el DON, es la de ser translocado a través de los diversos tejidos de las plantas, incluso antes de que el micelio aéreo del patógeno sea visible. Al parecer, este metabolito actuaría disminuyendo la síntesis proteica de la planta, suprimiendo y retrasando la respuesta de defensa al ataque fúngico. Este hecho le otorga un rol muy importante vinculado a la capacidad patogénica de *F. graminearum* tanto en trigo como en cebada (Reid y Zhu, 2000).

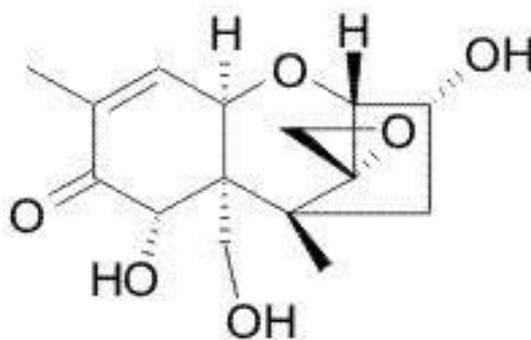


Figura 14. Estructura química de la molécula de deoxinivalenol.

El DON y sus derivados acetilados afectan tanto la síntesis de ADN como de ARN. Además, estos tricotecenos inhiben la síntesis de proteínas a nivel ribosomal, ya que en general se unen fuertemente a la sub-unidad 60 ribosomal presente en las células eucariotas, interfiriendo con la actividad de la peptidiltransferasa. También, el DON al carecer de sustituyentes en el C-4, actúa inhibiendo la elongación de la cadena peptídica (Desjardins, 2006).

Además, el DON posee efectos sobre el ser humano, siendo uno de los principales la acción hemolítica sobre los glóbulos rojos. Sin embargo, es necesario discriminar los efectos dispares que poseen una dosis aguda o una dosis crónica. La primera de ellas puede causar vómitos y diarrea, mientras que una dosis crónica (la cuál consta de pequeñas dosis en la ración) puede afectar negativamente el consumo, provocando anorexia y pérdida de peso en humanos. A pesar de ello, ambos efectos se pueden observar de manera conjunta ya que la ingesta de tricotecenos es mediada en ambos casos por la afección del sistema nervioso central y/o periférico, más específicamente actuando sobre los receptores de serotonina (Le Bail y Verger, 2005). Con respecto a su potencial efecto sobre el sistema inmunológico, se han reportado efectos negativos tanto en seres humanos como en animales, tales como la reducción de la producción de inmunoglobulinas y la depleción de los linfocitos desde el bazo y el timo. Además, dependiendo de la concentración, el DON puede alterar transitoriamente la expresión de citocinas e inducir la apoptosis celular, incluso en casos de intoxicación con elevadas concentraciones, puede producir necrosis en varios tejidos como el tracto gastro-intestinal, médula ósea y tejidos linfáticos (Le Bail y Verger, 2005).

Sobre los animales, el DON puede producir efectos diversos. Por ejemplo, la dosis mínima que causa vómitos en cerdos es de 0,05 a 0,2 $\mu\text{g/g}$, mientras que con concentraciones superiores a 1-2 $\mu\text{g/g}$ la ingesta se ve reducida drásticamente. En cuanto al ganado vacuno, este es más tolerante a la presencia de DON, ya que es detoxificado por las bacterias del rumen. En animales lecheros, no se ha reportado rechazo del alimento ni disminución de la producción de leche, pero si se han encontrado cambios en la composición, observándose una disminución en el contenido de grasa en la leche (Goyarts y Danicke, 2006).

En el caso del ganado de carne, las observaciones de algunos investigadores indican que raciones contaminadas hasta 18 $\mu\text{g/g}$ de DON no afectan el consumo, ganancia diaria, conversión alimenticia y el tamaño corporal de novillos durante un período de engorde de alrededor de 115 días. Sin embargo, los tricotecenos al ser inmunodepresores, pueden resultar más tóxicos en animales inmunodeprimidos (Yiannikouris y Jouanny, 2002). Por otra parte, se ha reportado que las aves también son tolerantes a las concentraciones de DON encontradas comúnmente en las raciones. Aunque se han reportado concentraciones de DON en huevos de aves, esto no implicaría un riesgo mayor para la salud humana, ya que representa un bajo porcentaje de la ingesta diaria de dicha micotoxina (Sypecka et al., 2004).

1.4.4. Micotoxinas de interés producidas por *Fusarium poae*.

Fusarium poae tiene la capacidad de producir una amplia gama de micotoxinas, tanto tricotecenos del tipo A (DAS, MAS, HT-2 y T-2), así como también tricotecenos del tipo B (NIV y FUS) (Rotter et al. 1996; Summerell et al., 2001). Estas toxinas poseen efectos inmunosupresores, apoptóticos, neurotóxicos, citotóxicos y linfotóxicos, tanto en consumidores humanos como animales (Chaudhary y Rao, 2010).

Fusarium poae se considera como la principal especie productora de NIV (Fig. 15). Numeros estudios se han focalizado en los efectos de la exposición tanto de humanos como de animales al NIV. Nagashima et al. (2006) reportaron daños severos en la proliferación celular, induciendo la apoptosis en las células HL60 pertenecientes a células de leucemia promielocíticas humanas. Por otra parte, en animales monogástricos tales como el cerdo, las intoxicaciones ocurren esporádicamente, reportándose en algunos casos necropatías y ulceraciones gástricas con alimentos contaminados (Mallman y Dilkin, 2011).

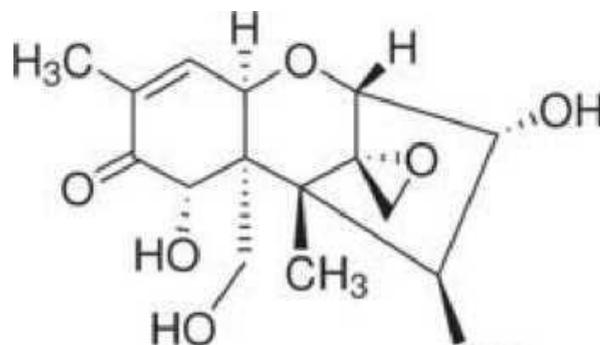


Figura 15. Estructura química de la molécula de nivalenol.

Con respecto a las demás micotoxinas producidas por *F. poae*, las cuáles no pertenecen al grupo de los tricotecenos, se ha demostrado la capacidad que posee dicho patógeno para producir beauvericinas (BEA), eniatinas (EN) y moniliformina (MON) (Jestoi et al., 2008; Thrane et al., 2004). Estas micotoxinas han sido consideradas menores en cuanto a los efectos que pueden causar sobre los consumidores en comparación con aquellas pertenecientes al grupo de los tricotecenos. Sin embargo, se ha demostrado un notable efecto genotóxico con consecuentes aberraciones cromosómicas, efectos inmunosupresores y citotóxicos (Calo et al., 2004).

Cabe aclarar, que también se ha citado la capacidad de *F. poae* para producir DON (Salas et al., 1999), aunque estudios recientes no han podido confirmarlo. Asimismo, la capacidad de producir toxinas tales como HT-2 y T-2 por parte de *F. poae*, actualmente se encuentra cuestionada.

1.5. Cambio climático global.

1.5.1. Panorama mundial.

Actualmente, el cambio climático global es una de las preocupaciones más importantes para la sociedad y la comunidad científica mundial. La influencia de la actividad humana sobre el sistema climático global es clara, siendo las emisiones antropogénicas de gases de efecto invernadero (GEI) las más elevadas de la historia, impactando así de manera directa e indirecta en los sistemas humanos y naturales. Así, el fenómeno conocido como “*calentamiento climático global*” es inequívoco, y desde la década de 1950, muchos de los cambios observados no tienen precedentes durante décadas o milenios. Las emisiones antropogénicas de GEI se han incrementado desde la era industrial, registrándose actualmente los valores más altos de los últimos 800.000 años. Esto ha llevado a concentraciones atmosféricas sin precedentes, de gases tales como dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) y óxido nitroso (N₂O) (Fig. 16A). El uso de combustibles fósiles, tanto en actividades agrícolas como industriales, junto con la explotación desmedida de los recursos naturales, el crecimiento demográfico exponencial y la creciente demanda de alimentos, han sido reconocidas como las principales causas (IPCC, 2014).

La atmósfera y el océano se han calentado constantemente desde los comienzos de la era industrial, reduciendo los niveles de nieve y hielo. Se estima que el 90% del aumento de la energía producto del cambio climático global y la emisión de GEI entre 1971 y 2010, ha sido absorbido por las grandes masas de agua (océanos), mientras que solo el 1% ha sido acumulado en la atmósfera. De esta manera, se sugiere que los 75 m superiores de la superficie del mar se calentaron a una tasa de 0,11°C por década, durante el

período mencionado. Cabe destacar, que desde el comienzo de la era industrial la captación oceánica de CO₂ ha resultado en la acidificación del océano, incrementándose en 0,1 (equivalente al 26% medido en concentración de hidrógeno) (IPCC, 2014). Con respecto a las grandes masas de hielo, durante el período comprendido entre 1992 y 2011, los mayores descensos han sido registrados en Groenlandia y la Antártida, junto con los glaciares que también han continuado reduciéndose en gran parte del mundo. La cobertura de nieve y la temperatura del permafrost ha aumentado también desde la década del 80', en respuesta al aumento de la temperatura de la superficie del suelo (Fig. 16B). Con respecto al hielo marino del Ártico, la extensión de la mismo disminuyó desde un 3,5% a 4,1% por década desde 1979. Como consecuencia, el nivel medio del mar se ha incrementado desde 0,17 a 0,20 m durante el período 1901-2010, siendo la mayor tasa media de crecimiento de los últimos dos milenios (Fig. 16C) (IPCC, 2014).

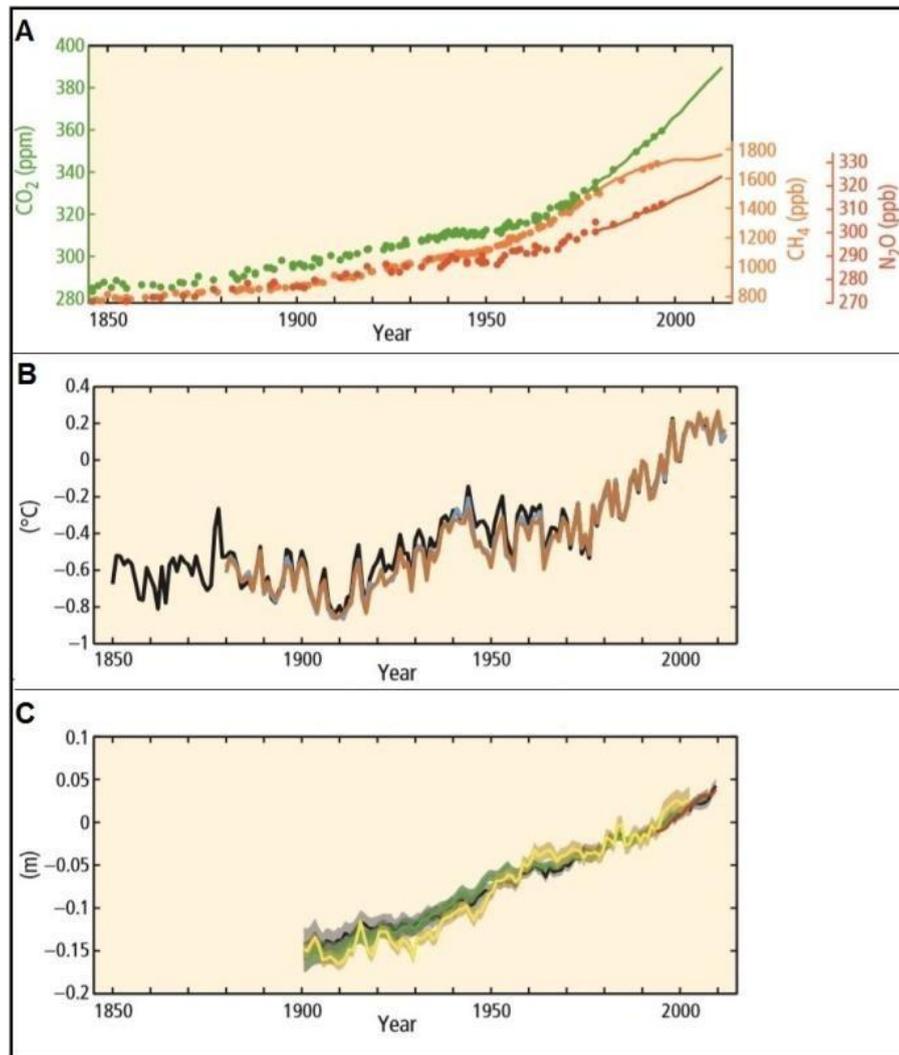


Figura 16. A) Incremento de la concentración de GEI en la atmósfera. B) Incremento de la temperatura de la superficie terrestre a nivel mundial. C) Aumento del nivel del mar (Fuente: IPCC, 2014).

1.5.2. Panorama nacional y escenarios futuros.

Numerosos estudios proyectan que las condiciones ambientales en el futuro cambiarán y la temperatura será una de las variables más afectadas por el cambio climático (Alexander et al., 2006; Ingram, 1999; IPCC, 2007). Los antecedentes en la Argentina demuestran que en el período comprendido entre 1960-2010, se registraron cambios significativos en diversas variables como temperatura media anual (aumento de 0,4°C a 1°C) y variaciones en la frecuencia de eventos extremos (aumento de noches cálidas y disminución del número de heladas). En cuanto a las precipitaciones, las mismas aumentaron en gran parte del país, observándose un cambio hacia precipitaciones más intensas y frecuentes. Además, el desplazamiento del anticiclón del Atlántico Sur hacia el sur generó aumentos en las frecuencias de vientos del sector este y sudeste sobre el Río de la Plata, causando que el viento norte ingrese al centro del país con mayor aporte de humedad y calor desde latitudes tropicales (CIMA, 2015).

En cuanto a la provincia de Buenos Aires, durante el período 1950-2010, se observaron cambios significativos principalmente en la temperatura media anual (+0,6°C), temperatura mínima anual (+0,8°C), el número de noches con heladas (-7,3 días), el número de noches tropicales (+6,6 días) junto con el aumento de la duración de las olas de calor. Con respecto a las precipitaciones, si bien existió una gran variación interanual en dicho período, se observó un incremento de 103,6 mm en la precipitación media anual para la provincia de Buenos Aires, atribuyéndose el mayor incremento a las lluvias estivales (+56,1 mm). Además, la duración e intensidad de precipitaciones extremas se incrementó con respecto a los eventos mayores a 5 días consecutivos (CIMA, 2015).

Según diversos modelos climáticos, se proyecta para fines de siglo que la temperatura media global aumentará de 1,1 a 6,4°C; mientras que para la región pampeana se estima un aumento de la temperatura media de entre 0,5°C a 1°C para el período 2015-2040 y de hasta 1,5 a 3,5°C para el período 2075-2099 (CIMA, 2015; IPCC, 2007). En relación al aumento de la frecuencia de eventos extremos, a nivel mundial, se han detectado cambios significativos en diversos parámetros. Por ejemplo, se ha registrado un aumento significativo en la temperatura mínima, junto con el incremento en el número anual de noches cálidas, las cuales han aumentado en aproximadamente 25 días al año desde 1951 hasta la actualidad (Alexander et al., 2006; Berneiter, 2016). El Centro de Investigaciones del Mar y la Atmósfera (CIMA) realizó recientemente una evaluación de las tendencias del clima en la Argentina, desde la segunda mitad del siglo XX, junto con una proyección del clima a futuro (siglo XXI). Principalmente, se elaboraron dos escenarios futuros (RCP: Representative Concentration Pathways): (i) RCP 4.5, escenario en el cual se simulan emisiones moderadas de GEI; y (ii) RCP 8.5, escenario el cual muestra el caso extremo de emisiones de GEI con las tendencias crecientes actuales hasta fin de siglo (CIMA, 2015). Los resultados observados en ambos escenarios, muestran que la temperatura media aumentaría tanto en un futuro cercano (2015-2039) como en un futuro lejano (2075-2099), siendo las temperaturas mayores para fin de siglo. En el futuro cercano, se proyectan aumentos muy similares en los dos escenarios con valores entre 0,5 y 1°C en casi todo el país. Esto implicaría una aceleración del calentamiento observado entre 1986-2010, que en casi todo el país fue menor a 0,5°C. Con respecto al patrón geográfico, el incremento de temperatura es mayor en el norte que en el sur, observándose

que en todos los casos, los aumentos de temperatura son menos pronunciados en las zonas como la Patagonia y la provincia de Buenos Aires, debido a que se encuentran más expuestos e influenciados por los vientos oceánicos predominantes. Contrariamente, la región noroeste registraría los máximos calentamientos, debido a su lejanía con el mar, estimando que el ingreso de frentes fríos en esta zona sería cada vez más esporádico, principalmente debido a su orografía (Fig. 17).

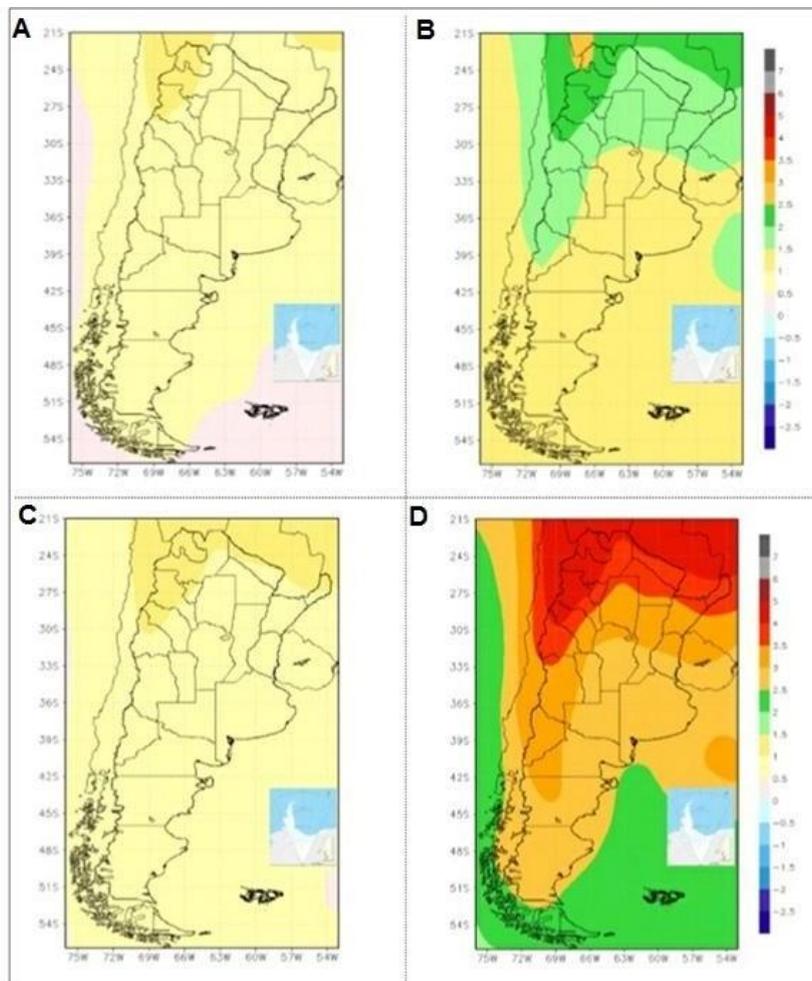


Figura 17. Temperaturas proyectadas bajo dos escenarios diferentes A-B) Futuro cercano (2015-2039) y futuro lejano (2075-2099) bajo escenario RCP 4.5. C-D) Futuro cercano (2015-2039) y futuro lejano (2075-2099) bajo escenario RCP 8.5 (Fuente: CIMA, 2015).

En cuanto a las precipitaciones, los cambios proyectados para ambos escenarios futuros, son relativamente de menor importancia. En el escenario RCP 8.5 en el período 2075-2099, los cambios estimados rondan el +/- 10%, por lo que se si se considera la fuente de error de estos modelos, se puede asumir que no habría mayores cambios en el país con respecto a las precipitaciones (Fig. 18).

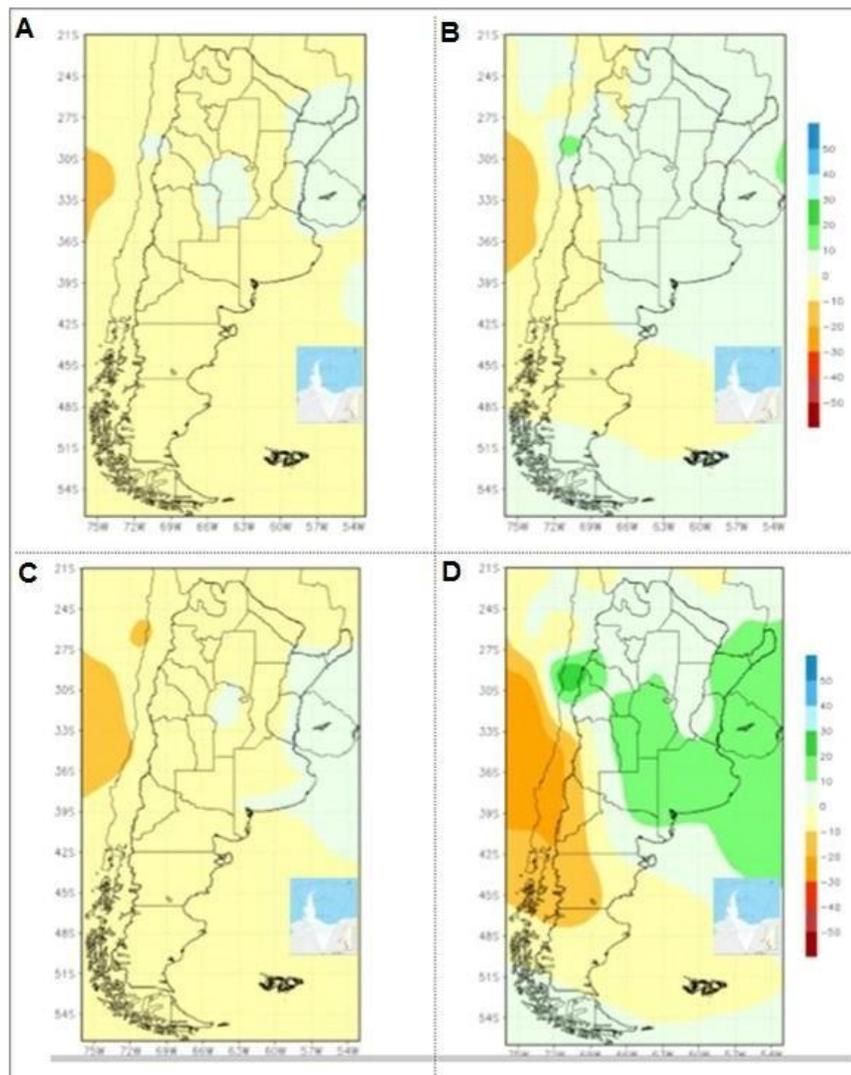


Figura 18. Precipitaciones proyectadas bajo dos escenarios diferentes A-B) Futuro cercano (2015-2039) y futuro lejano (2075-2099) bajo escenario RCP 4.5. C-D) Futuro cercano (2015-2039) y futuro lejano (2075-2099) bajo escenario RCP 8.5 (Fuente: CIMA, 2015).

1.5.3. Impacto del cambio climático en la agricultura.

Si bien el impacto del cambio climático sobre la producción agrícola, es aún incierto, estudios recientes indican efectos negativos sobre los cultivos. El aumento directo de las temperaturas nocturnas sobre cereales de invierno tales como trigo y cebada, tiene un impacto negativo en los rendimientos al acelerar el desarrollo durante el período crítico del cultivo, reduciendo el período en el cual se determina el número de granos y posteriormente la tasa de llenado. De esta manera, se ha determinado una reducción del 7% del rendimiento por cada 1°C de aumento de la temperatura nocturna durante el período crítico del cultivo, mientras que el calentamiento nocturno durante el llenado de grano produjo un 3-6% de disminución en los componentes del rendimiento (número y peso de grano) por cada 1°C de aumento (García et al., 2015; 2016; 2018).

Actualmente, se desconoce el potencial impacto del cambio climático sobre las interacciones planta-patógeno, más específicamente sobre el patosistema *F. graminearum*/*F. poae*- trigo/cebada. Teniendo en cuenta que cada patosistema es muy diferente y dependiente de muchos factores (región geográfica, condiciones climáticas, especies de plantas y/o patógenos), cualquier generalización acerca de los efectos del cambio climático sobre los cultivos y/o patógenos es compleja de realizar. Cambios en la temperatura, concentración de CO₂, precipitaciones y humedad, pueden extender la cantidad de tiempo disponible para la reproducción y diseminación del patógeno e impactar negativamente en el estado sanitario del cultivo (Berneiter, 2016; Medina, 2015; 2017a). Considerando la fenología de los cultivos y la presencia en el ambiente de diversos patógenos, es de suponer que tanto la temperatura como las precipitaciones se incrementarán en la etapa de floración de ciertos

cultivos, siendo más cercana al óptimo para algunos agentes etiológicos causantes de enfermedades, como lo es la FE. Como consecuencia, esto traería no solo problemas de variación en los rendimientos, sino también una disminución en la calidad e inocuidad de los granos destinados a la industria alimenticia (Berneiter, 2016; Madgwick et al., 2011; Russell y Nelson, 2010).

HIPÓTESIS

Según lo expuesto a lo largo de todo el capítulo I, se plantean como hipótesis:

HI) “La interacción de los distintos genotipos cebada y trigo con *Fusarium graminearum* y *F. poae* se encuentra relacionada al genotipo y a la especie de *Fusarium* inoculada, siendo ésta significativamente mayor cuando los patógenos se inoculan de manera conjunta”.

III) “El aumento de la temperatura nocturna favorece la colonización y producción de toxinas de *Fusarium*”

OBJETIVOS GENERALES Y PARTICULARES

Objetivo general

- ❖ Estudiar el efecto de la interacción entre *Fusarium graminearum* y *F. poae* y los dos cereales de invierno con mayor superficie sembrada en la Argentina (cebada y trigo), bajo condiciones de temperatura actuales y proyectadas a futuro.

Objetivos particulares

- ❖ Evaluar la patogenicidad de *Fusarium graminearum* y de *F. poae* en distintos genotipos de cebada y trigo.
- ❖ Cuantificar variaciones en el rendimiento, poder germinativo, tenor proteico y peso de granos de cebada y trigo provenientes de distintos genotipos inoculados con *F. graminearum* y *F. poae*.
- ❖ Determinar la producción de toxinas de *F. graminearum* y de *F. poae* en granos de cebada y trigo provenientes de plantas inoculadas.
- ❖ Evaluar el efecto del aumento de la temperatura nocturna proyectada para condiciones de cambio climático en los parámetros antes mencionados.

CAPÍTULO II

Materiales

y

Métodos

Generales

2. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES.

2.1. Sitio experimental.

Los ensayos a campo fueron llevados a cabo en la Chacra Experimental de la Facultad de Agronomía de Azul (UNCPBA), ubicada frente a la ruta nacional N°3 km 304, en la provincia de Buenos Aires, Argentina ($36^{\circ}49'41,4''$ S; $59^{\circ}53'11,6''$ W) (Fig. 19).



Figura 19. Circulos rojos: A) Imagen satelital de los ensayos experimentales durante la campaña agrícola 2016/2017. B) Vista aérea del sitio experimental desde un dron agrícola (Noviembre 2017). En rojo: suelo desnudo. En verde: cultivo de trigo en floración. (Fuente: Imagen Satelital Google 2017)

Según la clasificación de suelos, el suelo en la zona de estudio es un argiudol típico, siendo las propiedades físico-químicas las siguientes, para la profundidad 0-20 cm:

- ❖ Textura: suelo franco-arcilloso.
- ❖ pH = 6,06 (1: 2,5 en agua).

- ❖ Nitrógeno = 7,10 kg N/ha (reflectometría).
- ❖ Fósforo disponible = 26,50 ppm.
- ❖ Materia orgánica = 3,23%.

2.2. Conducción general de los ensayos a campo.

La siembra se realizó utilizando una sembradora hortícola manual de un surco (Earthway© M.1001-B). En cuanto al manejo del cultivo, las plantas se cultivaron en ausencia de cualquier estrés nutricional, aplicando insecticidas y herbicidas para el control de insectos y malezas cuando fue necesario. Ningún tratamiento suplementario de riego ni aplicación de fungicidas fue llevado a cabo.

El inóculo se aplicó en ausencia de viento, para disminuir la deriva a parcelas vecinas y evitar la contaminación cruzada. Con este fin, se utilizaron paneles plásticos de 1,60 m de lado, los cuáles fueron colocados en las parcelas adyacentes al momento de inocular. Luego de retirados los paneles, los mismos fueron enjuagados dos veces con agua destilada estéril (ADE), antes de su posterior re-utilización. Las condiciones bajo las cuáles se aplicaron los respectivos inóculos, fueron: (i) ausencia de viento, para limitar la deriva del inóculo a las parcelas vecinas; (ii) por la tarde (horas previas al atardecer), para evitar la evaporación del inóculo; (iii) manteniendo una distancia entre los picos aspersores y las espigas de alrededor de 5 cm, para evitar la dispersión de esporas a parcelas contiguas.

Los datos de temperatura, humedad relativa y precipitaciones, durante el período comprendido desde la inoculación hasta la cosecha, fueron obtenidos de la estación meteorológica del Servicio Meteorológico Nacional (SMN) ubicada a 100 m del sitio experimental y del Centro Regional de Agrometeorología (CRA, UNCPBA).

2.2.1. Ensayos de interacción *F. graminearum*/*F. poae* en cebada/trigo.

Los ensayos a campo se repitieron durante las campañas agrícolas 2014/2015, 2015/2016 y 2016/2017 (de aquí en adelante mencionados como años 2014, 2015 y 2016, respectivamente). Los ensayos se llevaron a cabo bajo sistema de labranza convencional, con labores con disco de arado a 15 cm de profundidad. Las fechas de siembra rondaron entre el 14 al 16 de julio, dependiendo de las condiciones climáticas de cada año. El tamaño de cada parcela fue de 8 x 1,5 m, siendo la distancia entre parcelas de 1 m y la densidad de siembra de 350 semillas/m².

En primer lugar, se sembraron, inocularon y evaluaron cinco genotipos comerciales de cebada y cinco genotipos de trigo (ver 3.2.1. y 4.2.1., respectivamente). Los experimentos a campo, tanto en cebada como trigo, fueron realizados utilizando el mismo diseño experimental, el cuál consistió en asignar al azar cada uno de los cinco genotipos de cebada o trigo, a 20 parcelas de 8 m x 1,5 m (cuatro parcelas por genotipo) (Figs. 20A-20B). Cada parcela se dividió en cuatro subparcelas a las que se asignó al azar la inoculación con cada uno de los cuatro tratamientos (con *F. graminearum*, con *F. poae*, con ambos patógenos y un tratamiento control sin *Fusarium*).

2.2.2. Ensayo a campo con aumento de la temperatura nocturna.

Se sembraron, inocularon y evaluaron un genotipo de cada especie (trigo y cebada) con susceptibilidad a *Fusarium*, descritos en 5.2.1 (Mackintosh et al. 2006; Stenglein et al. 2012, 2014). El genotipo de cebada y trigo seleccionado en cada caso, se sembró en la misma fecha (15 de julio y 15

de septiembre, respectivamente) durante las tres campañas evaluadas (2016/2017, 2017/2018 y 2018/2019, de aquí en adelante mencionados como años 2016, 2017 y 2018, respectivamente) acorde a la duración del ciclo de cada especie. Los ensayos fueron conducidos bajo condiciones ambientales naturales, en ambiente cerrado sin aumento de temperatura y en ambiente cerrado con aumento de temperatura. Para la realización de estos ensayos se utilizaron carpas, construidas con una estructura de madera (de dimensiones 1,5 x 3 m) y recubiertas con polietileno transparente (200 μm de espesor), con cierta inclinación para el escurrimiento de las precipitaciones (laterales de 1 y 1,5 m de altura) (Fig. 20D). Estas carpas se colocaron durante la noche sobre las parcelas correspondientes, por un período de 21 días consecutivos desde la inoculación (floración) hasta la evaluación de los síntomas. En este caso, a cada parcela se le asignaron los siguientes tratamientos:

- ❖ Testigo (T): parcelas sin carpas.
- ❖ Carpa control (CC): parcelas con carpas solamente (sin modificación de la temperatura), para evaluar el posible efecto de la “carpa”. Cabe aclarar, que el objetivo de colocar una carpa testigo (CC) consistió en registrar el posible efecto de la carpa, y demás posibles factores que pudieran influir sobre el desarrollo de la FE.
- ❖ Carpa con modificación de la temperatura (CT): parcelas con carpa, dentro de la cual la temperatura se aumentó en 3 °C con relación a la temperatura exterior, por medio de un equipo aditivo (Cavadevices©).

Los equipos aditivos consistieron en un regulador de temperatura, conectado a dos sensores de temperatura (uno dentro de la carpa y otro sensor fuera de la misma). A su vez, el regulador de temperatura, según las mediciones registradas por estos sensores, encendía/apagaba automáticamente el accionar de los caloventores durante la noche, para mantener esa diferencia seteadas de temperaturas entre el interior de la carpa y el exterior de la misma (en este caso, de 3°C). Como medida de seguridad ante posibles inconvenientes eléctricos y/o desperfectos en alguno de los caloventores, se colocaron 2 equipos aditivos, junto con sus respectivos caloventores, por carpa. Además, con el fin de registrar información de temperatura y humedad, se colocó un registrador de datos de 4 canales (“datalogger”, Cavadevices©), en cada tratamiento a la altura de la espiga (Fig. 20C).

En cuanto al diseño experimental, el mismo consistió en tres bloques, cada uno de los cuales incluyó a los tres tratamientos previamente descritos. Cada bloque se dividió en tres parcelas de 3 m x 1,5 m, cada una de las cuales se sembró al azar con trigo o con cebada. Asimismo, cada parcela se subdividió en tres subparcelas a las que se les asignó al azar la aplicación de los tratamientos de inoculación: *F. graminearum*, *F. poae* y tratamiento control (ADE+Tween 20 al 0,05%).



Figura 20. Ensayos de interacción en trigo y cebada, en diferentes estadios fenológicos: A) Macollaje. B) Madurez fisiológica. Ensayos de aumento de temperatura: C) Registrador de datos, ubicado a la altura de la espiga (“datalogger”, Cavadevices©). D) Equipos aditivos de control de temperatura (Cavadevices©).

2.3. Aislamientos de *Fusarium* utilizados.

Para la inoculación de los ensayos mencionados anteriormente (2.2.1 y 2.2.2), se utilizó una mezcla de 4 aislamientos de *Fusarium graminearum* y otra mezcla de 4 aislamientos de *F. poae* con la capacidad de producir toxinas *in vitro*, previamente caracterizados y evaluados (Castañares et al. 2014; Dinolfo et al. 2012) de la colección de hongos del BIOLAB-Azul (UNCPBA, Buenos Aires, Argentina) (Tabla 4, Fig. 21). El inóculo consistió de una suspensión de conidios, la cual se ajustó a una concentración de 1×10^5 conidios/mL. Cada uno de los patógenos se inoculó en forma separada, incluyendo un tratamiento con una mezcla de ambos patógenos para evaluar la posibilidad de efecto aditivo, junto con un tratamiento control (o testigo).

Tabla 4. Aislamientos de *Fusarium* utilizados.

Especie	Aislamiento	Producción <i>in vitro</i> (µg/g)				Referencia Bibliográfica
		DON	3-ADON	15-ADON	NIV	
<i>F. graminearum</i>	3.4	88,85	3,80	n.d.	0,14	Castañares et al. (2014)
	88.1	421,93	15,90	2,10	n.d.	
	92.2	28,65	n.d.	n.d.	n.d.	
	129.1	642,86	5,72	1,33	n.d.	
<i>F. poae</i>	FP-TSa1b	n.d.	n.d.	n.d.	8,7	Dinolfo et al. (2012)
	FP-TBig1a	n.d.	n.d.	n.d.	3,5	
	FP-TMa1a	n.d.	n.d.	n.d.	2,2	
	FP-TPe1a	n.d.	n.d.	n.d.	0,9	

n.d.no detectable

Para *F. graminearum*, el inóculo fúngico fue producido colocando pequeños cubos de agar (1 *plug* de 0,5 x 0,5 cm por Erlenmeyer) con micelio en medio líquido con carboximetilcelulosa (CMC) (Anexo II) . A continuación, se colocaron 50 mL del medio de cultivo CMC en un Erlenmeyer de 250 mL, agitándose continuamente, utilizando un agitador rotativo con controlador de temperatura (FAC©) (Fig. 21B), bajo las siguientes condiciones: 100 rpm, 25 ± 2°C y oscuridad durante 10 días. Por otra parte, para la realización del inóculo de *F. poae*, el medio utilizado fue APG (Anexo II), colocando dicho medio en placas de Petri (90 mm de diámetro) (Fig. 21A). En este caso, para *F. poae* el tiempo de incubación fue de 7 días, bajo condiciones de temperatura y luz controladas (25 ± 2°C, ciclos con alternancia de 12 h de luz y 12 h oscuridad). Luego, la recolección de conidios se realizó mediante el lavado con 5 mL de ADE.

Finalmente, para ambas especies de *Fusarium*, la suspensión resultante se filtró a través de una gasa, ajustándose la suspensión a la concentración de 1 x 10⁵ conidios/mL, utilizando un hemocitómetro de Neubauer (Brennan et al., 2005). De esta manera, la suspensión final se preparó utilizando partes iguales de los

cuatro aislamientos para cada especie de *Fusarium*. En última instancia, se añadió a la suspensión Tween 20 (0,05%) como tensioactivo.

En cuanto al momento de inoculación, en cebada las espigas fueron inoculadas cuando en más del 50% de las plantas se observó el estadio de aparición de aristas (Fig. 22A) (Buerstmayr et al., 2004). En este caso, debido a la desuniformidad de maduración entre espigas y a las diferencias entre plantas y parcelas, se aplicaron dos inoculaciones. En trigo, las espigas fueron inoculadas cuando el 50% alcanzó el estadio de antesis (Fig. 22B) (Vogelgsang et al., 2008). Con respecto al tratamiento control (ADE), al igual que en las suspensiones con los patógenos, se le adicionó Tween 20 (0,05%), aplicando todos los tratamientos en forma de *spray* hasta el “punto de goteo” de las plantas, mediante la utilización de un pulverizador a presión (Fig. 22C).

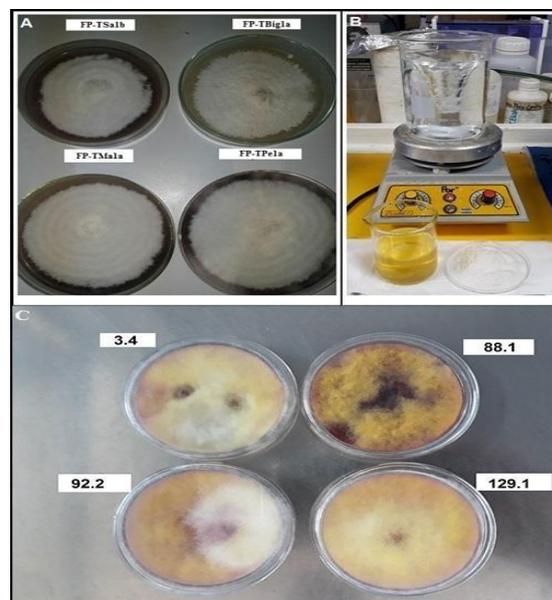


Figura 21. A). Aislamientos de *F. poae* utilizados para la producción del inóculo en medio de cultivo APG (2%). B) Preparación del medio líquido de cultivo (CMC) para el crecimiento de los aislamientos de *F. graminearum*. C) Aislamientos de *F. graminearum* utilizados para la producción del inóculo en medio de cultivo APG (2%) (Fuente: Castañares et al., 2014; Dinolfo et al., 2012).



Figura 22. A) Estado fenológico de aparición de aristas en plantas de cebada cervecera (*Hordeum vulgare* L.). B) Plena floración (anthesis) en plantas de trigo pan (*Triticum aestivum* L.). C) Inoculación por asperjado con la suspensión de conidios (1×10^5 conidios/mL) hasta “punto de goteo”.

CAPÍTULO III

Interacción de

Fusarium graminearum

y *Fusarium poae*

en cebada cervecera

(*Hordeum vulgare* L.)

3.1. Introducción.

La cebada (*Hordeum vulgare* L.) es uno de los cultivos de invierno más sembrados en el mundo, debido a sus múltiples usos y destinos, tales como el consumo humano, la alimentación animal y la industria del malteo. En los últimos años, la producción de cebada de “dos hileras” se ha incrementado significativamente, siendo el principal destino la industria cervecera, aunque el uso de cebada para la alimentación animal también se ha incrementado en volúmenes considerables. Los granos con destino a maltería deben cumplir una serie de requisitos y parámetros de calidad comercial. Los más importantes son: el poder germinativo (>98%), la concentración de proteínas (<12%) y el calibre del grano (con bajo porcentaje de fracciones bajo zaranda de 2,2 mm) (Anexo I) (Schwarz et al., 2006).

Dentro de los granos de los cereales, existe un amplio grupo de proteínas de almacenamiento, las cuales son muy abundantes y se denominan prolaminas. En cebada, estas proteínas se denominan hordeinas y representan la mayor fracción de las proteínas de almacenamiento del endosperma en los granos. Conocer la composición de estas proteínas es de vital importancia, ya que el tipo de proteína almacenada influye directamente en el extracto de malta, independientemente de la concentración de proteína de grano. Así, las hordeinas se clasifican principalmente en tres grupos: (i) D-hordeinas, de alto peso molecular; (ii) C-hordeinas, pobres en azufre; (iii) B-hordeinas, ricas en azufre. En primer lugar, las D-hordeinas tienen un tamaño aproximado de 100 kDa, representando menos del 10% del contenido total del grano; mientras que las C-hordeinas poseen un tamaño menor (55-70 kDa), representando un 10-20% de las proteínas totales. Las mismas carecen de residuos de cisteína, y no forman

complejos con otras proteínas. Por otra parte, las B-hordeinas tienen un tamaño de aproximadamente 36-44 kDa, existiendo abundantes residuos de cisteína, por lo que pueden formar puentes disulfuro intracatenarios y entre cadenas. Esta última fracción, es la más abundante representando alrededor del 75 al 80% de las hordeinas totales, siendo el factor principal que afecta la calidad de la proteína, existiendo una correlación negativa entre el contenido de B-hordeinas y el extracto de malta (Salgado-Albarran et al., 2015).

Una de las enfermedades más devastadoras en cultivos de invierno, es la FE, ocurriendo en la mayoría de las regiones cerealeras del mundo. Si bien, las pérdidas en rendimiento son menos importantes que en trigo, la FE causa severos daños cualitativos, afectando la inocuidad de los granos destinados a maltería y causando graves pérdidas económicas. Esta enfermedad es observada principalmente en regiones con clima cálido y húmedo, coincidiendo con la etapa de floración de este cereal. Actualmente, *F. graminearum* es la especie dominante aislada en todo el mundo, pero en los últimos años, varios investigadores han reportado que *F. poae* se encuentra presente en diversos sustratos, como la cebada (Nielsen et al., 2014; Nogueira et al., 2018). Sin embargo, no está claro si ambos patógenos son más agresivos si se encuentran de manera conjunta o por separado, y sus respectivos daños para este cultivo.

Los procesos más afectados por esta enfermedad fúngica son el malteo y por ende, la elaboración de cerveza, siendo el fenómeno más conocido el *gushing*. Además, en términos generales, se han informado efectos significativos sobre la germinación de los granos de cebada, el contenido de nitrógeno soluble y nitrógeno amino libre (FAN, *Free amino nitrogen*), el color del mosto y los niveles de β -glucano, siendo probablemente responsable de estas variaciones las

diversas enzimas producidas por este género fúngico. A pesar de ello, la mayor preocupación radica en el uso de cebada infectada con *Fusarium*, debido a la presencia de micotoxinas (Fig. 23) (Schwarz, et al. 2006; Sarlin et al., 2005).



Figura 23. A) Granos de cebada malteados e infectados por *Fusarium* spp. B) Corte transversal. Se puede apreciar el crecimiento micelial (rosado) y la degradación del endosperma almidonoso.

Los hongos del género *Fusarium* tienen la capacidad de producir tricotecenos, uno de los grupos más importantes de micotoxinas. Numerosos estudios han reportado concentraciones finales de DON en cervezas comerciales, reportando concentraciones de 0,30 a 569 $\mu\text{g/L}$ (Papadopolou-Bouraoui et al., 2004; Schwarz et al., 2006); mientras que respecto a NIV, se han registrado concentraciones que alcanzaron valores de $2,40 \pm 1,9 \mu\text{g/L}$ (Bryla et al., 2018). A pesar de los reportes mencionados anteriormente, el Comité Científico Europeo de Alimentos (SCF) ha establecido límites solo para DON, considerando una ingesta diaria tolerable de 1 mg por kg de peso corporal, mientras que para NIV, se

estableció un valor límite provisorio de 0,7 mg por kg de peso corporal (EC, 2006).

Investigaciones previas destacan la importancia de la contaminación con micotoxinas producidas por *Fusarium* y el daño cuantitativo/cualitativo que este género de hongos produce sobre los cereales de invierno, más específicamente sobre cebada cervecera. Además, se ha reportado en co-inoculaciones con diferentes especies de *Fusarium*, que estas interacciones pueden generar mayor competencia por los recursos, junto con una mayor producción de toxinas bajo estas condiciones de estrés. Sin embargo, en lo que respecta a la observación visual de los síntomas, no se ha encontrado hasta la actualidad evidencia que sustente la existencia de sinergismo entre las distintas especies de *Fusarium* (Xu y Nicholson, 2009). De esta manera, el objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de la presencia de *F. graminearum* y *F. poae* sobre los parámetros de la enfermedad, la calidad del grano y la contaminación por micotoxinas, en cebada cervecera.

3.2. Materiales y Métodos.

3.2.1. Genotipos de cebada.

Se evaluaron cinco genotipos de cebada cervecera con diferentes comportamientos con respecto a rendimiento y calidad maltera. Además, fueron seleccionados en base a sus similares ciclos vegetativos y duración (ciclos intermedios-cortos). Así, la floración de todos los genotipos se sincronizó durante 7 a 15 días (fines de octubre-principios de noviembre), encontrándose expuestos a las mismas condiciones ambientales.

Todos los genotipos de cebada seleccionados fueron de “dos hileras”, como se describen a continuación:

- ❖ Andreia: genotipo relativamente nuevo, con muy buen calibre y calidad maltera. Actualmente ocupa casi el 75% del área de siembra (González Montaner, 2019).
- ❖ INTA 7302: genotipo doble-propósito, utilizada tanto para malteo como forrajera.
- ❖ Scarlett: el genotipo más sembrado a nivel mundial y nacional, durante muchos años. De gran calidad y buen rendimiento, ha sido reemplazado paulatinamente por Andreia y Shakira, entre otros.
- ❖ Scrabble: genotipo con gran potencial de rendimiento y calibre, pero que no es utilizada con frecuencia en los últimos años.
- ❖ Shakira: genotipo con alto potencial de rendimiento, ocupando actualmente el segundo lugar en cuanto a área de siembra, con alrededor del 24% de la misma (González Montaner, 2019).

3.2.2. Conducción del ensayo y diseño experimental.

El diseño del experimento fue en parcelas divididas con cuatro bloques (Fig. 24). Considerando los cinco genotipos, junto con los dos niveles de patógenos (presencia y/o ausencia de *F. graminearum* y *F. poae*), los 20 tratamientos resultantes fueron ubicados aleatoriamente en cada uno de los cuatro bloques. Así, cada parcela sembrada con un genotipo se dividió en cuatro subparcelas, asignando al azar una de las cuatro combinaciones posibles de inoculación.

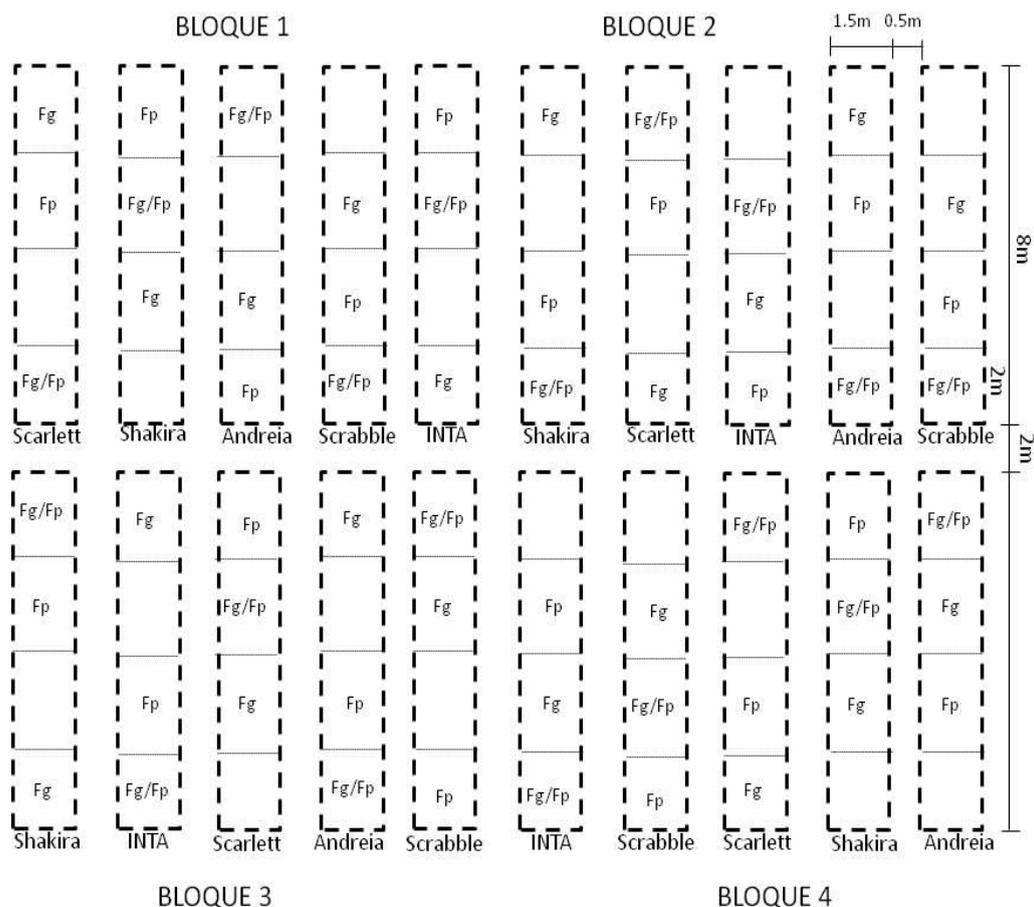


Figura 24. Diseño experimental de los ensayos realizados en cebada durante los años 2014, 2015 y 2016. Fp: tratamiento con *F. poae*; Fg: tratamiento con *F. graminearum*, Fg/Fp: tratamiento con *F. poae* + *F. graminearum*.

3.2.3. Medición de variables.

La evaluación visual de la enfermedad, registrando variables tales como incidencia, severidad y FHB índice se realizó 21 días después de la segunda inoculación, realizando un recuento del número de granos sintomáticos (aquellas con lesiones o decoloración de granos/glumas con margen oscuro) en 40 espigas por tratamiento, seleccionadas al azar, según Campbell y Lipps (1998) (Fig. 25A). A continuación, se calculó: (i) incidencia (número de espigas afectadas por subparcela), (ii) severidad (número de espiguillas con síntomas por espiga); y (iii) FHB Índice (incidencia x severidad/100). Luego de madurez fisiológica, las parcelas se recolectaron, se trillaron (trilladora estacionaria Forti©) y se limpiaron manualmente.

A continuación, se procedió con la medición del rendimiento en grano por parcela (g/m^2) y del peso de mil granos de cada muestra. La concentración de proteínas y el porcentaje de humedad se midieron con un analizador NIT con monocromador de doble cara (Agricheck®, Bruins Instruments). Luego se tamizaron los granos, con el fin de registrar los valores de calibre sobre zaranda de 2,5 mm y bajo zaranda de 2,2 mm, acorde a la norma de comercialización de cebada cervecera vigente (Anexo I). Las muestras de 100 g se tamizaron sobre un juego de cuatro zarandas, con agitación durante 5 min para determinar el calibre de cada muestra (Fig. 25C). En cuanto a la evaluación de la energía germinativa y el poder germinativo de los granos de cebada, los mismos fueron evaluados de acuerdo a los protocolos de la *International Seed Testing Association* (ISTA). Para el caso de la cebada cervecera, se colocaron 100 granos por bandeja, con cuatro repeticiones y con papel absorbente por debajo y por encima de las simientes. Luego se agregó ADE hasta saturar el papel, y se realizaron los

recuentos al cuarto día (energía germinativa) y al séptimo día (poder germinativo) (ISTA, 2017).

Las diferentes fracciones de hordeinas se extrajeron de granos mediante el método descrito por Salgado-Albarrán et al. (2015). Las muestras de grano se obtuvieron de los cinco surcos centrales de la parcela (1m x 1m), eliminando los dos surcos laterales. Para obtener una submuestra representativa, cada muestra de cebada obtenida (alrededor de 300 a 500 g) se homogeneizó. A continuación, las muestras se redujeron sucesivamente hasta obtener 25 g, utilizando un divisor de granos (CerealTools®), y luego se molieron con un molinillo experimental (FW-100, Arcano®). A continuación, se pesaron 50 mg de la harina obtenida a partir de la molienda y se colocaron en tubos Eppendorf (2,0 mL). Posteriormente, se agregó a cada muestra 1,6 mL de amortiguador de extracción, el cual contenía 12,5 mM de borato de sodio, 1% de dodecil sulfato de sodio y 2% de β -mercaptoetanol (pH=10). Luego se incubaron los tubos en agitación (120 rpm) a temperatura ambiente durante un período de 5 h. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron centrifugadas a 11.000 rpm durante 15 min. Se tomó el sobrenadante y se agregó etanol, agregando por cada 500 μ L de sobrenadante 1,2 mL de etanol absoluto, con el objetivo de alcanzar una concentración final de etanol equivalente al 70%. Las muestras se incubaron en agitación durante 1 h a temperatura ambiente y se centrifugaron a 11.000 rpm por 15 min. Finalmente, el sobrenadante se almacenó a -20°C para su posterior análisis (Salgado-Albarrán et al., 2015).

Las proteínas extraídas se separaron por SDS-PAGE (T = 13,5%). El gel se tiñó con 0,05% de *Coomassie Brilliant Blue* R250 durante 24 h, se destiñó en TCA al 12% durante 48 h y finalmente se lavó con ADE durante 24 h (Fig. 25B).

Los geles resultantes se escanearon y analizaron utilizando el software TotalLab (v1.10), con el fin de cuantificar la intensidad del píxel como un indicador de abundancia. Se aplicó la sustracción de fondo para evitar la variabilidad debida al proceso de tinción y se determinaron las diferentes fracciones de hordeinas D, C y B, junto con el contenido total de hordeinas.

Con respecto al análisis de toxinas, el mismo fue llevado a cabo en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos (PROPLAME-PRHIDEB) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (Universidad de Buenos Aires), a cargo de la Dra. Fernández Pinto y con la colaboración de la Dra. Ramírez Albuquerque. Las muestras de grano se obtuvieron de los cinco surcos centrales de la parcela (1m x 1m), eliminando los dos surcos laterales. Para obtener una submuestra representativa, cada muestra obtenida (alrededor de 300 a 500 g) se homogeneizó por completo. A continuación, las muestras se redujeron sucesivamente hasta obtener 25 g, utilizando un divisor de granos (CerealTools®), y luego se molieron con un molinillo experimental (FW-100, Arcano®). La extracción de tricotecenos se realizó durante 1 h a 300 rpm, con 125 mL de acetonitrilo:acetato de etilo: agua (50:41:9). La limpieza se realizó con una columna con carbón: alúmina: celite (0,7: 0,5: 0,3), secándose luego con un evaporador rotativo (Rotavap®). La detección y cuantificación de los tricotecenos se realizó mediante cromatografía de gases, equipado con un detector de captura de electrones ^{63}Ni (Shimadzu®, modelo GC17) y equipado con una columna capilar RX-5MS (25 mm x 0,2 mm id). El límite de detección (LOD) fue 0,02 $\mu\text{g/g}$ para DON y sus derivados acetilados (3-ADON y 15-ADON); mientras que para NIV el LOD fue de 0.05 $\mu\text{g/g}$. El límite de cuantificación (LOQ) fue 0,06 $\mu\text{g/g}$ para DON y sus derivados acetilados, mientras que para NIV el LOQ fue de 0,15 $\mu\text{g/g}$. Los estándares

utilizados para las micotoxinas evaluadas (DON, 3-ADON, 15-ADON y NIV) fueron obtenidos de SIGMA Chemical Company (St. Louis, EE. UU). La confirmación de la presencia de dichas micotoxinas fue realizada por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS QP 5050A, Shimadzu®) con sistema de ionización por impacto electrónico (70 eV), según lo descrito por Álvarez et al. (2009).

Cabe aclarar, que de aquí en adelante, cuando se mencionan las concentraciones de micotoxinas presentes en los tratamientos (FP₀FG₁, FP₁FG₀, FP₁FG₁, FP₀FG₀), dichos valores se refieren exclusivamente a la concentración de micotoxinas presente en los granos de trigo después del tratamiento específico con *Fusarium* spp.



Figura 25. A). Cuantificación de síntomas de FE al día 21 dpi en espiga de cebada cervecera. B) Fracción de gel de hordeina en poliacrilamida (SDS-PAGE). C) Granos de cebada sobre zaranda de 2,75 mm luego de 5 minutos de agitación.

