

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales



Tesis presentada para optar al título de Magister Scientiae de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata

Autor: Biólogo Nicolás Salines

Caracterización fenotípica de la resistencia a Fusariosis de la espiga (*Fusarium graminearum*) en RILs de trigo pan (*Triticum aestivum* L.) originadas de la cruce de PROINTA Granar x

BIOINTA 1005

Ing. Agr. MSc. Enrique Javier Alberione

Director

Dra. Teresa María Alconada

Co-Director

Lugar de trabajo: INTA, EEA Marcos Juárez, Grupo Patología de trigo (Marcos Juárez, Córdoba), CINDEFI, CONICET-UNLP (La Plata, Buenos Aires) y Departamento de Química Orgánica (Facultad de Ciencia Exactas y Naturales de la UBA).

Aprobada por el jurado de Tesis:

Dr. Ismael Malbrán

Dra. Ana María Castro

Dra. María Marta Reynoso

La Plata, Diciembre del 2019

Índice

Índice de Tablas	VII
Índice de Figuras	IX
Abreviaturas	X
Resumen	XI
Abstract	XII
Capítulo I: Introducción	1
1. Cultivo de trigo	1
1.1 El trigo y su morfología	2
1.2 Composición del grano	4
2. El trigo de la actualidad	5
3. Proteínas de reserva: Gluteninas y Gliadinas	5
3.1 Variación alélica en las gluteninas de alto peso molecular (GAPM)	7
3.2 Métodos de análisis proteicos	9
4. Fusariosis de la espiga de Trigo	9
4.1 Factores predisponentes de la enfermedad	10
4.2 Sintomatología y daños	11
4.3 Ciclo biológico de la enfermedad	12
4.4 Agresividad: componentes y evaluación	14
5. Micotoxinas	15
5.1 Genotipo y quimiotipo de <i>Fusarium graminearum</i>	16
5.2 Regulación del contenido de micotoxinas	17
5.3 Detección de Micotoxinas	17
6. El Grano	18
7. Tipos de resistencia a la enfermedad	18

8. Manejo de la enfermedad.....	19
9. Desarrollo de Líneas Híbridas Recombinantes.....	20
Hipótesis	22
Objetivo general	22
Objetivos específicos.....	22
Capitulo II: Caracterización Fenotípica	24
Materiales y Métodos	25
1. Material Vegetal	25
2. Desarrollo de las RILs	25
3. Obtención del inóculo	25
4. Ensayos en invernáculo	28
5. Ensayos a campo bajo telado con infección artificial y humedad controlada (Jaula)	29
6. Ensayos a campo.....	30
7. Análisis Estadístico.....	31
Resultados y Discusión	32
1. Análisis multivariado por Conglomerado o Cluster	35
2. Análisis de la varianza de medias para la severidad (ANAVA).....	38
3. Ensayo en Invernáculo.....	41
4. Ambiente de campo bajo telado con infección artificial y riego	44
5. Ensayo a campo bajo infección natural	46
6. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC)	48
Conclusiones	51
Capitulo III: Análisis de las Harinas	53
Materiales y Métodos	55

1. Molienda de las muestras de trigo	55
2. Análisis de Micotoxinas.....	55
2.1 Extracción	55
2.2 Limpieza (clean-up).....	55
2.3 Detección y cuantificación de DON, 15-ADON, 3-ADON	56
3. Análisis de Proteínas.....	56
3.1 Extracción proteica	56
3.2 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).....	57
3.3 Cromatografía Líquida de Alta Resolución por Fase Reversa HPLC-FR.....	58
3.4 Análisis de calidad de las harinas: Score de Payne	58
3.5 Análisis de los perfiles cromatográficos	58
4. Análisis Estadísticos	59
Resultados y Discusión	60
1. Micotoxinas	60
2. Análisis de Proteínas.....	65
2.1 Identificación alélica de las Gluteninas de Alto Peso Molecular	65
2.2 Asignación del Score de Payne.....	67
2.3 Análisis de densitometría en las Gluteninas de Alto Peso Molecular	69
3. Análisis de gluteninas por cromatografía líquida de alta eficacia por fase reversa.	72
Conclusiones	78
Conclusiones Finales.....	79
Bibliografía.....	81
Anexo I	97
Anexo II.....	98

Dendrograma Invernáculo 2015	98
Dendrograma Invernáculo 2016	99
Dendrograma Jaula 2016	100
Dendrograma campo 2016.....	101
Anexo III	102
Análisis de la varianza de medias para la severidad en Invernáculo 2015	102
Análisis de la varianza de medias para la severidad en Invernáculo 2016	105
Análisis de la varianza de medias para la severidad en Jaula 2016.....	108
Análisis de la varianza de medias para la severidad en Campo 2016.....	113

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación de las proteínas de trigo de acuerdo a su solubilidad.....	4
Tabla 2. Variación alélica de los genes de las gluteninas de alto peso molecular	7
Tabla 3. Scores individuales correspondientes a distintos alelos de GAPM (combinación de subunidades x+y por locus Glu-1).	8
Tabla 4. Porcentaje de homocigosis en generaciones de RILs (Törjék et al. 2006).	20
Tabla 5. Frecuencias absolutas y relativas de las RILs para las variables medidas en los ensayos de Invernáculo.	32
Tabla 6. Frecuencias absolutas y relativas de las RILs para las variables que fueron medidas en el ensayo a campo protegido por un telado con inoculación artificial y suministro de humedad.	33
Tabla 7. Frecuencias absolutas y relativas de las RILs para las variables que fueron medidas a campo.	34
Tabla 8. Resultado del análisis por conglomerado de líneas moderadamente resistentes a la FET en cada ambiente de evaluación.	36
Tabla 9. Análisis por conglomerado de líneas susceptibles a la FET en cada ambiente de evaluación.	37
Tabla 10. Valores medios de Severidad de las líneas que mostraron moderada resistencia a la FET.	39
Tabla 11. Valores medios de Severidad de las líneas más susceptibles a la FET por ANAVA.	39
Tabla 12. Comparación en el agrupamiento de líneas según análisis de varianza de medias (severidad) y análisis de conglomerado.	40
Tabla 13. Severidad y porcentaje de granos sanos de las líneas seleccionadas.	42
Tabla 14. Temperatura máxima en los meses de cultivo.	43
Tabla 15. Correlación de Pearson entre Severidad y % de Granos Sanos.	44
Tabla 16. Incidencia, Severidad e Índice de Fusarium de las líneas seleccionadas.	45
Tabla 17. Incidencia, Severidad e Índice de Fusarium de las líneas seleccionadas.	47
Tabla 18. Comparación del AUDPC, severidad invernáculo 2015 y severidad promedio de las líneas seleccionadas.	49

Tabla 19. Coeficientes de correlación de Pearson y sus probabilidades entre el AUDPC, severidad invernáculo 2015 y severidad promedio.	50
Tabla 20. Coeficiente de regresión para el AUDPC.	50
Tabla 21. Coeficientes de regresión y estadísticos asociados.	50
Tabla 22. Composición de las soluciones de fijación de la tinción.	58
Tabla 23. Contenido de micotoxinas en líneas moderadamente resistentes a la FET.....	61
Tabla 24. Correlación de Pearson: Coeficientes\probabilidades.....	62
Tabla 25. Contenido de micotoxinas en líneas susceptibles a la FET.	63
Tabla 26. Correlación de Pearson entre el contenido demicotoxinas y la severidad.	64
Tabla 27. Score de calidad obtenida a partir de SDS-PAGE y datos de severidad promedio.	68
Tabla 28. Análisis comparativo de medias para los valores de densitometría en los geles de poliacrilamida en líneas que presentaron el patrón de GAPM del parental ProINTA Granar.....	70
Tabla 29. Análisis de correlación entre los valores de intensidad en las bandas de GAPM y la severidad.....	70
Tabla 30. Análisis comparativo de medias para los valores de densitometría de las líneas con el patrón de GAPM correspondiente al parental BioINTA 1005.....	71
Tabla 31. Análisis de correlación entre la densidad de banda de las subunidades de las GAPM y la severidad.....	72
Tabla 32. Área de los picos proteicos para cada subunidad de las GAPM obtenidos por HPLC, contenido de micotoxinas y valores de severidad.....	74
Tabla 33. Correlación de Pearson entre el área de los picos proteicos, micotoxinas y severidad.	74
Tabla 34. Área de los picos proteicos obtenidos por HPLC para las subunidades de las GAPM, contenido de micotoxinas y valores de severidad.	76
Tabla 35. Correlación de Pearson ente el área de las subunidades proteicas, micotoxinas y severidad.	76

