



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

ESTUDIO DE FACTORES DETERMINANTES DE LA CONCENTRACIÓN DE DEOXINIVALENOL EN GRANO DE TRIGO

Carolina FRANCIA BENTANCUR

Magíster en Ciencias Agrarias
opción Ciencias Vegetales

julio 2021

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Dr. Andrés Locatelli, y Dra. Silvana Vero el 22 de setiembre de 2021.

Autora: Carolina Francia

Director: Carlos Pérez, Co-directora: Silvia Pereyra

Dedico este trabajo a mi abuelo gordo que me dio el amor por la agronomía, a mi madre que me enseñó a ser perseverante y crítica, a mi abuelo Hugo que siento que me dio el último empujón.

Los voy a extrañar por siempre.

AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia y amigos por escucharme y apoyarme siempre.

A Diego por acompañarme en todo el proceso

A mis tutores que me guiaron en el camino de investigación y me dieron oportunidades.

A mis compañeros de trabajo que siempre estuvieron para ayudarme.

A la Comisión Académica de posgrado por darme la oportunidad de tener dos becas en este período, sin su apoyo no hubiese sido posible.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
RESUMEN.....	VII
SUMMARY.....	VIII
 1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	 1
 2. <u>CARACTERIZACIÓN DE CULTIVARES DE TRIGO POR SU ACUMULACIÓN DE DEOXINIVALENOL Y SU RELACIÓN CON EL COMPORTAMIENTO FRENTE A LA FUSARIOSIS DE LA ESPIGA</u>	 8
2.1. RESUMEN.....	9
2.2. SUMMARY.....	10
2.3. INTRODUCCIÓN.....	11
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
2.4.1. <u>Inoculación</u>	16
2.4.1.1. Inoculación con grano de maíz.....	16
2.4.1.2. Inoculación con aspersión de macroconidios.....	17
2.4.2. <u>Determinaciones realizadas</u>	18
2.4.2.1. <i>Blotter test</i>	19
2.4.2.2. Determinación de la concentración de deoxinivalenol..	20
2.4.3. <u>Modelo estadístico</u>	21
2.5. RESULTADOS.....	22
2.6. DISCUSIÓN.....	33
2.7. CONCLUSIONES.....	38
2.8. BIBLIOGRAFÍA.....	39
2.9. ANEXOS.....	48

<u>3. CORRELACIÓN ENTRE DISTINTOS MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE LA FUSARIOSOS DE LA ESPIGA Y DE LA ACUMULACIÓN DE DEOXINIVALENOL EN GRANO</u>	50
3.1. RESUMEN.....	51
3.2. SUMMARY.....	52
3.3. INTRODUCCIÓN.....	53
3.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
3.5. RESULTADOS.....	61
3.6. DISCUSIÓN.....	65
3.7. CONCLUSIONES.....	67
3.8. BIBLIOGRAFÍA.....	68
 <u>4. CORRELACIÓN ENTRE DISTINTOS MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE LA FUSARIOSOS DE LA ESPIGA Y DE LA ACUMULACIÓN DE DEOXINIVALENOL EN GRANO</u>	 77
4.1. RESUMEN.....	78
4.2. SUMMARY.....	79
4.3. INTRODUCCIÓN.....	80
4.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	84
4.5. RESULTADOS.....	87
4.6. DISCUSIÓN.....	93
4.7. CONCLUSIONES.....	96
4.8. BIBLIOGRAFÍA.....	97
 <u>5. DISCUSIÓN GENERAL</u>	 102
<u>6. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS</u>	104
<u>7. BIBLIOGRAFÍA</u>	106

RESUMEN

La fusariosis de la espiga (FE), causada principalmente por *Fusarium graminearum*, es una de las principales enfermedades en el cultivo de trigo. Este patógeno tiene la capacidad de producir la micotoxina deoxinavalenol (DON). Son varios los factores que influyen en la concentración de DON en el grano. Los objetivos de este trabajo fueron: i) caracterizar los distintos cultivares comerciales disponibles en Uruguay frente a la acumulación de DON en el grano y asociarlo a la caracterización frente a la FE; ii) realizar la comparación entre distintos métodos de cuantificación de la FE y la acumulación de DON en grano; y iii) determinar la dinámica de la acumulación de DON según condiciones de humedecimiento ocurridas durante el llenado del grano. Para esto se sembraron 45 cultivares de trigo en los años 2017 y 2018, en la localidad de Paysandú. Se realizó inoculación artificial y se evaluó el nivel de infección de FE y el contenido de DON mediante el método Agraquant® DON (RomerLabs) y se estudiaron las correlaciones para cada cultivar. Además, se estudió la correlación entre el índice de la fusariosis de la espiga (IFE) cuantificado a campo, el % granos con *Fusarium* (FDK) por el método *blotter test* y *Canadian Grain Commission* (CGC), y la concentración de DON por ELISA. Para el tercer objetivo, se sembraron dos cultivares con comportamiento diferencial frente a FE en condiciones controladas y fueron expuestos a diferentes regímenes de mojado desde la inoculación hasta madurez fisiológica, estudiándose la influencia de la duración y frecuencia de humedad en la concentración de DON. Los resultados reflejan que las correlaciones entre los parámetros de la enfermedad y DON son más altas en los ensayos con menor enfermedad. La variable que más se correlacionó con DON fue el FDK por el método CGC, y luego por *blotter test*. La concentración de DON fue mayor con hasta 20 días de humedecimiento de espigas y es notoriamente menor con 40 días de mojado. En cuanto a frecuencia de días de mojado, se pudo observar que menor frecuencia de días de mojado, generó menor concentración DON para ambos cultivares.

Palabras clave: fusariosis de la espiga; seguridad alimentaria; deoxinivalenol

SUMMARY

STUDY OF DETERMINING FACTORS OF DEOXYNIVALENOL CONCENTRATION IN WHEAT GRAIN

Fusarium head blight (FHB), caused mainly by *Fusarium graminearum*, is one of the main diseases in wheat crops. This pathogen has the ability to produce the mycotoxin deoxynivalenol (DON). There are several factors influencing the final concentration of DON in grain. The aims of this research were: i) to characterize different commercial cultivars available in Uruguay against the accumulation of DON in grains and its association to the FHB characterization; ii) to compare different methods to quantify FHB and DON content in grains; and iii) to determine the dynamics of DON accumulation according to wetting conditions during grain filling. Forty-five wheat cultivars were sown in the field in 2017 and 2018. Trials were artificially. FHB level was determined, and DON content was evaluated using Agraquant® DON, the correlations for each cultivar were studied. For the second goal, the correlation between FHB index (FHBI) quantified in the field, the percentage of damage kernels with Fusarium (FDK) determined by the blotter test method and Canadian Grain Commission (CGC), and the concentration of DON by ELISA, were studied. For the third aim, two cultivars with known resistance to FHB were sown under controlled conditions and submitted to different wetting regimes during grain filling, to determine the influence of the duration and frequency of humidity on final DON concentration. The results reflect that correlations were stronger in the trials with lower disease pressure. FDK determined by the CGC method showed higher correlation with DON than blotter test. DON concentration was higher with up to 20 days with spike wetness and decreased with 40 days of wetness in both cultivars. Regarding the frequency of wet days, the results show that lower frequency of wet days resulted in a lower DON concentration for both cultivars.

Keywords: fusarium head blight; food safety; deoxynivalenol

1. INTRODUCCIÓN

El mercado internacional de trigo ha tenido una sostenida recuperación de las disponibilidades mundiales y en la zafra 2019/20 hubo una cosecha triguera superior a las necesidades del consumo mundial (FAO, 2020). A nivel regional, el MERCOSUR viene atravesando varios ciclos consecutivos de abundancia de producción y una importante oferta exportable (Avellaneda et al., 2020). A nivel local, la cadena de producción triguera uruguaya ha experimentado importantes cambios en los últimos años. El área de siembra se incrementó sostenidamente desde 2006 al 2011 y luego desde este año la superficie ha ido disminuyendo levemente debido a precios desfavorables llegando en 2017/18 a un área sembrada de 198.000 ha (DIEA, 2019). Sin embargo, en el 2018/19, el área sembrada fue un 20 % más que la siembra del año anterior (DIEA, 2019) y en el 2019/20 la superficie de trigo aumentó un 7 % más (224.000 ha) (DIEA, 2020), mostrando cierta estabilidad del área sembrada con trigo a lo largo de los años debido a su importancia para el país.

Por otro lado, en Uruguay, la producción triguera ha presentado diversos problemas de calidad, y en el 2018, sufrió el peor desempeño exportador de los últimos diez años. La zafra del invierno 2019/20 se caracterizó por condiciones climáticas que generaron algunos problemas de inocuidad y calidad en el grano cosechado.

Uruguay ha tenido como destino principal de exportación al mercado brasileño (82%), seguido de otros mercados más pequeños como Mauritania (9 %), Chile (8 %) y Taiwán (1 %) (OPYPA, 2020). Los requerimientos de calidad e inocuidad de los países importadores son crecientes y ha sido muy difícil cumplirlos (Engo et al., 2015). Éstos son un pilar fundamental porque determinan la posibilidad de desarrollar mercados internacionales (Godiño et al., 2020). Por su parte, la industria nacional también demanda mejor calidad e inocuidad desde que tiene que hacer frente a una exigente normativa y a una importante competencia de productos (Engo et al., 2015).

Una de las mayores limitantes que presenta la producción de trigo en el mundo, en la región y en Uruguay para la obtención de rendimientos de grano alto y estable, es la fusariosis de la espiga (Díaz de Ackermann y Pereyra 2010, Stępień y Chełkowski 2010, Salgado et al. 2015, Dweba et al. 2017).

Esta enfermedad no solo afecta el rendimiento y la calidad del grano (Salgado et al., 2015), sino también la inocuidad por la producción de micotoxinas por parte de las especies de *Fusarium* causales de la fusariosis de la espiga (FE), (Díaz de Ackermann y Pereyra 2010, Dweba et al. 2017, Valverde-Bogantes 2017). Las micotoxinas son compuestos tóxicos derivados del metabolismo secundario de los hongos (Abbas et al., 1989) y pueden generar hepatotoxicidad, teratogenicidad, y carcinogénesis, entre otros, en animales y humanos (Meca et al., 2010).

La FE puede estar causada por una o más especies del género *Fusarium*. Varias especies de *Fusarium* son productoras de toxinas estrogénicas, como por ejemplo zearalenona (ZEA) y alpha-zearalenol; y otras del grupo tricotecenos (o no estrogénicas) como por ejemplo, nivalenol (NIV), 4-Acetil nivalenol, T2 y HT2, deoxinivalenol (DON) y sus formas acetiladas como 3-acetilDON (3-ADON) y 15-acetilDON (15-ADON), entre otras (Dweba et al., 2017).

En Uruguay, el complejo de especies predominante asociado a FE en trigo es *Fusarium graminearum* (Umpiérrez-Failache et al., 2013). Este complejo (FGSC-*Fusarium graminearum* species complex) comprende hasta 16 especies filogenéticas (Del Ponte et al., 2021), con capacidad de producir el tipo B de tricotecenos como DON, 3-ADON, 15-ADON y NIV (Aoki et al. 2012).

La composición de la población de este patógeno es dinámica y en algunas regiones del mundo se han detectado cambios con la aparición o predominancia de cepas más toxicogénicas. En Uruguay, se ha relevado la población de *Fusarium* y en particular de *F. graminearum*, en las epidemias 2001, 2002, 2009 y 2012 y se encontró que *F. graminearum* sensu stricto 15-ADON era la especie predominante, por lo que es relevante el monitoreo de DON en el país (Umpiérrez-Failache et al., 2013).

La micotoxina DON produce exclusivamente toxicidad aguda ya que no se acumula en el organismo (Sosa et al., 2017). Es inhibidor de la síntesis de proteínas, y es la toxina más comúnmente detectada en trigo (Wegulo, 2012). Es una micotoxina termoestable (hasta 180°C) por lo que persiste durante el procesado de los alimentos (ELIKA, 2013). Es una toxina regulada en varios lugares del mundo (FAO, 2018). Específicamente en Uruguay se ha establecido como 1 ppm el límite máximo de DON en harina de trigo o subproductos elaborados a base de grano de trigo (IMPO, 2001) lo que condiciona indirectamente el nivel tolerado en el grano al momento de su comercialización.

La producción de DON por parte del patógeno, es parte de su arsenal de virulencia, por lo cual DON le confiere al hongo mayor capacidad de colonizar los tejidos vegetales (Gardiner et al., 2009). Su producción, no es constante a lo largo de la patogénesis (Matthäus et al., 2004) y su dinámica en la planta es muy compleja. La toxina puede translocarse en dirección acrópeta, a través de los vasos de xilema, y basípeta a través del floema (Argyris et al., 2003). Además, se conoce que DON no se distribuye homogéneamente en el grano, su concentración es mayor en las capas externas (cáscara), por lo que alimentos con salvado constituyen un mayor riesgo de contaminación (Pereyra y Acosta, 2014).

Los valores de infección por FE cuantificados en el campo no dan una predicción fiable de la concentración de DON (Koch et al., 2006) debido a que la relación entre la presencia del hongo y los síntomas visuales de la enfermedad a menudo no son tan fuertes (Edwards et al., 2001). Esto se debe a que los granos asintomáticos pueden contener cantidades significativas de DON, mientras que los granos sintomáticos dentro de la misma muestra, pueden estar casi libres de toxinas, lo que genera bajas correlaciones entre estos parámetros (Brunner et al., 2009), tema que se profundizará en el primer y tercer artículo.

La relación que existe entre la expresión de los síntomas de la FE y la acumulación de DON final en el grano, ha originado un constante cuestionamiento acerca de los mecanismos involucrados en la producción de DON. Son varios los factores que influyen en la concentración de DON en el grano tales como, la cepa del

patógeno, la resistencia del cultivar y las condiciones ambientales. A su vez, la interacción entre estos factores también es compleja.

Es posible que distintos aislados en una población dada de *F. graminearum*, posean capacidad diferencial en su producción de enzimas y toxinas, tanto en forma cualitativa como cuantitativa (Desjardins 2008, Gautam y Dill-Macky 2012). Estas se sintetizan por vías de biosíntesis complejas controladas por una red de genes (Desjardins 2008, Pasquali y Migheli 2014), por lo que hay una gran variabilidad presente en la agresividad de las cepas (Cumagun y Miedaner, 2004).

La susceptibilidad del cultivar también es un factor importante en la concentración final de DON en el grano (Koch et al., 2006). La resistencia a *Fusarium* es de naturaleza poligénica (Jung et al., 2010). Se han registrado de dos a cinco genes principales y varios genes menores que confieren pequeños efectos (Zhou et al. 2004, Jung et al. 2010). La evaluación fenotípica de la resistencia es difícil debido a que su expresión está fuertemente influenciada por factores ambientales (Rudd et al. 2001, Boutigny et al. 2008, Umpiérrez-Failache et al. 2013).

Algunos genotipos de trigo tienen la habilidad de detoxificar DON en un conjugado DON-glucosa (Lemmens et al., 2005). Pero se conoce que la desintoxicación de tricotecenos, no previene la infección y el crecimiento del hongo (Jansen et al., 2005). Por ello, la resistencia a la acumulación de DON es costosa de evaluar y no está completamente correlacionada con las evaluaciones visuales a FE (Paul et al. 2005, Sneller et al. 2012).

Los factores ambientales, también afectan en gran medida la acumulación de DON además de influir directamente sobre los patógenos (Umpiérrez-Failache et al., 2013). La temperatura, la humedad relativa, la duración y volumen de lluvias, la frecuencia de secado y mojado, la actividad del agua (a_w) sobre la superficie del material vegetal, específicamente la espiga, también afectan la producción y acumulación de DON en el grano (Marín 2010, Wegulo 2012, Cowger y Arellano 2013, Ramírez y Diana 2019). Además, se conoce que las condiciones ambientales

óptimas para la producción de las toxinas en general, difieren de las condiciones óptimas de crecimiento y dependerá de cada especie fúngica (Marín, 2010).

La duración del mojado de la espiga, como frecuencia y volumen de agua en post-antesis (y hasta llenado de grano) afectan la concentración de DON en el grano y la resistencia de los cultivares (Cowger y Arellano, 2013). Pero hay controversias sobre qué condiciones de humedad favorecen la acumulación de DON en el grano (Cowger y Arellano, 2013). Lemmens et al. (2004), Culler et al. (2007), Cowger et al. (2009), Cowger y Arellano (2013) y Gautam y Dill-Macky (2012) han demostrado que la concentración de DON en el grano varía (aumentando o disminuyendo), según la duración de condiciones de humedecimiento.

Por lo tanto, el estudio y el reconocimiento de la relación entre la expresión de síntomas de FE y la acumulación final de DON en el grano, permitirían obtener información de extrema utilidad para el desarrollo de planes de mejoramiento varietal orientados a mejorar el comportamiento de los genotipos de trigo frente a la enfermedad (Malbrán y Lori, 2013). Esto, sumado a la mayor exigencia de las distintas regulaciones nacionales e internacionales, determinan la necesidad de generar mayor conocimiento respecto a la caracterización de los cultivares frente a FE y su nivel de DON en el grano cosechado.

Por último, hay varios métodos para la cuantificación de FE y la concentración de DON en el grano, y no todos tienen la misma precisión, sensibilidad, rapidez y facilidad en la cuantificación. Los métodos de cuantificación de FE más comunes incluyen, evaluación visual de espigas infectadas, evaluación visual de espiguillas infectadas en pos-antesis, y conteo de daño por *Fusarium* en granos o granos infectados a cosecha. Sin embargo, hay escasa bibliografía local relacionada a la correlación entre los métodos. A su vez, para la cuantificación de la concentración de DON se describen numerosos métodos, entre los cuales los ensayos inmunoenzimáticos ELISA son los más utilizados por su rapidez, facilidad de operación, alto rendimiento y sensibilidad (Krska y Molinelli 2007, Umpiérrez-Failache 2013, Ono et al. 2016). Sin embargo, este método puede sobreestimar las

concentraciones de micotoxinas en comparación con los resultados generados por un método analítico más preciso (Papadopoulou-Bouraoui et al., 2004) porque que puede haber sobreestimación y reactividad cruzada de anticuerpos con DON-3-Glucósido (DON-3-Glc) y formas acetiladas del DON (A-DON) (Lattanzio et al. 2009, Umpiérrez-Failache 2013).

El objetivo general de este trabajo fue determinar el efecto de los distintos factores que afectan la acumulación de DON. Como objetivos específicos se planteó: i) Caracterizar los distintos cultivares comerciales en Uruguay frente a la acumulación de DON en el grano y asociarlo a la caracterización frente a la FE; ii) Comparar distintos métodos de cuantificación de la FE y de la acumulación de DON en grano; y iii) Determinar la dinámica de la acumulación de DON según condiciones de humedad ocurridas durante el llenado de grano.

Para cumplir con los objetivos, se sembraron 45 cultivares de trigo en los años 2017 y 2018, en la localidad de Paysandú. Se realizó inoculación artificial con una suspensión de macroconidios proveniente de 12 cepas de *Fusarium graminearum* s.s. representativas de la región triguera. Los cultivares se mantuvieron bajo un sistema de aspersión de agua desde la inoculación que aportó a un ambiente favorable para la infección. Se evaluó el nivel de infección de FE mediante el índice de la FE (IFE) y el contenido de DON por el método ELISA-Agraquant® DON. Para el estudio de la correlación entre métodos de cuantificación de la FE se utilizaron el IFE cuantificado a campo, el porcentaje de granos con *Fusarium* (FDK) por el método *blotter test* y el método de la *Canadian Grain Commission* (CGC, 2019), y para la cuantificación de la concentración de DON se utilizó el método ELISA -Agraquant® DON. Para el tercer objetivo se sembraron dos cultivares con comportamiento diferencial frente a FE, en condiciones controladas, y se expusieron a diferentes regímenes de duración y frecuencia de mojado desde la inoculación hasta madurez fisiológica.

Las hipótesis a probar fueron:

- i) Existe una correlación significativa entre el nivel de infección por FE y el contenido de DON en grano, dependiente del cultivar.
- ii) Existe una correlación significativa entre los diferentes métodos de cuantificación de FE y DON.
- iii) Las condiciones de humedad post-infección afectan significativamente la concentración de DON, según la resistencia del cultivar.

La estructura central de este trabajo consiste en tres artículos científicos. El primer artículo se titula “Acumulación de deoxinivalenol y su relación con el comportamiento frente a la fusariosis de la espiga”, el cual aporta información a la actual caracterización de cultivares en Uruguay. El segundo artículo se titula "Comparación de distintos métodos de cuantificación de la fusariosis de la espiga de trigo y el contenido de deoxinivalenol en grano”, el cual busca comprender las diferencias entre los métodos. Por último, el tercer artículo se titula “Dinámica de la acumulación de deoxinivalenol según condiciones de humedad durante el llenado de grano”, busca aportar nueva información sobre la influencia del mojado de la espiga sobre la acumulación de la toxina. Se proyecta remitir los tres artículos en la revista, *European Journal of Plant Pathology* para su publicación.

2. ACUMULACIÓN DE DEOXINIVALENOL EN GRANO DE TRIGO Y SU RELACIÓN CON EL COMPORTAMIENTO FRENTE A LA FUSARIOSIS DE LA ESPIGA

Carolina Francia¹, Silvia Pereyra², Noelia Benítez³, Oscar Bentancur⁴, Carlos A. Pérez⁵

¹ Ing. Agr., Ayudante de investigación fitopatología, Depto. Protección Vegetal, Fagro, EEMAC.
carofranciabent@gmail.com

² Ing. Agr. MSc., PhD., Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. spereyra@inia.org.uy

³ Ayudante de investigación fitopatología, Depto. Protección Vegetal, Fagro, EEMAC.
nbg_90@hotmail.com

⁴ Ing. Agr., Profesor Agregado, Fitopatología, Depto. de Biometría, Estadística y Computación, EEMAC obent@fagro.edu.uy

⁵ Ing. Agr. MSc., PhD., Profesor Agregado, Fitopatología, Depto. Protección Vegetal, Fagro, EEMAC.
caperez@fagro.edu.uy

2.1 RESUMEN

La fusariosis de la espiga (FE) representa una amenaza para el trigo debido a la reducción de rendimiento, calidad y su efecto sobre la inocuidad del grano. La FE es causada en Uruguay principalmente por *Fusarium graminearum* sensu stricto 15 acetildeoxinivalenol (15-ADON), caracterizado por la producción de DON (deoxinivalenol) y 15-ADON. Tradicionalmente, los enfoques de mejoramiento de cereales se han centrado en la selección por nivel de FE, pero esto no ha sido suficiente para asegurar un contenido de micotoxinas bajo. Este trabajo tuvo como objetivo caracterizar los distintos cultivares comerciales frente a la acumulación de DON en el grano y asociarlo a la caracterización frente a la FE. Para esto se sembraron 45 cultivares de trigo en los años 2017 y 2018. Se realizó inoculación artificial con un pool de 12 cepas de *Fusarium graminearum*. Se evaluó el índice de enfermedad (IFE), el % granos con *Fusarium* (FDK) mediante blotter test, el contenido de DON mediante el método Agraquant® DON (RomerLabs), y se estudió las correlaciones entre estas variables para cada cultivar. La correlación entre las distintas variables de cuantificación de la enfermedad y la concentración de DON en grano fue mayor en el experimento con menor nivel de enfermedad. FDK fue la variable que más se correlacionó con la concentración de DON. Por otro lado, en Uruguay, el sistema de caracterización sanitaria actual, permite predecir el comportamiento frente a la enfermedad pero no permite predecir la concentración de DON en años muy favorables para la enfermedad.

Palabras clave: cultivares, correlación, fusariosis de la espiga, deoxinivalenol

2.2 SUMMARY

DEOXYNIVALENOL ACCUMULATION AND ITS RELATIONSHIP WITH BEHAVIOR AGAINST FUSARIUM HEAD BLIGHT

Fusarium head blight (FHB) represents a threat in wheat due to its impact on grain yield, quality, as well as its impact on food safety. FHB is caused in Uruguay mainly by *Fusarium graminearum* sensu stricto 15 acetyldeoxynivalenol (15-ADON), characterized by the production of DON (deoxynivalenol) and 15-ADON. Traditionally most of wheat breeding approaches have focused on the selection for resistance to FHB, but this has not been enough to ensure a low mycotoxin content. This work aimed was to characterize commercial varieties in relation to DON accumulation in grain and associate it with the characterization against FHB. For this, 45 wheat cultivars were sown in 2017 and 2018. Artificial inoculation was performed with 12 strains of *Fusarium graminearum*. FHB was evaluated by the disease index (FHBI), the percentage of grains with *Fusarium* (FDK) was determined by blotter test and the DON content was quantified by the Agraquant® DON method (RomerLabs). Correlations among variables were performed for each cultivar. The highest significant correlation between FHBI/ FDK with DON content it was registered in Exp. 1, which had the lowest FHB level in the field. FDK and DON content had the highest positive correlation coefficient. Currently, national cultivars evaluation system includes characterization to FHB, while characterization based on DON concentration is still challenging.

Key words: cultivars, relationship, fusarium head blight, deoxynivalenol

2.3. INTRODUCCIÓN

El trigo es un alimento básico utilizado por varias civilizaciones a lo largo de la historia y en una gran variedad de productos, por lo que ha sido importante crear un abastecimiento estable del mismo. Por su parte, el trigo cumple un rol preponderante en la seguridad alimentaria establecida por la FAO en 1996, la cual refiere a que todas las personas puedan tener acceso a suficiente alimento, seguro y nutritivo para satisfacer sus necesidades (FAO, 1996).

La fusariosis de la espiga (FE) es una enfermedad que afecta la producción de trigo, cuando ocurren condiciones climáticas favorables, representando una amenaza para la seguridad alimentaria debido a la reducción de rendimiento y calidad, así como a la contaminación del grano por micotoxinas (Salgado et al., 2015; Dweba et al., 2017; Valverde-Bogantes, 2017). La FE es causada a nivel global por diversas especies del género *Fusarium* con capacidad de producir micotoxinas (metabolitos secundarios) tales como fumonisinas, tricotecenos y zearalenona que pueden afectar la salud humana y animal (Dweba et al., 2017).

Particularmente, el tricoteceno tipo B, deoxinivalenol (DON) es capaz de inhibir la síntesis de proteínas en organismos eucariotas (Gardiner et al., 2009; Sosa et al., 2017). En la planta de trigo es producido post-infección de la espiga y es considerado un factor de virulencia que le confiere mayor capacidad de colonizar saprofiticamente los tejidos vegetales, pero no es necesaria su presencia para causar la fusariosis de la espiga (Proctor, 2000; Jansen et al., 2005; Gardiner et al., 2009).

Su ingesta puede causar efectos como rechazo al alimento, vómitos, diarrea, irritación en piel, hemorragias e inmunosupresión en animales y humanos (Knutsen et al., 2017). Esta toxina presenta una dosis aguda de referencia (ARfD) de 8µg /kg de peso (ELIKA, 2013). Es una micotoxina termoestable hasta los 180°C por lo que persiste durante el procesamiento de los alimentos (ELIKA, 2013). Su toxicidad junto a su estabilidad durante el procesamiento de alimentos, y su frecuencia de detección en trigo demuestran su importancia (Wégulo, 2012; Maresca, 2013).