3.2.4. Análisis estadístico.

En el presente ensayo, las variables fueron evaluadas mediante el software estadístico RStudio (v.3.3.3, R Core Team 2018). Debido a las condiciones climáticas contrastantes observadas durante los tres años evaluados, más específicamente durante la etapa de antesis, cada año se evaluó por separado. El factor principal fue el genotipo de cebada, junto con dos niveles (presencia y/o ausencia) de cada especie de *Fusarium* anidada dentro del genotipo, con 4 bloques para cada combinación de tratamientos. Las comparaciones se realizaron utilizando modelos lineales mixtos. Variables con distribución normal del error tales como la concentración de proteína (CP), el peso de mil granos (PMG), el rendimiento de grano (RG), las diferentes fracciones de hordeinas (D, C y B) y la concentración de toxinas fueron analizadas utilizando la función lmer (paquete lme4; Bates et al., 2015). Se utilizaron modelos lineales de efectos mixtos, ya que permiten anidar los genotipos dentro de los bloques y las subparcelas con los tratamientos de *Fusarium* dentro de los genotipos. Se verificaron los supuestos de los datos, de manera gráfica utilizando los valores ajustados frente a los residuos (para la homogeneidad de las varianzas) y utilizando gráficos Q-Q plot para la normalidad de los residuos, junto con el test de Shapiro-Wilk para verificar la normalidad de los residuos. Las variables tales como incidencia (Inc), severidad (Sev), FHB índice (FHBi), energía germinativa (EG), poder germinativo (PG) y calibre del grano (Cal) se analizaron con un modelo lineal generalizado mixto, considerando las restricciones en la aleatorización y los errores no normales, con la función glmer (paquete lme4; Bates et al., 2015). Se exploraron las diferencias significativas entre los tratamientos con la función lsmeans (paquete emmeans) (Lenth, 2019). Los resultados se informaron como la media \pm SEM ($\alpha = 0,05$).

3.3. Resultados.

3.3.1. Condiciones climáticas.

Las condiciones ambientales durante los tres años evaluados fueron distintas, particularmente durante el período floración-cosecha, como se observa a continuación en la siguiente tabla:

Tabla 5. Valores promedios de temperatura, humedad relativa y precipitaciones (acumuladas e históricas) durante los años 2014, 2015 y 2016, específicamente durante el período floración-cosecha.

Año	Temperatura (°C)			Humedad Relativa (%)	Precipitaciones Acumuladas (mm)	Precipitaciones Históricas (mm)	Porcentaje de Variación (%)
	Promedio	Mínima	Máxima				
2014	18,22 ± 3,71	11,64 ± 3,52	25,19 ± 4,87	67,24 ± 11,55	209,60	165,10	+27%
2015	17,65 ± 3,06	9,88 ± 4,08	24,97 ± 3,75	66,88 ± 11,17	144,60	165,10	-12%
2016	17,62 ± 3,88	10,13 ± 4,10	25,10 ± 4,58	59,79 ± 13,07	74,90	165,10	-55%

Cabe recordar, que las temperaturas promedios más altas fueron observadas durante 2014 ($18,22 \pm 3,71^{\circ}\text{C}$) siendo este el año más cálido y húmedo (209,60 mm; $67,24 \pm 11,55\%$). Durante los años 2015 y 2016, tanto las temperaturas como las precipitaciones fueron menores en comparación con 2014 (Tabla 5).

3.3.2. Parámetros de la enfermedad.

Se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$; $N = 80$) solo para los parámetros de incidencia y severidad durante el año 2014, mientras que durante 2015 y 2016 no se registraron diferencias significativas. Con respecto a la incidencia ($p = 0,0055$; $N = 80$), los efectos de los tratamientos con *Fusarium* se observaron solo en 2014 (Fig. 26A) registrándose los valores más altos para el tratamiento FP_1FG_1 ($58,00 \pm 6,00\%$) seguido de FP_0FG_1 ($50,00 \pm 5,00\%$) y FP_1FG_0 ($46,00 \pm 6,00\%$). De la misma manera, para severidad se observaron diferencias significativas ($p < 0,0005$, $N = 480$) solo durante 2014 para los tratamientos con *Fusarium* (Fig. 26B), mostrando los valores más altos FP_1FG_1 y FP_0FG_1 ($3,00 \pm 0,23\%$) seguidos de FP_0FG_1 ($2,80 \pm 0,23\%$) y FP_1FG_0 ($2,00 \pm 0,23\%$).

Por otra parte, durante 2015 solo se observaron diferencias significativas ($p < 0,0010$; $N = 80$) entre los diferentes genotipos para incidencia, siendo Shakira ($29,00 \pm 3,00\%$), Andreia ($23,00 \pm 3,00\%$) e INTA 7302 ($21,00 \pm 3,00\%$) los genotipos más afectados, mientras que Scrabble ($8,00 \pm 2,00\%$) y Scarlett ($6,00 \pm 2,00\%$) mostraron los síntomas más bajos (Fig. 27A). Del mismo modo, para severidad solo se encontraron diferencias significativas ($p < 0,0001$; $N = 800$) entre los diferentes genotipos, siendo Shakira ($5,80 \pm 0,26\%$) el genotipo más afectado, mientras que en Scrabble ($0,30 \pm 0,09\%$) se observaron los valores más bajos de severidad (Fig. 27B). Por otra parte, aunque los valores de FHB Index fueron bajos, se observaron diferencias significativas ($p = 0,0012$; $N = 80$), siendo Shakira el genotipo más afectado ($2,30 \pm 0,70$), mientras que Scrabble ($0,10 \pm 0,03$) y Scarlett ($0,10 \pm 0,01$) mostraron los valores más bajos (Fig. 27C).

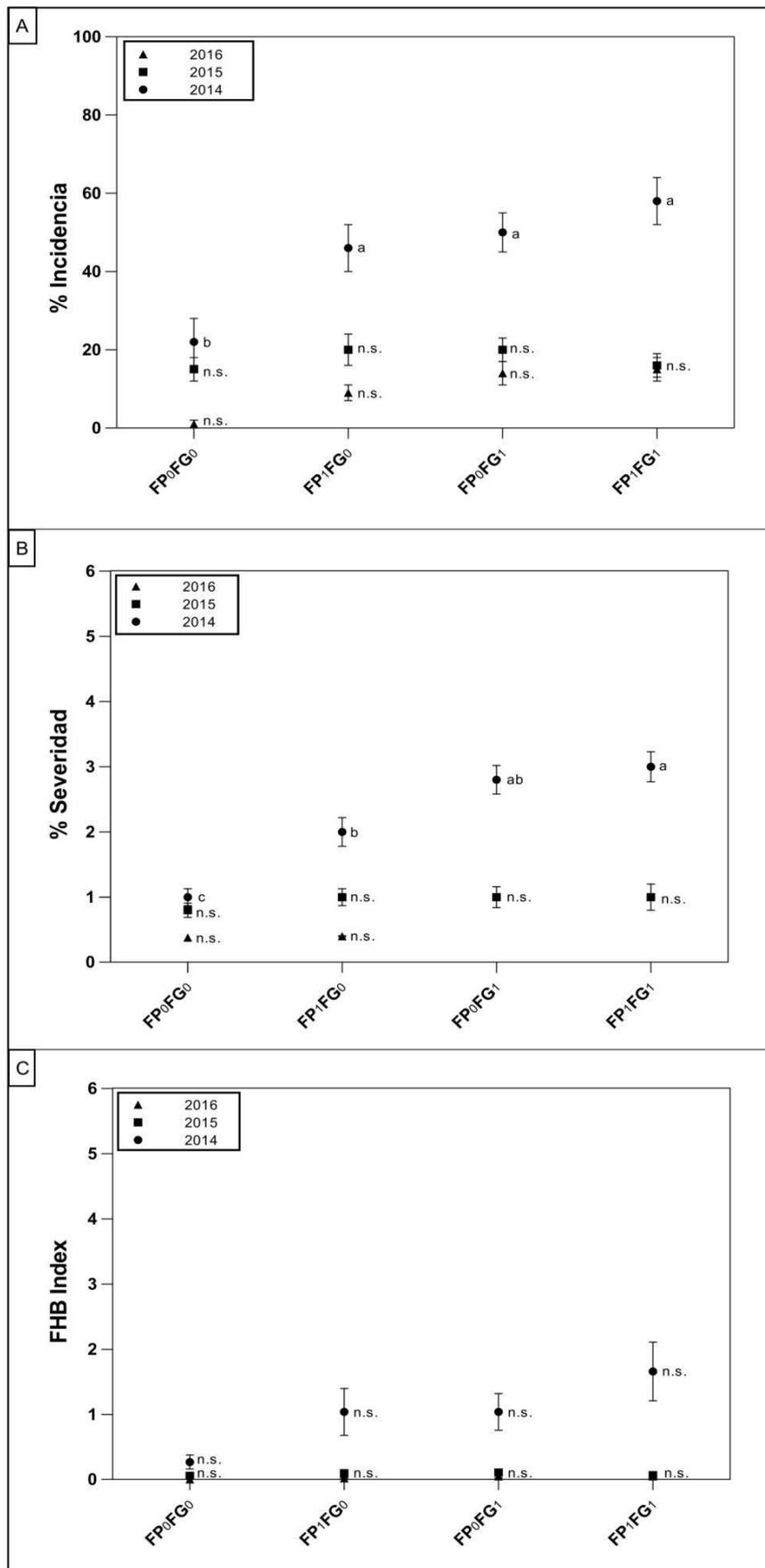


Figura 26. Parámetros de la FE para las tres años evaluados, según los diferentes tratamientos. A) Incidencia. B) Severidad. C) FHB index.

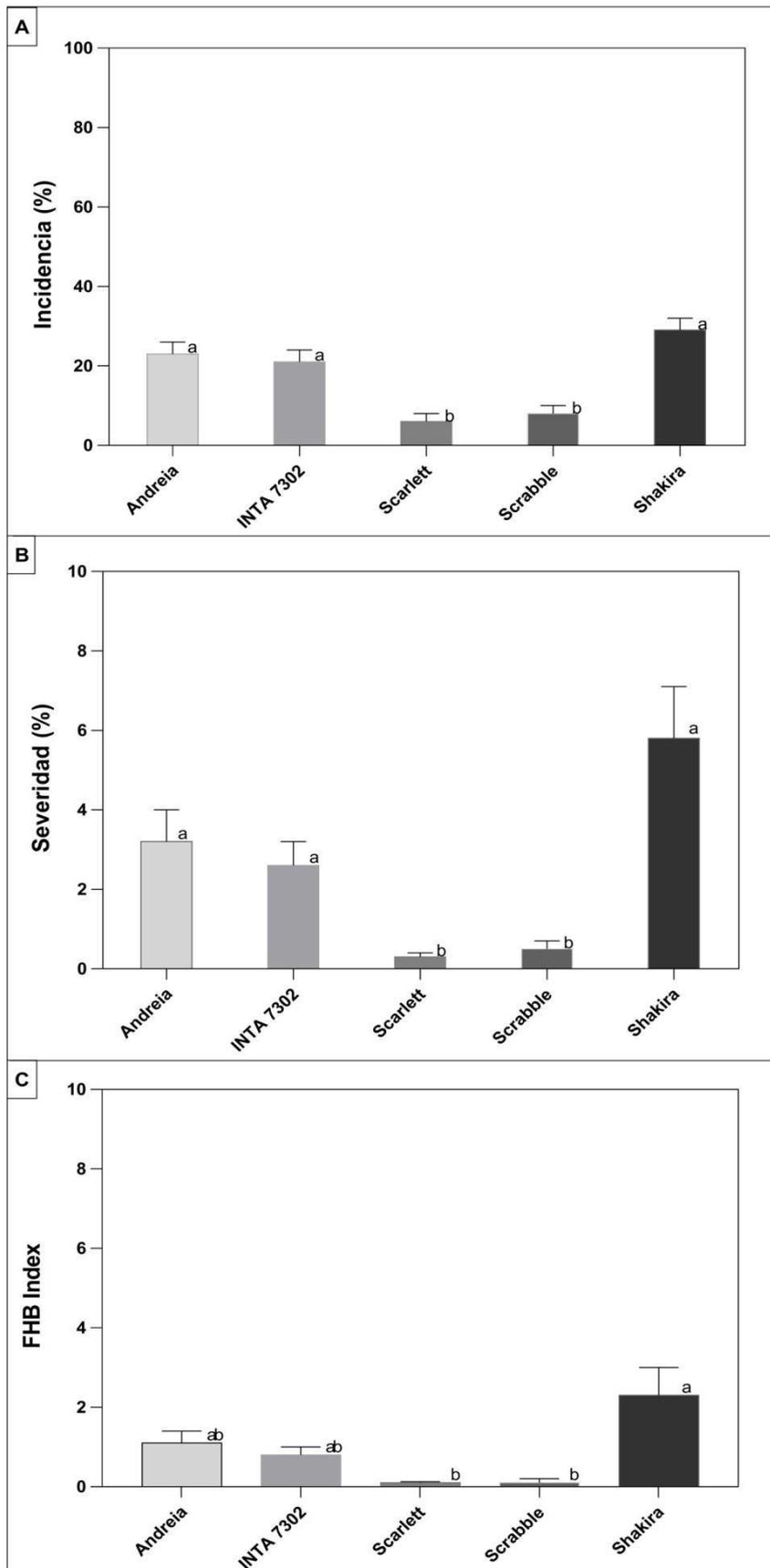


Figura 27. Parámetros de la FE para los tres años evaluados, según los diferentes genotipos evaluados. A) Incidencia. B) Severidad. C) FHB index.

3.3.3. Parámetros de rendimiento, proteína y germinación.

Como se observa a continuación (Tabla 6), se registraron diferencias significativas solo para los tratamientos con *Fusarium* en parámetros tales como EG, PG y Cal, reportando específicamente interacción entre los genotipos y los tratamientos de *Fusarium*. Por otra parte, para variables tales como PMG y RG, solo existieron diferencias significativas entre genotipos, mientras que no existieron diferencias para CP.

Tabla 6. Análisis de la varianza para diferentes los parámetros evaluados. EG: energía germinativa; PG: poder germinativo; CP: concentración de proteínas; Cal: calibre bajo zaranda de 2,2 mm; PMG: peso de mil granos; g.l.: grados de libertad; Chisq: Test de Wald-Chi cuadrado tipo II.

Fuente	2014										
	g.l.	EG		PG		CP		Cal		PMG	
		Chisq	p-value	Chisq	p-value	Chisq	p-value	Chisq	p-value	Chisq	p-value
<i>F. poae</i> (FP)	1	0,1020	0,7494	1,8081	0,1787	0,1831	0,6687	0,0262	0,8713	0,0522	0,8193
<i>F. graminearum</i> (FG)	1	11,4691	<0,0001	16,4078	<0,0001	0,1435	0,7049	0,2997	0,5840	0,7934	0,3730
FP*FG	1	2,0257	0,1546	4,7028	0,2628	0,3841	0,5354	1,2483	0,2638	0,8556	0,3549
Genotype (G)	4	2,2549	0,6889	5,2474	0,0301	3,6351	0,4576	20,0194	0,0005	23,2228	<0,0001
FP x G	4	3,7079	0,4469	9,5158	0,0494	6,1555	0,1878	0,8887	0,9261	1,1394	0,8879
FG x G	4	32,3143	<0,0001	25,9196	<0,0001	0,5093	0,9726	1,0761	0,8980	1,6520	0,7994
FP x FG x G	4	4,1869	0,3813	14,9133	0,0048	4,8352	0,3046	3,5408	0,4717	3,9729	0,4096
2015											
<i>F. poae</i> (FP)	1	0,1659	0,6837	5,2390	0,0221	2,4256	0,1194	0,0475	0,8274	2,0318	0,1540
<i>F. graminearum</i> (FG)	1	1,1697	0,2794	0,5343	0,4648	0,8120	0,3675	0,4218	0,5160	1,6586	0,1978
FP*FG	1	0,8451	0,3579	1,7980	0,1799	0,8889	0,3458	0,0070	0,9333	0,0400	0,8414
Genotype (G)	4	21,7546	<0,0001	186,5947	<0,0001	9,4225	0,0513	8,0878	0,0884	151,3667	<0,0001
FP x G	4	34,1863	<0,0001	49,8204	<0,0001	3,2673	0,5141	0,6775	0,9541	3,2791	0,5122
FG x G	4	2,7685	0,5972	2,3467	0,6722	2,8577	0,5819	0,9506	0,9172	2,0991	0,7175
FP x FG x G	4	3,3728	0,4974	3,8751	0,4232	4,0444	0,4000	11,4192	0,0222	1,0364	0,9042
2016											
<i>F. poae</i> (FP)	1	5,1516	0,0232	4,8807	0,0271	1,7631	0,1842	0,7744	0,3788	0,0021	0,9637
<i>F. graminearum</i> (FG)	1	7,2104	0,0072	10,0951	0,0015	1,8540	0,1733	0,0682	0,7939	0,1604	0,6888
FP*FG	1	19,8320	<0,0001	24,9336	<0,0001	0,0687	0,7931	2,9905	0,0837	0,7424	0,3889
Genotype (G)	4	34,8935	<0,0001	33,9568	<0,0001	2,4189	0,6592	2,1927	0,7000	7,5830	0,1081
FP x G	4	21,8001	<0,0001	33,7606	<0,0001	3,5612	0,4686	11,758	0,0192	2,2611	0,6879
FG x G	4	6,5949	0,1589	1,8345	0,2844	7,2430	0,1236	6,8506	0,1444	6,8474	0,1441
FP x FG x G	4	4,9760	0,2897	8,6166	0,0714	8,7112	0,0687	7,5877	0,1079	4,1841	0,3817

En primer lugar, durante 2014 se registraron diferencias significativas para EG ($p < 0,0001$, $N=60$) en la interacción genotipo x *Fusarium*, observando que para FP_0FG_1 Andreia no fue afectada ($85,00 \pm 3,00\%$), mientras que Shakira ($83,00$ a $71,00\%$) fue el genotipo más afectado, con una disminución de la energía germinativa del $12,00\%$. En contraste, durante los años 2015 y 2016 se observaron diferencias significativas ($p < 0,0001$; $N=80$) para la interacción genotipo x FP_1FG_0 . Durante 2015, Scarlett fue el genotipo menos afectado al disminuir solo un 2% la EG ($94,00$ a $92,00\%$), mientras que Andreia fue el más afectado con una disminución del $11,00\%$ ($65,00$ a $54,00\%$). De la misma manera, durante 2016 Scarlett continuó siendo el genotipo menos afectado, disminuyendo solo un $2,00\%$ ($94,00$ a $92,00\%$), mientras que INTA 7302 fue el más afectado con una reducción de la energía germinativa del $8,00\%$ ($93,00$ a $85,00\%$).

Para el poder germinativo, se encontró interacción genotipo x FP_1FG_1 ($p=0,0048$; $N=60$) en 2014, siendo Andreia el genotipo menos afectado, decreciendo el PG solo $2,00\%$ ($92,00$ a $90,00\%$), mientras que se observó una disminución de $6,00\%$ en INTA 7302 ($90,00$ a $84,00\%$). Además, en 2015 y 2016 existieron diferencias significativas ($p < 0,0001$; $N=80$) para la interacción genotipo x FP_1FG_0 . En 2015, Scarlett fue el menos afectado, reduciéndose el PG solo en un $2,00\%$ ($98,00$ a $96,00\%$), mientras que en Andreia se observó una reducción del $11,00\%$ ($83,00$ a $72,00\%$). De la misma manera, durante 2016 Scarlett fue el menos afectado, decreciendo solo el $2,00\%$ ($97,00$ a $95,00\%$), mientras que las mayores disminuciones ($7,00\%$) se observaron en INTA 7302 ($97,00$ a $90,00\%$).

En cuanto al calibre, durante 2014 solo se observaron diferencias significativas entre genotipos, mostrando Shakira los valores más altos ($96,75 \pm$

0,59%), mientras que en INTA 7302 se observaron los valores más bajos ($90,30 \pm 1,35\%$). Por otro lado, durante 2015 se reportó interacción genotipo x FP_1FG_1 , mostrando los valores más altos de calibre para Shakira x FP_0FG_0 ($97,55 \pm 0,50\%$), mientras que los valores más bajos se informaron para INTA 7302 x FP_1FG_1 ($94,73 \pm 0,76\%$). En 2016, existió interacción genotipo x FP_1FG_0 , observando diferencias significativas y siendo Shakira el genotipo más afectado, disminuyendo el calibre bajo zaranda de 2,2 mm en 0,62% con respecto al tratamiento control.

En cuanto a los parámetros de rendimiento de grano como RG y PMG, se registraron diferencias significativas solo entre genotipos. Para PMG, durante los años 2014 y 2015, se registraron en el genotipo Scrabble los valores más altos (41,64 y 51,51 g, respectivamente), mientras que Scarlett mostró los pesos más bajos en ambos años (34,69 y 42,27 g, respectivamente). De la misma manera, para RG los valores más bajos se registraron en Scarlett ($478,81 \pm 32,75$ g/m²), mientras que Andreia mostró el mayor rendimiento de grano por m² ($611,56 \pm 32,75$ g/m²). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas durante ninguno de los tres años evaluados para CP (Tabla 6).

3.3.4. Composición proteica.

El análisis de la degradación de las diferentes fracciones proteicas solo se realizó durante 2014, debido a las condiciones favorables para el desarrollo de la FE observadas y al alto número de FDK reportados durante este año. Así, durante 2014 se registraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos con *Fusarium*, mostrando la degradación de las diferentes fracciones de hordeinas con respecto al control (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis de varianza para las diferentes fracciones de proteína en granos de cebada sintomáticos. g.l.: grados de libertad; Chisq: Test de Wald-Chi cuadrado tipo II.

Fuente	2014								
	g.l.	D-hordeinas		C-hordeinas		B-hordeinas		Contenido Total de Hordeinas	
		Chisq	p-value	Chisq	p-value	Chisq	p-value	Chisq	p-value
<i>F. poae</i> (FP)	1	23,2646	<0,0001	29,5485	<0,0001	15,1053	<0,0001	28,0933	<0,0001
<i>F. graminearum</i> (FG)	1	25,9155	<0,0001	34,3116	<0,0001	12,3952	0,0004	29,7258	<0,0001
FP*FG	1	25,8283	<0,0001	37,9010	<0,0001	5,0114	0,0251	26,5949	<0,0001
Genotipo (G)	4	13,0929	0,0108	2,4440	0,6547	10,1299	0,0382	6,0173	0,1979
FP x G	4	7,0137	0,1352	0,9319	0,9199	8,2390	0,0832	3,4816	0,4807
FG x G	4	8,8224	0,0657	0,6454	0,9579	2,5708	0,6320	1,3887	0,8462
FP x FG x G	4	0,9882	0,4245	2,3856	0,6652	5,2762	0,2601	2,1403	0,7100
Tratamientos con <i>Fusarium spp.</i>		Media ± SEM		Media ± SEM		Media ± SEM		Media ± SEM	
FP ₁ FG ₀		6,24 ± 1,06 a		32,03 ± 4,75 a		57,69 ± 9,10 a		95,96 ± 12,40 a	
FP ₀ FG ₁		5,51 ± 1,05 a		27,52 ± 5,89 a		60,14 ± 9,35 a		93,17 ± 15,15 a	
FP ₁ FG ₁		6,22 ± 0,95 a		35,23 ± 9,15 a		49,10 ± 5,60 a		90,54 ± 14,26 a	
FP ₀ FG ₀		33,21 ± 5,07 b		155,94 ± 7,91 b		98,70 ± 9,31 b		287,85 ± 17,89 b	

Si bien no existieron diferencias significativas entre los tratamientos con *Fusarium* (excepto con respecto al tratamiento control), en términos generales se observaron diferentes patrones de degradación, observando que las fracciones de hordeinas D y C fueron degradadas más preferentemente en el tratamiento FP₀FG₁, mientras que las hordeinas B se degradaron preferentemente con FP₁FG₁. Por lo tanto, FP₁FG₁ fue el tratamiento que más afectó el contenido total de hordeinas (Fig. 28).

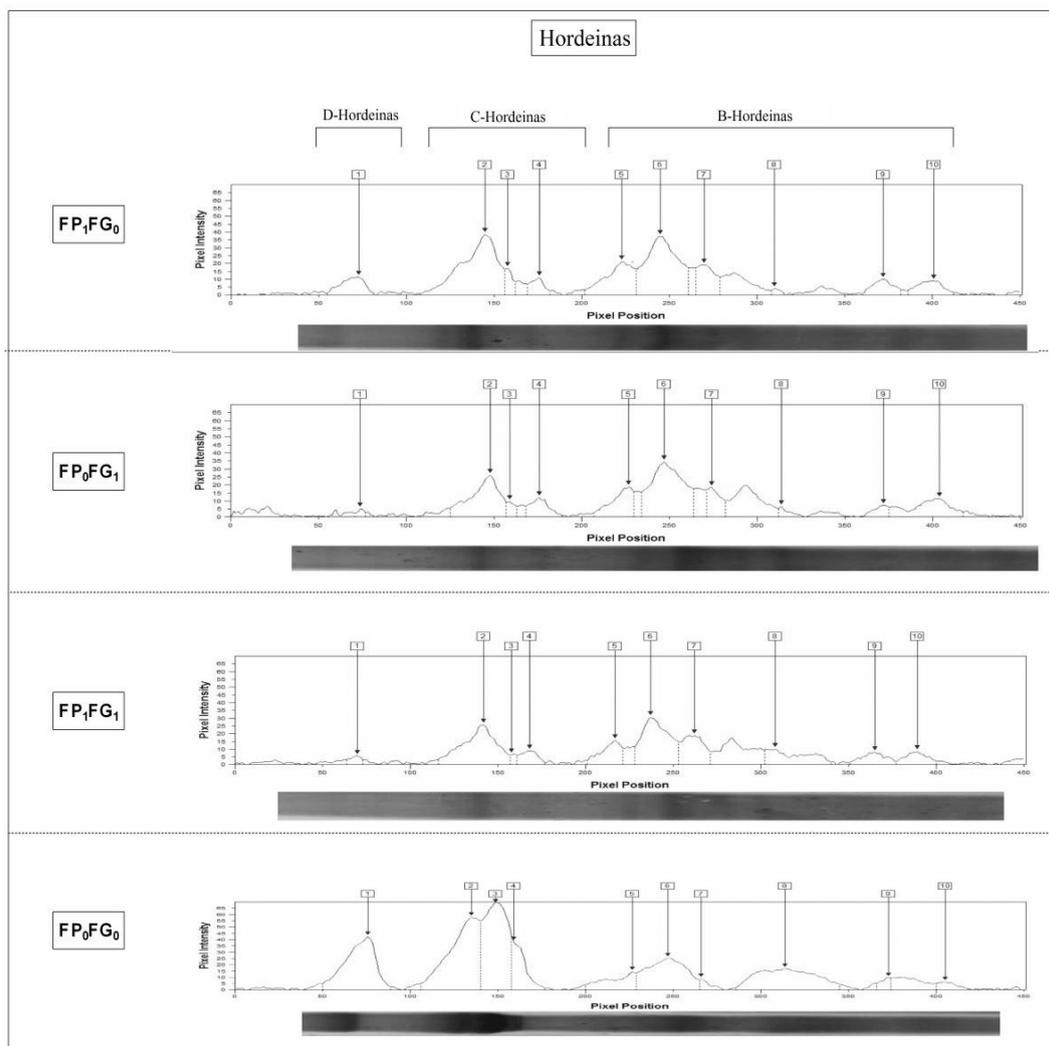


Figura 28. Degradación de las diferentes fracciones proteicas en granos de cebada sintomáticos. Se observan fracciones de geles de poliacrilamida (SDS-PAGE; T% = 13,5%) que muestran la abundancia relativa (intensidad de pixeles) y el patrón de bandas para las fracciones de D-hordeinas, C-hordeinas y B-hordeinas. Tratamientos: FP₁FG₀ (*F. poae*); FP₀FG₁ (*F. graminearum*), FP₁FG₁ (*F. poae* + *F. graminearum*) y FP₀FG₀ (tratamiento control).

Como se mencionó anteriormente, con respecto a las D-hordeinas ($p < 0,001$; $N=60$) la mayor disminución en la abundancia relativa se observó en el tratamiento con FP_0FG_1 , disminuyendo en 83,41% en comparación con el control, mientras que se observó una disminución de 81,24% en promedio para FP_1FG_0 y FP_1FG_1 (Fig. 29). En cuanto a las C-hordeinas ($p < 0,001$; $N=60$) los valores más bajos se observaron para FP_0FG_1 , disminuyendo en un 82,35% con respecto al tratamiento control, mientras que para FP_1FG_0 y FP_1FG_1 se informó una disminución de 79,46% en promedio.

Por otro lado, la mayor degradación sobre la fracción correspondiente a las B-hordeinas ($p=0,0251$, $N=60$) fue causada por el tratamiento con FP_1FG_1 , reduciendo su abundancia relativa en 50,25% en comparación con el control, mientras que se observó una disminución de 39,07% en promedio para FP_1FG_0 y FP_0FG_1 . Finalmente, con respecto al contenido total de hordeinas ($p < 0,0001$; $N=60$), los valores más bajos de abundancia relativa se observaron en el tratamiento con FP_1FG_1 reduciendo en 68,55% en comparación con FP_0FG_0 , mientras que para FP_1FG_0 y FP_0FG_1 se observó una disminución de 66,66% en promedio (Fig. 29).

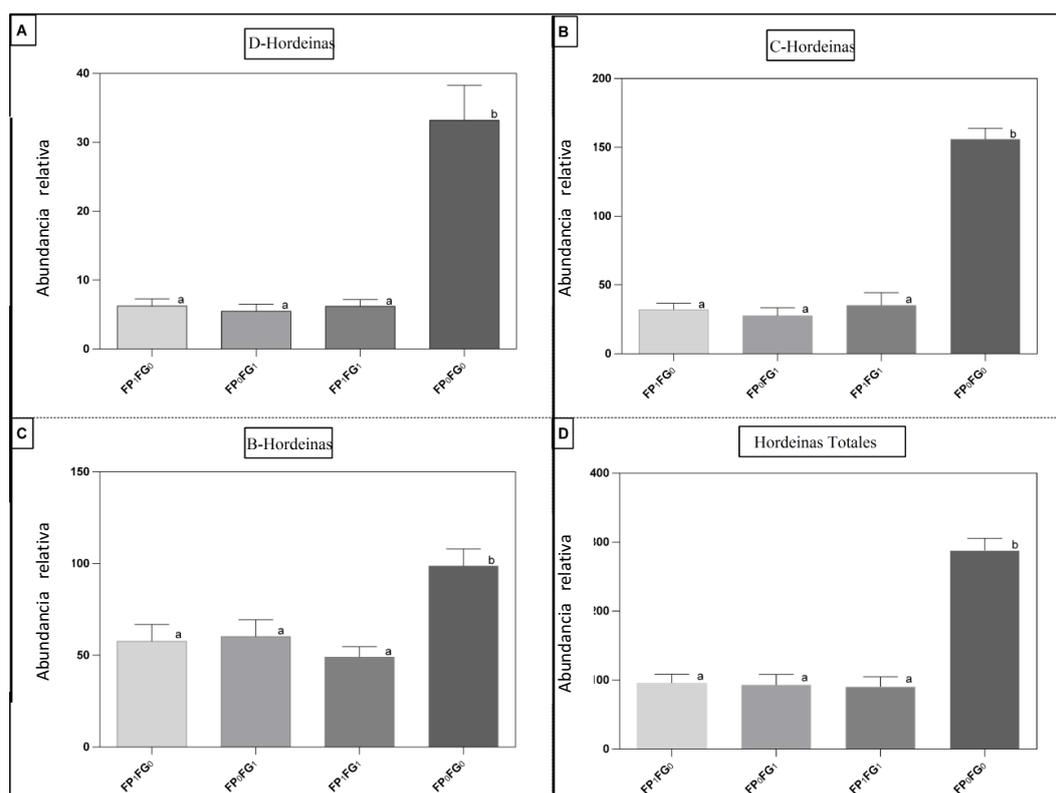


Figura 29. Degradación de las diferentes fracciones proteicas de granos sintomáticos de cebada cervecera. Valores de abundancia relativa (intensidad de pixel). A) D-hordeinas. B) C-hordeinas. C) B-hordeinas. D). Contenido total de hordeinas. Tratamientos: FP₁FG₀ (*F. poae*); FP₀FG₁ (*F. graminearum*), FP₁FG₁ (*F. poae* + *F. graminearum*) y FP₀FG₀ (tratamiento control).

3.3.5. Contaminación con micotoxinas.

Durante 2014, la mayor concentración de micotoxinas se observó para el tratamiento FP₀FG₁, con altas concentraciones de DON ($44,94 \pm 31,49 \mu\text{g/g}$), 3-ADON ($371,66 \pm 314,88 \mu\text{g/g}$) y 15-ADON ($0,24 \pm 0,09 \mu\text{g/g}$), mientras que la producción de NIV fue similar para los tratamientos FP₁FG₀ ($0,23 \pm 0,11 \mu\text{g/g}$) y FP₁FG₁ ($0,23 \pm 0,08 \mu\text{g/g}$). Sin embargo, durante 2015 y 2016, los valores de micotoxinas fueron más bajos en comparación con 2014, sin reportarse contaminación de NIV. En 2015, las mayores concentraciones de micotoxinas se observaron para el tratamiento FP₀FG₁, con bajas concentraciones de DON ($0,67 \pm 0,12 \mu\text{g/g}$), 3-ADON ($11,20 \pm 3,68 \mu\text{g/g}$) y 15-ADON ($0,60 \pm 0,24 \mu\text{g/g}$). De la misma manera, durante 2016 los valores más altos de micotoxinas se registraron

para el tratamiento FP₀FG₁, observando bajas concentraciones de DON ($2,12 \pm 0,54 \mu\text{g/g}$), 3-ADON ($33,23 \pm 6,88 \mu\text{g/g}$) y 15-ADON ($0,81 \pm 0,19 \mu\text{g/g}$) en comparación con los años anteriores. En términos de cantidad total de micotoxinas, se encontró una mayor concentración de 3-ADON a lo largo de los tres años evaluados (Tabla 8).

Tabla 8. Contaminación de las muestras de granos de cebada con deoxinivalenol (DON), 3-acetil deoxinivalenol (3-ADON), 15-acetil deoxinivalenol (15-ADON) y nivalenol (NIV) en cinco genotipos de cebada durante los años 2014, 2015 y 2016.

Año	Tratamiento con <i>Fusarium</i>	DON ($\mu\text{g/g}$)	3-ADON ($\mu\text{g/g}$)	15-ADON ($\mu\text{g/g}$)	NIV ($\mu\text{g/g}$)
2014	<i>F. poae</i>	n.d.	n.d.	n.d.	$0,23 \pm 0,11$
	<i>F. graminearum</i>	$44,94 \pm 31,49$	$371,66 \pm 314,88$	$0,24 \pm 0,09$	n.d.
	<i>F. poae</i> / <i>F. graminearum</i>	$11,29 \pm 4,76$	$148,42 \pm 74,23$	$0,21 \pm 0,07$	$0,23 \pm 0,08$
	Control	$1,66 \pm 0,91$	$3,65 \pm 1,06$	n.d.	n.d.
2015	<i>F. poae</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<i>F. graminearum</i>	$0,67 \pm 0,12$	$11,20 \pm 3,68$	$0,60 \pm 0,24$	n.d.
	<i>F. poae</i> / <i>F. graminearum</i>	$0,60 \pm 0,15$	$10,60 \pm 2,95$	$0,60 \pm 0,28$	n.d.
	Control	$0,53 \pm 0,06$	$9,04 \pm 2,02$	$0,28 \pm 0,06$	n.d.
2016	<i>F. poae</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<i>F. graminearum</i>	$2,12 \pm 0,54$	$33,23 \pm 6,88$	$0,81 \pm 0,19$	n.d.
	<i>F. poae</i> / <i>F. graminearum</i>	$1,62 \pm 0,30$	$28,55 \pm 4,82$	$0,79 \pm 0,17$	n.d.
	Control	n.d.	$2,44 \pm 0,55$	$0,48 \pm 0,06$	n.d.

n.d. : no detectado. LOD: DON: 0,02 $\mu\text{g/g}$; NIV 0,05 $\mu\text{g/g}$. LOQ: DON: 0,06 $\mu\text{g/g}$; NIV 0,15 $\mu\text{g/g}$.

En cuanto a la posible interacción entre *F. graminearum* y *F. poae* respecto a la acumulación de micotoxinas, no se detectaron evidencias que sustenten la existencia de antagonismo/sinergismo para esta variable. A pesar de ello, se registraron diferencias significativas para la interacción genotipo x FP₁FG₁ durante 2014 para DON ($p= 0,0059$; $N=60$) y 15-ADON ($p=0,0091$; $N=60$). Así, INTA 7302 fue el genotipo que acumuló más DON (desde 0,46 a 23,42 $\mu\text{g/g}$), mientras que Scrabble fue el genotipo que mostró menos contenido de DON (0,33 a 0,51 $\mu\text{g/g}$). De la misma manera, el genotipo que mostró la mayor concentración de 15-ADON fue INTA 7302 (0,06 a 0,34 $\mu\text{g/g}$), mientras que Scrabble fue el genotipo que menos 15-ADON acumuló con respecto al control (n.d.).

3.4. Discusión.

El presente trabajo se llevó a cabo bajo condiciones de campo, siendo los tres años analizados diferentes entre sí, principalmente con respecto a las condiciones ambientales (humedad relativa, temperatura y precipitaciones acumuladas) durante el período comprendido entre la antesis y la cosecha. Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas entre los tratamientos de *Fusarium* con respecto a los parámetros de la enfermedad solo durante el año 2014, con mayores temperaturas y condiciones de humedad favorables para el desarrollo de la FE. Por otro lado, durante 2015 y 2016 no se observaron diferencias significativas en los parámetros de la enfermedad, debido a las temperaturas más bajas y las condiciones más secas durante la etapa de floración. De la misma manera, estudios previos indican que las condiciones ambientales desempeñan un rol clave en las interacciones planta-patógeno, en este caso sobre

la interacción *Fusarium* spp.-cebada. Además, la composición de las especies de *Fusarium* varía año tras año, según las diferentes condiciones climáticas en cada una de ellas, principalmente durante la etapa de floración (Vogelsang et al., 2008). Turner y Jennings (1997) observaron que el aumento de la humedad producía un desarrollo más temprano de la enfermedad, con valores de incidencia mayores para todas las especies de *Fusarium* evaluadas excepto para *F. poae*. Las variaciones en la composición de las especies de *Fusarium* se pueden explicar por la presencia de diferentes condiciones termo-higrométricas. Así, cuando las condiciones no son favorables para los principales agentes causales de la FE, tales como *F. graminearum* y *F. culmorum*, otras especies como *F. poae* y *F. avenaceum* aumentan considerablemente su presencia (Covarelli et al., 2016).

Es sabido que el uso de genotipos resistentes es la herramienta más efectiva para el control de la FE (Steiner et al., 2017). En el actual trabajo, se observaron diferentes respuestas a la infección de *Fusarium* entre los diferentes genotipos de cebada evaluados. Si bien, los genotipos de cebada fueron seleccionados en base a su similitud en cuanto a su ciclo fenológico, estas diferencias podrían explicarse debido a: (i) diferencias en los patrones de floración espacial y temporal dentro del cultivo; (ii) diferencias en los micro-ambientes generados en cada parcela/subparcela y sus respectivas condiciones microclimáticas; (iii) la posible existencia de genes de resistencia presentes en los diferentes genotipos de cebada evaluados. De la misma manera, Schöneberg et al. (2018) encontraron que en los años con condiciones de infección menos favorables para el desarrollo de la FE, las diferencias observadas entre los genotipos podrían deberse principalmente a diferencias fenológicas.

En cuanto a los parámetros de calidad de grano, estudios previos en granos de cebada inoculados con *Fusarium*, reportaron una disminución del volumen del grano, mostrando bajos valores de granos de 2,5 mm de diámetro y con un ligero aumento en el contenido de proteína y nitrógeno total (Turner y Jennings, 1997). En el presente trabajo, se observó interacción genotipo x *Fusarium* spp. para la variable calibre de grano (> 2,5 mm) para los años 2015 y 2016, mientras que no existieron diferencias significativas con respecto a los diferentes tratamientos de *Fusarium* respecto a la concentración de proteínas y al peso de mil granos. Para dichas variables, se observaron diferencias significativas principalmente entre genotipos, siendo consistente con otros trabajos que reportan una fuerte influencia genética y ambiental con respecto a diversos parámetros analizados en genotipos de cebada cervecera (Al-Tabbal y Al-Fraihat, 2011; Cai et al., 2013).

Respecto a los parámetros de germinación analizados, varios estudios han registrado que la infección de *Fusarium* puede afectar la germinación de los granos de cebada y por ende, las características finales de la malta. Además, las especies de *Fusarium* pueden producir otras proteasas no detectadas durante la infección, las cuales pueden desencadenar la síntesis y/o activación de algunas de las proteasas que normalmente se encuentran presentes en los granos de cebada durante el proceso de germinación (Pekkarinen et al., 2003). De acuerdo a esto, Schwarz et al. (2002), informaron una disminución del poder germinativo de 42% a 32% en granos de cebada infectados con *F. graminearum*, y una reducción de 14% a 6% en tratamientos inoculados con *F. poae*. En relación, a la inoculación conjunta de especies de *Fusarium*, Sarlin et al. (2005) observaron una reducción del poder germinativo de 10% en promedio. Los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con los informados anteriormente, mostrando durante

2014 las mayores disminuciones en los valores de energía y poder germinativo, observando las mayores reducciones para el tratamiento con *F. graminearum* (6% en promedio). Por otra parte, durante 2015 y 2016, *F. poae* afectó en mayor medida ambas variables, dependiendo principalmente del genotipo, con una reducción en promedio del 4%.

La infección de los granos de cebada con *Fusarium* puede llevar a la producción de diferentes enzimas hidrolíticas, tales como celulasas, cutinasas, proteasas y xilanasas. Estas enzimas degradan la pared celular y pueden desempeñar un rol importante en la patogenicidad, siendo probable que participen en la colonización del grano. Probablemente, las proteasas son las más importantes, ya que la degradación de las proteínas afecta considerablemente la calidad de la malta final y la elaboración de cerveza a partir de granos infectados (Pekkarinen et al., 2003; Schwarz et al., 2002). En el presente trabajo, se observó una considerable degradación proteica sobre granos de cebada sintomáticos, mostrando que la presencia de *F. graminearum* provocó una mayor degradación de hordeinas, causando una disminución del 83,41% sobre las D-hordeinas y una reducción del 82,35% sobre la fracción de C-hordeinas. Por otra parte, se registró también una disminución causada por el tratamiento compuesto por la mezcla de *F. graminearum* y *F. poae*, siendo la misma de 50,25% sobre la fracción de B-hordeinas, junto con una reducción del contenido total de hordeinas de 68,55%, con respecto al control. Los cambios observados en las diferentes fracciones de hordeinas podrían explicarse debido a la actividad de las proteasas fúngicas mencionadas previamente, pertenecientes al exoproteoma de *Fusarium* como aquellas que actúan sobre aminoácidos tales como la serina (Pekkarinen et al., 2003; Phalip et al., 2005). Eggert et al. (2010) observaron en granos de cebada

infectados con *Fusarium* una ligera disminución del contenido de hordeinas, mientras que otras fracciones proteicas tales como las albúminas y las globulinas no se vieron afectadas. Además, Schwarz et al. (2002) detectaron niveles más altos de actividad de enzimas tales como proteasas, β -glucanasas y xilanasas, en muestras de granos de cebada infectadas artificialmente con *F. graminearum* y *F. poae*, en comparación con el control. En dicho estudio, se concluyó que los niveles de actividad enzimática en muestras de granos de cebada eran tan altos que podían afectar la calidad del grano destinado para malteo. En cuanto a la calidad de la malta final obtenida, existen evidencias que sustentan que la infección de granos de cebada con especies del género *Fusarium* disminuyen el contenido de β -glucano, aumentando simultáneamente las concentraciones de nitrógeno soluble, el nitrógeno amino libre (FAN) y el color del mosto (Nielsen et al., 2014). Así, se sugiere que dichas enzimas producidas por *Fusarium* pueden degradar las proteínas del grano de cebada directamente en el campo o posteriormente durante el malteado y el macerado (Sarlin et al., 2005).

Respecto a la contaminación con micotoxinas, teniendo en cuenta los mayores valores de incidencia y severidad de la FE observados a campo, era de suponer una mayor concentración durante 2014 respecto a 2015 y 2016. Las concentraciones de las micotoxinas evaluadas variaron entre los tratamientos de *Fusarium*, los genotipos y los años. Así, la mayor cantidad de DON y 3-ADON se registró durante 2014 en el tratamiento con *F. graminearum*, encontrándose los valores de DON por encima de los límites máximos establecidos para granos no procesados (1,25 $\mu\text{g/g}$) por la Comisión Europea (EC, 2006). Respecto al NIV, a pesar de ser esta toxina más nociva para la salud humana y animal que el DON y/o sus derivados acetilados, aún no se ha establecido el límite máximo en los

alimentos (Wan et al., 2013). Preocupantemente, en los últimos años, diversos trabajos señalan la existencia de concentraciones elevadas de NIV en los sistemas agrícolas de la Argentina. Stenglein et al. (2014) encontraron niveles más altos de NIV que los observados en el presente trabajo (concentraciones entre 0,20 y 10,80 $\mu\text{g/g}$), si bien los genotipos utilizados y los aislamientos de *Fusarium* fueron distintos; mientras que Nogueira et al. (2018) encontraron recientemente NIV en el 29% de las muestras de cebada cervecera evaluadas, con una concentración promedio de 2,36 $\mu\text{g/g}$, bajo condiciones de infección natural. Probablemente, las concentraciones de NIV más bajas en el presente trabajo, se podrían explicar debido a las condiciones ambientales, en este caso, debido a la temperatura durante la etapa de floración. En este caso, dichas condiciones no fueron favorables para el desarrollo de *F. poae*, ni tampoco para la posterior producción de NIV. De la misma manera, Nazari et al. (2018) estableció que la temperatura óptima para la producción de NIV para *F. poae* es de 27,5°C, temperatura promedio no alcanzada durante los años evaluados.

Actualmente existe escasa información respecto a la interacción entre las distintas especies de *Fusarium* en cebada. Xu et al. (2007) informaron que no existen evidencias que respalden el sinergismo entre diferentes aislamientos de hongos en cuanto a la sintomatología visual en trigo. Además, estos autores sugieren que la existencia de interacciones competitivas entre las distintas especies de *Fusarium* llevaron a una disminución de la biomasa fúngica (hasta el 90% para las especies menos competitivas, en comparación con las inoculaciones de un solo aislamiento). Contrariamente, dichos autores observaron que la producción de micotoxinas aumentó considerablemente en el experimento de co-inoculación, incluso superando en algunos casos más de 100 veces la

concentración observada en inoculaciones individuales; sugiriendo que la competencia entre las distintas especies de *Fusarium* induciría una mayor producción de tricotecenos. Este aumento en la producción de micotoxinas en las co-inoculaciones podría explicarse debido a la competencia entre las especies de *Fusarium*, las cuales producirían más toxinas bajo condiciones de estrés (ej. competencia por recursos). Sin embargo, en el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de *Fusarium* que evidencien sinergismo, aunque durante 2014 se observó interacción entre *F. graminearum*, *F. poae* y el genotipo. Estos resultados podrían explicarse debido a la interacción entre *F. graminearum* y *F. poae*, siendo *F. graminearum* una de las especies más competitivas, mientras que *F. poae* es un patógeno débil con baja agresividad. Por lo tanto, probablemente se generó una competencia intensa entre ambas especies causando una disminución de la biomasa fúngica de *F. poae* y una baja producción de NIV. Otra posible explicación para los resultados observados podría ser la interacción negativa entre los diferentes aislamientos utilizados para elaborar la mezcla de inoculación de cada tratamiento de *Fusarium*. Miedaner et al. (2004) llevaron a cabo un ensayo a campo en centeno con cuatro aislamientos de *F. culmorum*, procedentes de cuatro orígenes diferentes, informando que existieron interacciones significativas entre dichos aislamientos de la misma especie con respecto a la producción de toxinas. Además, observaron que los parámetros de patogenicidad, en este caso, fueron significativamente menores en las inoculaciones mixtas con respecto a los síntomas observados en las inoculaciones procedentes de un solo aislamiento.

Durante el presente trabajo, si bien los aislamientos de *F. graminearum* utilizados fueron productores de DON, 3-ADON y 15-ADON, se observó

predominantemente una mayor concentración de 3-ADON a lo largo de los diferentes años evaluados. Esta prevalencia en la biosíntesis de 3-ADON podría explicarse por el importante rol que desempeñan algunos parámetros climáticos, tales como la temperatura, la humedad relativa y otras condiciones ambientales durante el período de infección de la FE. De acuerdo con esto, Ramírez Albuquerque et al. (2019) encontraron, en condiciones *in vitro*, una importante producción de los derivados acetilados del DON, siendo la producción de 3-ADON máxima entre 25 y 30°C, mientras que la producción de 15-ADON fue máxima a 10°C.

CAPÍTULO IV

Interacción de

Fusarium graminearum

y *Fusarium poae*

en trigo pan

(*Triticum aestivum* L.)

4.1. Introducción.

El trigo (*Triticum aestivum* L.) es el cultivo de invierno más importante del mundo, siendo el mismo destinado a la exportación y el consumo local. Actualmente, los granos de trigo son destinados principalmente para el consumo humano y en menor proporción a la suplementación animal. Las características reológicas de los diferentes tipos de harinas de trigo existentes, posibilitan un amplio uso en la panificación, proceso en el cual las proteínas del gluten desempeñan un rol muy importante. Así, las fracciones proteicas que conforman el gluten, gliadinas y gluteninas, representan el 80-85% de las proteínas totales de un grano de trigo maduro y determinan en última instancia la calidad panadera (Horvat et al., 2015).

La FE es una de las principales enfermedades de los cereales a nivel mundial, encontrándose presente en la mayoría de las regiones cerealeras. Esta enfermedad afecta el cultivo de trigo, principalmente durante el estadio de floración, causando cuantiosas pérdidas cuantitativas y cualitativas, y por ende serios daños económicos. En primer lugar, existe una reducción en el rendimiento, disminuyendo el peso de mil granos, reduciendo también la germinación y el vigor de las semillas. En segundo lugar, la FE reduce el contenido de proteína (Reis y Carmona, 2002). Si bien, el agente etiológico dominante de la FE a nivel mundial es *F. graminearum*, numerosos investigadores han aislado a *F. poae* de diferentes cereales tales como la cebada y el trigo. Recientemente, Covarelli et al. (2016) reportó que *F. poae* incrementaba su presencia cuando las condiciones climáticas no eran las adecuadas para el desarrollo de *F. graminearum*. En la Argentina y en diferentes países del mundo, *F. graminearum* y *F. poae* predominan sobre otras especies de *Fusarium* (Dinolfo et al., 2012). Sin embargo,

no está claro si existe interacción entre ambas especies de *Fusarium* al infectar de manera conjunta o por separado, y sus potenciales daños a los cultivos.

Las toxinas más importantes producidas por el género *Fusarium* son los tricotecenos. *F. graminearum* tiene la capacidad de producir un amplio espectro y cantidad de toxinas, especialmente DON y sus derivados acetilados, 3-ADON y 15-ADON. Además, *F. graminearum* tiene la capacidad de producir otras micotoxinas tales como aurofusarina, fusarina C y zearalenona, siendo esta última la responsable de afectar la reproducción sexual en monogástricos, causando hiperestrogismo (Desjardins, 2006). Por otra parte, *F. poae* es la principal especie perteneciente al género *Fusarium* capaz de producir altas concentraciones de NIV (Wan et al., 2013).

Es de destacar, que la FE, posee un efecto considerable sobre el rendimiento del grano y sobre la calidad del mismo en cultivos de trigo. Respecto a la calidad del grano, las proteínas están compuestas por una fracción soluble en soluciones acuosas (albúminas y globulinas) y una fracción insoluble (gliadinas y gluteninas) que son responsables de la formación del gluten. Las gluteninas (GLU) forman enlaces químicos disulfuro e interaccionan tanto a nivel intramolecular como intermolecular. Las sub-unidades se clasifican según su peso molecular en: (i) gluteninas de alto peso molecular (HMW: *High Molecular Weight*); y (ii) gluteninas de bajo peso molecular (LMW: *Low Molecular Weight*). En cuanto a las gliadinas (GLI), las mismas forman solo enlaces disulfuro intramoleculares, clasificándose en cuatro grandes grupos, dependiendo de su estructura: α , β -, γ - y ω -gliadinas. La infección por parte de especies del género *Fusarium* y la consecuente producción de proteasas, conducen a la degradación del gluten, modificando la tenacidad y extensibilidad de la masa, dando como

resultado una pérdida de la funcionalidad de la masa y el volumen de pan (Eggert et al., 2011).

Actualmente, no existe demasiada información acerca de la interacción entre *F. graminearum* y *F. poae* y su potencial efecto sobre la contaminación con micotoxinas (Vogelgsang et al., 2008; Xu et al., 2007). Sin embargo, se ha reportado que la colonización temprana de la lemma por parte de *F. poae* puede promover la colonización posterior por *F. graminearum* (Miller et al., 1994). Asimismo, la presencia de NIV puede sinergizar la toxicidad del DON y sus derivados acetilados, lo que aumentaría el potencial riesgo en la seguridad e inocuidad alimentaria (Fernández Pinto et al., 2008). Diversos trabajos han reportado que en co-inoculaciones, la competencia por los recursos entre especies del género *Fusarium*, puede conllevar a una mayor producción de micotoxinas bajo estas condiciones de estrés, aunque no existe evidencia disponible que apoye el sinergismo con respecto al incremento de los síntomas visuales (Xu et al., 2007; Xu y Nicholson, 2009).

Teniendo en cuenta la importancia que poseen tanto *F. graminearum* como *F. poae* en los sistemas agrícolas de la Argentina, es de vital importancia conocer si existen efectos de ambas especies, e incluso algún tipo de interacción (sinergismo/antagonismo), entre ambas especies. De esta manera, se evaluó la presencia de *F. graminearum* y *F. poae* en diferentes genotipos de trigo pan, y su potencial efecto sobre los parámetros de la enfermedad, la calidad del grano y la contaminación con micotoxinas.

4.2. Materiales y Métodos.

4.2.1. Genotipos de trigo.

Se evaluaron cinco genotipos de trigo pan con diferentes comportamientos con respecto a rendimiento, calidad panadera y comportamiento sanitario. Asimismo, los genotipos fueron seleccionados también en base a sus similares ciclos vegetativos y duración (ciclos intermedios-cortos), para que de esta manera estén expuestos a las mismas condiciones ambientales durante el período de floración. Como se observa a continuación en la Tabla 9, los genotipos seleccionados fueron:

Tabla 9. Genotipos de trigo seleccionados para la realización de los experimentos.

Genotipo	Rendimiento	Calidad Panadera	Susceptibilidad a FE
<i>Klein León</i>	Moderado	Baja (GDC 3)	Moderada
<i>Klein Nutria</i>	Alto	Moderada (GDC 2)	Baja
<i>Klein Proteo</i>	Moderado	Alta (GDC 1)	Moderada
<i>Buck AGP Fast</i>	Alto	Moderada (GDC 2)	Baja
<i>Buck Pleno</i>	Alto	Moderada (GDC 2)	Moderada

(Fuente: Catálogos comerciales Klein y Buck, 2016).

4.2.2. Conducción del ensayo y diseño experimental.

Las características del sitio experimental, junto con el manejo del cultivo e inoculación, fueron llevadas a cabo según lo descrito previamente en el Capítulo II. Durante la floración del cultivo, las espigas fueron inoculadas en el estadio fenológico Z.60-Z.65 (Zadoks et al., 1974), aplicando las suspensiones de conidios hasta punto de goteo, utilizando un pulverizador a presión (Vogelgsang et al., 2008). Para el tratamiento control, se utilizó ADE con Tween 20 (0,05%).

En cuanto al diseño del experimento, el mismo fue en parcelas divididas con cuatro bloques (Figs. 30A-C). Teniendo en cuenta los cinco genotipos, y los dos niveles de patógenos (presencia y/o ausencia de *F. graminearum* y *F. poae*), los 20 tratamientos resultantes fueron ubicados aleatoriamente en cada bloque. De esta manera, cada parcela sembrada con un genotipo se dividió en cuatro subparcelas, las cuales a su vez fueron asignadas al azar con una de las cuatro combinaciones posibles de inoculación: (i) tratamiento con *F. graminearum* (FP₀FG₁); (ii) tratamiento con *F. poae* (FP₁FG₀); (iii) tratamiento con ambos patógenos (*F. graminearum*+*F. poae*) (FP₁FG₁); y (iv) tratamiento control, con ADE + Tween 20 (0,05%) (FP₀FG₀) (Fig. 30D).

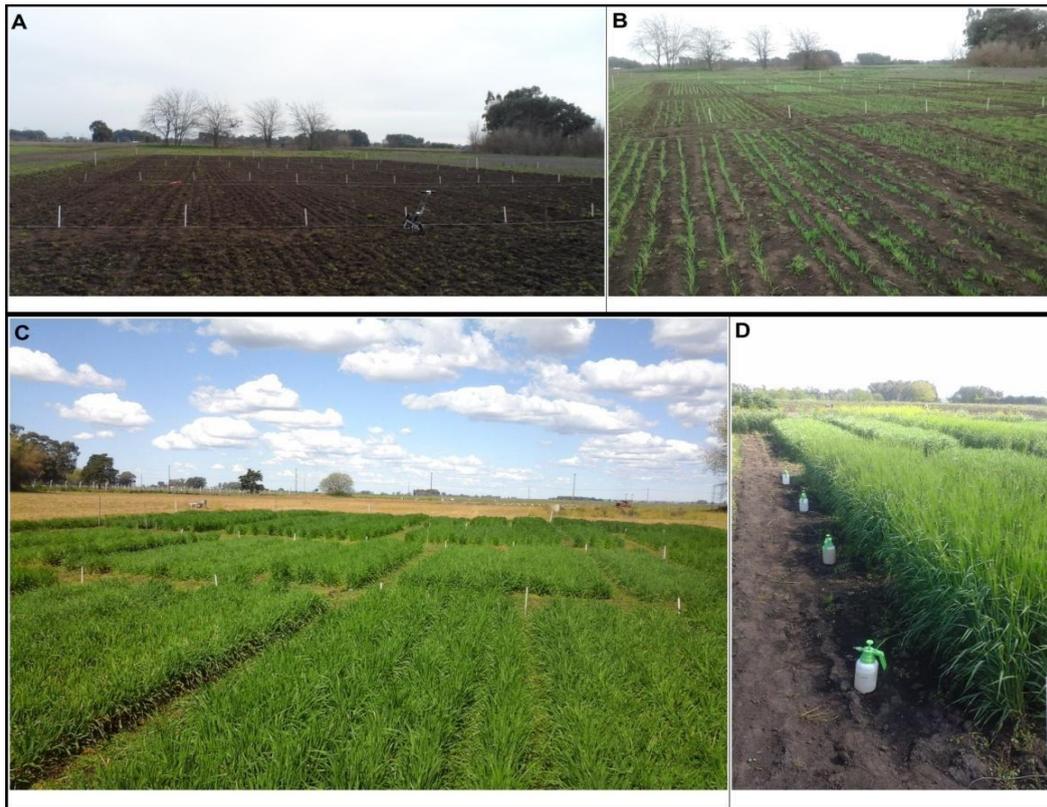


Figura 30. A) Siembra de ensayo a campo durante el año 2014. B) Emergencia del cultivo. Se puede apreciar el diseño en parcelas divididas con cuatro bloques. C) Macollaje y encañazón del cultivo. D) Inoculación del cultivo en el estadio fenológico Z.60-Z.65 (50% antesis) con los cuatro inóculos correspondientes.