Índice de Figuras

Figura 1. Apéndices para la identificación de la planta de trigo.....	3
Figura 2. Esquema de una espiguilla de trigo	3
Figura 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las subunidades de gliadinas.	6
Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las subunidades de gluteninas de alto peso molecular (GAPM) y de gluteninas de bajo peso molecular (GBPM).	7
Figura 5. Factores que interactúan para el desarrollo de la enfermedad.....	10
Figura 6. Ciclo de la fusariosis del trigo, según Melo Reis y Carmona (2002).	14
Figura 7. Crecimiento de aislamientos de <i>F. graminearum</i> en Erlenmeyer de 250 mL. .	27
Figura 8. Suspensión de conidios (A) y macroconidios de <i>F. graminearum</i> (B).	27
Figura 9. Desarrollo de la población en el invernáculo.	28
Figura 10. Escala de severidad utilizada para la evaluación de la enfermedad (Stack y McMullen, 1995) (A), espigas de trigo infectadas con <i>F. graminearum</i> (B), granos de trigo sanos (izq.) y enfermos (der.) por presencia de <i>F. graminearum</i> (C).	29
Figura 11. Hills plots de la población en el ambiente de campo bajo telado con infección artificial y humedad controlada.....	30
Figura 12. Población en el ambiente de campo con infecciones naturales.	31
Figura 13. Regresión entre el AUDPC y la severidad promedio de todos los ensayos. .	51
Figura 14. Gel de poliacrilamida-SDS para la identificación de patrones de GAPM en las líneas seleccionadas.	66
Figura 15. Gel de poliacrilamida para el análisis de densitometría.	69
Figura 16. Gel de poliacrilamida para el análisis de densitometría.....	71
Figura 17. Cromatografías en HPLC-RP de las fracciones de las gluteninas de alto peso molecular en: A - línea 22, B - línea 25, C - línea 53 y D - línea 120. Sobre los picos se muestran los valores de las áreas calculadas.....	73
Figura 18. Cromatografías en HPLC-RP de las fracciones de las GAPM en: A – línea 31, B – línea 41, C – línea 52, D – línea 62 y E – línea 75.....	75

Abreviaturas

15-ADON: 15-acetildeoxinivalenol.

3-ADON: 3-acetildeoxinivalenol.

ANAVA: análisis de la varianza.

AUDPC: area under disease progress curve.

CG: cromatografía gaseosa.

DON: deoxinivalenol.

FET: fusariosis de la espiga de trigo.

FUS X: fusarenona.

GAPM: gluteninas de alto peso molecular.

GBPM: glutenina de bajo peso molecular.

HPLC: high performance liquid chromatography.

IF: índice de fusarium.

NIV: nivalenol.

RILs: recombinant inbred lines.

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

Resumen

Fusarium graminearum es considerado el principal agente causal de la Fusariosis de la espiga de trigo (FET) en Argentina. Se trata de una enfermedad de infección floral, que se presenta esporádicamente y es dependiente de las condiciones ambientales; especialmente de la alta humedad relativa y de las temperaturas medias. Produce pérdidas de rendimiento y también afecta la calidad comercial y panadera, por la presencia de micotoxinas, fundamentalmente tricotecenos del tipo B. En este estudio se evaluó una población de 120 RILs, 2 parentales (ProINTA Granar y BioINTA 1005) y 4 testigos (2 susceptibles y 2 moderadamente resistentes a la FET) en 3 ambientes diferentes de evaluación. Para generar la infección en las espigas se empleó una mezcla de 9 cepas de *F. graminearum* con efectivas patogenicidad y agresividad. Los individuos fueron caracterizados según los distintos tipos de resistencia genética (**Tipo I** y **Tipo II**). En invernáculo se registraron los valores de severidad en 4 momentos (7, 14, 21 y 28 días después de la inoculación) para poder calcular los valores de área bajo la curva del progreso de la enfermedad. A partir de los análisis estadísticos de Conglomerado y ANOVA se pudo identificar líneas con distintos niveles de resistencia, permitiendo seleccionar líneas de interés en las cuales los granos producidos se les realizaron determinaciones por cromatografía gaseosa (CG) para evaluar las concentraciones de micotoxinas. Mediante el estudio por electroforesis de SDS-PAGE se analizó la segregación de las subunidades de las gluteninas de alto peso molecular (GAMP) y se utilizó el software GelAnalyzer2010 para estudiar la relación entre la señal de las bandas proteicas de las subunidades de GAPM y los niveles de infección de la enfermedad en las espigas. A través de la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) se midieron los picos proteicos de la GAMP en muestras que presentaban valores contrastante para los niveles de severidad de las espigas y la producción de micotoxinas en granos.

Finalmente, los estudios realizados permitieron identificar un grupo de líneas moderadamente resistentes a la FET, donde algunas de ellas se destacaron en sus perfiles proteicos demostrando tener una buena calidad de grano.

Abstract

Fusarium graminearum is considered the main causative agent of Fusarium head blight of wheat (FHB) in Argentina. It is a disease of floral infection, which occurs sporadically and is dependent on environmental conditions; especially because of the high relative humidity and average temperatures. It produces yield losses and also affects the commercial and bakery quality, due to the presence of mycotoxins, mainly trichothecenes of type B. In this study, was evaluated a population of 120 RILs, 2 parents (ProINTA Granar and BioINTA 1005) and 4 witnesses (2 susceptible and 2 moderately resistant to FHB) in 3 different evaluation environments. To generate infection in the spikes, was used a mixture of 9 strains of *F. graminearum* with effective pathogenicity and aggressiveness. The individuals were characterized according to the different types of genetic resistance (**Type I** and **Type II**). In the greenhouse, were registered the severity values in 4 moments (7, 14, 21 and 28 days after inoculation) in order to calculate the values of area under the disease progress curve (AUDPC). From the statistical analyzes of Conglomerate and ANOVA, lines with different levels of resistance could be identified, allowing the selection of lines of interest in which the grains produced were determined by gas chromatography (GC) to evaluate mycotoxin concentrations. The SDS-PAGE electrophoresis study analyzed the segregation of high molecular weight glutenins subunits (HMW-GS) and the GelAnalyzer2010 software was used to study the relationship between the signal of the HMW-GS protein bands and the levels of disease infection on the spikes. Through the high performance liquid chromatography technique (HPLC), the protein peaks of the HMW-GS were measured in samples that showed contrasting values for the severity levels of the spikes and the production of mycotoxins in grains.

Finally, the studies carried out allowed to identify a group of moderately resistant lines to the FHB, where some of them highlighted in their protein profiles demonstrating to have a good grain quality.