A nivel internacional, la Comisión Codex Alimentarius (FAO, 2018), estableció por decreto un límite máximo de 2 mg de DON por kg de grano de cereales (trigo, maíz y cebada) destinados a elaboración posterior de alimentos. En Uruguay, por resolución de la presidencia en el decreto 533/001, el límite máximo es de 1 mg/kg (1 ppm) en harina de trigo, subproductos y productos elaborados en base a trigo (IMPO, 2001).

La concentración final de DON en el grano está dada por la interacción de varios factores, relacionados al patógeno, al hospedero y al ambiente (Boutigny et al., 2008; Umpiérrez-Failache et al., 2013). La especie de *Fusarium* y cepa del patógeno, pueden definir que vía de producción de tricotecenos tipo B va a estar presente, debido a que hay diferencias intraespecie en la producción (Gautam y Dill-Macky, 2012; Wegulo, 2012; Umpiérrez-Failache et al., 2013). En las poblaciones de *F. graminearum*, las distintas cepas producen distintas toxinas y por lo tanto éstas, pueden ser agrupadas en distintos quimiotipos (Moss y Thrane, 2004). En Uruguay se ha determinado que la especie predominante es *Fusarium graminearum* sensu stricto, quimiotipo 15 acetildeoxinivalenol (15-ADON), perteneciente al complejo de especies de *F. graminearum* (FGSC) (Aoki et al., 2012; Umpiérrez-Failache et al., 2013). Esta especie es productora de deoxinivalenol (DON) y 15-ADON (Moss y Thrane, 2004; Pereyra y Dill-Macky, 2010; Umpiérrez-Failache et al., 2013).

Por otro lado, la susceptibilidad del cultivar y el estadio fenológico del cultivo al momento de la infección, son dos factores fuertemente relacionados a la concentración de DON a cosecha. Un cultivar altamente susceptible puede presentar concentraciones de DON significativamente más altas, que un cultivar moderadamente resistente, en igualdad de condiciones (Koch et al., 2006; Lemmens et al., 2016). Sin embargo, no siempre hay una correlación positiva y significativa entre variedades con alta resistencia a *Fusarium* y bajos niveles de DON detectados (Boutigny et al., 2008). Hernandez Nopsa et al., (2012) observaron que un cultivar moderadamente resistente acumuló más DON de forma consistente que un fenotipo susceptible. Si bien, los autores no concluyeron respecto a la causa de esto, infirieron que pudo ser debido a la madurez tardía del cultivar resistente y sugirieron que el

cultivar resistente que utilizaron, si bien es conocido por mostrar bajos niveles de IFE, es susceptible a FDK y DON. Estos autores proponen que los cultivares deben ser caracterizados por las tres variables de forma independiente y no estandarizarlo como en la actualidad.

Existen distintos mecanismos de resistencia a la FE, que se describen como: I- resistencia a la infección (Schroeder y Christensen, 1963), II- resistencia a la colonización de tejidos (Schroeder y Christensen, 1963), III- resistencia a la infección del cariopse (Mesterházy 1995; Mesterházy, 1997a; Mesterházy, 1997b), IV- tolerancia, - se desarrolla fusariosis de la espiga pero sin un efecto significativo en pérdida en el rendimiento o calidad del grano (Mesterházy, 1989; Mesterházy, 1995), V- resistencia a las toxinas. A su vez los mecanismos de resistencia relacionados a las toxinas pueden ser varios: descomposición de la toxina, insensibilidad a la toxina, o limitación en la acumulación en los tejidos de la espiga. Este último tipo de resistencia V, en clasificaciones de otros autores aparece nombrada como resistencia tipo III (Miller et al., 1985; Wang y Miller, 1988).

Los factores ambientales, además de influir directamente sobre los patógenos, afectan directamente la concentración de toxinas en el grano (Umpiérrez-Failache et al., 2013). La temperatura, así como la humedad relativa, y la duración y volumen de lluvias, son factores de gran importancia. La frecuencia de secado y mojado, la actividad del agua (a_w) sobre la superficie del material vegetal también afectan la producción y acumulación de DON en el grano (Marín, 2010; Wegulo, 2012; Cowger y Arellano, 2013; Ramírez y Diana, 2019).

Existen otros factores más complejos como el pH del medio que puede afectar la producción de toxinas por parte del patógeno. A modo de ejemplo Gardiner et al., (2009) demostraron que la expresión del gen Tri5 (gen que codifica la enzima que sintetiza tricodieno, es decir, la molécula precursora común a todos los tricotecenos (Desjardins et al. 1992) y la concentración de DON aumentaban al someter una cepa de *F. graminearum* a un medio de pH bajo en condiciones in vitro.

La composición gaseosa de la atmósfera (niveles de oxígeno y dióxido de carbono) afecta principalmente la producción de micotoxinas, y en menor grado el crecimiento fúngico (Marín, 2010).

Todos estos factores interaccionan entre sí, por lo que el sistema es muy complejo. Se puede pensar que las condiciones favorables para el crecimiento de *F. graminearum* darían lugar a una producción y acumulación más alta de tricotecenos, dado que su producción acompaña el proceso de colonización. Sin embargo, la compleja relación entre genotipo y quimiotipo asegura que la presencia de un gen, no garantiza la presencia de un metabolito producido por esa vía, ni predice los niveles producidos de ese metabolito (Desjardins, 2008). La traducción de genotipo en quimiotipo está dada por interacciones genéticas y factores ambientales (Desjardins, 2008).

Además, el DON producido puede ser degradado total o parcialmente, y metabolitos intermedios de la ruta pueden dirigirse hacia otras rutas metabólicas resultando en una gran variabilidad en la cantidad de DON detectada en el grano cosechado (Marín, 2010). Por lo tanto, resulta relevante investigar sobre la relación entre la acumulación de DON en el grano y los niveles de FE en la planta.

Tradicionalmente, el mejoramiento genético por resistencia a FE se ha realizado basado en los niveles de enfermedad (Boutigny et al., 2008). Sin embargo, los programas de mejoramiento podrían ser optimizados incorporando la determinación de los niveles de DON en los distintos cultivares (Malbrán y Lori, 2013). Esto permitiría contar con un indicador más confiable de la estabilidad o nivel de riesgo de las distintas variedades, debido a que el nivel de enfermedad y la inocuidad del grano no necesariamente presentan una alta correlación (Koch et al., 2006; Arrúa et al., 2014).

Estudios de la correlación entre distintos parámetros que cuantifican a la FE, incluido el nivel de infección de *Fusarium* en grano pre y/o postcosecha y la

concentración de DON, han presentado resultados inconsistentes debido a la gran cantidad de factores que están involucrados (Paul et al., 2005). Se han encontrado correlaciones altas y positivas (Edwards et al., 2001; Brunner et al., 2009; Malbrán y Lori, 2013; Martinez et al., 2014), bajas y positivas (Argyris et al., 2003; Hernandez Nopsa et al., 2012; Mourellos, 2015; Góral et al., 2018), y en algunos casos ausencia de correlación entre las variables (Edwards et al., 2001; Arrúa et al., 2014). La inmensa variabilidad de resultados encontrados fue resumida por Paul et al. (2005), quienes, analizando 163 trabajos, encontraron que en más del 65 % de los mismos, las correlaciones fueron de un coeficiente $r > 0,50$, sugiriendo correlaciones positivas entre DON y FE y en otros no se observaron correlaciones o incluso las mismas fueron negativas.

Estas diferencias entre los trabajos anteriores, han originado un constante cuestionamiento acerca del peso relativo de cada factor en forma individual y de sus interacciones en la acumulación de DON. Esto, sumado a la exigencia de las distintas regulaciones nacionales e internacionales, determina la necesidad de generar más conocimiento sobre la relación entre la resistencia a FE y el nivel de DON en el grano cosechado.

El presente estudio tuvo como objetivo caracterizar distintos cultivares comerciales frente a la acumulación de DON en el grano y asociarlo a la caracterización frente a FE. La principal hipótesis fue, que existe una correlación significativa entre la caracterización sanitaria del cultivar frente a FE y el contenido de DON en grano, que depende del cultivar.

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron tres experimentos de campo entre los años 2017 y 2018, en la Estación Experimental “Dr. Mario A. Cassinoni” (EEMAC), en la localidad de Paysandú, Uruguay (32°22'12''S 58°03'52''W).

El Exp. 1 se sembró en el 2017, incluyendo 45 cultivares de trigo, el día 24 de julio. El Exp. 2 y el Exp. 3 fueron sembrados en el 2018, incluyendo 44 cultivares. El

Exp 2. fue sembrado el 28 de mayo los ciclos largos y el 9 de junio los ciclos intermedios, mientras que en el Exp. 3 fueron sembrados el 26 de junio y el 16 de julio, respectivamente. Los cultivares utilizados se encontraban en etapas avanzadas de registro al momento de uso y cabe destacar que se utilizaron diferentes germoplasmas entre experimentos (Ver anexo No. 1).

La unidad experimental fue de dos surcos de 1 m de largo y 0,20 m de distancia entre surco, con una distancia entre parcelas de 0,40 m. El diseño experimental fue de bloques completos al azar, con tres repeticiones. Los ensayos se fertilizaron de manera que los nutrientes no fueran limitantes y se mantuvo el área experimental libre de malezas.

2.4.1. Inoculación

Se utilizó un pool de 12 aislados de *F. graminearum* de origen monospórico, representativos de la región triguera de Uruguay, provenientes de distintos cultivares, localidades y años, caracterizados por especie filogenética, quimiotipo y agresividad. Estas cepas se encuentran conservadas en la colección de INIA La Estanzuela, Uruguay (Códigos: 00-004, 02-020, 09-005, 11-001, 12-000, 13-009, 13-023, 14-003, 14-012, 16-000, 16-014 y 17-003), todas identificadas como *F. graminearum* sensu stricto 15ADON (S. Pereyra, S. Vero, obtenidos de varios proyectos comunicación personal, 1 de julio de 2017).

Se utilizaron dos métodos de inoculación: i) distribución de granos de maíz colonizados por los aislados, con presencia de peritecios y liberando ascosporas, y ii) aspersión de suspensión de macroconidios en la espiga.

2.4.1.1 Inoculación con grano de maíz

Las cepas conservadas en silica gel, se sembraron en medio PDA (Oxoid, UK). El inóculo se multiplicó en medio PDA (Oxoid, UK), en placas de Petri de 90 mm, donde se sembró la cepa correspondiente en el centro de la placa y se incubó por siete días temperatura ambiente (20-25 °C). Luego los granos de maíz se

embebieron por 24 h en agua (se utilizó agua suficiente para poder cubrir el maíz y asegurar que el agua no fuera limitante en este proceso). Posteriormente los granos se escurrieron, se colocaron en bandejas de aluminio y se cubrió con doble capa de papel de aluminio. Las bandejas se autoclavaron por 30 min a 120 °C y se dejó enfriar completamente. En la cámara de flujo laminar, cada bandeja se inoculó con una cepa diferente de *F. graminearum*, de modo de tener varias bandejas de cada una de las cepas. Cada bandeja de 700 g de maíz se inoculó con una placa completa de *Fusarium*.

Las bandejas inoculadas fueron incubadas a temperatura ambiente por tres semanas. Luego de dos semanas de incubación el contenido de la bandeja se mezcló para generar una colonización homogénea de los granos por parte del hongo. A la tercera semana se desagregaron los granos manualmente, y se dejó secar a temperatura ambiente sobre un nylon esterilizado superficialmente, con luminosidad natural. Luego de 15 días de secado se almacenó en bolsas de papel. Previo a la inoculación, se mezcló el grano inoculado de las 12 cepas, se homogeneizó, y se distribuyó uniformemente en las parcelas a razón de 40 g/m². La inoculación se realizó en dos oportunidades: dos semanas previas a floración, y a floración (modificado de Dill-Macky, 2003; Osman et al., 2015).

2.4.1.2 Inoculación con aspersión de macroconidios

Para producir la suspensión de macroconidios, se partió de las mismas 12 cepas mencionadas arriba. Las cepas se repicaron en medio PDA (Oxoid, UK) y se colocaron a temperatura ambiente (20-25°C) con fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Luego de 7 días, se transfirió el micelio hacia tubos de 10 mL que contenían 7 mL de medio agar-agua y se mezcló con vortex. Se colocó 1 mL de esa mezcla en una placa de Petri con medio de cultivo de poroto de soja y se esparció con un rastrillo estéril. A los 15 días se raspó la superficie de la placa usando agua estéril y se filtraron restos de micelio con gasa hidrófila estéril para que solo pasaran

los macroconidios. Por último, se llevó a la concentración deseada de 2×10^5 esporas/mL. La suspensión fue conservada en freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

El medio de cultivo de poroto de soja utilizado se realizó hirviendo 40 g de granos de soja en 1 L de agua desionizada por aprox. 23 min o hasta que el tegumento del grano se desprendía. Luego se filtró el líquido con un colador y se llevó el volumen a 1 L nuevamente. Posteriormente se agregaron 20 g de agar bacteriológico y se autoclavó por 20 min a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$. Luego de autoclavado, se dispensó en placas de Petri de 90 mm (modificado de Pereyra y Dill-Macky, 2010).

La inoculación con suspensión de macroconidios, se realizó mediante una pulverizadora manual (PP415, Forest & Garden). Se inoculó cada parcela de forma independiente, al estado mediados de floración (Z65). Para esto se utilizaron aproximadamente 60 mL de suspensión de macroconidios por parcela, con el objetivo de lograr la mayor cobertura posible de las espigas.

Se instaló un sistema de humidificación con dos tipos de aspersores. Uno de gota gruesa para el riego, de forma de que se favoreciera la diseminación del inóculo desde el grano de maíz, para esto se utilizaron aspersores modelo Gyronet (Netafim, Israel) de caudal 120 L/h, a 200.000 Pa de presión. El otro aspersor fue de cuatro boquillas en cruz (Coolnettmpro, Netafim, Israel) con caudal de 30 L/h que trabaja a un rango de presión de 300.000 a 500.000 Pa. Esta gota fina, permitió la prolongación de horas de agua libre en la espiga.

Este sistema buscó generar un ambiente favorable para la infección y posterior desarrollo de la FE. A su vez, se colocó malla sombra a 2 m de altura de las plantas, con el objetivo de disminuir la radiación y aumentar la humedad relativa. Esta malla podía correrse cuando fuera necesario.

2.4.2 Determinaciones realizadas

Se evaluó la incidencia (porcentaje de espigas con FE en el total de la parcela) y severidad (espiguillas con síntomas de FE en el total de espiguillas de la

espiga) en estado lechoso-pastoso (Z83) y se calculó el índice de FE (IFE) como el producto de severidad*incidencia expresado en porcentaje.

Cada parcela se cosechó en forma manual y trilló con una trilladora experimental (Classic, Wintersteiger, Austria) donde se trabajó con el nivel mínimo de viento para que los granos chuzos no fueran eliminados de la muestra. Finalmente se retiraron las cubiertas de todos los granos de forma manual en el laboratorio, y se conservó en bolsas de papel a 4°C hasta su procesamiento.

A su vez, se determinó el porcentaje de granos con *Fusarium* (FDK) mediante blotter test, y la concentración de deoxinivalenol (DON) en grano por el método AgraQuant®ELISA DON (Romer Labs Inc., Union, MO, EEUU).

2.4.2.1 Blotter test

La infección con *Fusarium*, se determinó siguiendo el protocolo ISTA (2021). Brevemente, se realizó desinfección superficial de los granos sumergiendo los mismos en hipoclorito al 1 % durante 15 s, luego el grano se sumergió durante 15 s en alcohol al 70 %, y por último se enjuagó por 30 s en agua destilada estéril en un vaso de Bohemia, por dos veces. Posteriormente, se eliminó el agua en la superficie mediante secado en papel absorbente, y se incubaron placas de Petri sobre papel de filtro humedecido.

Se analizó un total de 200 semilla/parcela, en cuatro repeticiones de 50 semillas cada una, con un diseño de bloques completos aleatorizados, con cuatro repeticiones. Las placas se incubaron a 25°C por 24 h, y luego se colocaron en freezer a -20°C por 12 h para matar el embrión de la semilla. Posteriormente, los granos se incubaron a 25°C por seis días, momento en que se cuantificó el número de semillas con esporulación de *Fusarium* (incidencia), bajo lupa estereoscópica 40X, y mediante confirmación por morfología de esporas bajo microscopio. Para evaluar que este procedimiento se realizara de forma homogénea entre las distintas tandas de muestras evaluadas, se incluyó un tratamiento testigo de infección conocida, que cumplía el rol de testigo (ISTA, 2021).

2.4.2.2 Determinación de la concentración de deoxinivalenol

El contenido de DON se determinó mediante el método AgraQuant®ELISA DON (COKAQ4000, RomerLabs) (aprobado por AOAC Research Institute-AOAC RI 110701). Se utilizaron tres muestras de concentración de DON conocida, determinada en el Laboratorio de Micotoxinas del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), de forma de tener muestras de referencia que permitieran verificar la consistencia del resultado. Las muestras de referencias presentaban distinta concentración de DON: baja con rango de 1,32-1,74 ppm, intermedia con rango de 2,68-2,93 ppm y alta con rango de 4,88-5,34 ppm. El grano se molió en un molino de laboratorio (modelo Newman, Inglaterra), y fue cernido en un tamiz de malla no. 20.

Posteriormente, se procedió con el protocolo del fabricante. Brevemente, se pesaron 10 g de muestra, se agregaron 50 mL de agua bidestilada estéril, se agitó durante 10 min a 400 rpm en Orbital Shaker, y se dejó decantar por 10 min. Luego se filtró el sobrenadante en papel Whatman #1 por 20 min y se colectó el filtrado, se agitó nuevamente en el vortex y se diluyó el extracto con agua bidestilada estéril (1 mL de extracto y 3 mL de agua) como lo indica el protocolo del kit. Con el extracto obtenido, se procedió a cuantificar la concentración de DON en un espectrofotómetro (Multiskan FC, Thermo Scientific, Finlandia), utilizando planilla de cálculo del método. En cada corrida se verificó que el coeficiente de determinación sea mayor a 0,985 y la densidad óptica mayor a 0,5. El límite de detección del método es de 0,20 ppm y el límite mínimo de cuantificación es de 0,25 ppm. Cuando la concentración fue mayor al máximo determinado por el método, se procedió a diluir la muestra, hasta que la concentración se ubicara dentro del rango de confiabilidad del método.

2.4.3 Modelo estadístico

Para el análisis de resultados se utilizó el procedimiento GLIMMIX del paquete estadístico SAS On Demand for Academics versión 9.04 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2018), y se trabajó con un modelo estadístico anidado:

$$Y_{ijkl} = \mu + \beta_i + C_j + M(C)_{jl} + D_k + \xi_{ijkl}$$

μ : media general

β_i : efecto del i-ésimo bloque

C_j : efecto del j-ésimo grupo de caracterización sanitaria

$M(C)_{jl}$: efecto del l-ésimo cultivar anidado a j-ésimo grupo de caracterización sanitaria

D_k : efecto del k-ésimo días favorables

ξ_{ijkl} : error experimental

Los grupos de caracterización sanitaria se generaron agrupando los cultivos con igual comportamiento sanitario, según Castro et al. (2020). Esta escala está comprendida por 9 grupos de susceptibilidad, donde los cultivos de baja susceptibilidad a FE pertenecen al grupo 1 y los cultivos altamente susceptibles pertenecen al grupo 9, por lo que un número mayor significa mayor susceptibilidad. El grupo 0, estuvo comprendido por cultivos aún sin caracterizar que se decidió dejar fuera del análisis.

El factor “días favorables” (o eventos infecciosos) se refiere a la cantidad de días que tuvieron un periodo crítico según Moschini y Fortugno (1996). Estos autores determinaron que un evento infeccioso corresponde a la ocurrencia de lluvias >0,2 mm, HR mayor a 81 %, y al día siguiente HR mayor o igual a 78 %. Mazzilli et al., (2011) agrega que en ambos días, no deben existir limitantes de temperatura, o sea, la misma debe ser mayor a 14 °C y menor a 25 °C. Los eventos infecciosos ocurridos durante la floración, son los que determinan mayor probabilidad de infección por *Fusarium*, pero se conoce que eventos infecciosos durante el llenado de grano también pueden generar infección (Hooker et al., 2002; Del Ponte et al., 2007;

Velázquez y Formento, 2012). Tomando en cuenta lo anterior, se analizaron los eventos infecciosos desde la inoculación hasta siete días previos a la lectura, debido a que es el período aproximado de incubación y en el cual se puede llegar a cuantificar los síntomas de FE (Del Ponte et al, 2007). Para las variables que fueron evaluadas en pos-cosecha (FDK y concentración de DON) se consideraron los días favorables de todo el periodo (desde inoculación a cosecha).

El análisis de varianza para las variables incidencia de FE, severidad de FE y FDK se realizó considerando que las mismas son variables binomiales, es decir cuenta el número de éxitos en una secuencia de n ensayos independientes entre sí. En el caso de la incidencia por ejemplo, número de espigas enfermas sobre número de espigas totales. El IFE analizó como variable logarítmica y luego se realizó la destransformación hacia variable exponencial. El análisis de DON, se realizó considerando que la misma tiene una distribución normal.

Finalmente, se estudió la correlación entre las distintas variables, utilizando la correlación de Pearson cuando ambas variables tenían distribución normal o correlación de Spearman cuando alguna variable presentaba otro tipo de distribución.

2.5 RESULTADOS

Los experimentos realizados presentaron distintos niveles de FE y de infección en grano pos-cosecha, con los menores niveles de infección en el Exp. 1 y los mayores niveles en el Exp. 3. Las condiciones climáticas fueron similares entre experimentos, aunque con diferencias en los volúmenes de lluvia: el Exp. 1 recibió menor volumen de lluvia total, en relación al Exp. 3, y los menores volúmenes se registraron en el Exp. 2 (Cuadro 1).

Cuadro 1. Valores máximos de incidencia, severidad e índice de Fusariosis de la espiga (FE) a los 21 días pos-inoculación, porcentaje de grano con *Fusarium* (FDK) y concentración de deoxinivalenol (DON), rangos promedios de temperatura, humedad relativa (HR) y lluvias totales del período desde 50 % de espigazón hasta cosecha en cada experimento

	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
Incidencia de FE máxima (%)	55	100	100
Severidad máxima (%)	77	71	89
Índice de FE máxima (%)	26	66	89
FDK máximo (%)	64	79	91
DON máximo (ppm)	12	21	25
Rango de Temp. promedio (°C)	13 - 28	11 – 28	11 – 28
Rango de HR promedio (%)	46 – 94	46 – 95	46 – 95
Volumen de lluvia total (mm)	325	458	432

Si bien se utilizó riego, el agregado de agua y la cobertura con malla sombra tuvo un efecto parcial sobre el ambiente, por lo cual las condiciones climáticas fueron determinantes en brindar condiciones óptimas para el éxito de las inoculaciones en la infección. En este sentido, en los tres ensayos hubo diferencias, tanto en cantidad como en la distribución de los eventos infecciosos, lo que podría explicar la severidad máxima de FE observada en cada caso (Cuadro 2).

Cuadro 2. Distribución de la ocurrencia de eventos infecciosos en el período desde ocho días previos a espigazón (50 % espigas afuera) hasta cosecha en los experimentos (Exp; 1: 2017; 2: 2018-siembra temprana; y 3: 2018-siembra tardía)

Experimento 1				Experimento 2				Experimento 3			
Set.	Oct.	Nov.	Dic.	Set.	Oct.	Nov.	Dic.	Set.	Oct.	Nov.	Dic.
0	1	0	0	2	0	2	6	2	0	2	6
Total				Total				Total			
1				10				10			

El IFE fue mayor en el Exp. 3. A su vez en este experimento los valores de IFE máximos fueron superiores a los otros experimentos. Los valores promedio de FDK cuantificados en laboratorio fueron mayores en el Exp. 2. Por otro lado, respecto a la concentración de DON, los Exp. 2 y 3 tuvieron promedios similares, pero el Exp. 3 tuvo mayor variación entre cultivares (Fig. 1).

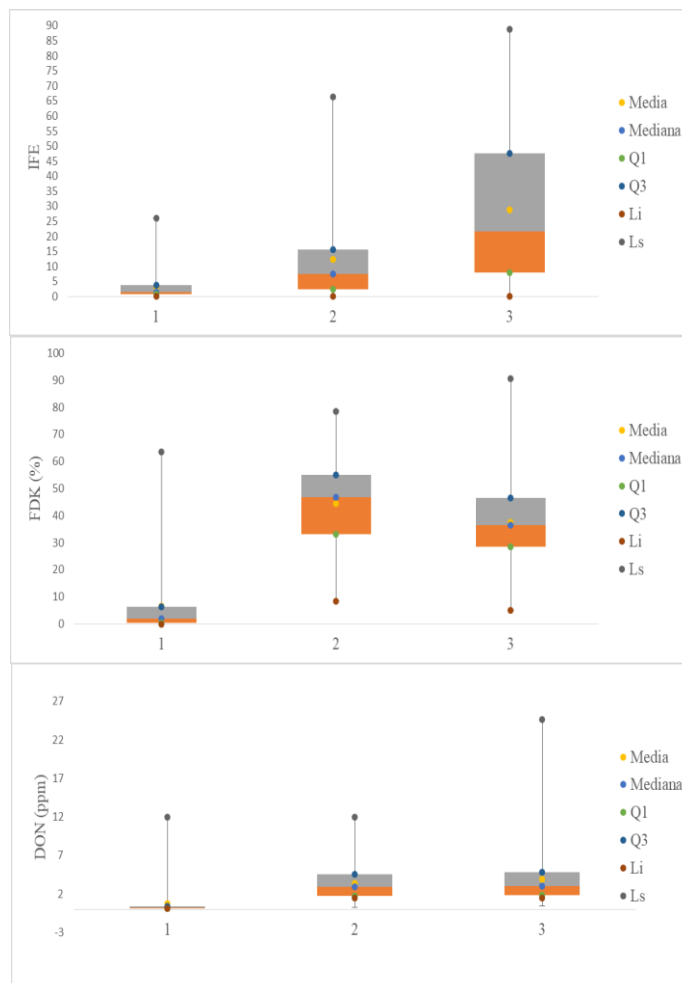


Fig. 1. Dispersión del índice de fusariosis de la espiga (IFE), porcentaje de infección en granos (FDK) y concentración de deoxinivalenol (DON) en cada experimento; 1: 2017; 2: 2018-siembra temprana; y 3: 2018-siembra tardía

En todos los experimentos, el grupo de caracterización sanitaria (CARSAN) fue un factor significativo para todas las variables, a excepción de la incidencia de FE en el Exp 3 (Cuadro 3), coincidiendo con el experimento que presentó los mayores niveles de IFE.

El factor cultivar dentro del grupo de CARSAN tuvo efecto significativo sobre todas las variables de respuesta en todos los experimentos. Por su parte, el factor días favorables o eventos infecciosos (DIASFAV), fue significativo sobre la concentración de DON en el Exp 1, donde los cultivares que tuvieron un día favorable, tuvieron significativamente mayor DON que los que no tuvieron días

favorables. En el Exp 3, no se consideró a DIASFAV como un factor dado que todos los cultivares tuvieron ocho días favorables hasta la cosecha.