4.2.3. Medición de variables.

Dentro de los parámetros evaluados, se realizó la evaluación visual de los síntomas luego de 21 días post-inoculación (dpi). A continuación, se calculó: (i) incidencia (número de espigas afectadas por subparcela), (ii) severidad (número de espiguillas con síntomas por espiga); y (iii) FHB Índice (incidencia x severidad/100). El total de espigas evaluadas fue de 40 por subparcela, seleccionadas al azar según Campbell et al. (1998). Luego de madurez fisiológica, cada subparcela se recolectó, se trilló (trilladora estacionaria Forti©) y se limpió manualmente.

El rendimiento en grano por subparcela fue registrado (g/m^2), junto con la evaluación del peso de mil granos. La concentración de proteínas fue cuantificada con un analizador NIT con monocromador de doble haz (Agricheck®, Bruins Instruments). La energía germinativa y el poder germinativo de los granos obtenidos fueron registrados de acuerdo a los protocolos de la *International Seed Testing Association* (ISTA). Para ello, se colocaron 100 granos por bandeja, con cuatro repeticiones, y con papel absorbente solo por debajo de las simientes. Luego se agregó ADE hasta saturar el papel, y se realizaron los recuentos al cuarto día (para energía germinativa) y al octavo día (para poder germinativo) (ISTA, 2017).

La prueba de micro-sedimentación con dodecil sulfato de sodio se llevó a cabo con el fin de estimar la fuerza panadera. Para mostrar los efectos de cada especie de *Fusarium* sobre cada sub-unidad de proteína, se extrajeron las diversas fracciones (GLI y GLU) mediante el método de extracción secuencial descrito por Gupta y Mc Ritchie (1991). El método consta principalmente de dos etapas, comenzando la primera de ellas con lavados sucesivos con etanol 70%, incubación a 65°C durante 30 min (con agitaciones intermedias cada 10 min) y centrifugado a 2.000 rpm. Durante uno de los lavados intermedios, se separaron los sobrenadantes de cada muestra (fracción en la cual se encontraban las gliadinas en suspensión) y se dejaron secando los tubos durante 24 h en estufa a 65°C. Con respecto a la segunda etapa, la misma se lleva a cabo con el residuo que precipitó en los tubos luego de los lavados sucesivos con etanol 70%. A continuación se realizó una lisis química utilizando ditiotreitól (DTT) al 1% p/v, incubando en estufa durante 30 min a 65°C y centrifugando 5 min a 13.000 rpm. Luego se agregó 4-vinilpiridina al 1,4% v/v, se incubó 15 min a 65°C y se

centrifugó a 13.000 rpm durante 2 min. Finalmente, a las muestras se les agregó buffer de carga (SDS 2%, glicerol 40% p/v, azul de bromofenol 0,02% p/v).

Las proteínas extraídas se separaron mediante SDS-PAGE (T=13,5%) y luego los geles correspondientes se tiñeron con 0,05% de Coomassie Brilliant Blue R250, durante 24 hs, se colocaron en TCA al 12% durante 48 h y finalmente se lavaron en ADE durante 24 h. Para la cuantificación de las diversas fracciones extraídas, se utilizó el software TotalLab (v1.10) con el fin de medir la intensidad del pixel como indicador de la abundancia relativa, aplicando la sustracción de fondo (*background*) para evitar la variabilidad debida al proceso de tinción. Se evaluaron los contenidos de GLI, GLU, HMW, LMW, ω -gliadinas y α - β - γ -gliadinas. Además, se calcularon las relaciones GLI/GLU, HMW/LMW y ω -gliadinas/ α - β - γ -gliadinas.

En cuanto a la cuantificación de micotoxinas, las mismas se realizaron de manera similar a la descrita anteriormente en 3.2.3., mediante cromatografía de gases con detección de captura de electrones (Shimadzu Modelo GC17) (Álvarez et al., 2009). El límite de detección (LOD) fue 0,02 $\mu\text{g/g}$ para DON y sus derivados acetilados (3-ADON y 15-ADON); mientras que para NIV el LOD fue de 0,05 $\mu\text{g/g}$. El límite de cuantificación (LOQ) fue 0,06 $\mu\text{g/g}$ para DON y sus derivados acetilados, mientras que para NIV el LOQ fue de 0,15 $\mu\text{g/g}$.

4.2.4. Análisis estadístico.

Las variables evaluadas se analizaron utilizando el software R (v.3.3.3, Rcore Team 2018). Debido a las condiciones climáticas contrastantes observadas durante los tres años evaluados, más específicamente durante la etapa de antesis, cada año se evaluó por separado. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando modelos lineales mixtos, ya que permiten el anidamiento de las parcelas (genotipo) dentro de los bloques, y a su vez, de las subparcelas (tratamientos con *Fusarium*) dentro de las parcelas. De esta manera, se determinó como factor principal el genotipo (G) de trigo, mientras que los dos niveles de cada especie de *Fusarium* (presencia/ausencia) se anidaron dentro, con 4 bloques para cada combinación de tratamientos (Fig. 31). La concentración de proteína (CP), test de sedimentación (SDSS), peso de mil granos (PMG), rendimiento en grano/m² (RG), gluten húmedo (GH%), las diversas fracciones de proteínas (gliadinas y gluteninas), junto con las concentraciones de micotoxinas (DON, 3-ADON, 15-ADON y NIV) se analizaron utilizando la función lmer (paquete lme4; Bates et al., 2015), debido a la distribución normal del error. A continuación, se verificaron gráficamente los supuestos utilizando los valores ajustados frente a los residuos para corroborar la homogeneidad de varianzas. En cuanto a la verificación de la normalidad de los residuos, para este fin se utilizaron gráficos Q-Q plot, junto con el test de Shapiro-Wilk.

En cuanto a variables tales como incidencia (Inc), severidad (Sev), FHB index (FHBi), energía germinativa (EG) y poder germinativo (PG), las mismas se analizaron mediante modelos mixtos lineales generalizados, considerando las restricciones en la aleatorización y los errores no normales. La función utilizada en este caso fue glmer (paquete lme4M; Bates et al., 2015). En todos los casos, las diferencias significativas se testearon con la función lsmeans (paquete emmeans) (Lenth, 2019). Los resultados se informaron como la media \pm error estándar de la media (SEM), junto con su nivel de significancia ($\alpha = 0,05$).

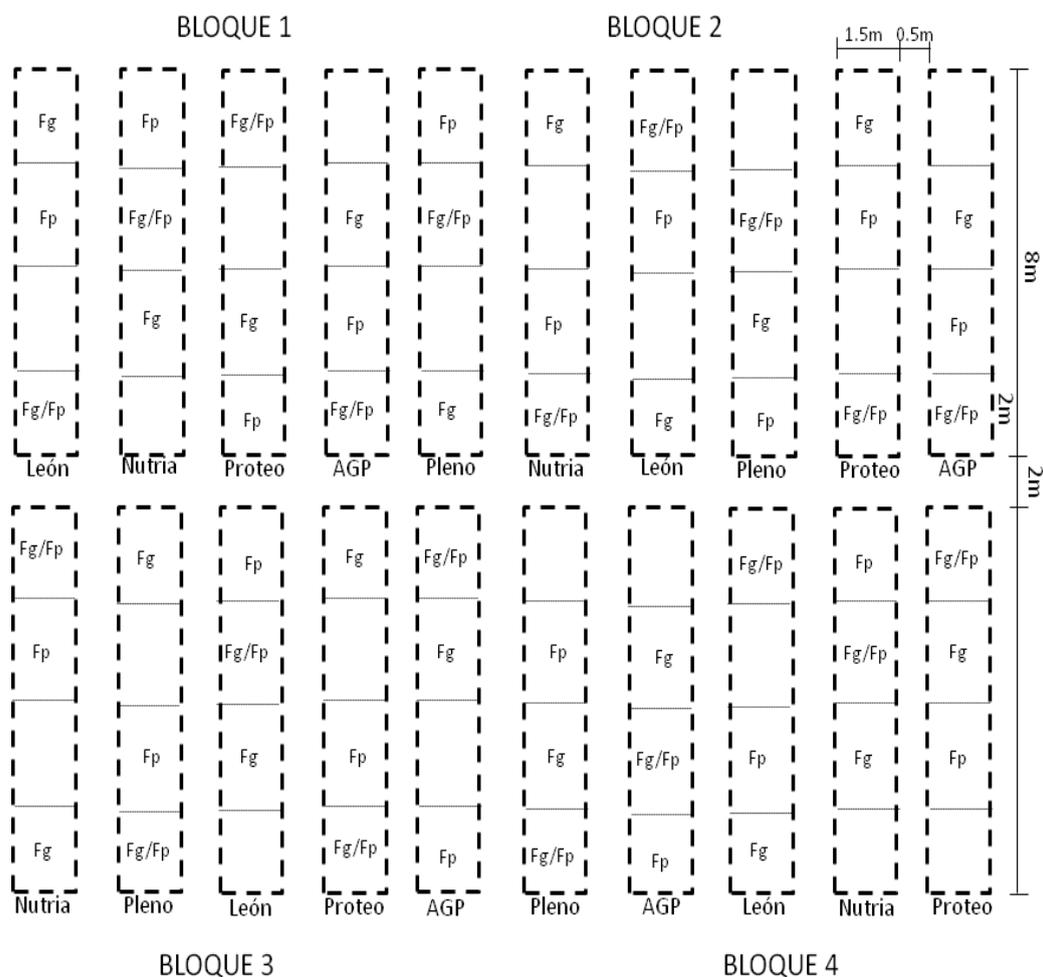


Figura 31. Diseño experimental de los ensayos realizados en trigo pan durante los años 2014, 2015 y 2016. Fp: tratamiento con *F. poae*; Fg: tratamiento con *F. graminearum*, Fg/Fp: tratamiento con *F. poae* + *F. graminearum*, Celdas vacías: tratamiento control.

4.3. Resultados.

4.3.1. Condiciones climáticas.

Teniendo en cuenta la fecha de siembra escogida durante cada año, junto con el tipo de ciclo vegetativo de los genotipos seleccionados (ciclos intermedios-cortos), el período de floración durante los tres años se ubicó generalmente, en la última semana de octubre y primer semana de noviembre. Cabe destacar, que las condiciones ambientales durante dicho período fueron diferentes entre los años analizados (Fig. 32).

Durante 2014, la temperatura promedio fue la más alta ($18,22 \pm 3,71^{\circ}\text{C}$), siendo el año más cálido y húmedo (209,60 mm; $67,24 \pm 11,55\%$ RH). En cambio, durante 2015 y 2016 las condiciones climáticas fueron similares entre sí, con temperaturas y precipitaciones menores. En 2015 se registraron las temperaturas mínimas más bajas ($9,88 \pm 4,08^{\circ}\text{C}$) con menores precipitaciones que en 2014 (144,60 mm, $68,88 \pm 11,17\%$ de HR). De la misma manera, durante 2016, se observaron escasas precipitaciones y menor humedad relativa (74,90 mm; $59,79 \pm 13,07\%$ HR) con temperaturas moderadas ($17,62 \pm 3,88^{\circ}\text{C}$).

En cuanto a las precipitaciones históricas para el período de cosecha-antesis (165,1 mm), en 2014 se reportó un incremento del 27%, mientras que contrariamente en 2015 y 2016 se observó una disminución en las precipitaciones de alrededor de 12% y 55%, respectivamente.

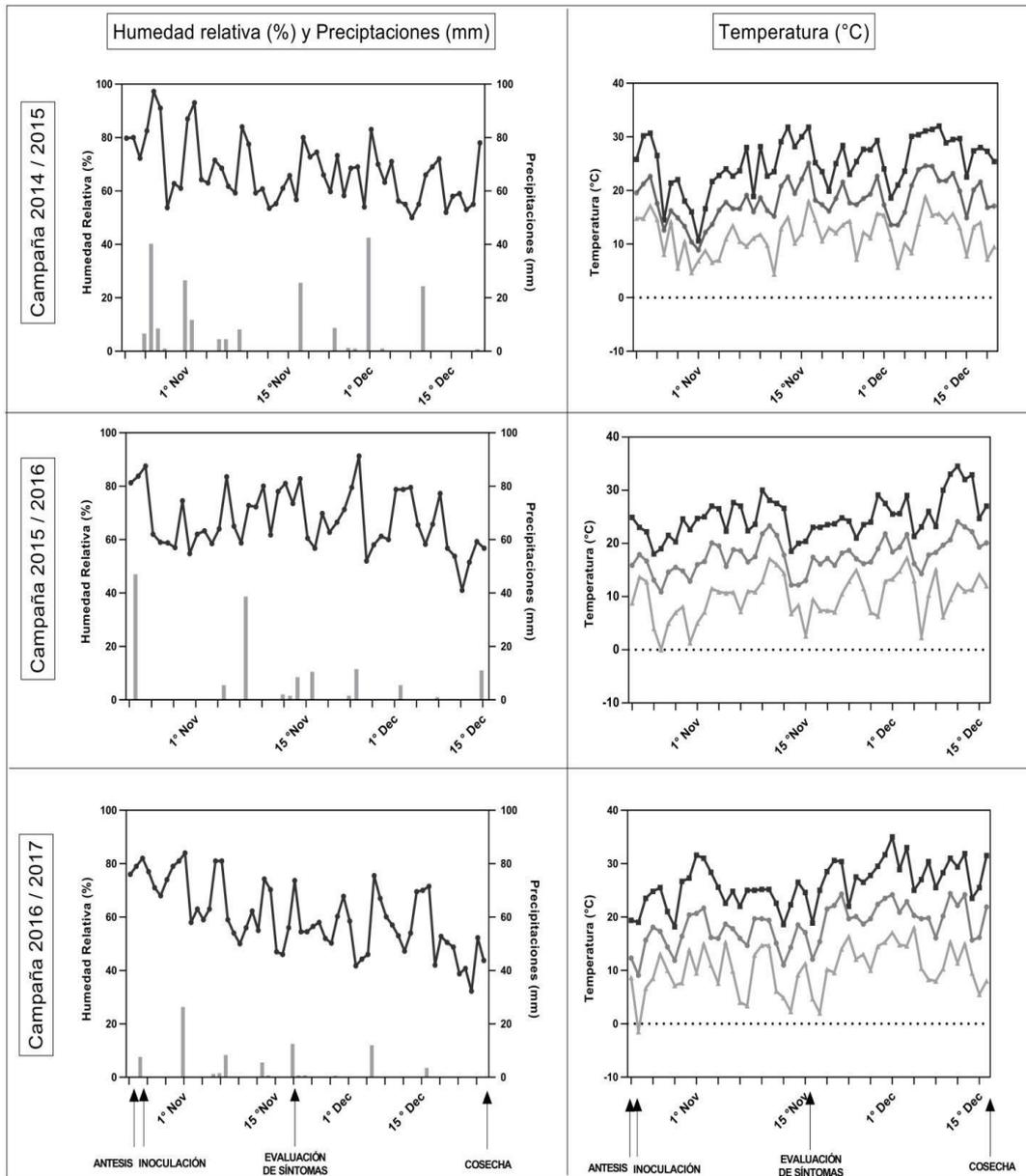


Figura 32. Condiciones climáticas para los años evaluados: 2014, 2015 y 2016. Izquierda: Condiciones de humedad relativa (línea punteada) y precipitaciones (barras). Derecha: Temperaturas máximas, medias y mínimas, respectivamente.

4.3.2. Parámetros de la enfermedad.

Los mayores valores de incidencia y severidad de FE se observaron durante 2014. Todos los genotipos evaluados mostraron síntomas con todos los tratamientos de *Fusarium* utilizados. Se registraron diferencias significativas ($p < 0,05$; $N=80$) para los diferentes tratamientos inoculados con *Fusarium* en las variables incidencia, severidad y FHB índice, según el año (Fig. 33). En 2014, los mayores valores de incidencia se observaron para el tratamiento FP_1FG_1 ($58,00 \pm 8,00\%$) con respecto a FP_0FG_1 ($52,00 \pm 6,00\%$) y FP_1FG_0 ($49,00 \pm 6,00\%$). De la misma manera, los valores más altos de severidad y FHB índice se registraron para el tratamiento FP_1FG_1 . Por otra parte, no se observaron diferencias significativas para la incidencia y el FHB índice durante 2015 y 2016, siendo similares en términos de visualización de los síntomas. Los valores de incidencia más altos se observaron para el tratamiento FP_0FG_1 ($30,00 \pm 2,00\%$ en 2015 y $28,00 \pm 2,00\%$ en 2016). Con respecto al FHB índice, se registraron los valores más altos para FP_0FG_1 ($0,34 \pm 0,09\%$) en 2015, mientras que en 2016 se observaron los valores más altos para FP_1FG_1 ($0,53 \pm 0,17\%$). Con respecto a la severidad, no existieron diferencias significativas en estos dos últimos años.

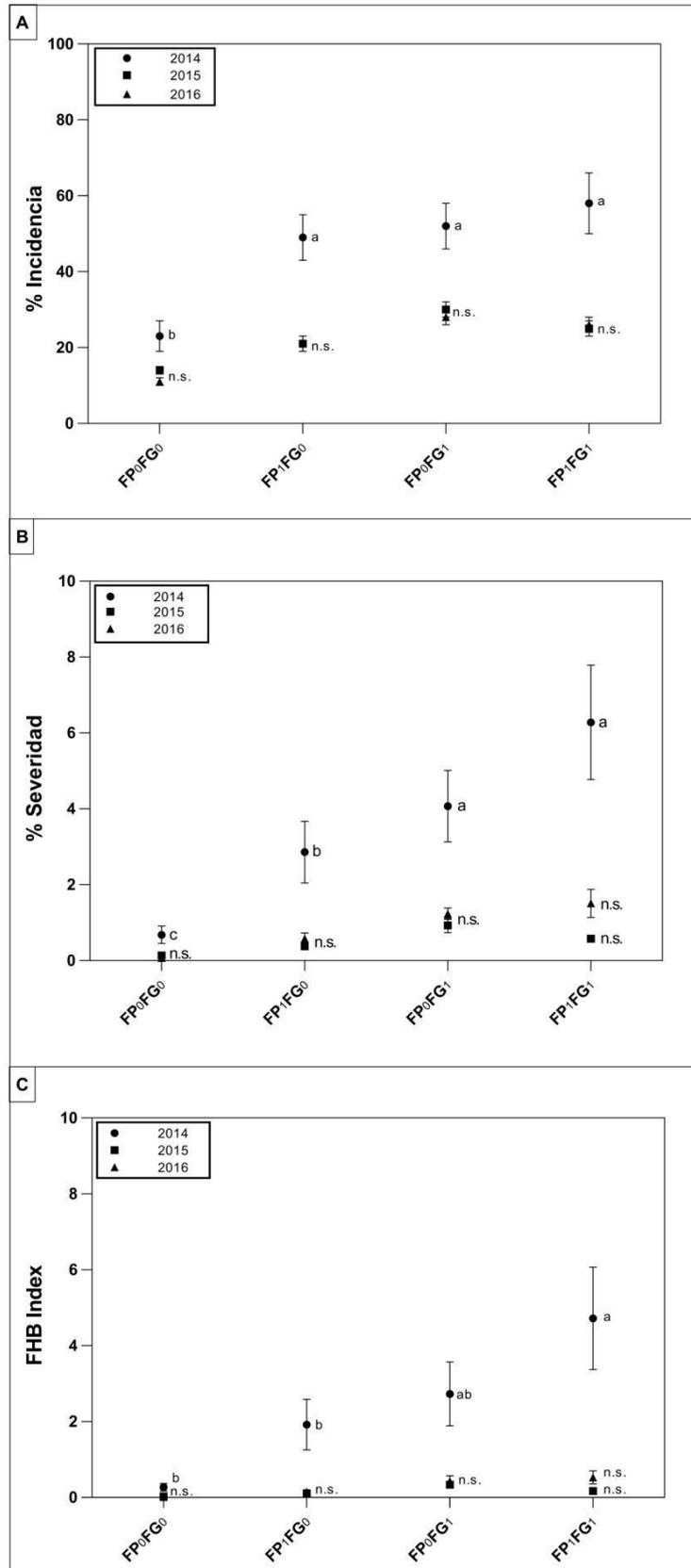


Figura 33. Parámetros de la FE para los tres años evaluados, según los diferentes tratamientos. A) Incidencia. B) Severidad. C) FHB index.

4.3.3. Parámetros de rendimiento, proteína y germinación.

Para las variables EG y PG, no se observaron diferencias significativas durante los tres años evaluados, con la excepción de EG para el 2015, en el cual se observaron solo diferencias entre genotipos. De la misma manera, no se observaron efectos de los tratamientos con *Fusarium* en parámetros como CP, SDSS y GH%, solo encontrando diferencias significativas ($p < 0,05$; $N=80$) para genotipo. Sin embargo, para las variables RG y PMG, existieron diferencias significativas ($p < 0,05$, $N=80$) en 2015 para la interacción $FP_0FG_1 \times G$ (Tabla 10).

Con respecto a CP, los genotipos Proteo ($11,94 \pm 0,23\%$) y Nutria ($10,89 \pm 0,19\%$) mostraron las concentraciones de proteína más elevadas durante todos los años. Los valores de GH% también mostraron que Proteo ($30,12 \pm 0,55\%$) y Nutria ($27,19 \pm 0,49\%$) fueron los genotipos con los mayores porcentajes. Respecto a los valores de SDSS, se observó la misma tendencia durante los tres años evaluados, mostrando en Pleno ($109,97 \pm 1,71$ mm) y Proteo ($97,34 \pm 1,66$ mm) los valores más altos de sedimentación.

En cuanto a variables tales como RG y PMG, existió interacción $FP_0FG_1 \times G$ durante 2015. Así, Proteo, fue el genotipo más afectado cuando *F. graminearum* estuvo presente, disminuyendo en un 24,25% el rendimiento en grano (de $303,50$ g/m² a $229,90$ g/m²), seguido de León con una disminución de 13,56% (desde $293,50$ g/m² hasta $253,70$ g/m²). Similarmente, para PMG el genotipo más afectado cuando *F. graminearum* estuvo presente fue León, registrando una disminución de 6,44% (de $50,96$ g a $47,68$ g) seguido de Proteo con una disminución de 2,04% (de $42,21$ g a $41,35$ g).

Tabla 10. Análisis de varianza para las diferentes variables analizadas. EG: energía germinativa; PG: poder germinativo; RG: rendimiento de grano; CP: concentración de proteínas; SDSS: prueba de sedimentación; PMG: peso de mil granos; GH%: gluten húmedo; g.l.: grados de libertad; Chisq: Test de Wald-Chi cuadrado tipo II.

Fuente	2014								
	g.l.	EG		PG		RG	CP		
		Chisq	p-value	Chisq	p-value		Chisq	p-value	
<i>F. poae</i> (FP)	1	0,0288	0,8653	0,0003	0,9864	-	0,2318	0,6302	
<i>F. graminearum</i> (FG)	1	0,3302	0,5655	0,0830	0,7733	-	0,5325	0,4656	
FP*FG	1	0,0007	0,9788	0,0004	0,9844	-	0,0632	0,8016	
Genotipo (G)	4	1,7182	0,7874	1,8308	0,7669	-	23,5378	<0,0001	
FP x G	4	0,5755	0,9657	0,0742	0,9993	-	0,6104	0,9619	
FG x G	4	0,1810	0,9961	0,2178	0,9945	-	3,2667	0,5142	
FP x FG x G	4	0,2762	0,9913	0,0902	0,9999	-	5,1332	0,2739	
2015									
<i>F. poae</i> (FP)	1	0,1486	0,6999	0,0190	0,8904	0,1362	0,7120	7,1081	0,0076
<i>F. graminearum</i> (FG)	1	0,7929	0,3732	0,0032	0,9547	0,2907	0,5897	2,1407	0,1434
FP*FG	1	0,4138	0,5200	0,0080	0,9285	0,7048	0,4011	1,2950	0,2551
Genotipo (G)	4	20,7279	0,0006	0,8505	0,9316	44,1100	<0,0001	396,8649	<0,0001
FP x G	4	0,8853	0,9266	0,0793	0,9992	3,5036	0,4773	6,1098	0,1911
FG x G	4	2,0404	0,7283	0,3047	0,9885	14,0439	0,0071	3,3488	0,5012
FP x FG x G	4	3,8622	0,4249	0,0904	0,9990	2,5628	0,6334	7,2003	0,1256

Continuación Tabla 10.

2016									
Fuente		EG		PG		RG		CP	
		Chisq	p-value	Chisq	p-value	Chisq	p-value	Chisq	p-value
<i>F. poae</i> (FP)	1	0,0169	0,8966	0,0052	0,9427	1,0614	0,3028	2,2508	0,1335
<i>F. graminearum</i> (FG)	1	0,0598	0,8068	0,0400	0,8415	2,6732	0,1020	1,1584	0,2818
FP*FG	1	0,0449	0,8321	0,0231	0,8791	1,2457	0,2643	1,2661	0,2605
Genotipo (G)	4	0,3948	0,9829	0,0435	0,9998	21,5111	0,0003	16,0737	0,0029
FP x G	4	0,0231	0,9999	0,0093	1,0000	4,0766	0,3957	2,7121	0,6071
FG x G	4	0,0043	1,0000	0,0013	1,0000	1,2877	0,8634	5,0012	0,2871
FP x FG x G	4	0,0119	1,0000	0,0248	0,9999	0,6870	0,9529	3,9481	0,4131
2014									
	g.l.	SDSS		PMG		GH%			
		Chisq	p-value	Chisq	p-value	Chisq	p-value		
<i>F. poae</i> (FP)	1	0,0020	0,9643	0,1100	0,7400	0,5629	0,4530		
<i>F. graminearum</i> (FG)	1	2,4277	0,1192	0,0217	0,8827	0,1466	0,7018		
FP*FG	1	1,5311	0,2159	0,2476	0,6187	2,4636	0,1165		
Genotipo (G)	4	33,1704	<0,0001	16,7432	0,0021	23,2136	<0,0001		
FP x G	4	3,3675	0,4983	5,9262	0,2047	2,3656	0,6688		
FG x G	4	3,3385	0,5029	2,0543	0,7257	3,7211	0,4451		
FP x FG x G	4	4,3021	0,3667	4,1210	0,3898	3,7831	0,4361		

Continuación Tabla 10.

2015							
Fuente	g.l.	SDSS	PMG	GH%	SDSS	PMG	GH%
		Chisq	p-value	Chisq	Chisq	p-value	Chisq
<i>F. poae</i> (FP)	1	2,0504	0,1522	1,8341	0,1756	1,3840	0,2391
<i>F. graminearum</i> (FG)	1	0,0251	0,8741	0,5738	0,4487	0,1609	0,6883
FP*FG	1	0,8239	0,3640	0,0190	0,8904	2,5746	0,1085
Genotipo (G)	4	756,0312	<0,0001	169,6639	<0,0001	177,2547	<0,0001
FP x G	4	4,9954	0,2878	6,0327	0,1967	7,9892	0,0919
FG x G	4	1,2630	0,8676	15,1702	0,0043	2,8171	0,5888
FP x FG x G	4	0,2481	0,9929	0,7500	0,9450	3,9501	0,4128
2016							
	g.l.	SDSS	PMG	GH%	SDSS	PMG	GH%
		Chisq	p-value	Chisq	Chisq	p-value	Chisq
<i>F. poae</i> (FP)	1	0,0009	0,9764	0,1164	0,7329	3,2825	0,0700
<i>F. graminearum</i> (FG)	1	1,8664	0,1719	1,5884	0,2075	0,6201	0,4310
FP*FG	1	0,2252	0,6351	0,0000	1,0000	1,0214	0,3121
Genotipo (G)	4	129,8270	<0,0001	39,4706	<0,0001	56,0797	<0,0001
FP x G	4	2,1468	0,7088	5,8198	0,2130	0,7473	0,9453
FG x G	4	2,6199	0,6233	9,1167	0,0582	6,7330	0,1507
FP x FG x G	4	4,2545	0,3727	1,3651	0,8502	0,2942	0,9902

4.3.4. Composición proteica.

Para los loci que codifican subunidades de gluteninas de alto peso molecular (HMW), las composiciones alélicas para Glu-A1, Glu-B1 y Glu-D1 son las descritas a continuación en la Tabla 11.

Tabla 11. Sub-unidades de gluteninas de alto peso molecular (HMW) para cada genotipo, y su respectivo grupo de calidad (GDC).

Genotipo	Glu-A1	Glu-B1	Glu-D1	GDC
AGP Fast	n.i.	13+16	5+10	2
León	2*	7+9	2+12	3
Nutria	2*	7+9	5+10	2
Pleno	2*	7+8	5+10	2
Proteo	1	7+9	5+10	1

n.i.: no identificado

El análisis de las diferentes fracciones de proteínas se realizó únicamente durante 2014, debido al elevado número de granos sintomáticos observados, que justificaron la evaluación de dichas variables en función del potencial impacto sobre la calidad panadera. Se registraron diferencias significativas ($p < 0,05$; $N=60$) para los diferentes genotipos y tratamientos de *Fusarium* (Tabla 12).

Tabla 12. Análisis de la varianza para los diferentes parámetros de calidad de grano. GLI: gliadinas; GLU: gluteninas; HMW: gluteninas de alto peso molecular; LMW: gluteninas de bajo peso molecular; ω-GLI: ω-gliadinas; α, β, γ-GLI: α,β,γ- gliadinas; g.l.: grados de libertad; Chisq: Test de Wald-Chi cuadrado tipo II.

Fuente	2014								
	g.l.	GLI		GLU		GLI/GLU		HMW	
		Chisq	p-value	Chisq	p-value	Chisq	p-value	Chisq	p-value
<i>F. poae</i> (FP)	1	2,6822	0,1015	15,4093	<0,0001	3,7305	0,0534	10,9638	0,0009
<i>F. graminearum</i> (FG)	1	0,9342	0,3337	27,3622	<0,0001	10,9357	0,0009	27,1796	<0,0001
FP*FG	1	8,8335	0,0296	26,5163	<0,0001	0,4568	0,4991	22,0571	<0,0001
Genotipo (G)	4	4,4901	0,2780	22,4163	0,0001	13,7433	0,0081	34,2752	<0,0001
FP x G	4	5,0918	0,2780	0,7310	0,9474	3,2250	0,5209	8,4871	0,0752
FG x G	4	5,9412	0,2035	1,2142	0,8757	7,7648	0,1005	0,6321	0,9594
FP x FG x G	4	4,9024	0,2975	1,4341	0,8382	4,6966	0,3198	2,7539	0,5998
Tratamiento con <i>Fusarium</i> spp.		Media ± SEM		Media ± SEM		Media ± SEM		Media ± SEM	
FP ₁ FG ₀		376,76 ± 28,94 a		175,51 ± 29,14 a		2,89 ± 0,47 n.s.		53,44 ± 6,56 a	
FP ₀ FG ₁		399,62 ± 24,01 a		134,46 ± 16,43 a		3,73 ± 0,56 n.s.		50,67 ± 6,21 a	
FP ₁ FG ₁		445,66 ± 32,92 ab		180,15 ± 34,53 a		4,53 ± 1,26 n.s.		77,44 ± 19,81 a	
FP ₀ FG ₀		533,79 ± 49,05 b		460,89 ± 36,37 b		1,28 ± 0,16 n.s.		126,64 ± 17,81 b	
Genotipo		Media ± SEM		Media ± SEM		Media ± SEM		Media ± SEM	
AGP Fast		410,29 ± 46,34 n.s.		151,29 ± 33,98 a		3,86 ± 0,74 ab		53,89 ± 7,88 a	
León		384,75 ± 52,25 n.s.		164,31 ± 42,48 a		4,75 ± 1,38 b		28,59 ± 7,56 a	
Nutria		467,34 ± 54,12 n.s.		240,70 ± 53,64 ab		3,09 ± 0,59 ab		113,93 ± 26,19 b	
Pleno		483,43 ± 16,90 n.s.		364,68 ± 50,91 b		1,63 ± 0,20 a		91,44 ± 14,43 a	
Proteo		446,07 ± 28,40 n.s.		273,13 ± 49,14 ab		1,94 ± 0,19 a		97,08 ± 9,99 a	

Continuación Tabla 12.

2014											
Fuente	g.l.	LMW		HMW/LMW		ó-GLI		α, β, γ-GLI		ó-GLI/ α, β, γ-GLI	
		Chisq	p-value	Chisq	p-value	Chisq	p-value	Chisq	p-value	Chisq	p-value
		<i>F. poae</i> (FP)	1	15,8977	<0,0001	5,6642	0,0173	2,8976	0,0887	2,2515	0,1334
<i>F. graminearum</i> (FG)	1	30,7783	<0,0001	3,9541	0,0467	3,0459	0,0809	0,2901	0,5902	1,4126	0,2346
FP*FG	1	21,7429	<0,0001	0,1505	0,6980	9,8986	0,0016	7,2703	0,0070	1,9823	0,1592
Genotype (G)	4	19,3326	0,0007	12,4577	0,0142	4,7876	0,3097	11,3221	0,0232	12,4947	0,0140
FP x G	4	1,9614	0,7428	9,3120	0,0538	4,8702	0,3008	4,5659	0,3348	4,4848	0,3443
FG x G	4	0,8107	0,9370	1,8341	0,7662	6,0867	0,1927	5,6596	0,2261	9,0438	0,0600
FP x FG x G	4	0,3505	0,9863	2,1307	0,7117	6,5471	0,1618	3,6532	0,4550	7,1167	0,1296
<i>Fusarium</i> Treatments		Media ± SEM		Media ± SEM		Media ± SEM		Media ± SEM		Media ± SEM	
FP ₁ FG ₀		122,07 ± 26,51 a		0,92 ± 0,26 n.s.		91,34 ± 9,34 a		284,93 ± 22,26 a		0,33 ± 0,02 n.s.	
FP ₀ FG ₁		83,79 ± 13,96 a		0,84 ± 0,14 n.s.		91,83 ± 8,78 a		308,29 ± 19,13 a b		0,30 ± 0,02 n.s.	
FP ₁ FG ₁		102,71 ± 28,12 a		1,31 ± 0,38 n.s.		107,54 ± 12,08 a b		338,13 ± 27,14 a b		0,33 ± 0,02 n.s.	
FP ₀ FG ₀		334,24 ± 25,70 b		0,39 ± 0,05 n.s.		146,97 ± 18,11 b		386,82 ± 82 b		0,35 ± 0,04 n.s.	
Genotypes		Media ± SEM		Media ± SEM		Media ± SEM		Media ± SEM		Media ± SEM	
AGP Fast		97,41 ± 27,20 a		1,15 ± 0,32 a		92,28 ± 14,96 n.s.		318,01 ± 31,73 a		0,28 ± 0,02 a	
León		135,72 ± 36,99 ab		0,48 ± 0,17 a		113,68 ± 19,50 n.s.		271,07 ± 33,01 a		0,40 ± 0,02 ab	
Nutria		126,78 ± 37,01 a		1,55 ± 0,38 b		115,16 ± 13,65 n.s.		352,18 ± 40,74 a		0,30 ± 0,03 a	
Pleno		273,24 ± 38,63 b		0,35 ± 0,03 a		90,81 ± 13,72 n.s.		392,62 ± 11,37 b		0,23 ± 0,04 a	
Proteo		176,05 ± 42,37 ab		0,73 ± 0,10 a		136,28 ± 12,33 n.s.		309,79 ± 16,30 a		0,43 ± 0,02 b	

Se observó que la degradación entre las diferentes fracciones de proteína varió entre los tratamientos con *Fusarium*, mostrando mayor degradación de las gluteninas cuando *F. graminearum* se inoculó solo. Contrariamente, cuando se inoculó solamente *F. poae* se registró una mayor degradación de las gliadinas, mientras que cuando ambas especies fueron inoculadas conjuntamente, ambas fracciones de proteína fueron afectadas (Fig. 34).

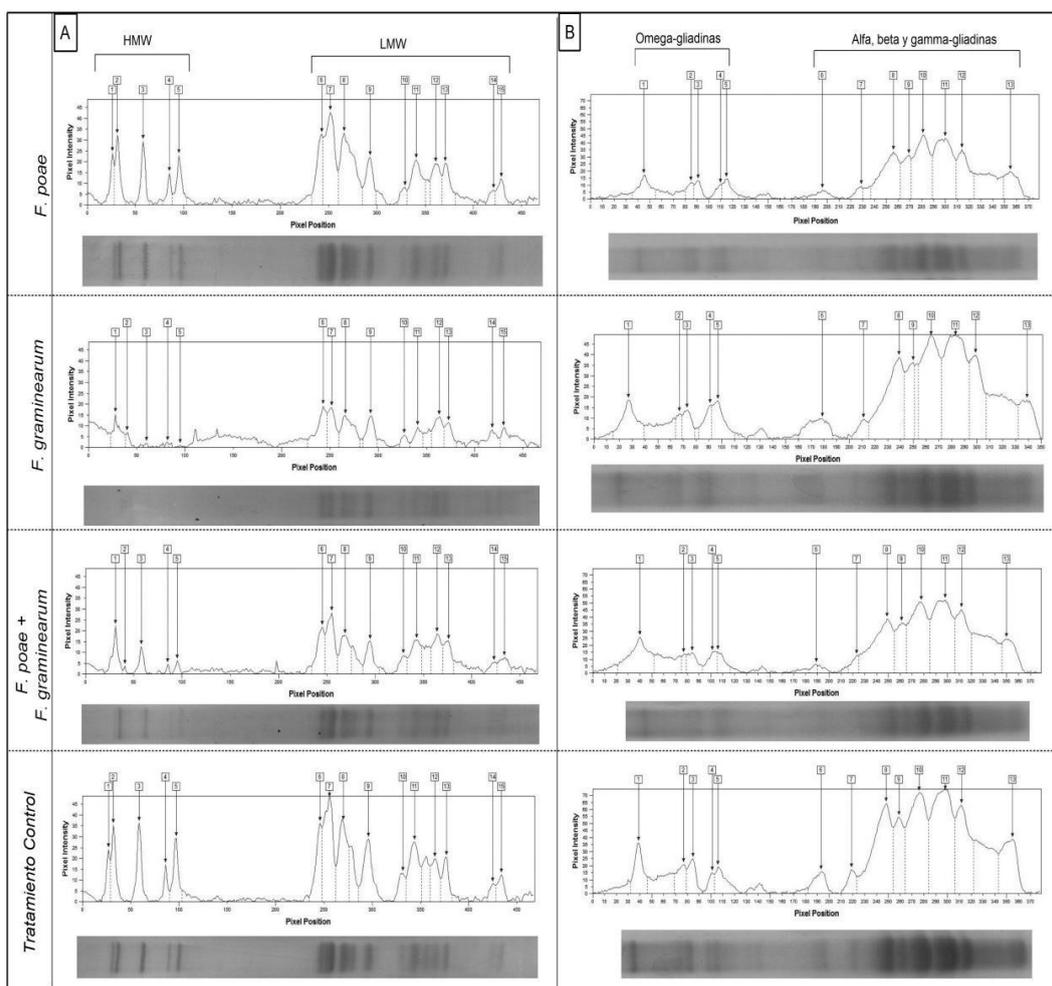


Figura 34. Degradación de las diferentes subunidades de proteínas en granos de trigo con síntomas de FE. A) Abundancia relativa y fracciones de geles de poliacrilamida (SDS-PAGE; T% = 13,5%) que muestran el patrón de bandas para las gluteninas de alto peso molecular (HMW) y de bajo peso molecular (LMW). B) Abundancia relativa y fracciones de geles de poliacrilamida (SDS-PAGE; T% = 13,5%) que muestran el patrón de bandas en las ω -gliadinas y α, β, γ -gliadinas. Tratamientos: *F. poae* (FP₁FG₀), *F. graminearum* (FP₀FG₁), *F. poae* + *F. graminearum* (FP₁FG₁) y tratamiento control (FP₀FG₀).

Los valores de abundancia relativa (intensidad de pixel) para las gluteninas indicaron una reducción del 70,82% para el tratamiento FP₀FG₁ con respecto al control (Fig. 35), seguido por FP₁FG₁ (60,91%) y FP₁FG₀ (61,97%). Por otro lado, FP₁FG₀ fue el tratamiento que más afectó a la fracción de gliadinas, reduciéndola un 29,42%, seguido por FP₀FG₁ (25,14%) y FP₁FG₁ (16,51%). Con respecto a la relación GLI/GLU, no existieron diferencias significativas entre los tratamientos de *Fusarium*, observando una ligera tendencia que indica una relación GLI/GLU más alta en comparación con el control para FP₁FG₁ (3,54 veces) seguido de FP₀FG₁ (2,91 veces) y FP₁FG₀ (2,25 veces).

En cuanto a las fracciones de gluteninas, las HMW fueron más afectadas por el tratamiento FP₀FG₁ (60,00%), seguido por FP₁FG₀ (57,80%) y FP₁FG₁ (38,85%); mientras que la fracción LMW también se vio afectada en mayor medida por FP₀FG₁, reduciéndose en 74,93% y luego por FP₁FG₁ (69,23%) y FP₁FG₀ (63,49%). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas para la relación HMW/LMW. Para la fracción ω -gli, se observó que FP₁FG₀ fue el tratamiento que afectó en mayor proporción esta fracción proteica (37,85%), seguido de FP₀FG₁ (37,52%) y FP₁FG₁ (26,82%). Además, FP₁FG₀ fue el tratamiento que más afectó a la fracción α - β - γ -gli disminuyendo un 26,34%, seguido por FP₀FG₁ (20,30%) y FP₁FG₁ (12,60%). Con respecto a la relación ω -gli/ α - β - γ -gli, no se encontraron diferencias significativas.

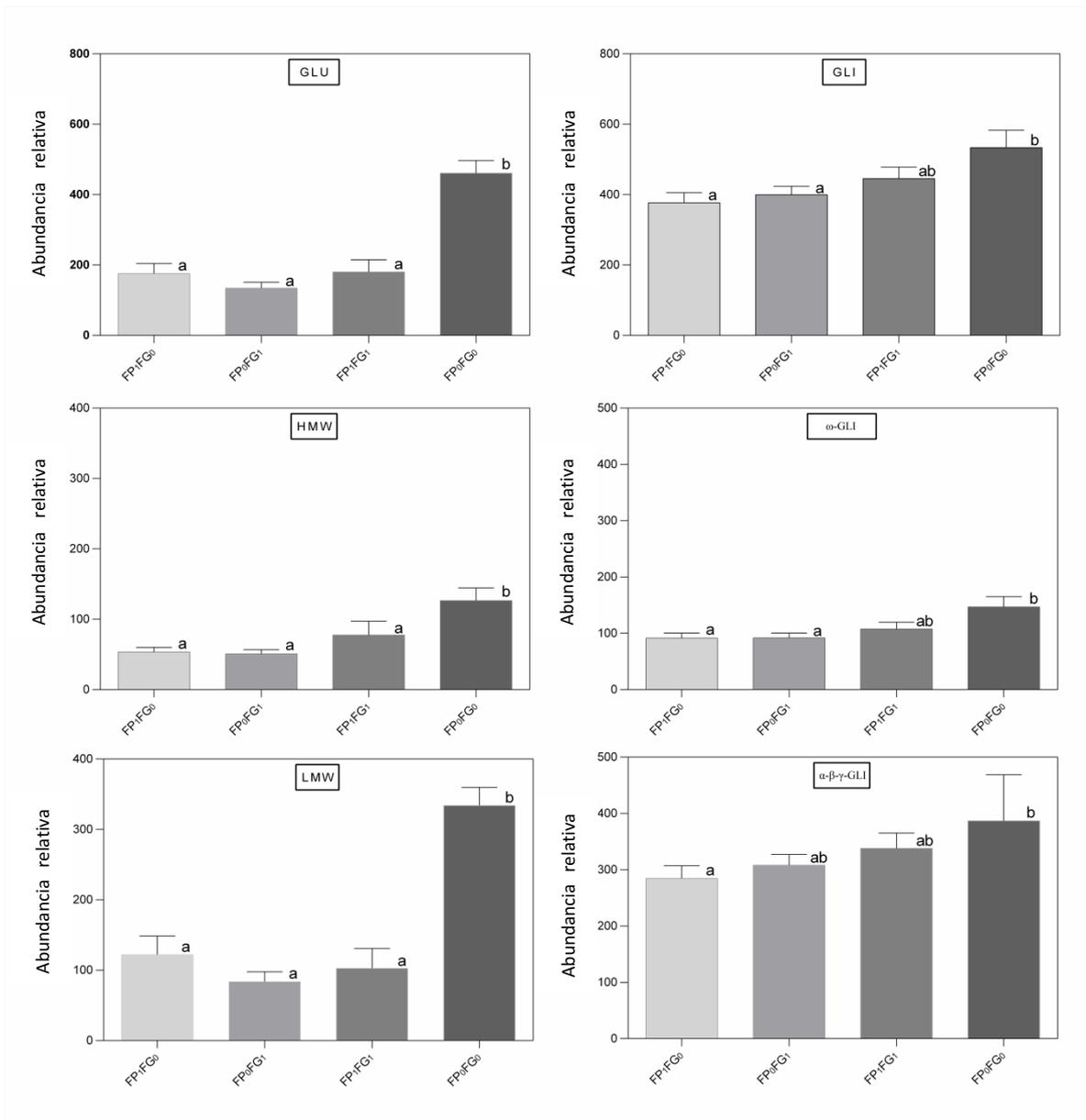


Figura 35. Abundancia relativa de cada subunidad de proteína para diferentes tratamientos en granos sintomáticos de trigo. Tratamientos: *F. poae* (FP1FG0), *F. graminearum* (FP0FG1), (FP1FG1) y tratamiento control (FP0FG0). GLU: gluteninas; GLI: gliadinas; HMW: gluteninas de alto peso molecular; LMW: gluteninas de bajo peso molecular; ω-GLI: ω-gliadinas; α-β-γ-GLI: α,β,γ-gliadinas. Media ± SEM. Las columnas con letras diferentes son estadísticamente diferentes según el test de Tukey (p<0,05).

4.3.5. Contaminación con micotoxinas.

Durante 2014, se observaron las mayores concentraciones de DON ($5,06 \pm 2,47 \mu\text{g/g}$) y 15-ADON ($0,13 \pm 0,04 \mu\text{g/g}$) para el tratamiento FP₀FG₁, mientras que los mayores valores para 3-ADON ($55,76 \pm 31,37 \mu\text{g/g}$) fueron observados para el tratamiento en FP₁FG₁ (Tabla 13). En cuanto a la concentración de DON, solo se observaron diferencias significativas ($p=0,0377$; $N= 60$) entre genotipos, mostrando que el genotipo con mayor contaminación de DON fue Proteo ($12,01 \pm 3,67 \mu\text{g/g}$), mientras que las menores concentraciones se observaron en Pleno ($0,84 \pm 0,19 \mu\text{g/g}$) (Fig. 36). En cuanto a NIV, no se registraron diferencias significativas, registrando solo concentraciones de esta toxina en el tratamiento con *F. poae* ($0,19 \pm 0,05 \mu\text{g/g}$) (Tabla 13). De la misma manera, para 3-ADON y 15-ADON, no se registraron diferencias significativas.

Durante 2015, se observaron las concentraciones más altas de DON ($4,54 \pm 1,62 \mu\text{g/g}$) y 15-ADON ($2,98 \pm 1,49 \mu\text{g/g}$) para el tratamiento FP₀FG₁, mientras que los mayores valores de 3-ADON ($11,10 \pm 2,21 \mu\text{g/g}$) se registraron en el tratamiento FP₁FG₁. Cabe resaltar, que solo se observaron diferencias significativas entre los diferentes genotipos para DON ($p<0,0001$; $N=80$) (Fig. 36). En el primer caso, Proteo fue el genotipo con la mayor concentración de DON ($8,74 \pm 2,01 \mu\text{g/g}$), mientras que el genotipo León mostró los valores más bajos ($1,66 \pm 0,68 \mu\text{g/g}$). En cuanto a NIV, no se registraron con concentraciones de esta toxina durante 2015, mientras que para los derivados acetilados, no se encontraron diferencias significativas.

Respecto al año 2016, las mayores concentraciones de micotoxinas se observaron para el tratamiento FP₀FG₁ para DON ($1,01 \pm 0,29 \mu\text{g/g}$), 3-ADON ($30,96 \pm 7,21 \mu\text{g/g}$) y 15-ADON ($1,03 \pm 0,19 \mu\text{g/g}$). Con respecto a NIV, no se

detectaron concentraciones de esta toxina durante 2016. Asimismo, para todas las micotoxinas analizadas durante este año, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con *Fusarium* o entre genotipos.

Tabla 13. Contaminación de granos de trigo con deoxinivalenol (DON), 3-acetil deoxinivalenol (3-ADON), 15-acetil deoxinivalenol (15-ADON) y nivalenol (NIV) en cinco genotipos de trigo durante los años 2014, 2015 y 2016.

Año	Tratamiento	DON (µg/g)	3-ADON (µg/g)	15-ADON (µg/g)	NIV (µg/g)
2014	<i>F. poae</i>	n.d.	n.d.	n.d.	0,19 ± 0,05
	<i>F. graminearum</i>	5,06 ± 2,47	44,45 ± 35,18	0,13 ± 0,04	n.d.
	<i>F. poae</i> / <i>F. graminearum</i>	3,00 ± 1,22	55,76 ± 31,37	0,12 ± 0,04	n.d.
	Control	1,03 ± 0,23	8,02 ± 1,25	0,09 ± 0,04	n.d.
2015	<i>F. poae</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<i>F. graminearum</i>	4,54 ± 1,62	10,75 ± 3,16	2,98 ± 1,49	n.d.
	<i>F. poae</i> / <i>F. graminearum</i>	3,53 ± 0,80	11,10 ± 2,21	1,59 ± 1,12	n.d.
	Control	1,95 ± 0,95	9,11 ± 1,67	0,49 ± 0,08	n.d.
2016	<i>F. poae</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<i>F. graminearum</i>	1,01 ± 0,29	30,96 ± 7,21	1,03 ± 0,19	n.d.
	<i>F. poae</i> / <i>F. graminearum</i>	0,99 ± 0,31	22,28 ± 5,43	0,71 ± 0,23	n.d.
	Control	0,79 ± 0,11	22,57 ± 2,83	0,50 ± 0,07	n.d.

n.d. : no detectado. LOD: DON: 0,02 µg/g; NIV 0,05 µg/g. LOQ: DON: 0,06 µg/g; NIV 0,15 µg/g.

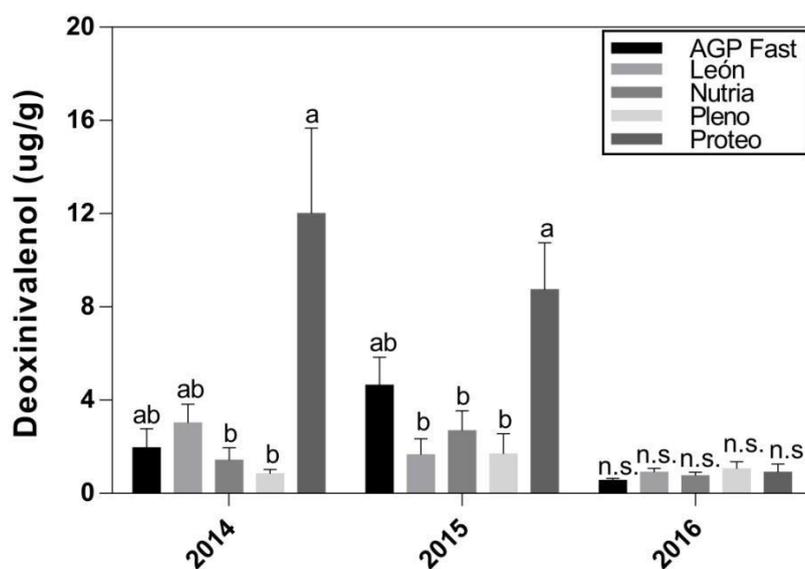


Figura 36. Diferencias significativas para la contaminación con DON entre los diferentes genotipos evaluados.

4.4. Discusión.

Durante el presente trabajo, las condiciones de humedad relativa, temperatura y precipitaciones acumuladas para el período antesis-cosecha fueron diferentes durante los tres años evaluados (2014, 2015 y 2016). Con respecto a los parámetros de la enfermedad, solo se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con *Fusarium* durante 2014. Sin embargo, no se reportaron diferencias estadísticas que pudieran demostrar antagonismo y/o sinergismo cuando se inocularon *F. graminearum* y *F. poae* de manera conjunta. Durante 2014, se registraron los valores más altos para los parámetros de la enfermedad, debido a las temperaturas cálidas y a las condiciones húmedas durante la etapa de floración, las cuales fueron favorables para el desarrollo de la enfermedad. Contrariamente, durante 2015 y 2016 las temperaturas más bajas y las condiciones hídricas más secas disminuyeron el desarrollo de la enfermedad, observando así menores síntomas visuales. Teniendo en cuenta que los residuos de cultivos y las prácticas de labranza fueron similares durante los tres años evaluados, los resultados registrados en el presente trabajo indican que las variaciones en las condiciones ambientales desempeñaron un rol importante en el desarrollo de la enfermedad, y por ende, en el desarrollo de los síntomas de la misma. Actualmente, es sabido que las condiciones ambientales desempeñan un rol fundamental en las interacciones *Fusarium*-hospedante, variando la composición de las especies de *Fusarium* de acuerdo con los diferentes factores climáticos durante cada temporada de crecimiento, principalmente durante la etapa de floración (Vogelgsang et al., 2008). Generalmente, los síntomas observados de la FE están asociados con la precipitación total acumulada y con el patrón de distribución de las mismas durante la etapa de floración (Lori et al., 2009).

Además, las diferentes condiciones termo-higrométricas durante este período podrían explicar las variaciones en la composición de las especies de *Fusarium*. A modo de ejemplo, cuando las condiciones no son favorables para *F. graminearum*, otras especies como *F. poae* podrían aumentar su presencia (Covarelli et al., 2016). Asimismo, la diferencia observada en los síntomas visuales entre los tratamientos con *F. poae* y *F. graminearum* podría explicarse debido a que *F. poae* coloniza los tejidos florales en mayor medida que el grano, mientras que *F. graminearum* puede colonizar ambos tipos de tejidos de igual manera (Xu et al., 2007). Condiciones húmedas y temperaturas cálidas (aproximadamente 28°C) son favorables para la infección de *F. graminearum*, mientras que condiciones secas y temperaturas de aproximadamente 25°C son favorables para el desarrollo de *F. poae* (Xu y Nicholson, 2009). Con respecto a los valores más bajos de síntomas observados durante 2015 y 2016, los mismos podrían deberse a las temperaturas mínimas diarias por debajo de 9°C registradas alrededor de antesis, las cuales pueden inhibir o disminuir el crecimiento de los patógenos mencionados (Moschini y Fortugno, 1996).

Las especies de *Fusarium* causan disminución de rendimiento y deterioro en la calidad del grano de trigo (Bellesi et al., 2019; McMullen et al., 2012). En el presente estudio, no se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos de *Fusarium* en términos de parámetros como CP, SDSS y GH%, mostrando solo diferencias entre genotipos. Estos resultados coinciden con investigaciones previas en el área que indican que no existieron diferencias para estas variables en muestras infectadas con *Fusarium*. Eggert et al. (2010) y Wang et al. (2005), encontraron que la concentración de proteína no varió significativamente con respecto a la infección con *F. graminearum* o *F. culmorum*. Por otra parte, en

muestras infectadas naturalmente, Hysing y Wiik (2014) encontraron que no existían diferencias significativas para variables tales como gluten húmedo y concentración de proteínas. Con respecto a RG y PMG, se reportó una disminución de hasta el 6,44% según el genotipo, coincidiendo con Hysing y Wiik (2014), que reportaron una disminución de 4,00% en el peso de mil granos.

Las proteínas del gluten desempeñan un rol importante en la determinación de la calidad panadera del trigo, ya que son las gluteninas y gliadinas las fracciones responsables de las propiedades viscoelásticas de la masa (Horvat et al., 2015). La infección con *Fusarium* puede afectar las propiedades de procesamiento, cocción y panificación en relación con los cambios en las fracciones proteicas (Nightingale et al., 1999; Wang et al., 2005). En el presente trabajo, se observaron diferencias estadísticas para los tratamientos con *Fusarium*, disminuyendo las fracciones de gluteninas tales como HMW (52,22% en promedio) y LMW (69,22%). Además, se registró una reducción en las fracciones de gliadinas, más específicamente para las ω -gliadinas (34,06%) y para las α,β,γ -gliadinas (19,75%). Así, la relación GLI/GLU se incrementó debido a una mayor degradación de las gluteninas (64,57%) con respecto a las gliadinas (23,69%). Las diversas especies de *Fusarium* producen diferentes enzimas hidrolíticas como las cutinasas, proteinasas, xilanasas y celulasas. Las proteasas forman parte del exoproteoma de *Fusarium*, siendo posible que la actividad de dichas enzimas sea responsable de los cambios observados en la relación gluteninas/gliadinas (Phalip et al., 2005). Al igual que los resultados observados a lo largo del presente trabajo, Eggert et al. (2011) encontraron en *Triticum dicoccum* que el contenido de gluteninas en muestras infectadas artificialmente con *Fusarium*, se redujo significativamente, principalmente sus fracciones proteicas HMW y LMW,

cambiando así la relación GLI/GLU a favor de las gliadinas. Además, encontraron una gran cantidad de gluteninas degradadas dentro de la fracción de gliadinas, después de la digestión y de la extracción. Estos resultados podrían explicar el aumento en la relación GLI/GLU después de la infección con *Fusarium*, resultados que sugieren que este fenómeno podría enmascarar la degradación de las gliadinas. Otras posibles explicaciones del incremento relativo en la fracción de gliadinas pueden ser: (i) la reducción de la síntesis de proteínas producida por la infección por *Fusarium*; (ii) la subsiguiente inhibición de la síntesis de proteínas por la acumulación de DON; (iii) la formación de gluteninas poliméricas durante las etapas posteriores de maduración (Wang et al., 2005). Con respecto a las demás fracciones proteicas, Eggert et al. (2011) observaron que la fracción ω -gliadinas también se redujo, aunque no significativamente, mientras que no observaron cambios para las α - β - γ -gliadinas.