Capítulo I: Introducción

1. Cultivo de trigo

El trigo (*Triticum aestivum* L.) es uno de los tres cultivos más extendidos en el mundo, junto al maíz y el arroz, y el más ampliamente consumido por el hombre en la civilización occidental desde la Antigüedad. El origen del trigo actual se encuentra en la región asiática comprendida entre los ríos Tigris y Éufrates, en la zona mesopotámica. Desde Oriente Medio el cultivo del trigo se difundió hacia todo el mundo. Fue uno de los primeros cultivos domesticados, y por más de 8.000 años ha sido el alimento básico de las principales civilizaciones de Europa, Asia occidental y África del Norte. Las colonizaciones anglosajona y española fueron las responsables de introducir el cultivo en América, donde se expandió por las grandes llanuras del norte (cuena del Mississippi-Missouri, Grandes Llanos), del sur (Llanura Pampeana) y en Australia, en la llanura de sudoeste australiano (Evans & Peacock 1981). Actualmente, el trigo ocupa un área de siembra superior a cualquier otro cultivo comercial y continúa siendo la fuente más importante de granos alimenticios para humanos (FAO 1999). Los principales países productores de este cultivo son China, Unión Europea, India, EEUU, Rusia, Europa Oriental, Canadá, Australia y Argentina, siendo los principales exportadores EEUU, Canadá, Unión Europea, Argentina y Australia. Argentina aporta el 10% del volumen comercializado internacionalmente, lo que representa alrededor del 60% del total de su producción (FAO 2015).

El trigo pertenece a la familia de las Gramíneas; fundamentalmente, existen dos especies diferentes para la industria molinera (FAO 1999):

a) *Triticum aestivum*: corresponde al trigo harinero, el cual se utiliza básicamente en la producción de harina para pan, galletas y repostería.

b) *Triticum turgidum* L. subsp. *Durum* (Desf.) van Slageren o *Triticum durum* Desf.: corresponde al trigo duro o candeal. Se destina fundamentalmente a la obtención de semolina para la fabricación de fideos y pastas.

El grano de trigo es utilizado para hacer harina y una gran variedad de productos alimenticios (FAO 1999). Al igual que en los últimos años, en la campaña triguera 2016/17

el mayor productor a nivel mundial fue la Unión Europea, con más de 150 millones de toneladas de producción anuales. La Argentina, por su parte, ocupa el puesto número 11 en el ranking mundial, con una producción récord de 17,5 millones de toneladas (USDA 2017b). De acuerdo con información del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), la menor producción mundial de trigo en los últimos años se observó en la cosecha 2012/13 con 645 millones de toneladas, lo que significó un descenso del 5,2% respecto del año anterior (USDA 2017a). Las causas de esta caída en la producción se encontraron en la ocurrencia de fuerte estrés por sequía y altas temperaturas en las principales regiones de cultivo, como en el caso de Rusia (FAO 2012). En esta misma campaña 2012/13, la producción triguera Argentina también sufrió grandes pérdidas en rendimiento y en la calidad de sus harinas debido a la severa incidencia de la Fusariosis de la espiga del trigo. Especialmente en el cuadrante NE de la Región Pampeana, las fases de espigazón, floración e inicio de llenado del grano coincidieron con la ocurrencia de períodos muy húmedos y templado-cálidos que favorecieron el desarrollo de *Fusarium* spp. (Anone 2013; Carmona 2012; Velazquez 2012).

1.1 El trigo y su morfología

El trigo pertenece a la Clase *Liliopsida* (monocotiledóneas), Orden *Poales*, Familia *Poaceae* (Gramíneas), Subfamilia *Pooideae*, Tribu *Triticeae* y Género *Triticum*. El trigo es una planta herbácea anual de una altura entre 0,7 y 1,2 m, con una raíz fasciculada (o raíz en cabellera), y un único tallo principal con varios macollos por planta. Las hojas del trigo se componen básicamente de dos partes: una vaina hendida longitudinalmente, que envuelve una porción del tallo por sobre el nudo, y una lámina relativamente larga y angosta. En la base de cada lámina se presentan dos apéndices conocidos con el nombre de aurículas (**Figura 1**). La presencia o ausencia de aurículas y el tamaño de ellas son características fundamentales para lograr diferenciar las distintas especies de cereales durante los estadios vegetativos (Biología de cultivos anuales 2018).

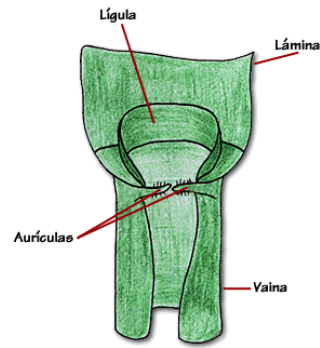


Figura 1. Apéndices para la identificación de la planta de trigo.

La inflorescencia de la espiga está compuesta por un raquis o tallo central de entrenudos cortos, sobre el cual van dispuestas de 13 a 25 espiguillas en forma alterna. Cada espiguilla presenta externamente dos brácteas denominadas glumas y contiene tres a cinco antecios dispuestos sobre una raquilla. Cada uno de los antecios se compone de una lemma o glumela inferior, de una pálea o glumela superior y de una flor. En la mayoría de los cultivares las lemmas se prolongan en forma de arista, originando espigas barbadas como se observan en la **Figura 2** (Biología de cultivos anuales 2018).

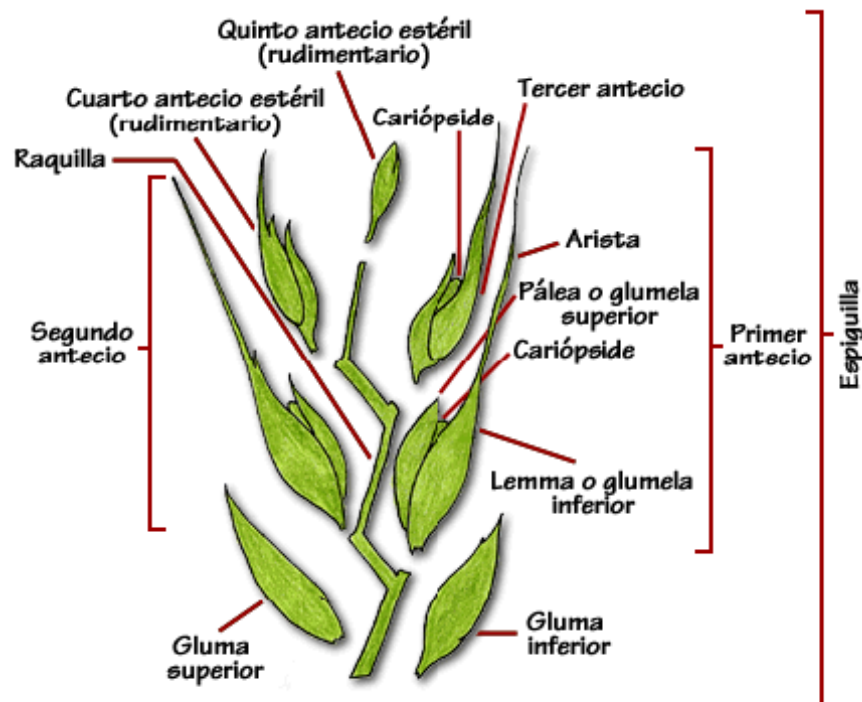


Figura 2. Esquema de una espiguilla de trigo

El fruto típico de las gramíneas es un cariósipide, comúnmente llamado grano. Es un fruto simple, formado a partir de un único carpelo, uniseminado, seco e indehisciente, en el cual el integumento y pericarpio se han fusionado, formando una piel protectora. El tamaño del grano de trigo depende de la variedad, teniendo una longitud media de 8 mm y un peso medio de 35 mg.

1.2 Composición del grano

El grano de trigo está compuesto principalmente por almidón, proteínas, minerales, vitaminas y lípidos (Matz 1999; Shewry & Halford 2002). Las proteínas del trigo se clasifican por su solubilidad de acuerdo con Osborne (1907) en cuatro fracciones, las cuales se detallan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Clasificación de las proteínas de trigo de acuerdo a su solubilidad.