Cuadro 3. Resultados del ANOVA para incidencia y severidad de fusariosis de la espiga (FE), índice de FE (IFE), granos con *Fusarium* a poscosecha (FDK) y contenido de deoxinivalenol (DON). El valor presentado corresponde a p-valor

Experimento 1					
Efecto	Incidencia de FE	Severidad de FE	IFE	FDK	DON
Bloque	0,6406	0,0683	0,1763	<0,0001	0,0277
Carsan	0,0089	0,0362	0,0314	0,0117	<0,0001
Material(Carsan)	<0,0001	0,0426	0,0534	<0,0001	<0,0001
Diasfav.	0,4579	0,1692	0,6822	0,3207	0,0485
Experimento 2					
Efecto	Incidencia	Severidad	IFE	FDK	DON
Bloque	0,0001	0,1737	0,0012	0,0482	<0,0001
Carsan	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0003	<0,0001
Material(CARSAN)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Diasfav.	0,0093	<0,0001	0,0012	0,1931	0,8044
Experimento 3					
Efecto	Incidencia	Severidad	IFE	FDK	DON
Bloque	0,7638	0,1589	0,7795	0,0047	0,0009
Carsan	0,8486	0,0017	0,0599	0,0373	0,0058
Material(Carsan)	0,0005	0,0008	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Diasfav.	<0,0001	<0,0001	<0,0001	-	-

Significancia con valores de p-valor < 0,10 son indicados en negritas.

Se registraron diferencias significativas entre los grupos de caracterización frente a FE en la concentración de DON en los tres experimentos. Sin embargo, no se

observó que los grupos más susceptibles tuvieron mayor concentración de DON que los grupos con mayor resistencia (Fig. 2).

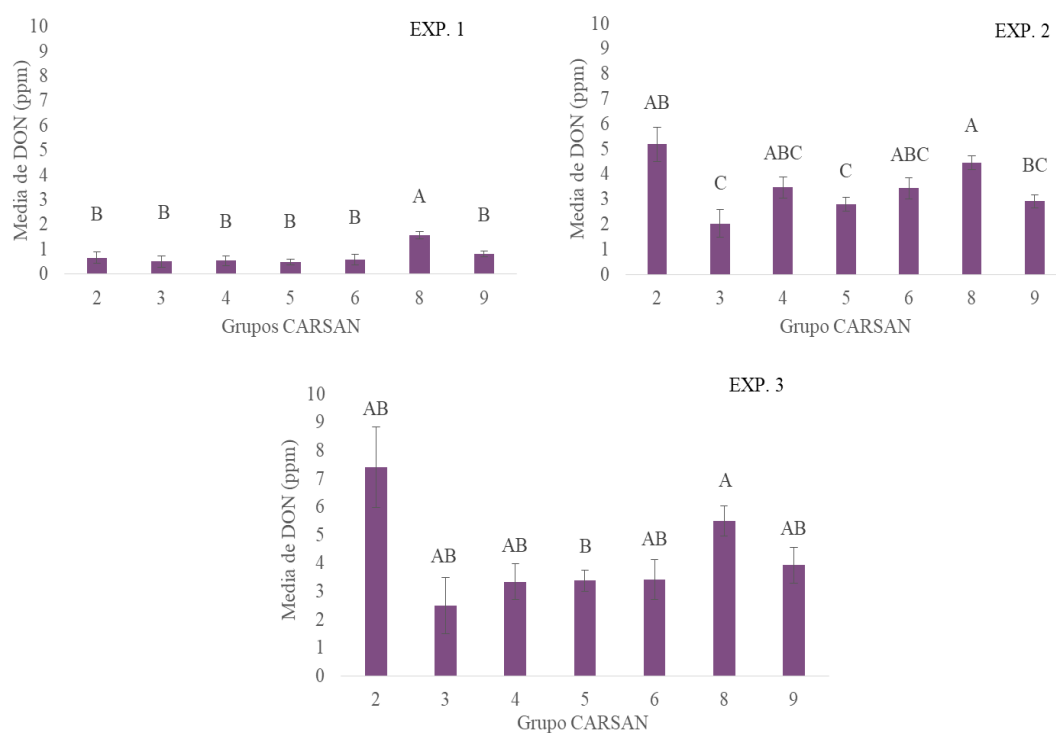


Fig. 2. Valores medios de contenido de deoxinivalenol (DON) según grupo de caracterización sanitaria (Grupo CARSAN)

La correlación entre las distintas variables de cuantificación de la enfermedad y la concentración de DON en grano fue mayor en el experimento con menor nivel de enfermedad, y fue disminuyendo en los experimentos con mayor nivel de infección (Cuadro 4).

Cuadro 4. Correlaciones de Pearson o Spearman (*), según corresponda, entre incidencia y severidad de fusariosis de la espiga (FE), índice de FE (IFE), granos con *Fusarium* a poscosecha (FDK) y la concentración de deoxinivalenol (DON) para los experimentos (experimentos; 1: 2017; 2: 2018-siembra temprana; y 3: 2018-siembra tardía)

Correlaciones	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
IFE-DON*	0,74 (<0,0001)	0,63 (<0,0001)	0,16 (0,07)
%Inc-DON	0,89 (<0,0001)	0,55 (<0,0001)	-0,03 (0,69)
%Sev-DON	0,42 (0,0016)	0,44 (<0,0001)	-0,01 (0,92)
%FDK-DON	0,86 (<0,0001)	0,60 (<0,0001)	0,38 (<0,0001)

Significancia con valores de p-valor < 0, 05 son indicados en negritas. El valor presentado entre paréntesis corresponde a p-valor.

Para determinar si las correlaciones fueron significativamente distintas entre experimentos, se realizó un análisis de comparación por Z-Fisher (datos no presentados). Las correlaciones poblacionales entre IFE-DON y Sev-DON no difirieron significativamente entre los Exp. 1 y 2, mientras que para la correlación Inc-DON sí hubo diferencias significativas donde la correlación del Exp. 1 fue significativamente mayor que la del Exp. 2. Las correlaciones poblacionales entre FDK y concentración de DON fueron significativamente diferentes entre los tres experimentos.

Al re-categorizar los cultivares en tres grupos de susceptibilidad, para mejorar la robustez de los resultados, las correlaciones más altas y positivas se encuentran en la categoría de cultivares más resistentes y en el año de menor nivel de enfermedad (Cuadro 5).

Cuadro 5. Correlación de Spearman entre índice de fusariosis de la espiga a campo (IFE, %) y contenido de deoxinivalenol (DON, ppm) según grupo de susceptibilidad de los cultivares para los tres ensayos.

Grupo	Cultivares	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
1	A, AI, IA	-0,29	0,56	0,47
2	I-IA, I	0,66	0,62	0,06
3	I-IB, IB, BI, IB-I	0,92	0,68	0,06
Sin agrupar	Todos	0,74	0,63	0,16

* Significancia con valores de p-valor < 0, 05 son indicados en negritas

Hubo un total de 25 cultivares que fueron compartidos entre los tres experimentos. Si se considera el máximo de concentración de DON para cada cultivar y se establece un corte en 2 ppm, se observa que hay cultivares que no superaron las 2 ppm de DON en ninguno de los experimentos. Por otro lado, se observan cultivares que aún en ambientes no tan favorables para FE, igualmente superaron dicha concentración de DON (Fig. 3). Cabe aclarar que al no realizar soplado de grano en las muestras, los valores no son estrictamente comparables a los valores comerciales.

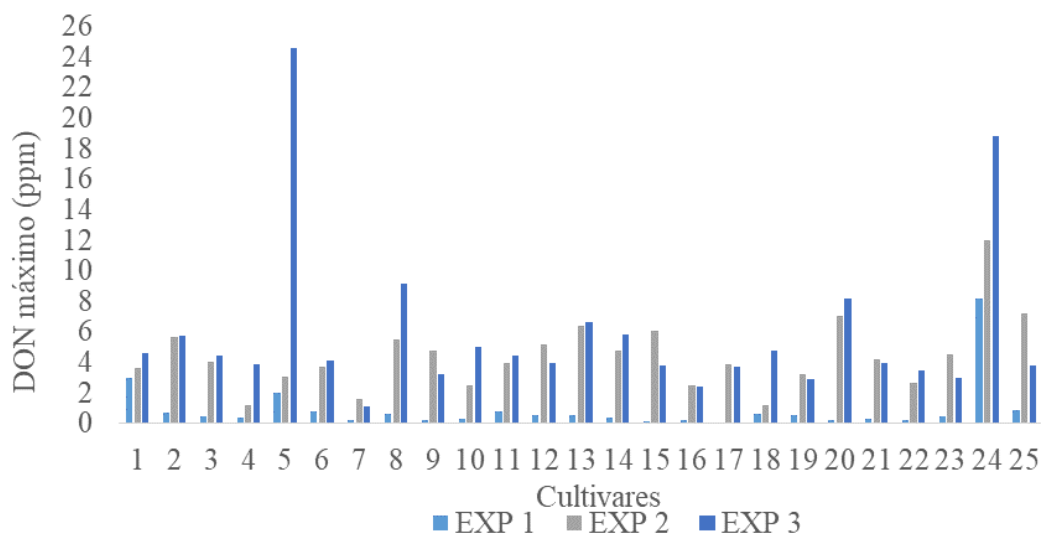
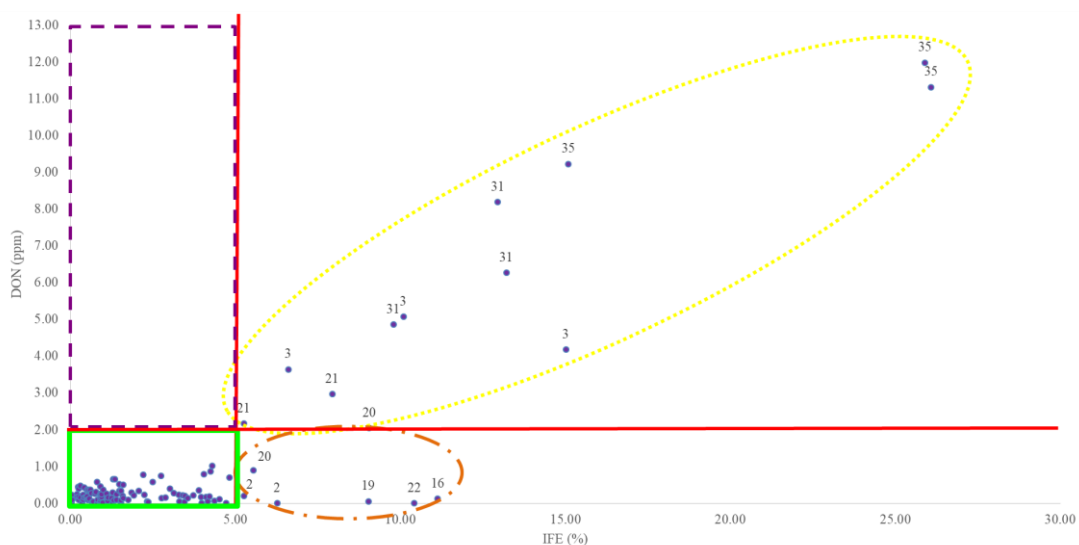


Fig. 3. Concentración máxima de deoxinivalenol (DON, ppm) según cultivar y experimentos (experimento; 1: 2017; 2: 2018-siembra temprana; y 3: 2018-siembra tardía)

En base a la regresión de IFE y DON, se realizaron agrupaciones de cultivares en cuatro categorías. La primera incluyó cultivares que presentaron un IFE menor a 5 % y contenido de DON por debajo de 2 ppm (conjunto verde o línea continua), que es el límite máximo permitido según el Codex Alimentarius (FAO, 2018). La segunda categoría comprendió a cultivares con un IFE mayor a 5 %, pero con concentración de DON correlacionada con los niveles de FE a campo estimada por el IFE (conjunto amarillo o línea punteada). Una tercera categoría de cultivares que, por más que presentaron valores de IFE mayores a 5 %, se cuantificaron valores de DON en el grano entre 0-1 ppm, menores al límite establecido por FAO (2018), (conjunto anaranjado o línea punto y raya). Y una cuarta categoría de cultivares que si bien presentaban valores de IFE menores a 5 %, tenían valores mayores a 2 ppm de DON (grupo violeta o línea discontinua). Si bien este análisis se realizó para los tres ensayos, se presenta la información obtenida en el experimento 1. En este caso, la categoría del segundo cuadrante no comprendía ningún cultivar (Fig. 4).



Referencias: Grupo amarillo o línea de puntos: cultivares con IFE>5 % y DON>2 ppm; grupo violeta o línea a rayas: IFE<5 % y DON>2 ppm; grupo verde o línea continua: IFE<5 % y DON<2 ppm; grupo anaranjado o línea de punto y raya: IFE>5 %y DON<2 ppm.

Fig. 4. Cultivares agrupados según la relación entre su nivel de fuariosis de espiga (FE) a campo estimada por el índice IFE (%) y su contenido de deoxinivalenol (DON, ppm) en el experimento 1

Los cultivares que se encontraron comprendidos en la categoría del primer cuadrante (o grupo amarillo), es decir con alto IFE y DON, fueron cultivares clasificados como pertenecientes a la categoría 8 y 9 (altamente susceptibles a FE) según la clasificación realizada en Uruguay según Castro et al. (2020). Esto coincidió con los niveles de IFE que se encontraron en este estudio. Para estos cultivares, la caracterización frente a FE (Castro et al., 2020), explicó en gran parte, la concentración de DON. La regresión entre IFE y DON de los cultivares del primer cuadrante, presentó un coeficiente de determinación (R^2) de 0,82. En estos cultivares, se puede esperar una alta concentración de DON a cosecha por tener alto IFE. Mientras que para los Exp. 2 y 3, los cultivares presentes en dicho cuadrante pertenecen a todas las categorías de Castro et al. (2020). Es decir, algunos cultivares categorizados con susceptibilidad baja-intermedia frente a FE según Castro et al. (2020) presentaron niveles altos de FE.

En los tres experimentos, los cultivares comprendidos en el tercer cuadrante (indicados con el círculo verde), con bajo IFE y bajo DON, pertenecen a diversos grupos de caracterización, desde muy susceptibles a moderadamente resistentes según Castro et al. (2020). Por lo tanto, hubo cultivares altamente susceptibles que mostraron niveles de IFE cercanos a cero.

Los cultivares pertenecientes al cuarto cuadrante (señalado con naranja), con alto IFE y bajo DON, pertenecen las categorías 5, 6 y 8, según Castro et al. (2020). Esa clasificación estuvo en concordancia con el IFE observada en el experimento. Sin embargo, en este grupo un alto IFE no resultó en alta concentración de DON. Esto fue también observado en los Exp 2 y 3 (datos no mostrados).

Particularmente en los Exp. 2 y 3 hubo cultivares ubicados en el primer cuadrante, indicando que si bien presentaron un IFE menor a 5, tuvieron concentraciones de DON mayores a 2 ppm. En el Exp. 2, en esta categoría, se encontraron cultivares pertenecientes a la caracterización sanitaria de 4 al 9 y en el Exp. 3, cultivares pertenecientes a la caracterización sanitaria de 4 al 8. Para ambos experimentos, todos los cultivares tuvieron por lo menos ocho eventos infecciosos al igual que los cultivares en otros cuadrantes pero que no elevaron su concentración de DON por encima de 2 ppm.

Estudiando el comportamiento de los cultivares en los tres experimentos y considerando todas las parcelas del mismo, se concluye que si bien se pueden hacer categorías generales, el 32 % de los cultivares presentaron comportamientos variables en los distintos ambientes.

Igualmente se observó que el 28 % de los cultivares, no siempre presentaron concentraciones mayores de 2 ppm de DON aún con valores de IFE mayores a 5 %. Un grupo que comprendió el 12 % de los cultivares, a medida que aumentó el nivel de enfermedad aumentó la concentración de DON. Es decir, cuando presentaron

niveles mayores a 5 % de IFE, tuvieron concentraciones de DON mayores a 2 ppm y cuando presentaron niveles menores de 5 % de IFE, presentaron concentraciones menores de 2 ppm de DON.

También se observaron cultivares que siempre presentaron concentraciones de DON mayores a 2 ppm (4 %). Hubo cultivares con bajo IFE, que en ningún experimento tuvieron niveles de IFE mayores a 5 % (4 %). Y un 2 % de los cultivares evaluados a pesar del nivel de IFE, nunca tuvieron concentraciones de DON mayores a 2 ppm.

2.6 DISCUSIÓN

Los resultados reflejan que todas las correlaciones estudiadas entre el nivel de FE observado y el contenido de DON final en grano, fueron altamente dependientes del ambiente. Estas correlaciones fueron más altas en el ambiente menos favorable para la enfermedad, donde hubo menor cantidad de eventos infecciosos.

Si bien todos los experimentos tuvieron similar rango de temperatura y HR promedio, los tres experimentos difirieron tanto en cantidad como en la distribución de los eventos infecciosos. La menor correlación entre el nivel de FE y el contenido de DON en grano observada en los Exp. 2 y 3 podrían estar asociadas a un mayor volumen total de lluvia, y a la ocurrencia de eventos infecciosos tardíos respecto al ciclo del cultivo. Este mayor volumen de lluvia tardío pudo haber lixiviado al DON en el grano en estos dos experimentos y resultar en la disminución de la correlación entre el nivel de enfermedad y concentración de DON.

Se conoce la gran variación de las correlaciones en localidades diferentes (Góral et al., 2018). Además, varios autores concluyen que uno de los factores más asociados con la variación en los niveles de DON es el ambiente (Culler et al., 2007; Schaafsma y Hooker, 2007; Czaban et al., 2015; Scala et al., 2016). Estos autores hallaron que el efecto ambiental (incluido en el estudio como efecto año) representó el 48 % de la variación en los niveles de DON, seguido por el efecto cultivar (27 %) (Schaafsma y Hooker, 2007; Czaban et al., 2015; Scala et al., 2016).

A su vez se observó, que las correlaciones además de ser dependientes de las condiciones ambientales, varían según el nivel de enfermedad. En el experimento con menor enfermedad (Exp. 1), la incidencia, el IFE y FDK tuvieron buena correlación con la concentración de DON, pero a medida que los niveles de FE fueron mayores, en los experimentos, las correlaciones disminuyeron.

Estos resultados concuerdan con Paul et al. (2005), que concluyen que hasta un 53 % de la variación en el contenido de DON puede explicarse por la variación en la intensidad de la enfermedad. A su vez, Lemmens et al., (2004) observaron que las correlaciones más altas ($R= 0,73-0,89$) fueron en ambientes con niveles de infección media a moderada, disminuyendo a niveles de infección más altos por la aparición de espigas prematuras.

Por el contrario, Mourellos (2015), determinó que la mayor parte de la variabilidad de la concentración de DON estuvo explicada por la severidad de FE en el campo en el año con mayor intensidad de FE. Esto es explicado debido a que en el experimento que se halló la regresión más débil, hubo aislados que provocaron un bajo porcentaje de infección en las espigas, pero fueron capaces de producir niveles altos de DON. Koch et al., (2006) obtuvieron resultados similares a los anteriores.

Se observó mayor correlación entre IFE y DON en los cultivares con mayor resistencia a FE en los Exp. 1 y 2. Por el contrario en el Exp 3, sólo se observó correlación significativa para los cultivares altamente susceptibles. Sin dudas el tipo de resistencia juega un rol fundamental en la correlación IFE – DON, máxime cuando las evaluaciones se realizan en ensayos de campo que ponen en evaluación a todos los tipos de resistencia en forma simultánea (Góral et al., 2018).

Así, la resistencia del tipo I (resistencia a la infección), es muy eficiente frente a alta presión de inóculo, mientras que una escasa resistencia tipo II (resistencia a la colonización de los tejidos) puede provocar una infección grave a pesar de baja presión de inóculo. Por otro lado, en ambientes donde ocurra un alto lavado del grano en todos los materiales, la resistencia tipo V (resistencia a la

toxina), ya sea por detoxificación o limitación en la acumulación de la toxina, se puede ver enmascarada por la lixiviación. En este trabajo, no se tuvo acceso al tipo de resistencia de los cultivares evaluados, lo cual limita un análisis desde este enfoque.

El FDK cuantificado a pos-cosecha, fue la variable que mejor se correlacionó con las concentraciones de DON, aún en diferentes ambientes. Esta correlación, si bien es positiva y alta en los años que hay un bajo nivel de enfermedad, disminuye en años con un alto nivel de enfermedad. Esta menor correlación, podría estar explicada por las condiciones ambientales requeridas por el hongo para la infección, para la colonización o para la producción de DON. Existe un rango de aW entre 0,89 y 0,92 donde el hongo puede crecer y esporular, pero no producir DON (Lacey y Megan, 1991). Así mismo, hay temperaturas que favorecen más el crecimiento, respecto a la producción de DON y viceversa. Es decir, entre 24 a 26 °C, el crecimiento es más favorecido que la producción de toxinas. Por otro lado, temperaturas en el rango entre 10 a 24 °C, favorecen la producción de 15-ADON y por encima de 26 °C hay mayor producción de DON y 3-ADON y el crecimiento se ve disminuido (Lacey y Megan, 1991; Wegulo, 2012; Ramírez y Diana, 2019).

Las correlaciones bajas entre FDK-DON en los Exp. 2 y 3 podrían estar explicadas por el efecto de las lluvias sobre el lavado de las toxinas en el grano, como menciona Culler et al., (2007). A su vez, la temperatura podría explicar mayor crecimiento fúngico en el grano cosechado (favorecido por las temperaturas óptimas), y aun así menor concentración de DON respecto a la esperada.

El efecto de la temperatura sobre las distintas etapas de desarrollo de la FE también podría estar explicando la menor correlación de FDK con DON observada en el Exp. 3 respecto al Exp. 2. En el Exp. 3 las últimas inoculaciones ocurrieron con temperaturas más cercanas a las óptimas para el crecimiento de *Fusarium* más que a la producción de toxina.

Estos resultados permiten concluir que en condiciones que favorecen alto nivel de enfermedad resulta más complejo comprender la relación entre síntomas y concentración de DON, y que dicha asociación se fortalece con niveles medios a bajos de enfermedad.

A su vez la producción de DON es dinámica, variable a lo largo del ciclo del cultivo. Matthäus et al., (2004) y Tucker et al., (2019) detectaron concentraciones de DON más altas en las etapas tempranas del desarrollo del grano y se observó que disminuyó después de la madurez del grano. Esta disminución hacia madurez puede deberse por la desintoxicación del hospedero (Lemmens et al., 2005), por la acción de lixiviación por agua (Culler et al., 2007) y/o por la conversión a formas glucosiladas de DON (Boutigny et al., 2008; Cowger y Arellano, 2013; Lemmens et al., 2016). Sin dudas que este puede ser otro de los factores que pueden estar influyendo en la baja correlación entre la sintomatología y la concentración de DON en algunos ambientes.

En el Exp. 1, con bajo nivel promedio de FE, la caracterización sanitaria coincidió con los niveles de enfermedad que se observaron en el experimento. Para algunos cultivares, esta caracterización también presentó una buena asociación con la concentración de DON a cosecha, mientras que también se observaron cultivares que con una IFE mayor a 5 %, presentaron niveles de DON menores a 1 ppm. A su vez, con niveles intermedios o altos de FE (Exp 2 y 3), la caracterización sanitaria no estuvo asociada a la concentración de DON a cosecha.

Estos resultados permiten concluir que a mayor presión de FE, disminuye la segregación entre los cultivares, lo cual toma gran relevancia al momento de enfatizar en el manejo integrado de la enfermedad. Por otro lado, la presencia de cultivares altamente susceptibles que mostraron niveles de IFE cercanos a cero, puede estar indicando la ocurrencia de escape, probablemente por fallas en la inoculación de esos cultivares, o desfase entre la inoculación y el ambiente favorable a la infección.

Un punto interesante del presente estudio es que hubo casos con porcentajes relativamente bajos de IFE que arrojaron niveles relativamente altos de DON, como también ha sido mencionado en otros estudios (Martínez et al., 2014). Del Ponte et al. (2007), explicaron este fenómeno en que *Fusarium* es un patógeno que puede infectar la espiga desde floración hasta grano pastoso duro, y el realizar la evaluación del síntoma en Z83, indica que el IFE estimado podría no estar contemplando infecciones tardías que podrían estar en etapa de incubación o incluso podrían ocurrir luego de la evaluación. Estas infecciones tardías si bien pueden ser subestimadas por el IFE, pueden ser cuantificadas por el FDK, dado que este último se realiza pos-cosecha, y en laboratorio en base a presencia del signo y no del síntoma.

Además, se debe considerar también que DON puede formarse en ausencia de síntomas de la enfermedad (Lacey et al., 1999). Por otro lado, la presencia del patógeno en el raquis de espigas asintomáticas podría explicar el hecho de que, incluso en muestras donde la expresión de síntomas de la FE resultó en valores de severidad extremadamente bajos, los niveles de DON detectados en los granos cosechados resultaron considerables e incluso superiores a los tolerados en los estándares de comercialización. Aún cepas con limitada capacidad de inducción de síntomas visibles de FE, serían capaces de colonizar los tejidos vasculares de la espiga y producir cantidades detectables de DON (Malbrán y Lori, 2013).

La ocurrencia de alto IFE y bajos niveles de DON, puede deberse a una sobre-estimación del IFE al momento de la cuantificación, a lixiviación de la toxina en el grano, a detoxificación de la toxina por parte del hospedero y/o a que las condiciones óptimas de crecimiento no son las mismas que para la producción de toxinas (Lemmens et al., 2005; Culler et al., 2007; Marín, 2010; Gautam y Dill-Macky, 2012). También puede explicarse como indican Malbrán y Lori (2013), por el bloqueo de haces vasculares a nivel del raquis, que causa un desecamiento prematuro de la parte distal de la espiga y resulta en la sobrestimación de la infección. Es decir, se pueden observar estructuras secas (debido a obstrucción del pasaje de fotosintatos y agua), y que dichas estructuras no hayan sido colonizadas por el hongo. La compleja interacción entre diversos factores explican la diversidad

de resultados probables de la interacción planta:patógeno. En este sentido Brunner et al., (2009) concluye que los granos asintomáticos pueden contener cantidades significativas de DON, mientras que los granos sintomáticos dentro de la misma muestra, pueden estar casi libres de toxinas, lo que genera bajas correlaciones entre los parámetros.

Además, otro factor que puede estar afectado los resultados es el método ELISA. Este método es dependiente de la matriz y esto puede generar sobreestimación y reactividad cruzada de anticuerpos con DON-3-Glucósido (DON-3-Glc) y formas acetiladas del DON (A-DON) como indican Umpiérrez-Failache et al., (2013), por lo que esto puede también estar afectando las correlaciones en su conjunto.

Los resultados obtenidos confirman la complejidad de caracterizar los cultivares por potencial acumulación de DON en grano. El nivel final de DON en el grano, como se expuso en líneas anteriores, es producto de una fuerte interacción entre la resistencia del cultivar, la presión de la enfermedad, y las condiciones ambientales post-infección. Sin dudas una aproximación a este tipo de caracterización requiere la realización de un alto número de experimentos, en ambientes diferentes que permitan identificar cierta “estabilidad” en los comportamientos de los cultivares.