En cuanto al potencial impacto en la calidad panadera, varios autores han reportado que la presencia de enzimas proteolíticas pueden afectar las fracciones de gluteninas y gliadinas. En primer lugar, se ha registrado una reducción significativa en la resistencia a la extensión (extensibilidad), junto con una relación inversa entre el volumen de pan y el nivel de contaminación de granos con *Fusarium* (FDK). Esto conlleva a una pérdida en la funcionalidad de la masa y una disminución en el volumen de pan, que se acentúa durante aquellos procesos de cocción que involucran largos períodos de fermentación (Nightingale et al., 1999). Respecto a los resultados obtenidos, es interesante destacar que existieron diferencias entre las fracciones proteicas que fueron degradadas por *F. graminearum* y *F. poae*, si bien estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Así, se observó que *F. graminearum* degradó en mayor proporción

las gluteninas, mientras que *F. poae* afectó mayormente las gliadinas. Estos resultados coinciden con estudios previos, tales como Brzozowski et al. (2008), que demostraron en trigo que tanto las enzimas proteolíticas (intra y extracelulares) sintetizadas por *F. poae* eran capaces de hidrolizar las gliadinas en una proporción mayor que otras especies como *F. graminearum*. También es de destacar que en el presente trabajo, cuando ambas especies de *Fusarium* se inocularon en conjunto, las gliadinas (ω -gli y α,β,γ -gli) y las gluteninas (HMW y LMW) se degradaron en mayor proporción, aunque no existieron diferencias significativas que sugieran la existencia de sinergismo con respecto a la degradación de las diferentes fracciones proteicas.

En cuanto a las micotoxinas, las mismas se encontraron en todos los tratamientos de *Fusarium* y genotipos evaluados. No se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos con *Fusarium*, por lo que no se observó sinergismo para dichas especies bajo estas condiciones de ensayo. Sin embargo, se registraron diferencias entre los genotipos evaluados para los años 2014 y 2015, mostrando diferentes patrones de contaminación con micotoxinas para cada genotipo. Estas diferencias podrían deberse a diferencias en la resistencia a la FE de cada genotipo de trigo evaluado (resistencia poligénica), constituidas principalmente por diferencias en la resistencia tipo IV (resistencia a la infección con *Fusarium*) y/o tipo V (resistencia a la acumulación de tricotecenos) (Mesterházy, 2002; Gunupuru et al., 2017). A su vez, dentro de este último tipo de resistencia a la contaminación con tricotecenos, existen dos clases de mecanismos que explican dichas diferencias entre los diferentes genotipos: (i) aquellos que emplean mecanismos que favorecen la transformación química (ej. glicolización), degradación y detoxificación de los tricotecenos en la planta; (ii) aquellos

mecanismos que impiden la biosíntesis de los tricotecenos mediante compuestos antioxidantes presentes en la planta (ej. compuestos fenólicos) (Boutigny et al., 2008).

En términos generales, el tricoteceno más comúnmente encontrado en los granos de cereales es el DON, que a menudo es producido junto con cantidades relativamente pequeñas de derivados acetilados (Xu y Nicholson, 2009). Actualmente, existen evidencias que demuestran una correlación positiva ($>0,70$) entre la presencia de *F. graminearum* y/o las variables de patogenicidad con respecto a la concentración de DON (Agostinelli, 2009; Martínez et al., 2014). En el presente trabajo, se observaron concentraciones moderadas de DON (entre 0,84 $\mu\text{g/g}$ y 12,01 $\mu\text{g/g}$) las cuales dependieron principalmente del genotipo de trigo evaluado. Al igual que los resultados reportados previamente en cebada, dichas concentraciones superaron los límites máximos establecidos para granos no procesados (1,25 $\mu\text{g/g}$) por la Comisión Europea (EC, 2006). Similarmente, Shin et al. (2018) encontraron en cinco genotipos de trigo y utilizando diferentes aislamientos de *Fusarium*, concentraciones de DON que variaron desde 0,4 $\mu\text{g/g}$ a 21 $\mu\text{g/g}$, aunque se correspondieron con mayores valores de severidad (entre 8,0 a 65,8%) que los encontrados en el presente trabajo. Estas diferencias indicarían que no necesariamente valores bajos de patogenicidad (incidencia/severidad) implicarían menores riesgos de contaminación con micotoxinas en los granos, en este caso DON, siendo esta suposición extremadamente riesgosa desde el punto de vista de la inocuidad y seguridad alimentaria. Por ende, es necesario un monitoreo constante de la FE y de las concentraciones de DON, incluso en campañas en las cuáles no son favorables las condiciones ambientales para el desarrollo de síntomas visuales característicos de la enfermedad.

En cuanto a los derivados acetilados, en los últimos años varios autores han informado la producción simultánea de 3-ADON y 15-ADON en comparables cantidades, encontrando una tendencia creciente en la producción simultánea de ambos derivados acetilados de DON en muestras contaminadas con *F. graminearum* (Álvarez et al., 2009; Castañares et al., 2014; Fernández Pinto et al., 2008). En el presente trabajo se reportó una concentración mayor de 3-ADON a lo largo de los diferentes años evaluados, coincidiendo con los resultados obtenidos previamente en cebada, a pesar de que los aislamientos de *F. graminearum* utilizados fueron productores de DON, 3-ADON y 15-ADON. Una posible explicación para la mayor producción 3-ADON observada, se basa en que la biosíntesis del metabolito secundario podría verse afectada principalmente por la temperatura y otras condiciones ambientales (Sugiura et al., 1990). Recientemente, Ramírez Albuquerque et al. (2019) encontraron bajo condiciones *in vitro*, que la temperatura cumple un rol clave en la producción de micotoxinas, siendo la producción de 3-ADON máxima a 25-30°C, mientras que la producción de 15-ADON es máxima a 10°C. Además, estos resultados también podrían depender de la interacción entre los diferentes aislamientos de *Fusarium* utilizados en la mezcla, junto con el quimiotipo de cada uno de ellos (Von der Ohe y Miedaner, 2010).

Respecto a NIV, en varios estudios previos fue la micotoxina más frecuente, radicando su importancia en su mayor toxicidad que el DON y sus derivados acetilados (Wan et al., 2013). En el presente trabajo, se reportaron valores bajos de NIV ($0,19 \pm 0,05 \mu\text{g/g}$) durante 2014 para el tratamiento con *F. poae*. Contrariamente, Stenglein et al. (2014) encontraron niveles más altos de NIV en genotipos de trigo inoculados en condiciones de campo (entre 0,30 y

16,10 $\mu\text{g/g}$). Estas diferencias en la concentración de NIV pueden deberse a diferencias en los aislamientos de *Fusarium* utilizados, diferencias en los genotipos utilizados y/o diferencias en las condiciones ambientales durante la etapa de floración. Además, recientemente Nazari et al. (2018) evidenciaron que la temperatura óptima para la producción de NIV de *F. poae* es de 27,5°C, mientras que en el presente trabajo la temperatura promedio estuvo por debajo de estos valores (18,22°C, 17,65°C and 17,62°C, respectivamente en 2014, 2015 y 2016).

CAPÍTULO V

Efecto del aumento
de la temperatura nocturna
y su impacto
sobre la interacción
Fusarium-cebada/trigo

5.1. Introducción.

Numerosos estudios proyectan que las condiciones ambientales en el futuro cambiarán y la temperatura será una de las variables más afectadas por este cambio (Alexander et al., 2006; Ingram, 1999; IPCC, 2007). Los antecedentes en la Argentina muestran que en el período comprendido entre 1960-2010, se registraron cambios significativos en diversas variables como la temperatura media anual, que registró un aumento de 0,4°C a 1°C, junto con variaciones en la frecuencia de eventos extremos, tales como el aumento de noches cálidas y la disminución del número de heladas (Alexander et al., 2006). En cuanto a las precipitaciones, las mismas aumentaron en gran parte del país, observándose un cambio hacia precipitaciones más intensas y reiteradas (CIMA, 2015). Además, se registraron ingresos más frecuentes de vientos provenientes del sector norte, provocando en el centro del país, un mayor aporte de humedad y calor desde latitudes tropicales (CIMA, 2015). Teniendo en cuenta dichos antecedentes y según diversos modelos climáticos predictivos, se proyecta para fines de siglo que la temperatura media global aumente de 1,1 a 6,4°C (Magrin et al., 2009). Por otra parte, para la región pampeana se estima un aumento de la temperatura media de entre 0,5°C a 1°C para el período 2015-2040 y de hasta 1,5 a 3,5°C para el período 2075-2099 (CIMA, 2015; IPCC, 2007).

Actualmente, el impacto del cambio climático sobre la producción agrícola es incierto, así como también se desconoce cómo variarán las enfermedades de los cultivos. Cabe resaltar que cada patosistema es diferente y dependiente de muchos factores, tales como la región geográfica, las condiciones climáticas y las especies de plantas y/o patógenos. De esta manera, cualquier generalización acerca de los efectos del cambio climático sobre los cultivos y/o patógenos es compleja de

realizar. Cambios en la temperatura, concentración de CO₂, precipitaciones y humedad, pueden extender la cantidad de tiempo disponible para la reproducción y diseminación del patógeno e impactar negativamente en el estado sanitario del cultivo (Berneiter, 2016; Medina et al., 2015, 2016). Con respecto a la temperatura, es de suponer que la misma será más cercana al óptimo para algunos agentes etiológicos causantes de enfermedades, como *Fusarium*. A nivel mundial, el análisis de los datos climatológicos de los últimos 100 años, indica que los aumentos de temperatura se darían durante el día (aumento de temperaturas extremas) y durante la noche (aumento de la temperatura mínima) (Alexander et al., 2006). Como consecuencia, esto no traería solamente aparejados problemas de variación en los rendimientos, sino un posible aumento en el riesgo de presencia de micotoxinas (Madgwick et al., 2011; Miraglia et al., 2009; Russell y Nelson, 2010). Sin embargo, no se sabe cómo afectarán estas variaciones la diversidad y la composición de las comunidades fúngicas, junto con el potencial impacto de cada especie en particular sobre los parámetros de rendimiento y calidad de los cultivos (Russell y Nelson., 2010; West et al. 2012).

Cabe resaltar que el “triángulo de las enfermedades” (Fig. 7) reconoce el rol que posee el ambiente en el desarrollo de las enfermedades fúngicas, considerando que las condiciones climáticas pueden influenciar directamente sobre la duración de los estadios del hospedante, así como el ciclo de vida del patógeno y el desarrollo posterior de la enfermedad (Agrios, 1999; Chakraborty et al., 2000). El estudio de estas interacciones planta-patógeno, las cuales se encuentran estrechamente relacionadas con las condiciones climáticas, han servido en las últimas décadas para su uso en modelos de predicción y manejo de epifitias. De esta manera, una de las hipótesis vigentes en la actualidad, sostiene

que el calentamiento global favorecerá el desarrollo de las enfermedades fúngicas necrotróficas, por sobre las enfermedades biotróficas (Sabburg et al., 2015). El incremento de las temperaturas a nivel mundial acortaría las etapas de desarrollo de los cultivos, reduciendo así el período de infección de los patógenos biotróficos (Ghini et al., 2008). Contrariamente, muchos patógenos necrotróficos serían beneficiados por este incremento, disponiendo de mejores condiciones para completar su ciclo de vida, aumentando su tasa de infección (Siebold y von Tiedemann, 2012).

Con respecto a la FE y su potencial impacto sobre la inocuidad alimentaria, en los últimos años se incrementó la necesidad de elaborar alimentos que cumplan estándares internacionales de calidad e inocuidad. Por ejemplo, durante la campaña agrícola 2012-2013, las condiciones ambientales fueron predisponentes para la infección con *Fusarium* en gran parte de la Argentina, registrándose epifitias moderadas en ciertas zonas de la región centro de la provincia de Buenos Aires (Martínez et al., 2014). Bajo escenarios futuros de cambio climático, variaciones en las condiciones climáticas en la región pampeana podrían afectar la diversidad de especies de *Fusarium* y el perfil de producción de micotoxinas, principalmente en cereales de invierno como la cebada y el trigo, coincidiendo dichas variaciones climatológicas con el período de susceptibilidad de los cultivos (antes). Diversos modelos estiman que, hacia fines de siglo, la incidencia de la FE se incrementaría hasta un 10% en el sur de la región pampeana y disminuiría en el norte de la misma hasta un 20% (Fig. 37) (CEPAL, 2014).

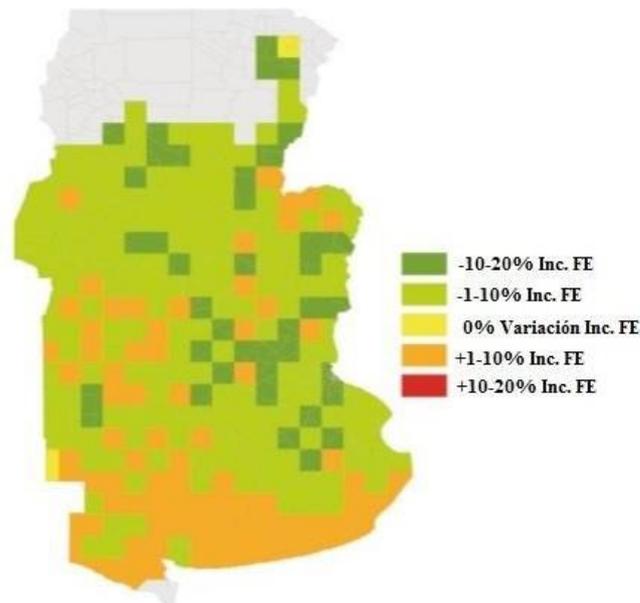


Figura 37. Mapa de predicción de FE para la región pampeana proyectadas para fines de siglo (Fuente: CEPAL, 2014).

Si bien es sabido que el incremento de las temperaturas nocturnas y el aumento del número de eventos de estrés térmico pueden afectar considerablemente diversos parámetros de rendimiento y calidad (García et al., 2015, 2016, Savin y Nicolas, 1996; Stones et al., 1994, 1996) se desconoce cómo podrían interactuar dichos estreses en presencia de *F. graminearum* y/o *F. poae*. Por todo lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del aumento de la temperatura nocturna, ocasionada por el cambio climático sobre la interacción planta-patógeno (cebada/trigo-*Fusarium*) y su potencial impacto en los parámetros de la enfermedad, la calidad del grano y la contaminación con micotoxinas.

5.2. Materiales y métodos.

5.2.1. Genotipos utilizados.

Para el desarrollo del presente ensayo se evaluaron dos genotipos susceptibles a *Fusarium*: para trigo pan se evaluó Apogee (Utah State University, E.E.U.U.), mientras que para cebada se evaluó Stander (Minnesota Agricultural Experiment Station, E.E.U.U.) (Fig. 38). Los genotipos fueron seleccionados también en base a sus similares ciclos vegetativos, (ciclos intermedios-cortos), sincronizando la floración (mediados a fines de octubre para cebada, principios de noviembre para trigo). Otra de las características deseables, fue la escasa altura de planta (de 30 a 50 cm para Apogee y \leq a 100 cm para Stander), característica que posibilitó el desarrollo de los ensayos con carpas de calentamiento.



Figura 38. Espigas de Apogee (A) y Stander (B) con síntomas característicos de FE.

5.2.2. Conducción del ensayo y diseño experimental.

Las características del sitio experimental, junto con el manejo agronómico del cultivo fueron descritas anteriormente en la sección 2.1. Los ensayos fueron conducidos bajo condiciones ambientales naturales, en ambiente cerrado sin aumento de temperatura (CC), en ambiente cerrado con aumento de temperatura (CT), sumado a un tratamiento testigo (T), acorde a los descrito previamente en 2.2.2 (Fig. 39).



Figura 39. A) Armado de las estructuras de las carpas de madera, con listones de *Eucalipto saligna* de 2 x 2 plg y 2 x 1 plg (1,5 m ancho x 3 m de largo x 1,5m alto). B) Conexión de los equipos aditivos con los respectivos caloventores y los sensores de temperatura. C) Disposición del tratamiento “Carpa + Temperatura” sobre el cultivo. D) Colocación de la cubierta de polietileno transparente (200 μ m de espesor) y finalización del armado de las carpas.

El diseño del ensayo para cada cereal evaluado (cebada y trigo) consistió en 3 bloques, cada uno de los cuales incluyó a los 3 tratamientos descriptos previamente (T, CC y CT). Cada bloque se dividió en 3 parcelas de 3 m x 1,5 m, y luego cada una de estas parcelas se subdividió en 3 subparcelas, a las que se les asignó al azar la aplicación de: (i) *F. graminearum*; (ii) *F. poae*; (iii) Tratamiento control (ADE+Tween 20 al 0,05%) (Fig. 40).

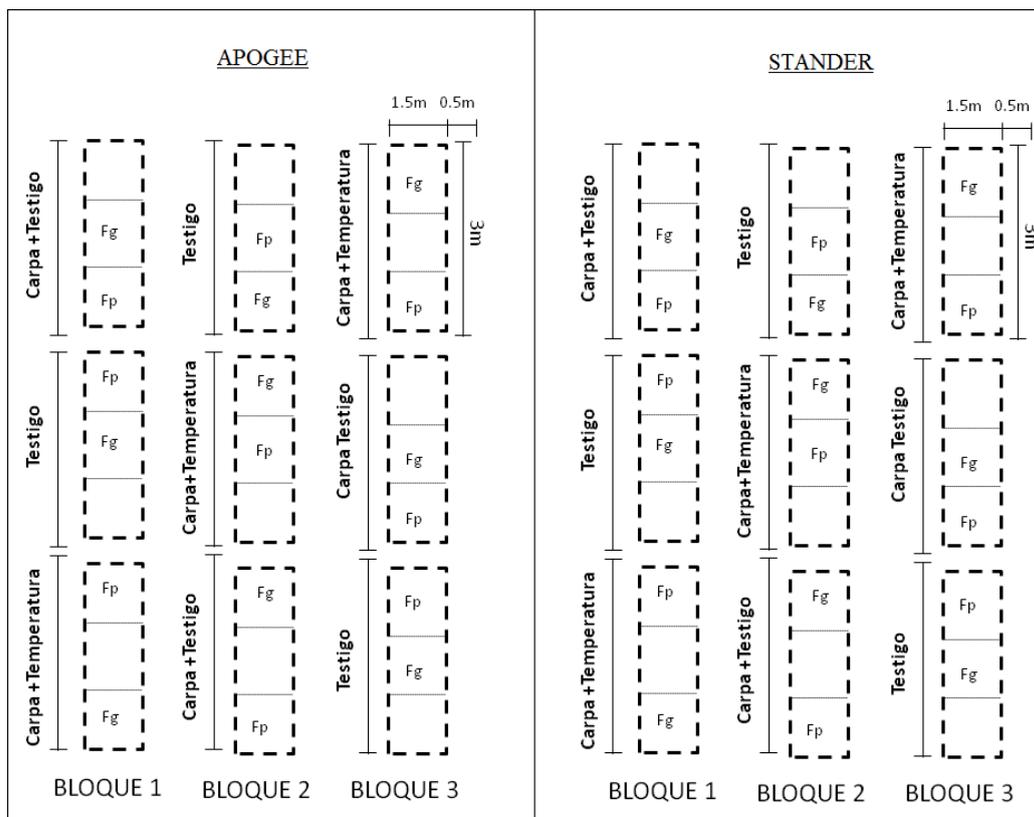


Figura 40. Diseño experimental de los ensayos de calentamiento nocturno para trigo (izquierda) y cebada (derecha) durante los años 2016, 2017 y 2018. Fg: tratamiento con *F. graminearum*. Fp: tratamiento con *F. poae*. Celdas vacías: tratamiento control.

En trigo la inoculación se realizó cuando el 50% de las espigas alcanzaron el estadio de Z.60 (antes de la anthesis) (Vogelsang et al., 2008). Por otra parte, en cebada se realizó cuando el 50% de las espigas se encontraron en el estadio de aparición de aristas (Buerstmayr et al., 2004), inoculando en más de una ocasión de acuerdo a la heterogeneidad del cultivo. Luego de la inoculación, las carpas se colocaron durante el período de 21 días en los tratamientos CC y CT, siempre en el mismo horario, colocándolas sobre el cultivo correspondiente al inicio del atardecer (19.00 p.m.) y retirándolas luego de la salida del sol (7.00 a.m.).

5.2.3. Medición de variables.

Tanto en cebada como en trigo, la evaluación de los síntomas en las espigas se realizó a los 21 dpi, retirando así las carpas y finalizando los tratamientos de calentamiento (Fig. 41A). El total de espigas evaluadas fue de 40 espigas por subparcela, las cuáles fueron seleccionadas al azar según Campbell et al. (1998). En base a ello, se calcularon las siguientes variables: (i) incidencia (número de espigas afectadas por subparcela), (ii) severidad (número de espiguillas con síntomas por espiga); (iii) FHB Índice (incidencia x severidad/100); (iv) FDK (número de granos afectados con síntomas típicos de FE); (v) ISK ($0,3 \text{ incidencia} + 0,3 \text{ severidad} + 0,4 \text{ FDK}$); (vi) DISK ($0,2 \text{ incidencia} + 0,2 \text{ severidad} + 0,3 \text{ FDK} + 0,3 \text{ DON}$). Finalmente, luego de madurez fisiológica, cada subparcela se recolectó, trilló (trilladora estacionaria Forti ©) y se limpió manualmente (Fig. 41B).

A continuación se registró el rendimiento en grano (RG) por subparcela evaluando la cantidad de granos (g) por metro cuadrado recolectados, junto al peso de mil granos (PMG) (Fig. 41E). La concentración de proteínas (CP) junto con el porcentaje de gluten húmedo (GH%) fueron analizados con un analizador NIT con monocromador de doble haz (Agricheck®, Bruins Instruments). Además, la prueba de micro-sedimentación con dodecil sulfato (SDSS) de sodio se utilizó para predecir y estimar la fuerza panadera. En cuanto a los parámetros de germinación, la energía germinativa (EG) y el poder germinativo (PG) de los granos obtenidos se evaluaron de acuerdo a los protocolos de la *International Seed Testing Association* (ISTA). Para el caso del trigo, se colocaron 100 granos por bandeja, con cuatro repeticiones, y con papel absorbente solo por debajo de las simientes. Luego, se agregó ADE hasta saturar el papel y se realizaron los recuentos al cuarto día (energía germinativa) y al octavo día (poder germinativo) (ISTA, 2017). De la misma manera se realizó para cebada, con la excepción de que se agregó un papel absorbente por encima de los granos realizando las mediciones al día cuarto (energía germinativa) y al séptimo día (poder germinativo), de acuerdo a la norma vigente (Figs. 41C, 41D).

Además, en cebada se realizó la determinación de: (i) calibre del grano (Cal), fracción compuesta por aquellos granos por encima de zaranda de 2,5 mm; (ii) porcentaje de granos bajo zaranda de 2,2 mm (BZ). Para ello, se procedió según la norma de comercialización vigente (Anexo I), colocando para cada muestra 100 g de granos de cebada, sobre el juego de 4 zarandas características para este grano (con alveolos de 2,7 mm, 2,5 mm, 2,2 mm y bajo zaranda, respectivamente). Luego de 5 min de agitación, se determinaron las diferentes fracciones mencionadas previamente. Las mediciones se realizaron por duplicado,

para luego calcular los resultados finales promedios para cada muestra (en porcentaje).

Con respecto al análisis de las diferentes fracciones proteicas, se extrajeron las diversas fracciones proteicas (gluteninas en trigo y hordeinas en cebada) mediante los métodos de extracción secuencial descritos previamente 3.2.3. y 4.2.3. (Gupta y Mc Ritchie, 1991; Salgado Albarrán et al., 2015). Cabe resaltar que la evaluación de las fracciones de proteínas se realizó únicamente durante 2018, año con mayor cantidad de granos sintomáticos. Luego las proteínas extraídas fueron separadas mediante SDS-PAGE (T=13,5%), tiñendo los correspondientes geles con 0,05% de *Coomassie Brilliant Blue* R250, durante 24 h, luego colocando en TCA (12%) durante 48 h y finalmente lavando en ADE durante 24 h (Fig. 41F). Para la cuantificación de las diversas fracciones extraídas, se utilizó el software TotalLab (v1.10) con el fin de medir la intensidad del pixel como indicador de la abundancia relativa, aplicando la sustracción de fondo (“background”) para evitar la variabilidad debida al proceso de tinción. Se evaluaron: (i) en trigo: los contenidos de GLI, GLU, HMW, LMW, ω -gliadinas y α - β - γ -gliadinas y sus respectivas relaciones (GLI/GLU, HMW/LMW y ω -gliadinas/ α - β - γ -gliadinas); (ii) en cebada: el contenido de B, C, D-hordeinas y el contenido total de hordeinas.



Figura 41. A) Evaluación de síntomas en trigo a los 21 dpi. B) Muestras de cebada trilladas luego de madurez de fisiológica. C-D) Energía y poder germinativo en granos de trigo. Se observan granos con síntomas de FE y crecimiento micelial (rosa). E) Determinación de peso de mil granos. F) Geles de poliacrilamida (SDS-PAGE, T=13,5%) en electroforesis vertical.

En relación al análisis de micotoxinas, el mismo fue llevado a cabo en el Instituto de Tecnología de los Alimentos (ITA) perteneciente al INTA Castelar (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) a cargo del Dr. Cristos. Para el análisis, se tomaron 250 g de cada muestra y se molieron en un molinillo experimental (Arcano Fw-100®). A continuación, se añadió un volumen de 20 mL de solvente de extracción ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$; 79:20:1) a 10 g de las harinas de cebada/trigo obtenidas previamente. Las muestras se homogeneizaron con un agitador de alto rendimiento (Ultra-Turrax®) durante 3 min, se sonicaron durante 60 min y finalmente se centrifugaron durante 5 min a 3.000 rpm. Luego, se transfirió un volumen de 10 mL de extracto y se evaporó a 45°C bajo una corriente de N_2 . Las muestras se re-suspendieron en metanol/agua (70:30) y se filtraron a través de un filtro de nylon (0,22 mm) previo al análisis. La identificación y cuantificación de las micotoxinas (DON, 3-ADON, 15-ADON y NIV) se realizó de acuerdo a Arroyo-Manzanares et al. (2015) mediante cromatografía líquida de alto rendimiento junto con espectrometría de masas en tándem (HPLC MS/MS). Para las toxinas analizadas, el límite de detección (LOD) fue de 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ mientras que el límite de cuantificación (LOQ) fue de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Dichos análisis se realizaron en un sistema Thermo Scientific™ que consta de un desgasificador, una bomba cuaternaria, un horno de columna y un espectrómetro de masas con trampa de iones LTQ-XL™. Las separaciones cromatográficas se realizaron con una columna C18 de 100 x 2,1 mm Hypersil™ ODS (tamaño de partícula de 5 mm). Como fase móvil se usó una solución de formiato de amonio en acetonitrilo (10 mM). Las muestras (10 mL) se analizaron a una velocidad de flujo de 0,2 mL/min a 45°C. Las micotoxinas fueron cuantificadas utilizando estándares externos, incluyendo como control de calidad

del proceso de extracción, una muestra adicional cada 10 muestras evaluadas, la cual contenía una concentración conocida de micotoxinas.

5.2.4. Análisis estadístico.

Las dos especies evaluadas (cebada y trigo) fueron analizadas por separado. Para cada cereal, el diseño estadístico fue de parcelas divididas en tres bloques repetidos, durante tres años. En las parcelas principales, se aleatorizaron los niveles del factor temperatura (T, CC y CT). Dentro de cada parcela, en cada bloque, se asignó aleatoriamente a cada subparcela un nivel del factor *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. poae* o control). El análisis de las variables evaluadas fue realizado utilizando el software R (v.3.3.3, Rcore Team 2018), mediante modelos lineales mixtos, los cuáles posibilitaron el anidamiento de las parcelas de cebada o trigo (factor temperatura) dentro de los bloques, y a su vez, de las subparcelas (factor *Fusarium*) dentro de las parcelas. Para analizar las variables con distribución normal del error, tales como FHB índice (FHBi), FDK, ISK, DISK, concentración de proteína (CP), test de sedimentación (SDSS), peso de mil granos (PMG), rendimiento en grano/m² (RG), gluten húmedo (GH%), las fracciones de proteínas (gliadinas, gluteninas y hordeínas) y las concentraciones de micotoxinas (DON, 3-ADON, 15-ADON y NIV) se utilizó la función lmer (paquete lme4; Bates et al., 2015). En todos los casos, se verificaron gráficamente los supuestos utilizando los valores ajustados frente a los residuos para corroborar la homogeneidad de varianzas. Para la verificación de la normalidad de los residuos, se utilizaron gráficos Q-Q plot, junto con el test de Shapiro-Wilk .

Para analizar las variables con distribución binomial tales como incidencia (Inc), severidad (Sev), energía germinativa (EG), poder germinativo (PG), calibre (Cal) y porcentaje de granos bajo zaranda de 2,2 mm (BZ), se utilizó la función `glmer` (paquete `lme4`; Bates et al., 2015) para construir modelos mixtos lineales generalizados, considerando las restricciones en la aleatorización y los errores no normales. Para todas las variables analizadas, las diferencias significativas se evaluaron con la función `lsmeans` (paquete `emmeans`; Lenth, 2019) con un nivel de significancia $\alpha = 0,05$. Los resultados se informaron como la media \pm error estándar de la media (SEM).

5.3. Resultados.

5.3.1. Condiciones climáticas.

Las condiciones climáticas durante el período de floración de cada cultivo, para los tres años evaluados (2016, 2017 y 2018) fueron similares en lo que respecta a temperatura nocturna, humedad relativa y precipitaciones totales. En cuanto a las temperaturas nocturnas, las mismas fueron registradas a la altura de la espiga como se describió previamente, observándose valores promedios entre 5 a 20°C. Sin embargo, se registraron valores mínimos de 3,20°C y valores máximos de 26,50°C (Fig. 42). Con respecto a las precipitaciones totales para el período de floración de la cebada, los años 2016 y 2018 fueron similares en términos de precipitación acumulada total durante ese período (42,70 y 44,80 mm, respectivamente), mientras que durante 2017 se registraron 94,20 mm. Por otra parte, para trigo se registraron valores similares para 2017 y 2018 (39,90 y 38,60 mm), mientras que durante 2016 solo se registraron 14,60 mm (Fig. 42).

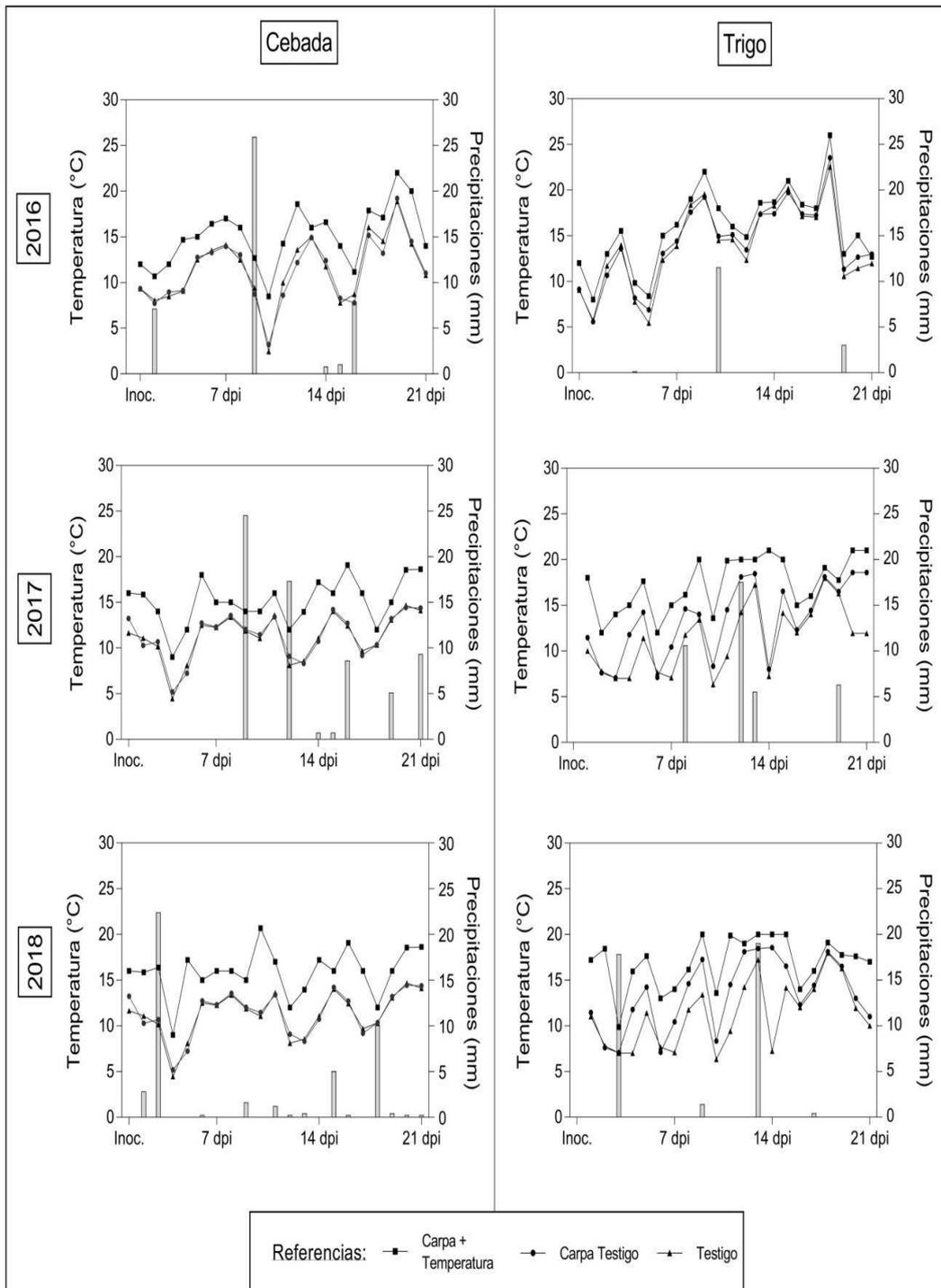


Figura 42. Valores promedio de temperatura nocturna (°C) y precipitaciones totales (mm), para los diferentes tratamientos evaluados tanto en trigo como en cebada. Los datos mostrados corresponden al período comprendido desde la inoculación (Inoc.) hasta 21 dpi, durante los años 2016, 2017 y 2018.

Con respecto a las condiciones de la humedad relativa (HR%), durante los 21 días que permanecieron los tratamientos sobre el cultivo (únicamente durante la noche) se observó el mismo patrón de aumento de HR%, desde el inicio del tratamiento (19.00 p.m.) hasta el amanecer, momento en el que se retiraron las carpas (7.00 a.m.). En los tres tratamientos (CT, CC y T) se observaron valores promedios de humedad relativa mayores al 80% durante las horas nocturnas. Con respecto a la temperatura, tanto en cebada como en trigo, los valores de incremento de temperatura rondaron los 3°C (fluctuando entre 2,5 a 4,0°C) en promedio durante los tres años evaluados, acorde a lo seteado en los equipos aditivos.

Debido a que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las variables evaluadas entre T y CC, se considera que no existe un efecto de la "carpa" que influya sobre los resultados obtenidos. Por ende, desde aquí en adelante, aunque los análisis consideran el diseño original con tres niveles, en los resultados se hará referencia solo a la comparación entre los niveles T (testigo) y CT (carpa + temperatura).

5.3.2. Parámetros de la enfermedad.

Los análisis de la varianza indicaron diferencias significativas para las variables de patogenicidad evaluadas tales como incidencia, severidad, FDK, ISK y DISK. En cebada, los valores máximos de granos sintomáticos observados (FDK) fueron de hasta el 6%. En cuanto a la incidencia de la FE, se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de *Fusarium* ($p=0,0013$; $N=81$), mostrando el tratamiento con *F. graminearum* los valores más altos de incidencia ($39 \pm 4\%$), seguido por *F. poae* ($30 \pm 4\%$) y el tratamiento testigo ($18 \pm 3\%$). Además, se registraron diferencias significativas para los tratamientos con carpas ($p=0,0004$; $N=81$), observándose los mayores valores en CT ($41 \pm 4\%$), seguido por T ($21 \pm 4\%$). En cuanto a las diferencias entre años ($p<0,0001$; $N=81$), durante 2016 se observó la mayor incidencia ($48 \pm 3\%$), seguido por el año 2017 ($22 \pm 3\%$) y 2018 ($17 \pm 3\%$). Respecto de la severidad, se registraron diferencias significativas para la interacción tratamiento x año ($p<0,0001$; $N=810$), mostrando los mayores valores de severidad para el año 2016 y en CT ($4 \pm 1\%$), mientras que los menores valores se registraron durante 2018 para T ($0,33 \pm 0,17\%$).

De la misma manera, se registraron diferencias significativas para FHB index ($p<0,0001$; $N=81$), mostrando interacción entre los tratamientos de *Fusarium* spp. x tratamiento con carpas, observando que *F. graminearum* mostró mayores valores (3%) cuando se incrementó 3°C la temperatura nocturna, mientras que bajo condiciones naturales el FHB index fue menor (1%) (Fig. 43A). En cuanto al ISK, existió interacción entre *Fusarium* spp. x tratamiento x año ($p=0,0271$; $N=81$), mostrando los mayores valores durante 2016, 2017 y 2018 para los tratamientos con *F. graminearum* y CT ($23 \pm 2\%$, $17 \pm 2\%$ y $18 \pm 1\%$,

respectivamente), mientras que los menores valores correspondieron a los tratamientos control en T durante los tres años ($11 \pm 2\%$, $1 \pm 1\%$ y $4 \pm 1\%$, respectivamente) (Fig. 43C). Por último, en cuanto a la variable DISK, solo se registraron diferencias significativas entre años ($p < 0,0001$; $N=81$), mostrando los mayores valores durante 2018 (9,97%), seguido por 2017 (3,37%) y 2016 (2,48%).

En trigo, los valores máximos de granos sintomáticos observados (FDK) fueron de hasta el 10%. Se observaron diferencias significativas para incidencia respecto de los diferentes tratamientos de *Fusarium* spp. ($p=0,0009$, $N=81$), mostrando mayores valores de incidencia en el tratamiento con *F. graminearum* ($34 \pm 4\%$), seguido de *F. poae* ($24 \pm 3\%$) y el tratamiento control ($14 \pm 3\%$). Además, se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos con carpas ($p < 0,0001$; $N=81$), observando los mayores valores en CT ($37 \pm 4\%$), seguido de T ($16 \pm 3\%$). En cuanto a las diferencias significativas entre años ($p < 0,0001$; $N=81$), se observaron los mayores valores de incidencia durante 2018 ($40 \pm 3\%$), seguido de 2016 ($20 \pm 3\%$) y 2017 ($13 \pm 3\%$). Además, se registraron diferencias significativas para la variable severidad con respecto al tratamiento con *Fusarium* spp. ($p < 0,0001$; $N=81$), observando los mayores valores de severidad para *F. graminearum* ($11 \pm 1\%$), seguido de *F. poae* ($6 \pm 1\%$) y el tratamiento control ($3 \pm 1\%$). Respecto a la interacción tratamiento con carpas x año, la misma fue significativa ($p=0,0009$; $N=81$) mostrando que en CT durante los tres años (2016, 2017, 2018) los valores de severidad fueron mayores ($0,11 \pm 3\%$; $0,11 \pm 3\%$; $0,12 \pm 3\%$, respectivamente). Respecto a FHB index, existieron diferencias significativas ($p=0,0110$; $N=81$) para la interacción *Fusarium* spp. x tratamiento con carpas x año, mostrando que los mayores valores se encontraron

durante los tres años (2016, 2017 y 2018) para CT y *F. graminearum* ($6 \pm 4\%$, $10 \pm 4\%$ y $19 \pm 4\%$, respectivamente) seguido por *F. poae* ($2 \pm 0,3\%$, $4 \pm 2\%$ y $5 \pm 1\%$, respectivamente) (Fig. 43B).

En cuanto a ISK, existieron diferencias significativas ($p < 0,0001$; $N=81$) en cuanto a la interacción entre tratamientos con carpas x *Fusarium* spp., mostrando el mayor valor de ISK cuando *F. graminearum* ($23 \pm 3\%$) fue inoculado bajo condiciones de aumento de temperatura nocturna, mientras que cuando se inoculó bajo condiciones naturales los valores fueron menores ($8 \pm 1\%$) (Fig. 43D). Finalmente, con respecto a los valores de DISK, se registraron diferencias significativas entre años ($p < 0,0001$; $N=81$) y tratamientos ($p=0,1544$; $N=81$). En el primer caso, se observaron los mayores valores durante 2018 ($6,77 \pm 0,64\%$), seguido de 2017 ($2,14 \pm 0,59\%$) y 2016 ($0,08 \pm 0,03\%$). En el segundo caso, los mayores valores se observaron para CT ($4,04 \pm 0,86\%$), seguido de T ($2,28 \pm 0,63\%$).

Cabe resaltar, que en términos generales las condiciones climáticas fueron más propicias para el desarrollo de la enfermedad durante 2016 en cebada, mientras que en trigo los mayores valores de patogenicidad se observaron durante 2018 (Fig. 43).

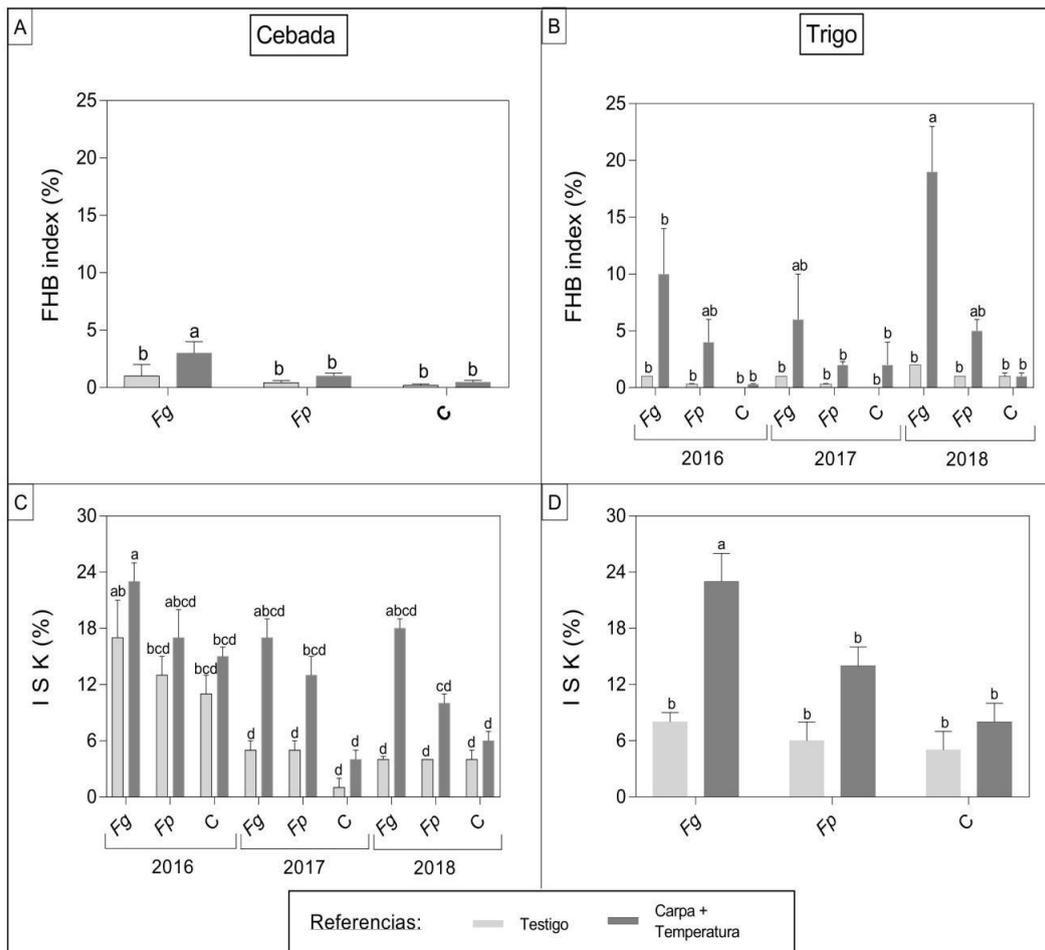


Figura 43. Valores de FHB index e ISK para cada tratamiento de *Fusarium* spp. y su respectiva interacción (tratamiento carpas y año), en cebada (izquierda) y trigo (derecha). Las columnas con letras diferentes son estadísticamente diferentes según el test de Tukey ($p < 0,05$). A y D) Interacción entre tratamientos de *Fusarium* spp. x tratamientos con carpas. B y C) Interacción entre tratamientos de *Fusarium* spp. x tratamientos con carpas x año.

5.3.3. Parámetros de rendimiento, proteína y germinación.

En cebada, no se observaron diferencias para las variables de germinación (EG y PG), mientras que para las variables de rendimiento (PMG y RG) si se registraron diferencias significativas (Tabla 14). En primer lugar, para PMG se registró interacción *Fusarium* spp. x tratamiento con carpas x año ($p = 0,0010$; $N = 81$), observando una reducción del peso de mil granos en CT para 2017 y 2018. Durante 2017, estas disminuciones ocurrieron más específicamente para el

tratamiento con *F. graminearum*, con una reducción del 5,57% del PMG (de 37,70 g a 35,60 g en promedio) y para *F. poae* (0,35%), en ambos casos en comparación con el tratamiento control. De la misma manera, durante 2018 la reducción del PMG fue de 4,56% para *F. graminearum* (de 36,60 g a 34,93 g), mientras que para *F. poae* fue de 5,19% (de 36,60 g a 34,70 g). Con respecto al RG, solo existieron diferencias significativas ($p=0,0010$; $N=81$) entre años.

Por otra parte, para variables tales como CP, Cal y BZ, se registraron diferencias significativas para la interacción *Fusarium* spp. x año ($p=0,0010$; $N=81$). De esta manera, para CP se observó durante 2017 una reducción del contenido de proteína del 3,50% en CT en comparación con T (de 13,44% a 12,97%), mientras que durante 2018 la reducción fue de 6,22% (de 12,22% a 11,46%). En cuanto a Cal y BZ, se observó solo durante 2017 para el tratamiento CT una reducción del calibre del grano ($> 2,5$ mm) del 5% en comparación a T (de 83% a 78%), mientras que la fracción de granos bajo zaranda de 2,2 mm (BZ) se incrementó en 1% (de 5 a 6%). Por otra parte, durante 2016 y 2018 no se observaron cambios en Cal y BZ.

En trigo se observaron diferencias significativas para todas las variables analizadas (EG, PG, PMG, RG, CP y GH%) solo entre los diferentes años analizados, con la excepción de RG. En esta última variable se observó interacción de los tratamientos con carpas x año, mostrando la mayor reducción en CT para el año 2018, reduciéndose en un 20,62% en comparación con T (de 258,33 g/m² a 205,11 g/m²). En cambio, durante los años 2016 y 2017 no se registraron cambios en el rendimiento en grano.

Tabla 14. Análisis de varianza para las diferentes variables analizadas. EG: energía germinativa; PG: poder germinativo; PMG: peso de mil granos; RG: rendimiento de grano; CP: concentración de proteínas; Cal: calibre de granos (>2,5 mm); BZ: granos bajo zaranda de 2,2 mm; GH%: gluten húmedo; SDSS: prueba de sedimentación; g.l.: grados de libertad; Chisq: Test de Wald, tipo II.

Fuente	Cebada								
	g.l.	EG		PG		PMG		RG	
		Chisq	p-value	Chisq	p-value	Chisq	p-value	Chisq	p-value
<i>Fusarium</i> (F)	2	1,0978	0,5776	0,8114	0,6665	0,4907	0,7824	0,0423	0,9791
Temperatura (Tp)	2	0,0928	0,9546	0,0506	0,9750	94,7776	<0,0001	1,8522	0,3961
Año (A)	2	3,3696	0,1855	1,2238	0,5423	182,4208	<0,0001	36,5562	<0,0001
F x Tp	4	0,2167	0,9945	0,1134	0,9985	7,2570	0,1229	1,3850	0,8468
F x A	4	0,1526	0,9972	0,2259	0,9941	6,8345	0,1448	1,9454	0,7458
T p x A	4	0,4440	0,9787	0,4414	0,9790	310,7578	<0,0001	0,9356	0,9194
F x T p x A	8	0,4395	0,9999	0,1795	1,0000	25,9900	0,0010	6,1338	0,6323
Fuente	g.l.	CP		Cal		BZ			
		Chisq	p-value	Chisq	p-value	Chisq	p-value		
<i>Fusarium</i> (F)	2	3,5937	0,1658	0,4357	0,8042	0,3562	0,8368		
Temperatura (Tp)	2	1214,2796	<0,0001	985,4773	<0,0001	33,4701	<0,0001		
Año (A)	2	6271,3514	<0,0001	7591,1459	<0,0001	178,4182	<0,0001		
F x Tp	4	10,1925	0,0373	2,0379	0,7288	2,0252	0,7311		
F x A	4	4,4851	0,3443	4,8062	0,3078	3,4167	0,4907		
T p x A	4	2980,2810	<0,0001	2418,9983	<0,0001	27,6269	<0,0001		
F x T p x A	8	9,7463	0,2832	12,9247	0,1145	11,9395	0,1539		

Continuación Tabla 14

Trigo

Fuente	g.l.	EG		PG		PMG		RG	
		Chisq	p-value	Chisq	p-value	Chisq	p-value	Chisq	p-value
<i>Fusarium</i> (F)	2	0,8419	0,6564	0,1954	0,9069	2,8302	0,2429	0,6929	0,7072
Temperatura (Tp)	2	0,2821	0,8684	0,0653	0,9678	2,8432	0,2413	2,0696	0,3553
Año (A)	2	16,1390	0,0003	6,3453	0,0418	254,3497	<0,0001	305,0011	<0,0001
F x Tp	4	0,2355	0,9935	0,0260	0,9999	1,1641	0,8840	4,4835	0,3445
F x A	4	0,4289	0,9800	0,0255	0,9999	2,7325	0,6035	6,0336	0,1967
Tp x A	4	0,3412	0,9870	0,0665	0,9994	3,8234	0,4304	28,8569	<0,0001
F x Tp x A	8	0,3654	0,9999	0,1073	1,0000	6,4911	0,5924	7,0069	0,5359

Fuente	g.l.	CP		GH%		SDS	
		Chisq	p-value	Chisq	p-value	Chisq	p-value
<i>Fusarium</i> (F)	2	1,5360	0,4639	0,6454	0,7242	0,7302	0,6941
Temperatura (Tp)	2	3,8883	0,1431	2,4019	0,3009	1,9819	0,3712
Año (A)	2	37,1421	<0,0001	1385,1243	<0,0001	149,7103	<0,0001
F x Tp	4	4,1197	0,3901	1,7074	0,7894	3,8784	0,4227
F x A	4	2,1323	0,7114	2,7163	0,6064	3,4580	0,4843
Tp x A	4	2,9099	0,5730	4,7633	0,3125	3,8183	0,4311
F x Tp x A	8	3,1927	0,9217	4,8574	0,7727	7,6035	0,4731

5.3.4. Composición proteica.

Con respecto a la composición proteica, en lo que respecta a las diferentes fracciones de hordeinas (D, C y B hordeinas), gluteninas (HMW y LMW) y gliadinas (ω , α , β y γ -gli), los análisis de la varianza indicaron diferencias significativas para las diferentes fuentes de variación (Tabla 15). En primer lugar, con respecto a cebada no se encontraron diferencias significativas para los diferentes tratamientos de *Fusarium* spp. ni tampoco entre los tratamientos de aumento de temperatura nocturna (CT y T) (Fig. 44). En relación al trigo, se registraron diferencias significativas (Tabla 15) entre los diferentes tratamientos con *Fusarium* spp. (GLI, α, β, γ -gli y la relación $\omega/\alpha, \beta, \gamma$ -gli) y entre los diferentes tratamientos de calentamiento (GLU, GLI/GLU, LMW, HMW/LMW, ω -gli y α, β, γ -gli) (Figs. 45 y 46).

Para GLI ($p < 0,0001$; $N=81$) se observó una reducción de la abundancia relativa (intensidad de pixel) de 37,17% cuando *F. graminearum* se encontró presente, mientras que *F. poae* redujo la fracción GLI en un 36,93%. Con respecto a la fracción α, β, γ -gli ($p < 0,0001$; $N=81$), la misma se redujo un 21,51% cuando se inoculó con *F. graminearum*, mientras que cuando *F. poae* se encontró presente dicha fracción se redujo en 19,52%. Finalmente, en cuanto a la relación $\omega/\alpha, \beta, \gamma$ -gli ($p < 0,0001$; $N=81$) la misma se incrementó un 50% (de 0,04 a 0,06) cuando se inoculó con *F. graminearum*, mientras que cuando se inoculó con *F. poae* dicha relación se incrementó un 25% (de 0,04 a 0,05).

Respecto a las diferencias significativas reportadas entre los diferentes tratamientos con carpas (Tabla 15), para GLU ($p=0,0028$; $N=81$) se observó una disminución del 13,57% en CT en comparación a T, mientras que la relación

GLI/GLU ($p=0,0020$; $N=81$) disminuyó en un 14,63% (de 0,41 a 0,35). Además, se observó una reducción de la fracción LMW ($p=0,0002$; $N=81$) de 11,43% en CT comparado con T, mientras que la relación HMW/LMW ($p<0,0001$; $N=81$) se incrementó en un 14,55% (de 0,55 a 0,63). Finalmente, las diferencias observadas para las fracciones ω -gli y α,β,γ -gli ($p<0,0001$; $N=81$) fueron disminuciones en dichas fracciones de 13,62% y 10,49%, respectivamente.

Tabla 15. Análisis de la varianza para los diferentes parámetros de calidad de grano. GLI: gliadinas; GLU: gluteninas; HMW: gluteninas de alto peso molecular; LMW: gluteninas de bajo peso molecular; ω -GLI: ω -gliadinas; α, β, γ -GLI: α,β,γ -gliadinas; g.l.: grados de libertad; Chisq: Test de Wald-Chi cuadrado tipo II.

Fuente	Cebada						
	g.l.	D-Hordeinas		C-Hordeinas			
		Chisq	p-value	Chisq	p-value		
<i>Fusarium</i> (F)	2	1.1420	0.5650	1.7754	0.4116		
Temperatura (Tp)	4	2.1665	0.3385	1.0363	0.5956		
F x Tp	4	1.0663	0.8996	1.1321	0.8891		
Fuente	g.l.	B-Hordeinas		Total Hordeinas			
		Chisq	p-value	Chisq	p-value		
	<i>Fusarium</i> (F)	2	3.6731	0.1594	3.0716	0.2153	
Temperatura (Tp)	4	0.9185	0.6318	0.4708	0.7902		
F x Tp	4	4.1856	0.3815	2.1839	0.7020		
Fuente	g.l.	Trigo					
		GLI		GLU		GLI/GLU	
		Chisq	p-value	Chisq	p-value	Chisq	p-value
<i>Fusarium</i> (F)	2	85.5904	<0.0001	2.090	0.3516	2.2096	0.3313
Temperatura (Tp)	4	1.9795	0.3717	11.7519	0.0028	12.3498	0.0020
F x Tp	4	1.9937	0.7369	1.9112	0.7520	2.0445	0.7276
Fuente	g.l.	HMW		LMW		HMW/LMW	
		Chisq	p-value	Chisq	p-value	Chisq	p-value
		<i>Fusarium</i> (F)	2	23.9020	<0.0001	2.0869	0.3522
Temperatura (Tp)	4	64.5790	<0.0001	16.5087	0.0002	24.8151	<0.0001
F x Tp	4	32.7450	<0.0001	2.2158	0.6961	0.6093	0.9620
Fuente	g.l.	ω -GLI		α,β,γ -GLI		ω -GLI/ α,β,γ -GLI	
		Chisq	p-value	Chisq	p-value	Chisq	p-value
		<i>Fusarium</i> (F)	2	2.0169	0.3647	95.6940	<0.0001
Temperatura (Tp)	4	17.6595	<0.0001	22.5708	<0.0001	3.8621	0.1450
F x Tp	4	2.4751	0.6491	5.1643	0.2708	2.2069	0.6978

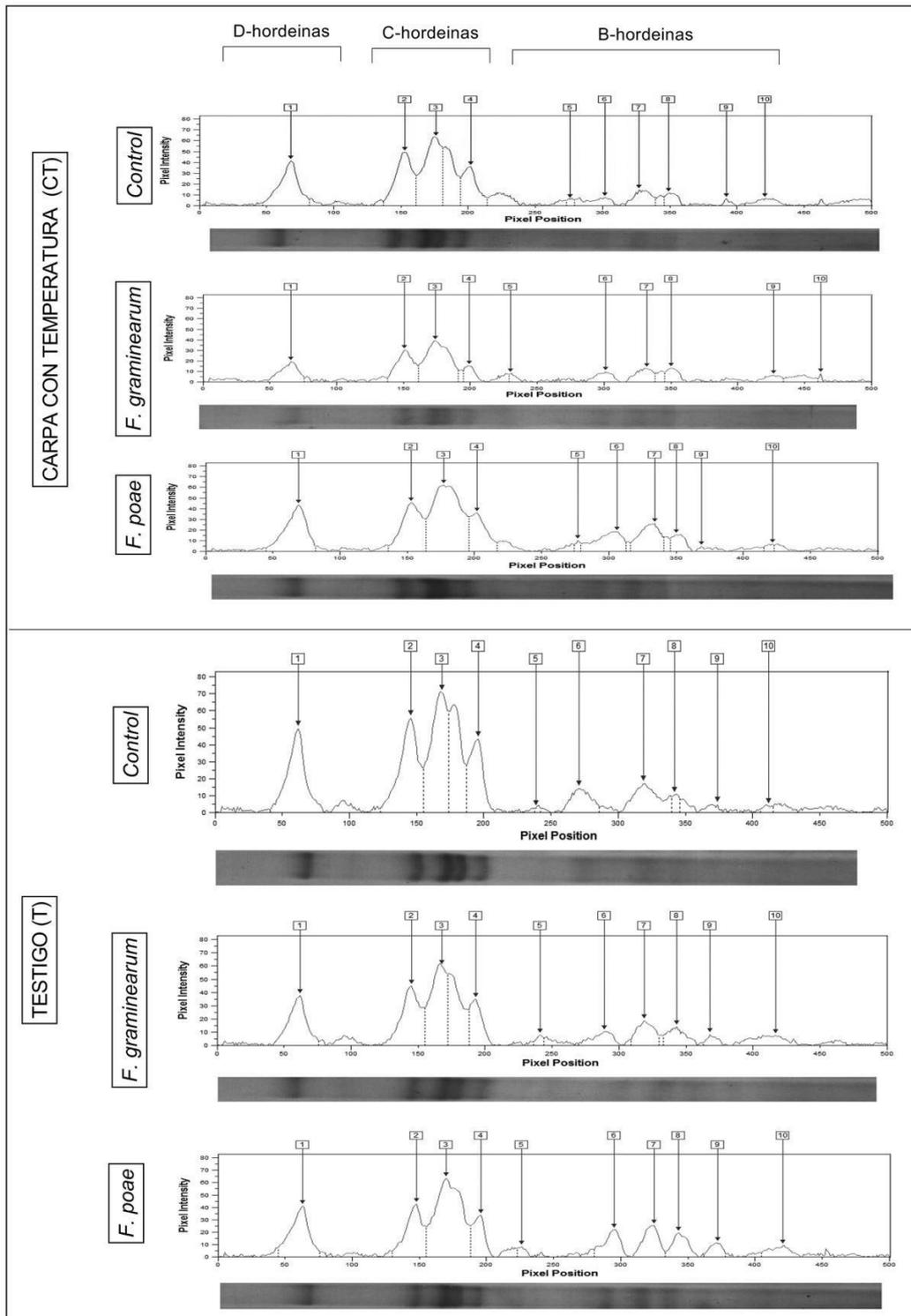


Figura 44. Degradación de las diferentes fracciones proteicas en granos de cebada (cv. Stander). Se observan fracciones de geles de poliacrilamida (SDS-PAGE; T% = 13,5%) que muestran la abundancia relativa (intensidad de pixeles) y el patrón de bandas para las fracciones de D-hordeinas, C-hordeinas y B-hordeinas. Tratamientos: Carpas (CT) y Testigo (T). Inóculos: *F. graminearum*, *F. poae* y tratamiento control.