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

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

La elasticidad del gluten es generalmente conocida como fuerza de masa. En general, masas fuertes son requeridas para la elaboración de pan y pastas, mientras que masas débiles son requeridas para la elaboración de bizcochuelos y galletitas. Estas propiedades únicas del gluten están determinadas por las interacciones moleculares establecidas por las proteínas que lo componen, gluteninas y gliadinas (Balakireva & Zamyatnin 2016; Ortolan & Steel, 2017).

El rol biológico del gluten es proveer un almacenamiento de aminoácidos para la germinación del embrión. Durante el llenado de grano, las células del endosperma se llenan de almidón, los cuerpos proteicos se desorganizan y tienden a unirse entre sí formando una matriz de proteínas que rodean a los gránulos de almidón.

2. El trigo de la actualidad

El trigo moderno es el resultado de la hibridación y selección efectuadas durante años para conseguir variedades de alto potencial de rendimiento, promovidas durante la denominada Revolución Verde, en la segunda mitad del Siglo XX, y variedades de alto contenido de gluten, ya que sus cualidades viscoelásticas y adhesivas son demandadas por la industria alimentaria. Los cultivares desarrollados durante la Revolución Verde obtuvieron un gran éxito en el aumento de la producción, pero no se dio suficiente relevancia a la calidad nutricional; en los últimos años la calidad industrial y nutricional se ha constituido en un objetivo de muchos programas de mejoramiento (Belderok 2000, Delcour 2012).

El trigo moderno presenta un alto contenido de hidratos de carbono, bajo contenido de proteínas de baja calidad por ser deficientes en aminoácidos esenciales, y un contenido desequilibrado de ácidos grasos esenciales, vitaminas, minerales y otros factores de calidad nutricional, respecto a sus ancestros (FAO 2013; Sands 2009). Asimismo, presenta una mayor capacidad citotóxica e inmunogénica, debido a su elevado contenido de gluten (80-90% del total de las proteínas) (Fasano 2015; Bressan 2016).

El grano de trigo debe tener un balance adecuado en las propiedades del gluten; la excesiva elasticidad limita la expansión de la masa pero una insuficiente elasticidad (mayor tenacidad) no permite la retención del dióxido de carbono que proporciona una estructura porosa a la masa, que se fija al hornear (Shewry *et al.* 2002 A).

3. Proteínas de reserva: Gluteninas y Gliadinas

Las proteínas que conforman las gliadinas son polipéptidos monoméricos de aproximadamente 50 kD, mientras que las gluteninas consisten en grandes polipéptidos asociados por puentes disulfuro con pesos moleculares que varían entre 100.000 y millones de kD (Sapirstein & Fu 1998; Veraverbeke & Delcour 2002; Arfvidsson *et al.* 2004). Las gliadinas se clasifican en ω , α , β y γ de acuerdo con su movilidad en geles de poli(acrilamida) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) como se muestra en la **Figura 3** (Hamauzu

et al. 1974). Al ser hidratadas, estas proteínas desarrollan cualidades de adhesión; sin embargo, tienen poca o nula resistencia a la extensión. Estas cualidades son responsables de la viscosidad y extensibilidad de la masa, facilitando la fluidez y expansión de la misma, contribuyendo a aumentar el volumen de la pieza del pan (Khatkar & Schofield 2002; Faergestad *et al.* 2004; Belton 2005).

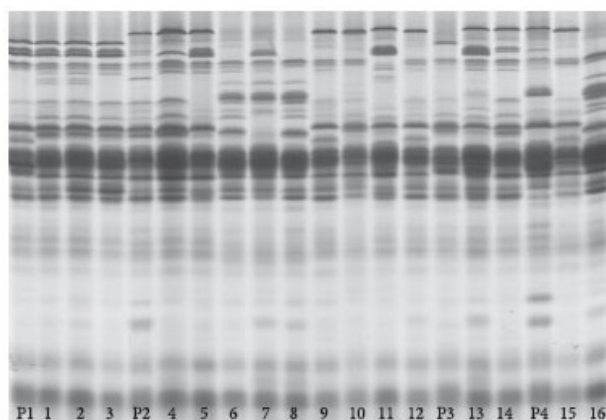


Figura 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las subunidades de gliadinas.

Las gluteninas se pueden clasificar en subunidades de alto (GAPM) y bajo peso molecular (GBPM) como se muestra en la **Figura 4** (D'Ovidio & Masci 2004; Belton 2005). Su capacidad de entrecruzamiento contribuye tanto a la textura y la reología de la masa, como a la calidad panadera de las harinas, dado que son responsables de su elasticidad y cohesividad (Payne *et al.* 1987; Shewry *et al.* 2001; Kamal *et al.* 2009).

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

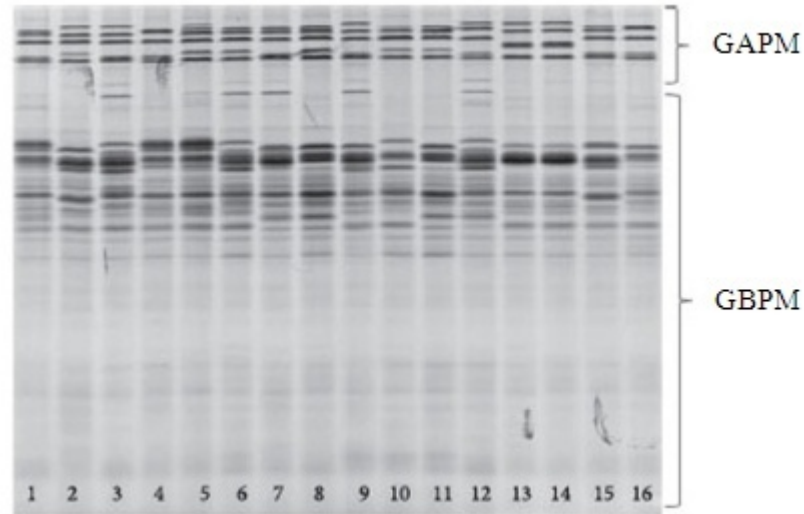


Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las subunidades de gluteninas de alto peso molecular (GAPM) y de gluteninas de bajo peso molecular (GBPM).

3.1 Variación alélica en las gluteninas de alto peso molecular (GAPM)

Los genes que codifican para las GAPM se ubican en tres locus distribuidos en el brazo más largo de los cromosomas 1A, 1B y 1D; son denominados *Glu A1*, *Glu B1* y *Glu D1* y entre todos conforman el grupo Glu-1 (Payne *et al.* 1987). Cada locus tiene una variación alélica diferente que se detalla en la **Tabla 2** (Payne & Laurence 1983; Sutton 1991).

Tabla 2. Variación alélica de los genes de las gluteninas de alto peso molecular

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

La variación alélica de estas subunidades está muy relacionada con los parámetros de calidad, por lo que Payne *et al.* (1984, 1987) generaron un score que asocia la variante alélica con los resultados de calidad de las pruebas de sedimentación en SDS (**Tabla 3**). Rogers *et al.* (1989) desarrollaron una modificación al score de Payne, tomando en cuenta la pérdida de calidad panadera como producto de la translocación 1BL/1RS, llamada

“introgresión con centeno”. Por otro lado, factores ambientales tales como la disponibilidad de agua y nutrientes, la variación de temperatura y las condiciones pre y post cosecha, pueden provocar cambios en la relación gliadinas/gluteninas, lo que hace variar la calidad potencial (Weegels *et al.* 1996; Don *et al.* 2006; Sapirstein *et al.* 2007; Kamal *et al.* 2009).