2.7 CONCLUSIONES

Las correlaciones entre el nivel de enfermedad y la concentración de DON dependieron del ambiente. En ambientes favorables a altos niveles de FE, la correlación entre ambas variables fue menor respecto a ambientes con niveles menores de FE. El FDK fue la variable que más se correlacionó con la concentración de DON, pero igualmente la correlación entre estas dos variables fue menor cuando el ambiente fue muy favorable para la enfermedad. Sin embargo, estos resultados indicarían que FDK es un mejor estimador de los probables niveles de DON en grano, que el IFE.

Se concluye, a su vez, que el IFE puede sobreestimar o subestimar la infección real, y que la correlación IFE-DON aumentó en condiciones de menor presión de enfermedad ($p=0,74$), llegando a correlaciones no significativas en ambientes con niveles altos de FE.

Por otro lado, en Uruguay, el grupo de caracterización sanitaria actual, permite predecir el comportamiento varietal respecto al IFE, pero no necesariamente a la concentración de DON en años muy favorables para la FE. Todos estos factores limitan la caracterización de cultivares respecto a su comportamiento frente a la acumulación de DON, ya que se requiere más cantidad de experimentos en diversos ambientes, que permitan estimar la estabilidad de los distintos cultivares respecto a esta variable.

2.8. BIBLIOGRAFÍA

- Aoki, T., Ward, T. J., Kistler, H. C., O'donnell, K. (2012). Systematics, phylogeny and trichothecene mycotoxin potential of *Fusarium* head blight cereal pathogens. *Japanese Society of Mycotoxicology Mycotoxins*, 62(2), 91-102.
- Argyris, J., Van Sanford, D., TeKrony, D. (2003). *Fusarium graminearum* infection during wheat seed development and its effect on seed quality. *Crop Science*, 43(5), 1782-1788.
- Arrúa, A. A., Moura, J., Casal, C., Dujak, C. E., Fernandez, D., Oviedo, R. M., Mohan, M. (2014). Incidencia de hongos del complejo *Fusarium graminearum* y acumulación de deoxinivalenol en líneas de trigo. *Investigación Agraria*, 16(1), 43-48.
- Boutigny, A. L., Richard-Forget, F., Barreau, C. (2008). Natural mechanisms for cereal resistance to the accumulation of *Fusarium* trichothecenes. *European Journal of Plant Pathology*, 121(4), 411-423.

- Brunner, K., Paris, M. P. K., Paolino, G., Bürstmayr, H., Lemmens, M., Berthiller, F., Mach, R. L. (2009). A reference-gene-based quantitative PCR method as a tool to determine *Fusarium* resistance in wheat. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 395(5), 1385-1394.
- Castro, M., Germán, S., Pereyra, S. (2020). *Caracterización sanitaria de cultivares de trigo y cebada*. INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria), Uruguay. Obtenido el 15 junio de 2020 de <http://inia.uy/estaciones-experimentales/direcciones-regionales/inia-la-estanzuela/caracterizaci%C3%B3n-sanitaria-de-cultivares-de-trigo-y-cebada>
- Cowger, C., Arellano, C. (2013). *Fusarium graminearum* infection and deoxynivalenol concentrations during development of wheat spikes. *Phytopathology*, 103(5), 460-471.
- Culler, M. D., Miller-Garvin, J. E., Dill-Macky, R. (2007). Effect of extended irrigation and host resistance on deoxynivalenol accumulation in *Fusarium*-infected wheat. *Plant Disease*, 91(11), 1464-1472.
- Czaban, J., Wróblewska, B., Sułek, A., Mikos, M., Boguszevska, E., Podolska, G., Nieróbca, A. (2015). Colonisation of winter wheat grain by *Fusarium* spp. and mycotoxin content as dependent on a wheat variety, crop rotation, a crop management system and weather conditions. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(6), 874-910.
- Del Ponte, E. M., Fernandes, J. M. C., Bergstrom, G. C. (2007). Influence of growth stage on *Fusarium* head blight and deoxynivalenol production in wheat. *Journal of Phytopathology*, 155(10), 577-581.
- Desjardins, A. (1992). Genetic approaches to the chemical ecology of phytopathogenic *Fusarium* species. En: Bhatnagar, D., Lillehoj, E. B., Arora, D. K. (Eds.), *Handbook of Applied Mycology*. (Págs. 333–357). New York: Marcel Dekker.

- Desjardins, A. E. (2008). Natural product chemistry meets genetics: when is a genotype a chemotype?. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 7587-7592.
- Dill-Macky, R. (2003). Inoculation Methods and Evaluation of Fusarium Head Blight Resistance in Wheat. En: Leonard, K. J., Bushnell, W. R. (Eds.), *Fusarium Head Blight in Wheat and Barley*. (Págs. 184-210). APS Press.
- Dweba, C. C., Figlan, S., Shimelis, H. A., Motaung, T. E., Sydenham, S., Mwadzingeni, L., Tsilo, T. J. (2017). Fusarium head blight of wheat: Pathogenesis and control strategies. *Crop Protection*, 91(sn), 114-122.
- Edwards, S. G., Pirgozliev, S. R., Hare, M. C., Jenkinson, P. (2001). Quantification of trichothecene-producing *Fusarium* species in harvested grain by competitive PCR to determine efficacies of fungicides against Fusarium head blight of winter wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1575-1580.
- ELIKA (Fundación Vasca para la seguridad alimentaria). (2013). *Deoxinivalenol*. Obtenido el 19 de febrero de 2021 de <https://seguridadalimentaria.elika.eus/deoxinivalenol/>
- FAO (Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura). (1996). Rome Declaration on World Food Security and World Food Summit Plan of Action. Roma: World Food Summit. Obtenido el 19 de febrero de 2021 de <http://www.fao.org/3/w3548e/w3548e00.htm>
- FAO (Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura). (2018). En: Residuos de plaguicidas en alimentos y piensos. Obtenido el 28 de julio de 2020 de <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/maximum-residue-limits/es/>.
- Gardiner, D. M., Osborne, S., Kazan, K., Manners, J. M. (2009). Low pH regulates the production of deoxynivalenol by *Fusarium graminearum*. *Microbiology*, 155(9), 3149-3156.

- Gautam, P., Dill-Macky, R. (2012). *Fusarium* head blight development and trichothecene accumulation in point inoculated *Fusarium* infected wheat heads. *World Mycotoxin Journal*, 5(1), 45-55.
- Góral, T., Wiśniewska, H., Ochodzki, P., Nielsen, L. K., Walentyn-Góral, D., Stępień, Ł. (2018). Relationship between *Fusarium* head blight, kernel damage, concentration of *Fusarium* biomass, and *Fusarium* toxins in grain of winter wheat inoculated with *Fusarium culmorum*. *Toxins*, 11(1), 2
- Hernandez Nopsa, J. F., Baenziger, P. S., Eskridge, K. M., Peiris, K. H., Dowell, F. E., Harris, S. D., Wegulo, S. N. (2012). Differential accumulation of deoxynivalenol in two winter wheat cultivars varying in FHB phenotype response under field conditions. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 34(3), 380-389.
- 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(6), 611-619.
- IMPO (2001). Normativa y avisos legales del Uruguay. Registro Nacional de Leyes y Decretos: Tomo 2 Semestre: 2 Año: 2001 Página: 1869. Decreto N° 533/001. Obtenido el 28 de julio de 2020 de <https://www.impo.com.uy/bases/decretos/533-2001/4>.
- ISTA (International rules for seed testing). (2021). Validated Seed Health Testing Methods. Detection of *Verticillium dahliae* in *Spinacia oleracea* (spinach) seed. Bassersdorf. [Archivo PDF]. Consultado el 22 de agosto de 2021. https://www.seedtest.org/upload/cms/user/ISTA_SHMethods_2021_7-032_final.pdf
- Jansen, C., Von Wettstein, D., Schäfer, W., Kogel, K. H., Felk, A., Maier, F. J. (2005). Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(46), 16892-16897.

- Knutsen, H.K., Alexander, J., Barregård, L., Bignami, M., Brüschweiler, B., Edler, L. (2017). Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed. *EFSA journal*, 15(9), 1-345.
- Koch, H. J., Pringas, C., Maerlaender, B. (2006). Evaluation of environmental and management effects on Fusarium head blight infection and deoxynivalenol concentration in the grain of winter wheat. *European Journal of Agronomy*, 24(4), 357-366.
- Lacey, J., Megan, N. (1991). Fungi in cereal grains: their occurrence and water and temperature relationships. En: Chelkowski, J. (Ed). *Cereal grain. Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage*. (pp. 77-118). Elsevier.
- Lacey, J., Bateman, G.L., Mirocha, C.J. (1999). Effects of infection time and moisture on development of ear blight and deoxynivalenol production by *Fusarium spp.* in wheat. *Annals of Applied Biology*, 134(3), 277-283.
- Lemmens, M., Buerstmayr, H., Krska, R., Schuhmacher, R., Grausgruber, H., Ruckebauer, P. (2004). The effect of inoculation treatment and long-term application of moisture on Fusarium head blight symptoms and deoxynivalenol contamination in wheat grains. *European Journal of Plant Pathology*, 110(3), 299-308.
- Lemmens, M., Scholz, U., Berthiller, F., Dall'Asta, C., Koutnik, A., Schuhmacher, R., Ruckebauer, P. (2005). The ability to detoxify the mycotoxin deoxynivalenol colocalizes with a major quantitative trait locus for Fusarium head blight resistance in wheat. *Molecular plant-microbe interactions*, 18(12), 1318-1324.
- Lemmens, M., Steiner, B., Sulyok, M., Nicholson, P., Mesterhazy, A., Buerstmayr, H. (2016). Masked mycotoxins: does breeding for enhanced Fusarium head blight resistance result in more deoxynivalenol-3-glucoside in new wheat varieties?. *World Mycotoxin Journal*, 9(5), 741-754.

- Malbrán, I., Lori, G. (2013). Agresividad, producción de micotoxinas y diversidad en las poblaciones de *Fusarium graminearum* de la región triguera argentina. [Tesis de Doctorado, Universidad de Buenos Aires]. Consultado el 10 de agosto de 2020. <http://ri.agro.uba.ar/files/download/tesis/doctorado/2013malbranisrael.pdf>
- Maresca, M. (2013). From the gut to the brain: Journey and pathophysiological effects of the food-associated trichothecene mycotoxin deoxynivalenol. *Toxins*, 5(4), 784-820.
- Marín, P. (2010). Análisis de factores ecofisiológicos que influyen en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de toxinas en especies de "*Fusarium*". [Tesis de Doctorado, Universidad Complutense de Madrid]. Consultado el 15 de julio de 2020. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/11150/1/T32054.pdf>
- Martinez, 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(1), 41-44.
- Matthäus, K., Dänicke, S., Vahjen, W., Simon, O., Wang, J., Valenta, H., Flachowsky, G. (2004). Progression of mycotoxin and nutrient concentrations in wheat after inoculation with *Fusarium culmorum*. *Archives of Animal Nutrition*, 58(1), 19-35.
- Mazzilli, S.; Pérez, C.; Ernst, O. (2011). Una alternativa para optimizar el uso de fungicidas para controlar fusariosis de espiga en trigo. *Agrociencia Uruguay*, 15(2), 60-68. 48.
- Mesterházy, A. (1989). Progress in breeding of wheat and com genotypes not susceptible to infection by Fusaria. En: Chelkowski, J. (Ed.). *Fusarium: Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*. (pp. 357-386). Elsevier.
- Mesterházy, A. (1995). Types and components of resistance against *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Breed*, 114(5), 377-386.

- Mesterházy, A. (1997a). Methodology of resistance testing and breeding against Fusarium head blight in wheat and results of the selection. *Cereal Research Communications*, 25(3), 631-637.
- Mesterházy, A. (1997b). Breeding for resistance to Fusarium head blight of wheat. En: Dubin, H. J., Gilchrist, L., Reeves, J., McNab, A. (Eds.), *Fusarium Head Scab: Global Status and Future Prospects*. (Págs. 79-85). CIMMYT.
- Miller, J. D., Young, J. C., Sampson, D. R. (1985). Deoxynivalenol and Fusarium head blight resistance in spring cereals. *Journal of Phytopathology*, 113(4), 359-367.
- 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(3), 211-218.
- Moss, M. O., Thrane, U. (2004). *Fusarium* taxonomy with relation to trichothecene formation. *Toxicology Letters*, 153(1), 23-28.
- Mourellos, C A. (2015). Fusariosis de la espiga del trigo: dinámica del inóculo de *Fusarium graminearum* ante un manejo sustentable. [Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de Quilmes]. Consultado el 10 de abril de 2019. https://ridaa.unq.edu.ar/bitstream/handle/20.500.11807/579/TD_2015_mourellos_007.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Osman, M., He, X., Singh, R. P., Duveiller, E., Lillemo, M., Pereyra, S. A., Singh PK. (2015). Phenotypic and genotypic characterization of CIMMYT's 15th international Fusarium head blight screening nursery of wheat. *Euphytica*, 205(2), 521-537.
- Paul, P. A., Lipps, P. E., Madden, L.V. (2005). Relationship between visual estimates of Fusarium head blight intensity and deoxynivalenol accumulation in harvested wheat grain: A meta-analysis. *Phytopathology*, 95(10), 1225-1236.

- Pereyra, S., Dill-Macky, R. (2010). *Fusarium* species recovered from wheat and barley grains in Uruguay, pathogenicity and deoxynivalenol content. *Agrociencia Uruguay*, 14(2), 33-44.
- Proctor, R. H. (2000). *Fusarium* toxins: trichothecenes and fumonisins. *Microbial-foodborne-diseases: mechanisms-of-pathogenesis-and-toxin-synthesis*, 363-381.
- Ramírez, A., Diana, L. (2019). Influencia de las condiciones ambientales sobre el perfil de tricotecenos producido por cepas de *Fusarium graminearum* con distintos quimiotipos. [Tesis de Doctorado, Universidad de Buenos Aires]. Consultado el 25 de julio de 2020. https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/84017/CONICET_Digital_Nro.060707e7-4f67-4626-a217-7a8fdd7992c5_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y
- Salgado, J. D., Madden, L.V., Paul, P.A. (2015). Quantifying the effects of *Fusarium* head blight on grain yield and test weight in soft red winter wheat. *Phytopathology*, 105(3), 295-306.
- SAS® On Demand for Academics. (2018). Cary: SAS Institute Inc. Cary: SAS Institute Inc.
- Scala, V., Aureli, G., Cesarano, G., Incerti, G., Fanelli, C., Scala, F., Bonanomi, G. (2016). Climate, soil management, and cultivar affect *Fusarium* head blight incidence and deoxynivalenol accumulation in durum wheat of Southern Italy. *Frontiers in Microbiology*, 7(sn), 1-1014.
- 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(1-2), 116-125.
- Schroeder, H. W., Christensen, J.J. (1963). Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*. *Phytopathology*, 53(7), 831-838.

- Sosa, D., Escobar, A., Faure, R. (2017). Deoxinivalenol: métodos de análisis de residualidad en cereales. Toxicidad en animales de granjas. *Revista de Salud Animal*, 39(2), 1-16.
- Tucker, J. R., Badea, A., Blagden, R., Pleskach, K., Tittlemier, S. A, Fernando, W. G. (2019). Deoxynivalenol-3-glucoside content is highly associated with deoxynivalenol levels in two-row barley genotypes of importance to Canadian barley breeding programs. *Toxins*, 11(6), 1-319.
- Umpiérrez-Failache, M., Garmendia, G., Pereyra, S., Rodríguez-Haralambides, A., Ward, T. J., Vero, S. (2013). Regional differences in species composition and toxigenic potential among *Fusarium* head blight isolates from Uruguay indicate a risk of nivalenol contamination in new wheat production areas. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), 135-140.
- Valverde-Bogantes, E. (2017). Species and Trichothecene Genotypes of *Fusarium* Head Blight Pathogens in Nebraska, USA in 2015-2016. [Tesis de maestría, University of Nebraska-Lincoln]. Consultado el 13 de febrero de 2020. <https://digitalcommons.unl.edu/foodscidiss/80/>
- Velázquez, P. D., Formento, A.N. (3-5 de octubre de 2012). Efecto de la fusariosis de la espiga (*Fusarium graminearum* y *Fusarium spp.*) sobre dos genotipos de trigo. Trabajo F-63. Presentado en: XIV Jornadas Fitosanitarias Argentinas, Potrero de Los Funes, San Luis, Argentina.
- Wang, Y. Z., Miller, J. D. (1988). Screening techniques and sources of resistance to *Fusarium* head blight. En: Klatt, A. R. (Ed.). *Wheat Production Constraints in Tropical Environments*. (pp. 239-250). CIMMYT.
- Wegulo, S. N. (2012). Factors influencing deoxynivalenol accumulation in small grain cereals. *Toxins*, 4(11), 1157-1180.

2.9 ANEXO

Fig. 1. Caracterización de los cultivares evaluados frente a fusariosis de la espiga según Castro et al., (2020).

Experimento 2017		Experimentos 2018	
Cultivar	Caracterización	Cultivar	Caracterización
1	-	1	5
2	-	2	5
3	9	3	8
4	5	16	5
5	8	17	8
6	8	18	4
7	6	19	5
8	8	20	5
9	5	21	5
10	0	22	5
11	9	27	5
12	4	28	3
13	3	29	6
14	5	32	0
15	5	33	6
16	5	34	2
17	5	35	3
18	0	36	5
19	9	37	5
20	9	38	4
21	9	39	8
22	5	40	9
23	6	41	9
24	0	42	6

Experimento 2017		Experimentos 2018	
Cultivar	Caracterización	Cultivar	Caracterización
25	0	43	9
26	5	44	5
27	8	47	0
28	5	48	0
29	5	49	8
30	4	51	0
31	8	52	0
32	0	56	5
33	3	57	8
34	2	58	9
35	0	61	9
36	6	62	4
37	9	63	8
38	0	64	5
39	2	65	4
40	4	66	5
41	5	67	0
42	4	68	8
43	4	69	6
44	8	70	4
45	6		

Referencias: Nivel de susceptibilidad: 1: B B-BI; 2: BI BI-IB; 3: IB-BI IB; 4: IB-I I-IB; 5: I I-IA; 6: IA-I IA; 7: IA-AI AI-IA; 8: AI AI-A; 9: A-AI A. Nivel de susceptibilidad B: bajo; I: intermedio; A: alto.

3. COMPARACIÓN DE DISTINTOS MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE LA FUSARIOSIS DE LA ESPIGA DE TRIGO A CAMPO Y POSTCOSECHA Y EL CONTENIDO DE DEOXINIVALENOL EN GRANO

Carolina Francia¹, Silvia Pereyra², Noelia Benítez³, Carlos Pérez⁴

¹ Ing. Agr., Ayudante de investigación fitopatología, Depto. Protección Vegetal, Fagro, EEMAC.
carofranciabent@gmail.com

² Ing. Agr. MSc., PhD., Investigadora Principal Referente, Programa Nacional de Cultivos. La Estanduela. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. spereyra@inia.org.uy

³ Ayudante de investigación fitopatología, Depto. Protección Vegetal, Fagro, EEMAC.
nbg_90@hotmail.com

⁴ Ing. Agr. MSc., PhD., Profesor Agregado, Fitopatología, Depto. Protección Vegetal, Fagro, EEMAC.
caperez@fagro.edu.uy

3.1 RESUMEN

La fusariosis de la espiga (FE) es una enfermedad que afecta la producción de trigo y es considerada una de las enfermedades más devastadoras de este cultivo. En Uruguay, el complejo de especies predominante asociada a FE en trigo es *Fusarium graminearum*, productora de deoxinivalenol (DON) y 15-ADON. Hay varios métodos de cuantificación de FE y de DON y estudio de las correlaciones entre métodos permitiría un mayor entendimiento de la compleja relación que existe entre la cuantificación de sintomatología de FE y DON. Por lo tanto este estudio tuvo como objetivo determinar la correlación entre distintos métodos de cuantificación de la FE y de la acumulación de DON en grano. El estudio se realizó en base a 30 muestras de trigo cosechado en el 2018. De estas muestras se evaluaron tres métodos de cuantificación de la enfermedad: i) evaluación visual de espigas y espiguillas enfermas ii) porcentaje de granos con *Fusarium* (FDK) evaluado mediante el método Canadian Grain Commission (CGC), y iii) FDK evaluado mediante el método blotter test. La concentración de DON se evaluó por el método AgraQuant®ELISA DON (RomerLabs) (aprobado por AOAC Research Institute-AOAC RI 110701) y se evaluó la correlación entre todos los métodos. Se concluye que el FDK cuantificado por blotter test y por el método CGC, lograron mayor predicción del DON de las muestras seleccionadas, y que el método CGC fue el que presentó mayor correlación con la acumulación de DON final en el grano.

Palabras clave: *Fusarium*, DON, métodos de cuantificación, correlación

3.2 SUMMARY

COMPARISON OF DIFFERENT METHODS OF QUANTIFICATION OF FUSARIUM HEAD BLIGHT ON THE FIELD AND POST-HARVEST IN WHEAT AND DEOXYNIVALENOL CONTENT IN GRAIN

Fusarium head blight (FHB) is considered one of the most devastating diseases affecting wheat production worldwide. In Uruguay, the predominant species complex associated with FHB in wheat is *Fusarium graminearum*. This species produces deoxynivalenol (DON) and 15-ADON. There are several methods for quantifying FHB and DON, and study of the correlations between methods could help to understand the relationship between symptoms of EF and DON. Therefore, this study aimed to determine the correlation between different methods for quantifying FHB and the accumulation of DON in grain. 30 wheat grain samples harvested in 2018 were selected. And three methods of disease quantification were evaluated: i) visual evaluation of disease spikes and spikelets, ii) percentage of grains with *Fusarium* (FDK) evaluated by the Canadian Grain Commission (CGC) method, and iii) FDK evaluated by the blotter test method. DON concentration was evaluated by the AgraQuant®ELISA DON method (RomerLabs) (approved by AOAC Research Institute-AOAC RI 110701) and the correlation among all methods was evaluated. Based on our results, FDK quantified by blotter test and by the CGC method, give a better understanding of the variation observed in the correlations between FHBI and DON, and CGC method was the one with the highest correlation with the accumulation of final DON in the grain.

Keywords: *Fusarium*, DON, quantification methods, correlation

3.3 INTRODUCCIÓN

La fusariosis de la espiga (FE) es una enfermedad que afecta la producción de trigo y es considerada una de las enfermedades más devastadoras a nivel mundial, regional y local (Parry et al., 1995; Windels, 2000; Dean et al., 2012; Dweba et al., 2017). Esta enfermedad produce pérdidas de rendimiento y disminución de la calidad del grano (McMullen y Stack, 1994; Salgado et al., 2015), pudiendo comprometer su inocuidad, debido a la producción de micotoxinas (Pan et al., 2013; Valverde-Bogantes, 2017).

La FE puede estar causada por una o más especies del género *Fusarium*. En Uruguay, el complejo de especies predominante asociado a FE en trigo es *Fusarium graminearum* (Pereyra y Dill-Macky, 2010; Umpiérrez-Failache et al., 2013), siendo el quimiotipo dominante el 15acetildeoxinivalenol (15-ADON) (Aoki et al., 2012; Umpiérrez-Failache et al., 2013), con capacidad de producir deoxinivalenol (DON) y 15-ADON (Moss y Thrane, 2004; Pereyra y Dill-Macky, 2010; Umpiérrez-Failache et al., 2013).

La micotoxina DON pertenece al grupo de tricotecenos tipo B (Sosa et al., 2017). Si bien no es de los tricotecenos más tóxicos, inhibe la síntesis de proteínas, y es el más comúnmente detectado en trigo (Wegulo, 2012; Maresca, 2013; Pan et al., 2013; Martinez et al., 2014). Además, al ser una micotoxina termoestable (hasta 180°C) se mantiene estable durante el procesamiento de los alimentos (ELIKA, 2013).

La Comisión Codex Alimentarius (FAO, 2018), estableció por decreto un límite máximo de 2 mg de DON/kg de grano en cereales (trigo, maíz y cebada) destinados a la elaboración posterior de alimentos para consumo humano. A su vez, en Uruguay por decreto (533/01; IMPO, 2001) se estableció un máximo permitido de 1 mg de DON/kg (1 ppm) en harina de trigo, subproductos y productos elaborados de trigo para consumo humano.

Hay varios métodos de cuantificación de FE a nivel de campo y pos-cosecha, sin embargo, hay escasos trabajos que hayan estudiado la correlación entre algunas de estas técnicas. Los métodos de cuantificación de FE más comunes incluyen: i) la evaluación visual de espigas con síntomas de fusariosis en el total de espigas (incidencia) que puede ser expresada en porcentaje o ser cuantificada mediante escalas, ii) la evaluación visual de espiguillas con síntomas de fusariosis en relación al total de espiguillas de la espiga en pos-antesis (severidad), que al igual que el anterior puede ser expresada en porcentaje o mediante la utilización de escalas. Los métodos anteriores tienen la ventaja de ser métodos sencillos y rápidos; y pueden realizarse directamente en el material fresco o a partir de las espigas congeladas (Edwards et al., 2001; Dill-Macky, 2003).

Otro método incluye iii) el conteo de daño por *Fusarium* o granos infectados a cosecha (Edwards et al., 2001; Dill-Macky, 2003). Estos métodos si bien son sencillos, insumen tiempo de análisis relativamente prolongado y requieren esperar hasta que el cultivo esté cosechado (Umpiérrez-Failache, 2013).

Para la cuantificación de daño por *Fusarium* o granos infectados a cosecha se pueden describir el método Canadian Grain Commission (CGC), donde mediante una lupa se pueden cuantificar los granos dañados, mediante la observación del crecimiento micelial alrededor del germen y en la hendidura del grano. La semilla se ve arrugada y de color blanco tiza o con una cierta decoloración rosada (CGC, 2019). El resultado se puede expresar en porcentaje de peso de granos enfermos/peso de granos totales evaluados o en porcentaje mediante el número de granos enfermos/número total de granos evaluados (Dill-Macky, 2003). Por otro lado hay un método de evaluación que se realiza mediante una separación de grano por flotación en una solución salina de sacarosa, pero no es muy utilizado porque es una técnica muy laboriosa (Dill-Macky, 2003).

Por otro lado, para hongos patógenos transmitidos por semillas, la prueba del papel secante o blotter test es uno de los métodos más utilizados (Limonard, 1966;

Misra et al., 1994), siendo recomendada para detectar *F. graminearum* en trigo (Celano et al., 2012). En este método, las semillas se incuban durante un cierto período de tiempo sobre papel secante y las semillas se examinan individualmente por la presencia de estructuras típicas de los patógenos utilizando un microscopio (Dill-Macky, 2003; MAPA, 2009).

Algunas ventajas de esta técnica son, que permite la detección de varios hongos al mismo tiempo, la facilidad de instalación del ensayo de evaluación, y su bajo costo (Pires et al., 2017). Por otro lado, algunos autores reconocen la desventaja de que, aunque se realice desinfección superficial del grano, la presencia de algunos hongos puede enmascarar la presencia de otros (Scandiani y Carmona, 2009). Por otro lado, comparado con métodos que incluyen medios agarizados, el blotter test detecta menor cantidad de géneros de hongos (Noelting et al., 2004). Como última desventaja se remarca que, las manifestaciones del patógeno están influenciados por las condiciones ambientales durante la incubación. Además de estos factores ambientales, la manifestación del patógeno puede ser afectada por la "resistencia" física que ofrecen los tejidos de la semilla (Limonard, 1966).