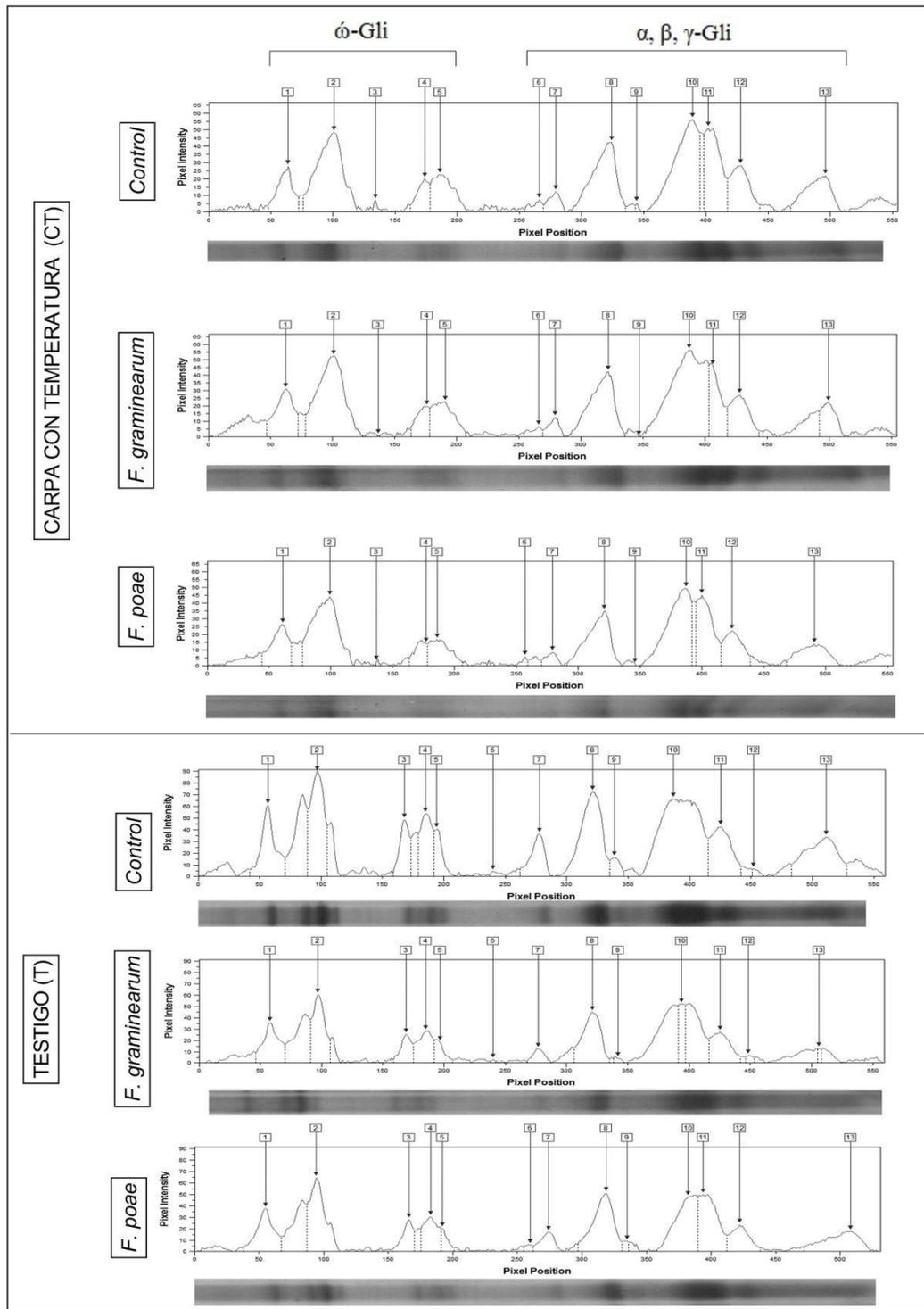


Figura 45. Degradación de las diferentes fracciones de gliadinas en granos de trigo (cv. Apogee). Se observan fracciones de geles de poliácridamida (SDS-PAGE; T% = 13,5%) que muestran la abundancia relativa (intensidad de píxeles) y el patrón de bandas para las fracciones de ω -gliadinas y α, β, γ -gliadinas. Inóculos: *F. graminearum*, *F. poae* y tratamiento control.

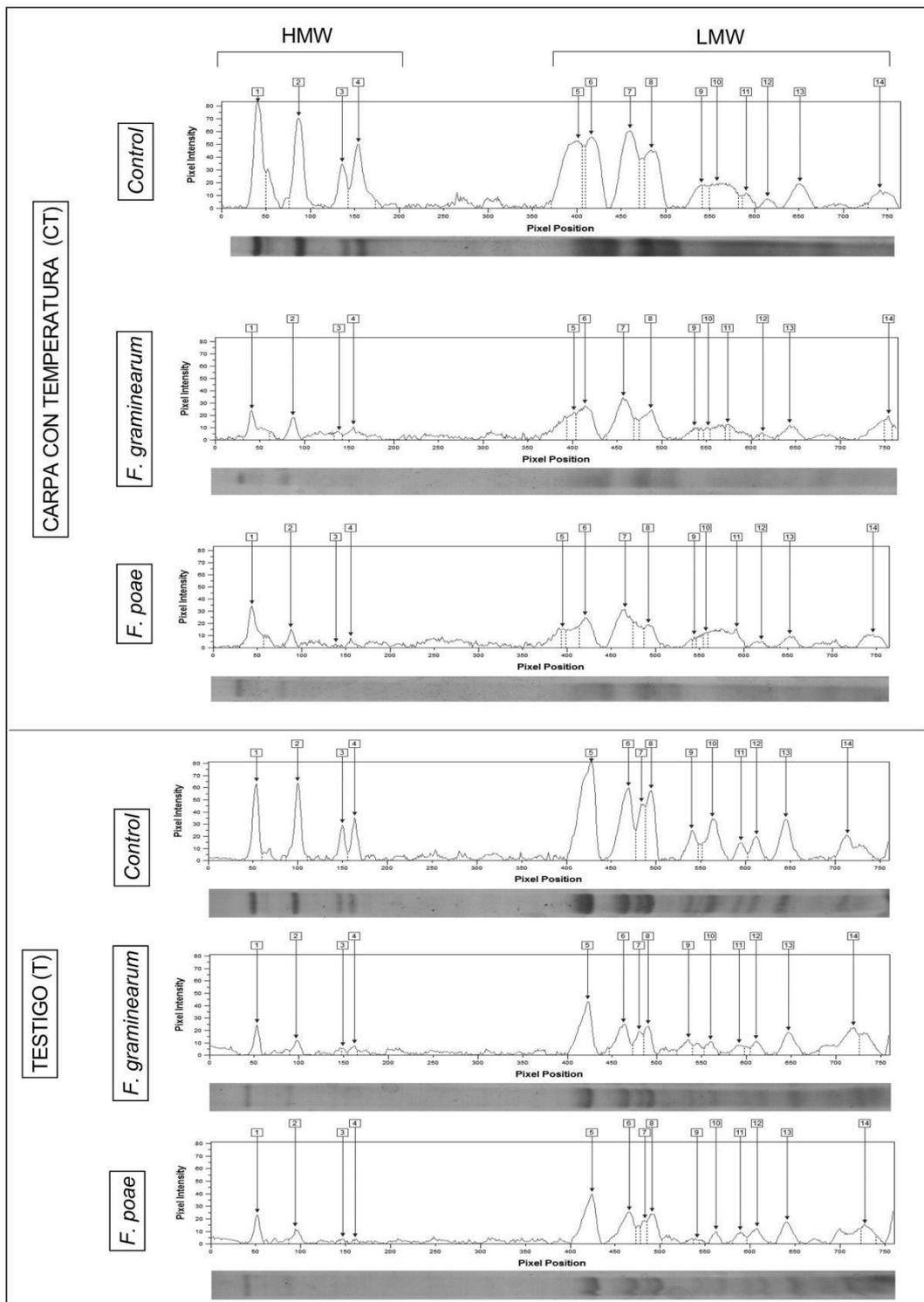


Figura 46. Degradación de las diferentes fracciones de gluteninas en granos de trigo (cv. Apogee). Se observan fracciones de geles de poliácridamida (SDS-PAGE; T% = 13,5%) que muestran la abundancia relativa (intensidad de pixeles) y el patrón de bandas para las fracciones de gluteninas de bajo (LMW) y de alto peso molecular (HMW). Inóculos: *F. graminearum*, *F. poae* y tratamiento control.

5.3.5. Contaminación con micotoxinas.

En cuanto al análisis de la varianza de las micotoxinas, se observaron diferencias significativas solo para las concentraciones de DON y 3-ADON, tanto en cebada como en trigo (Figs. 47-48). No se registraron concentraciones de 15-ADON ni de NIV, durante ninguno de los años evaluados. En cebada, se observaron diferencias significativas solo entre los diferentes años evaluados tanto para DON ($p=0,0148$; $N=81$) como para 3-ADON ($p=0,1732$; $N=81$) (Fig. 47). Para DON se registraron los mayores contenidos durante 2018, con valores promedios de $33,07 \pm 2,11 \mu\text{g/kg}$, seguido por 2017 ($11,41 \pm 2,54 \mu\text{g/kg}$) y 2016 ($7,91 \pm 1,85 \mu\text{g/kg}$). De la misma manera, para 3-ADON se observaron los mayores valores durante 2018, con valores promedios de $11,83 \pm 0,91 \mu\text{g/kg}$, seguido por 2017 ($3,53 \pm 0,77 \mu\text{g/kg}$) y 2016 ($2,89 \pm 0,70 \mu\text{g/kg}$) (Fig. 46).

En trigo se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos con carpas y entre los diferentes años evaluados, tanto para DON y 3-ADON. Con respecto a las concentraciones de DON, se observaron diferencias entre los tratamientos carpas ($p=0,0106$; $N=81$), observando las mayores concentraciones en CT ($13,11 \pm 2,86 \mu\text{g/kg}$) equivalente a un 75,73% más de DON que en T ($7,46 \pm 2,08 \mu\text{g/kg}$). Para 3-ADON ($p=0,0072$; $N=81$) se observaron mayores concentraciones en CT ($4,19 \pm 0,88 \mu\text{g/kg}$), equivalente a un 68,27% más de 3-ADON que en T ($2,49 \pm 0,68 \mu\text{g/kg}$) (Fig. 47). Con respecto a las diferencias significativas entre los diferentes años evaluados, tanto para DON ($p=0,0057$; $N=81$) como para 3-ADON ($p=0,0050$; $N=81$) las mayores concentraciones se observaron durante 2018 ($22,20$ y $6,89 \mu\text{g/kg}$, respectivamente), seguido por 2017 ($7,01$ y $2,30 \mu\text{g/kg}$) y 2016 ($0,10$ y $0 \mu\text{g/kg}$) (Fig. 47).

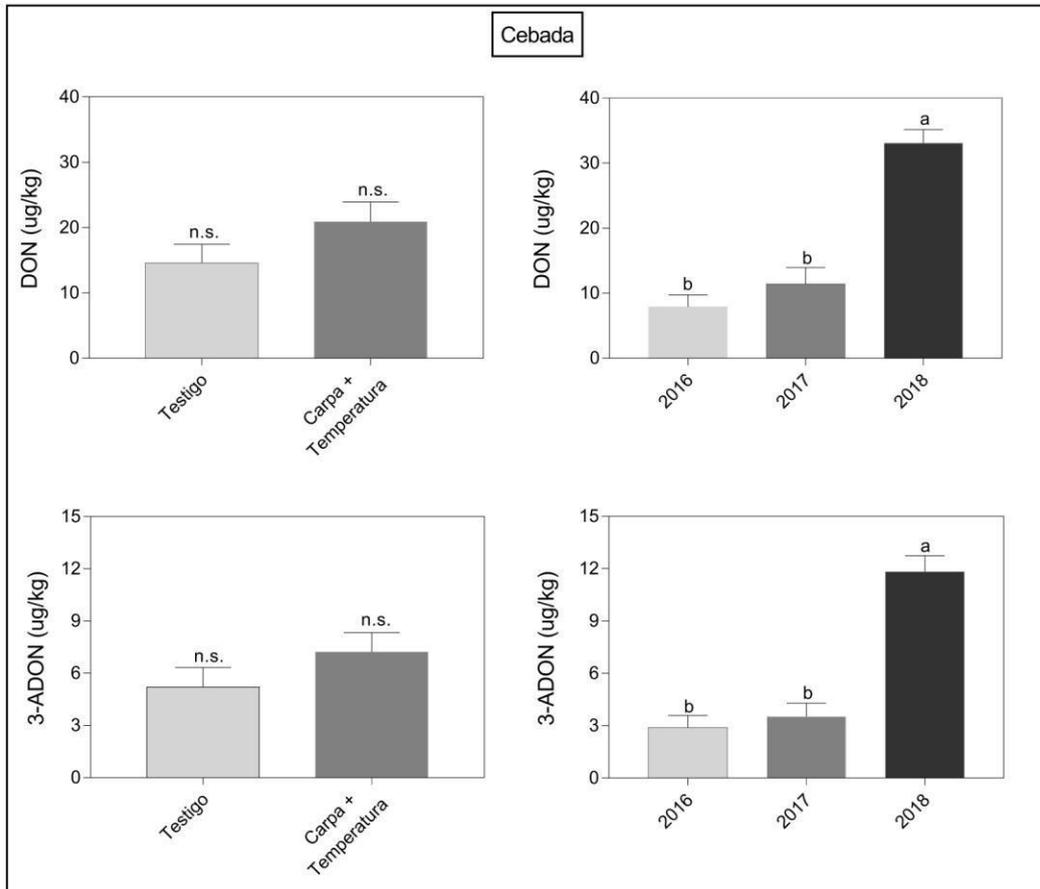


Figura 47. Diferencias para la contaminación con micotoxinas (DON y 3-ADON) en granos de cebada (cv. Stander). Izquierda: diferencias significativas entre los tratamientos de aumento de la temperatura nocturna. Derecha: diferencia entre los distintos años evaluados.

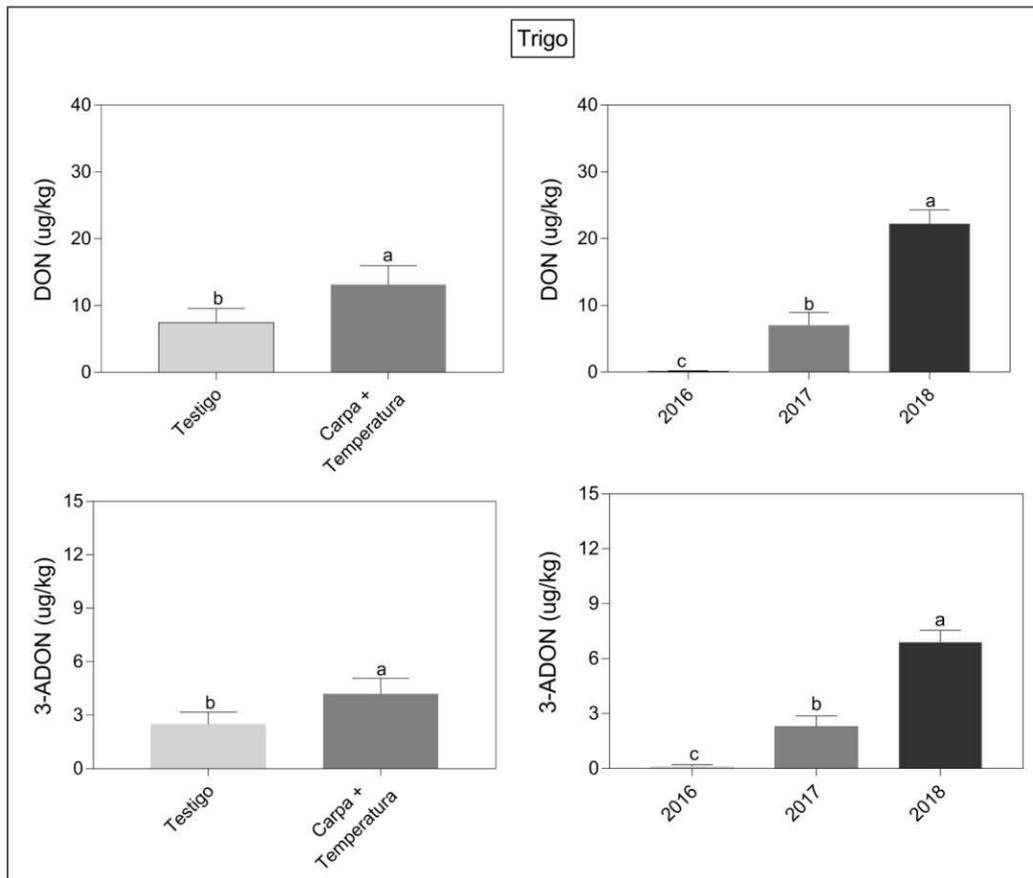


Figura 48. Diferencias significativas para la contaminación con micotoxinas (DON y 3-ADON) en granos de trigo (cv. Apogee). Izquierda: diferencias entre los tratamientos de aumento de temperatura nocturna. Derecha: diferencia entre los distintos años evaluados.

5.4. Discusión.

Durante el presente trabajo, se evaluó el incremento de la temperatura nocturna sobre la interacción planta-patógeno (*F. graminearum*/*F. poae*-cebada/trigo) bajo condiciones de campo durante tres años (2016, 2017 y 2018). De esta manera, se evaluó el potencial impacto de la FE sobre los parámetros de la enfermedad, rendimiento, calidad de grano y contaminación con micotoxinas. Tanto en cebada como en trigo, los resultados indicaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos con carpas, especies de *Fusarium* y años, observando en algunos casos interacción entre las fuentes de variación mencionadas.

Diversos estudios consideran que la ocurrencia de FE se encuentra relacionada a la cantidad de precipitaciones durante el período comprendido entre la floración y los siguientes 30 días, junto con las altas temperaturas previas a la floración. De esta manera, se sugiere que bajo escenarios futuros de cambio climático (2020-2050), la ocurrencia de la FE se incrementará debido al desplazamiento de las fechas de floración de los cultivos (cebada y trigo, en este caso) hacia períodos más tempranos, adelantando la floración de 3 a 6 días (Zhang et al., 2014) e incluso desde 5 hasta 11 días (van der Fels-Klerx et al., 2013). Sin embargo, la estrecha correlación entre las condiciones climáticas y el desarrollo de la enfermedad, posibilitan la predicción de la ocurrencia de la FE, con una precisión aceptable (mayor al 70%) (Vaughan et al., 2016). Estos modelos de simulación se basan en el análisis de los datos de floración de cada genotipo, las condiciones climáticas de cada campaña agrícola y otros factores agronómicos que influyen el manejo de la enfermedad (De Wolf et al., 2003; Del Ponte et al., 2005; Hooker et al., 2002; Rossi et al., 2003; van der Fels-Klerx et al., 2014,

2016). En la mayor parte de estos estudios, focalizados en regiones geográficas específicas (Argentina, Brasil, China y Reino Unido), se estima que la incidencia de la FE se incrementará (Fernandes et al., 2004; Madgwick et al., 2011; Moschini et al., 2013; Zhang et al., 2014). Sin embargo, en otras regiones del mundo (ej. Escocia) se estima una disminución de la incidencia de la FE, debido a que el estadio de floración coincidiría con períodos más secos, desfavorables para el desarrollo de la enfermedad (Skelsey y Newton, 2015). En cuanto a la Argentina, se estima un aumento de la ocurrencia de FE hacia fines de siglo, con un incremento de la incidencia para el sur de la región pampeana de hasta un 10% (CEPAL, 2014; Fig. 37).

Es interesante resaltar que los resultados obtenidos en el presente trabajo, coinciden con las estimaciones mencionadas previamente, registrando incrementos significativos en variables tales como FHB index e ISK, las cuáles integran la incidencia y la severidad de la enfermedad, junto con el número de granos sintomáticos. Así, se registraron incrementos del 2% en cebada y 17% en trigo para FHB index, mientras que para ISK se registraron aumentos del 6% en cebada y del 15% en trigo, cuando la temperatura nocturna se incrementó 3°C y se inoculó con *F. graminearum* (Fig. 43). Si bien estos resultados fueron observados en años particulares (2016 para cebada y 2018 para trigo), estas diferencias se deben a las distintas condiciones ambientales durante cada año, más específicamente durante el período de floración, en donde las mismas fueron propicias para el desarrollo del patógeno. En los tres años evaluados, los valores de patogenicidad obtenidos indicaron que *F. graminearum* fue más patogénico y predominó sobre *F. poae*, dependiendo principalmente del año y del aumento de la temperatura nocturna, mientras que para *F. poae* no se observaron diferencias

significativas. Este hecho sugiere que *F. graminearum* ocuparía un rol de mayor importancia que *F. poae*, bajo escenarios futuros de cambio climático. Trabajos previos sostienen que en los últimos años, cambios en las composiciones de las comunidades fúngicas han ocurrido a nivel mundial. A modo de ejemplo, en Reino Unido se ha reportado una disminución de la ocurrencia de *F. culmorum* desde el año 2002 junto con un incremento de la ocurrencia de *F. graminearum* (Gosman et al., 2007; Jennings et al., 2004). Sin embargo, aún es muy pronto para afirmar que dichas variaciones se deben exclusivamente al cambio climático global (West et al., 2012). Actualmente, es sabido que temperaturas cálidas (alrededor de 28°C) y condiciones húmedas son favorables para la infección por *F. graminearum*, mientras que las temperaturas alrededor de 25°C y las condiciones secas son favorables para *F. poae* (Nazari et al., 2018). Por ende, teniendo en cuenta las condiciones de cambio climático proyectadas a futuro, y considerando las mayores temperaturas nocturnas y precipitaciones durante el período de floración, es de suponer que dichas condiciones serán más cercanas al óptimo de *F. graminearum* que para *F. poae*.

Cabe resaltar que bajo condiciones climáticas proyectadas a futuro, no solo la temperatura y la concentración de CO₂ influirán en el desarrollo de las enfermedades fúngicas, sino también alterarán la fisiología y morfología foliar de los hospedantes, modificando así las condiciones micro-climáticas del canopeo (densidad de hojas y área foliar, incidencia de luz, humedad relativa, apertura estomática, etc.). El incremento de las temperaturas junto con la modificación de otros factores climáticos pueden inducir cambios fisiológicos en la resistencia del hospedante, por lo que es necesario en un futuro evaluar la FE teniendo en cuenta el comportamiento entre los diferentes genotipos (tanto en cebada como en trigo)

como la interacción con otros factores climáticos (ej.: incremento de la concentración de CO₂). Algunos estudios sugieren que el cambio climático global provocaría una mayor producción primaria neta y mayores rendimientos para algunas especies C3 (en este caso, cebada y trigo), debido al efecto de fertilización con CO₂ en la fotosíntesis y a la mayor eficiencia en el uso del agua (Kimball et al., 2002; Wittwer, 1995). Experimentos bajo condiciones de cambio climático con concentraciones elevadas de CO₂, mostraron incrementos en la fotosíntesis del 30 al 50% en especies C3, mientras que para especies C4 (caña de azúcar, maíz, etc.) el incremento fue solo del 10 al 25%. Por otra parte, en términos de rendimiento el incremento sería de 10 a 20% mayor para especies C3 y de hasta 10% para especies C4 (Tubiello et al., 2007). Sin embargo, algunos autores sostienen que el efecto verdadero de la fertilización con CO₂ es aún incierto bajo condiciones de campo, considerando que las magnitudes de incremento fotosintético y tasas de crecimiento han sido sobreestimadas, debido a que han sido calculadas bajo condiciones experimentales controladas o semi-controladas (Ainsworth and Long, 2005). Actualmente, existen evidencias que sustentan el aumento en la ocurrencia y severidad de las enfermedades fúngicas, bajo condiciones futuras de cambio climático, las cuáles implicarían importantes disminuciones en los rendimientos. Los resultados de patogenicidad obtenidos en el presente trabajo concuerdan con Kaukoranta (1996), quien evaluó la pérdida de rendimiento causada por *Phytophthora infestans* en papa, realizando un estudio de 3 años de duración con un aumento de 3°C más que el ambiente. En dicho estudio se reportó que la infección comenzaba entre 4 a 7 días antes, por lo que los tratamientos con fungicidas para proteger el cultivo se deberían extender por 10 ± 20 días por cada grado de calentamiento, con el consiguiente incremento de costos

y riesgo de daño ambiental. Similarmente, Vary et al. (2015) realizaron un estudio en trigo, utilizando dos genotipos contrastantes (susceptible vs resistente) y reportaron una mayor incidencia de FE respecto de otras enfermedades (*Septoria tritici*) bajo condiciones proyectadas de cambio climático y elevadas concentraciones de CO₂ (780 ppm). En cebada, Hibberd et al. (1996) observaron una mayor severidad de *Erysiphe graminis hordei* junto con una reducción de la fotosíntesis neta bajo condiciones de cambio climático y altas concentraciones de CO₂ (700 ppm).

Actualmente, existen estimaciones acerca del potencial efecto del cambio climático sobre el rendimiento en cereales tales como la cebada y el trigo, aunque se desconoce el impacto adicional que tendría la FE en años favorables para el desarrollo de la enfermedad. García et al. (2015, 2016) evaluaron el efecto del incremento en la temperatura nocturna (3,9°C) en trigo y cebada bajo condiciones de campo, registrando una disminución en el rendimiento del 7% por cada grado de aumento en la temperatura nocturna. Esta reducción en el rendimiento en grano fue acompañada por un decrecimiento en el número de granos (6%°C⁻¹) y menor peso de mil granos (3%°C⁻¹), causada por un desarrollo acelerado durante el período de calentamiento, con un acortamiento de la duración del período crítico, y por ende una menor intercepción de radiación solar, menor biomasa acumulada y menor número de espigas/m². Similarmente, Magrin et al. (2009) reportó, sin considerar el efecto del CO₂, una disminución del 4% del rendimiento en trigo para fines del siglo XXI, con pérdidas de hasta un 20-30% para la parte centro-norte de la región pampeana. Resultados similares han sido observados en otras partes del mundo, utilizando el modelo CERES y estimando pérdidas del rendimiento del 7% en regiones templados-frías y un 10% en regiones cálidas

(Lobell y Monasterio, 2007). De acuerdo con las estimaciones previas, y en adición a las pérdidas de rendimiento causadas por el incremento en las temperaturas nocturnas, los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren un impacto negativo sobre los rendimientos, más específicamente sobre el peso de mil granos, cuando las condiciones fueron favorables para el desarrollo de la FE. Así, se registraron disminuciones del 5,6% y 4,6% en el peso de mil granos en cebada (durante 2017 y 2018, respectivamente) cuando se inoculó con *F. graminearum* y se incrementó la temperatura nocturna en 3°C; mientras que para *F. poae* se observó una disminución del 0,4% y 5,2%, respectivamente. Estos resultados evidencian el impacto adicional que implicaría la presencia de *Fusarium* spp. sobre los rendimientos en cebada, bajo escenarios futuros de cambio climático.

Si bien, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el impacto del aumento de la temperatura nocturna en conjunto con la presencia de *Fusarium* spp., se registraron diferencias significativas producidas únicamente por el incremento en la temperatura nocturna en 3°C, las cuáles no han sido reportadas hasta el momento en variables tales como calibre de grano (cebada) y composición proteica (trigo). Bajo condiciones climáticas proyectadas a futuro, es de vital importancia conocer el potencial impacto sobre la calidad del grano, la cual determinará su uso final, ya sea en cebada (elaboración de malta o forraje) como en trigo (obtención de harinas, panificados y subproductos). Con respecto a la cebada, actualmente en la Argentina y en gran parte del mundo, la industria maltera exige materia prima con niveles mínimos de calidad, para garantizar lotes de malteo uniformes y homogéneos, asegurando así medianamente una calidad constante de malta (Anexo I). Dichas tolerancias de recibo son: poder germinativo

(>95%) porcentaje de proteína (hasta 12%), calibre de grano (85% de granos >2,5 mm y menos del 2% de granos con calibre <2,2 mm), humedad (hasta 12%), granos quebrados (hasta 2%). Con respecto al calibre del grano, los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron un decrecimiento de la fracción de granos sobre zaranda de 2,5 mm (5%) y un aumento de granos con calibre <2,2 mm (1%). Similarmente, diversos estudios han reportado que períodos cortos de aumento en la temperatura diurna (8°C durante 6 h, 5 días consecutivos) durante el llenado de granos, producen disminuciones en el peso del grano (2 a 14%), sumado a disminuciones en la fracción de granos >2,5 mm, aumento en la fracción de granos <2,2 mm y disminución de la síntesis de β -glucanos, con la consecuente disminución en el extracto de malta (Pasarella et al., 2002; Savin y Nicolas, 1996; Stone y Nicolas, 1994, 1996).

En cuanto a la composición proteica, actualmente escasos trabajos han sido llevados a cabo evaluando el potencial impacto del cambio climático, más específicamente el aumento de la temperatura nocturna, sobre las diferentes fracciones de hordeinas, gluteninas y gliadinas. Si bien, en el presente trabajo no se reportaron diferencias significativas en la fracción de hordeinas (cebada), en trigo se registraron disminuciones en las diferentes fracciones de gliadinas (3,6% ω -gli y 10,5% α,β,γ -gli) y gluteninas (13,6% GLU y 11,4% LMW), provocando en última instancia una disminución de la relación GLI/GLU (14,6%), cuando se incrementó la temperatura nocturna en 3°C. Estos resultados coinciden con Stones y Nicolas (1994), que registraron durante el período centrado en floración (10 dpi y 30 dpi) y bajo condiciones de aumento de temperatura diurna (>35°C), disminuciones de hasta 9% en la relación GLI/GLU, dependiendo del genotipo. En cuanto a la menor degradación de las gliadinas respecto a las gluteninas, si

bien en el presente trabajo se registraron disminuciones en ambas fracciones proteicas debido al aumento en la temperatura nocturna, las gliadinas se vieron ligeramente menos afectadas que las gluteninas. Este hecho podría ser explicado por una menor disminución en la tasa de síntesis de las gliadinas en comparación con las gluteninas, debido a su naturaleza polimérica y su síntesis más tardía durante la formación del grano (Blumenthal et al., 1993). De esta manera, el daño generado a las proteínas del endosperma del grano de trigo, produciría daños posteriores durante el proceso de panificación, principalmente en el amasado y en la fermentación, al dar como resultado masas más débiles y con menor volumen de pan. Estas pérdidas de las propiedades reológicas y en la funcionalidad de la masa, se acentuarían en procesos de panificación que requieran mayores tiempos de fermentación (Nightingale et al., 1999). Por ende, es de vital importancia considerar el potencial impacto sobre la composición proteica, y consecuentemente sobre la calidad panadera, teniendo en cuenta la creciente demanda de alimentos a nivel mundial (Godfray et al., 2010).

Si bien el impacto del calentamiento global sobre la producción de micotoxinas es aún incierto, numerosos trabajos han sido llevados a cabo en base a diferentes modelos predictivos y estimaciones (Hooker et al., 2002; Juroszek et al., 2013; Magan, et al., 2011; Medina et al., 2015, 2017a, 2017b; Paterson et al., 2010; Schaafsma et al., 2001, 2007; Zhang et al., 2014). Estos modelos permiten simular posibles escenarios futuros y estimar con cierta precisión cambios en la composición de las comunidades fúngicas, modificaciones en las interacciones planta-patógeno, y por ende su potencial impacto en la agricultura, más específicamente en la producción de micotoxinas. Cabe resaltar que, actualmente el cambio climático global representa una de las mayores preocupaciones a nivel

mundial en lo que respecta a inocuidad y seguridad alimentaria, por lo que es de vital importancia estimar a futuro el potencial impacto sobre la producción de micotoxinas. En el presente trabajo, se reportaron diferencias significativas para DON y 3-ADON, no registrando concentraciones de NIV y 15-ADON durante ninguno de los tres años evaluados. En ambos cultivos, la ausencia de NIV en concentraciones por encima del límite de cuantificación, puede ser explicada por las condiciones no predisponentes para *F. poae* durante los años evaluados. Por otra parte, la ausencia de 15-ADON confirma los resultados obtenidos por Ramírez Albuquerque et al. (2019), que reportaron bajo condiciones *in vitro*, una mayor producción de DON y 3-ADON entre los 25-30°C, mientras que las temperaturas óptimas para la síntesis de 15-ADON fueron menores (10°C).

En cebada solo se registraron diferencias significativas entre años para DON y 3-ADON (Fig. 48), coincidiendo con otros autores que sostienen que el efecto “año” es reconocido como el principal factor que contribuye a la concentración de DON y sus derivados acetilados al momento de la cosecha, representando el 48% de la variación total (Schaafsma et al., 2001, 2007). Sin embargo, se han registrado diferencias dentro de un mismo año, entre dos regiones geográficas no muy distantes, por lo que estas diferencias causadas por las condiciones ambientales (principalmente en pre y post-floración), deben ser consideradas al momento de realizar estimaciones con respecto a la concentración de micotoxinas bajo escenarios climáticos futuros (Hooker et al., 2002). Cabe resaltar, que en el presente trabajo se reportaron incrementos alarmantes en las concentraciones de DON (75,7%) y 3-ADON (68,3%) en trigo, cuando se incrementó en 3°C la temperatura nocturna. Estos resultados coinciden con van der Fels-Klerx et al. (2013, 2014), que estimaron a través de dos modelos un

incremento de hasta 3 veces la concentración de DON en muestras de trigo provenientes del noroeste de Europa para el año 2040. Por ende, los resultados obtenidos en este trabajo indicarían que bajo condiciones futuras de cambio climático, las condiciones de inocuidad y seguridad alimentaria se encontrarán severamente comprometidas. Estas condiciones implicarían serios riesgos para los consumidores, debido a la toxicidad *per se* de dichas micotoxinas, sumado al aumento considerable de las concentraciones a lo largo de toda la cadena alimenticia: desde la cosecha de los granos, transporte y almacenamiento de los mismos, hasta la elaboración de las materias primas y subproductos derivados.

**CONCLUSIONES
GENERALES**

Y

**PERSPECTIVAS
A FUTURO**

CONCLUSIONES GENERALES.

Durante el presente trabajo de tesis, se llevaron a cabo estudios que aportan al conocimiento en cuanto a la interacción *Fusarium graminearum*/*Fusarium poae* y cebada/trigo. La importancia de este estudio radica en que tanto la cebada como el trigo, son los dos cultivos de invierno de mayor importancia en los sistemas agrícolas de la Argentina; mientras que las especies de *Fusarium* evaluadas son los principales agentes etiológicos aislados de granos de espigas con síntomas de FE. En función de los objetivos específicos y de acuerdo con los resultados obtenidos durante el desarrollo del presente trabajo, las hipótesis planteadas fueron aceptadas o rechazadas, según se justifica a continuación para cada ensayo realizado (Fig. 49).

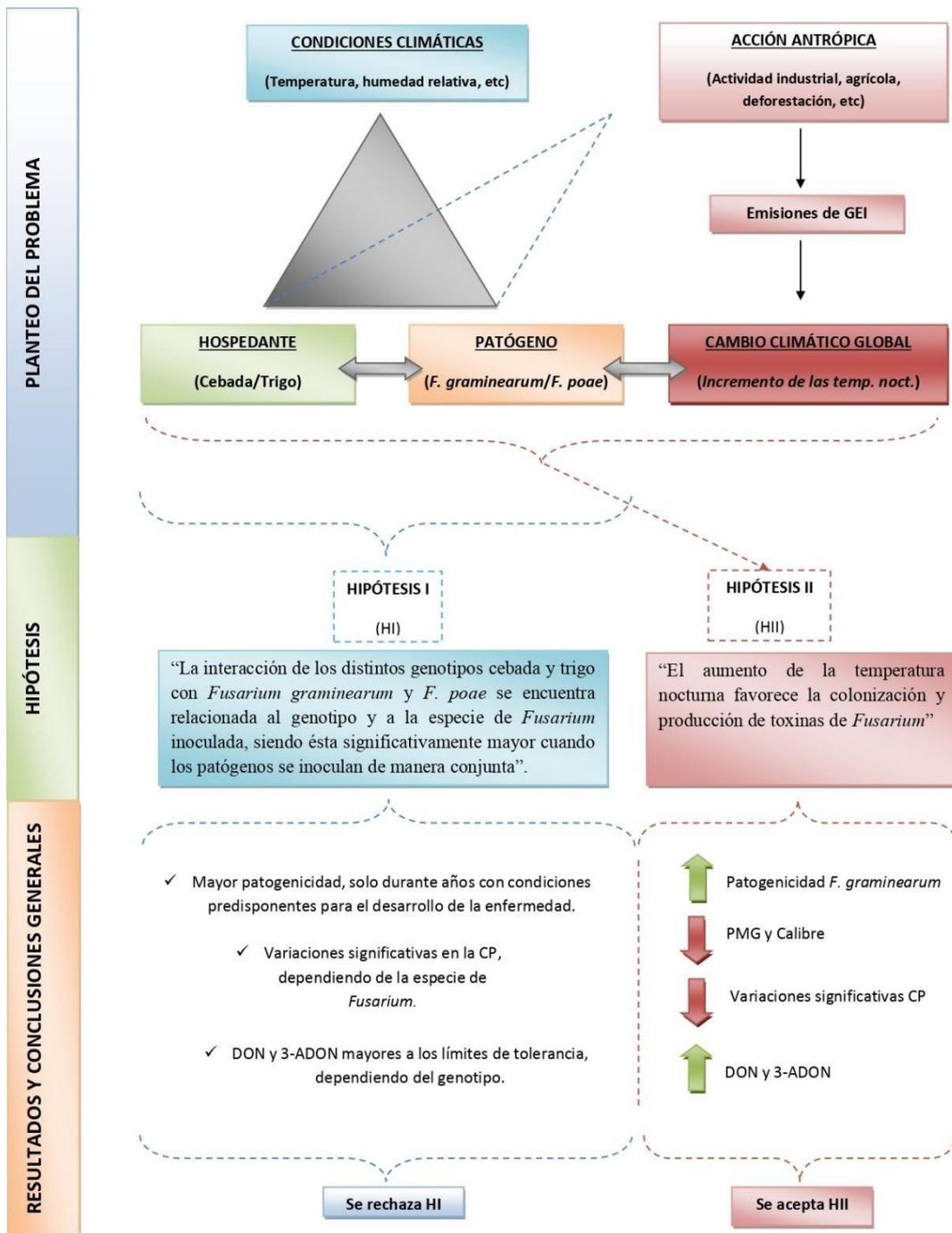


Figura 49. Esquema general del presente plan de trabajo, junto con las hipótesis planteadas, los resultados principales obtenidos y las conclusiones generales.

En primer lugar, se evaluó durante tres campañas agrícolas y bajo condiciones a campo la interacción entre *F. graminearum* y *F. poae* en genotipos de cebada cervecera. Del presente trabajo se concluye que:

- ✚ En el presente trabajo no se registraron diferencias significativas que sustenten el sinergismo entre *F. graminearum* y *F. poae* en lo que respecta a patogenicidad.
- ✚ Se evidenciaron diferentes comportamientos entre los genotipos de cebada con respecto a la infección por *Fusarium* y su impacto en variables de rendimiento y calidad, que podrían ser útiles para la mejora genética en el futuro.
- ✚ Dependiendo del genotipo, el proceso normal de germinación del grano se vio afectado por ambas especies de *Fusarium* evaluadas (*F. graminearum* > *F. poae*). Ambas especies podrían afectar la calidad de la malta y, por lo tanto, el proceso de malteado, maceración y elaboración de cerveza.
- ✚ La degradación de las diferentes fracciones proteicas depende de cada especie de *Fusarium*. Mientras que las D y C-hordeinas fueron degradadas preferentemente por *F. graminearum*, las B-hordeinas y el contenido total de hordeinas fueron afectados en mayor medida cuando ambas especies se inocularon de manera conjunta.
- ✚ En el presente trabajo se registraron concentraciones de DON y 3-ADON por encima de los límites de tolerancia.

Estudios realizados en cebada cervecera sugieren que los fuertes efectos ambientales, junto al efecto del genotipo, pueden influir considerablemente sobre las relaciones planta-patógeno, en este caso sobre las interacciones *F. graminearum*/*F. poae*-cebada. Por ende, a pesar de los resultados y conclusiones anteriormente expuestos, se rechaza la hipótesis I (HI), considerando necesarios más estudios en el área, incluso bajo condiciones controladas, para confirmar estos resultados observados en ambos cultivos evaluados.

En segundo lugar, se evaluó durante tres campañas agrícolas y bajo condiciones a campo la interacción entre *F. graminearum* y *F. poae* en genotipos de trigo pan. Del presente trabajo se concluye que:

- ✚ Al igual que en cebada, en el presente trabajo no se registraron diferencias significativas que evidencien sinergismo entre *F. graminearum* y *F. poae* en lo que respecta a patogenicidad.
- ✚ La degradación de diferentes fracciones de proteínas depende de cada especie de *Fusarium*. Mientras que las gluteninas fueron degradadas preferentemente por *F. graminearum*, las gliadinas fueron afectadas en mayor medida por *F. poae*. Además, cuando las dos especies de *Fusarium* se encontraron presentes, ambas fracciones de proteínas (gliadinas y gluteninas) fueron degradadas.
- ✚ En el presente trabajo se registraron concentraciones de DON y 3-ADON por encima de los límites de tolerancia. Los diferentes patrones de contaminación con DON dependieron principalmente del

genotipo, lo cuál podría ser útil en un futuro cercano para el mejoramiento genético vegetal.

Si bien en el presente trabajo se observaron tendencias en diferentes variables para trigo, tales como en los parámetros de la enfermedad y en la degradación de las diferentes fracciones proteicas, las mismas no permiten confirmar el sinergismo entre *F. graminearum* y *F. poae*, ya que estas diferencias no alcanzan a ser estadísticamente significativas. Por ende, en este caso, se rechaza la hipótesis I (HI), considerando necesarios más estudios incluso bajo condiciones controladas para confirmar las tendencias observadas, debido a que existen fuertes efectos del genotipo (variaciones en la interacción planta-patógeno) y del año (variaciones en las condiciones climáticas) sobre el patosistema *Fusarium*-trigo.

En tercer y último lugar, se evaluó el potencial impacto del cambio climático, específicamente el aumento de la temperatura nocturna (3°C), sobre la interacción planta-patógeno (*F. graminearum*/*F. poae*-cebada/trigo) y su influencia sobre parámetros de rendimiento, germinación, calidad de grano, composición proteica y contaminación con micotoxinas. Del presente trabajo se concluye que:

- ✚ Tanto en cebada como en trigo, el aumento de la temperatura nocturna favorece el desarrollo de *F. graminearum*, observando mayores valores de patogenicidad (FHB e ISK).
- ✚ En cebada, en años en los cuales las condiciones para el desarrollo de la enfermedad fueron favorables, el aumento de la

temperatura nocturna impactó negativamente disminuyendo el peso de mil granos, tanto para *F. graminearum* como para *F. poae*.

- ✚ Si bien el objetivo del presente trabajo no fue evaluar el impacto *per se* de las temperaturas nocturnas, se registraron disminuciones significativas en cuanto al calibre de los granos (cebada) y a la composición proteica (trigo).
- ✚ Con respecto a la contaminación con micotoxinas, el impacto del calentamiento nocturno incrementa significativamente la concentración de micotoxinas tales como DON y 3-ADON en trigo.

Por ende, la hipótesis II (HII) de este trabajo es aceptada. Bajo condiciones de cambio climático proyectadas a futuro, la seguridad alimentaria y la inocuidad de los alimentos se verá seriamente comprometida. En lo que respecta a los cereales evaluados (cebada y trigo) el mayor desarrollo de la FE impactaría negativamente tanto en términos cuantitativos (pérdidas de rendimiento) como cualitativos (disminución en la calidad maltera/panadera y contaminación con micotoxinas).

PERSPECTIVAS A FUTURO

Los resultados obtenidos a lo largo del presente trabajo, establecen las bases para potenciales investigaciones futuras, principalmente en lo que respecta a estudios de cambio climático, bajo condiciones de campo. Esto sería posible, ya que en el presente trabajo se corroboró la eficacia de la metodología empleada para el estudio de dicho fenómeno (aumento de la temperatura nocturna, mediante la utilización de carpas de calentamiento nocturno) sobre la interacción *Fusarium* spp.-cebada/trigo. Además, se observó que las condiciones ambientales fueron más adecuadas para el desarrollo de *F. graminearum* sobre *F. poae*. De esta manera, se plantea en los próximos años continuar con la evaluación del impacto del calentamiento nocturno en ambos cultivos, bajo condiciones de campo. Específicamente, se pretende evaluar el potencial efecto sobre la interacción planta-patógeno en la calidad industrial de la cebada y el trigo.

En cebada, se evaluará el efecto del calentamiento nocturno sobre la interacción de *F. graminearum* en cultivares comerciales contrastantes con destino a maltería, evaluando parámetros industriales tales como friabilidad, extracto de mosto, micromalteo, FAN, contaminación con micotoxinas, entre otros.

En trigo pan, se evaluará el efecto del calentamiento nocturno sobre la interacción de *F. graminearum* en cultivares comerciales contrastantes en lo que respecta a calidad panadera, evaluando parámetros tales como tenacidad, extensibilidad, fuerza de la masa, volumen de pan, contaminación con micotoxinas, entre otros.

Luego de la realización de estos ensayos, es de esperar que los resultados obtenidos sean promisorios y posibiliten un mejor entendimiento del potencial efecto que implicaría el aumento de la temperatura nocturna sobre la interacción *F. graminearum*-cebada/trigo, al menos en lo que respecta al potencial impacto negativo sobre la seguridad e inocuidad alimentaria y la calidad industrial.

**REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

- Aapresid. (2016). Evolución y retos de la siembra directa en la Argentina: Boletín Técnico Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa. Recuperado de: <https://www.aapresid.org.ar/wp-content/uploads/2018/03/Evoluci%C3%B3n-y-retos-de-la-Siembra-Directa-en-Argentina.pdf>
- Agostinelli, A.M. (2009). Phenotypic and genotypic selection for head scab resistance in wheat. Tesis de Magister Scientiae. University of Kentucky, USA.
- Agrios, G.N. (1999). Fitopatología. México DF, México: Limusa S.A.
- Ainsworth, E.A., Long, S.P. (2005). What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. *New Phytologist*, 165, 351–372.
- Alberione, E., Bainnotti, C., Donaire, G., Fraschina, J., Salines, J., Salines, N.... Cuniberti, M. (2015). Incidencia de la fusariosis de la espiga en cultivares de trigo pan durante 2012-13 en Marcos Juárez (Córdoba-Argentina). *Revista FAVE-Ciencias Agrarias*, 14, 2-13.
- Alexander, L.V., Zhang, X., Peterson, T.C., Caesar, J., Gleason, B., Klein Tank, A.M...Vasquez Aguirre, J.R. (2006). Global observed changes in daily climate extremes of temperature and precipitation. *Journal of Geophysical Research*, 111, 1-22.
- Al-Tabbal, J.A., Al-Fraihat, A. (2011). Genetic variation, heritability, phenotypic and genotypic correlation studies for yield and yield components in

- promising barley genotypes. *Journal of Agriculture Science*, 4,193-210.
- Álvarez, C.A., Azcarate, M.P., Fernández Pinto, V. (2009). Toxigenic potential of *Fusarium graminearum* sensu stricto isolates from wheat in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 135, 131-5.
- Annone, J.G., Galich, M.T., Galich, A. (1994). Entre los hongos acecha el golpe blanco. *Campo y Tecnología*, 15, 6-10.
- Aoki, T., Ward, T.J., Kistler, H.C., O'Donnell, K. (2012). Systematics, phylogeny and trichothecene mycotoxin potential of *Fusarium* head blight cereal pathogens. *Mycotoxins*, 62, 91-102.
- Arata, A.F. (2009). Influencia de la fertilización con nitrógeno y azufre sobre la composición del gluten y la calidad industrial en genotipos argentinos de trigo pan (*Triticum aestivum* L.). Tesis de Magister Scientiae. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- Arroyo Manzanares, N., Huertas Pérez, J.F., Gámiz Gracia, L., García-Campaña, A.M. (2015). Simple and efficient methodology to determine mycotoxins in cereal syrups. *Food Chemistry*, 177, 274-279.
- Arseniuk, E., Foremska, E., Goral, T., Chelkowski, J. (1999). Fusarium Head Blight reactions and accumulation of deoxynivalenol (DON) and some of its derivatives in kernels of wheat, triticale and rye. *Journal of Phytopathology*, 147, 577-590.
- Arthur, J.C. (1891). Wheat scab. *Indiana Agricultural Experiment Station Bulletin*, 36, 129-132.

- Asseng, S., Martre, P., Maiorano, A., Rotter, R.P., O'Leary, G.L., Fitzgerald, G.J., ...Ewert, F. (2019). Climate change impact and adaptation for wheat protein. *Global Change Biology*, 25, 155-173.
- Bai, G., Shaner, G. (1994). Scab of wheat: Prospects for control. *Plant Disease*, 78, 760-766.
- Bartosik, R., Castellari, C., Cardoso, L., De la Torre, D., Abadía, B., Carpaneto, B. Valle, F.M. (2012). Manejo de Trigo con fusariosis en la Poscosecha. Balcarce, Argentina: INTA.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S. (2015). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67, 1-48.
- BCR. (2019). Bolsa de Comercio de Rosario: Estimaciones de producción. Recuperado de: <https://www.bcr.com.ar/es/mercados/gea/estimaciones-nacionales-de-produccion/estimaciones>
- Bellesi, F., Martínez, M., Dinolfo, M.I., Stenglein, S.A., Lázaro, A., Arata, A.F. (2018). Efecto de diferentes especies de *Fusarium* sobre la calidad del gluten en trigo pan. IV Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental. Mar del Plata, Argentina.
- Bellesi, F., Arata, A.F., Martínez, M., Arrigoni, A., Stenglein, S.A., Dinolfo, M.I. (2019). Degradation of gluten proteins by *Fusarium* species and their impact on the grain quality of bread wheat. *Journal of Stored Products Research*, 83, 1-8.

- Benavidez Mendoza, A., Hernández Valencia, R.E., Ramírez Rodríguez, H., Sandoval Rangel, A. (2010). Tratado de Botánica Económica Moderna. Universidad Autónoma Antonio Narro, Mexico: Buenavista.
- Beres, B.L., Brulé-Babel, A.L., Ye, Z., Graf, R.J., Turkington, T.K., Harding, M.W., Kutcher, H.R., Hooker, D.C. (2018). Exploring genotype × environment × management synergies to manage *Fusarium* head blight in wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology* 40, 1-10.
- Berneiter, A. The influence climate change has on plant pathogens. *Revista Científica Ecuatoriana*, 3, 8-10.
- Betchel, D.B., Kaleikau, L.A., Gaines, R.L., Seitz, L.M. (1985). The effects of *Fusarium graminearum* infection on wheat kernels. *Cereal Chemistry*, 62, 191-197.
- Bianchini, A., Horsley, R.D., Ryu, D., Abbas, K.H., Jack, M.M., Kobielush, B... Weaver, G. (2015). DON occurrence in grains: A north american perspective. *Cereal Foods World*, 60, 32-56.
- Bianco, C., Krauz, T.A., Nuñez, C.O. (2007). Botánica agrícola. Río Cuarto, Argentina: Editorial UNRC.
- Bilska, K., Jurczak, S., Kulik, T., Ropelweska, E., Olszewski, J., Zelechowski, M., Zapotoczny, P. (2018). Species composition and trichothecene genotype profiling of *Fusarium* field isolates recovered from wheat in Poland. *Toxins*, 10, 325.
- Birr, T., Verreet, J.A., Klink, H. (2019). Prediction of deoxynivalenol and zearalenone in winter wheat grain in a maize-free crop rotation based on

- cultivar susceptibility and meteorological factors. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 126, 13-27.
- Blumenthal, C.S., Barlow, E.W.R., Wrigley, C.W. (1993). Growth environment and wheat quality: the effect of heat stress on dough properties and gluten proteins. *Journal of Cereal Science*, 18, 3-21.
- Bottalico, A. (1998). *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles. *European Journal of Plant Pathology*, 80, 85-103.
- Bottalico, A., Perrone, G. (2002). Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 611-624.
- Boutigny, A.L., Richard-Forget, F., Barreau, C. (2008). Natural mechanism for cereal resistance to the accumulation of *Fusarium* trichothecenes. *European Journal of Plant Pathology*, 121, 411-423.
- Brennan, J.M., Egan, D., Cooke, B.M., Doohan, F. M. (2005). Effect of temperature on head blight of wheat caused by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum*. *Plant Pathology*, 54, 156-160.
- Brown, D.W., Dyer, J.M., McCormick, S.P., Kendra, D.F., Plattner, R.D. (2004). Functional demarcation of the *Fusarium* core trichothecene gene cluster. *Fungal Genetics and Biology*, 41, 454-462.
- Bryła, M., Ksieniewicz-Wozniak, E., Waskiewicz, A., Szymczyk, K., Jedreżczak, R. (2018). Co-occurrence of nivalenol, deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside in beer samples. *Food Control*, 92, 319-324.

- Brzozowski, B., Dawidziuk, K., Bednarski, W. (2008). Gliadin degradation by proteases of *Fusarium* genus fungi in different in vivo and in vitro conditions. *Polish Journal of Natural Science*, 23,188–206.
- Buerstmayer, H., Legzdina, L., Steiner, B., Lemmens, M. (2004).Variation for resistance to Fusarium head blight in spring barley. *Euphytica*, 137, 279-290.
- Burenhult, G.(1992).Recuperado de:
<http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/19948/Ponzio,%20Nora.pdf.txt?sequence=2>
- Leonard, K.J., Bushnell, W. (2003). Fusarium head blight of wheat and barley. Minnesota, USA: APS Press.
- CAA. (2004). Código Alimentario Argentino. Recuperado de:
http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_IX.pdf
- Cai, S., Yu, G., Chen, X., Huang, Y., Jiang, X., Zhang, G., Xioli, J. (2013), Grain protein content variation and its association analysis in barley. *BMC Plant Biology*,1, 13-35.
- Calo, L., Fornelli, F., Ramires, R., Nenna, S., Tursi, A., Caiaffa, M.F., Macchia, L. (2004). Cytotoxic effects of the mycotoxin beauvericin to human cell lines of myeloid origin. *Pharmacological Research*, 49, 73-77.
- Campbell, K.A., Lipps, P.E. (1998). Allocation of resources: sources of variation in Fusarium head blight screening nurseries. *Phytopathology*, 88, 1078-1086.

- Carmona, M.A., Barreto, D., Wright, E.D. (1992). Incidencia y evolución de las enfermedades fúngicas de la cebada cervecera en la provincia de Buenos Aires (Argentina). *Revista Facultad de Agronomía*, 13, 187-192.
- Castañares, E., Albuquerque, D.R., Dinolfo, M.I., Fernández Pinto, V., Patriarca, A., Stenglein, S.A. (2014). Trichothecene genotypes and production profiles of *Fusarium graminearum* isolates obtained from barley cultivated in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 179, 57-63.
- Castañares, E. (2016). Variabilidad genética de *Fusarium graminearum*, potencial producción de toxinas y su implicancias en la calidad de los granos de cebada. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Catálogo comercial de variedades Buck de trigo y avena. (2016). Buck Semillas S.A. Recuperado de: www.semillasbuck.com.ar
- Catálogo comercial de variedades Klein de trigo pan. (2016). Klein S.A. Recuperado de: www.trigoklein.com.ar
- Cattáneo, M. (2011). Los mercados de la cebada cervecera en la Argentina y en el mundo. En: Cebada cervecera. Miralles, D.J., Benech Arnold, R.L., Abeledo, G.L. (Eds.). Buenos Aires, Argentina: Editorial FAUBA.
- Cebada Cervecera (2019). Recuperado de: <http://cebadacervecera.com.ar/cerveza-produccion-mundial-por-continente/>
- CERE. (2017). Análisis de la cadena agroindustrial de la cebada cervecera en Argentina. Recuperado de:

http://www.unsam.edu.ar/escuelas/economia/economia_regional/cebada.pdf

- CEPAL. (2014). Evaluación de impactos del cambio climático sobre la producción agrícola en la Argentina. Comisión Económica para América Latina.
- Chakraborty, S., Tiedemann, A.V., Teng, P.S. (2000). Climate change: potential impact on plant diseases. *Environmental Pollution*, 108, 317-326.
- Chalfoun, N.R., Grellet-Bourno, C., Martínez Zamora, M.G., Díaz-Perales, A., Castagnaro, A.P., Díaz-Ricci, J.C. (2013). Purification and characterization of AsEs protein: a subtilisin secreted by *Acremonium strictum* is a novel plant defense elicitor. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 14098-14113.
- Chalfoun, N.R., Durman, S.B., González Montaner, J., Resnikov, S., De Lisi, V., González, V., Moretti, E., Devani, M., Ploper, L.D., Castagnaro, A., Welin, B. (2018). Elicitor-based biostimulant PSP1 protects soybean against late season diseases in field trials. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1-14.
- Chaudhary, M., Rao, L. (2010). Brain oxidative stress after dermal and subcutaneous exposure of T-2 toxin in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3436-3442.
- Chowdhury, S.I., Wardlaw, I.F. (1978). The effect of temperature on kernel development in cereals. *Australian Journal of Agricultural Research*, 29, 205-223.