Tabla 3. Scores individuales correspondientes a distintos alelos de GAPM (combinación de subunidades x+y por locus Glu-1).

Puntaje de calidad	Locus		
	<i>Glu-A1</i>	<i>Glu-B1</i>	<i>Glu-D1</i>
4			5+10
3	1	17+18	
3	2*	7+8	
3		13+16	
2		7+9	2+12
2			3+12
1	nulo	7	4+12
1		6+8	
1		20	

El índice GLU-1 se obtiene de sumar los scores de los alelos presentes en los tres locus Glu-1 de una variedad. Por ejemplo, una variedad que posea la combinación 1, 7+9, 2+12 genera un índice GLU-1 de $3+2+2=7$.

En Argentina, los distintos cultivares de trigo se clasifican en tres grupos de calidad, basados en propiedades como el peso hectolítrico, contenido de proteína del grano, rendimiento en harina, contenido de cenizas, contenido de gluten húmedo, estabilidad farinográfica, volumen de pan y, principalmente, fuerza panadera (W alveográfico) (Miranda 2001; Cuniberti 2003, 2004). El Grupo I (G1) incluye trigos para panificación industrial ($340 < W < 600$); el Grupo II (G2), trigos aptos para panificación tradicional ($240 < W < 340$), y el grupo III (G3), trigos que pueden ser usados en panificación directa ($180 < W < 240$). Cada cultivar de trigo presenta valores dentro de un rango determinado de acuerdo a sus características genéticas, modificado por el ambiente, de acuerdo a sitio de

evaluación, año de campaña y a los efectos de la interacción genotipo – ambiente; esto hace que la clasificación deba actualizarse constantemente.

3.2 Métodos de análisis proteicos

Dada la estrecha relación existente entre la composición proteica y la calidad o funcionalidad de las harinas, a lo largo del tiempo se han propuesto distintos protocolos para la cuantificación de las fracciones proteicas del grano de trigo. Técnicas fiables y sensibles se han empleado en estos estudios, como la cromatografía líquida (HPLC) de fase reversa o exclusión molecular y diferentes técnicas electroforéticas; todas revisten cierta complejidad, tiempo y costos en equipamiento. Protocolos de fraccionamiento proteico basados en su diferencial de solubilidad en solventes y posterior lectura en espectrofotómetro-UV han resultado ser fiables, de bajo costo, sencillos y requieren poca cantidad de muestra para el análisis, por lo que resultan adecuados en programas de mejoramiento de trigo (Hernández Espinosa *et al.* 2013).

4. Fusariosis de la espiga de Trigo

La Fusariosis de la espiga de trigo (FET) es causada por diferentes especies del género *Fusarium*; es una enfermedad muy importante en la Argentina y en la mayoría de las áreas productoras de trigo del mundo (McMullen *et al.* 1997; Monds *et al.* 2005). En nuestro país, el principal agente etiológico es *F. graminearum*, perteneciente al Phylum Ascomycota, Orden Hypocreales, Familia Hypocreaceae); ha causado al menos 20 epidemias de variable intensidad en los últimos 50 años. El síntoma principal de la enfermedad es una decoloración de las espiguillas en la espiga antes de la madurez. Por ser una enfermedad de tipo floral, se inicia durante el estadio de floración, anthesis o en inicios de llenado de grano, bajo condiciones ambientales templadas a cálidas, en períodos de alta humedad como consecuencia de lluvias o lloviznas (Bai & Shaner 1994). Las pérdidas de rendimiento producidas por esta enfermedad pueden llegar al 50% en condiciones de epidemias severas, en variedades muy susceptibles; en epidemias moderadas, pueden esperarse pérdidas entre 10% y 20%. Dichas pérdidas están relacionadas con la esterilidad de las espiguillas y la formación de granos poco desarrollados (chuzos), castigados en la comercialización por tener una constitución alterada y bajo peso hectolítrico. A esto debe

sumarse la contaminación con micotoxinas que limita la utilización del producto por su toxicidad para los animales y el hombre (Ramírez *et al.* 2004).

4.1 Factores predisponentes de la enfermedad

En la naturaleza, la enfermedad es una función combinada o interacción simultánea entre un hospedador susceptible, un patógeno virulento y un ambiente favorable, con lo que se conforma el comúnmente llamado triángulo de la enfermedad (De Wolf & Isard 2007) (**Figura 5**). Por otro lado, la influencia del hombre es decisiva en el desarrollo de la enfermedad, al incorporar cultivos, prácticas de manejo y sistemas de control, por lo cual las epidemias se definen como el incremento temporal y espacial de la enfermedad y dependerán de la interacción entre todos estos factores.

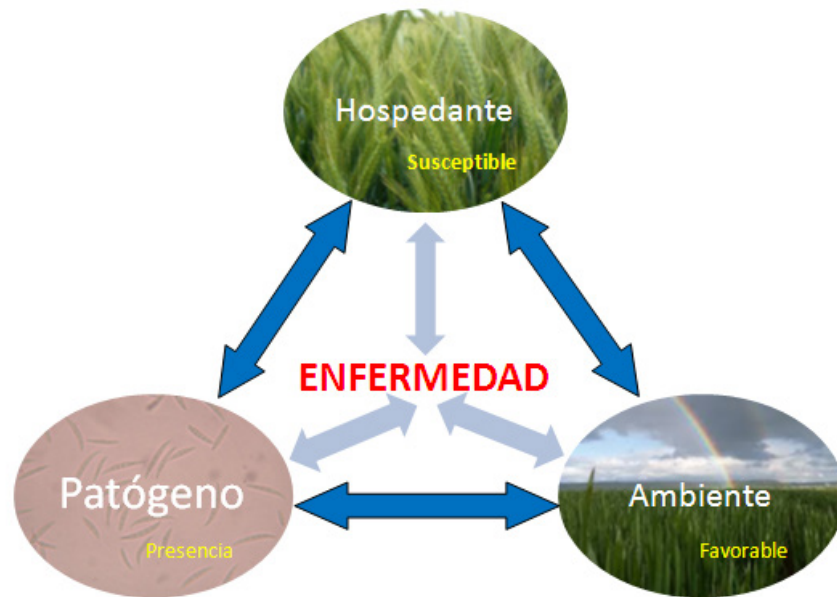


Figura 5. Factores que interactúan para el desarrollo de la enfermedad.

La magnitud de las epidemias de la FET está determinada por la abundancia de inóculo primario, la susceptibilidad del hospedante y las condiciones meteorológicas (duración de mojado y temperatura) durante y después de la antesis (Bai & Shaner 2004). La incidencia y la severidad son parámetros muy importantes para conocer los niveles de una enfermedad, estos parámetros permiten cuantificar la presencia y el desarrollo del problema. La incidencia se refiere al porcentaje o proporción de espigas enfermas en relación al total

evaluados en un lote o laboratorio. Se evalúa en cada espiga, la presencia o ausencia de enfermedad. Y la severidad es el área o porcentaje de la superficie de la espiga que está cubierta por signos de la enfermedad. Es una estimación visual en la cual se establecen grados de infección sobre la cantidad de tejido vegetal enfermo. Es subjetiva y se determina como una proporción del total del área afectada, que va desde el 0 y al 100 (Ivancovich et al. 1998).

La temperatura óptima para la infección de la FET se sitúa entre 20° y 30°C (Andersen 1948; Sutton 1982); la intensidad se incrementa claramente a partir de temperaturas de 20°C, con duraciones de mojado entre 48 a 72 h. Martínez (2009) observó en ensayos en cámaras de cría la aparición de síntomas de la enfermedad a partir de los 9°C; con temperaturas superiores a los 15°C se registraron respuestas en orden creciente en la intensidad de la FET ante los incrementos en la duración de mojado (24 a 72 horas). Además, Zoldan (2008), en ambiente controlado, observó severidades de 68% con duraciones de mojado superiores a las 35 h y temperaturas de 25°C. Estos autores concluyeron que a temperaturas de 10°C o inferior los niveles de enfermedad son bajos.