Existen otras técnicas más costosas como el análisis de ergosterol que se pueden utilizar para determinar la biomasa fúngica en los tejidos vegetales (Edwards et al., 2001; Dill-Macky, 2003), el análisis por PCR en tiempo real que se puede utilizar en grano cosechado para evaluar la cantidad de ADN-Tri 5 (Schaafsma et al., 2004; Zhang et al., 2009), y técnicas no destructivas, como el análisis de imágenes en grano que puede diferenciar granos de trigo sanos y dañados con gran precisión (Schaafsma et al., 2004), o la técnica de espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRs) que cuantifica la biomasa del patógeno. Se ha visto potencial en estas técnicas de imágenes multiespectrales para análisis de calidad y sanidad en semillas (Boelt et al., 2018).

Argyris et al. (2003) encontraron una correlación de 0,67 entre granos infectados (evaluados mediante morfología de la colonia a través de la siembra de granos en un medio de PDA modificado), y el porcentaje de severidad de

FE (evaluada como espiguillas infectadas/total de espiguillas de la espiga). Por su parte, Góral et al. (2018) encontraron correlaciones significativas con coeficiente $r=0,78$, entre la evaluación visual de espigas con síntomas y el daño por *Fusarium* en granos determinado en laboratorio (este último parámetro fue determinado dividiendo la muestra en dos fracciones, número de granos con síntomas de daño por *Fusarium*/número de granos sanos).

La cuantificación de la concentración de DON se puede realizar mediante varios métodos, algunos de ellos son: i) ensayos inmunoenzimáticos ELISA, ii) inmunocromatografía, iii) inmunoensayo polarizado de fluorescencia (FPI), iv) superficie de resonancia de plasmones (SPR), v) cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) o cromatografía gaseosa (GC) con varios detectores (Krska, 2009; Stark 2010; Berthiller et al., 2013; Saccon et al., 2016; Ono et al., 2016), vi) lectores fotométricos portátiles para la lectura in situ (Krska y Molinelli, 2009; Lattanzio et al., 2009), vii) cromatografía de capa fina (TLC), viii) NIRs, ix) ensayos de flujo lateral, x) polímeros impresos molecularmente, xi) canales de membrana y xii) nariz electrónica (Schaafsma et al., 2004; Stark 2010; Saccon et al., 2016).

El método de ELISA es una de las técnicas más útiles por la rapidez, facilidad de operación, alto rendimiento y sensibilidad (Krska y Molinelli, 2007; Umpiérrez-Failache, 2013), pero debe tenerse en cuenta que es dependiente de la matriz y que puede haber sobreestimación y reactividad cruzada de anticuerpos con DON-3-Glucósido (DON-3-Glc) y formas acetiladas del DON (A-DON) (Lattanzio et al., 2009; Umpiérrez-Failache, 2013). Estas formas acetiladas, aunque difieren solo ligeramente entre sí y con el DON, en términos de estructura química, estos cambios pueden afectar en gran medida la toxicidad y la actividad de estos compuestos químicos (Kimura et al., 1998).

Este método ha demostrado sobreestimar las concentraciones de micotoxinas en comparación con los resultados generados por un método analítico más preciso como HPLC (Papadopoulou-Bouraoui et al., 2004; Zachariasova et al., 2008). Sin embargo, estudios basados en análisis de 30 muestras de trigo, han encontrado un

coeficiente de determinación entre HPLC y ELISA (Ridascreen Ltd.) de $R^2=0,76$ (Veha et al., 2008).

Por lo tanto, debido a la diversidad de métodos disponibles para la estimación de FE, este estudio tuvo como objetivo determinar la correlación entre distintos métodos de cuantificación de la FE más utilizados y estudiar su asociación con la acumulación de DON en grano medido mediante un método ELISA, ya que si bien este tiende a sobreestimar, es rápido, fácil, tiene alto rendimiento, sensibilidad y se han encontrado altas correlaciones con métodos más precisos como se mencionó anteriormente.

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en base a la selección de 30 parcelas de trigo de un ensayo conformado por dos experimentos de campo, el primero fue sembrado el 28 de mayo (ciclos largos) y el 9 de junio (ciclos intermedios), mientras que en el segundo, las parcelas fueron sembradas el 26 de junio y el 16 de julio, respectivamente. Se utilizaron 44 cultivares que se encontraban en etapas avanzadas de registro al momento de uso. Cada parcela fue, de dos surcos de 1 m de largo y 0,20 m de distancia entre surcos. Estas parcelas de trigo, fueron inoculadas artificialmente a mediados de floración con un pool de 12 aislados de *Fusarium graminearum* representativos de la región, provenientes de distintos cultivares y años, caracterizados por especie filogenética, quimiotipo y agresividad. Estas cepas se encuentran conservadas en la colección de INIA La Estanzuela, Uruguay (Códigos: 00-004, 02-020, 09-005, 11-001, 12-000, 13-009, 13-023, 14-003, 14-012, 16-000, 16-014 y 17-003), todas identificadas como *F. graminearum* sensu stricto 15ADON (Silvia Pereyra, S. Vero, generado de varios proyectos comunicación personal, 1 de julio de 2017).

Para la selección de las 30 parcelas que se utilizaron en este estudio, se analizó la relación entre el índice de fusariosis de la espiga (IFE) y la concentración de DON de las parcelas sembradas en 2018 y se agruparon en tres categorías según si

las parcelas tenían un coeficiente entre IFE-DON de $R^2 = 1$ aproximadamente o no. Las parcelas que no tenían un coeficiente cercano a 1 se las separaba según su relación entre IFE y DON.

Además, las distintas parcelas se separaron según su contenido de DON en tres categorías: menor a 2 ppm, entre 2 a 5 ppm y más de 5 ppm y según el IFE en: más de 70 %, entre 10 - 70 % y menor o igual a 10 %. Así, se obtuvieron nueve grupos de parcelas y se trabajó con tres parcelas por grupo. Además, se seleccionaron tres parcelas extras, denominadas “gemelas” (grupo verde claro) dado que presentaron mismo IFE, pero diferente concentración de DON (Fig. 1 y Cuadro 1).

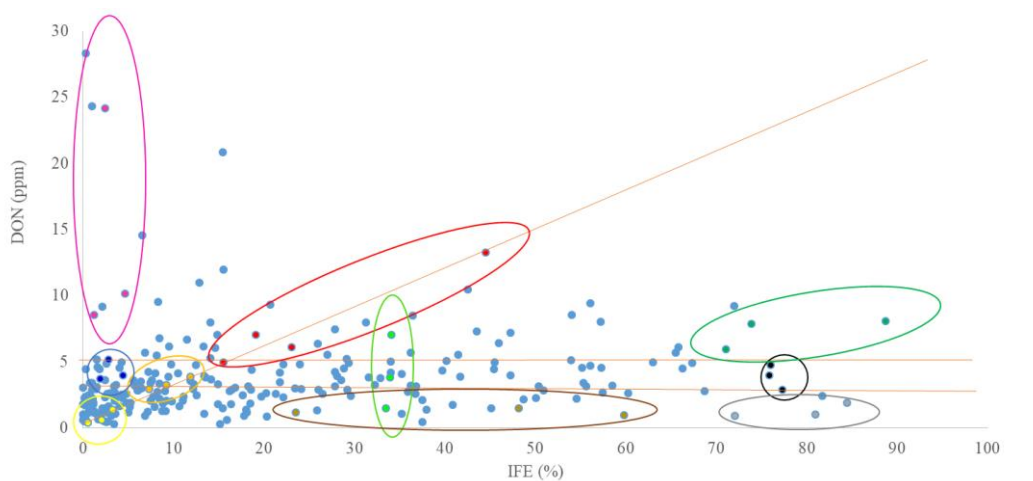


Fig. 1. Categorías realizadas en base a la regresión entre el índice de fusariosis de la espiga (IFE, %) y la concentración de deoxinivalenol (DON, ppm) en grano de trigo cosechado en 2018

Cuadro 1. Caracterización de las categorías definidas según concentración de DON (ppm), índice de fusariosis de la espiga (IFE, %) y según regresión entre estas variables

Color	Categoría	Correlación	DON (ppm)	IFE (%)
	1	Aprox. $R^2=1$	> 5	-
	2	Aprox. $R^2=1$	2 - 5	-
	3	Aprox. $R^2=1$	0 - 2	-
	4	$R^2 \neq 1$	> 5	≥ 70
	5	$R^2 \neq 1$	2 - 5	≥ 70
	6	$R^2 \neq 1$	0 - 2	20 - 60
	7	$R^2 \neq 1$	0 - 2	≥ 70
	8	$R^2 \neq 1$	> 5	≤ 10
	9	$R^2 \neq 1$	2 - 5	≤ 10
	10	Parcelas gemelas	Diferente DON	Mismo IFE

Este experimento incluyó la participación de 22 cultivares, de manera de abarcar todas las categorías de susceptibilidad a *Fusarium* según la caracterización sanitaria de Castro et al. (2020). El rango de IFE registrado en las parcelas trabajadas varió desde 0 a 89 % y el rango de concentración de DON varió desde 1 a 18 ppm.

Se evaluaron tres métodos de cuantificación de la enfermedad: i) evaluación visual de incidencia y severidad de FE ii) porcentaje de granos con *Fusarium* determinado en laboratorio por apreciación visual (CGC, 2019), y iii) porcentaje de grano con *Fusarium* mediante blotter test (ISTA, 2021).

La evaluación visual de la incidencia (porcentaje de espigas con síntomas de FE) y de la severidad (porcentaje de espiguillas con síntoma de FE en cada espiga evaluada), se realizó en todas las espigas al estado lechoso-pastoso. El índice de la fusariosis de la espiga (IFE) fue calculado como el producto de severidad*incidencia expresadas en porcentaje/100.

El porcentaje de granos con *Fusarium*, estimado según el protocolo de la Canadian Grain Commission (CGC, 2019), se realizó tomando dos muestras al azar de cada parcela. Cada muestra fue de 25 g y por observación bajo lupa de mesa (X5) se separaron los granos que presentaban micelio blanquecino a rosado en la hendidura del grano. Finalmente se pesaron los granos con presencia de *Fusarium* en cada muestra y el resultado se expresó como porcentaje en peso de granos afectados.

Para la cuantificación de granos con *Fusarium* por blotter test, se realizó desinfección superficial de los granos con hipoclorito de sodio al 1 % durante 15 s, seguido de alcohol a 70 ° por 15 s, luego se realizaron dos enjuagues en agua destilada estéril durante 30 s cada uno. Posteriormente, se colocaron los granos sobre papel absorbente y se dejaron secar hasta que la evaporación del agua libre en la superficie del grano. Luego se colocaron de forma uniforme en una caja de Petri con algodón y papel humedecido con agua destilada estéril (ISTA, 2021).

La unidad experimental fue de una placa de Petri de 90 mm de diámetro con 50 granos, con cuatro repeticiones, totalizando 200 granos por muestra. Las placas fueron posteriormente incubadas a 25 °C por 24 h para luego ser congeladas a -20°C por 12 h, para de ese modo matar el embrión de la semilla, y que el brotado no interfiera en la cuantificación del hongo. Posteriormente, se volvieron a colocar las placas en la incubadora hasta completar siete días de incubación total. La cuantificación del porcentaje de granos con *Fusarium* se realizó mediante morfología de las esporas observada en cada grano (ISTA, 2021). Durante todo este proceso, se evaluaron granos de una muestra "testigo" en todas las tandas como referente para la comparación entre las distintas tandas de semillas evaluadas.

La concentración de DON se evaluó en base al método AgraQuant®ELISA DON (RomerLabs) (aprobado por AOAC Research Institute-AOAC RI 110701), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. A su vez a cada determinación, se le agregaron tres muestras de referencias, con concentración de DON conocida.

Los análisis estadísticos se utilizó el paquete estadístico SAS On Demand for Academics versión 9.04 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2018). Las variables

utilizadas fueron incidencia de FE, severidad de FE, FDK-CGC, FDK-blotter y DON. El IFE se analizó como variable logarítmica y luego se realizó la destransformación hacia variable exponencial. Se estudió la correlación entre las distintas variables, utilizando la correlación de Pearson cuando ambas variables tenían distribución normal o correlación de Spearman cuando alguna variable presentaba otro tipo de distribución.

3.5 RESULTADOS

No se observó correlación entre el IFE y el porcentaje de granos con *Fusarium* cuantificados por blotter test (FDK-blotter), entre el porcentaje de incidencia y FDK-blotter, ni entre el porcentaje de severidad y FDK-blotter. Así como tampoco fueron significativas las correlaciones entre la incidencia y el porcentaje de granos con *Fusarium* cuantificados por el método CGC (FDK-CGC), el porcentaje de severidad y FDK-CGC; el IFE y concentración de DON; el porcentaje de incidencia y concentración de DON; el porcentaje de severidad y concentración de DON (Cuadro 2).

Estos resultados coinciden con el criterio de selección de las muestras, dado que las mismas fueron elegidas en su mayoría, debido a que presentaban una mala correlación con estas variables.

Cuadro 2. Coeficientes de correlación de Pearson entre incidencia (Inc., %), severidad (Sev., %) e índice de fusariosis de la espiga (IFE, %) a los 21 días pos-inoculación, porcentaje de grano con *Fusarium* (FDK) y concentración de deoxinivalenol (DON, ppm) y significancias respectivas

	IFE	Inc.	Sev.	FDK-blotter	FDK-CGC	DON
IFE	1	-	-	0,2783	0,2172	0,4447
Inc.	-	1	-	0,400	0,3037	0,3402
Sev.	-	-	1	0,2230	0,2096	0,2048
FDK-blotter	-0,2	-0,16	-0,22	1	0,0009	0,0018
FDK-CGC	-0,23	-0,19	-0,24	0,57	1	<0,0001
DON	-0,14	-0,18	-0,24	0,55	0,76	1

*de la diagonal hacia el extremo superior del cuadro se presenta la significancia de las correlaciones y de la diagonal hacia la parte inferior, los coeficientes de correlación. Valores con guión (-) corresponden a que no aportan al objetivo del experimento. Significancia con valores de p-valor < 0,05 se indican en negritas.

Las correlaciones entre DON y FDK-blotter, DON y FDK-CGC y FDK-blotter y FDK-CGC fueron correlaciones significativas. Para mayor detalle de la distribución de los datos de estas correlaciones se presenta la Fig. 2.

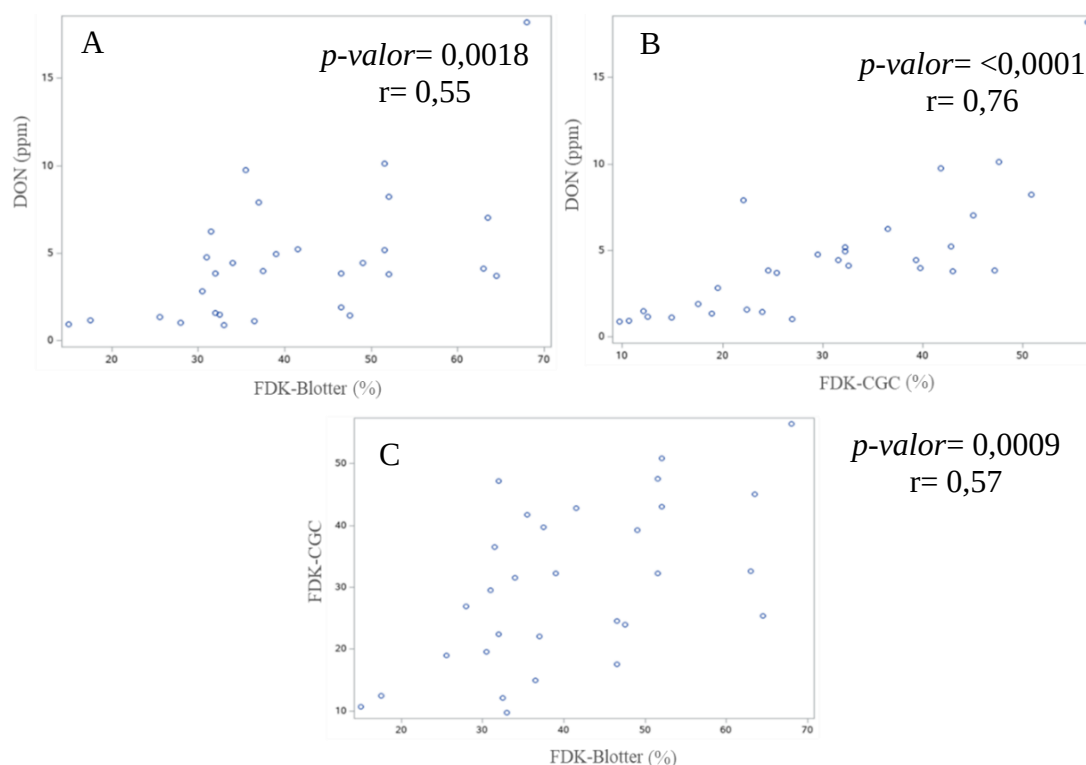


Fig. 2. A-Correlación entre el porcentaje de granos con *Fusarium* cuantificados por blotter test (FDK-blotter) y la concentración de deoxinivalenol (DON). B-

Correlación entre el porcentaje de granos con *Fusarium* cuantificados por el método Canadian grain comission (FDK-CGC) y la concentración de DON. C-Correlación entre FDK-blotter test y FDK-CGC.

Analizando las parcelas seleccionadas, se comparó su valor de IFE con los nuevos datos de FDK-CGC y de FDK-blotter, para ver si se logran explicar las relaciones entre IFE y concentración de DON. Por lo tanto, de cada muestra se analizó si el IFE reflejaba el porcentaje de granos con *Fusarium* que se cuantificaba posteriormente en el laboratorio. Los resultados reflejaron que el IFE puede subestimar como sobreestimar el porcentaje de granos con *Fusarium* que se detectó mediante los otros métodos de laboratorio a poscosecha (Fig. 3 y No. 4).

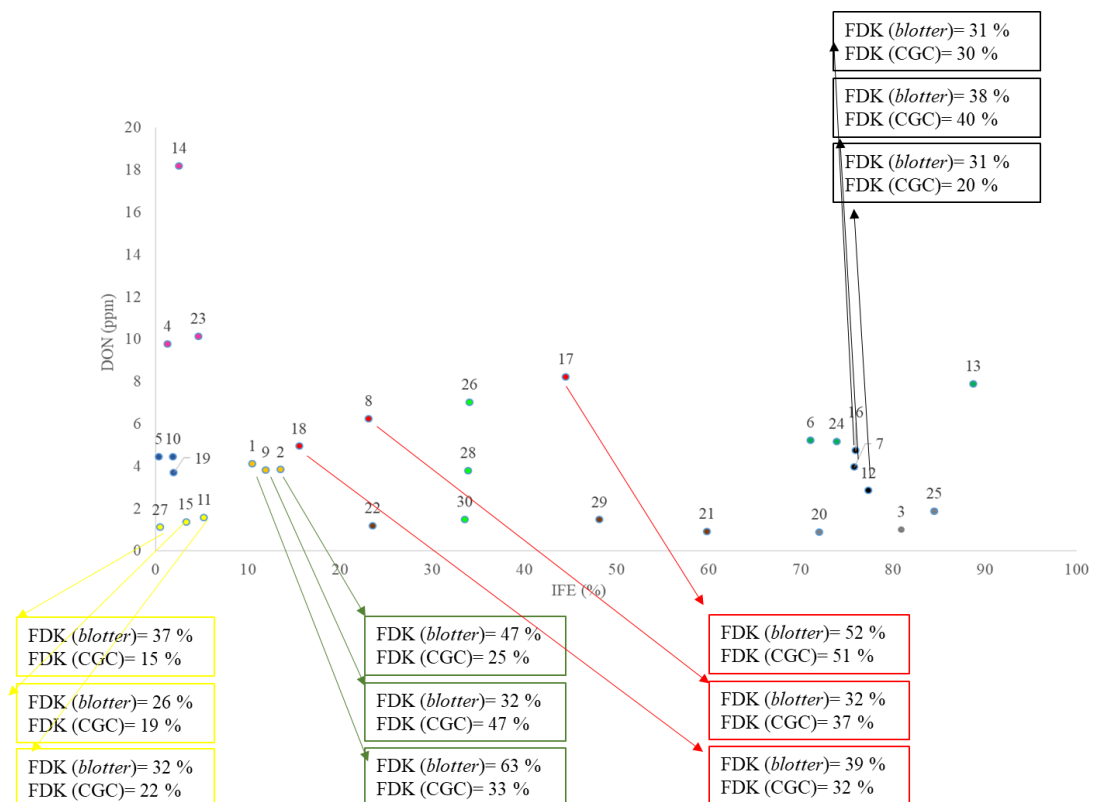


Fig. 3. Porcentaje de granos con *Fusarium* (FDK) según el método Canadian grain comission (CGC) y porcentaje de granos con *Fusarium* (FDK) según el método blotter test de las parcelas elegidas en base a la regresión IFE-DON

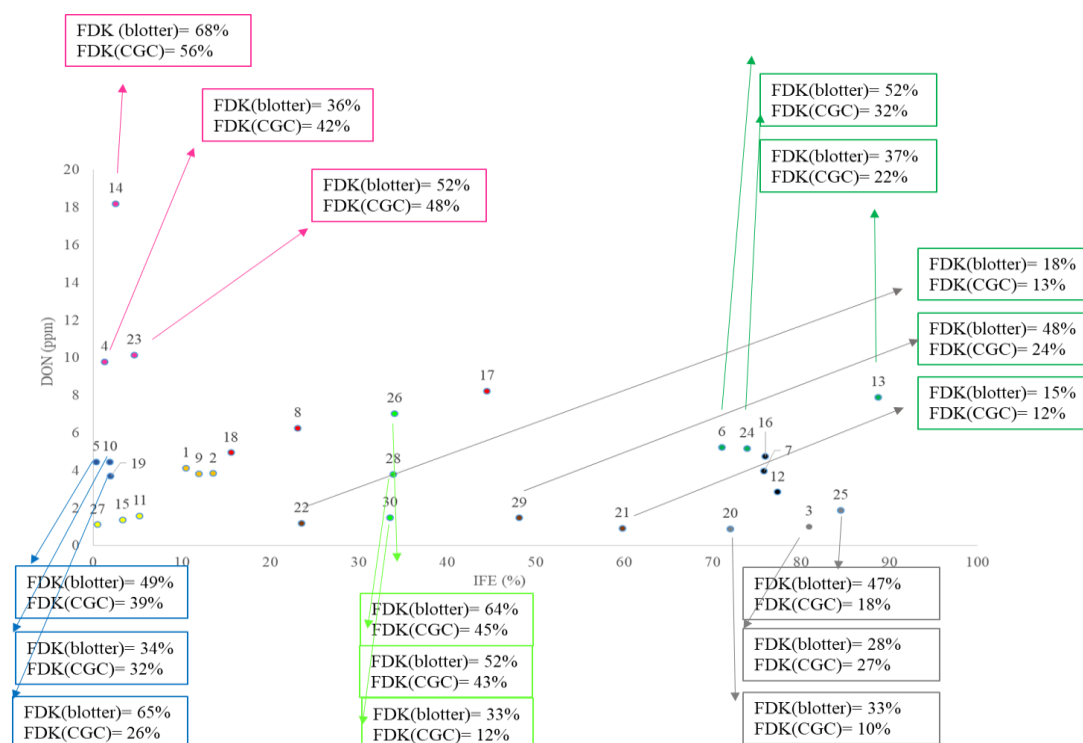


Fig. 4. Porcentaje de granos con *Fusarium* (FDK) según el método Canadian grain comission (CGC) y porcentaje de granos con *Fusarium* (FDK) según el método blotter test de las parcelas elegidas en base a la regresión IFE-DON

Se encontraron parcelas de cultivares con “alto” porcentaje de infección en grano pos-cosecha y niveles de DON menores a 2 ppm. No se observaron cultivares con “bajo” porcentaje de infección en grano pos-cosecha y niveles de DON mayores a 2 ppm.

3.6 DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos, el IFE puede resultar en una sobreestimación de la infección. Esto puede deberse a la dificultad de distinguir la madurez del cultivo del síntoma de la enfermedad, y por otro lado a los efectos de la infección por *Fusarium* sobre la fisiología de la espiga. *Fusarium* puede mediante necrosis, bloquear la translocación del agua y provocar el secado las espiguillas

desde el bloqueo hacia el ápice, por lo cual al contabilizar las espiguillas secas, se sobreestima los granos colonizados por *Fusarium*. Por esta razón, una espiguilla puede estar seca o muerta, debido a la falta de agua, sin estar colonizada por el hongo. Este fenómeno puede no ser de relevancia cuando se cuantifica IFE para estimar el efecto sobre el rendimiento, dado que la espiguilla con senescencia prematura afecta directamente al rendimiento, sin embargo es de gran relevancia cuando se busca tener una aproximación a la problemática causada por acumulación de DON, donde espiguillas con senescencia prematura se asumen enfermas cuando en realidad no fueron colonizadas por el hongo.

Además, en tanto *Fusarium* puede producir infecciones desde floración hasta estados tardíos del desarrollo del grano (Bushnell et al., 2003; Del Ponte et al., 2007), es posible que ocurrieran infecciones posteriores a la lectura de IFE. Éstas podrían no haber sido cuantificadas a campo pero sí cuantificadas en laboratorio por los métodos de blotter test y CGC. A su vez, Del Ponte et al., (2007) aseguran que infecciones tardías, generan niveles significativos de acumulación de DON, incluso sin una reducción correspondiente en el peso del grano. Esto podría explicar que los métodos de cuantificación de la enfermedad, después de la cosecha del grano, tengan mayor correlación con la concentración de DON, que la enfermedad cuantificada con el cultivo en pie.

El método CGC tuvo mayor correlación con la concentración de DON que el método blotter test, esto puede deberse a que este último es muy dependiente de la humedad del papel filtro durante la incubación. Si el papel se seca, disminuye la humedad de la placa y disminuye el estímulo del hongo a crecer y esporular, lo cual podría llevar a una subestimación del valor de infección por *Fusarium* del grano. Los resultados de este ensayo concuerdan con Palazzini et al. (2015), quienes obtuvieron una correlación débil pero significativa con coeficientes de correlación de 0,56 entre el contenido de DON en granos y porcentaje de granos con *Fusarium*. A diferencia de Góral et al. (2018), en este estudio no se encontraron correlaciones significativas entre la evaluación visual de espigas con síntomas y el método CGC.

La presencia de muestras con “alto” porcentaje de infección en grano pos-cosecha y niveles de DON menores a 2 ppm puede ser debido a que el cultivar podría detoxificar la toxina (Berthiller et al., 2005; Lemmens et al., 2005), o presentar mecanismos que impidieran la producción de DON, es decir puedan tener algún tipo de resistencia tipo III (Miller et al., 1985; Wang y Miller, 1988). También puede deberse a la ocurrencia de condiciones ambientales más favorables para la infección y no para la acumulación de DON desde floración hacia llenado de grano (Lacey y Megan, 1991; Comerio et al., 1999; Ramírez y Diana, 2019) o porque ocurrieron en el campo condiciones de mucha agua donde el DON pudo haber sido lixiviado del grano como indican Gautam y Dill-Macky (2012). Por otra parte existe la posibilidad a la infección por otras especies de *Fusarium* que fueran productoras de otras micotoxinas diferentes a DON o no productoras (Dweba et al., 2017).