- CIMA. (2015). Cambio climático en Argentina, tendencias y proyecciones. Centro de Investigaciones del Mar y la Atmósfera.
- Colobig, M.M., Zucol, A., Brea, M., Franco, M.J., Passeggi, E., Cocco, G., Sánchez-Pinto, I. (2017). Archaeobotanical remains of Sancti Spiritus fort archaeological site, Santa Fé, Argentina. *Comechingonia*, 21, 275-304.
- Covarelli, L., Beccari, G., Prodi, A., Generotti, S., Etruschi, F., Juan, C., Ferrer, E., Mañes, J. (2016). *Fusarium* species, chemotype characterization and trichothecene contamination of durum and soft wheat in an area of central Italy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 540-551.
- Cubero, J.I. (2003). Introducción a la mejora genética vegetal. Córdoba, España: Ediciones Mundi-Prensa.
- Daniels, R. (2006). Designing great beers. USA: Brewers Publication.
- Del Ponte, E.M., Fernandes, J.M.C., Pavan, W. (2005). A risk infection simulation model for *Fusarium* head blight of wheat. *Fitopatologia Brasileira*, 30, 634–642.
- Desjardins, A.E. (2006). *Fusarium* mycotoxins. Chemistry, genetics, and biology. Minnesota, USA: APS Press.
- Dewey, D.R. (1985). The genomic system of classification as a guide to intergeneric hybridization with the perennial Triticeae. Utah, USA: Springer.

- De Wolf, E.D., Madden, L.V., Lipps, P.E. (2003). Risk assessment models for wheat *Fusarium* head blight epidemics based on within-season weather data. *Phytopathology*, 93, 428–435.
- Dinolfo, M.I., Barros, G.G., Stenglein, S.A. (2012). Development of a PCR assay to detect the potential production of nivalenol in *Fusarium poae*. *FEMS Microbiology Letters*, 332, 99-104.
- Dinolfo, M.I. (2014a). Caracterización de *Fusarium poae* mediante metodologías moleculares y su potencial producción de toxinas. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Dinolfo, M.I., Castañares, E., Stenglein, S.A. (2014b). Characterization of a *Fusarium poae* world-wide collection by using molecular markers. *European Journal of Plant Pathology*, 140, 119-132.
- Dinolfo, M.I., Martínez, M., Castañeres, E., Stenglein, S.A. (2019). Presence of *Fusarium* sensu stricto associated with triticale (x. *Triticosecale* Wittmack) in Argentina. *Spanish Journal of Agricultural Research*. In press.
- Dubin, H.J., Gilchrist, L., Reeves, J., McNab, A. (1996). *Fusarium* head scab: global status and future prospects. El Batán, Mexico: CIMMYT.
- Dweba, C.C., Figlan, S., Shimelis, H.A., Moutang, T.E., Sydenham, S., Mwadzingeni, L., Tsilo, T.J. (2017). *Fusarium* head blight of wheat: pathogenesis and control strategies. *Crop Protection*, 91, 114-122.

- EC. (2006). European Commission: commission regulation no 1881/2006 of 19 december 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuff. *Official Journal of the European Union*, 364, 5-24.
- Eggert, K., Wieser, H., Pawelzik, E. (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, 837–847.
- Eggert, K., Rawel, H.M., Pawelzik, E. (2011). *In vitro* degradation of wheat gluten fractions by *Fusarium graminearum* proteases. *European Food Research and Technology*, 233, 697-705.
- Evans, L.T., Peacock, W. (1981). *Wheat Science. Today and tomorrow*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- FAO. (1999). Importancia de la calidad e inocuidad de los alimentos para los países en desarrollo. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/x1845s/x1845s.htm>
- FAO. (2003). Manual sobre la aplicación del sistema de análisis de peligros y de puntos críticos de control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/a-y1390s.pdf>
- FAO. (2009). *FAO Agribusiness Handbook Barley-Malt-Beer*. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/a-i1003e.pdf>
- FEDNA. (2019). Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Recuperado de: <http://www.fundacionfedna.org/node/495>

- Fernandes, J.M., Cunha, G.R., Del Ponte, E. (2004). Modelling *Fusarium* head blight in wheat under climate change using linked process-based models. En: Proc. 2nd International Symposium on *Fusarium* Head Blight, Michigan State University, East Lansing, Michigan.
- Fernández Pinto, V., Terminiello, L.A., Basilico, J.C., Ritieni, A. (2008). Natural occurrence of nivalenol and mycotoxigenic potential of *Fusarium graminearum* strains in wheat affected by head blight in Argentina. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 157-162.
- García, G., Dreccer, F., Miralles, D., Serrago, R. A. (2015). High night temperatures during grain number determination reduce wheat and barley grain yield: a field study. *Global Change Biology*, 21, 4153-4164.
- García, G., Serrago, R.A., Dreccer, F., Miralles, D. (2016). Post-anthesis warm nights reduce grain weight in field-grown wheat and barley. *Field Crops Research*, 195, 50-59.
- García, G., Miralles, D., Serrago, R.A., Alzueta, I., Huth, N., Dreccer, F. (2018). Warm nights in the Argentine Pampas: Modelling its impact on wheat and barley shows yield reductions. *Agricultural Systems*, 162, 259-268.
- Ghini, R., Hamada, E., Bettiol, W. (2008). Climate change and plant diseases. *Scientia Agricola*, 65, 98-107.
- Gilbert, J., Haber, S. (2013). Overview of some recent research developments in *Fusarium* Head Blight of wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 35, 149-174.

- Glenn, A.E. (2007). Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, 137, 213-240.
- Godfray, H.C.J., Beddington, J.R., Crute, I.R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., ... Toulmin, C. (2010). Food Security: The challenge of feeding 9 billion people. *Science*, 327, 812–818.
- González Montaner, J. (2019). Todas las tecnologías pasan exámen. Jornada de actualización técnica CREA. Región Mar y Sierras, Argentina.
- Gosman, N., Bayles, R., Jennings, P., Kirby, and Nicholson, P. (2007). Evaluation and characterization of resistance to *Fusarium* head blight caused by *Fusarium culmorum* in UK winter wheat cultivars. *Plant Pathology*, 56, 264-276.
- Goyarts, T., Danicke, S. (2006). Bioavailability of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol (DON) from naturally contaminated wheat for the pig. *Toxicology letters*, 163, 171-182.
- Gunupuru, L.R., Perochon, A., Doohan, F.M. (2017). Deoxynivalenol resistance as a component of FHB resistance. *Tropical Plant Pathology*, 42, 175-183.
- Gupta, R.B., MacRitchie, F. (1991). A rapid one-step one-dimensional SDS-PAGE procedure for analysis of subunit composition of glutenin in wheat. *Journal of Cereal Science*, 14, 105-109.
- Gutleb, A., Morrison, E., Murk, A. (2002). Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 11, 309-30.

- Haidukowski, M., Pascale, M., Perrone, G., Pancaldi, D., Campagna, C., Visconti, A. (2005). Effect of fungicides on the development of *Fusarium* head blight, yield and deoxynivalenol accumulation in wheat inoculated under field conditions with *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 191-198.
- Harlan, J.R. (1971). Agricultural origins: center and noncenters. *Science*, 174, 468-473.
- Heiser, C.B. (1990). Seed to civilization. Massachusetts, USA: Harvard University Press.
- Hibberd, J.M., Whitbread, R., Farrar, J.F. (1996). Effect of 700 μmol^{-1} mol CO_2 and infection with powdery mildew on the growth and carbon partitioning of barley. *New Phytologist*, 134, 309-315.
- Hohn, T.M., Beremand, P.D. (1989). Isolation and nucleotide sequence of a sesquiterpene cyclase gene from the trichothecene-producing fungus *Fusarium sporotrichioides*. *Gene*, 79, 131-138.
- Horvat, D., Spanic, V., Dvojkovic, K., Simic, G., Magdic, D., Nevistic, A. (2015). The influence of *Fusarium* infection on wheat (*Triticum aestivum* L.) proteins distribution and baking quality. *Cereal Research Communication*, 43, 61-71.
- Hooker, D.C., Schaafsma, A.W., Tamburic-Ilincic, L. (2002). Using weather variables pre- and post-heading to predict deoxynivalenol content in winter wheat. *Plant Disease*, 86, 611-619.

- Hysing, S.C., Wiik, L. (2014). *Fusarium* seedling blight of wheat and oats: effects of infection level and fungicide seed treatments on agronomic characters. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science*, 64, 537-546.
- INASE (2019). Catálogo Nacional de Cultivares. Recuperado de: <https://gestion.inase.gov.ar/consultaGestion/gestiones>
- Infantino, A., Santori, A., Shah, D.A. (2012). Community structure of the *Fusarium* complex on wheat seed in Italy. *European Journal of Plant Pathology*, 132, 499-510.
- Ingram, D.S. (1999). Biodiversity, plant pathogens and conservation. *Plant Pathology*, 48, 433-442.
- INIA (1991). Calidad industrial de la cebada cervecera. Recuperado de: <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/111219220807120028.pdf>
- IPCC, 2007. Climate change 2007: the physical science basis. Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge, New York: Cambridge University Press.
- IPCC, 2014. Climate change 2014: synthesis report. Intergovernmental Panel on Climate Change. Geneva, Switzerland.
- Ireta Moreno, J., Bekele, G.T. (1989). Histopatología de la penetración de *Fusarium graminearum* Schw. en trigo. En: Taller sobre la fusariosis de la espiga en América del sur, Encarnación del Paraguay. Kohli, M.M. (Ed.) México: CIMMYT.

- Ireta Moreno, J., Gilchrist, L. (1994). Roña o tizón de la espiga de trigo (*Fusarium graminearum* Schwabe). México: CIMMYT.
- ISTA. (2017). International rules for seed testing: The international Seed Testing Association (ISTA). Zürichstr. 50, CH-8303 Bassersdorf, Switzerland.
- Jennings, P., Coates, M.E., Walsh, K., Turner, J.A., and Nicholson, P. (2004). Determination of deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat crops in England and Wales. *Plant Pathology*, 53, 643-652.
- Jestoi, M.N., Paavanen-Huhtala, S., Parikka, P., Yli-Mattila, T. (2008). *In vitro* and *in vivo* mycotoxin production of *Fusarium* species isolated from Finnish grains. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 41, 545-558.
- Jones, R.K. (2000). Assessments of *Fusarium* head blight of wheat and barley in response to fungicide treatment. *Plant Disease*, 84, 1021-1030.
- Juroszek, P., von Tiedemann, A. (2013). Climate change and potential future risks through wheat diseases: a review. *European Journal of Plant Pathology*, 136, 21-33.
- Kaukoranta, T. (1996). Impact of global warming on potato late blight: risk, yield loss, and control. *Agricultural and Food Science*, 5, 311-327.
- Kimball, B.A., Kobayashi, K., Bindi, M. (2002). Responses of agricultural crops to free-air CO₂ enrichment. *Advances in Agronomy*, 77, 293–368.
- Kimura, M., Matsumoto, G., Shingu, Y, Yoneyama, K., Yamaguchi, I. (1998). The mystery of the *trichothecene 3-O-acetyltransferase* gene analysis of

the region around *Tri101* and characterization of its homologue from *Fusarium sporotrichioides*. *FEBS Letters*, 435, 163-168.

Kimura, M., Tokai, T., O'Donnell, K., Ward, T.J., Fujimura, M., Hamamoto, H., Shibata, T., Yamaguchi, I. (2003). The trichothecen biosynthesis gene cluster of *Fusarium graminearum* F15 contains a limited number of essential pathway genes and expressed non-essential genes. *FEBS Letters*, 359, 105-110.

Knudsen, K.E.B. (2014). Fiber and nonstarch polysaccharide content and variation in common crops used in broiler diets. *Poultry Science*, 93, 2380-2393.

Kohli, M.M. (1989). Análisis de la fusariosis de trigo en el Cono Sur. En: Taller sobre la fusariosis de la espiga en América del sur, Encarnación del Paraguay. Kohli, M.M. (Ed.) México: CIMMYT.

Kohli, M.M., Annone, J.G., Galich, M.T.V. (1995). Fusariosis de la espiga y su manejo. En: Curso de manejo de enfermedades del trigo. Kohli, M.M., Annone, J.G., García, R. (Eds.) Pergamino, Argentina: Editorial INTA.

Ladizinsky, G. (1985). Recuperado de: <http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/19948/Ponzio,%20Nora.pdf.txt?sequence=2>

Lawlor, P.G., Lynch, P.B. (2001). Mycotoxins in pig feeds: source of toxins, prevention and management of mycotoxicosis. *Irish Veterinary Journal*, 54, 117-120.

- Le Bail, B., Verger, P. (2005). Simulation of consumer exposure to deoxynivalenol according to wheat crop management and grain segregation: case studies and methodological considerations. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 42, 253-259.
- Lee, T., Han, Y-K., Kim, K.-H., Yun, S.-H., Lee, Y-W. (2002). *Tri13* and *Tri7* determine deoxynivalenol and nivalenol producing chemotypes of *Gibberella zea*. *Applied Environmental and Microbiology*, 68, 2148-2154.
- Lenth, R.V. (2019). emmeans: estimated marginal means, a.k.a. least-squares means. R package version 1.3.0. Recuperado de: <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>
- León, A.E., Rosell, C.M. (2007). De tales harinas, tales panes. Granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica. Buenos Aires, Argentina: Baez Impresiones.
- Lerner, S.E., Cogliatti, M., Ponzio, M.L., Seghezzo, Molfese, E.R., Rogers, W.J. (2004). Genetic variation for grain protein components and industrial quality of durum wheat cultivars sown in Argentina. *Cereal Chemistry*, 40, 161-166.
- Leslie, J.F., Summerell, B.A. (2006). The *Fusarium* Laboratory Manual. Iowa, USA: Blackwell Ames.
- Lewandowski, S.M., Bushnell, W.R., Evans, C.K. (2006). Distribution of mycelial colonies and lesions in field-grown barley inoculated with *Fusarium graminearum*. *Phytopathology*, 96, 567-581.

- Lobell, D.B., Ortiz-Monasterio, J.I. (2007). Impacts of day versus night temperatures on spring wheat yields: a comparison of empirical and CERES model predictions in three locations. *Agronomy Journal*, 99, 469-477.
- Lori, G.A., Carranza, M.R., Violante, A., Rizzo, I., Alippi, H. (1992). *Fusarium* spp. en trigo, capacidad toxicogénica y quimiotaxonomía de las cepas aisladas en la Argentina. *Agronomie*, 12, 459-467.
- Lori, G.A., Sisterna, M.N., Sarandón, S.J., Rizzo, I., Chidichimo, H. (2009). *Fusarium* head blight in wheat: Impact of tillage and other agronomic practices under natural infection. *Crop Protection*, 28, 495-502.
- Mackintosh, C.A., Garvin, D.F., Radmer, L.E., Heinen, S.J., Muehlbauer, G.J. (2006). A model wheat cultivar for transformation to improve resistance to *Fusarium* head blight. *Plant Cell Reports*, 25, 313-319.
- Madgwick, J.W., West, J.S., White, R.P., Semenov, M.A., Townsend, J.A., Turner, J., Fitt, B. (2011). Impacts of climate change on wheat anthesis and *Fusarium* ear blight in the UK. *European Journal of Plant Pathology*, 130, 117-131.
- Magan, N., Medina, A., Aldred, D. (2011). Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and postharvest: mycotoxins and climate change. *Plant Pathology*, 60, 150-163.
- Magrin, G.O., Travasso, M.I., Rodriguez, G.R. (2009). Climate change and wheat production in Argentina. *International Journal of Global Warming*, 1, 214-226.

- Maiorano, A., Blandino, M., Reyneri, A., Vanara, F. (2007). Effects of maize residues on the *Fusarium* spp. infection and deoxynivalenol (DON) contamination of wheat grain. *Crop Protection*, 27, 182-188.
- Malaissi, T. (2016). Fusariosis de la espiga de trigo: las malezas como fuente de inóculo. Tesis de Grado. Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Mallmann, C.A., Dilkin, P. (2011). Mycotoxins and mycotoxicosis in swine. Douglas, Z. (Ed.). Brasil: Special Nutrients Inc.
- Manstretta, V., Morcia, C., Terzi, V., Rossi, V. (2016). Germination of *Fusarium graminearum* ascospores and wheat infection are affected by dry periods and by temperature and humidity during dry periods. *Phytopathology*, 106, 262-269.
- Marasas, W.F.O, Nelson, P.E., Toussoun, T.A. (1984). Toxigenic *Fusarium* species: identity and mycotoxicology. Pennsylvania, USA: APS Press.
- Martin, C., Schöneberg, T., Vogelgsang, S., Mendes Ferreira, C.S., Morisoli, R., Bertossa, M., Bucheli, T., Mauch Mani, B., Mascher, F. (2018). Responses of oat grains to *Fusarium poae* and *F. langsethiae* infections and mycotoxin contaminations. *Toxins*, 10, 47.
- Martínez, M., Castañares, E., Dinolfo, M.I., Pacheco, W.G., Moreno, M.V., Stenglein, S.A. (2014). Presencia de *Fusarium graminearum* en muestras de trigo destinado al consumo humano. *Revista Argentina de Microbiología*, 46, 41-44.

- Martínez, M.I., Moschini, R. (2018). Fusariosis de la espiga: condiciones metereológicas campaña 2018/2019. Argentina: Editorial INTA.
- Martínez, M., Dinolfo, M.I., Castañares, E., Stenglein, S.A. (2019). *Fusarium graminearum* sensu stricto associated with head blight on rye (*Secale cereale* L.) in Argentina. *Journal of Plant Protection Research*, 59, 287-292.
- Matz, S.A. (1999). Bakery Technology and Engineering. USA: Springer.
- Mazzilli, S., Pérez, C., Ernst, O. (2007). Fusariosis de la espiga en trigo: características de la enfermedad y posibilidades de uso de modelos de predicción para optimizar el control químico. *Agrociencia*, 11, 11-21.
- McCormick, S.P., Stanley, A.M., Stover, N.A., Alexander, N.J. (2011). Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. *Toxins*, 3, 802-814
- McMullen, M., Jones, R., Gallemborg, D. (1997). Scab of wheat and barley: a emerging disease of devastating impact. *Plant Disease*, 81, 1340-1348.
- McMullen, M., Bergstrom, G., De Wolf, E., Dill-Macky, R., Hershman, D., Shaner, G., Van Sanford, D. (2012). A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: *Fusarium* head blight. *Plant Disease*, 96, 1712-1728.
- Medina, A., Rodriguez, A., Magan, N. (2015). Climate change and mycotoxigenic fungi: impacts on mycotoxin production. *Current Opinion in Food Science*, 5, 99-104.

- Medina, A., Akbar, A., Baazeem, A., Rodriguez, A., Magan, N. (2017a). Climate change, food security and mycotoxins: Do we know enough?. *Fungal Biology Reviews*, 31, 143-154.
- Medina, A., González Jartin, J.M., Sainz, M.J. (2017b). Impact of global warming on mycotoxins. *Current Opinion in Food Science*, 18, 76-81.
- Mesterházy, A., Bartók, T. (1996). Control of *Fusarium* head blight of wheat by fungicides and its effect on the toxin contamination of the grains. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 49, 181-198.
- Mesterházy, Á. (2002). Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and in resistance to *Fusarium* head blight. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 675-684.
- Miedaner, T., Schilling, A.G., Geiger, H.H. (2004). Competition effects among isolates of *Fusarium culmorum* differing in aggressiveness and mycotoxin production on heads of winter rye. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 63-70.
- Miller, J.D. (1989). Biochemical nature of mycotoxins and host resistance. En: Taller sobre la fusariosis de la espiga en América del sur. Kohli, M.M. (Ed.) México: CIMMYT.
- Miller, J.D. (1994). Epidemiology of *Fusarium* ear diseases of cereals. En: Mycotoxins in grain. Minnesota, USA: Eagan Press.
- Ministerio de Hacienda. (2018). Informes de cadena de valor: Trigo. Recuperado de: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/sspmicro_cadenas_de_valor_trigo.pdf

- Miraglia, M., Marvin, H.J.P., Kleter, G.A., Batilanni, P., Brera, C., Coni, E. (2009). Climate change and food safety: An emerging issue with special focus on Europe. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1009-1021.
- Miralles, D.J., Benech Arnold, R.L., Abeledo, G.L. (2011). Cebada cervecera. Buenos Aires, Argentina: Editorial FAUBA.
- Miralles, D.J., González, F.G., Abeledo, L.G., Serrago, R.A., Alzueta, I., García, G.A., de San Caledonio, R.P., Lo Valvo, P. (2014). Manual de trigo y cebada para el Cono Sur : procesos fisiológicos y bases de manejo. Buenos Aires, Argentina: Orientación Gráfica Editora.
- Molfese, E.R., Seghezzo, M.L. (2013). Panorama complicado 2012/2013: escasa cantidad de trigo de baja calidad. Recuperado de: <http://inta.gob.ar/documentos/panorama-complicado-2012-2013-escasa-cantidad-de-trigo-de-baja-calidad/>
- Moschini, R.C., Fortugno, C. (1996). Predicting wheat head blight incidence using models based on meteorological factors in Pergamino, Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, 102, 211-218.
- Moschini, R.C., Martínez, M.I., Sepulcri, M.G. (2013). Modeling and forecasting systems for *Fusarium* head blight and deoxynivalenol content in wheat in Argentina. En: *Fusarium* head blight in Latin America. Dordrecht, Netherlands: Springer.
- Mourellos, C.A., Malbrán, I., Balatti, P.A., Ghiringhelli, P.D., Lori, G.A. (2014). Gramineous and non-gramineous weed species as alternative hosts of

- Fusarium graminearum*, causal agent of *Fusarium* head blight of wheat, in Argentina. *Crop Protection*, 65, 100-104.
- Muriuki, J.G. (2001). Deoxynivalenol and nivalenol in pathogenesis of *Fusarium* head blight in wheat. Tesis de Doctorado. University of Minnesota, Minnesota, USA.
- Nagashima, H., Nakagawa, H., Iwashita, K. (2006). Cytotoxic effects of nivalenol on HL60 cells. *Mycotoxins*, 56, 65-70.
- Namatame, I., Tomoda, H., Ishibashi, S., Omura, S. (2004). Antiatherogenic activity of fungal beauveriolides, inhibitors of lipid droplet accumulation in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 737-742.
- Nazari, L., Patteri, E., Manstretta, V., Terzi, V., Morcia, C., Somma, S., Moretti, A., Ritieni, A., Rossi, V. (2018). Effect of the temperature on growth, wheat head infection, and nivalenol production by *Fusarium poae*. *Food Microbiology*, 76, 83-90.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Marasas, W.F.O. (1983). *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. USA: Pennsylvania State University Press.
- Nielsen, L.K., Cook, D.J., Edwards, S.G., Ray, R.V. (2014). The prevalence and impact of *Fusarium* head blight pathogens and mycotoxins on malting barley quality in UK. *International Journal of Food Microbiology*, 179, 38-49.

- Nightingale, M.J., Marchylo, J.E., Clear, R.M., Dexter, J.E., Preston K.R. (1999). *Fusarium* head blight: effect of fungal proteases on wheat storage proteins. *Cereal Chemistry*, 76, 150-158.
- Nogueira, M., Decundo, J., Martínez, M., Dieguez, S., Moreyra, F., Moreno, M., Stenglein, S.A. (2018). Natural contamination with mycotoxins produced by *Fusarium graminearum* and *Fusarium poae* in malting barley in Argentina. *Toxins*, 10, 78.
- Nuevo Diccionario Ilustrado de Micología. (2006). Ulloa, M., Hanlin, R.T. (Eds.). Minnesota, USA: APS Press.
- O'Donnell, K., Ward, T.J., Aberra, D., Kistler, H.C., Aoki, T., Orwig, N., Kimura, M., Bjornstad, A., Klemsdal, S.S. (2008). Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. *Fungal Genetics and Biology*, 45, 1514-1522.
- Papadopoulou-Bourai, A., Vrabcheva, T., Valzacchi, S., Stroka, J., Anklam, E. (2004). Screening survey of deoxynivalenol in beer from the European market by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Food Additives and Contaminants*, 21, 607-617.
- Parry, D.W., Jenkinson, P., Mcleod, L. (1995). *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals: A review. *Plant Pathology*, 44, 207-238.
- PAS. (2019). Panorama agrícola semanal: Bolsa de cereales. Recuperado de: www.bolsadecereales.com

- Passarella, V.S., Savin, R., Slafer, G.A. (2002). Grain weight and malting quality in barley as affected by brief periods of increased spike temperature under field conditions. *Australian Journal of Agricultural Research*, 53, 1219-1277.
- Paterson, R., Rusell, M. (2010). How will climate change affect mycotoxins in food?. *Food Research International*, 43, 1902-1914.
- Paulitz, T.C. (1996). Diurnal release of ascospores by *Gibberella zeae* in inoculated wheat plots. *Plant Disease*, 80, 674-678.
- Pekkarinen, A.I., Sarlin, T.H., Laitila, A.T., Haikara, A.I., Jones, B.L. (2003) *Fusarium* species synthesize alkaline proteinases in infested barley. *Journal of Cereal Science*, 37, 349-356.
- Peña, R.J., Trethowan, R., Pfeiffer, W.H., Ginkel, M.V. (2002). Quality (end-use) improvement in wheat: compositional, genetic, and environmental factors. *Journal of Crop Production*, 5, 1-37.
- Peplow, A.W., Meek, I.B., Wiles, M.C., Philips, T.D., Beremand, M.N. (2003). *Tri16* required for esterification of position C-8 during trichothecene mycotoxin production by *Fusarium sporotrichioides*. *Applied Environmental and Microbiology*, 69, 5935-5940.
- Pereyra, S., Lori, G.A. (2013). Crop residues and their management of *Fusarium* Head Blight. En: *Fusarium* head blight in Latin America. Alconada Magliano, T.M., Chulze S.N. (Eds.). Berlín, Alemania: Springer.

- Phalip, V., Delalande, F., Carapito, C., Goubet, F., Hatsch, D., Leize-Wagner, E. (2005). Diversity of the exoproteome of *Fusarium graminearum* grown on plant cell wall. *Current Genetics*, 48, 366–379.
- Pirgozliev, S.R., Edwards, S.G., Hare, M.C., Jenkinson, P. (2003). Strategies for the control of *Fusarium* head blight in cereals. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 731-742.
- Pitt, J.I. (1996). What are mycotoxins?. *Australian Mycotoxin Newsletter*, 7, 1-4.
- Placinta, C., D’Mello, J., McDonald, A. (1999). A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed by *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 78, 21-37.
- Ponzio, N.R. (2010). Calidad panadera de variedades de trigo puras y sus mezclas. Influencia del agregado de aditivos. Tesis de Magister Scientiae. Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Prandini, A., Sigolo, S., Filippi, L., Battilani, P., Piva, G. (2009). Review of predictive models for *Fusarium* Head Blight and related mycotoxin contamination in wheat. *Food and Chemical Technology*, 47, 927-931.
- Ramírez Albuquerque, L.D., Patriarca, A., Fernández Pinto, V. (2019). Can discrepancies between *Fusarium graminearum* trichothecene genotype and chemotype be explained by the influence of temperature in the relative production of 3-ADON and 15-ADON?. *Fungal Biology*. In press.
- R Core Team. (2018). R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.

- Reid, L.M., Zhu, A.X. (2000). Pre-harvest accumulation of deoxynivalenol in sweet corn ears inoculated with *Fusarium graminearum*. *Food additives and Contaminants*, 17, 689-701.
- Reis, E.M. (1988). Doencas do trigo III. Gibberella. Sao –Paulo (2ª Edicao revista ampliada).
- Reis, E.M. (1989). Fusariosis: Biología y Epidemiología de *Gibberella zeae* en trigo. En: Taller sobre la fusariosis de la espiga en América del Sur. Kohli M. M. (Eds.) México DF, México: CIMMYT.
- Reis, E.M., Carmona, M. (2002). Fusariosis del trigo Biología, epidemiología y estrategias para su manejo. Buenos Aires, Argentina: BASF Argentina S.A.
- Reis, E.M., Carmona, M. (2013). Integrated disease management of *Fusarium* head blight. En: *Fusarium* head blight in Latin America. Alconada Magliano, T.M., Chulze, S.N. (Eds.) Berlín, Alemania: Springer.
- Reynoso, M.M., Ramírez, M.L., Torres, A.M., Chulze, S.N. (2011). Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* strains isolated from wheat in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 444-448.
- Rossi, V., Giosue, S., Patteri, E., Spanna, F., Del Vecchio, A. (2003). A model estimating the risk of *Fusarium* head blight on wheat. *EPPO Bulletin*, 33, 421-425.
- Rotter, B.A., Prelusky, D.B., Pestka, J.J. (1996). Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 48, 1-34.

- Russell, P., Nelson, L. (2010). How will climate change affect mycotoxins in food. *Food Research International*, 43, 1902-1914.
- Sabburg, R., Obanor, F., Aitken, E., Chakraborty, S. (2015). Changing fitness of a necrotrophic plant pathogen under increasing temperature. *Global Change Biology*, 21, 3126-3137.
- Saccardo, P.A. (1886). *Sylloge Fungorum Omnium Hucusque Cognitorum*.
Edwards Brothers, Ann Arbor, MI.
- SAGPyA. (2006). Programa Nacional de Calidad de Trigo. Recuperado de:
http://www.minagri.gob.ar/DIMEAGRO/calidad_trigo/publicaciones
- Salgado-Albarrán, M., Herrera-Díaz, J., Dinkova, T.D. (2015). Caracterización de patrones de hordeínas en variedades mexicanas de cebada maltera. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químicas-Biológicas*, 18, 43-51.
- Salas, B., Steffenson, B.J., Casper, H.H., Tacke, B., Prom, L.K., Fetch, Jr., T.G., Schwarz, P.B. (1999). *Fusarium* species pathogenic to barley and their associated mycotoxins. *Plant Disease*, 83, 667-674.
- Santa Cecilia Montilva, B. (2014). Estudios sobre las hidrofobinas de clase II. Tesis de grado. Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España.
- Sarlin, T., Laitila, A., Pekkarinen, A., Haikara, A. (2005). Effects of three *Fusarium* species on the quality of barley and malt. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 63,43-49.
- Satorre, E.H., Benech Arnold, R.L., Slafer, G.A., de la Fuente, E.B., Miralles, D.J., Otegui, M.E., Savin, R. (2003). Producción de granos. Bases funcionales para su manejo. Buenos Aires, Argentina: Editorial FAUBA.

- Savin, R., Nicolas, M.E. (1996). Effects of short periods of drought and high temperature on grain growth and starch accumulation of two malting barley cultivars. *Australian Journal of Plant Physiology*, 23, 201-210.
- Savin, R., Aguinaga, A.A. (2011). Los requerimientos de la industria: calidad comercial e industrial y sus determinantes. En: Cebada cervecera. Miralles, D.J., Benech Arnold, R.L., Abeledo, G.L. (Eds.). Buenos Aires, Argentina: Editorial FAUBA.
- Schaafsma, A.W., Tamburic-Ilinic, L., Miller, J.D., Hooker, D.C. (2001). Agronomic considerations for reducing deoxynivalenol in wheat grain. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 23, 279-285.
- Schaafsma, A.W., Hooker, D.C. (2007). Climatic models to predict occurrence of *Fusarium* toxins in wheat and maize. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 116-125.
- Schöneberg, T., Musa, T., Forrer, H.R., Mascher, F., Bucheli, T.D., Bertossa, M., Keller, B., Vogelgsang, S. (2018). Infection conditions of *Fusarium graminearum* in barley are variety specific and different from those in wheat. *European Journal of Plant Pathology*, 151, 975-989.
- Schwarz, P.B., Jones, B.L., Steffenson, B.J. (2002) Enzymes associated with *Fusarium* infection of barley. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 60, 130-134.
- Schwarz, P.B., Horsley, R.D., Steffenson, B.J., Salas, B., Paul, S., Barr, J.M. (2006). Quality risks associated with the utilization of *Fusarium* head

- blight infected malting barley. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 64, 1-7.
- Shewry, P.R., Halford, N.G. (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany*, 53, 947-958.
- Shin, S., Son, J.H., Park, J.C., Kim, K.H., Yoon, Y., Cheong, Y.K.,...Kang, C.S. (2018). Comparative pathogenicity of *Fusarium graminearum* isolates from wheat kernels in Korea. *Plant Pathology Journal*, 34, 347-355.
- Siebold, M., von Tiedemann, A. (2012). Potential effects of global warming on oilseed rape pathogens in Northern Germany. *Fungal Ecology*, 5, 62-72.
- SIIA. (2014). Sistema Integrado de Información Agropecuaria: Estadísticas, Agricultura, Trigo. Recuperado de : <http://www.siiia.gov.ar/serie>
- Simmonds, D.H. (1989). Wheat and wheat quality in Australia. Melbourne, Australia: CSIRO Publishing.
- Slafer, G.A., Kantolic, A.G., Appendino, M.L., Miralles, D. J., Savin, R. (2009). Crop Development: Genetic Control, Environmental Modulation and Relevance for Genetic Improvement of Crop Yield. En: Crop Physiology. Sadras, V., Calderini, D. (Eds.). San Diego, USA: Academic Press.
- Skelsey, P., Newton, A.C. (2015). Future environmental and geographic risks of *Fusarium* head blight of wheat in Scotland. *European Journal of Plant Pathology*, 142, 133–147.

- Steffenson, B.J., Casper, H.H., Tacke, B., Prom, L.K., Fetch, T.G., Schwarz, P.B. (1999). *Fusarium* species pathogenic to barley and their associated mycotoxins. *Plant Disease*, 83, 667-674.
- Steiner, B., Buertmayr, M., Michel, S., Schweiger, W., Lemmens, M., Buertmayr, H. (2017). Breeding strategies and advances in line selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Tropical Plant Pathology*, 42, 165-174.
- Stenglein, S.A., Barreto, D., Nicholson, P., Chandler, E., Brambilla, V., Piris, E.M., Saliva, V., Mitidieri, M., Salerno, G. (2009). First report of *Fusarium poae* on tomato in Argentina. *Plant Pathology*, 58, 401-410.
- Stenglein, S.A. (2010). La importancia del género *Fusarium*. *Énfasis en Alimentación*, 1, 44-46.
- Stenglein, S.A., Dinolfo, M.I., Bongiorno, F., Moreno, M.V. (2012). Response of wheat and barley to *Fusarium poae*. *Agrociencia*, 46, 299-306.
- Stenglein, S.A., Dinolfo, M.I., Barros, G., Bongiorno, F., Chulze, S.F., Moreno, M.V. (2014). *Fusarium poae* pathogenicity and mycotoxin accumulation on selected wheat and barley genotypes at a single location in Argentina. *Plant Disease*, 98, 1733-1738.
- Steyn, P.S. (1995). Mycotoxins, general view, chemistry and structure. *Toxicological Letters*, 82, 843-851.

- Stones, P.J., Nicolas, M.E. (1994). Wheat cultivars vary widely in their responses of grain yield and quality to short periods of post-anthesis heat stress. *Functional Plant Biology*, 21, 887-900.
- Stones, P.J., Nicolas, M.E. (1996). Effect of timing of heat stress during grain filling on two wheat varieties differing in heat tolerance. II. Fractional protein accumulation. *Functional Plant Biology*, 23, 739-749.
- Strange, R.N., Majer, J.R., Smith, M. (1974). The isolation and identification of choline and betaine as two major components in anthers and wheat germ that stimulate *Fusarium graminearum* in vitro. *Physiological Plant Pathology*, 4, 277-290.
- Strange R.N., Smith M. (1978). Specificity of choline and betaine as stimulants of *Fusarium graminearum*. *Transactions British Mycological Society*, 70, 187-192.
- Summerell, B.A., Leslie, J.F., Blackhouse, D., Bryden, W.L., Burgess, L.W. (2001). *Fusarium* Paul Nelson Memorial Symposium. Minnesota, USA: APS Press.
- Sugiura, Y., Watanabe, Y., Tanaka, T., Yamamoto, S., Ueno, Y. (1990). Occurrence of *Gibberella zeae* strains that produce both nivalenol and deoxynivalenol. *Applied Environmental Microbiology*, 56, 3047-3051.
- Sutton, J.C. (1982). Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 4, 195-209.

- Sypecka, Z., Kelly, M., Brereton, P. (2004). Deoxynivalenol and zearalenone residues in eggs of laying hens fed with a naturally contaminated diet: effects on egg production and estimation of transmission rates from feed to egg. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5463-5471.
- Thrane, U., Adler, A., Clasen, P., Galvano, F., Langseth, W., Lew, H., Logrieco, A., Nielsen, K., Ritieni, A. (2004). Diversity in metabolite production by *Fusarium lansethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium sporotrichioides*. *International Journal of Food Microbiology*, 95, 257-266.
- Tubiello, F.N., Soussana, J.F., Howden, M.S. (2007). Crop and pasture response to climate change. *PNAS*, 104, 19686-19690.
- Turner, J.A., Jennings, P. (1997). The effect of increasing humidity on *Fusarium* ear blight and grain quality. *Cereal Research Communication*, 25, 825-826.
- USDA. (2019). Grain: World markets and trade. Recuperado de: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/grain.pdf>
- van der Fels-Klerx, H.J., van Asselt, E.D., Madsen, M.S., Olesen, J.E. (2013). Impact of climate change effects on contamination of cereal grains with deoxynivalenol. *Plos One*, 8, 1-10.
- van der Fels-Klerx, H.J. (2014). Evaluation of performance of predictive models for deoxynivalenol in wheat: models for deoxynivalenol in wheat. *Risk Analysis*, 34, 380-390.

- van der Fels-Klerx, H.J., Liu, C., Battilani, P. (2016). Modelling climate change impacts on mycotoxin contamination. *World Mycotoxin Journal*, 9, 717-726.
- Van der Lee, T., Zhang, H., van Diepeningen, A., Waalwijk., C. (2015). Biogeography of *Fusarium graminearum* species complex and chemotypes: a review. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 32, 453-460.
- Vary, Z., Mullins, E., McElwain, J.C., Doohan, F. (2015). The severity of wheat diseases increases when plants and pathogens are acclimatized to elevated carbon dioxide. *Global Change Biology*, 21, 2661-2669.
- Vaughan, M., Backhouse, D., Del Ponte, E.M. (2016). Climate change impacts on the ecology of *Fusarium graminearum* species complex and susceptibility of wheat to *Fusarium* head blight: a review. *World Mycotoxin Journal*, 9, 685-700.
- Villar de Galich, M. (2002). Fusariosis de la Espiga del Trigo. En: Trigo: Actualización 2002. Franchina, J., Saavedra, A., Segura, L. (Eds.) Argentina: INTA.
- Vismer, H.F., Marasas, W.F.O, Rheeder, J.P., Joubert, J.J. (2002). *Fusarium dimerum* as a cause of human eye infections. *Medical Mycology*, 40, 399-406.
- Vogelgsang, S., Sulyok, M., Hecker, A., Jenny, E., Krska, R., Schuhmacher, R., Forrer, H.R. (2008). Toxigenicity and pathogenicity of *Fusarium poae* and

- Fusarium avenaceum* on wheat. *European Journal of Plant Pathology*, 122, 265-276.
- Vogelgsang, S., Pasquali, M., Jenny, E., Musa, T., Bucheli, T., Wettstein, F., Forrer, H. (2019). An eight-year survey of wheat shows distinctive effects of cropping factors on different *Fusarium* species and associated mycotoxins. *European Journal of Agronomy*, 105, 62-77.
- Von der Ohe, C., Miedaner, T. (2010). Competitive aggressiveness in binary mixtures of *F. graminearum* and *F. culmorum* isolates inoculated on spring wheat with highly effective resistance QTL. *Journal of Phytopathology*, 159, 401-410.
- Wan, M.Y.L., Turner, P.C., El-nezami, H. (2013). Individual and combined cytotoxic effects of *Fusarium* toxins (deoxynivalenol, nivalenol, zearalenone and fumonisins B1) on swine jejunal epithelial cells. *Food and Chemical Toxicology*, 57, 276-283.
- Wang, J., Wieser, H., Pawelzik, E., Weinert, J., Keutgen, A.J., Wolf, G.A. (2005). Impact of the fungal protease produced by *Fusarium culmorum* on the protein quality and bread making properties of winter wheat. *European Food Research and Technology*, 220, 552–559.
- Watkins, J.E., Boosalis, M.G. (1994). Plant disease incidence as influenced by conservation tillage systems. En: *Managing agricultural residues*. Unger, P.W. (Ed.). Florida, USA: CRC Press.
- West, J.S., Holdgate, S., Townsend, J.A., Edwards, S.G., Jennings, P., Fitt, B.D.L. (2012). Impacts of changing climate and agronomic factors on

- Fusarium* ear blight of wheat in the UK. *Fungal Ecology*, 5, 53-61.
- Wiese, M.V. (1977). Compendium of wheat diseases. Minnesota, USA: APS Press.
- Wilson, W., Dahl, B., Nganje, W. (2018). Economic costs of *Fusarium* head blight, scab and deoxynivalenol. *World Mycotoxin Journal*, 11, 291-302.
- Williams, J., Kubelik, A., Livak, K., Rafalski, J., Tingey, S. (1989). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 6531-6535.
- Windels, C.E. (1991). Current status of *Fusarium* taxonomy. *Phytopathology*, 81, 1048-1051.
- Wittwer, S.H. (1995). Food, climate and carbon dioxide. The Global Environment and World Food Production. Florida, USA: CRC Press, Boca Raton.
- Xu, X. (2003). Effects of environmental conditions on the development of *Fusarium* ear blight. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 683-689.
- Xu, X.M., Monger, W., Ritieni, A., Nicholson, P. (2007). Effect of temperature and duration of wetness during initial infection periods on disease development, fungal biomass and mycotoxin concentrations on wheat inoculated with single, or combinations of, *Fusarium* species. *Plant Pathology*, 56, 943-956.
- Xu, X., Nicholson, P. (2009). Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 83-103.

- Xue, A. G., Chen, Y., Seifert, K., Guo, W., Blackwell, B.A., Harris, L.J., Overy, D.P. Prevalence of *Fusarium* species causing head blight of spring wheat, barley, and oat in Ontario during 2001-2017. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 41, 392-402.
- Yiannikouris, A., Jouany, J.P. (2002). Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Animal Research*, 51, 81-99
- Zadoks, J. C., Chang, T. T., Konzak, C. F. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed research*, 14, 415-421.
- Zhang, X., Halder, J., White, R.P., Hughes, D.J., Ye, Z., Wang, C., Xu, R., Gan, B., Fitt, B.D.L. (2014). Climate change increases risk of fusarium ear blight on wheat in central China: *Fusarium* and climate change in China. *Annals of Applied Biology*, 164, 384-395.
- Zohary, D., Hopf, M., Weiss, E. (2012). Domestication of plants in the old world: the origin and spread of domesticated plants in southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin. Oxford, UK: Oxford University Press.

ANEXO I

NORMAS

DE

COMERCIALIZACIÓN

Norma de comercialización de cebada cervecera*(Hordeum vulgare L.)***NORMA V (ANEXO C)**

RUBROS	BASE S	TOLERANCIA DE RECIBO	BONIFICACIONES	REBAJAS	OBSERVACIONES
CAPACIDAD GERMINATIVA	98% mín.	95% mín.	-----	Para valores inferiores a 98% y hasta 95% se rebajará a razón de 1% por cada por ciento.	-----
DESECHOS TOTALES	---	5% máx.	Para valores inferiores a 5% se bonificará a razón de 1% por cada por ciento o fracción proporcional.	-----	-----
BAJO ZARANDA DE 2,2 mm.	---	3% máx.	-----	Para valores superiores al 3% se rebajará a razón del 1% por c/% o fracción proporcional.	-----
GRANOS QUEBRADOS, PARTIDOS, PELADOS, MAT. EXT. Y GRANOS DAÑADOS.	---	2% máx. (1)	-----	Para valores superiores al 2% se rebajará a razón del 1% por c/% o fracción proporcional.	En los casos en que los análisis arrojen valores superiores a los establecidos como máximo para los rubros parciales: picados, mat. ext. y carbón se practicarán rebajas del 1% por c/% o fracción proporcional de excedente, aunque la suma total no supere el 2% establecido como tolerancia.
CALIBRE sobre zaranda de 2,5 mm.	---	85% mín.	-----	-----	-----
PROTEINAS S.S.S.	---	12% máx.	-----	-----	-----
HUMEDAD	12%	12,5% máx.	Para valores inferiores al 12%, se bonificará a razón de 1,2% por cada % o fracción proporcional.	Para mercadería que exceda el 12,5% se aplicará una merma conforme a la fórmula siguiente.	$\text{Merma (\%)} = \frac{Hi - Hf}{100 - Hf} \times 100$ Hi: Humedad inicial Hf: Humedad final

Libre de insectos y arácnidos vivos: (1) Incluido: 0,2% máximo de carbón; 0,5% máximo de granos picados; 1,0% máximo de materias inertes y semillas extrañas.

Norma de comercialización de trigo pan*(Triticum aestivum L.)*

Con vigencia a partir del 01 de octubre de 2006

Grado	Peso Hectolítrico (Kg/hL)	Materias Extrañas	Granos dañados		Granos con carbón	Granos panza blanca	Granos quebrados y/o chuzos
			Ardidos y/o Dañados por calor	Total dañados			
1	79	0,2%	0,5%	1%	0,1%	15%	0,5%
2	76	0,8%	1%	2%	0,2%	25%	1,2%
3	73	1,5%	1,5%	3%	0,3%	40%	2%

Fuera de Standard	Descuento
Rubro	
Peso Hectolítrico	2%
Materias Extrañas	1%
Granos Ardidos y Dañados por calor	1,5%
Total Dañados	1%
Quebrados y/o chuzos	0,5%
Panza Blanca	0,5%
Granos con carbón	5%

Rubros de descuento por fuera de condición: las rebajas se calcularán de acuerdo a la tabla que se consigna a continuación:

Rubro	Descuento
Granos picados	2%
Punta sombreada por tierra (según intensidad)	0,5 a 2%
Punta negra por carbón (según intensidad)	1 a 6%
Revolcado en tierra (según intensidad)	0,5 a 2%
Olores objetables (según intensidad)	0,5
Semillas de trebol de Olor	2% merma de peso y gastos de zarandeo
Humedad	Se aplicará la merma porcentual de peso correspondiente según tabla oficial vigente en el momento de la entrega. La tarifa de secado será convenida o fijada

Las bonificaciones y rebajas establecidas se aplicarán sobre el grado que le corresponde por aplicación del estándar vigente. Para lotes de peso hectolitro menor a SETENTA Y CINCO KILOGRAMOS (75 kg.) por hectolitro no se aplicarán bonificaciones por contenido proteico.

ANEXO II

MEDIOS DE CULTIVOS

Y

SOLUCIONES

Medios de cultivos

- ❖ APG (Agar papa glucosado): 20 g de agar, 20 g glucosa y 250 g de extracto de papa, llevando a un volumen final de 1 L con agua destilada.

- ❖ CLA (Agar clavel): 20 g de agar en volumen final de 1 L de agua destilada. Luego agregar trozos de hojas de clavel desinfectadas (alcohol 70%) y 30 s al microondas.

- ❖ SNA (Agar Spezieller Nährstoffarmer): 20 g agar; 1 g KH_2PO_4 ; 1 g KNO_3 ; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g KCl ; 0,2 g sacarosa; 0,2 g sacarosa. Llevar a volumen final de 1 L de agua destilada.

- ❖ CMC: 15 g Carboximetilcelulosa (CMC); 1 g extracto de levadura; 1 g NH_4NO_3 ; 1 g KH_2PO_4 y 0,5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Llevar a volumen final con 1 L de agua destilada. Luego de autoclavado agregar 0,2 cloranfenicol.

Soluciones

- ❖ Buffer de corrida: 141 g glicina; 30 g Tris (trisaminometano); 10 g SDS (sodio dodecilsulfato) y completar hasta volumen de 1 Lt.

- ❖ Geles de poliacrilamida: (Para 2 geles) 31,52 mL acrilamida (35% p/v); 4,16 mL bisacrilamida (2% p/v); 30,08 mL Tris pH=8,8; 1 mL SDS (10% p/v); 9,76 mL agua destilada; 200 µL APS (persulfato de amonio) y 40 µL TEMED (tetrametil-etilen-diamina).

- ❖ Stacking gel: (Para 2 geles) 2,86 mL acrilamida (35% p/v); 0,876 mL bisacrilamida (2% p/v); 2,5 mL Tris pH=6,8; 0,20 mL SDS (10% p/v); 13,06 mL agua destilada; 100 µL APS y 30 µL TEMED.

- ❖ TCA (12%): 120 g ácido tricloracético (TCA) en un volumen final de 1 L de agua destilada.

- ❖ Solución de tinción: 1 g de *Coomasie Brilliant Blue* (colorante) en 250 mL de etanol.

ANEXO III

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS
PUBLICADOS

Artículos científicos publicados

- ✚ Martínez, M., Ramírez Albuquerque, L.D., Arata, A., Biganzoli, F., Fernández Pinto, V., Stenglein, S.A. (2020) Effects of *Fusarium graminearum* and *Fusarium poae* on disease parameters, grain quality and mycotoxins contamination in bread wheat (Part I). 2020. *Journal of the Science of the Food and Agriculture*, 100: 863-873. doi: 10.1002/jsfa.10099

- ✚ Martínez, M., Ramírez Albuquerque, L.D., Dinolfo, M.I., Biganzoli, F., Fernández Pinto, V., Stenglein, S.A. (2020) Effects of *Fusarium graminearum* and *Fusarium poae* on disease parameters, grain quality and mycotoxins contamination in barley (Part II). *Journal of the Science of the Food and Agriculture*. Aceptado (25-2-2020). doi: 10.1002/jsfa.10354

Trabajos presentados en congresos derivados de esta tesis

- ✚ Martínez M., Ramírez Albuquerque D., Castañares E., Fernández Pinto V., Moreyra F., Biganzoli F. y Stenglein S.A. (2018) Efectos de la interacción de *F. graminearum* y *F. poae* sobre la contaminación de micotoxinas en cebada cervecera (*Hordeum vulgare* L.). VI Simposio Latinoamericano de Inocuidad Alimentaria IAAP. Buenos Aires, Argentina.

- ✚ Martínez M., Arata A., Pacheco W.G., Lázaro L. y Stenglein S.A. (2017). Efecto de *Fusarium graminearum* y *F. poae* sobre la composición del gluten de trigo. 4º Congreso Argentino de Fitopatología. Mendoza, Argentina.

- ✚ Martínez M., Ramírez Albuquerque L.D., Biganzoli F., Fernández Pinto V. E. y Stenglein S.A. (2016). Evaluación de micotoxinas producidas por *Fusarium graminearum* y *F. poae* en trigo y cebada. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología y XIV Congreso Argentino de Microbiología. Rosario, Santa Fé, Argentina.

- ✚ Martínez M., Biganzoli F. y Stenglein S.A. (2015) Evaluación de la patogenicidad de *Fusarium* en trigo y cebada. III Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Effects of *Fusarium graminearum* and *Fusarium poae* on disease parameters, grain quality and mycotoxins contamination in bread wheat (Part I)

Mauro Martínez,^a Lady Ramírez Albuquerque,^b Agustín F Arata,^{a,c} Fernando Biganzoli,^d Virginia Fernández Pinto^b  and Sebastian A Stenglein^{a*} 



Abstract

BACKGROUND: Wheat is the most important winter crop in the world, being affected by the presence of fungal, mainly those belonging to the *Fusarium* genus. *Fusarium* head blight (FHB) is a serious disease that causes important economic damage and quantitative/qualitative losses, with *Fusarium graminearum* and *Fusarium poae* being two of the most isolated species worldwide. The present study aimed to evaluate the interaction between *F. graminearum* and *F. poae* and the effects on disease parameters, grain quality and mycotoxin contamination on five wheat genotypes under field conditions during three growing seasons.

RESULTS: Statistical differences between *Fusarium* treatments were found for disease parameters, grain quality and mycotoxin contamination during the 2014/2015 growing season. High values of incidence ($58.00 \pm 8.00\%$), severity ($6.28 \pm 1.51\%$) and FHB index (4.72 ± 1.35) were observed for *F. graminearum* + *F. poae* treatment. Regarding grain quality, the results showed that the degradation of different protein fractions depends on each *Fusarium* species: glutenins were degraded preferably by *F. graminearum* (-70.82%), gliadins were degraded preferably by *F. poae* (-29.42%), whereas both protein fractions were degraded when both *Fusarium* species were present (-60.91% and -16.51% , respectively). Significant differences were observed for mycotoxin contamination between genotypes, with Proteo being the most affected ($\text{DON} = 12.01 \pm 3.67 \mu\text{g g}^{-1}$). In addition, we report that 3-ADON predominated over 15-ADON in the three seasons evaluated.

CONCLUSION: Variations in plant–pathogen interaction (*Fusarium* – wheat pathosystem) should be considered at least in years with favorable climatic conditions for FHB development, as a result of the potential impact of this disease on grain quality and mycotoxin contamination.

© 2019 Society of Chemical Industry

Supporting information may be found in the online version of this article.

Keywords: *Fusarium*; wheat; mycotoxins; disease parameters; grain quality; plant–pathogen interaction

INTRODUCTION

Wheat (*Triticum aestivum* L.) is the most important winter crop in the world and its production is aimed at export and local consumption. The wheat world production was approximately 758.38 million tons during the 2017/2018 harvest, with the US Department of Agriculture estimating that the production for 2018/2019 will be approximately 747.76 million tons. The main wheat producers during the 2017/2018 harvest season were the European Union (151.58 million tons), China (129.77 millions of tons) and India (98.51 million tons).¹ Wheat grains can be used for animal feed, although their main use is for flour production and baking. This is possible as a result of the viscoelastic properties of wheat dough that make it suitable for various bakery products, where gluten proteins play an important role in determining wheat baking quality. Thus, gliadins and glutenins represent 80–85% of the total protein in mature wheat grain.²

* Correspondence to: S A Stenglein, Laboratorio de Biología Funcional y Biotecnología (BIOLAB)-INBIOTEC- CONICET-UNCPBA-CICBA, Facultad de Agronomía, Av. República de Italia # 780, 7300 Azul, Buenos Aires, Argentina. E-mail: stenglein@faa.unicen.edu.ar

a Laboratorio de Biología Funcional y Biotecnología (BIOLAB)-INBIOTEC-CONICET-UNCPBA-CICBA, Facultad de Agronomía, Buenos Aires, Argentina

b Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Buenos Aires, Argentina

c Cátedra de Cereales y Oleaginosas, Laboratorio de Valoración de Calidad Industrial de Trigo, Facultad de Agronomía, UNCPBA, Azul, Buenos Aires, Argentina

d Departamento de Métodos Cuantitativos y Sistemas de Información, Facultad de Agronomía, UBA, Buenos Aires, Argentina

One of the major diseases that occur in most of the cereal regions worldwide and causes serious economic damage in wheat is *Fusarium* head blight (FHB). FHB is observed mainly in regions with warm and wet climate during the flowering stage of this cereal. This disease causes both quantitative and qualitative losses. First, there is a reduction in yield, decreasing the thousand kernel weight (TKW), reducing the germination and vigor of the seeds. Second, FHB reduces the starch content of the grains and degrades different subunits of proteins, causing a lower baking quality, along with the presence of harmful toxins for health.³ Among the *Fusarium* species causing FHB, *F. graminearum* is the dominant species isolated worldwide, although, over recent years, *F. poae* has been found in diverse substrates such as barley and wheat.³ Covarelli et al.⁴ showed that *F. poae* increases its presence when the climatic conditions are not suitable for *F. graminearum* growth. At present, in Argentina and in different countries in the world, *F. graminearum* and *F. poae* predominate over other *Fusarium* species.⁵ However, it is not clear whether both pathogens are more aggressive if they infect together or separately, in addition to their potential damage to the crops.

The most important toxins produced by *Fusarium* spp. are trichothecenes (inhibitors of eukaryotic protein synthesis) that can cause adverse effects in humans and animals through the ingestion of contaminated cereal grain. The type and amount of mycotoxins produced by a species vary on an annual basis, depending mainly on environmental, crop and storage factors.⁶ *F. graminearum* has the capacity to produce a wide spectrum and quantity of toxins, especially deoxynivalenol (DON) and its acetylated derivatives (3-ADON and 15-ADON), which are associated with feed refusal, vomiting and suppressed immune functions.⁷ Besides, *F. graminearum* has the ability to produce other mycotoxins, such as aurofusarin, fusarin C, nivalenol (NIV) and zearalenone, an important mycotoxin that can affect sexual reproduction causing hyperstrogism in monogastrics.^{7,8} On the other hand, *F. poae* is the main *Fusarium* pathogen that is able to produce high amounts of NIV, an important mycotoxin that inhibits cell proliferation and produces cytotoxic effects on cells.⁹

Fusarium spp. has a significant effect on grain yield, causing losses of up to 70% in wheat.¹⁰ Regarding grain quality, wheat grain proteins are composed of a soluble fraction in aqueous solutions (albumins and globulins) and an insoluble fraction (gliadins and glutenins) that are responsible for gluten formation. Glutenins (GLU) form intra and intermolecular disulfide bonds and are classified into high molecular weight (HMW) and low molecular weight (LMW) subunits, whereas gliadins (GLI) form only intramolecular disulfide bonds and are divided into four structural types (α -, β -, γ - and ω -gliadins). *Fusarium* spp. infection and the consequent production of proteases by the fungus leads to gluten degradation, thus changing dough consistency and resistance to extension. This results in a loss of dough functionality and loaf volume.¹¹

Currently, few studies have evaluated the interaction of *Fusarium* species under field conditions, with information concerning their potential impact on mycotoxin contamination being scarce.^{12,13} Early colonization of the lemma by *F. poae* may promote subsequent colonization by *F. graminearum*.¹⁴ Furthermore, the presence of NIV can synergize the toxicity of DON and its acetylated derivatives, thus increasing the potential risk in food safety.¹⁵ In co-inoculations, the competence for resources between *Fusarium* species can produce more toxins under these stress conditions, although no evidence has been found to support synergism between fungal isolates with respect to causing visual

symptoms.^{13,16} However, it is unknown whether synergism or interaction can occur between *F. graminearum* and *F. poae*. Therefore, the present study aimed to evaluate the effects of *F. graminearum* and *F. poae* and their presence on disease parameters, grain quality and mycotoxin contamination in bread wheat.