4.2 Sintomatología y daños

La enfermedad se manifiesta en los órganos aéreos, donde *F. graminearum* coloniza principalmente los componentes de las espiguillas: partes florales, glumas, granos y raquis. El inóculo principal está constituido por ascosporas liberadas de cuerpos fructíferos llamados peritecios, diseminadas por el viento a través del aire. La colonización se inicia principalmente con el ingreso de ascosporas a través de las anteras expuestas durante la floración (Pritsch *et al.* 2000). Una vez depositadas sobre las anteras, las esporas germinan, penetran y colonizan la flor. Las hifas se desarrollan permitiendo al hongo crecer hacia los estomas y otros sitios sensibles de la inflorescencia (Bushnell *et al.* 2003).

Luego el hongo crece inter e intracelularmente en el ovario y brácteas, propagándose de una espiguilla a las demás a través del raquis. La propagación de las hifas, durante las etapas posteriores a la infección, es acompañada por desintegración de los orgánulos de la célula huésped, degeneración del citoplasma y colapso de células del parénquima dañando las proteínas de reserva del grano (Nightingale *et al.* 1999, Wanjiru *et al.* 2002, Barneix 2007; Brzozowski *et al.* 2008). Todos estos efectos drásticos resultan de la acción de las

enzimas y las micotoxinas, que juegan un papel esencial en la patogenicidad fúngica (Alconada Magliano & Kikot 2013).

El micelio bloquea el transporte de nutrientes, provocando una reducción en el número de granos por espiga, resultando en granos más pequeños, livianos y chuzos, con reducción del rendimiento, peso hectolítrico, tenor proteico, poder germinativo, vigor de las semillas y calidad del grano por las micotoxinas asociadas, las cuales amenazan la salud humana y animal (Reis & Carmona 2002).

El hongo puede ser totalmente destructivo por lo que no habrá formación del grano debido al aborto de las flores. Si la colonización es lenta, los granos se desarrollan mostrando los síntomas característicos de la enfermedad. Las espiguillas infectadas exhiben inicialmente despigmentación debido a la pérdida de clorofila, siendo un síntoma característico y de sencillo reconocimiento. En condiciones de tiempo cálido y húmedo se produce el desarrollo de los macroconidios en esporodoquios, lo cual puede observarse en las espiguillas infectadas por una coloración rosa-salmón, especialmente en la base y bordes de las glumas. La infección frecuentemente se extiende a espiguillas adyacentes y a veces a toda la espiga a través del raquis. La primera manifestación de los síntomas ocurre en el tercio superior y medio de la espiga. Puede afectar desde una espiguilla hasta toda la espiga (Pesquero 2017).

Al final del ciclo del cultivo, cuerpos esféricos oscuros conocidos como peritecios (estructuras sexuales) se pueden desarrollar en las espigas bajo condiciones de alta humedad y elevadas temperaturas. En el interior de estos se forman ascos y ascosporas, las que darán origen a nuevas infecciones. Los granos infectados crecen de manera deficiente, arrugados, con una apariencia áspera debido al crecimiento superficial del micelio (Reis & Carmona 2002).

4.3 Ciclo biológico de la enfermedad

La FET es una enfermedad floral y monocíclica, siendo *F. graminearum* el principal agente etiológico. *Fusarium graminearum* es una especie cosmopolita y presenta una amplia gama de hospedantes. Se encuentra principalmente en cultivos de trigo (pan y duro), cebada, avena, centeno, triticale, maíz, trébol, alfalfa, batata y arroz. Como puede observarse en la **Figura 6**, en su fase inicial, el hongo sobrevive entre las estaciones del cultivo como saprófito en residuos vegetales del suelo de cultivos de soja, maíz, arroz,

cebada, trigo y sorgo, así como también en pasturas y malezas. Otra fuente de inóculo son los granos de trigo infectados de bajo peso que quedan en el suelo después de la cosecha hasta el siguiente ciclo (Melo Reis y Carmona 2002). El beneficio potencial de la rotación con cultivos no susceptibles es medianamente eficaz, debido al amplio rango de hospedantes de *F. graminearum*, que aseguran una alta probabilidad de inóculo. En años con condiciones ambientales favorables generalizadas no hay un efecto marcado del cultivo predecesor, sin embargo, en años normales, los niveles de fusariosis son significativamente mayores sobre rastrojo de trigo, cebada y maíz respecto a otros rastrojos (Pereyra & Acosta 2014).

En la superficie infectada de estos residuos el hongo crece saprofiticamente y se desarrollan los peritecios (fase sexual) y conidios (esporas asexuales), los cuales garantizan la disponibilidad anual de inóculo. Las ascosporas (esporas sexuales) se liberan de los peritecios a temperatura ambiente entre 12° y 34°C (preferentemente 25°C) y a una humedad relativa mayor al 80% durante al menos 18 h (Mc Mullen *et al.* 1997). Las ascosporas pueden ser dispersadas por cientos de kilómetros con el viento. Los conidios se producen en masas viscosas llamadas esporodoquios; se dispersan a corta distancia a través de salpicaduras de lluvia. Si las ascosporas o macroconidios hacen contacto con las espiguillas del trigo a través del flujo del viento o la lluvia, el hongo inicia la fase parasitaria patógena. Durante el corto periodo entre la floración y el inicio del desarrollo del grano (alrededor de 10 - 20 días), las plantas de trigo son muy susceptibles a la infección por *Fusarium* spp., especialmente durante el lapso en que las anteras permanecen expuestas (Pritsch *et al.* 2000). Las anteras fueron reportadas como el primer sitio de infección donde las esporas se depositan, germinan y colonizan las flores, por lo tanto la afección puede darse desde el momento de anthesis hasta la formación del grano.

Fusarium spp. no tiene estructuras especializadas de penetración a la célula huésped, el hongo entra por aberturas naturales o penetra directamente en las paredes de las células epidérmicas con hifas cortas de infección. La capacidad de los macroconidios para adherirse y germinar en el tejido del huésped presumiblemente juega un papel crítico en la difusión localizada (Bushnell *et al.* 2003).

Una vez dentro del tejido, *F. graminearum* es capaz de propagarse sistémicamente. Se han observado dos estructuras de hifa morfológicamente distintas, hifas subcuticulares e hifas

bulbosas; las primeras crecen de manera subcuticular y el tejido, con el tiempo, es colonizado inter e intracelularmente, en tanto que el crecimiento de las hifas bulbosas en la espiguilla infectada se extiende a lo largo de espiguillas adyacentes del raquis, inter e intracelularmente en todo el parénquima y tejidos vasculares de lema, gluma, ovario y raquis, causando graves daños (Alconada Magliano & Kikot 2013).