En síntesis, los métodos utilizados para la evaluación de los granos en pos-cosecha, en los que se cuantifica observando directamente el signo del patógeno en vez del síntoma, estiman mejor la concentración final de DON en el grano, en comparación con los métodos que se basan en la observación del síntoma a campo. Sin embargo, poseen la desventaja de que exigen mayor tiempo y entrenamiento del operador.

3.7 CONCLUSIONES

Entre los métodos de cuantificación de *Fusarium* en grano utilizados en este trabajo, el que presentó mayor correlación con el contenido de DON en grano fue el método visual peso:peso de la Comisión Canadiense de Granos, seguido por el método blotter test. Estos dos métodos tuvieron correlación significativa entre sí y lograron explicar mejor las distintas situaciones entre IFE y DON de las parcelas seleccionadas.

La cuantificación de la infección pos-cosecha presenta ventajas significativas frente al IFE, si lo que se busca es tener una estimación de la concentración de DON en el grano cosechado.

3.8 BIBLIOGRAFÍA

- Aoki, T., Ward, T. J., Kistler, H. C., O'donnell, K. (2012). Systematics, phylogeny and trichothecene mycotoxin potential of *Fusarium* head blight cereal pathogens. *Japanese Society of Mycotoxicology Mycotoxins*, 62(2), 91-102.
- Argyris, J., Van Sanford, D., TeKrony, D. (2003). *Fusarium graminearum* infection during wheat seed development and its effect on seed quality. *Crop Science*, 43(5), 1782-1788.
- Berthiller, F., Dall'Asta, C., Schuhmacher, R., Lemmens, M., Adam, G., Krska, R. (2005). Masked mycotoxins: determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(9), 3421-3425.
- Berthiller, F., Crews, C., Dall'Asta, C., Saeger, S. D., Haesaert, G., Karlovsky, P., Stroka, J. (2013). Masked mycotoxins: A review. *Molecular nutrition & food research*, 57(1), 165-186.
- Boelt, B., Shrestha, S., Salimi, Z., Jørgensen, J. R., Nicolaisen, M., Carstensen, J. M. (2018). Multispectral imaging—a new tool in seed quality assessment?. *Seed Science Research*, 28(3), 222-228.
- Bushnell, W., Hazen, B., Pritsch, C. (2003). Histology and physiology of *Fusarium* head blight. En: Leonard K, Bushnell W. (Eds.). *Fusarium head blight of wheat and barley*. (pp. 44-83). APS Press.
- Castro, M., Germán, S., Pereyra, S. (2020). *Caracterización sanitaria de cultivares de trigo y cebada*. INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria), Uruguay. Obtenido el 15 junio de 2020 de <http://inia.uy/estaciones-experimentales/direcciones-regionales/inia-la-estanzuela/caracterizaci%C3%B3n-sanitaria-de-cultivares-de-trigo-y-cebada>
- Celano, M. M., Machado, J. C., Filho, D. J., Guimarães, R. M. (2012). Avaliação do potencial de uso da restrição hídrica em teste de sanidade de sementes de

- trigo visando à detecção de fungos. *Revista Brasileira de Sementes*, 34(4), 613-618.
- CGC (Canadian Grain Commission). (2019). Identifying wheat and barley seed affected by Fusarium head blight. Obtenido el 27 de junio de 2020 de <https://grainscanada.gc.ca/en/grain-quality/grain-grading/grading-factors/identifying-fusarium.html>
- Comerio, R. M., Pinto, V. F., Vaamonde, G. (1999). Influence of water activity on deoxynivalenol accumulation in wheat. *Mycotoxin Research*, 15(1), 24-32
- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(4), 414-430.
- Del Ponte, E. M., Fernandes, J. M. C., Bergstrom, G. C. (2007). Influence of growth stage on Fusarium head blight and deoxynivalenol production in wheat. *Journal of Phytopathology*, 155(10), 577-581.
- Dill-Macky, R. (2003). Inoculation methods and evaluation of Fusarium head blight resistance in wheat. En: Leonard KJ, Bushnell WR. (Eds.), *Fusarium head blight of wheat and barley*. (Págs. 184-210). American Phytopathological Society (APS Press).
- Dweba, C. C., Figlan, S., Shimelis, H. A., Motaung, T. E., Sydenham, S., Mwadzingeni, L., Tsilo, T. J. (2017). Fusarium head blight of wheat: Pathogenesis and control strategies. *Crop Protection*, 91(sn), 114-122.
- Edwards, S. G., Pirgozliev, S. R., Hare, M. C., Jenkinson, P. (2001). Quantification of trichothecene-producing *Fusarium* species in harvested grain by competitive PCR to determine efficacies of fungicides against Fusarium head

blight of winter wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1575-1580.

ELIKA (Fundación Vasca para la seguridad alimentaria). (2013). *Deoxinivalenol*.
Obtenido el 19 de febrero de 2021 de
<https://seguridadalimentaria.elika.eus/deoxinivalenol/>

FAO (Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura). (2018). En: Residuos de plaguicidas en alimentos y piensos. Obtenido el 28 de julio de 2020 de <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/maximum-residue-limits/es/>.

Gautam, P., Dill-Macky, R. (2012). Fusarium head blight development and tricothecene accumulation in point inoculated *Fusarium* infected wheat heads. *World Mycotoxin Journal*, 5(1), 45-55.

Góral, T., Wiśniewska, H., Ochodzki, P., Nielsen, L. K., Walentyn-Góral, D., Stepień, Ł. (2018). Relationship between Fusarium head blight, kernel damage, concentration of *Fusarium* biomass, and *Fusarium* toxins in grain of winter wheat inoculated with *Fusarium culmorum*. *Toxins*, 11(1), 2.

IMPO (2001). Normativa y avisos legales del Uruguay. Registro Nacional de Leyes y Decretos: Tomo 2 Semestre: 2 Año: 2001 Página: 1869. Decreto N° 533/001. Obtenido el 28 de julio de 2020 de <https://www.impo.com.uy/bases/decretos/533-2001/4>.

ISTA (International rules for seed testing). (2021). Validated Seed Health Testing Methods. Detection of *Verticillium dahliae* in *Spinacia oleracea* (spinach) seed. Bassersdorf. [Archivo PDF]. Consultado el 22 de agosto de 2021. https://www.seedtest.org/upload/cms/user/ISTA_SHMethods_2021_7-032_final.pdf

- Kimura, M., Kaneko, I., Komiyama, M., Takatsuki, A., Koshino, H., Yoneyama, K., Yamaguchi, I. (1998). Trichothecene 3-O-acetyltransferase protects both the producing organism and transformed yeast from related mycotoxins: cloning and characterization of Tri101. *Journal of Biological Chemistry*, 273(3), 1654-1661.
- Krska, R., Molinelli, A. (2007). Mycotoxin analysis: state-of-the-art and future trends. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(1), 145-148.
- Krska, R. (2009). Mycotoxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(sn), 1203-1204.
- Krska, R., Molinelli, A. (2009). Rapid test strips for analysis of mycotoxins in food and feed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(1), 67-71.
- Lacey, J., Megan, N. (1991). Fungi in cereal grains: their occurrence and water and temperature relationships. En: Chelkowski J. (Ed). *Cereal grains. Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage*. (pp: 77-118). Elsevier.
- Lattanzio, V. M., Pascale, M., Visconti, A. (2009). Current analytical methods for trichothecene mycotoxins in cereals. *Trends in Analytical Chemistry*, 28(6), 758–768.
- Lemmens, M., Scholz, U., Berthiller, F., Dall'Asta, C., Koutnik, A., Schuhmacher, R., Ruckebauer, P. (2005). The ability to detoxify the mycotoxin deoxynivalenol colocalizes with a major quantitative trait locus for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Molecular plant-microbe interactions*, 18(12), 1318-1324.

- Limonard, T. (1966). A modified blotter test for seed health. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 72(3), 319-321.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Secretaria de Defesa Agropecuária. (2009). *Manual de Análise Sanitária de Sementes*. [Archivo PDF]. Consultado el 1 de marzo de 2020. <https://www.abrates.org.br/files/manual-de-analise-sanitaria-de-sementes.pdf>
- Maresca, M. (2013). From the gut to the brain: Journey and pathophysiological effects of the food-associated trichothecene mycotoxin deoxynivalenol. *Toxins*, 5(4), 784-820.
- Martinez, 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(1), 41-44.
- McMullen, M. P., Stack, R. W. (1994). *Fusarium head blight (scab) of small grains*. Obtenido el 10 de setiembre de 2020 de <https://library.ndsu.edu/ir/bitstream/handle/10365/17320/PP-804-1994.pdf?sequence=1>
- Miller, J. D., Young, J. C., Sampson, D. R. (1985). Deoxynivalenol and *Fusarium* head blight resistance in spring cereals. *Journal of Phytopathology*, 113(4), 359-367.
- Misra, J. K., Mew, T. W., Merca, S. D. (1994). Equipment. En: Mew, T. W., Misra, J. K. (Eds.), *A Manual of Rice Seed Health Testing*. Manila: International Rice Research Institute. (Págs. 13-17).

- Moss, M. O., Thrane, U. (2004). *Fusarium* taxonomy with relation to trichothecene formation. *Toxicology Letters*, 153(1), 23-28.
- Noelting, M. C., Sandoval, M. C., Abbiati, N. N. (2004). Determinación de microorganismos fúngicos en semillas de Amaranto (*Amaranthus* spp.) mediante diferentes métodos de análisis. *Revista Peruana de Biología*, 11(2), 169-178.
- Ono, E., Bordini, J., Omori, A., Hirozawa, M., Ono, M. (2016). Métodos inmunológicos para a detecção de fungos toxigênicos e micotoxinas em grãos, alimentos e rações. *Biotecnologia Aplicada à Agro&indústria. São Paulo: Blucher*, 4(sn), 895-936.
- Palazzini, J., Fumero, V., Yerkovich, N., Barros, G., Cuniberti, M., Chulze, S. (2015). Correlation between *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol during the 2012/13 wheat *Fusarium* head blight outbreak in Argentina. *Cereal Research Communications*, 43(4), 627-637.
- Pan, D., Calero, N., Mionetto, A., Bettucci, L. (2013). Trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* from wheat in Uruguay. *International journal of food microbiology*, 162(1), 120-123.
- Papadopoulou-Bouraoui, 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(6), 607-617.
- Parry, D. W., Jenkinson, P., McLeod, L. (1995). *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals—a review. *Plant pathology*, 44(2), 207-238.

- Pereyra, S., Dill-Macky, R. (2010). *Fusarium* species recovered from wheat and barley grains in Uruguay, pathogenicity and deoxynivalenol content. *Agrociencia Uruguay*, 14(2), 33-44.
- Pires, M., Duarte, M. H., Machado, J. O. (2017). Efficiency of Blotter test and agar culture medium to detect *Fusarium graminearum* and *Pyricularia grisea* in wheat seeds. *Journal of Seed Science*, 39(3), 297-302.
- Ramírez, A., Diana, L. (2019). Influencia de las condiciones ambientales sobre el perfil de tricotecenos producido por cepas de *Fusarium graminearum* con distintos quimiotipos. [Tesis de Doctorado, Universidad de Buenos Aires]. Consultado el 25 de julio de 2020. https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/84017/CONICET_Digital_Nro.060707e7-4f67-4626-a217-7a8fdd7992c5_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y
- Saccon, F. A., Parcey, D., Paliwal, J., Sherif, S. S. (2016). Assessment of *Fusarium* and deoxynivalenol using optical methods. *Food and Bioprocess Technology*, 10(1), 34-50.
- Salgado, J. D., Madden, L.V., Paul, P.A. (2015). Quantifying the effects of *Fusarium* head blight on grain yield and test weight in soft red winter wheat. *Phytopathology*, 105(3), 295-306.
- SAS® On Demand for Academics. (2018). Cary: SAS Institute Inc. Cary: SAS Institute Inc.
- Scandiani, M., Carmona, M. A. (2009). La semilla de soja puede ser fuente de inóculo de la mancha ojo de rana. Avances en el desarrollo de métodos para su detección en semilla y recomendaciones para la próxima campaña. *Análisis de Semillas*, 3(9), 22-25.

- Schaafsma, A. W., Savard, M. E., Clear, R., Dexter, J. (2004). Methods and issues regarding detection of deoxynivalenol, *Fusarium*-damaged kernels, and *Fusarium spp.* in commercial grain in Canada. *Canadian journal of plant pathology*, 26(4), 443-452.
- Sosa, D., Escobar, A., Faure, R. (2017). Deoxinivalenol: métodos de análisis de residualidad en cereales. Toxicidad en animales de granjas. *Revista de Salud Animal*, 39(2), 1-16.
- Stark, A. A. (2010). Molecular Mechanism of Detection of Aflatoxins and Other Mycotoxins. En: Rai, M., Varma, A. (Eds.), *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons*. (Págs. 21-37). Springer.
- Umpiérrez-Failache, M. (2013). Estrategias para la identificación y caracterización de patógenos causantes de fusariosis en trigo. [Tesis de Maestría en Química. Uruguay, Universidad de la República]. Consultado el 17 de setiembre de 2020. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/2679>
- Umpiérrez-Failache, M., Garmendia, G., Pereyra, S., Rodríguez-Haralambides, A., Ward, T. J., Vero, S. (2013). Regional differences in species composition and toxigenic potential among *Fusarium* head blight isolates from Uruguay indicate a risk of nivalenol contamination in new wheat production areas. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), 135-140.
- Valverde-Bogantes, E. (2017). Species and Trichothecene Genotypes of *Fusarium* Head Blight Pathogens in Nebraska, USA in 2015-2016. [Tesis de maestría, University of Nebraska-Lincoln]. Consultado el 13 de febrero de 2020. <https://digitalcommons.unl.edu/foodscidiss/80/>

- Veha, A., Teren, J., Győri, Z., Mesterhazy, A. (2008). A comparative study of *Fusarium*-damaged kernel and deoxynivalenol contamination in naturally infected wheat samples. *Cereal Research Communications*, 36(SUPPL. 6), 399.
- Wang, Y. Z., Miller, J. D. (1988). Screening techniques and sources of resistance to *Fusarium* head blight. En: Klatt, A. R. (Ed.), *Wheat Production Constraints in Tropical Environments*. (Págs. 239-250). CIMMYT.
- Wegulo, S. N. (2012). Factors influencing deoxynivalenol accumulation in small grain cereals. *Toxins*, 4(11), 1157-1180.
- Windels, C. (2000). Economic and Social Impacts of *Fusarium* Head Blight: Changing Farms and Rural Communities in the Northern Great Plains. *Phytopathology* 90(1), 17-21.
- Zachariasova, M., Hajslova, J., Kostelanska, M., Poustka, J., Krplova, A., Cuhra, P., Hochel, I. (2008). Deoxynivalenol and its conjugates in beer: A critical assessment of data obtained by enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 625(1), 77-86
- Zhang, Y. J., Fan, P. S., Zhang, X., Chen, C. J., Zhou, M. G. (2009). Quantification of *Fusarium graminearum* in harvested grain by real-time polymerase chain reaction to assess efficacies of fungicides on *Fusarium* head blight, deoxynivalenol contamination, and yield of winter wheat. *Phytopathology* 99(suppl), 95-100.

4. DINÁMICA DE LA ACUMULACIÓN DE DEOXINIVALENOL SEGÚN CONDICIONES DE HUMEDAD DURANTE EL LLENADO DE GRANO

Carolina Francia¹, Silvia Pereyra², Noelia Benítez³, Oscar Bentancur⁴, Carlos Pérez⁵

¹ Ing. Agr., Ayudante de investigación fitopatología, Depto. Protección Vegetal, Fagro, EEMAC.
carofranciabent@gmail.com

² Ing. Agr. MSc., PhD., Investigadora Principal Referente, Instituto Nacional de Investigación
Agropecuaria. spereyra@inia.org.uy

³ Ayudante de investigación fitopatología, Depto. Protección Vegetal, Fagro, EEMAC.
nbg_90@hotmail.com

⁴ Ing. Agr., Profesor Agregado, Fitopatología, Depto. de Biometría, Estadística y Computación,
EEMAC obent@fagro.edu.uy

⁵ Ing. Agr. MSc., PhD., Profesor Agregado, Fitopatología, Depto. Protección Vegetal, Fagro,
EEMAC.
caperez@fagro.edu.uy

4.1 RESUMEN

El patógeno *Fusarium graminearum* causante de la fusariosis de la espiga (FE) y productor de la toxina deoxinivalenol (DON) es uno de los principales problemas que atentan contra la inocuidad del trigo. Son varios los factores que pueden afectar su concentración en el grano como, por ejemplo, las condiciones de humedecimiento: duración, frecuencia y volumen de lluvia en post-antesis, antesis y durante llenado de grano. Sin embargo, no se conoce exactamente su influencia. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar la dinámica de la acumulación de DON según condiciones de humedecimiento de espigas ocurridas durante el llenado del grano. Para esto se sembraron dos cultivares con comportamiento diferencial frente a FE (LE 2375 y INIA Don Alberto), en condiciones semi-controladas en los años 2017 y 2018. Se realizó inoculación artificial a mediados de floración con 12 cepas de *Fusarium graminearum* y los cultivares fueron expuestos a diferentes regímenes de mojado desde la inoculación hasta madurez fisiológica. Los tratamientos evaluados consideraban diferentes duraciones y frecuencia de humedad. Se evaluó el nivel de infección de FE mediante el índice de enfermedad (IFE) y el contenido de DON mediante el método Agraquant® DON (RomerLabs). Los resultados mostraron que la concentración de DON es mayor a los 30 días de niebla y luego bajó con 40 días de niebla. En cuanto a frecuencia de humedad, no hubo un patrón muy claro entre años y entre cultivares, pero en 2018 se pudo observar que menor frecuencia de humedad, generó menor concentración DON para ambos cultivares.

Palabras clave: *Fusarium*, DON, humedecimiento, duración de humedad

4.2 SUMMARY

DYNAMICS OF DEOXYNIVALENOL ACCUMULATION ACCORDING TO HUMIDITY CONDITIONS DURING GRAIN FILLING

The pathogen *Fusarium graminearum*, that cause fusarium head blight (FHB) and produce deoxynivalenol toxin (DON), is one of the main problems that threaten the safety of wheat grain. Many factors can affect the final DON concentration in grain, for example the wetting conditions such as, duration, frequency and volume of rain in post-anthesis, anthesis and during grain filling. However, its influence is not fully known. Therefore, the aim of this work was to determine the dynamics of DON accumulation according to wetting conditions that occurred during grain filling. Thus, two cultivars with differential resistance against FHB (LE 2375 and INIA Don Alberto) were sown under semi-controlled conditions in 2017 and 2018. Artificial inoculation was performed in half flowering with 12 strains of *Fusarium graminearum* and the cultivars were exposed to different wetting regimes, from inoculation to maturity. The evaluated treatments considered different durations and frequency of humidity. The FHB infection level was evaluated by the disease index (FHBI) and the DON content by the Agraquant® DON method (RomerLabs). The results showed that DON concentration is higher after 30 days moisture durations and then decreased with 40 days. Regarding the frequency of humidity, there was not a clear pattern between years and between cultivars, but in 2018 it was observed that a lower frequency of humidity generated a lower DON concentration for both cultivars.

Keywords: *Fusarium*, DON, moistening, moisture duration

4.3 INTRODUCCIÓN

La contaminación de productos agropecuarios con hongos capaces de producir metabolitos tóxicos ha sido siempre una preocupación a nivel mundial. El género *Fusarium* es de gran relevancia en la agricultura, ya que incluye un grupo de importantes fitopatógenos que pueden producir un amplio espectro de micotoxinas (Somma et al., 2014). Dentro de las micotoxinas producidas por *Fusarium*, el deoxinivalenol (DON) es la más comúnmente detectada en trigo, y es conocida por su efecto inhibidor de la síntesis de proteínas (Wegulo, 2012). Además, al ser una micotoxina termoestable (hasta 180 °C) persiste durante el procesamiento de los alimentos (ELIKA, 2013) y es regulada por organismos nacionales e internacionales (IMPO, 2001; FAO, 2018).

La micotoxina es producida por el hongo como factor de virulencia, otorgándole una mayor agresividad en la patogénesis (Proctor, 2000; Jansen et al., 2005; Gardiner et al., 2009). En este sentido, se conoce que hay una correlación positiva entre la agresividad de las cepas y la producción de DON en *F. graminearum* (Proctor et al., 2002). Jansen et al., (2005) observó, que DON permite a las hifas del hongo colonizar espiguillas a través del raquis de la espiga de trigo. Por lo que, en ausencia de tricotecenos, el hongo se ve impedido de colonizar debido al engrosamiento en la pared celular del raquis, una defensa de la planta que es inhibida por la micotoxina. La disminución en la producción de estas micotoxinas no influiría en la capacidad de una cepa para infectar el trigo, pero podría afectar la progresión de la infección debido a la disminución de su agresividad (Proctor, 2000).

Además, si bien la acumulación de toxinas muestra una relación estrecha con los cambios patogénicos en las células del huésped, la aparición de síntomas y la colonización de los tejidos del huésped por las hifas (Kang y Buchenauer, 1999), Malbrán y Lori (2013) además de encontrar una estrecha correlación entre la severidad de los síntomas de la FE y la producción de DON in vivo, encontraron cepas capaces de inducir limitados síntomas de FE, pero capaces de colonizar los

tejidos vasculares de la espiga y constituir un importante riesgo de contaminación del grano.

Los factores que pueden hacer variar la concentración de DON en los tejidos colonizados son muy diversos, y las variables involucradas en la producción del mismo por parte de las cepas no son totalmente conocidas (Mallmann et al., 2017). La cepa del patógeno va a determinar la vía de síntesis de toxinas que aportan al resultado final de acumulación en grano (Gautam y Dill-Macky, 2012).

Por otro lado, el cultivar utilizado cumple un rol fundamental en la acumulación final de DON en el grano, en tanto determina la ausencia o presencia y cantidad de genes que confieren resistencia, el o los tipos de resistencia presentes en el mismo, el estado fenológico al que está expuesto el cultivo a *Fusarium*, y la arquitectura de la espiga (espiga más laxa o compacta) (Rudd et al., 2001; Zhou et al., 2004; Jung et al., 2010).

Además, las condiciones ambientales son también determinantes de la producción de toxina por parte de la cepa, así como de la acumulación final en el grano (Wegulo, 2012). Aún en el caso en que el aislamiento tenga funcional toda la vía de producción de toxinas, las condiciones ambientales son las que en último caso determinan su producción (Umpiérrez-Failache et al., 2013). Las horas de agua libre sobre la espiga afectan la expresión de la resistencia de los cultivares (Cowger y Arellano, 2013) e influyen directamente en la dinámica de la toxina en el grano (Gautam y Dill-Macky, 2012).

Algunas de las condiciones ambientales que pueden afectar la concentración final de DON son: la temperatura, la duración de la humedad (en un rango de 0-40 días post-antesis), precipitaciones durante antesis y hasta fin de llenado de grano (que también puede afectar la expresión de la resistencia del cultivar), el volumen de lluvia o niebla, la frecuencia de secado y mojado, la actividad del agua (*aw*) sobre la superficie del material vegetal, el pH y la composición gaseosa de la atmósfera (Marín, 2010; Wegulo, 2012).

Las condiciones óptimas de temperatura para la producción de DON y 3-acetildeoxinivalenol (3-ADON) se encuentran entre 25 y 30°C, y la máxima cantidad de 15-acetildeoxinivalenol (15-ADON) se produce a 10°C (Ramírez y Diana, 2019). Sin embargo, *Fusarium* tiene poco crecimiento con temperaturas menores a 15°C y tiene un crecimiento óptimo de 24-26°C, por lo que no son los mismos requerimientos de temperatura para el crecimiento de *Fusarium* que para la producción de DON (Lacey y Megan, 1991).

La duración, frecuencia y volumen de lluvia en post-antesis, antesis y durante llenado de grano, afectan la concentración final de DON en el grano. Las condiciones de humedad durante el llenado de grano permiten aliviar los efectos de la creciente escasez de agua en la espiga, lo que facilita el proceso de la colonización (Cowger y Arellano, 2013).

El efecto de la duración de la humedad en la concentración de DON, es complejo. Se han reportado asociaciones positivas entre número de días con agua libre en las espigas y concentración de DON (Matthäus et al., 2004; Cowger et al., 2009; Cowger y Arellano, 2013; Mallmann et al., 2017). El aumento de la duración de días con espigas mojadas post-floración puede tener un efecto de aumento significativo sobre DON, sobre el porcentaje de granos de trigo infectado, y sobre la expresión de la resistencia en todos los tejidos de la espiga (es decir que un creciente número de días de lluvia después de la antesis pueden cambiar a los cultivares de ranking de resistencia).

Sin embargo, también se han reportado asociaciones negativas entre estas variables (Culler et al., 2007; Gautam y Dill-Macky, 2012) explicado a que DON puede ser lixiviado de los tejidos por agua libre durante o poco después de la antesis. Lemmens et al. (2004) encontraron que algunos genotipos de trigo reaccionan al riego niebla con un aumento en el contenido de DON en grano, mientras que otros responden con una disminución. Lemmens et al. (2004) aclaran que esta diferencia puede ser debida a que en los genotipos que respondieron con disminución de DON,

ocurrió la aparición de espigas prematuras. En estas espigas prematuras, ocurre el marchitamiento apical de la espiga con granos arrugados (por la presencia del hongo en el raquis de la espiga), pero si bien, se observa el síntoma de la enfermedad, el hongo no está presente por lo que el contenido de DON es menor (Lemmens et al., 2004).

Hay escasa información respecto a cómo influye la frecuencia de días con saturación de agua en la concentración de DON. En este sentido, Andersen et al., (2015) evaluaron distintas frecuencias de niebla en invernáculo durante ocho días inmediatamente después de la antesis, y concluyeron que, con mayor período seco, es decir sin lluvias ni niebla, tuvieron mayor concentración de DON y remarcan que cuatro días secos, podrían estresar al hongo haciendo que la concentración de la toxina sea mayor comparado a menos de cuatro días secos.

Otro factor importante en la acumulación de DON es la actividad del agua. La actividad de agua (a_w) se define como el agua libre de un sustrato, en equilibrio con la humedad relativa ambiente, disponible para el crecimiento microbiano o fúngico (Lacey y Magan, 1991; Marín, 2010). Estudios sobre la influencia de la actividad del agua (a_w) en la acumulación de DON en trigo a 25 °C, muestran que la mayor acumulación de DON se detectó a a_w de 0,98 y el rango de a_w donde se produjo DON, fue de 0,92-0,98, no encontrándose DON a valores iguales o inferiores de 0,92 (Comerio et al., 1999). Ramírez et al. (2004) también demostraron la influencia de a_w en la producción de DON y concluyeron que hay mayor producción de DON a 25°C con a_w de 0,97 respecto a a_w de 0,99 o 0,995. En cambio, a diferencia de los autores anteriores, Lacey y Megan (1991) establecieron un crecimiento de *F. graminearum* a un a_w mínimo menor (0,89) y óptimo mayor (0,98-0,99).