MATERIALS AND METHODS

Fusarium isolates

In the present study, *F. graminearum*, *F. poae* and a mixture of *F. graminearum* + *F. poae* were used as inoculum in the fields experiments. Regarding *F. poae* (FP₁FG₀), a mixture of four isolates of *F. poae* (FP-TSa1b, FP-TBig1a, FP-TMa1a and FP-TPe1a) based on the production of NIV *in vitro* was used.⁵ In this case, the fungal inoculum was produced by placing individual agar plugs with mycelium in Petri dishes (diameter 90 mm) with potato dextrose agar 2% (PDA). The time of incubation for *F. poae* was 7 days at 25 ± 2°C under 12 h each of light and darkness. The conidial harvest was performed by flooding the plates with 5 mL of sterile distilled water (SDW) and dislodging the conidia with a bent glass rod. Then, the resulting suspension was filtered through a cheesecloth, and the conidial suspension was adjusted to 1 × 10⁵ conidia mL⁻¹ with a Neubauer hemacytometer for each *F. poae* isolate.¹⁷ The final conidial suspension was prepared with equal parts of each of the four isolates. Tween 20 (0.05%) was added to the suspension as a surfactant.

On the other hand, for *F. graminearum* (FP₀FG₁), a mixture of four isolates with the ability to produce mainly DON, 3-ADON and 15-ADON *in vitro* was selected for the production of the inoculum (isolates 3.4, 88.1, 92.2 and 129.1).¹⁸ These isolates were cultured on PDA 2% for 7 days at room temperature. The *F. graminearum* macroconidial suspension was produced by transferring four PDA plugs (1 × 1 cm) of the established fungal culture to 50 mL of carboxymethylcellulose (CMC) broth (CMC 15 g, NH₄NO₃ 1 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, yeast 1 g and H₂O 1 L) in a 250-mL Erlenmeyer flask. The culture was incubated on a rotary shaker for 10 days (100 rpm, 25 ± 2°C and in the dark). The conidial harvest was performed by filtering the resulting suspension through a cheesecloth, adjusting the conidial suspension to 1 × 10⁵ conidia mL⁻¹ with a Neubauer hemacytometer for each *F. graminearum* isolate.¹⁷ The final conidial suspension was prepared with equal parts of each of the four isolates. Tween 20 (0.05%) was added to the suspension as a surfactant.

Finally, the inoculum composed of the mixture of *F. graminearum* and *F. poae* (FP₁FG₁) was prepared by mixing equal parts of the inoculums, as described above, with a final concentration of 1 × 10⁵ conidia mL⁻¹. In addition, a mock inoculum prepared with SDW was used as control treatment (FP₀FG₀).

Wheat genotypes

Five genotypes (G) of bread wheat were evaluated: Klein León (high yield, poor baking quality and moderate susceptibility to FHB); Klein Nutria (high yield, high values of gluten and moderate susceptibility to FHB); Klein Proteo (good baking quality, high protein and gluten, moderate susceptibility to FHB); Buck AGP Fast (good baking quality and low susceptibility to FHB); and Buck Pleno (high yield, good baking quality and moderate susceptibility to FHB).^{19,20} These genotypes were chosen as a result of an intermediate-short maturity cycle and the similarity of the time until the anthesis.

Experimental design

Field experiments were carried out in the experimental farm at the Faculty of Agronomy, Azul, Buenos Aires province, Argentina (36°49'41.4"S, 59°53'11.6"W). The soil is a typical Argiudoll and the characteristics of this soil at the depth of 0–20 cm were: texture = clay loam soil, pH 6.06 (1:2.5 in water), N-nitrate = 7.10 kg N ha⁻¹ (reflectometry), available P = 26.50 ppm, organic matter = 3.23%.

The field experiments were repeated in the 2014, 2015 and 2016 growing seasons. Conventional tillage practices were made with a disc plow and harrow to a depth of 15 cm. Sowing dates ranged from 14 to 16 July in the three years, to ensure uniformity in the timing of anthesis and inoculation. Each plot size was 8 × 1.5 m and genotypes were sown at 350 seeds m⁻². The distance between plots was 1 m. Plants were grown in the absence of any nutritional or pest stress (insecticides and herbicides were applied as needed), without supplemental irrigation or fungicide treatments. Wheat heads were inoculated in mid-anthesis at Z.60–Z.65 and conidial suspensions were applied until run-off using a hand-held garden sprayer (2 L), with adjustable brass nozzles. Plots were artificially inoculated by spraying 1 L of spore suspension (250 mL in each subplot). For control treatment, SDW with Tween 20 (0.05%) was used to inoculate. The inoculum was applied: (A) in the absence of wind, to limit the drift of the inoculum to neighbouring plots; (B) in the evening on preferably cloudy days with high relative humidity (RH) (> 80%), to avoid the evaporation of the inoculum; and (C) keeping a distance between the nozzle and the spikes of around 5 cm, to avoid spore dispersion. Furthermore, the plot to be inoculated was temporarily isolated from adjacent plots by placing 1.60-m plastic panels on the three sides of the plot and removing the panels when the inoculation was finished. To avoid cross contamination, the plastic panels were rinsed twice with SDW between *Fusarium* treatments and dried. Finally, to check the possibility of contamination with other *Fusarium* spp., 100 grains per plot were selected at random, superficially disinfected (70% ethanol for 2 min and 5% sodium hypochlorite for 2 min, then finally rinsed twice in SDW) and placed on PDA 2% with 0.25 g of chloramphenicol and incubated for 7 days at 25 ± 2 °C under a 12:12 h light/dark cycle. *Fusarium* spp. were identified in accordance with Leslie and Summerell.⁸

The field experiment was a split-plot design with four blocks, where the main plot was the wheat genotype, whereas the subplot was the *Fusarium* treatment. Each plot sown with a genotype was divided into four subplots, which were randomly assigned to one of the four inoculation combinations: (i) with *F. graminearum* alone (FP₁FG₁); (ii) with *F. poae* alone (FP₁FG₀); (iii) with both pathogens (FP₁FG₁); and (iv) control without *Fusarium* species (FP₀FG₀). Temperature, RH and precipitation data (from inoculation to harvest in 2014, 2015 and 2016) were obtained from the National Meteorological Center Weather Station located 100 m from the experimental site and from the Regional Center of Agrometeorology.

Measurements

Visual disease assessment of incidence (number of spikes with symptoms), severity (number of spikelets with symptoms per spike) and FHB index (incidence × severity/100) was conducted at 21 days post-inoculation by counting the number of symptomatic spikelets (typical lesions or bleaching of spikelets) of 40 spikes per subplot selected at random.²¹ After physiological maturity, each subplot was harvested manually and threshed using a wheat stationary tresher.

Grain yield per subplot (g m⁻²) was measured. Protein concentration, the percentage of moisture and the percentage of wet gluten were measured with a NIT analyzer with a double-face monochromator (Agricheck®; Bruins Instruments, Salem, NH, USA). The germinative energy and the germinative power of the seeds were evaluated in accordance with International Seed Testing Association protocols. A sodium dodecyl sulfate microsedimentation test (SDSS) was used to predict the gluten strength. To show the effects of each *Fusarium* species on each protein subunit during the three growing seasons evaluated, the glutenin (GLU) and gliadin (GLI) proteins were extracted by a sequential extraction method. All proteins were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (T = 13.5%). The gels were stained with 0.05% Coomassie Brilliant Blue R250 for 24 h, destained in trichloroacetic acid 12% for 48 h and finally washed in SDW for 24 h. Also, the resulting gels were scanned and analyzed using TotalLab, version 1.10 (<http://totalab.com>) to measure the intensity of the pixel as an abundance indicator. Background subtraction was applied to avoid the variability as a result of the staining process. The GLI, GLU, HMW-GS (high molecular weight glutenin subunits), LMW-GS (low molecular weight glutenin subunits), ω-gliadins and α-β-γ-gliadins contents were evaluated. Also, the GLI/GLU ratio, the HMW-GS/LMW-GS ratio and the ω-gli/α-β-γ-gli ratio were calculated.

For toxins analyses, during the harvest, the grain samples were obtained from the five central furrows of the plot (1 × 1 m), eliminating the two lateral furrows. To obtain a representative subsample, each sample obtained (approximately 300–500 g) were completely homogenized. Then, the samples were reduced successively using a grain divider (Cereal Tools®) until 25 g was obtained, and were then ground with a high speed disintegrator FW-110 (Arcano®; Pasteur Instrumental, Buenos Aires, Argentina). Trichothecenes were extracted for 1 h at 300 rpm with 125 mL of acetonitrile:acetylacetate:water (50:41:9). The clean-up was performed with a column packed with charcoal:alumina:celite (0.7:0.5:0.3) and dried in a rotary evaporator. Gas chromatography, with 63Ni electron capture detection, using a Shimadzu Model GC17 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan), equipped with a split/splitless injector and fitted with RX-5MS capillary column (inner diameter 25 mm × 0.2 mm id), was performed to detect and quantify trichothecenes.²² The quantification limits were 0.06 µg g⁻¹ for DON and 0.15 µg g⁻¹ for NIV, whereas the detection limits were 0.02 µg g⁻¹ for DON and its acetyl derivatives, and 0.05 µg g⁻¹ for NIV. Standards used of DON, 15-ADON, 3-ADON and NIV were from Sigma (St Louis, MO, USA). Toxins present in treatments refer to grains that contain toxins after the specific treatment.

Statistical analysis

All of the variables evaluated were analyzed using R, version 3.3.3 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Because of the contrasting climatic conditions observed in the three growing seasons (mainly during the anthesis-harvest period), each year was evaluated separately. The main factor was the wheat genotype and two levels (presence or absence) of each *Fusarium* species nested within the genotype, with four blocks for each combination of treatments. Comparisons were performed using linear mixed models: (A) for variables with a normal distribution of the error, we used a linear mixed-effects model (lme) and (B) for variables with a non-normal distribution of the error, we used a generalized linear mixed model (glm). *Fusarium* treatments and genotype were

considered as fixed effects, whereas block and main-plot were assigned as random effects.

Among the variables evaluated, the following showed a normal distribution of the error: protein concentration (PC), SDSS, TKW, grain yield (GY), wet gluten (WG), protein fractions (gliadins and glutenins) and concentration of toxins (DON, 3-ADON, 15-ADON and NIV). These variables were analyzed using the lmer function (lme4 package).²³ We used mixed-effects linear models, which allow the nesting of plots within blocks and subplots within plots. Data assumptions were verified graphically using plots of fitted values versus the residuals for homogeneity of variances and using normal Q-Q plots for normality of residuals. Furthermore, the Shapiro–Wilk test was used to check for normality of residuals.

On the other hand, the following variables showed a non-normal distribution of the error: incidence (I), severity (S), FHB index, germinative energy (GE) and germinative power (GP). These variables were analyzed using a generalized linear mixed model that considered the restrictions in the randomization and non-normal errors with the function glmer (lme4 package).²³ Significance was tested with a type II likelihood ratio test and tested with the lsmeans function (emmeans package).²⁴ Results were reported as the mean \pm SEM and a significance of $\alpha = 0.05$.

RESULTS

Climatic conditions

The environmental conditions in the three years were particularly different during the flowering stage (Fig. 1). In 2014, the average temperature was the highest (18.22 ± 3.71 °C), being the warmest and wettest year (209.60 mm, $67.24 \pm 11.55\%$ RH). By contrast, in the 2015 and 2016 growing seasons, the weather conditions were not optimal for the development of the disease. The spring of 2015 had the lowest minimum temperatures (9.88 ± 4.08 °C), with less rainfall than 2014 (144.60 mm, $68.88 \pm 11.17\%$ RH), whereas the spring of 2016 was the driest, with low rainfall and less relative humidity (74.90 mm, $59.79 \pm 13.07\%$ RH), with moderate temperatures (17.62 ± 3.88 °C). Regarding historical precipitation for the anthesis-harvest period, in 2014, we registered an increase of 27%, whereas, by contrast, in 2015 and 2016, we observed a decrease in the precipitation (12% and 55%, respectively).

Disease parameters

Analysis of the control plots indicated lower development of disease symptoms for each year compared to inoculated treatments. In 2014, the greatest level of visual symptoms was observed, whereas, in 2015 and 2016, fewer symptoms were reported. All genotypes showed symptoms with all the *Fusarium* treatments used as inoculum. Significant differences ($P < 0.05$, $n = 80$) were detected for the different *Fusarium* treatments with respect to the incidence, severity and FHB index, depending on the year (Fig. 2). In 2014, FP₁FG₁ treatment show higher incidence values ($58.00 \pm 8.00\%$) with respect to FP₀FG₁ ($52.00 \pm 6.00\%$) and FP₁FG₀ ($49.00 \pm 6.00\%$), although there were no significant differences between *Fusarium* treatments. In addition, this trend coincided with higher values of severity and FHB Index in this growing season. On the other hand, no significant differences were observed for incidence and FHB index in 2015 and 2016, being similar in terms of visualization of symptoms. For incidence, the highest incidence values were observed in FP₀FG₁ ($30.00 \pm 2.00\%$ in 2015 and $28.00 \pm 2.00\%$ in 2016). Regarding the FHB index, lower

values were reported, with FP₀FG₁ showing the highest values (0.34 ± 0.09) in 2015, whereas, in 2016, the highest values were observed for FP₁FG₁ ($0.53 \pm 0.17\%$). Regarding severity, no significant differences were observed in any of the years evaluated.

Germination and grain quality parameters

For GE and GP, no significant differences were observed in all the years, except for GE in 2015 between genotypes. In the same way, no effects of *Fusarium* treatments were observed in parameters such as PC, SDSS and WG, showing only significant differences ($P < 0.05$, $n = 80$) for genotype. However, for GY, as in TKW, there were significant differences ($P < 0.05$, $n = 80$) only in 2015 for the FP₀FG₁ \times G interaction (see Supporting information, Table S1).

For PC, genotypes Proteo ($11.94 \pm 0.23\%$) and Nutria ($10.89 \pm 0.19\%$) showed the highest values in all the years with respect to the rest of the genotypes. Regarding SDSS, the same tendency was observed in the three years, with Pleno (109.97 ± 1.71 mm) and Proteo (97.34 ± 1.66 mm) showing the highest values of sedimentation. Wet gluten values also showed that Proteo ($30.12 \pm 0.55\%$) and Nutria ($27.19 \pm 0.49\%$) were the genotypes with the highest percentages in all of the growing seasons analyzed.

For GY, interaction FP₀FG₁ \times G was found in 2015, with Proteo being the genotype most affected, decreasing by 24.25% (from 303.50 to 229.90 g m⁻²), followed by León with a decrease of 13.56% (from 293.50 to 253.70 g m⁻²). In the same way, for TKW, the genotype most affected was León, decreasing by 6.44% (from 50.96 g to 47.68 g), followed by Proteo with a decrease of 2.04% (from 42.21 g to 41.35 g).

Protein composition

The HMW-GS allelic composition of each wheat genotype with respect to *Glu-A1*, *Glu-B1* and *Glu-D1*, respectively, was: AGP Fast (not identified; 13 + 16, 5 + 10), León (2*, 7 + 9, 2 + 12), Nutria (2*, 7 + 9, 5 + 10), Pleno (2*, 7 + 8, 19 5 + 10) and Proteo (1, 7 + 9, 5 + 10). The analysis of protein fractions was significant only in 2014, whereas, during 2015 and 2016, no significant differences were observed. In 2014, significant differences ($P < 0.05$, $n = 60$) were detected for *Fusarium* treatments and genotypes (see Supporting information, Table S2). Protein degradation varied between *Fusarium* treatments, with *F. graminearum* showing more of a preference to degrade glutenins, whereas *F. poae* showed more of a preference to degrade gliadins. Interestingly, when both *Fusarium* species were inoculated together, both protein fractions were affected (Fig. 3).

The values of relative abundance (pixel intensity) indicate that glutenins were affected by FP₀FG₁, decreasing by 70.82% compared to the control (Fig. 4), followed by FP₁FG₀ (61.97%) and FP₁FG₁ (60.91%). On the other hand, FP₁FG₀ was the treatment that most affected the gliadin fraction, decreasing by 29.42%, followed by FP₀FG₁ (25.14%) and FP₁FG₁ (16.51%). Regarding the GLI/GLU ratio, there were no statistical differences, although a slight trend was observed indicating a higher ratio compared to the control for FP₁FG₁ (3.54-fold), followed by FP₀FG₁ (2.91-fold) and FP₁FG₀ (2.25-fold).

Regarding glutenin fractions, HMW-GS was more affected by FP₀FG₁, decreasing by 60.00%, followed by FP₁FG₀ (57.80%) and FP₁FG₁ (38.85%), whereas the LMW-GS fraction was also affected by FP₀FG₁, decreasing by 74.93%, then followed by FP₁FG₁ (69.23%) and FP₁FG₀ (63.49%). However, no significant differences

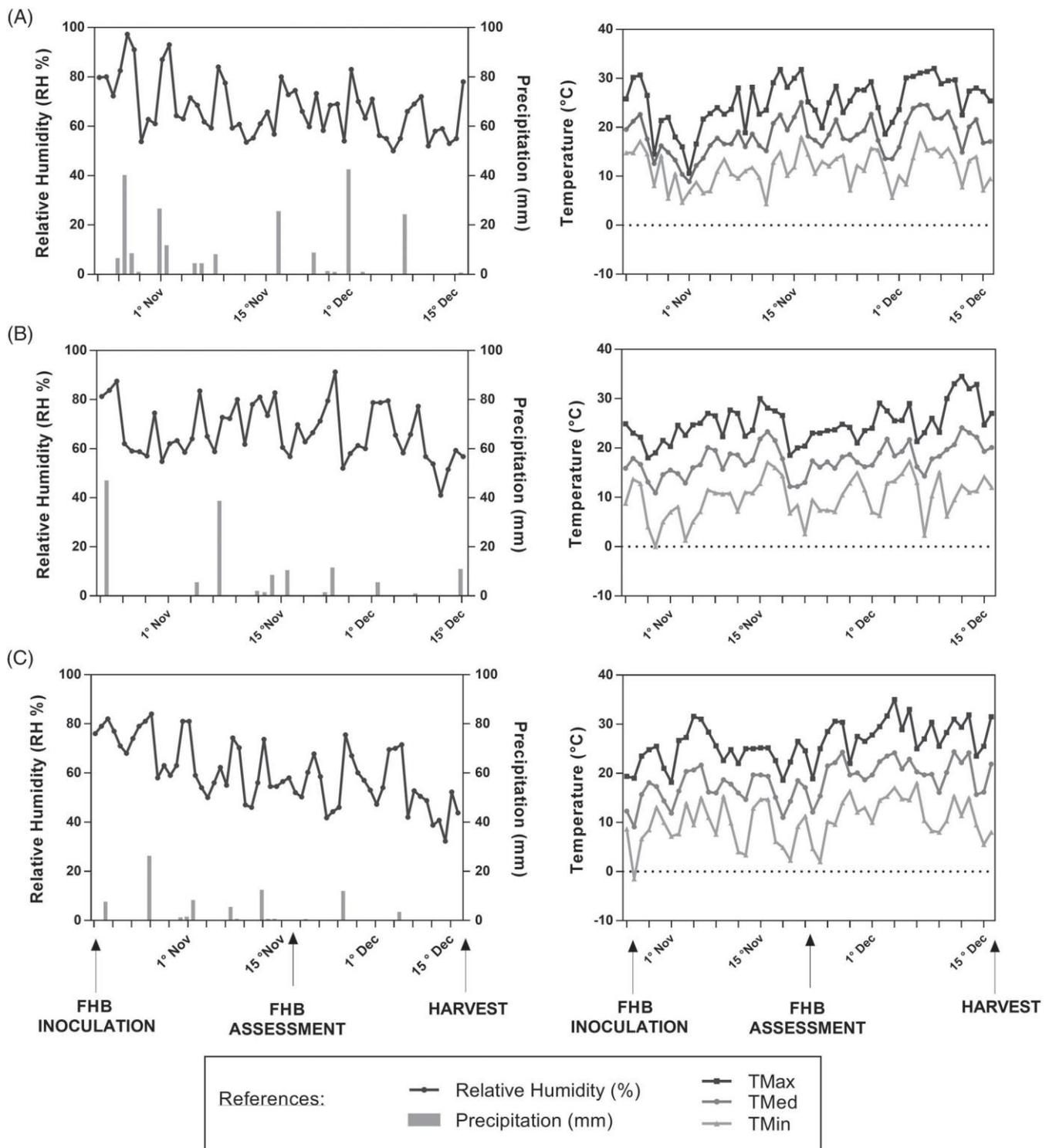


Figure 1. Relative humidity (RH %), precipitation (mm), maximum temperature (TMax), medium temperature (TMed) and minimum temperature (TMin), from inoculation to harvest. (A) 2014, (B) 2015 and (C) 2016.

were found in the HMW-GS/LMW-GS ratio. For the ω -gli fraction, the FP₁FG₀ treatment showed the highest degradation of this protein fraction (37.85%) followed by FP₀FG₁ (37.52%) and FP₁FG₁ (26.82%). In addition, FP₁FG₀ was the treatment that most affected α - β - γ -gli, decreasing by 26.34%, followed by FP₀FG₁ (20.30%) and FP₁FG₁ (12.60%). Regarding the ω -gli/ α - β - γ -gli ratio, no significant differences were found.

Mycotoxin contamination

As a result of the natural existence of *Fusarium* spp. present in the environment, the analysis of the control plots indicated a slight contamination with mycotoxins. In 2014, the highest concentrations of DON ($5.06 \pm 2.47 \mu\text{g g}^{-1}$) and 15-ADON ($0.13 \pm 0.04 \mu\text{g g}^{-1}$) were observed in FP₀FG₁ grains after treatment (hereafter *Fusarium* treatment), whereas the major values for 3-ADON

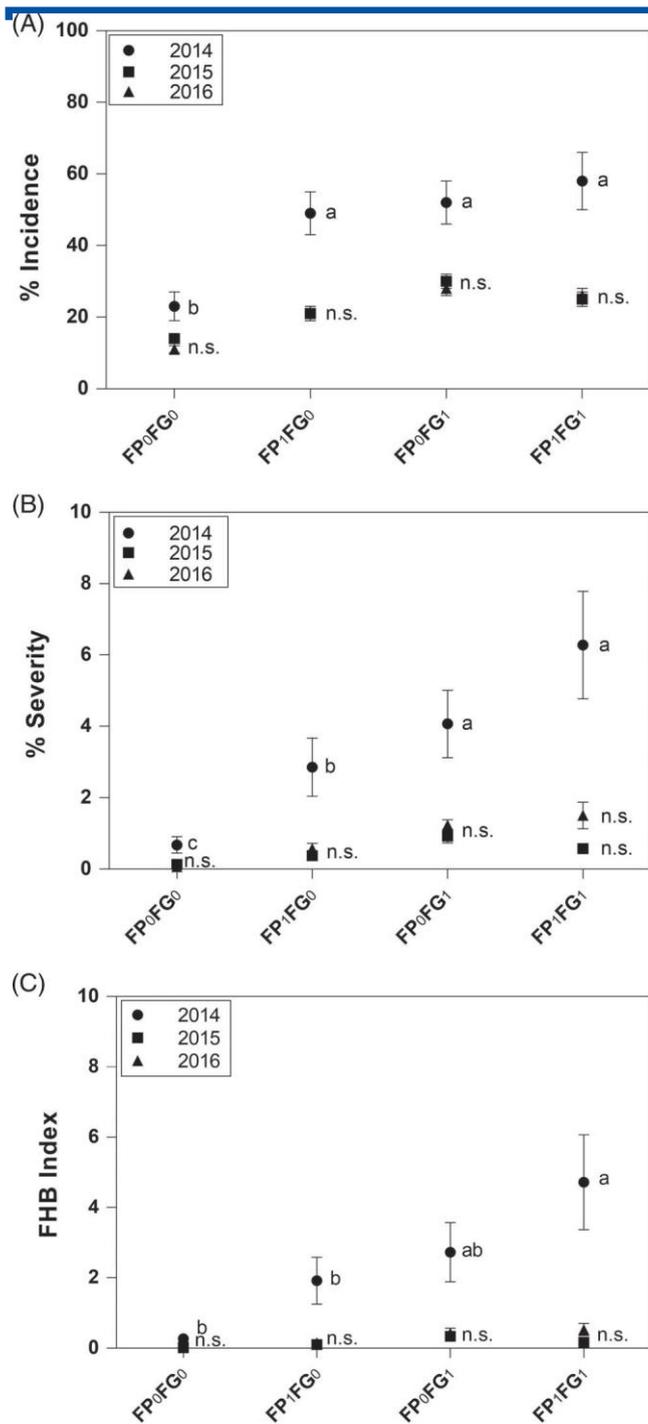


Figure 2. Incidence (A), severity (B) and FHB index (C) values for different treatments in 2014, 2015 and 2016. Treatments: *Fusarium poae* (FP₁FG₀), *Fusarium graminearum* (FP₀FG₁), both pathogens (FP₁FG₁) and control without *Fusarium* (FP₀FG₀). Mean ± SEM. Different lowercase letters indicate statistical differences according to Tukey's test at $P \leq 0.05$.

($55.76 \pm 31.37 \mu\text{g g}^{-1}$) were in FP₁FG₁ (see Supporting information, Table S1). For DON, significant differences ($P = 0.0377$, $n = 60$) were observed only for genotype, showing that the genotype with the highest DON accumulation was Proteo ($12.01 \pm 3.67 \mu\text{g g}^{-1}$), whereas the least contaminated was Pleno ($0.84 \pm 0.19 \mu\text{g g}^{-1}$) (Fig. 5). For 3-ADON and 15-ADON, no significant differences were found. Regarding NIV concentrations, only two genotypes

showed contamination above the limit of quantification during 2014 (Proteo: $0.36 \pm 0.14 \mu\text{g g}^{-1}$; and León: $0.18 \pm 0.03 \mu\text{g g}^{-1}$).

Similarly, in 2015, the highest concentrations of DON ($4.54 \pm 1.62 \mu\text{g g}^{-1}$) and 15-ADON ($2.98 \pm 1.49 \mu\text{g g}^{-1}$) were observed in FP₀FG₁, whereas the most significant values for 3-ADON ($11.10 \pm 2.21 \mu\text{g g}^{-1}$) were in FP₁FG₁. Significant differences were observed only for genotypes in DON ($P < 0.0001$, $n = 80$) (Fig. 5). In the first case, Proteo was the genotype with the highest amount of DON ($8.74 \pm 2.01 \mu\text{g g}^{-1}$), whereas León showed the lowest values ($1.66 \pm 0.68 \mu\text{g g}^{-1}$). For acetylated derivatives, no significant differences were found in this growing season. Regarding NIV, during 2015 and 2016, concentrations were below the limits of quantification. During 2016, the highest values of mycotoxins were observed in FP₀FG₁ for DON (1.01 ± 0.29), 3-ADON (30.96 ± 7.21) and 15-ADON (1.03 ± 0.19). For all the mycotoxins analyzed in this growing season, no significant differences were found between *Fusarium* treatments or genotypes.

DISCUSSION

The three growing seasons evaluated were different from each other in terms of environmental conditions such as relative humidity, temperature and accumulated rainfall during the period from anthesis to harvest (Fig. 1). For disease parameters, significant differences between the *Fusarium* treatments were found only in 2014, although no statistical differences that could demonstrate antagonism or synergism were observed when *F. graminearum* and *F. poae* were inoculated together (Fig. 2). In 2014, we registered the highest disease values, as a result of warm temperatures and wet conditions at the flowering stage that were favorable for the development of the disease. By contrast, during 2015 and 2016, the lowest temperatures and the driest conditions decreased FHB development, causing minor visual symptoms. In agreement with Lori et al.,²⁵ we observed that FHB symptoms are associated with the total rainfall accumulated and also with the pattern of distribution during the flowering stage. The difference observed in visual symptoms between *F. poae* and *F. graminearum* treatments could be explained because *F. poae* colonize floral tissues to a greater extent than they do grain, whereas *F. graminearum* may colonize both tissue types to a similar extent.¹³

Tillage practices were similar among the three years; therefore, our results indicate that the variations in climatic factors played an important role in disease symptoms. It is known that environmental conditions play a fundamental role in *Fusarium* – host interactions, depending on the different climatic factors of each growing season, mainly during the flowering stage.¹² Different thermo-hygrometric conditions in this stage can explain variations in the presence of the different *Fusarium* species and, when the conditions were not favorable for the main causal agents of FHB, such as *F. graminearum*, other species as *F. poae* could increase their presence significantly.⁴ Wet conditions and warm temperatures (approximately 28 °C) are favorable for *F. graminearum* infection, whereas dry conditions and temperatures of around 25 °C are favorable for *F. poae*.¹⁶ Furthermore, it could be observed that the lowest values of symptoms in 2015 and 2016 were the result of daily minimum temperatures below 9 °C and maximum temperatures greater than 26 °C registered around anthesis that may inhibit or decrease fungal growth.²⁶

Fusarium species cause yield loss and a deterioration in wheat grain quality.²⁷ In the present study, we did not observe statistical differences between the *Fusarium* treatments in terms of

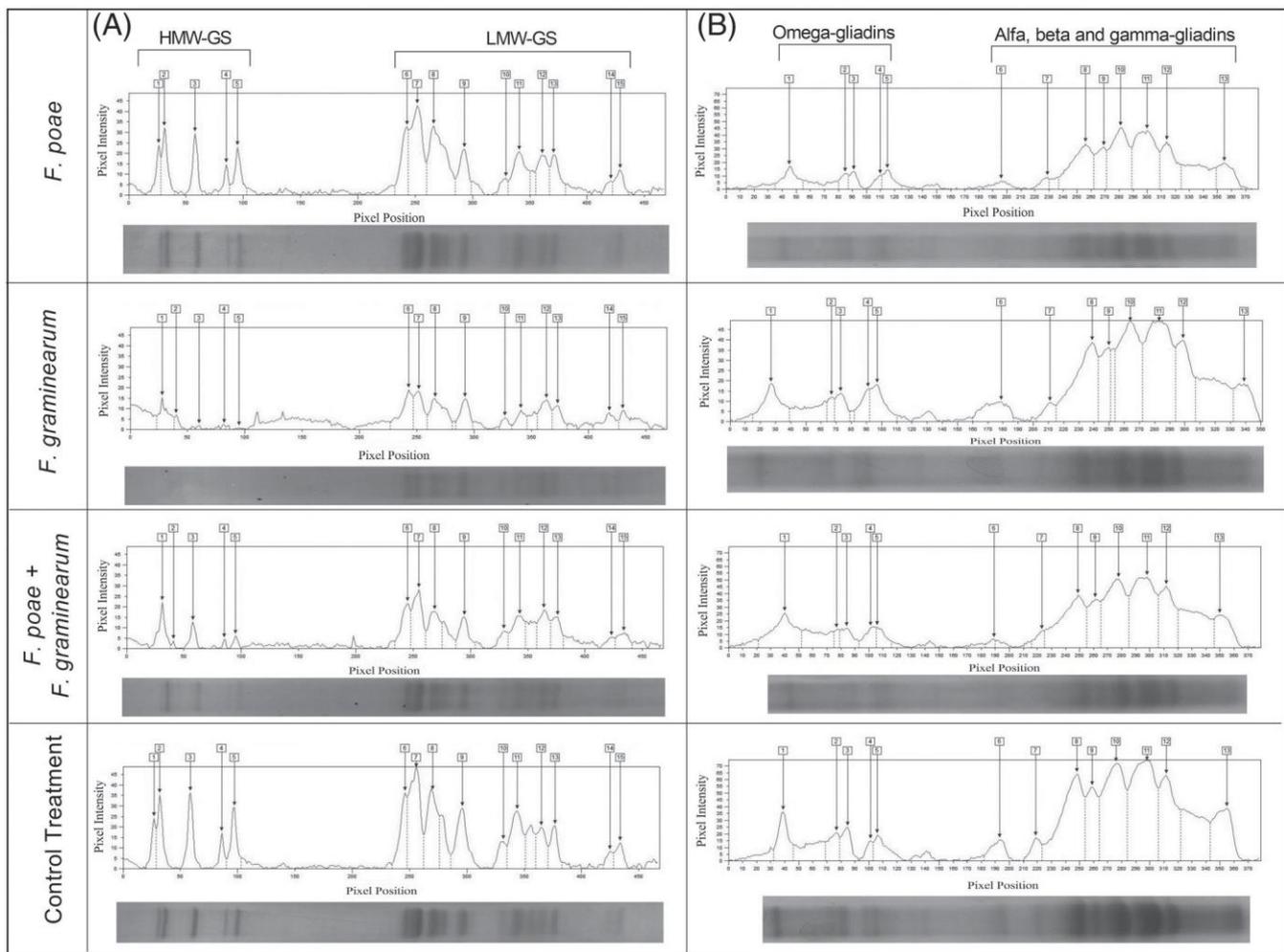


Figure 3. Degradation of different protein subunits in *Fusarium* damaged kernels (FDK). (A) Relative abundance and fractions of polyacrylamide gel (SDS-PAGE; T% = 13.5%) showing the pattern of bands in the high molecular weight glutenins (HMW) and low molecular weight (LMW). (B) Relative abundance and fractions of polyacrylamide gel (SDS-PAGE; T% = 13.5%) showing the pattern of bands in the ω -gliadins and α , β , γ -gliadins. Treatments: *Fusarium poae* (FP₁FG₀), *Fusarium graminearum* (FP₀FG₁), both pathogens (FP₁FG₁) and control without *Fusarium* (FP₀FG₀).

parameters such as PC, SDSS and WG, showing only differences among genotypes (see Supporting information, Table S1). In the same way, other studies agree with our results, showing that there are no differences in *Fusarium* infected samples for these parameters. Eggert *et al.*²⁸ and Wang *et al.*²⁹ found that protein concentration did not change significantly with respect to *F. graminearum* or *F. culmorum* infection, whereas, in naturally infected samples, Hysing & Wiik³⁰ found that there were no significant differences for wet gluten and protein concentration at all levels of infection tested. Regarding GY and TKW, we observed a decrease of up to 24.25% and 6.44% (respectively) depending on the genotype, coinciding with the study by Hysing & Wiik³⁰ that reported a decrease of 4.00% in TKW and a correlation with the level of infection with *Fusarium* spp. ($r = 0.76$, $P = 0.020$). These differences between genotypes for GY and TKW could suggest that the existing genetic differences are likely to be more important than other agronomic factors (such as soil tillage and the use of fertilizer) against *Fusarium* infection.²⁵

Gluten proteins play an important role in determining the wheat processing quality, with glutenins and gliadins being responsible for the viscoelastic properties of the dough.² *Fusarium* infection can affect the baking properties in relation to changes in the protein fractions.^{29,31} In the present study, we observed statistical

differences for *Fusarium* treatments (see Supporting information, Table S2), decreasing the glutenin fractions such as HMW-GS (52.22%) and LMW-GS (69.22%). Furthermore, we observed a reduction in the gliadin fractions, for ω -gliadins (34.06%) and α - β - γ -gliadins (19.75%). Therefore, the ratio GLI/GLU was increased because we observed a higher degradation of glutenins (64.57%) than gliadins (23.69%). These results could be explained because *Fusarium* infection produces different hydrolytic enzymes such as cellulases, cutinases, proteinases and xylanases. The fungal proteases activity such as trypsin protease or serine protease (which are known to be protein-degrading enzymes) is part of the exoproteome of *Fusarium* and they could be responsible for the changes observed in the gliadins/glutenins ratio.³² This change in the GLI/GLU in favor of the gliadins fraction was reported by Eggert *et al.*¹¹ in wheat and emmer (*Triticum dicoccum*), showing a preferential degradation of glutenins with respect to gliadins. In addition, a high amount of degraded glutenins was found within the gliadin fraction after digestion and extraction. These results can explain the increase in the GLI/GLU ratio after infection with *Fusarium* and may mask the degradation of gliadins. Other causes that may explain the increase in GLI/GLU ratio are: (i) the reduced protein synthesis produced by *Fusarium* infection; (ii) the subsequent

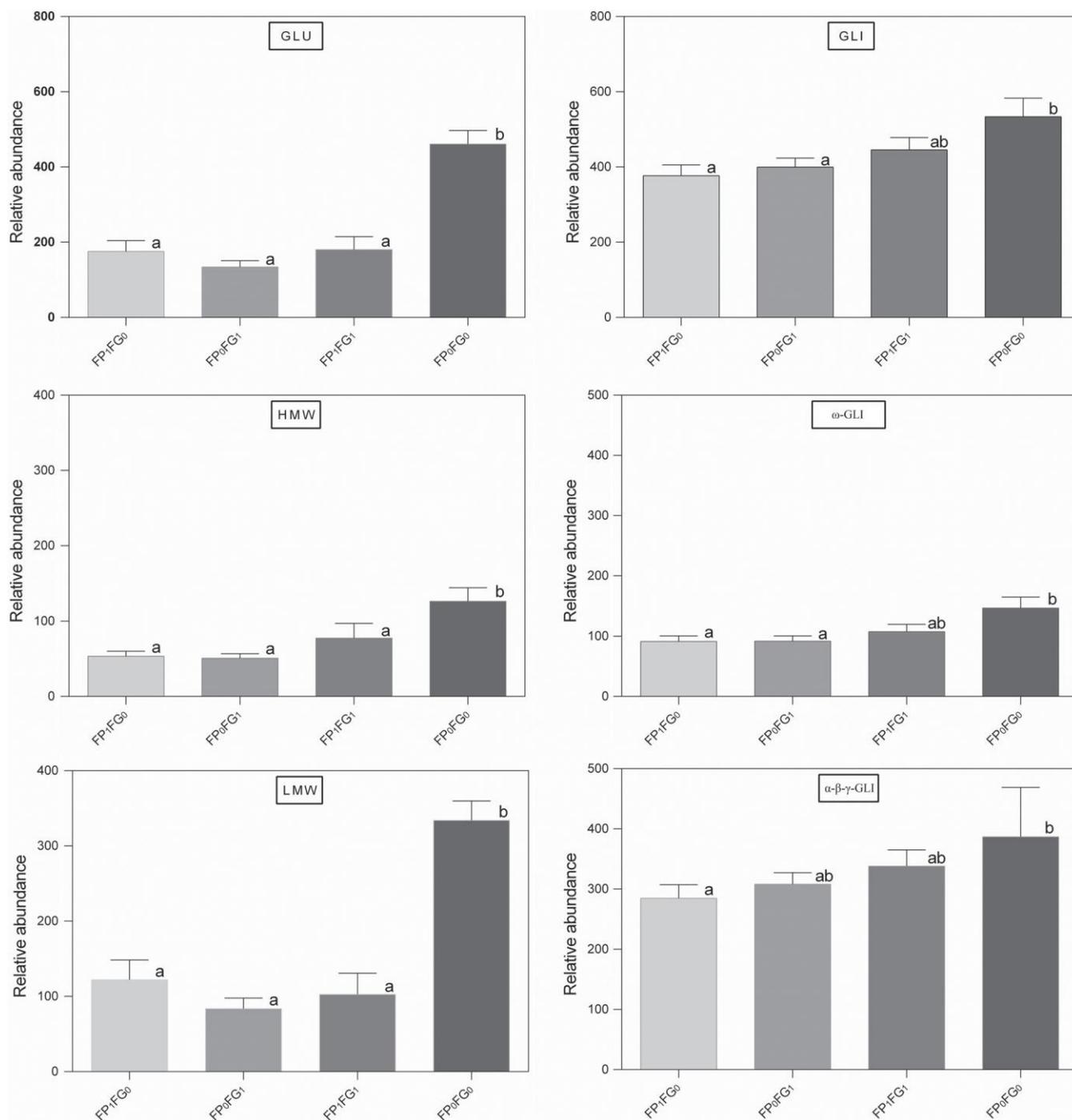


Figure 4. Relative abundance of each protein subunit for different treatments in *Fusarium* damaged kernel (FDK) in the 2014 growing season. Treatments: *Fusarium poae* (FP₁FG₀), *Fusarium graminearum* (FP₀FG₁), both pathogens (FP₁FG₁) and control without *Fusarium* (FP₀FG₀). GLU, glutenins; GLI, gliadins; HMW, high molecular weight glutenins; LMW, low molecular weight glutenins; ω-GLI, ω-gliadins; α-β-γ-GLI, α, β, γ-gliadins. Mean ± SEM. Columns with different lowercase letters are statistically different according to Tukey's test at $P \leq 0.05$.

inhibition of protein synthesis by the accumulation of DON; and (iii) the formation of polymeric glutenins in the later maturation stages.²⁹

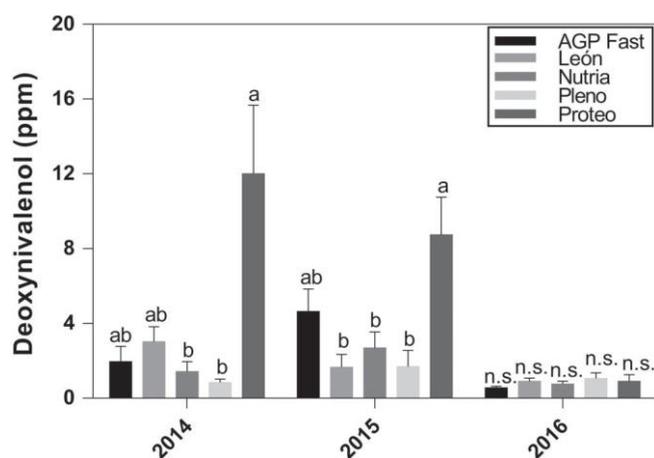
Regarding the potential impact on baking quality, several studies have reported that the presence of proteolytic enzymes that can affect glutenin/gliadin fractions are consistent with: (i) the significant reduction in the resistance to extension; (ii) an inverse relationship between loaf volume and the level of FDK

contamination; and (iii) a decrease in dough functionality and loaf volume accentuated in baking processes that involve long fermentation periods.³¹ In the present study, we observed that *F. graminearum* degraded in more proportion glutenin fractions, whereas *F. poae* affected gliadins. In the same way, Brzozowski et al.³³ demonstrated in wheat that proteolytic intra and extra-cellular enzymes synthesized by *F. poae* were capable of gliadin hydrolysis in a greater proportion compared to other species

Table 1. Grains contamination with Deoxynivalenol (DON), 3-acetyl deoxynivalenol (3-ADON), 15-acetyl deoxynivalenol (15-ADON) and Nivalenol (NIV) in five wheat genotypes during THE 2014, 2015 and 2016 growing seasons

Year	Inoculation	DON ($\mu\text{g g}^{-1}$)	3-ADON ($\mu\text{g g}^{-1}$)	15-ADON ($\mu\text{g g}^{-1}$)	NIV ($\mu\text{g g}^{-1}$)
2014	<i>Fusarium poae</i>	ND	ND	ND	0.19 ± 0.05
	<i>Fusarium graminearum</i>	5.06 ± 2.47	44.45 ± 35.18	0.13 ± 0.04	ND
	<i>Fusarium poae</i> / <i>Fusarium graminearum</i>	3.00 ± 1.22	55.76 ± 31.37	0.12 ± 0.04	0.12 ± 0.04
	Control	1.03 ± 0.23	8.02 ± 1.25	0.09 ± 0.04	0.08 ± 0.03
2015	<i>Fusarium poae</i>	ND	ND	ND	0.11 ± 0.02
	<i>Fusarium graminearum</i>	4.54 ± 1.62	10.75 ± 3.16	2.98 ± 1.49	ND
	<i>Fusarium poae</i> / <i>Fusarium graminearum</i>	3.53 ± 0.80	11.10 ± 2.21	1.59 ± 1.12	0.11 ± 0.02
	Control	1.95 ± 0.95	9.11 ± 1.67	0.49 ± 0.08	0.09 ± 0.02
2016	<i>Fusarium poae</i>	ND	ND	ND	0.02 ± 7.3 × 10 ⁻⁴
	<i>Fusarium graminearum</i>	1.01 ± 0.29	30.96 ± 7.21	1.03 ± 0.19	ND
	<i>Fusarium poae</i> / <i>Fusarium graminearum</i>	0.99 ± 0.31	22.28 ± 5.43	0.71 ± 0.23	0.02 ± 1.5 × 10 ⁻³
	Control	0.79 ± 0.11	22.57 ± 2.83	0.50 ± 0.07	0.02 ± 1.5 × 10 ⁻³

ND, not detected.


Figure 5. Differences between genotypes for the concentration of deoxynivalenol. Mean ± SEM. Columns with different lowercase letters are statistically different according to Tukey's test at $P \leq 0.05$.

such as *F. graminearum*. In the present study, when both *Fusarium* species were inoculated together, gliadins (ω and α - β - γ gliadins) and glutenins (HMW and LMW) were degraded in a remarkable proportion, although there was no evidence to support synergism regarding the impact on protein fractions and baking properties.

We found mycotoxins in all of the *Fusarium* treatments evaluated. Between *Fusarium* treatments, no statistical differences were observed for the mycotoxins concentration (Table 1), assuming that synergism was not found under these experimental conditions. However, we reported genotype effects in 2014 and 2015 (Fig. 5), showing different extents of mycotoxin contamination in each genotype. Because the flowering patterns between genotypes were similar in the years analyzed, these differences in mycotoxin contamination could be a result of differences in FHB resistance (polygenic resistance).³⁴In 2014, we expected a higher mycotoxin contamination compared to 2015 and 2016, related to the major values of incidence/FHB index observed in the field. In 2014, we observed a slight predominance of *F. graminearum* respect to *F. poae*; therefore, we expected to find a major proportion of DON and its acetylated derivatives compared to NIV. In this

way, we observed that mycotoxin concentration varied greatly between *Fusarium* treatments, genotypes and years, observing the highest level of DON in 2014 ($5.06 \pm 2.47 \mu\text{g g}^{-1}$) and for 15-ADON in 2015 ($2.98 \pm 1.49 \mu\text{g g}^{-1}$), in both cases for *F. graminearum* treatment, whereas, for 3-ADON, the contamination was the highest ($55.76 \pm 31.37 \mu\text{g g}^{-1}$) in 2014 for *F. graminearum* × *F. poae* treatment (Table 1). Regarding NIV, it was the most frequent mycotoxin found in several previous studies, being more toxic than DON or its acetylated derivatives.^{9,35–37} In the present study, we observed low values of NIV ($0.19 \pm 0.05 \mu\text{g g}^{-1}$) in 2014 for *F. poae* treatment. Stenglein *et al.*³⁸ reported higher levels of NIV in wheat genotypes inoculated under field conditions (ranging between 0.30 and 16.10 $\mu\text{g g}^{-1}$). These differences in the NIV concentration may be a result of differences in the *Fusarium* isolates used, differences in the genotypes and/or differences in the environmental conditions during the flowering stage. Recently, Nazari *et al.*³⁹ found that, for *in vitro* conditions, the optimum temperature for *F. poae* NIV production is 27.5 °C (ranging between 20 and 35 °C), whereas, in the present study, the average temperatures during the flowering stage were lower in 2014, 2015 and 2016 (18.22, 17.65 and 17.62 °C, respectively). In general terms, the most common trichothecene found in cereal grains is DON, which often occurs along with relatively small amounts of acetylated derivatives.¹⁴ In recent years, several studies have reported the simultaneous production of 3-ADON and 15-ADON in comparable amounts by *F. graminearum*, demonstrating a tendency to increase the simultaneous production of both DON-acetylated derivatives.^{15,18,22} In the present study, we found a major concentration of 3-ADON along the different years (Table 1), despite the fact that the *F. graminearum* isolates used were DON, 3-ADON and 15-ADON producers. A possible explanation for the prevalence of 3-ADON is that the secondary metabolite biosynthesis could be affected mainly by temperature and other environmental conditions.⁴⁰ Recently, Ramírez Albuquerque *et al.*⁴¹ found that, under *in vitro* conditions, temperature plays an important role in the mycotoxin production, with the production of 3-ADON being maximum at 25 – 30 °C, whereas the production of 15-ADON is maximum at 10 °C. In addition, these results could also depend on the interaction between the *Fusarium* isolates chosen for the mixture, as well as the chemotype of each of them.⁴²

CONCLUSIONS

This research presents novel information about the interaction between *F. graminearum* and *F. poae* on wheat genotypes under field conditions. However, many questions remain to be addressed and further work is clearly needed to determine how plant – pathogen interactions can impact on disease development, grain quality and mycotoxin contamination. We conclude that: (i) at least in years with favorable conditions for FHB development (*F. graminearum*), a trend was observed suggesting that synergism between *F. graminearum* and *F. poae* could exist in disease parameters; (ii) degradation of different protein fractions depends on each *Fusarium* species (glutenins were degraded preferably by *F. graminearum*, gliadins were degraded preferably by *F. poae*, both protein fractions were degraded when both *Fusarium* species were present); and (iii) different concentrations of mycotoxins (mainly DON) were observed among the genotypes evaluated, which could be useful in the future for genetic improvement. Nevertheless, strong effects of the genotype (variations in plant-pathogen interaction) and the year (variations in climatic conditions) exist with respect to the *Fusarium*– wheat pathosystem; therefore, more studies are considered necessary, even under controlled conditions, to confirm these results.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Wheat Industrial Quality Laboratory-UNCPBA, Mendivil, G., Troncoso, U. and Pacheco, W. for technical assistance in the field experiments. This research was carried out with the funds: FONCyT-PICT 213/2015 and UNCPBA.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that they no have conflicts of interest.

SUPPORTING INFORMATION

Supporting information may be found in the online version of this article.

REFERENCES

- USDA, United States Department of Agriculture, Available: <https://www.fas.usda.gov/data/argentina-grain-and-feedupdate-7> [5 September 2018].
- Horvat D, Spanic V, Dvojkovic K, Simic G, Magdic D and Nevistic A, The influence of *Fusarium* infection on wheat (*Triticum aestivum* L.) proteins distribution and baking quality. *Cereal Res Commun* **43**:61–71 (2015).
- Reis EM and Carmona M, *Fusariosis del Trigo: Biología, Epidemiología y Estrategias Para su Manejo*. BASF Argentina S.A, Buenos Aires (2002).
- Covarelli L, Beccari G, Prodi A, Generotti S, Etruschi F, Juan C et al., *Fusarium* species, chemotype characterization and trichothecene contamination of durum and soft wheat in an area of Central Italy. *J Sci Food Agric* **95**:540–551 (2016).
- Dinolfo MI, Barros GG and Stenglein SA, Development of a PCR assay to detect the potential production of nivalenol in *Fusarium poae*. *FEMS Microbiol Lett* **332**:99–104 (2012).
- Placinta CM, D'Mello JPF and MacDonald AMC, A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Anim Feed Sci Technol* **78**:21–37 (1999).
- Desjardins AE, *Fusarium Mycotoxins: Chemistry, Genetics, and Biology*. APS, St Paul, MN (2006).
- Leslie JF and Summerell BA, *The Fusarium Laboratory Manual*. Oxford, Blackwell Publishing (2006).
- Wan MYL, Turner PC and El-nezami H, Individual and combined cytotoxic effects of *Fusarium* toxins (deoxynivalenol, nivalenol, zearalenone and fumonisins B1) on swine jejunal epithelial cells. *Food Chem Toxicol* **57**:276–283 (2013).
- Parry DW, Jenkinson P and McLeod L, *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals??? A review. *Plant Pathol* **44**:207–238 (1995).
- Eggert K, Rawel HM and Pawelzik E, *In vitro* degradation of wheat gluten fractions by *Fusarium graminearum* proteases. *Eur Food Res Technol* **233**:697–705 (2011).
- Vogelgsang S, Sulyok M, Hecker A, Jenny E, Krska R, Schuhmacher R et al., Toxicogenicity and pathogenicity of *Fusarium poae* and *Fusarium avenaceum* on wheat. *Eur J Plant Pathol* **122**:265–276 (2008).
- Xu XM, Monger W, Ritieni A and Nicholson P, Effect of temperature and duration of wetness during initial infection periods on disease development, fungal biomass and mycotoxin concentrations on wheat inoculated with single, or combinations of, *Fusarium* species. *Plant Pathol* **56**:943–956 (2007).
- Miller JD, Aspects of the ecology of *Fusarium* toxins in cereals, in *Mycotoxins and Food Safety*, ed. de Vries JW, Truckess MW, Jackson LS. Springer, Boston, 19–27 (2002).
- Fernández Pinto V, Terminiello LA, Basilico JC and Ritieni A, Natural occurrence of nivalenol and mycotoxigenic potential of *Fusarium graminearum* strains in wheat affected by head blight in Argentina. *Braz J Microbiol* **39**:157–162 (2008).
- Xu XM and Nicholson P, Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annu Rev Phytopathol* **47**:83–103 (2009).
- Brennan JM, Egan D, Cooke BM and Doohan FM, Effect of temperature on head blight of wheat caused by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum*. *Plant Pathol* **54**:156–160 (2005).
- Castañares E, Albuquerque DR, Dinolfo MI, Fernández Pinto V, Patriarca A and Stenglein SA, Trichothecene genotypes and production profiles of *Fusarium graminearum* isolates obtained from barley cultivated in Argentina. *Int J Food Microbiol* **179**:57–63 (2014).
- Catálogo comercial de variedades Buck de trigo y avena, Buck Semillas S.A., (2016). Available from: www.semillasbuck.com.ar [26 August 2019].
- Catálogo comercial de variedades Klein de trigo pan, Klein S.A., (2016). Available from: www.trigoklein.com.ar [26 August 2019].
- Campbell KA and Lipps PE, Allocation of resources: sources of variation in *Fusarium* head blight screening nurseries. *Phytopathology* **88**:1078–1086 (1998).
- Alvarez CL, Azcarate MP and Fernández Pinto V, Toxicogenic potential of *Fusarium graminearum* sensu stricto isolates from wheat in Argentina. *Int J Food Microbiol* **135**:131–135 (2009).
- Bates D, Maechler M, Bolker B and Walker S, Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J Stat Softw* **67**:1–48 (2015).
- Lenth RV, emmeans: estimated marginal means, a.k.a. least-squares means. R package version 1.3.0. Available <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans> [5 March 2019].
- Lori GA, Sisterna MN, Sarandón SJ, Rizzo I and Chidichimo H, *Fusarium* head blight in wheat: impact of tillage and other agronomic practices under natural infection. *Crop Prot* **28**:495–502 (2009).
- Moschini RC and Fortugno C, Predicting wheat head blight incidence using models based on meteorological factors in Pergamino, Argentina. *Eur J Plant Pathol* **102**:211–218 (1996).
- McMullen M, Bergstrom G, De Wolf E, Dill-Macky R, Hershman D, Shaner G et al., A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: *Fusarium* head blight. *Plant Dis* **96**:1712–1728 (2012).
- Eggert K, Wieser H and Pawelzik E, The influence of *Fusarium* infection and growing location on the quantitative protein composition of (part I) emmer (*Triticum dicoccum*). *Eur Food Res Technol* **230**:837–847 (2010).
- Wang J, Wieser H, Pawelzik E, Weinert J, Keutgen AJ and Wolf GA, Impact of the fungal protease produced by *Fusarium culmorum* on the protein quality and bread making properties of winter wheat. *Eur Food Res Technol* **220**:552–559 (2005).
- Hysing SC and Wiik L, *Fusarium* seedling blight of wheat and oats: effects of infection level and fungicide seed treatments on agronomic characters. *Acta Agric Scand B* **64**:537–546 (2014).
- Nightingale MJ, Marchylo BA, Clear RM, Dexter JE and Preston KR, *Fusarium* head blight: effect of fungal proteases on wheat storage proteins. *Cereal Chem* **76**:150–158 (1999).

- 32 Phalip V, Delalande F, Carapito C, Goubet F, Hatsch D and Leize-Wagner E, Diversity of the exoproteome of *Fusarium graminearum* grown on plant cell wall. *Curr Genet* **48**:366–379 (2005).
- 33 Brzozowski B, Dawidziuk K and Bednarski W, Gliadin degradation by proteases of *Fusarium* genus fungi in different in vivo and in vitro conditions. *Pol J Nat Sci* **23**:188–206 (2008).
- 34 Gunupuru LR, Perochon A and Doohan FM, Deoxynivalenol resistance as a component of FHB resistance. *Trop Plant Pathol* **42**:175 – 183 (2017).
- 35 Xu XM, Parry DW, Nicholson P, Thomsett MA, Simpson D, Edwards SG *et al.*, Predominance and association of pathogenic fungi causing *Fusarium* ear blight in wheat in four European countries. *Eur J Plant Pathol* **112**:143–154 (2005).
- 36 Lindblad M, Gidlund A, Sulyok M, Börjesson T, Krska R, Olsen M *et al.*, Deoxynivalenol and other selected *Fusarium* toxins in Swedish wheat- occurrence and correlation to specific *Fusarium* species. *Int J Food Microbiol* **167**:284–291 (2013).
- 37 Parikka P, Hakala K and Tilikkala K, Expected shifts in *Fusarium* species' composition on cereal grain in Northern Europe due to climatic change. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* **29**:1543–1555 (2012).
- 38 Stenglein SA, Dinolfo MI, Barros G, Bongiorno F, Chulze SF and Moreno MV, *Fusarium poae* pathogenicity and mycotoxin accumulation on selected wheat and barley genotypes at a single location in Argentina. *Plant Dis* **98**:1733–1738 (2014).
- 39 Nazari L, Patteri E, Manstretta V, Terzi V, Morcia C, Somma S *et al.*, Effect of the temperature on growth, wheat head infection, and nivalenol production by *Fusarium poae*. *Food Microbiol* **76**:83–90 (2018).
- 40 Sugiura Y, Watanabe Y, Tanaka T, Yamamoto S and Ueno Y, Occurrence of *Gibberella zeae* strains that produce both nivalenol and deoxynivalenol. *Appl Environ Microbiol* **56**:3047–3051 (1990).
- 41 Ramirez Albuquerque LD, Influence of environmental factors in the relative production of tricothecenes by *Fusarium graminearum*. MSc thesis, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (2014). http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5609_RamirezAlbuquerque
- 42 Von der Ohe C and Miedaner T, Competitive aggressiveness in binary mixtures of *F. graminearum* and *F. culmorum* isolates inoculated on spring wheat with highly effective resistance QTL. *J Phytopathol* **159**:401–410 (2010).