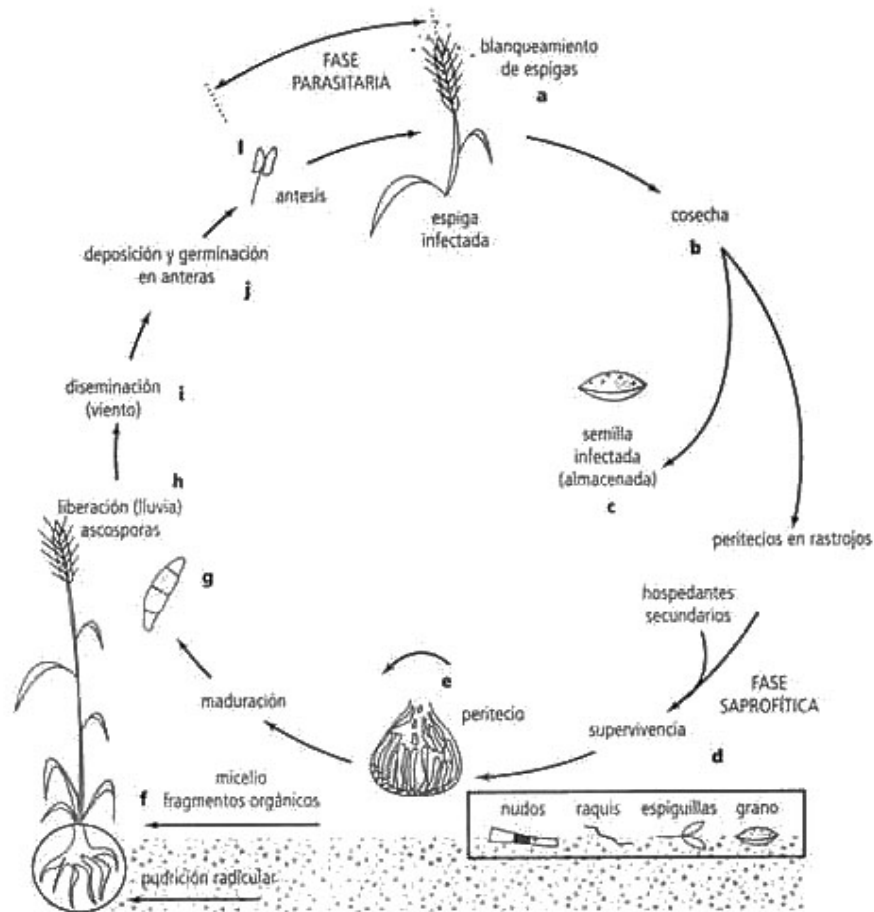


Figura 6. Ciclo de la fusariosis del trigo, según Melo Reis y Carmona (2002).

4.4 Agresividad: componentes y evaluación

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

la agresividad es una medida cuantitativa de la misma (Vanderplank 1984; Shaner *et al.* 1992).

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

F. graminearum posee diferentes mecanismos para producir la infección que pueden influir en los niveles de agresividad, como la liberación de enzimas extracelulares - entre ellas celulasas, xilanasas y pectinasas- que degradan los componentes de la pared celular; su liberación en estadios tempranos permite el establecimiento y propagación de la enfermedad (Wanjiru *et al.* 2002; Kang *et al.* 2005; Kikot *et al.* 2009).

Debe considerarse que las condiciones fisiológicas, tanto del patógeno como de la planta huésped, son factores determinantes en el progreso y agresividad de una enfermedad (Pariaud *et al.* 2009); en condiciones óptimas para el desarrollo de la enfermedad la respuesta de agresividad del patógeno suele ser elevada y homogénea.

5. Micotoxinas

El término micotoxina deriva de las palabras griegas *mikesy toxina*, que significan hongo y veneno respectivamente. Las micotoxinas son un grupo de metabolitos secundarios de los hongos filamentosos de peso molecular relativamente bajo, que pueden contaminar los alimentos para el hombre y los animales. (De Souza Diniz 2017, Bennett & Klich 2003).

Los géneros fúngicos frecuentemente asociados a la producción de micotoxinas son *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Las micotoxinas producidas por las especies del género *Fusarium* incluyen tres clases importantes: tricotecenos, fumonisinas y zearalenonas, siendo los primeros la familia de micotoxinas más comúnmente producidas por las diferentes especies del género (Fernandez Pinto *et al.* 2013).

Este grupo de toxinas se puede dividir en cuatro subgrupos (A, B, C y D) según su estructura química; los tricotecenos del tipo B son las micotoxinas que mayoritariamente

producen las cepas de *F. graminearum* y se diferencian de otras micotoxinas porque contienen una función carbonilo en el Carbono 8. En este grupo se incluyen tricotecenos como deoxinivalenol (DON) y sus acetyl derivados (3-acetyldeoxinivalenol 3-ADON y 15-acetyldeoxinivalenol 15-ADON), nivalenol (NIV) y fusarenona X (FUS X) (Fernandez Pinto *et al.* 2013).

Fusarium graminearum es responsable de la producción de micotoxinas en granos, con gran capacidad toxicogénica sobre ellos, condición que afecta directamente su calidad comercial e industrial, factor de suma importancia para la seguridad alimentaria animal y humana (Haller *et al.* 2008). La fitotoxicidad del DON se lo asocia a la capacidad de inhibir la síntesis proteica y de desencadenar la muerte celular debido a pérdida de electrolitos. (Marasas *et al.* 1984).

5.1 Genotipo y quimiotipo de *Fusarium graminearum*.

El genotipo se define como la información genética que posee un organismo en particular, en forma de ADN; el quimiotipo es la caracterización de un aislamiento de acuerdo al patrón de producción de metabolitos secundarios y debe ser usado sólo cuando el fenotipo químico se expresa y es detectado por análisis químicos. Ambos, el genotipo y quimiotipo de *F. graminearum*, se han utilizado para caracterizar a la especie por su potencial toxigénico, tomando en cuenta que el genotipo que determina un determinado tricoteceno no siempre predice correctamente la presencia del correspondiente metabolito (Desjardins 2008).

Para determinar el quimiotipo de las cepas autóctonas de *F. graminearum* se utilizan métodos cromatográficos mientras que para determinar el genotipo se utilizan métodos biotecnológicos basados en el polimorfismo de los genes e intrones (tales como *Tri3*, *Tri7*, *Tri12* y *Tri13*) de la vía de biosíntesis de tricotecenos (Reynoso *et al.* 2013).

La producción de tricotecenos de tipo B en *Fusarium graminearum* puede clasificarse en dos quimiotipos: quimiotipo I, donde las cepas producen DON, 3-ADON y 15-ADON; y el quimiotipo II, que produce NIV y FUS X (Ichinoe *et al.* 1983).

Al quimiotipo I a su vez se lo puede subdividir en 4 quimiotipos: **quimiotipo DON** para aislamientos que producen DON, sin producción de derivados acetylados, **quimiotipo 3-ADON** para los aislamientos que producen DON y 3-ADON, **quimiotipo 15-ADON** para los aislamientos que producen DON y 15-ADON y **quimiotipo 3- y 15-ADON** para

aislamientos con producción de DON y simultáneamente 3- y 15-ADON (Alvarez *et al.* 2009).

5.2 Regulación del contenido de micotoxinas

Dada la importancia de las micotoxinas tanto por sus efectos nocivos para la salud humana y animal como por las implicancias que tienen en la industria alimenticia, el número de regulaciones sobre el contenido máximo de micotoxinas permitido en alimentos se ha extendido a varios países (FAO 2004).

De los principales tricotecenos (DON, NIV y FUS X) que producen las cepas de *F. graminearum* solamente el contenido de DON es regulado por la legislación a nivel internacional para la comercialización de los granos de trigo y sus derivados donde se establecen límites máximos para cada tipo de alimento (Trombete *et al.* 2013).

Actualmente en Argentina no existe una regulación de los niveles máximos de micotoxinas permitidos para la comercialización interna; sólo se exige un control más estricto para la comercialización internacional, donde el comercio de exportación se rige por los límites establecidos por la Unión Europea que determinan el contenido máximo de DON en 2µg/g para granos enteros, según la Comisión de Regulación (EC) de la Comunidad Europea (Regulación EC 1881/2006, Regulación EC 1126/2007). Hay un proyecto para establecer los niveles máximos de DON en los cereales sin procesar en 2 µg/g, para productos a base de cereales (harinas) en 1 µg/g y para alimentos a base de cereales para lactantes y niños de corta edad en 0,5 µg/g (Comisión del Codex Alimentarius 2013).