Por lo tanto, si bien hay una gran diversidad de factores ambientales que afectan la acumulación de DON en el grano, el objetivo de este estudio fue establecer la dinámica de la acumulación de DON según distintas condiciones de humedecimiento de la espiga durante el llenado de grano.

4.4 MATERIALES Y MÉTODOS

Se instalaron dos ensayos, uno en el 2017 (Exp. 1) y el otro en el 2018 (Exp. 2), en sombráculo en la localidad de Paysandú, en la Estación Experimental “Dr. Mario A. Cassinoni” (EEMAC, 32° 22’ 46”S 58° 03’ 14”W).

El estudio se realizó en dos cultivares de trigo, ambos sembrados el 29 de agosto del 2017 y el 8 de julio del 2018. Dichos cultivares tenían comportamiento diferencial frente a FE, el cultivar LE 2375, de susceptibilidad intermedia a intermedia-baja (grupo 4 según la caracterización de Castro et al., 2020), e INIA Don Alberto, altamente susceptible (grupo 9 según la caracterización de Castro et al., 2020). La unidad experimental fue una maceta con 50 % tierra: 50 % arena, con 15 plantas de trigo.

Se evaluó la duración de mojado con cuatro niveles, y la frecuencia de mojado con cuatro niveles. Se agregó además un tratamiento sin humedecimiento (sin lluvia ni mojado), y uno con lluvia natural, totalizando 10 tratamientos (Cuadro 1).

En ambos experimentos el mojado se logró con 23 microaspersores NaanDanJain fogger de cuatro boquillas con caudal de 28 L/h, es decir en una superficie de 1 m² se aplicaron 28 mm en 60 min. Al final de los experimentos, todos los tratamientos habían recibido distinto volumen de agua final (Cuadro 1).

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos y volumen total de agua (mm) recibido desde tercer día post-inoculación hasta cosecha en cada tratamiento

Tratamiento	Características del tratamiento	Volumen de agua (mm) total
1	Testigo (0 días de mojado)	0
Duración¹		
2	10 d	280
3	20 d	560
4	30 d	840
5	40 d	1120
Frecuencia²		
6	2 d de mojado - 2 d secos	560
7	2 d de mojado - 6 d secos	280
8	2 d de mojado - 10 d secos	224
9	4 d de mojado - 10 d secos	336
10 Exp. 1	Lluvia natural	140,5
10 Exp. 2	Lluvia natural	339,2

¹ Días consecutivos, en los cuales se aplicó un riego de 1 h, siempre iniciando la aplicación de riego desde dos días post-inoculación.

² Frecuencia de mojado, expresada como alternancia días con aplicación de un riego de 1 h, y días sin aplicación de riego, iniciando desde dos días post-inoculación, hasta cosecha.

El diseño experimental fue un DCA con 10 tratamientos y tres repeticiones para cada uno de los cultivares sembrados. Se trabajó con un modelo estadístico factorial con interacción, donde los factores fueron: cultivar, tratamiento y la interacción cultivar*tratamiento.

$$Y_{jk} = \mu + C_j + T_k + (C \times T)_{jk} + \epsilon_{jk}$$

μ : media general

C_j : efecto del j-ésimo (cultivar)

T_k : efecto del k-ésimo (tratamiento)

$C_j \times T_k$: efecto de la interacción cultivar*tratamiento

ϵ_{jk} : error experimental

Los experimentos tuvieron inoculación artificial con una suspensión de macroconidios a concentración 1×10^5 conidios/mL con un gasto aproximado de 25 mL por maceta. Para esto se utilizó un pool de 12 aislados monospóricos de *Fusarium graminearum* representativos de la región caracterizados por su especie filogenética, quimiotipo y agresividad *in planta* de la colección de INIA La Estanzuela y Facultad de Química (UDELAR), Uruguay (Códigos: 00-004, 02-020, 09-005, 11-001, 12-000, 13-009, 13-023, 14-003, 14-012, 16-000, 16-014 y 17-003) todos identificados como *F. graminearum sensu stricto*, quimiotipo 15ADON.

Luego de la inoculación, las espigas se mantuvieron mojadas por 48 h en el Exp. 1 y 72 h en el Exp. 2, con aspersores que fueron activados para que la espiga siempre estuviera mojada según apreciación visual. Todos los tratamientos comenzaron el tercer día post-inoculación.

A los 14 y 21 días post-inoculación se realizó la cuantificación de síntomas mediante la evaluación de la incidencia (espigas con FE en el total de las espigas de la maceta) y severidad (espiguillas afectadas por FE en el total de las espiguillas de la espiga). En base a estos dos parámetros se estimó el índice de fusariosis de la espiga (IFE) como el producto de severidad*incidencia expresadas en porcentaje/100.

Cada maceta se cosechó y trilló en forma manual. Luego los restos florales se retiraron de forma manual en el laboratorio y el grano se conservó en bolsas de papel hasta el momento del procesamiento en el laboratorio.

Posteriormente en el laboratorio se determinó porcentaje de granos con *Fusarium* mediante el método Canadian Grain Commission (CGC, 2019) y se

determinó contenido de DON en grano por el método AgraQuant®ELISA DON (RomerLabs) (aprobado por AOAC Research Institute-AOAC RI 110701).

Para el análisis de resultados se utilizó el paquete estadístico SAS On Demand for Academics versión 9.04 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2018). Se realizó ANOVA para incidencia de FE, severidad de FE, IFE y contenido de DON. Y se realizó separación de medias según el método Tukey ($\alpha=0,05$), según grupos de tratamiento para cada cultivar.

4.5 RESULTADOS

Ambos experimentos tuvieron diferente nivel de enfermedad. En el Exp. 1 los niveles de IFE fueron muy bajos respecto al Exp. 2 (Cuadro 2), debido principalmente a las condiciones de inoculación de ambos experimentos, dado que el período de humedecimiento de la espiga mediante el riego a la inoculación fue de 48 h en el Exp 1, y 72 h en el Exp. 2.

Además del mayor período de humedecimiento de la espiga a la inoculación, en el Exp. 1 hubo mayor temperatura en el período desde la inoculación hasta el inicio de los tratamientos (18-26 °C vs. 16-20 °C) y la humedad relativa fue menor (48-67 % vs. 66-84 %). El Exp. 2, a su vez tuvo mayor temperatura mínima y mayor HR máxima durante el período experimental (Cuadro 2). Estas diferencias permitieron evaluar los tratamientos frente a distinta presión de enfermedad.

Cuadro 2. Rangos de temperatura media diaria, humedad relativa (HR) media diaria, desde inoculación a cosecha, índice de fusariosis de la espiga (IFE) y contenido de deoxinivalenol (DON) según experimento

	Exp. 1	Exp. 2
Temperatura media (°C)	14-28	15-28
HR (%)	46-84	47-95
IFE (%)	0,0-14,3	4,8-78,6
DON (ppm)	<0,25-1,5	1,0-27,3

Los niveles de enfermedad observados fueron afectados significativamente por cultivar, y por el tratamiento. A su vez, hubo efecto significativo de la interacción de estos dos factores (Cuadro 3).

Cuadro 3. Resultados del ANOVA para incidencia y severidad de fusariosis de la espiga (FE), índice de FE (IFE), y contenido de deoxinivalenol (DON). El valor presentado corresponde a p-valor

Exp. 1				
Efecto	Incidencia	Severidad	IFE	DON
Cultivar	0,0057	0,83	0,02	<0,0001
Trat.	0,57	0,039	0,19	0,01
Cultivar*TRAT	0,43	0,001	0,03	0,11
Exp. 2				
Efecto	Incidencia	Severidad	IFE	DON
Cultivar	0,02	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Trat.	0,34	0,0047	0,03	<0,0001
Cultivar*Trat.	0,38	<0,0001	0,003	0,01

* Significancia con valores de p-valor < 0, 05 son indicados en negritas.

Don Alberto tuvo significativamente mayor nivel de enfermedad que LE 2375, tanto en condiciones de bajos niveles de enfermedad (Exp. 1) como con altos niveles (Exp. 2), aunque estas diferencias se hicieron más evidentes en condiciones de alta presión de enfermedad (Cuadro 4).

Cuadro 4. Promedio general del índice de FE (IFE, %) para el cultivar INIA Don Alberto y LE 2375

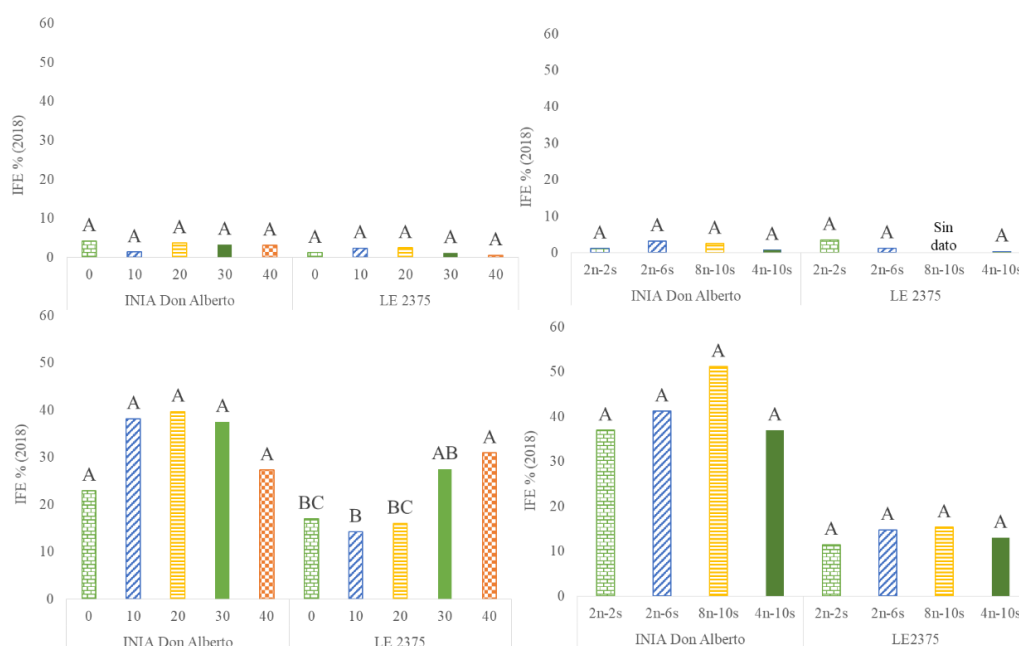
IFE (%)	INIA Don Alberto	LE 2375
Exp. 1	2,3 A	1,3 B
Exp. 2	37,5 A	17,4 B

Diferencias significativas entre cultivares dentro de un mismo experimento, mediante el método Tukey ($\alpha=0,05$).

El cultivar INIA Don Alberto tuvo mayor IFE que LE 2375 para todos los tratamientos excepto en el tratamiento de 10 días de duración de mojado en el Exp. 1 y en 40 días de duración de mojado en el Exp. 2 (Fig. 1).

El tratamiento tuvo efecto significativo sobre IFE en el Exp. 2 pero no en el Exp. 1, probablemente explicado por los bajos niveles de IFE en este último. Por esta razón, en Exp. 1 se realizó cuantificación de granos con *Fusarium* post-cosecha, variable que sí fue afectada por el tratamiento (p -valor=0,0003, datos no mostrados). A su vez, se observó efecto significativo de la interacción tratamiento*cultivar tanto sobre la severidad como IFE en ambos experimentos. Debido a que, los bajos niveles de enfermedad del Exp. 1 no permitieron segregar entre tratamientos, se hará énfasis en los resultados del Exp. 2 donde se observan claras diferencias.

En el Exp. 2, con altos niveles de enfermedad, no se observó en INIA Don Alberto efecto significativo de la duración y la frecuencia de mojado sobre el IFE, mientras que en el cultivar LE 2375 la duración afectó el IFE, con 40 días de mojado se observó mayor IFE respecto a 0, 10 o 20 días. En este cultivar, al igual que en INIA Don Alberto, la frecuencia de mojado no afectó el IFE (Fig. 1).



Referencias: n: días con mojado, s: días sin mojado.

Diferentes letras en cada figura indican medias estadísticamente diferentes entre tratamientos para cada cultivar, mediante el método Tukey ($\alpha=0,05$)

Fig. 1. Índice de la fusariosis de la espiga (IFE, %) por cultivar según tratamiento

Los niveles de DON fueron afectados significativamente por el cultivar, y por el tratamiento, siendo significativa la interacción de estos dos factores en el Exp. 2 (Cuadro 3). Los experimentos tuvieron diferente concentración de DON. En el Exp. 1 la concentración de DON fue muy baja respecto al Exp. 2 (Cuadro 2), probablemente asociado al nivel de enfermedad en ambos experimentos.

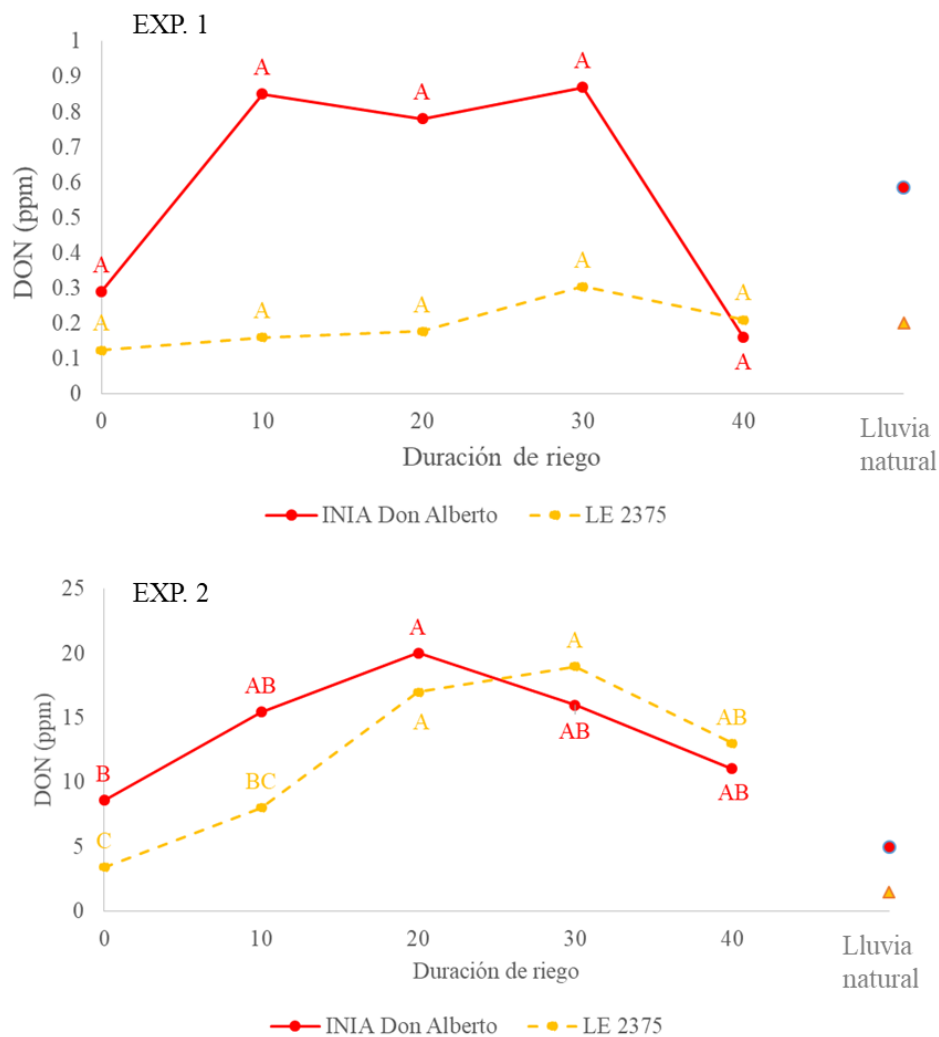
El cultivar INIA Don Alberto presentó mayor concentración de DON que LE 2375, tanto en condiciones de bajos niveles de enfermedad (Exp. 1) como con altos niveles (Exp. 2). Las diferencias entre cultivares se hicieron más evidentes en el Exp. 2 (Cuadro 5).

Cuadro 5. Promedio general de la concentración de deoxinivalenol (DON, ppm) para el cultivar INIA Don Alberto y LE 2375

DON (ppm)	INIA Don Alberto	LE 2375
Exp. 1	0,46 A	0,16 B
Exp. 2	14,1 A	9,4 B

Diferencias significativas entre cultivares dentro de un mismo experimento, mediante el método Tukey ($\alpha=0,05$).

En el Exp. 1, si bien los bajos niveles de DON en todo el experimento (menores a 2 ppm), no permitió observar diferencias entre tratamientos, se observó una tendencia en INIA Don Alberto a tener mayor concentración de DON a los 10, 20 y 30 días de duración del riego, y luego hay una disminución con 40 días de duración del riego. Por otro lado, el cultivar LE 2375 tendió a tener los mayores valores de DON con 30 días de duración del riego. En el Exp. 2, INIA Don Alberto tuvo la mayor concentración de DON con 20 días de duración del riego, disminuyendo con 30 y 40 días de duración del riego. Por otro lado, el cultivar LE 2375 tuvo los mayores valores de DON con 20 y 30 días de duración del riego disminuyendo con 40 días de riego. Es decir, la concentración de DON aumentó con los días de humedecimiento, hasta un máximo de 20 y 30 días y luego disminuyó con 40 días de humedecimiento, a pesar de que esta disminución no fue significativa (Fig. 2).



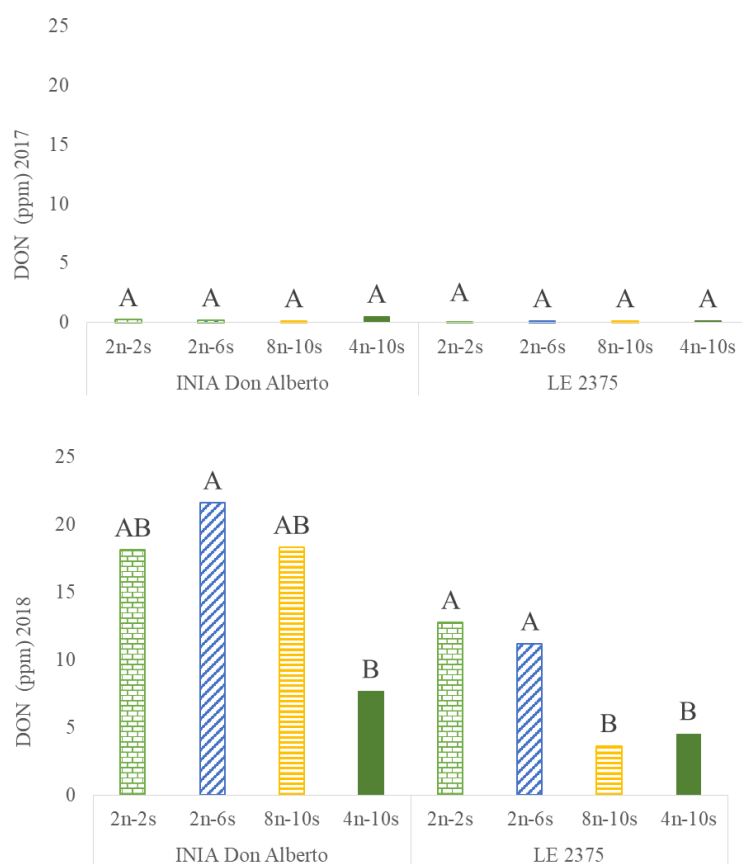
Referencias: n: días con mojado, s: días sin mojado.

Diferencias significativas entre tratamientos para cada cultivar, mediante el método Tukey ($\alpha=0,05$).

Fig. 2. Concentración de deoxinivalenol (DON, ppm) por cultivar según tratamiento

En el Exp. 2, mediante contrastes ortogonales se pudo observar que el tratamiento de lluvia natural tuvo menor concentración de DON que el resto de los tratamientos (datos no mostrados). Este tratamiento presentó un total de 19 días lluviosos y el volumen total de lluvia fue de 339,2 mm. Estas macetas estuvieron expuestas a ocho eventos infecciosos según la descripción de evento infeccioso de Moschini y Fortugno (1996).

La frecuencia de mojado, no afectó la concentración de DON con un patrón claro, pero en términos generales, a mayor frecuencia de mojado hubo mayor contenido de DON, y a mayor período seco, la concentración de DON fue menor (Fig. 3).



Diferencias significativas entre tratamientos para cada cultivar, mediante el método Tukey ($\alpha = 0,05$). Referencias: n: días con mojado, s: días sin mojado.

Fig. 3. Concentración de deoxinivalenol (DON, ppm) según cultivar y tratamiento de frecuencia de la humedad para ensayos 1 y 2

4.6 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la concentración de DON puede ser afectada por la duración y frecuencia de humedecimiento de la

espiga, y que dicho efecto depende a su vez del cultivar. La concentración de DON en grano aumentó con el humedecimiento de la espiga, aunque no se observe variación en el IFE. En las condiciones de este estudio, se observó un aumento del DON con 20 días de mojado de la espiga a pesar de que no observarse aumento en el IFE (Fig. 1 y 2). La mayor concentración de DON a los 20 días de mojado respecto a otros tratamientos, en ambos cultivares (Exp. 2), puede deberse a que el humedecimiento de la espiga favoreció el crecimiento de *Fusarium* y la producción de toxina, sin que ocurra un lavado de la misma.

Estos resultados concuerdan con Cowger et al. (2009), quienes encontraron una asociación positiva entre la concentración de DON y el número de días húmedos hasta una duración de 20 días post inoculación. Luego estos autores encontraron que con 30 días de humedad, la concentración de DON se mantenía igual que con 20 días o la misma podía bajar. Gautam y Dill-Macky (2012) reportaron que con 31 días de niebla, la concentración de DON disminuyó. A su vez, Lemmens et al. (2004) también encontraron asociaciones negativas entre días húmedos y concentración de DON con una duración de niebla de hasta 46 días. Esta disminución en la concentración de DON, la cual es soluble en agua (Culler et al., 2007), es explicada por un “lavado” de la misma desde los tejidos de la espiga (Culler et al., 2007).

A su vez, la disminución en concentración de DON fue más pronunciada en el cultivar más susceptible, resultando incluso con menores concentraciones de DON que el cultivar con mayor resistencia (Fig. 2). Esto concuerda con los datos encontrados por Cowger y Arellano (2013) que concluyeron que incrementos en la duración de la humedad post-antesis, reducen el efecto del cultivar sobre DON, afectando la expresión de la resistencia en todos los tejidos de la espiga. Estos autores sugirieron una falta de expresión de la resistencia genética con 30 días de humedad. En el presente estudio, el aumento de días con humedecimiento aumentó los niveles de DON en ambos cultivares, pero el cultivar susceptible (Don Alberto) tuvo mayor concentración de DON con menos días de humedecimiento, hasta un máximo a los 20 días, a partir del cual a mayor número de días de humedecimiento

disminuyeron más la concentración de DON en el cultivar susceptible que en el resistente (LE 2375).

Sin dudas que hay efectos mezclados entre días con humedecimiento y volúmen total de agua recibido. La disminución en la concentración de DON ocurrió con 840 mm de niebla en el cultivar resistente, mientras que para el cultivar susceptible ocurrió a partir de 560 mm de niebla. Las diferencias en la dinámica de la concentración de DON en grano entre ambos experimentos, plantea la interrogante de si a mayor concentración de DON en el grano, este podría ser lixiviado con menor cantidad de agua.

En cuanto a frecuencia de mojado, Andersen et al. (2015) observaron un aumento de DON con cuatro días secos y lo atribuyeron a un factor de estrés al hongo. En el presente estudio se obtuvieron resultados similares ya que la concentración de DON aumentó de manera significativa en el cultivar susceptible con 6 días secos. Luego se observa una disminución con 10 días días secos, esto podría deberse a que el hongo detiene su crecimiento o su producción de DON y la planta puede detoxificarse en este periodo.

Respecto al tratamiento con lluvia natural, el cultivar susceptible tuvo mayor concentración de DON que el resistente. El nivel de DON, encontrado en este tratamiento está acorde al volumen final de agua recibido respecto al resto de los tratamientos. Todos los tratamientos expuestos a distintas duraciones de humedecimiento, recibieron un máximo de 28 mm/día y el tratamiento de lluvia natural, recibió cantidades inferiores a esta. Los 140 mm recibidos al final del período pueden haber lixiviado el DON y así explicar los bajos niveles de toxina que se encontraron en este tratamiento.

En el Exp. 2, el tratamiento de lluvia natural tuvo menor concentración de DON para ambos cultivares, respecto a los demás tratamientos a pesar de que este tratamiento recibió un volumen final de agua mayor (Fig. 2). Por lo tanto, dado que

las macetas expuestas a lluvia natural, recibieron 43 y 38 mm de agua de forma consecutiva a los 14 y 15 días post inoculación y a los 17 días pre-cosecha volvieron a recibir tres eventos de 90, 75 y 32 mm de lluvia, estos volúmenes recibidos en etapas tempranas del llenado de grano, pueden haber lixiviado el DON (Culler et al., 2007; Gautam y Dill-Macky, 2012).

Por último, se destaca que las condiciones post-infección condicionaron la severidad de FE pero, en ningún caso la incidencia fue determinada por los tratamientos, ya que esta dependió de las condiciones de inoculación. Es decir, las condiciones al momento de la infección determinaron la incidencia, y las condiciones de humedecimiento afectaron la severidad de la enfermedad. Esto es importante porque cuando no hubo condiciones favorables para la infección (como ocurrió en el Exp 1), las condiciones durante el llenado prácticamente no tienen efecto sobre la acumulación de DON.

4.7 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que la concentración de DON se vió afectada por el humedecimiento de la espiga durante el llenado. La concentración final de DON aumentó con hasta 20 de días de humedecimiento, y se redujo notoriamente con 40 días de mojado, independientemente de los niveles de enfermedad, aunque el efecto de humedecimiento toma mayor relevancia cuando los niveles de infección son elevados.

En cuanto a frecuencia de días de mojado, se pudo observar que menor frecuencia de días de mojado, generó menor concentración DON para ambos cultivares.