Effects of *Fusarium graminearum* and *Fusarium poae* on disease parameters, grain quality and mycotoxin contamination in barley (part II)

Mauro Martínez,^a Lady D Ramirez Albuquerque,^b María I Dinolfo,^a Fernando Biganzoli,^c Virginia F Pinto^b and Sabastian A Stenglein^{a*} 

Abstract

BACKGROUND: Barley is one of the most sown crops in the world, with multiple uses such as human consumption, animal feed and for the malting industry. This crop is affected by different diseases, such as Fusarium Head Blight (FHB), that causes losses in yield and quality. In the last years *F. graminearum* and *F. poae* were two of the most frequently isolated species in barley grains, so the aim of this study was to evaluate the interaction between these *Fusarium* species and the effects on disease parameters, grain quality and mycotoxin contamination on five barley genotypes under field conditions.

RESULTS: Statistical differences between *Fusarium* treatments for some parameters depending mainly on the year/genotype were found. The results showed that the germination process was affected by both *Fusarium* species. As to grain quality and the different hordein fractions, it was observed that *F. graminearum* affects preferentially D and C-hordeins. Different concentrations of nivalenol, deoxynivalenol and their acetylated derivatives (3-acetyl deoxynivalenol (3-ADON), 15-acetyl deoxynivalenol (15-ADON)) were detected.

CONCLUSIONS: In the present work, no evidence of synergism between *F. graminearum* and *F. poae* were found regarding disease parameters and mycotoxin contamination. However, at least in the years with favorable climatic conditions to FHB development and depending on the barley genotype, a continuous monitoring is deemed necessary to prevent the negative impact on protein composition and germinative parameters

© 2020 Society of Chemical Industry

Keywords: *Fusarium*; barley; mycotoxins; disease parameters; grain quality; plant-pathogen interaction

INTRODUCTION

Barley (*Hordeum vulgare* L.) is one of the most sown crops in the world due to its multiple uses such as human consumption, animal feed and for the malting industry. Barley grains are the major raw material used for brewing, being the malting barley the major input for the brewing industry. Within the commercial quality parameters for malting barley, the most important ones are germinative power (GP > 95%), protein concentration (PC < 12%) and screening percentage (SP > 85% grains with a diameter greater than 2.5 mm).^{1,2} In the last few years, the production of two-row barley has grown significantly and the main destination is the brewing industry, although the use of barley for animal feed is also increasing. The global barley production in 2017/2018 was about 142.97 million tons, with the US Department of Agriculture (USDA) estimating that the production for 2018/2019 will be about 147.57 million tons. The major barley producers are the European Union (59.09 million tons) and Russia (20.18 million tons).³

Regarding grain quality, a group of storage proteins highly abundant in cereal seeds is the prolamins, known as hordeins in barley and representing the major fraction of the endosperm storage proteins in grains. The type of protein stored influences malt extract regardless of grain PC. Hordeins are classified into three

groups: (i) high molecular weight (D-hordeins); (ii) poor in sulfur (C-hordeins); (iii) rich in sulfur (B-hordeins). The D-hordeins have an approximate size of 100 kDa and represent less than 10% of the total seed content. The C-hordeins have a size of 55 to 70 kDa, do not contain cysteine residues, so they do not tend to form complexes with other proteins and their abundance is 10–20%. The B-hordeins have a size of 36 to 44 kDa, are rich in cysteine residues, therefore they can form intrachain or interchain disulfide bridges and are the most abundant (75–80%).⁴ The B-hordeins represent the primary factor affecting grain protein content, with

* Correspondence to: S A Stenglein, Laboratorio de Biología Funcional y Biotecnología (BIOLAB)-INBIOTEC-CONICET-UNCPBA-CICBA, Facultad de Agronomía, Av. República de Italia # 780. 7300 Azul, Buenos Aires, Argentina. E-mail: stenglein@faa.unicen.edu.ar

^a Laboratorio de Biología Funcional y Biotecnología (BIOLAB)-INBIOTEC-CONICET-UNCPBA-CICBA, Facultad de Agronomía, Buenos Aires, Argentina

^b Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Buenos Aires, Argentina

^c Departamento de Métodos Cuantitativos y Sistemas de Información., Facultad de Agronomía, UBA, Buenos Aires, Argentina

a negative correlation between the B-hordein content and malt extract.⁵

Fusarium Head Blight (FHB) is one of the most devastating diseases that occur in barley in most areas of the world causing not only damage to crops but also serious economic losses. FHB is observed mainly in the regions with a warm and wet climate coinciding with the flowering stage of this cereal. Currently, *F. graminearum* is the dominant species isolated worldwide but in the last years, *F. poae* has been commonly found by several researchers in diverse substrates such as barley and wheat.⁶ FHB causes quantitative and qualitative damage to crops with a significant impact on yield and several functional parameters of grain related to malting and brewing quality, with beer gushing (violent overfoaming of beer) being the most infamous. In general, pronounced effects on germination, soluble nitrogen, free amino nitrogen, wort color, and β -glucan levels were reported and many of the changes likely resulted from enzymes produced by *Fusarium* spp.^{1,6–9} However, the greatest concern for the use of barley infected with FHB has been the presence of mycotoxins.^{1,7}

Fusarium has the capacity to produce trichothecenes, one of the most important groups of mycotoxins that can cause harmful effects on humans and animals through ingestion of contaminated cereal grains. Variations in environmental conditions, crops and storage factors can influence the type and amount of mycotoxins produced by different *Fusarium* species.¹⁰ *Fusarium graminearum* has the capacity to produce a wide spectrum and quantity of mycotoxins, such as deoxynivalenol (DON), that can be acutely lethal when consumed in large amounts, and its acetylated derivatives 3-acetyl deoxynivalenol (3-ADON) and 15-acetyl deoxynivalenol (15-ADON). DON has been found to carry through malting and brewing into finished beer and has been reported in commercial beers at levels of 0.30 to 569 $\mu\text{g L}^{-1}$.¹¹ *Fusarium poae* has special importance since it is the main *Fusarium* pathogen able to produce nivalenol (NIV), an important mycotoxin that in high concentrations can inhibit cell proliferation and produces cytotoxic effects on cells.¹² High NIV concentrations were found in commercial samples of beer reaching values of 2.40 \pm 1.9 $\mu\text{g L}^{-1}$.¹³ However, the European Scientific Committee on Food (SCF) has established limits for DON only, considering a tolerable daily intake of 1 mg kg^{-1} body weight, while for NIV established a provisional limit value of 0.7 mg kg^{-1} body weight.¹⁴

It is known that the competition for resources between *Fusarium* species can produce more toxins under stress conditions, while in co-inoculations no evidence was found to support synergism between fungal isolates in causing visual symptoms.¹⁵ The aim of this study was to evaluate the effects of the presence of *F. graminearum* and *F. poae* in terms of disease parameters, grain quality and mycotoxin contamination in two-row barley under field conditions.

MATERIALS AND METHODS

Fusarium

isolates

A mixture of four isolates of *F. graminearum* with the ability to produce DON, 3-ADON and 15-ADON *in vitro* were selected for the production of the inoculum (isolates 3.4, 88.1, 92.2 and 129.1)¹⁶ while another mixture of four isolates of *F. poae* (FP-TSa1b, FP-TBig1a, FP-TMa1a, and FP-TPC1a) based on the production of NIV *in vitro* were used.¹⁷ The fungal inoculum was produced by placing individual agar plugs with mycelium and conidia onto liquid medium containing carboxymethyl cellulose (CMC) for *F. graminearum* and potato dextrose agar (PDA) in Petri dishes

(90 mm) for *F. poae*. For *F. graminearum*, 50 mL of CMC medium were placed in 250 mL Erlenmeyer flask and shaken continuously for 10 days (100 rpm, 25 \pm 2 °C and darkness). For *F. poae* the time of incubation was 7 days at 25 \pm 2 °C under 12 h each of light and darkness. In this case, the conidial harvest was done by flooding the plates with 5 mL of sterilized distilled water (SDW) and dislodging the conidia with a bent glass rod. For both *Fusarium* species, the resulting suspension was filtered through cheesecloth and the conidial suspension was adjusted to 1 \times 10⁵ conidia mL^{-1} with a Neubauer hemacytometer.¹⁸ For each *Fusarium* species, the final conidial suspension was prepared with equal parts of each of the four isolates. Tween 20 (0.05%) was added to the suspension as a surfactant.

Barley genotypes

Five genotypes of spring barley were evaluated: Scarlett (the genotype sown by most growers in Argentina, with excellent performance and malt quality), Shakira (second genotype in sowing area, for malting and with high yield potential), Andreia (new genotype, high SP and malt quality), Scrabble (barley genotype for malting and with high yield potential) and INTA 7302 (two-row barley for malting or forage use). These genotypes were chosen because their times to harvest and rates of development through phenological stages were similar.

Experimental

design

Field assays were carried out on the experimental farm at the Faculty of Agronomy, Azul, Buenos Aires Province, Argentina (36° 49'41.4" S, 59° 53'11.6" W). The soil is a typical Argiudoll and the following are the characteristics of this soil at the depth of 0 to 20 cm: texture = clay loam soil, pH 6.06 (1:2.5 in water), nitrate-nitrogen (N) = 7.10 kg N ha^{-1} (reflectometry), available phosphorus (P) = 26.50 ppm, organic matter = 3.23%. The field trials were repeated in 2014, 2015, and 2016 growing seasons. Conventional tillage practices were made with a disc plow and harrow to a depth of 15 cm. Sowing dates ranged 14–16 July in the 3 years because they were adjusted for the different genotypes to ensure uniformity in the timing of inoculation. Each plot size was 8 m \times 1.5 m and genotypes were sown at 350 seeds m^{-2} . The distance between plots was 1 m. Plants were grown in the absence of any nutritional or pest stress, without supplemental irrigation or fungicide treatments. Plants were fertilized with 150 kg N ha^{-1} , using urea (46% nitrogen) in split doses at sowing and Z2.3.¹⁹ During crop cycle, insecticide (cypermethrin) were applied in the 3 years and weeds were removed by hand. Barley heads were inoculated when > 50% of the plants having undergone fertilization (Z.49) according to the literature.^{19,20} Conidial suspensions were applied until run-off using a hand-held garden sprayer (2 L), with adjustable brass nozzles. Plots were artificially inoculated by spraying 1 L of spore suspension (250 mL in each subplot). For control treatment, SDW with Tween 20 (0.05%) was used to inoculate. The inoculum was applied: (A) in the absence of wind, to limit the drift of the inoculum to neighboring plots; (B) in the evening on preferably cloudy days with high relative humidity (RH > 80%), to avoid the evaporation of the inoculum; (C) keeping a distance between the nozzle and the spikes of around 5 cm, to avoid spore dispersion. Furthermore, the plot to be inoculated was temporarily isolated from adjacent plots by placing 1.60 m plastic panels on the three sides of the plot and removing the panels when the inoculation was finished. To check the possibility of contamination with other *Fusarium* spp., 100 grains per subplot were selected at random, superficially

disinfected (70% ethanol for 2 min and 5% sodium hypochlorite for 2 min, then finally rinsed twice in SDW) and placed on PDA with 0.25 g of chloramphenicol and incubated for 7 days at 25 ± 2 °C under 12 h each of light and darkness. *Fusarium* spp. were identified according to Leslie and Summerell.²¹ The field experiment was a split-plot design with four blocks, where the 20 treatments (five genotypes by two levels – presence or absence – of each *Fusarium* species) were applied for each block. Each plot sown with a genotype was divided into four subplots which were randomly assigned to one of the four inoculation combinations: (i) with *F. graminearum* alone (FP₀FG₁), (ii) with *F. poae* alone (FP₁FG₀), (iii) with both pathogens (FP₁FG₁), (iv) control without *Fusarium* species (FP₀FG₀). Temperature, RH, and precipitation data (from inoculation to harvest in 2014, 2015, and 2016) were obtained from the National Meteorological Center Weather Station located 100 m from the experimental site and from the Regional Center of Agrometeorology (RCA).

Measurements

Visual disease assessment (incidence, severity, FHB index) was conducted at 21 days post-inoculation by counting the number of symptomatic grains (lesions or bleaching of grains or glumes with a dark margin) of 40 spikes per plot selected at random according to Campbell and Lipps.²² After physiological maturity the plots were harvested, threshed and cleaned manually. Grain yield per plot (in g m⁻²) was measured. Protein content and percentage of moisture were measured with a NIT analyzer with double-face monochromator (Agricheck, Bruins Instruments, Salem, NH, USA). The grains were sieved and the percentage of grains retained on a 2.5-mm sieve (SP) were recorded. The germinative energy (GE) and the GP of seeds were evaluated according to ISTA rules for seed testing.²³ The different fractions of hordeins were extracted from symptomatic/healthy grains by the method described by Salgado-Albarrán *et al.*⁴ All proteins were separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ($T = 13.5\%$). The gels were stained with 0.05% Coomassie Brilliant Blue R250 for 24 h, destained in trichloroacetic acid 12% for 48 h and finally washed in SDW for 24 h. The resulting gels were scanned and analyzed by using TotalLab (v1.10 demo) software to measure the intensity of the pixel as an abundance indicator. Background subtraction was applied to avoid the variability due to the staining process. The contents of total hordein and D-, C-, B-hordein fractions were determined. The toxins found in the grain samples were analyzed. About 200 g of seeds were taken, reduced to 25 g using a grain divider (Cereal Tools®) and ground with a high speed disintegrator FW-110 (Arcano®; Pasteur Instrumental, Buenos Aires, Argentina).²⁴ Trichothecenes were extracted for 1 h at 300 rpm with 125 mL of acetonitrile/acetate/water (50:41:9). The clean-up was performed with a column packed with charcoal/alumina/celite (0.7:0.5:0.3) and dried in a rotary evaporator. Gas chromatography (GC), with 63Ni electron capture detection Shimadzu Model GC17 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) equipped with split/splitless injector and fitted with RX-5MS capillary column (25 m × 0.2 mm i.d.), was used to detect and quantify trichothecenes. The detection limits were 0.02 µg g⁻¹ for DON and its acetyl derivatives and 0.05 µg g⁻¹ for NIV, while the quantification limits were 0.06 µg g⁻¹ for DON and 0.15 µg g⁻¹ for NIV. Standards of DON, 3-ADON, 15-ADON and NIV were purchased from Sigma Chemical Company (St Louis, MO, USA). The presence of compounds was confirmed by GC-mass spectrometry (GC-MS QP 5050A, Shimadzu®) with electron impact (EI) mode (70 eV) as described by Alvarez *et al.*²⁵

Statistical analysis

All the variables evaluated were analyzed using the software R (v.3.3.3, R Core Team 2018).²⁶ Due to the contrasting climatic conditions observed in the three growing seasons (mainly during the anthesis-harvest period), each year was evaluated separately. The main factor was the barley genotype and two levels (presence or absence) of each *Fusarium* species nested within the genotype, with four blocks for each combination of treatments. We used mixed-effects linear models, which allow nesting plots within blocks and subplots within plots. Data assumptions were verified graphically using plots of fitted values *versus* the residuals for homogeneity of variances and using normal Q-Q plots for normality of residuals. Furthermore, the Shapiro–Wilk test was used to check for normality of residuals. PC, thousand kernel weight (TKW), grain yield (GY) and hordein fractions (D-, C-, and B-hordeins) were analyzed using the lmer function (lmer~variable ~ *F. graminearum* * *F. poae* * barley genotype + (1|block/bigplot), data = barley) (lme4 package)²⁷ with normal distribution of error. For mycotoxins analysis (DON, 3-ADON, 15-ADON and NIV) log transformation was performed (lmer~log (mycotoxin+1) ~ *F. graminearum* * *F. poae* * barley genotype + (1|block/bigplot), data = barley). The variables incidence (I), severity (S), FHB index, GE, GP and SP were analyzed with a generalized linear mixed model (glmer~variable (cbind) ~ *F. graminearum* * *F. poae* * barley genotype + (1|block/bigplot), family = binomial (link = 'logit'), data = barley) that considered the restrictions in the randomization and nonnormal errors with the function glmer (lme4 package).²⁷ In all cases, a full model including all interactions was analyzed and significance was tested with Type II Likelihood Ratio Test. Significant effects were tested with the lsmeans function (emmeans package).²⁸ Results were reported as the mean ± standard error of the mean (SEM) for all the variables analyzed, except for mycotoxins contamination that was reported as mean ± SEM of the log transformed data.

RESULTS

Climatic conditions

The environmental conditions in the 3 years were different particularly in the flowering stage. In 2014, the average temperature was the highest (18.22 ± 3.71 °C) being the warmest and wettest year (209.60 mm, $67.24 \pm 11.55\%$ RH), favorable for growth conditions for *Fusarium* spp. In contrast, in 2015 and 2016 growing seasons the weather conditions were not optimal for the development of the disease (Table 1). The spring of 2015 had the lowest minimum temperatures (9.88 ± 4.08 °C) with less rainfall than 2014 (144.60 mm, $68.88 \pm 11.17\%$ RH), while the spring of 2016 was the driest with low rainfall and less RH (74.90 mm, $59.79 \pm 13.07\%$ RH) with moderate temperatures (17.62 ± 3.88 °C). Regarding historical precipitation for the anthesis-harvest period, in 2014 we registered an increase of 27%, while in contrast in 2015 and 2016 we observed a decrease in the precipitation (12% and 55%, respectively) (Table 1).

Disease parameters

Significant differences ($P < 0.05$, $n = 80$) were detected only for incidence and severity parameters in 2014, but not for 2015 and 2016 growing season (Fig. 1). In addition, all genotypes showed symptoms with all the isolates used as inoculum. Regarding incidence ($P = 0.0055$, $n = 80$), effects of the *Fusarium* treatments were observed only in 2014 (Fig. 1(A)) showing the highest values for FP₁FG₁ treatment ($58.00 \pm 6.00\%$) followed by FP₀FG₁ (50.00

Table 1. Mean values and standard deviation of temperature, relative humidity (RH), and accumulated precipitation during 2014, 2015, and 2016 growing seasons (from inoculation to harvest)^a

Year	Temperature (°C)			RH% (average)	Accumulated precipitation (mm)	Historical precipitation (mm)	% Precipitation variation
	Average	Average minimum	Average maximum				
2014	18.22 ± 3.71	11.64 ± 3.52	25.19 ± 4.87	67.24 ± 11.55%	209.60		+27%
2015	17.65 ± 3.06	9.88 ± 4.08	24.97 ± 3.75	66.88 ± 11.17%	144.60	165.10	-12%
2016	17.62 ± 3.88	10.13 ± 4.10	25.10 ± 4.58	59.79 ± 13.07%	74.90		-55%

^a Weather station was located 100 m from the experimental site and data were taken every 30 min.

± 5.00%) and FP₁FG₀ (46 ± 6.00%). In the same way, severity was significantly different ($P < 0.0005$, $n = 800$) in 2014 for *Fusarium* treatments (Fig. 1(B)), being the most affected FP₁FG₁ and FP₀FG₁ (3.00 ± 0.23%) followed by FP₀FG₁ (2.80 ± 0.23%) and FP₁FG₀ (2.00 ± 0.23%).

However, in 2015 only significant differences ($P < 0.0010$, $n = 80$) were observed among different genotypes for incidence, being Shakira (29.00 ± 3.00%), Andreia (23.00 ± 3.00%) and INTA 7302 (21.00 ± 3.00%) the most affected genotypes, while Scrabble (8.00 ± 2.00%) and Scarlett (6.00 ± 2.00%) showed the lowest symptoms (Fig. 1(D)). In the same way, for severity only significant differences ($P < 0.0001$, $n = 800$) were found among the different genotypes being Shakira (5.80 ± 0.26%) the most affected genotype, while in Scrabble (0.30 ± 0.09%) the lowest values of severity were observed (Fig. 1(E)). Although the values were low, for FHB Index significant differences were observed ($P = 0.0012$, $n = 80$), being Shakira the most affected (2.30 ± 0.70), while Scrabble (0.10 ± 0.03) and Scarlett (0.10 ± 0.01) showed the lowest values (Fig. 1(F)).

Germination and grain quality parameters

Significant differences were observed only for *Fusarium* treatments in parameters such as GE, GP, and SP depending on the genotype, while there were no effects on PC (Table 2). For yield parameters as TKW and GY, there were only significant differences for genotype.

Regarding GE, in 2014 significant differences were found ($P < 0.0001$, $n = 60$) for *Fusarium* × genotype interaction, showing for FP₀FG₁ that Andreia was not affected (85.00 ± 3.00%), while Shakira (83.00 to 71.00%) was the most affected, with a decrease of 12.00% in relation to FP₀FG₀. In contrast, in 2015 and 2016 growing seasons significant differences were found ($P < 0.0001$, $n = 80$) for the interaction of the FP₁FG₀ × genotype. In 2015, Scarlett was the least affected genotype reducing GE by 2.00% (94.00 to 92.00%) while Andreia was the most affected with a loss of 11.00% (65.00 to 54.00%). In addition, Scarlett remained the least affected genotype in 2016, losing 2.00% (94.00 to 92.00%), while INTA 7302 was the most affected genotype with a loss of 8.00% (93.00 to 85.00%).

However, GP was affected in 2014 by the FP₁FG₁ × genotype interaction ($P = 0.0048$, $n = 60$), being Andreia the least affected losing 2.00% (92.00 to 90.00%), while a decrease of 6.00% was observed in INTA 7302 (90.00 to 84.00%). In addition, in 2015 and 2016 there were significant differences ($P < 0.0001$, $n = 80$) for the FP₁FG₀ × genotype interaction. In 2015, Scarlett was the least affected genotype, reducing only by 2.00% (98.00 to 96.00%), while a reduction of 11.00% was observed in Andreia

(83.00 to 72.00%). In the same way, in 2016 Scarlett was the least affected genotype losing only 2.00% (97.00 to 95.00%), while the greatest decreases (7.00%) were observed in INTA 7302 (97.00 to 90.00%).

Regarding SP, in 2014 only significant differences were observed for genotype, showing Shakira the highest values (96.75 ± 0.59%) and INTA 7302 the lowest values (90.30 ± 1.35%). However, in 2015 FP₁FG₁ × genotype interaction was observed, showing the highest values of SP for Shakira × FP₀FG₀ (97.55 ± 0.50%) while the lowest values were reported for INTA 7302 × FP₁FG₁ (94.73 ± 0.76%). In 2016, *F. poae* × genotype interaction showed significant differences, being Shakira the genotype most affected, decreasing the SP in 0.62% respect to the control.

As to grain yield parameters such as TKW and GY, there were significant differences only for genotype. In contrast, for PC there were no significant differences in any of the years evaluated (Table 2). For TKW in 2014 and 2015, Scrabble had the heaviest grain (41.64 and 51.51 g, respectively) while the lower grain weights were found in Scarlett (34.69 and 42.27 g, respectively). In the same way, for GY the lowest values were reported in Scarlett (478.81 ± 32.75 g m⁻²), while Andreia showed the highest GY (611.56 ± 32.75 g m⁻²).

Protein composition

The analysis of protein fractions was performed only in 2014, due to the favorable conditions for FHB development. Significant differences were found for *Fusarium* treatments, showing degradation of the different hordeins fractions with respect to the control (Table 3, Fig. 2). For D-hordeins, the highest decrease in relative abundance were observed in FP₀FG₁ treatment decreasing by 83.41% compared to the control, while a decrease of 81.24% on average was observed for FP₁FG₀ and FP₁FG₁. In the same way, for C-hordeins the lowest values were observed in FP₀FG₁ decreasing by 82.35% with respect to FP₀FG₀, while for FP₁FG₀ and FP₁FG₁ a decrease of 79.46% on average was reported. However, the greatest degradation in B-hordeins fraction was caused by FP₁FG₁ treatment, being 50.25% lower than the control, while a decrease of 39.07% on average was observed in FP₁FG₀ and FP₀FG₁ treatments. Regarding the total hordeins content, the lowest values of relative abundance were found in FP₁FG₁ treatment being 68.55% lower than FP₀FG₀, while for FP₁FG₀ and FP₀FG₁ a decrease of 66.66% on average was observed.

Mycotoxin contamination

Regarding the possible antagonism/synergism interaction between the mycotoxins accumulation of *F. graminearum* and

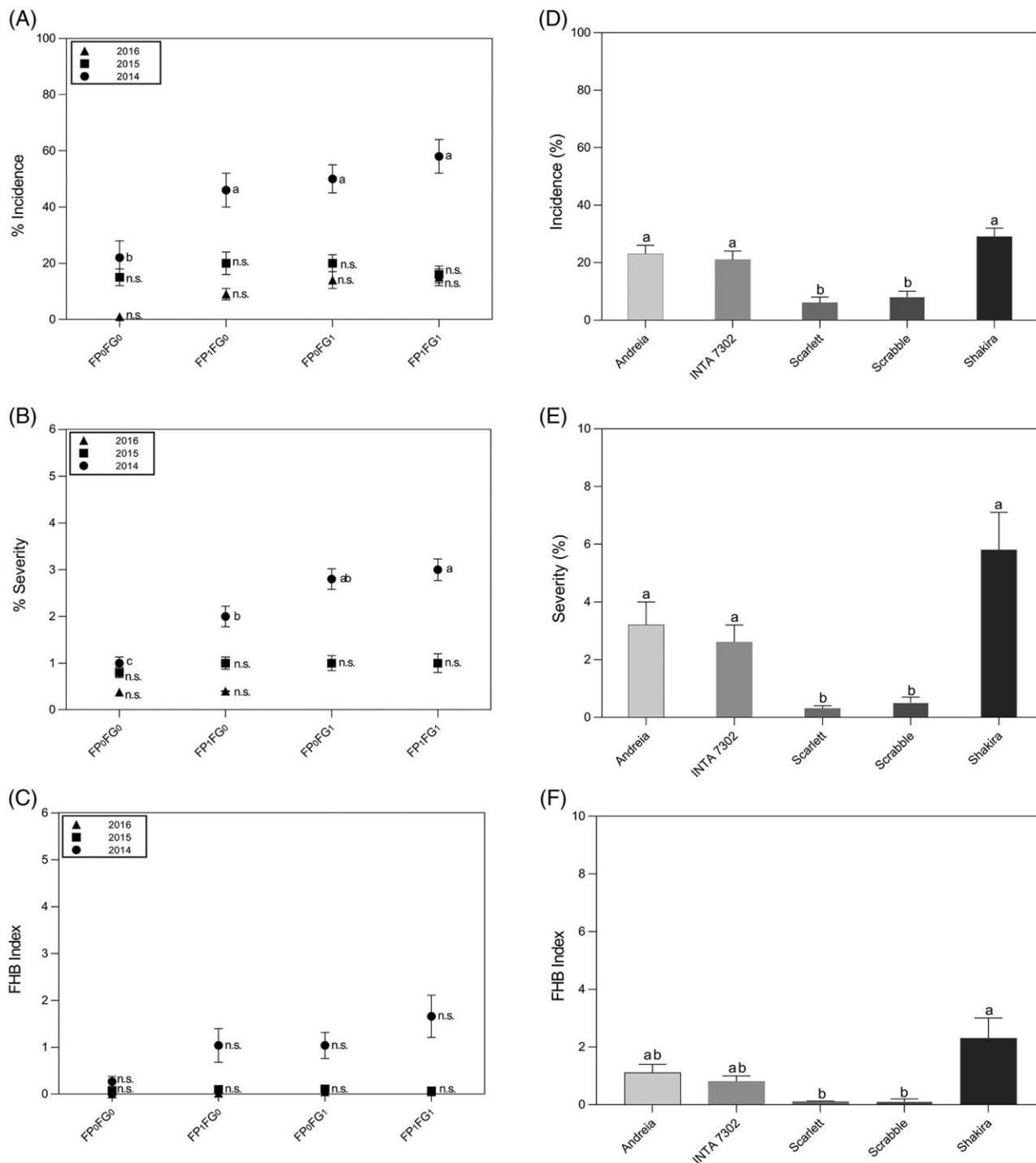


Figure 1. Left: Incidence (A), severity (B) and FHB index (C) values for different treatments in 2014, 2015 and 2016. Right: Differences between genotypes for incidence (D), severity (E) and FHB index (F) in 2015 growing seasons. Treatments: *Fusarium poae* (FP₀FG₀), *F. graminearum* (FP₁FG₀), *F. graminearum* (FP₀FG₁) and control without *Fusarium* (FP₀FG₀). Mean ± standard error of the mean (SEM). Columns with different letters are statistically different according to Tukey's test at $P \leq 0.05$.

F. poae treatments, no significant differences were observed in all the years analyzed. In 2014, the highest mycotoxin value was observed in FP₀FG₁ treatment, with high concentrations of DON ($6.12 \pm 1.77 \mu\text{g g}^{-1}$) and 15-ADON ($1.21 \pm 0.05 \mu\text{g g}^{-1}$), while the 3-ADON and NIV production was higher in FP₁FG₁ treatment (21.60 ± 11.41 and $1.20 \pm 0.06 \mu\text{g g}^{-1}$, respectively).

In 2015 and 2016, mycotoxin values were lower compared to 2014 and NIV production was not detected. In 2015, the major amounts of mycotoxins were observed for FP₀FG₁ (DON: $1.53 \pm 0.11 \mu\text{g g}^{-1}$) and FP₁FG₁ treatments (3-ADON: $5.20 \pm 1.29 \mu\text{g g}^{-1}$; 15-ADON: $1.41 \pm 0.11 \mu\text{g g}^{-1}$). In the same way, in 2016 the highest values of mycotoxins were registered in

Table 2. Analysis of variance for different grain parameters

	d.f.	GE		GP		PC		SP		TKW	
		Chisq	P-Value	Chisq	P-Value	Chisq	P-Value	Chisq	P-Value	Chisq	P-Value
2014											
<i>F. poae</i> (FP)	1	0.10	0.75	1.81	0.18	0.18	0.67	0.023	0.87	0.0522	0.82
<i>F. graminearum</i> (FG)	1	11.47	<0.0001	16.41	<0.0001	0.14	0.71	0.30	0.58	0.7934	0.37
FP*FG	1	2.03	0.16	4.70	0.26	0.38	0.54	1.25	0.26	0.8556	0.36
Genotype (G)	4	2.26	0.69	5.25	0.03	3.64	0.46	20.02	0.0005	23.2228	<0.0001
FP × G	4	3.71	0.45	9.52	0.05	6.16	0.19	0.89	0.93	1.1394	0.89
FG × G	4	32.31	<0.0001	25.92	<0.0001	0.51	0.97	1.08	0.90	1.6520	0.80
FP × FG × G	4	4.19	0.38	14.91	0.01	4.84	0.31	3.54	0.47	3.9729	0.41
2015											
<i>F. poae</i> (FP)	1	0.17	0.68	5.24	0.02	2.43	0.12	0.05	0.83	2.0318	0.15
<i>F. graminearum</i> (FG)	1	1.17	0.28	0.53	0.47	0.81	0.37	0.42	0.52	1.6586	0.20
FP*FG	1	0.85	0.36	1.80	0.18	0.89	0.35	0.01	0.93	0.0400	0.84
Genotype (G)	4	21.76	<0.0001	186.60	<0.0001	9.42	0.05	8.09	0.09	151.3667	<0.0001
FP × G	4	34.19	<0.0001	49.82	<0.0001	3.27	0.51	0.68	0.95	3.2791	0.51
FG × G	4	2.77	0.60	2.35	0.67	2.86	0.58	0.95	0.92	2.0991	0.72
FP × FG × G	4	3.37	0.50	3.88	0.42	4.04	0.40	11.42	0.02	1.0364	0.90
2016											
<i>F. poae</i> (FP)	1	5.15	0.02	4.88	0.03	1.76	0.18	0.77	0.38	0.0021	0.96
<i>F. graminearum</i> (FG)	1	7.21	0.01	10.10	0.002	1.85	0.17	0.07	0.79	0.1604	0.69
FP*FG	1	19.83	<0.0001	24.93	<0.0001	0.07	0.79	2.99	0.08	0.7424	0.39
Genotype (G)	4	34.90	<0.0001	33.96	<0.0001	2.42	0.66	2.19	0.70	7.5830	0.11
FP × G	4	21.80	<0.0001	33.76	<0.0001	3.56	0.47	11.76	0.02	2.2611	0.69
FG × G	4	6.60	0.16	1.84	0.28	7.24	0.12	6.85	0.14	6.8474	0.14
FP × FG × G	4	4.98	0.2897	8.62	0.07	8.71	0.07	7.59	0.11	4.1841	0.38

Note: GE, germinative energy; GP, germinative power; PC, protein concentration; SP, screening percentage; TKW, thousand kernel weight; d.f., degrees of freedom; Chisq, Type II Wald Chi-square tests.

Table 3. Analysis of variance for different grain quality parameters (d.f., degrees of freedom; Chisq, Type II Wald Chi-square tests)

	d.f.	D-hordeins		C-hordeins		B-hordeins		Total hordeins content	
		Chisq	P-Value	Chisq	P-Value	Chisq	P-Value	Chisq	P-Value
2014									
<i>F. poae</i> (FP)	1	23.27	<0.0001	29.55	<0.0001	15.11	<0.0001	28.09	<0.0001
<i>F. graminearum</i> (FG)	1	25.92	<0.0001	34.31	<0.0001	12.40	0.0004	29.73	<0.0001
FP*FG	1	25.83	<0.0001	37.90	<0.0001	5.01	0.03	26.60	<0.0001
Genotype (G)	4	13.09	0.01	2.44	0.66	10.13	0.04	6.02	0.20
FP × G	4	7.01	0.14	0.93	0.92	8.24	0.08	3.48	0.48
FG × G	4	8.82	0.07	0.65	0.96	2.57	0.63	1.39	0.85
FP × FG × G	4	0.99	0.43	2.39	0.67	5.28	0.26	2.14	0.71
<i>Fusarium treatments</i>		<i>Mean ± SEM</i>		<i>Mean ± SEM</i>		<i>Mean ± SEM</i>		<i>Mean ± SEM</i>	
FP ₁ FG ₀		6.24 ± 1.06 a		32.03 ± 4.75 a		57.69 ± 9.10 a		95.96 ± 12.40 a	
FP ₀ FG ₁		5.51 ± 1.05 a		27.52 ± 5.89 a		60.14 ± 9.35 a		93.17 ± 15.15 a	
FP ₁ FG ₁		6.22 ± 0.95 a		35.23 ± 9.15 a		49.10 ± 5.60 a		90.54 ± 14.26 a	
FP ₀ FG ₀		33.21 ± 5.07 b		155.94 ± 7.91 b		98.70 ± 9.31 b		287.85 ± 17.89 b	

FP₀FG₁ treatment, with low concentrations of DON ($1.02 \pm 0.002 \mu\text{g g}^{-1}$) and 3-ADON ($2.58 \pm 0.30 \mu\text{g g}^{-1}$), while for 15-ADON ($1.41 \pm 0.11 \mu\text{g g}^{-1}$) the highest values were

observed in FP₁FG₁ treatment. In terms of total mycotoxin amount, we found a higher concentration of 3-ADON over the years evaluated (Table 4).

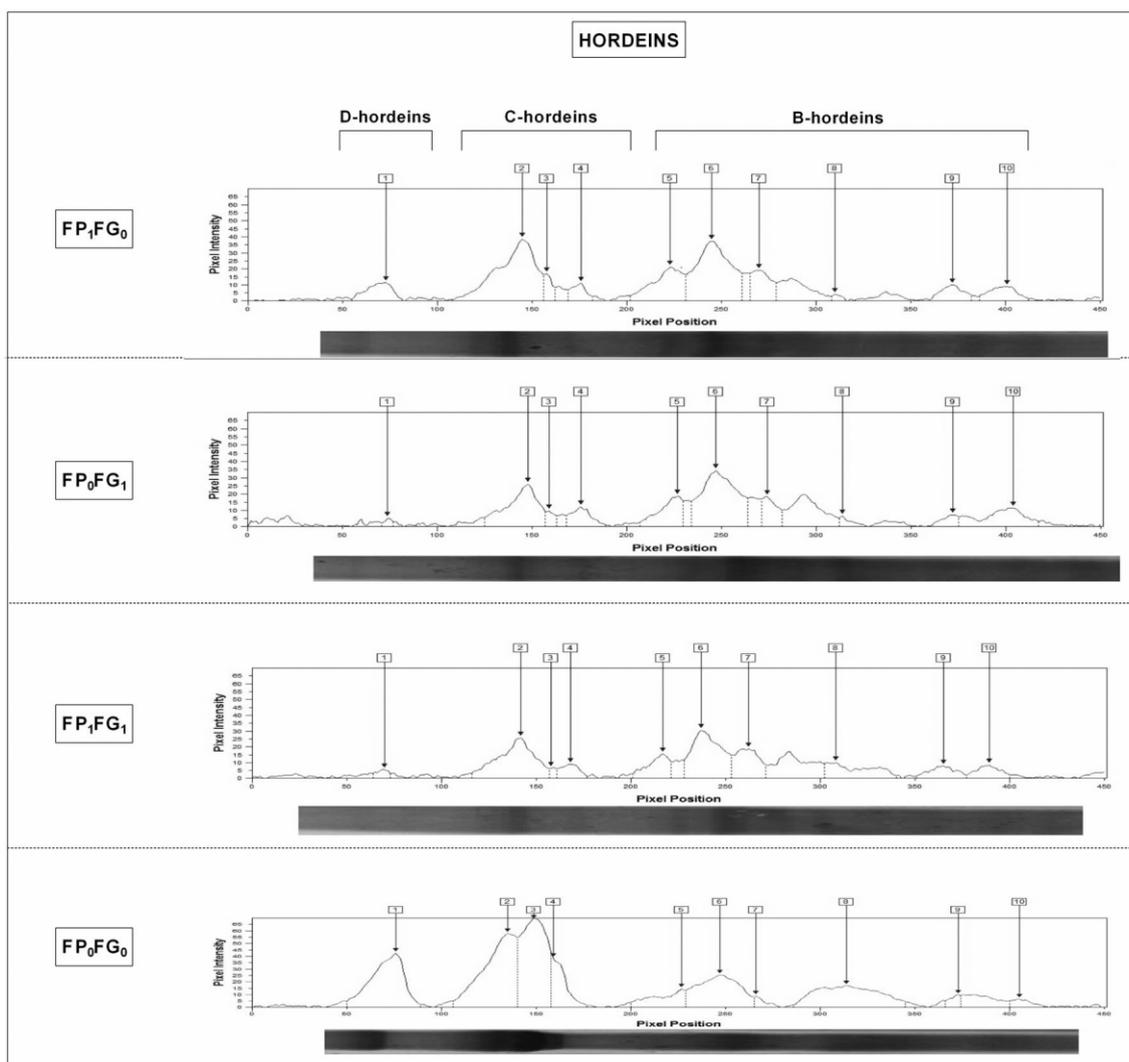


Figure 2. Relative abundance and fractions of polyacrylamide gel (SDS-PAGE; 7% = 13.5%) showing the pattern of D-hordeins, C-hordeins, and B-hordeins. Treatments: *Fusarium poae* (FP₁FG₀), *F. graminearum* (FP₀FG₁), both pathogens (FP₁FG₁) and control without *Fusarium* (FP₀FG₀).

DISCUSSION

The experiment was carried out under field conditions, being the 3 years analyzed different from each other, mainly with respect to environmental conditions such as RH, temperature, and accumulated rainfall during the period from anthesis to harvest. Our results showed significant differences between the *Fusarium* treatments in disease parameters only in the 2014 growing season, with warm temperatures and wet conditions that were favorable especially for the growth of *F. graminearum*. However, in 2015 and 2016 no statistical differences were observed in disease parameters, due to the lowest temperatures and the driest conditions at the flowering stage. Several authors found evidence indicating that environmental conditions play a key role in *Fusarium* spp.–host interactions. Moreover, the composition of *Fusarium* species changes according to the effects of different climatic factors on each growing season, mainly during the flowering stage.²⁹ Turner and Jennings³⁰ observed that increasing humidity produced earlier disease development and a major incidence of the disease for all *Fusarium* species evaluated except to *F. poae*. The variations in the composition of the *Fusarium* species can be

explained by the occurrence of different thermo-hygrometric conditions, and when the conditions were not favorable for the main causal agents of FHB such as *F. graminearum* and *F. culmorum*, other species as *F. poae* and *F. avenaceum* significantly increase their presence. In general, warm temperatures (around 28 °C) and wet conditions are favorable for *F. graminearum* infection, while temperatures around 25 °C and dry conditions are for *F. poae*.^{15,31} In addition, it is known that genotype plays an important role in FHB resistance. In our work, in 2015 different responses were observed to *Fusarium* spp. infection among different barley genotypes. Although the barley genotypes were chosen for their similar phenological stages, these results could be explained by slight differences in temporal and spatial flowering patterns, the different micro-environment and microclimatic conditions combined of each trial plot, and the possibility of resistance genes present in different barley genotypes.

Previously studies reported a decrease in kernel plumpness, low values of kernels larger than 2.5 mm in diameter and a slight increase in protein and total nitrogen content in inoculated barley

Table 4. Grain contamination with deoxynivalenol (DON), 3-acetyl deoxynivalenol (3-ADON), 15-acetyl deoxynivalenol (15-ADON) and nivalenol (NIV) in five barley genotypes during 2014, 2015 and 2016 growing seasons

Year	Inoculation	DON ($\mu\text{g g}^{-1}$)	3-ADON ($\mu\text{g g}^{-1}$)	15-ADON ($\mu\text{g g}^{-1}$)	NIV ($\mu\text{g g}^{-1}$)
2014	<i>F. poae</i>	n.d.	n.d.	n.d.	1.18 \pm 0.06
	<i>F. graminearum</i>	6.12 \pm 1.77	14.60 \pm 7.71	1.21 \pm 0.05	n.d.
	<i>F. poae</i> / <i>F. graminearum</i>	4.69 \pm 1.35	21.60 \pm 11.41	1.18 \pm 0.05	1.20 \pm 0.06
	Control	1.87 \pm 0.54	4.20 \pm 2.22	n.d.	n.d.
2015	<i>F. poae</i>	n.d.	n.d.	1.29 \pm 0.10	n.d.
	<i>F. graminearum</i>	1.53 \pm 0.11	3.97 \pm 0.98	1.39 \pm 0.11	n.d.
	<i>F. poae</i> / <i>F. graminearum</i>	1.37 \pm 0.09	5.20 \pm 1.29	1.41 \pm 0.11	n.d.
	Control	1.46 \pm 0.10	3.74 \pm 0.93	1.26 \pm 0.10	n.d.
2016	<i>F. poae</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<i>F. graminearum</i>	1.02 \pm 0.002	2.58 \pm 0.30	1.39 \pm 0.11	n.d.
	<i>F. poae</i> / <i>F. graminearum</i>	1.02 \pm 0.002	2.38 \pm 0.28	1.41 \pm 0.11	n.d.
	Control	n.d.	2.83 \pm 0.34	n.d.	n.d.

Mean \pm standard error of the mean (SEM) values were from the log transformed data.
Note: n.d., not detected.

grains.^{7,32} In the current study, we observed *Fusarium* \times genotype interaction for the SP (2015 and 2016), while there were no significant differences among *Fusarium* treatments on PC and TKW. These effects showed a significant effect mainly of the genotype, being consistent with other works that describe a strong genetic and environmental influence on the differences in the parameters analyzed on barley genotypes.^{33,34}

Regarding germinative parameters, several studies have revealed that the growth of *Fusarium* spp. may affect germination capacity and therefore malt characteristics. Furthermore, *Fusarium* spp. can produce other undetected proteinases during the infection, and can trigger the synthesis or activation of some barley proteinases that normally function during the germination process.⁸ According to this, Schwarz *et al.*³² reported a decrease from 42.00% to 32.00% in barley infected with *F. graminearum* and a decrease from 14.00% to 8.00% in treatments inoculated with *F. poae*. In the same way, Sarlin *et al.*⁷ observed a reduction of 10.00% on average using a mixture of *Fusarium* species, while Oliveira *et al.*³⁵ found a decrease around 45.00% in GE by inoculating with *F. culmorum*. Results observed in our work agree with those previously reported, showing that in 2014 highest effects on GE/GP were observed for *F. graminearum* treatment decreasing by 6.00% on average, while in 2015 and 2016 growing season *F. poae* affected both parameters depending on the genotype, reducing by 4.00% on average.

Fusarium spp. infection may lead to the production of different hydrolytic enzymes such as cutinases, proteinases, xylanases, and cellulases. These cell wall-degrading enzymes could play an important role in pathogenicity and are likely to be involved in the colonization of barley grains, being the proteinases the most important, therefore protein degradation can strongly affect the malting or brewing quality of the diseased grain.^{8,32} In our work, we reported a slight trend in symptomatic barley grains showing that *F. graminearum* presence degraded a great amount of hordeins, around 83.41% and 82.35% in D-hordeins and C-hordeins, respectively. Furthermore, we reported a decrease caused by *F. graminearum* \times *F. poae* treatment (FP₁FG₁) of 50.25% in B-hordeins and a reduction of the total hordeins content in 68.55% respect to the control. Changes observed in hordeins

fraction could be explained due to fungal proteases activity such as trypsin protease or serine protease that belongs to the exoproteome of *Fusarium* spp. known as protein-degrading enzymes.^{8,9} Eggert *et al.*³⁶ found that the influence of *Fusarium* infection on naked barley reduced slightly the content of hordeins, while the albumins and globulins were not affected. In addition, Schwarz *et al.*³² detected the higher proteinase, α -glucanase, and xylanase activity levels in barley samples artificially infected with *F. graminearum* and *F. poae* compared with the control, concluding that enzyme activity levels in barley samples were so high that they might affect the grain quality and therefore malt quality. Regarding the potential impact on malt quality, several authors have reported that heavy *Fusarium* spp. infection decreases α -glucan content and simultaneously increases soluble nitrogen, free amino nitrogen (FAN) and wort color, suggesting that *Fusarium* proteinases could degrade barley proteins already in the field or during malting and mashing.⁷

Based on the major values of incidence/severity in the field during 2014, we expected a higher mycotoxin concentration in this year compared to 2015 and 2016. Mycotoxin concentration varied greatly between *Fusarium* treatments, genotypes and years, observing the highest amount of DON in 2014 for *F. graminearum* treatment (Table 4). For DON, these values were above the maximum limits established by the European Commission for unprocessed grains (1.25 $\mu\text{g g}^{-1}$).¹⁴ Moreover, we found an important concentration of 3-ADON in the different years evaluated, which coincides with our results obtained in bread wheat.³⁷

In some studies, the predominant toxin is NIV which is believed to be more toxic than DON or its acetylated derivatives, although the maximum limit for NIV has not been established yet.³⁸ The SCF has set limits only for DON, considering a tolerable daily intake of 1 mg kg^{-1} body weight, while for NIV, a provisional limit value of 0.7 mg kg^{-1} was established.¹⁴ Stenglein *et al.*³⁹ found higher levels of NIV in barley genotypes inoculated under field conditions (ranging between 0.20 and 10.80 $\mu\text{g g}^{-1}$), while Nogueira *et al.*⁴⁰ found NIV in 29% of the barley samples evaluated (with an average concentration of 2.36 $\mu\text{g g}^{-1}$) under natural infection conditions. In the present study, we reported lower

values that could be explained due to the climatic conditions (mainly temperature) during the flowering stage. These climatic conditions were not optimal to the development of *F. poae* and the subsequent NIV production. This is supported by Nazari *et al.*,³¹ who established that the optimum temperature for *F. poae* growth is 24.7 °C and for NIV production 27.5 °C.

Scarce information about *Fusarium* species interaction and their potential impact in mycotoxin production are available. Xu *et al.*⁴¹ reported that there was no evidence to support synergism between fungal isolates in causing visual symptoms; thus suggesting the existence of competitive interactions that led to decrease in the fungal biomass (until 90% for weaker species) compared to single-isolate inoculations. Regarding mycotoxin contamination, reports in co-inoculation experiments indicate that the productivity increased considerably (in many cases exceeding 100-fold) suggesting that competition resulted in greater production of trichothecene mycotoxins.⁴¹ This effect on mycotoxin production in co-inoculations could be explained by competition between *Fusarium* species which produces more toxin under stress conditions as resources for competence.¹⁵ In the present work, no significant differences were observed between *Fusarium* treatments. However, we found a major concentration of 3-ADON along the different years, despite the fact that the *F. graminearum* isolates used were DON, 3-ADON and 15-ADON producers. This prevalence of 3-ADON biosynthesis could be explained by the important role that some climatic parameters play such as the temperature and other environmental conditions.⁴² In accordance with this, Ramírez Albuquerque *et al.*⁴³ found under *in vitro* conditions a major production of DON acetylated derivatives, being the production of 3-ADON maximum at 25–30 °C, while the production of 15-ADON is maximum at 10 °C.

CONCLUSIONS

This is the first work under field conditions during three growing seasons evaluating the interaction between *F. graminearum* and *F. poae* on barley genotypes. We conclude that: (i) no evidence of synergism between *F. graminearum* and *F. poae* were found regarding disease parameters and mycotoxin contamination; (ii) coinciding with previous works, different response patterns to *Fusarium* infection exists between barley genotypes, that could be useful for future genetic improvement; (iii) depending on the genotype, the germination process was affected by both *Fusarium* species (*F. graminearum* > *F. poae*) which could affect the protein composition, the malt quality and therefore the malting process. (iv) However, at least in the years with favorable climatic conditions to FHB development and depending on the barley genotype, a continuous monitoring is deemed necessary to prevent the negative impact on protein composition and germinative parameters.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Wheat Industrial Quality Laboratory-UNCPBA, Mendivil, G., Troncoso, U., and Pacheco, W. for technical assistance in field experiments. This research was carried out with the following funds: FONCYT-PICT 213/2015 and UNCPBA.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Schwarz PB, Horsley RD, Steffenson BJ, Salas B, Paul S and Barr JM, Quality risks associated with the utilization of *Fusarium* head blight infected malting barley. *J Am Soc Brew Chem* 1:1–7 (2006).
- Norma V – Cebada cervecera y forrajera. Available at: <https://cacbb.com.ar/normativa/estandares/Norma%20V%20-%20Cebada%20Cervecera%20y%20Forrajera-%20R%20SENASA%2027-2013%20-%20A%20partir%20de%20Oct%202014.pdf> (2013).
- US Department of Agriculture (USDA). Available at: <https://www.fas.usda.gov/data/argentina-grain-and-feedupdate-7> (2018).
- Salgado-Albarrán M, Herrera-Díaz J and Dinkova TD, Caracterización de patrones de hordeínas en variedades mexicanas de cebada maltera. *TIP Rev Esp Cienc Quím-Biol* 18:43–51 (2015).
- Qi JC, Chen JX, Wang JM, Wu FB, Cao LP and Zhang GP, Protein and hordein fraction content in barley seeds as affected by sowing date and their relation to malting quality. *J Zhejiang Univ Sci B* 6: 1069–1075 (2005).
- Nielsen LK, Cook DJ, Edwards SG and Ray RV, The prevalence and impact of *Fusarium* head blight pathogens and mycotoxins on malting barley quality in UK. *Int J Food Microbiol* 179:38–49 (2014).
- Sarlin T, Laitila A, Pekkarinen A and Haikara A, Effects of three *Fusarium* species on the quality of barley and malt. *J Am Soc Brew Chem* 63: 43–49 (2005).
- Pekkarinen AI, Sarlin TH, Laitila AT, Haikara AI and Jones BL, *Fusarium* species synthesize alkaline proteinases in infested barley. *J Cereal Sci* 37:349–356 (2003).
- Phalip V, Delalande F, Carapito C, Goubet F, Hatsch D and Leize-Wagner E, Diversity of the exoproteome of *Fusarium graminearum* grown on plant cell wall. *Curr Genet* 48:366–379 (2005).
- Placinta CM, D'Mello JPF and MacDonald AMC, A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Anim Feed Sci Technol* 78:21–37 (1999).
- Papadoupoulou-Bouraoui A, Vrabcheva T, Valzacchi S, Stroka J and Anklam E, Screening survey of deoxynivalenol in beer from the European market by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Food Addit Contam* 21:607–617 (2007).
- Nagashima H, Nakagawa H and Kushiuro M, The *in vitro* approach to the cytotoxicity of a trichothecene mycotoxin nivalenol. *Jpn Agr Res Q* 43:7–11 (2009).
- Bryla M, Ksieniewicz-Wozniak E, Waskiewicz A, Szymczyk K and Jedrejczak R, Co-occurrence of nivalenol, deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside in beer samples. *Food Control* 92: 319–324 (2018).
- European Commission, Commission regulation no 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuff. *Off J Eur Union* 364:5–24 (2006).
- Xu X and Nicholson P, Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annu Rev Phytopathol* 47:83–103 (2009).
- Castañares E, Albuquerque DR, Dinolfo MI, Fernández Pinto V, Patriarca A and Stenglein SA, Trichothecene genotypes and production profiles of *Fusarium graminearum* isolates obtained from barley cultivated in Argentina. *Int J Food Microbiol* 179:57–63 (2014).
- Dinolfo I, Barros G and Stenglein S, Development of a PCR assay to detect the potential production of nivalenol in *Fusarium poae*. *FEMS Microbiol Lett* 332:99–104 (2012).
- Brennan JM, Egan D, Cooke BM and Doohan FM, Effect of temperature on head blight of wheat caused by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum*. *Plant Pathol* 54:156–160 (2005).
- Zadoks JC, Chang TT and Konzak CF, A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res* 14:415–421 (1974).
- Buerstmayr H, Legzdina L, Steiner B and Lemmens M, Variation for resistance to *Fusarium* head blight in spring barley. *Euphytica* 137: 279–290 (2004).
- Leslie JF and Summerell BA, *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, Oxford, UK (2006).
- Campbell KA and Lipps PE, Allocation of resources: sources of variation in *Fusarium* head blight screening nurseries. *Phytopathology* 88: 1078–1086 (1998).
- ISTA, International Rules for Seed Testing, *The International Seed Testing Association (ISTA)*. ISTA, Bassersdorf, Switzerland (2017).
- Martínez M, Castañares E, Dinolfo MI, Pacheco WG, Moreno MV and Stenglein SA, Presencia de *Fusarium graminearum* en muestras de trigo destinado al consumo humano. *Rev Argent Microbiol* 46: 41–44 (2014).

- 25 Alvarez CL, Azcarate MP and Fernández Pinto V, Toxigenic potential of *Fusarium graminearum* sensu stricto isolates from wheat in Argentina. *Int J Food Microbiol* 135:131–135 (2009).
- 26 R Core Team, *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/> (2017).
- 27 Bates D, Maechler M, Bolker B and Walker S, Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J Stat Software* 67:1–48 (2015).
- 28 Lenth RV, emmeans: estimated marginal means, a.k.a. least-squares means. R package version 1.3.0. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans> (2018).
- 29 Vogelgsang S, Sulyok M, Hecker A, Jenny E, Krska R and Schuhmacher R, Toxigenicity and pathogenicity of *Fusarium poae* and *Fusarium avenaceum* on wheat. *Eur J Plant Pathol* 122:265–276 (2008).
- 30 Turner JA and Jennings P, The effect of increasing humidity on *Fusarium* ear blight and grain quality. *Cereal Res Commun* 25:825–826 (1997).
- 31 Nazari L, Patteri E, Manstretta V, Terzi V, Morcia C, Somma S *et al.*, Effect of the temperature on growth, wheat head infection, and nivalenol production by *Fusarium poae*. *Food Microbiol* 76:83–90 (2018).
- 32 Schwarz PB, Jones BL and Steffenson BJ, Enzymes associated with *Fusarium* infection of barley. *J Am Soc Brew Chem* 60:130–134 (2002).
- 33 Al-Tabbal JA and Al-Fraihat A, Genetic variation, heritability, phenotypic and genotypic correlation studies for yield and yield components in promising barley genotypes. *J Agric Sci* 4:193–210 (2011).
- 34 Cai S, Yu G, Chen X, Huang Y, Jiang X, Zhang G *et al.*, Grain protein content variation and its association analysis in barley. *BMC Plant Biol* 1: 13–35 (2013).
- 35 Oliveira PM, Mauch A, Jacob F, Waters DM and Arendt EK, Fundamental study on the influence of *Fusarium* infection on quality and ultrastructure of barley malt. *Int J Food Microbiol* 156:32–43 (2012).
- 36 Eggert K, Wieser H and Pawelzik E, The influence of *Fusarium* infection and growing location on the quantitative protein composition of (part II) naked barley (*Hordeum vulgare nudum*). *Eur Food Res Technol* 230:893–902 (2010).
- 37 Martínez M, Ramírez Albuquerque LD, Arata AF, Biganzoli F, Fernández Pinto V and Stenglein SA, Effects of *Fusarium graminearum* and *Fusarium poae* on disease parameters, grain quality and mycotoxins contamination in bread wheat (part I). *J Sci Food Agric* 100:863–873 (2020).
- 38 Wan MYL, Turner PC and El-nezami H, Individual and combined cytotoxic effects of *Fusarium* toxins (deoxynivalenol, nivalenol, zearalenone and fumonisins B1) on swine jejunal epithelial cells. *Food Chem Toxicol* 57:276–283 (2013).
- 39 Stenglein S, Dinolfo I, Barros G, Bongiorno F, Chulze S and Moreno V, *Fusarium poae*: pathogenicity and mycotoxin accumulation on selected wheat and barley genotypes at a single location in Argentina. *Plant Dis* 98:1733–1738 (2014).
- 40 Nogueira M, Decundo J, Martínez M, Dieguez S, Moreyra F, Moreno M *et al.*, Natural contamination with mycotoxins produced by *Fusarium graminearum* and *Fusarium poae* in malting barley in Argentina. *Toxins* 10:78 (2018).
- 41 Xu XM, Monger W, Ritiene A and Nicholson P, Effect of temperature and duration of wetness during initial infection periods on disease development, fungal biomass and mycotoxin concentrations on wheat inoculated with single, or combinations of *Fusarium* species. *Plant Pathol* 56:943–956 (2007).
- 42 Sugiura Y, Watanabe Y, Tanaka T, Yamamoto S and Ueno Y, Occurrence of *Gibberella zeae* strains that produce both nivalenol and deoxynivalenol. *Appl Environ Microbiol* 56:3047–3051 (1990).
- 43 Ramírez Albuquerque LD, Influence of Environmental Factors in the Relative Production of Tricothecenes by *Fusarium graminearum*. MSc thesis, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (2014). http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5609_amirezAlbuquerque