4.8 BIBLIOGRAFÍA

- Andersen, K. F., Madden, L. V., Paul, P. A. (2015). Fusarium head blight development and deoxynivalenol accumulation in wheat as influenced by post-anthesis moisture patterns. *Phytopathology*, 105(2), 210-219.
- Castro, M., Germán, S., Pereyra, S. (2020). *Caracterización sanitaria de cultivares de trigo y cebada*. INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria), Uruguay. Obtenido el 15 junio de 2020 de <http://inia.uy/estaciones-experimentales/direcciones-regionales/inia-la-estanzuela/caracterizaci%C3%B3n-sanitaria-de-cultivares-de-trigo-y-cebada>
- CGC (Canadian Grain Commission). (2019). Identifying wheat and barley seed affected by Fusarium head blight. Obtenido el 27 de junio de 2020 de <https://grainscanada.gc.ca/en/grain-quality/grain-grading/grading-factors/identifying-fusarium.html>
- Cowger, C., Patton-Özkurt, J., Brown-Guedira, G., Perugini, L. (2009). Post-anthesis moisture increased Fusarium head blight and deoxynivalenol levels in North Carolina winter wheat. *Phytopathology*, 99(4), 320-327.
- Cowger, C., Arellano, C. (2013). *Fusarium graminearum* infection and deoxynivalenol concentrations during development of wheat spikes. *Phytopathology*, 103(5), 460-471.
- Comerio, R. M., Pinto, V. F., Vaamonde, G. (1999). Influence of water activity on deoxynivalenol accumulation in wheat. *Mycotoxin Research*, 15(1), 24-32
- Culler, M. D., Miller-Garvin, J. E., Dill-Macky, R. (2007). Effect of extended irrigation and host resistance on deoxynivalenol accumulation in *Fusarium*-infected wheat. *Plant Disease*, 91(11), 1464-1472.
- ELIKA (Fundación Vasca para la seguridad alimentaria). (2013). *Deoxinivalenol*. Obtenido el 19 de febrero de 2021 de <https://seguridadalimentaria.elika.eus/deoxinivalenol/>

- FAO (Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura). (2018). En: Residuos de plaguicidas en alimentos y piensos. Obtenido el 28 de julio de 2020 de <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/maximum-residue-limits/es/>.
- Gardiner, D. M., Osborne, S., Kazan, K., Manners, J. M. (2009). Low pH regulates the production of deoxynivalenol by *Fusarium graminearum*. *Microbiology*, 155(9), 3149-3156.
- Gautam, P., Dill-Macky, R. (2012). *Fusarium* head blight development and trichothecene accumulation in point inoculated *Fusarium* infected wheat heads. *World Mycotoxin Journal*, 5(1), 45-55.
- IMPO (2001). Normativa y avisos legales del Uruguay. Registro Nacional de Leyes y Decretos: Tomo 2 Semestre: 2 Año: 2001 Página: 1869. Decreto N° 533/001. Obtenido el 28 de julio de 2020 de <https://www.impo.com.uy/bases/decretos/533-2001/4>.
- Jansen, C., Von Wettstein, D., Schäfer, W., Kogel, K. H., Felk, A., Maier, F. J. (2005). Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(46), 16892-16897.
- Jung, Y., Park, C. S., Jeung, J. U., Kim, C. K., Park, J. C., Kang, C. S., Seo, Y. W. (2010). Employment of wheat grain properties in evaluation of *Fusarium* head blight resistance. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 13(4), 275-281.
- Kang, Z., Buchenauer, H. (1999). Immunocytochemical localization of *Fusarium* toxins in infected wheat spikes by *Fusarium culmorum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55(5), 275-288.

- Lacey, J., Megan, N. (1991). Fungi in cereal grains: their occurrence and water and temperature relationships. En: Chelkowski, J. (Ed). *Cereal grain. Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage*. (pp. 77-118). Elsevier.
- Lemmens, M., Buerstmayr, H., Krska, R., Schuhmacher, R., Grausgruber, H., Ruckebauer, P. (2004). The effect of inoculation treatment and long-term application of moisture on *Fusarium* head blight symptoms and deoxynivalenol contamination in wheat grains. *European Journal of Plant Pathology*, 110(3), 299-308.
- Malbrán, I., Lori, G. (2013). Agresividad, producción de micotoxinas y diversidad en las poblaciones de *Fusarium graminearum* de la región triguera argentina. [Tesis de Doctorado, Universidad de Buenos Aires]. 108 p. Consultado el 10 de agosto de 2020. <http://ri.agro.uba.ar/files/download/tesis/doctorado/2013malbranismael.pdf>
- Mallmann, C. A, Dilkin, P., Mallmann, A. O., Oliveira, M. S., Adaniya, Z. N., Tonini, C. (2017). Prevalence and levels of deoxynivalenol and zearalenone in commercial barley and wheat grain produced in Southern Brazil: an eight-year (2008 to 2015) summary. *Tropical Plant Pathology*, 42(3), 146-152.
- Marín, P. (2010). Análisis de factores ecofisiológicos que influyen en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de toxinas en especies de "*Fusarium*". [Tesis de Doctorado, Universidad Complutense de Madrid]. 233 p. Consultado el 15 de julio de 2020. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/11150/1/T32054.pdf>
- Matthäus, K., Dänicke, S., Vahjen, W., Simon, O., Wang, J., Valenta, H., Flachowsky, G. (2004). Progression of mycotoxin and nutrient concentrations in wheat after inoculation with *Fusarium culmorum*. *Archives of Animal Nutrition*, 58(1), 19-35.

- 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(3), 211-218.
- Proctor, R. H. (2000). *Fusarium* toxins: trichothecenes and fumonisins. *Microbial-foodborne-diseases: mechanisms-of-pathogenesis-and-toxin-synthesis*, 363-381.
- Proctor, R. H, Desjardins, A. E., McCormick, S. P., Plattner, R. D., Alexander, N. J., Brown, D. W. (2002). Genetic analysis of the role of trichothecene and fumonisin mycotoxins in the virulence of *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 108(7), 691-698.
- Ramírez, L., Chulze, S., Magan, N. (2004). Impact of environmental factors and fungicides on growth and deoxinivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentinian wheat. *Crop Protection*, 23(2), 117-125.
- Ramírez, A., Diana, L. (2019). Influencia de las condiciones ambientales sobre el perfil de tricotecenos producido por cepas de *Fusarium graminearum* con distintos quimiotipos. [Tesis de Doctorado, Universidad de Buenos Aires]. Consultado el 20 de julio de 2020. https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/84017/CONICET_Digital_Nro.060707e7-4f67-4626-a217-7a8fdd7992c5_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y
- Rudd, J. C., Horsley, R. D., McKendry, A. L., Elias, E. M. (2001). Host plant resistance genes for *Fusarium* head blight. *Crop Science*, 41(3), 620-627.
- SAS® On Demand for Academics. (2018). Cary: SAS Institute Inc. Cary: SAS Institute Inc.
- Somma, S., Petruzzella, A. L., Logrieco, A. F., Meca, G., Cacciola, O. S., Moretti, A. (2014). Phylogenetic analyses of *Fusarium graminearum* strains from cereals

in Italy, and characterisation of their molecular and chemical chemotypes. *Crop and Pasture Science*, 65(1), 52-60.

Umpiérrez-Failache, M., Garmendia, G., Pereyra, S., Rodríguez-Haralambides, A., Ward, T. J., Vero, S. (2013). Regional differences in species composition and toxigenic potential among *Fusarium* head blight isolates from Uruguay indicate a risk of nivalenol contamination in new wheat production areas. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), 135-140.

Wegulo, S. N. (2012). Factors influencing deoxynivalenol accumulation in small grain cereals. *Toxins*, 4(11), 1157-1180.

Zhou, W., Kolb, F. L., Yu, J., Bai, G., Boze, L. K., Domier, L. L. (2004). Molecular characterization of *Fusarium* head blight resistance in Wangshuibai with simple sequence repeat and amplified fragment length polymorphism markers. *Genome*, 47(6), 1137-1143.

5. DISCUSIÓN GENERAL

El análisis realizado demuestra que la cuantificación de la FE mediante el IFE como predictor de la concentración final de DON en el grano, es muy dependiente de la presión de inóculo del sistema y de las condiciones ambientales, no solo durante el proceso de infección, sino también durante el llenado del grano. El IFE puede sobreestimar o subestimar el daño causado por *Fusarium*. Por un lado, en tanto el IFE es estimado en base al síntoma, es posible sobreestimar al confundir e incluir como síntoma el desecamiento apical por bloqueo del pedúnculo o raquis por el desecamiento prematuro inducido por el patógeno en las espiguillas (Malbrán y Lori, 2013). Por otro, una vez que comienza la senescencia natural de los tejidos de la espiga, es difícil visualizar el avance de los síntomas en la espiga y también aquellos que provienen de eventos infecciosos tardíos (ocurridos durante el llenado), que pueden tener un significativo aporte en la concentración de toxinas en el grano como explican Del Ponte et al. (2007). Los métodos de evaluación de FDK permitieron una mejor predicción de la concentración final de DON en grano, ya que en este caso detectan la presencia del patógeno a post-cosecha. Sin embargo, FDK es un método que requiere mayor entrenamiento del operador y mayor tiempo (Umpiérrez-Failache, 2013). Si bien, en años no favorables para la enfermedad, el IFE tuvo buena correlación con los niveles de DON, en años más favorables, y con probabilidad de infecciones tardías, se debería recurrir a técnicas pos-cosecha más precisas, como lo es FDK.

La correlación entre la cuantificación de la infección en poscosecha mediante el método *blotter test* y el método CGC fue de 0,57. Se observó que el método CGC tuvo mayor correlación con la concentración final de DON en grano. Esto podría deberse, en parte, a que el método *blotter test* es dependiente de la humedad del papel durante la incubación, lo cual puede condicionar los resultados. Si el papel se seca, disminuye la humedad de la placa y disminuye el estímulo del hongo a crecer y esporular, lo cual podría llevar a una subestimación del valor de infección por *Fusarium* del grano.

A su vez, se observó que el humedecimiento de la espiga tiene un efecto sobre la concentración final de DON en grano. El agua libre por un lado puede producir el lixiviado de la toxina, pero por otro permitir la germinación de esporas del patógeno y posiblemente la ocurrencia de eventos infecciosos (Culler et al. 2007, Cowger y Arellano 2013). Se observó que el cultivar INIA Don Alberto con alta susceptibilidad a FE requirió menor duración de mojado para elevar su concentración de DON, respecto al cultivar LE 2375, que presenta mayor resistencia a la enfermedad. Además, el cultivar INIA Don Alberto, requirió menos cantidad de agua para que la toxina fuera lixiviada.

Por último, se observó que, si bien la caracterización sanitaria actual de los cultivares en comercialización en Uruguay permite predecir el nivel de FE máximo que se puede observar a campo en un año favorable, no predice la concentración final de DON en grano. Si bien se pudo agrupar a los cultivares por comportamientos diferenciales en su relación entre IFE-DON, se requiere una mayor cantidad de ensayos en distintos ambientes para poder realizar una caracterización de cultivares respecto a su comportamiento frente a la acumulación de DON, debido a la compleja relación entre los factores que determinan la concentración final de DON en grano.

6. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos permiten profundizar en el entendimiento de los distintos factores que influyen sobre la concentración final de DON en grano de trigo.

Se concluye que las correlaciones entre diferentes parámetros de la enfermedad y la concentración de DON fueron altamente dependientes del ambiente, es decir, de las condiciones ambientales y de la presión de inóculo del sistema.

El FDK cuantificado en pos-cosecha por el método *blotter test*, presentó mayor correlación con la concentración de DON, que el IFE.

En condiciones de baja presión de enfermedad, tanto el FDK mediante *blotter test*, la incidencia y el IFE tuvieron correlación significativa y alta con la concentración de DON. En cambio, en el experimento con alta presión de enfermedad el IFE y la incidencia no tuvieron correlación significativa con la concentración de DON, pero el FDK mediante *blotter test*, tuvo correlación significativa pero débil.

Respecto a la búsqueda de un buen predictor de los niveles de DON a cosecha, la variable que más se correlacionó con la concentración de DON fue FDK cuantificado por el método CGC, seguido por FDK cuantificado por *blotter test*. Estos dos métodos entre sí, tuvieron un coeficiente de correlación de $r=0,57$ y ambos son una buena herramienta para comprender la asociación entre IFE y DON.

Respecto al efecto del humedecimiento de la espiga sobre la concentración de DON, se concluye que el cultivar más resistente (LE 2375) tuvo mayor concentración de DON a los 30 días de riego niebla y luego la misma cayó con 40 días de niebla. Este comportamiento fue diferente al observado en el cultivar más susceptible (INIA Don Alberto), el cual requirió de menor duración del humedecimiento para elevar los niveles de DON y su disminución también fue observada con menor duración del humedecimiento respecto al cultivar más resistente.

En cuanto a frecuencia de humedad, no hay un patrón claro entre años y cultivares, pero se pudo observar que menor frecuencia de humedecimiento generó menor concentración de DON para ambos cultivares.

Si bien se pudo categorizar a los cultivares en grupos diferentes, según su comportamiento respecto a la sintomatología a la FE relacionada a la concentración de DON en el grano, la compleja influencia de los distintos factores en la concentración de DON y su interacción, impidió que se realice una caracterización de cultivares respecto a su comportamiento frente a la acumulación de DON final.

Por último, se concluye que el sistema de caracterización sanitaria actual de Uruguay, permite estimar la resistencia de los cultivares a la enfermedad, pero no permite estimar el comportamiento frente a la acumulación de DON, principalmente en años muy favorables para la enfermedad.

Por lo tanto, se propone realizar mayor cantidad de ensayos en distintos años y localidades, dada la alta variación en los comportamientos de los distintos cultivares en distintos ambientes, para poder caracterizar los cultivares según su acumulación de DON y así complementar la caracterización actual. También se deberían realizar estudios detallados sobre la genética de los cultivares, para poder definir, no solo el tipo de resistencia que presenta el cultivar frente a FE, si no también para conocer los mecanismos que están asociados a la detoxificación o a la inhibición de la producción de DON. Por otro lado, se debería profundizar en otras variables que afectan la concentración de DON final en el grano, como por ejemplo, el volumen de agua, el pH extracelular, las condiciones de suelo, entre otras. Se podría estudiar en mayor profundidad, el lavado con agua, de los granos que presentan toxinas y desarrollar una nueva técnica alterativa para la disminución de la concentración de DON. Por último, se sugiere la profundización de la toxicidad de las poblaciones de *Fusarium*.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas HK, Mirocha CJ, Gunther R. 1989. Mycotoxins produced by toxic *Fusarium* isolates obtained from agricultural and nonagricultural areas (Arctic) of Norway. *Mycopathologia*, 105(3): 143-151.
- Aoki T, Ward TJ, Kistler HC, O'donnell K. 2012. Systematics, phylogeny and trichothecene mycotoxin potential of *Fusarium* head blight cereal pathogens. *Japanese Society of Mycotoxicology Mycotoxins*, 62(2): 91-102.
- Argyris J, Van Sanford D, TeKrony D. 2003. *Fusarium graminearum* infection during wheat seed development and its effect on seed quality. *Crop Science*, 43(5): 1782-1788.
- Avellaneda J, Ayrala D, Cadenazzi M, Cea J, Fagundez P, Godiño M, Moriyama C, Rovetta N, Suburú G, Tresso G, Cordova D, Tihista H, de Aurrecoechea I, Vázquez D. 2020. Informe de calidad e inocuidad del trigo uruguayo. Zafra 2019/20. Mesa Nacional del Trigo. [En línea]. 15 setiembre 2020. Disponible en: https://catalogo.latu.org.uy/opac_css/doc_num.php?explnum_id=2866
- Boutigny AL, Richard-Forget F, Barreau C. 2008. Natural mechanisms for cereal resistance to the accumulation of *Fusarium* trichothecenes. *European Journal of Plant Pathology*, 121(4), 411-423.
- Brunner K, Kovalsky MP, Paolino G, Bürstmayr H, Lemmens M, Berthiller F, Schuhmacher R, Krska R, Mach RL. 2009. A reference-gene-based quantitative PCR method as a tool to determine *Fusarium* resistance in wheat. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 395(5): 1385-1394.
- CGC (Canadian Grain Commission). 2019. Identifying wheat and barley seed affected by *Fusarium* head blight (en línea). Consultado el 27 jun. 2020. Disponible en

<https://grainscanada.gc.ca/en/grain-quality/grain-grading/grading-factors/identifying-fusarium.html>

Cowger C, Arellano C. 2013. *Fusarium graminearum* infection and deoxynivalenol concentrations during development of wheat spikes. *Phytopathology*, 103(5): 460-471.

Cowger C, Patton-Özkurt J, Brown-Guedira G, Perugini L. 2009. Post-anthesis moisture increased *Fusarium* head blight and deoxynivalenol levels in North Carolina winter wheat. *Phytopathology*, 99(4): 320-327.

Culler MD, Miller-Garvin JE, Dill-Macky R. 2007. Effect of extended irrigation and host resistance on deoxynivalenol accumulation in *Fusarium*-infected wheat. *Plant Disease*, 91(11): 1464-1472.

Cumagun JR, Miedaner T. 2004. Segregation for aggressiveness and deoxynivalenol production of a population of *Gibberella zeae* causing head blight of wheat. *European Journal of Plant Pathology*, 110(8): 789-799.

Del Ponte EM, Moreira GM, Ward TJ, O'Donnel K, Nicolli CP, Machado FJ, Duffeck MR, Alves KS, Tessmann DJ, Waalwijk C, van der Lee T, Zhang H, Chulze SN, Stenglein SA, Pan D, Vero S, Vaillancourt LJ, Schmale III DG, Esker PD, Moretti A, Logrieco AF, H. Kistler C, Bergstrom GC, Viljoen A, Rose LJ, van Coller GJ, Lee, T. 2021. *Fusarium graminearum* species complex: A bibliographic analysis and web-accessible database for global mapping of species and trichothecene toxin chemotype. [En línea]. 1 julio 2021. Disponible en: <https://osf.io/sbwvh>

Del Ponte EM, Fernandes JM, Bergstrom GC. 2007. Influence of growth stage on *Fusarium* head blight and deoxynivalenol production in wheat. *Journal of Phytopathology*, 155(10): 577-581.

- Desjardins AE. 2008. Natural product chemistry meets genetics: when is a genotype a chemotype?. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(17): 7587-7592.
- Díaz de Ackermann MD, Pereyra, S. 2010. Fusariosis de la espiga de trigo y cebada. Manejo de Enfermedades en Trigo y Cebada. [En línea]. 15 julio 2020. Disponible en: <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/112761220910153559.pdf#page=97>
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2019. Producción [En línea]. En: Anuario estadístico agropecuario 2019. Montevideo: MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). Consultado el 12 marzo 2020. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/anuario-estadistico-diea-2019>
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2020. Producción [En línea]. En: Encuesta agrícola ganadera “Primavera 2020”. Montevideo: MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). Consultado el 16 marzo 2020. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/noticias/diea-presenta-resultados-encuesta-agricola-primavera-2020>
- Dweba CC, Figlan S, Shimelis HA, Motaung TE, Sydenham S, Mwadzingeni L, Tsilo TJ. 2017. Fusarium head blight of wheat: Pathogenesis and control strategies. *Crop Protection*, 91, 114-122.
- Edwards SG, Pirgozliev SR, Hare MC, Jenkinson P. 2001. Quantification of trichothecene-producing *Fusarium* species in harvested grain by competitive PCR to determine efficacies of fungicides against Fusarium head blight of winter wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4): 1575-1580.

ELIKA (Fundación Vasca para la seguridad alimentaria). 2013. Deoxinivalenol: [En línea]. Consultado el 19 febrero 2021. Disponible en: <https://seguridadalimentaria.elika.eus/deoxinivalenol/>

Engo N, Fuxman A, Gonzalez C, Negri L, Polenta G, Vaudagna S. 2015. Desarrollo de las exigencias de calidad e inocuidad de alimentos en el mundo (2025). Buenos Aires: Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva. [En línea]. 15 julio 2020. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Diego-Cristos/publication/308065030_Estado_de_arte_de_los_requerimientos_de_inocuidad_de_los_alimentos/links/57d8b60c08ae6399a3992f0b/Estado-de-arte-de-los-requerimientos-de-inocuidad-de-los-alimentos.pdf

FAO (Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura). 2020. [En línea]. En: Información sobre operaciones poscosecha. Consultado el 27 noviembre 2020. Disponible en: <http://www.fao.org/in-action/inpho/crop-compendium/cereals-grains/es/#:~:text=Trigo.,m%C3%A1s%20de%20%20000%20a%C3%B1os.&text=El%20trigo%20tambi%C3%A9n%20se%20utiliza,alimentos%20animales%20almid%C3%B3n%20y%20etanol.>

FAO (Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura). 2018. [En línea]. En: Residuos de plaguicidas en alimentos y piensos. Consultado el 28 julio 2020. Disponible en: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/maximum-residue-limits/es/>.

Gardiner DM, Osborne S, Kazan K, Manners JM. 2009. Low pH regulates the production of deoxynivalenol by *Fusarium graminearum*. Microbiology, 155(9): 3149-3156.

- Gautam P, Dill-Macky R. 2012. Fusarium head blight development and trichothecene accumulation in point inoculated *Fusarium* infected wheat heads. World Mycotoxin Journal, 5(1): 45-55.
- Godiño M, Pérez C, Pereyra S, Francia C, Vázquez D. 2020. URUTRIGO: Estrategias para viabilizar el trigo uruguayo mediante la mejora de su calidad. En: Anuario OPYPA. [En línea]. 27 julio 2021. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/anuario-opypa-2020/temas-politica/urutrigo-estrategias-para-viabilizar>
- IMPO 2001. Normativa y avisos legales del Uruguay. Registro Nacional de Leyes y Decretos: Tomo 2 Semestre: 2 Año: 2001. Página: 1869. Decreto N° 533/001. Consultado el 28 Jul. 2020. Disponible en: <https://www.impo.com.uy/bases/decretos/533-2001/4>
- Jansen C, Von Wettstein D, Schäfer W, Kogel KH, Felk A, Maier FJ. 2005. Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 102(46): 16892-16897.
- Jung Y, Park CS, Jeung JU, Kim CK, Park JC, Kang CS, Seo YW. 2010. Employment of wheat grain properties in evaluation of Fusarium head blight resistance. Journal of Crop Science and Biotechnology, 13(4): 275-281
- Koch HJ, Pringas C, Maerlaender B. 2006. Evaluation of environmental and management effects on Fusarium head blight infection and deoxynivalenol concentration in the grain of winter wheat. European Journal of Agronomy, 24(4): 357-366.

- Krska R, Molinelli A. 2007. Mycotoxin analysis: state-of-the-art and future trends. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(1): 145-148.
- Lattanzio VM, Pascale M, Visconti A. 2009. Current analytical methods for trichothecene mycotoxins in cereals. *Trends in Analytical Chemistry*, 28(6): 758–768
- Lemmens M, Scholz U, Berthiller F, Dall'Asta C, Koutnik A, Schuhmacher R, Ruckebauer P. 2005. The ability to detoxify the mycotoxin deoxynivalenol colocalizes with a major quantitative trait locus for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Molecular plant-microbe interactions*, 18(12): 1318-1324.
- Lemmens M, Buerstmayr H, Krska R, Schuhmacher R, Grausgruber H, Ruckebauer P. 2004. The effect of inoculation treatment and long-term application of moisture on *Fusarium* head blight symptoms and deoxynivalenol contamination in wheat grains. *European Journal of Plant Pathology*, 110(3): 299-308.
- Malbrán I, Lori GA. 2013. Agresividad, producción de micotoxinas y diversidad en las poblaciones de *Fusarium graminearum* de la región triguera argentina. Argentina. Universidad de la Plata. 128 p.
- Marín P. 2010. Análisis de factores ecofisiológicos que influyen en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de toxinas en especies de *Fusarium*. España. Universidad Complutense de Madrid. 233 p.
- Matthäus K, Dänicke S, Vahjen W, Simon O, Wang J, Valenta, H, Flachowsky G. 2004. Progression of mycotoxin and nutrient concentrations in wheat after inoculation with *Fusarium culmorum*. *Archives of Animal Nutrition*, 58(1): 19-35.

- Meca G, Zinedine A, Blesa J, Font G, Mañes J. 2010. Further data on the presence of *Fusarium* emerging mycotoxins enniatins, fusaproliferin and beauvericin in cereals available on the Spanish markets. Food and Chemical Toxicology, 48(5): 1412-1416.
- Ono E, Bordini J, Omori A, Hirozawa M, Ono M. 2016. Métodos imunológicos para a detecção de fungos toxigênicos e micotoxinas em grãos, alimentos e rações. Biotecnologia Aplicada à Agro&indústria. São Paulo: Blucher, 4, 895-936.
- OPYPA (Oficina de Programación y Política Agropecuaria). Anuario 2020. En: Análisis sectorial y cadenas productivas. 2020. Montevideo: MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). Consultado el 25 febrero 2021. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/anuario-opypa-2020>
- Papadopoulou-Bouraoui 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(6): 607-617.
- Pasquali M, Migheli Q. 2014. Genetic approaches to chemotype determination in type B-trichothecene producing Fusaria. International Journal of Food Microbiology, 189, 164-182.
- Paul PA, Lipps PE, Madden LV. 2005. Relationship between visual estimates of *Fusarium* head blight intensity and deoxynivalenol accumulation in harvested wheat grain: A meta-analysis. Phytopathology, 95(10): 1225-1236.
- Pereyra S, Acosta Y. 2014. Guía para el manejo de la Fusariosis de la espiga en trigo. Instituto nacional de investigación agropecuaria, Uruguay. [En línea]. 13 julio 2020. Disponible en:

[http://www.inia.uy/Documentos/INIA%20La%20Estanzuela/INIA_guia%20manejo%20FE%20trigo%202014_web%20\(1\).pdf](http://www.inia.uy/Documentos/INIA%20La%20Estanzuela/INIA_guia%20manejo%20FE%20trigo%202014_web%20(1).pdf)

Pereyra S, Dill-Macky R. 2010. *Fusarium* species recovered from wheat and barley grains in Uruguay, pathogenicity and deoxynivalenol content. *Agrociencia Uruguay*: 14(2): 33-44.

Ramírez A, Diana L. 2019. Influencia de las condiciones ambientales sobre el perfil de tricotecenos producido por cepas de *Fusarium graminearum* con distintos quimiotipos. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 277p.

Rudd JC, Horsley RD, McKendry AL, Elias EM. 2001. Host plant resistance genes for *Fusarium* head blight. *Crop Science*, 41(3): 620-627.

Salgado JD, Madden LV, Paul PA. 2015. Quantifying the effects of *Fusarium* head blight on grain yield and test weight in soft red winter wheat. *Phytopathology*, 105(3): 295-306.

Sneller C, Guttieri M, Paul P, Costa J, Jackwood R. 2012. Variation for resistance to kernel infection and toxin accumulation in winter wheat infected with *Fusarium graminearum*. *Phytopathology*, 102(3): 306-314.

Sosa D, Escobar A, Faure R. 2017. Deoxinivalenol: métodos de análisis de residualidad en cereales. Toxicidad en animales de granjas. *Revista de Salud Animal*, 39(2): 00-00.

Stępień Ł, Chelkowski J. 2010. *Fusarium* head blight of wheat: pathogenic species and their mycotoxins. *World Mycotoxin Journal*, 3(2): 107-119.

- Umpiérrez-Failache, M. 2013. Estrategias para la identificación y caracterización de patógenos causantes de fusariosis en trigo. Tesis de maestría. Montevideo, Uruguay. Facultad de Química. 111 p.
- Umpiérrez-Failache M, Garmendia G, Pereyra S, Rodríguez-Haralambides A, Ward TJ, Vero S. 2013. Regional differences in species composition and toxigenic potential among *Fusarium* head blight isolates from Uruguay indicate a risk of nivalenol contamination in new wheat production areas. *International journal of food microbiology*, 166(1): 135-140.
- Valverde-Bogantes E. 2017. Species and Trichothecene Genotypes of *Fusarium* Head Blight Pathogens in Nebraska, USA in 2015-2016. Tesis de maestría. University of Nebraska-Lincoln. 98 p.
- Wegulo SN. 2012. Factors influencing deoxynivalenol accumulation in small grain cereals. *Toxins*, 4(11): 1157-1180.
- Zhou W, Kolb FL, Yu J, Bai G, Boze LK, Domier LL. 2004. Molecular characterization of *Fusarium* head blight resistance in Wangshuibai with simple sequence repeat and amplified fragment length polymorphism markers. *Genome*, 47(6): 1137-1143.