5.3 Detección de Micotoxinas

Para determinar el contenido de micotoxinas se emplean distintos métodos, entre los que se incluyen las técnicas cromatográficas, basadas en la distribución o partición de una muestra en dos fases: una fase estacionaria y una fase móvil. La fase móvil, que puede ser gaseosa o líquida (cromatografía gaseosa o líquida respectivamente), pasa bajo presión a través de la columna para eluir la muestra. La cromatografía gaseosa (GC) resulta más eficiente que la líquida en la identificación de este tipo de micotoxinas, siendo más rápido y eficiente el proceso de separación e identificación de los compuestos (Neuhof *et al.*, 2009).

La mayoría de los métodos analíticos detectan una sola micotoxina o una sola clase de micotoxinas; por lo tanto, incluyen solamente un número limitado de analitos

químicamente relacionados. Pero como se han observado efectos aditivos y sinérgicos concernientes a la peligrosidad para la salud que poseen estos metabolitos, se han incrementado los esfuerzos para desarrollar métodos para un screening en simultáneo de diferentes clases de micotoxinas (Sulyok *et al.* 2006).

6. El Grano

A los efectos tóxicos de la infección por *F. graminearum* se le suman las pérdidas en rendimiento como consecuencia de la reducción del número, tamaño y peso de los granos. Además los granos sufren alteraciones tanto en su composición química como en sus propiedades físicas, con la consiguiente alteración de características de calidad en los productos de panificación (Papouškova *et al.* 2011; Capouchova *et al.* 2012).

La constitución física de los granos se relaciona con su textura y dureza y su composición química define el valor nutricional y las propiedades tecnológicas de las harinas. Los mercados son cada vez más exigentes y se interesan por el contenido de proteínas, aminoácidos, almidón, aceites y demás componentes; paulatinamente se va reduciendo la tolerancia a sustancias contaminantes y/o micotoxinas. Los principales criterios para determinar la calidad de los granos incluyen el contenido y constitución de las proteínas, variables de rendimiento como el peso de mil granos y características organolépticas como la fuerza de la masa y propiedades de mezcla (Prange *et al.* 2005; Vanova *et al.* 2008) siendo el análisis del perfil proteico de importancia para la producción de alimentos, dada su variación con el genotipo del grano, el ambiente y las interacciones con microorganismos (Triboi *et al.* 2003; Torbica *et al.* 2007).

7. Tipos de resistencia a la enfermedad

Numerosos estudios han logrado determinar diferentes tipos de resistencia genética a la FET; pero este trabajo se ha basado en los esquemas clásico descrito por Mesterházy *et al.* (1995, 1999) donde se definen 6 tipos diferentes de resistencia:

- La resistencia a la infección inicial (**tipo I**). Es la resistencia que genera la planta al patógeno para que no puede penetrar e infectar sus tejidos.
- La resistencia a la propagación de la infección en la espiga (**tipo II**). Se produce la penetración y se establece la infección, pero el micelio tiene dificultad para invadir el tejido adyacente.

- La resistencia a la acumulación de micotoxinas o **tipo III**, fue considerada como la habilidad del huésped para degradar DON.
- La **tipo IV** es la resistencia a la infección del grano.
- La tolerancia a altas concentraciones de micotoxinas es la resistencia **tipo V**.
- Y la resistencia **tipo VI** es la tolerancia a la enfermedad FET, y se evalúa comparando el rendimiento de los granos en espigas enfermas *versus* espigas libres de síntomas.

8. Manejo de la enfermedad

Las buenas prácticas agrícolas empleadas en el manejo de los cultivos, la correcta elección de los cultivares y la protección química en la etapa de floración, se consideran estrategias convenientes para evitar los perjuicios ocasionados por *F. graminearum*. Pero la complejidad de la FET y su amenaza multifacética, imponen el uso de múltiples estrategias de manejo para poder atenuar esta enfermedad cuando se manifiesta de forma muy agresiva. La utilización de cultivares de trigo con buen comportamiento es crucial para reducir daños causados por la FET (Bai & Shaner 2004); esta práctica permite un control económico y eficaz de la enfermedad especialmente si se la integra a otras como la reducción inicial del inóculo y la rotación de cultivos. Generar materiales resistentes o moderadamente resistentes con altos potenciales de rendimiento, es una forma eficiente de contribuir al control de la enfermedad; esto se logra a través del mejoramiento genético, combinando germoplasma de buen comportamiento con cultivares adaptados, generando líneas híbridas recombinantes o líneas endogámicas recombinantes (RILs, Recombinant Inbred Lines).

El cultivar de origen chino Sumai 3# y sus derivados proveen actualmente el máximo grado de resistencia tipo II (menor velocidad de invasión en la espiga). A la fecha no están disponibles cultivares de trigo altamente resistentes a la enfermedad o tolerantes a las micotoxinas con altos potenciales de rendimiento. Este hecho se explica por la complejidad de la herencia de la resistencia, la pobre aptitud agronómica y la baja calidad de las principales fuentes de resistencia (Goswami & Kistler 2004).

9. Desarrollo de Líneas Híbridas Recombinantes

Las RILs son la progenie homocigota resultado de la autofecundación en las generaciones F2 hasta F6 o más, de un cruzamiento entre dos líneas endocriadas. En el proceso, una semilla de cada línea es la fuente para la próxima generación, y por eso las RILs también se conocen como líneas descendientes por semilla única. La autopolinización permite la producción de RILs en un número relativamente corto de generaciones. En la sexta generación se considera que se obtiene homocigosis casi completa (Schneider 2005), (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de homocigosis en generaciones de RILs (Törjék et al. 2006).

Generaciones de endogamia (RIL)	% homocigosis dentro de cada locus de las líneas
F3:4	75,0
F4:5	87,5
F5:6	92,25
F6:7	96,875
F7:8	98,4375
F8.9	99,21875

En el genoma de cada RIL, los alelos derivados de cada parental se alternan. La recombinación ya no puede cambiar la constitución genética de las RILs, la segregación en la progenie de estas líneas es ausente. Una ventaja de las RILs es que debido a que se someten a varias rondas de meiosis antes de que la homocigosis sea alcanzada, el grado de recombinación es mayor en comparación con las poblaciones F2 de las cuales son derivadas (Schneider 2005).

Las líneas hermanas recombinantes permiten llevar a cabo estudios consistentes para la detención de caracteres cuantitativos de herencia compleja y su uso en el mejoramiento. De esta manera numerosos investigadores como Shen *et al.* (2003), Buerstmayr *et al.* (2002), Anderson *et al.* (2001), Waldron *et al.* (1999), han estudiado la FET a través de RILs para encontrar loci específicos que proporcionen fuentes de resistencia a esta enfermedad. En un principio, para generar una población se buscan líneas parentales divergentes que muestren diferencias fenotípicas y alelos diferenciales para uno o más caracteres de interés y que

exhiban suficiente polimorfismo; se realiza el cruzamiento y se avanza en las generaciones, manteniendo cada línea originada a partir de una semilla. Una vez que se logra estabilizarlas RILs, se las caracteriza fenotípicamente y se observa la segregación del carácter deseado en la población. Luego se calculan las correlaciones fenotípicas y genéticas, se analiza su heredabilidad y sus posibilidades en la mejora genética (Semagn *et al.* 2006).

Hipótesis

El estudio del comportamiento de las RILs (Lineas Hermanas Recombinates) de trigo pan originadas a partir del cruzamiento de los cultivares ProINTA Granar x BioINTA 1005 permitirá identificar y caracterizar líneas de la población con diferentes niveles de resistencia genética a la fusariosis de la espiga de trigo, y evaluarlas a parámetros de calidad comercial.

Objetivo general: algunos

Identificar y determinar a partir de evaluaciones fenotípicas en una población de líneas hermanas recombinantes cultivadas bajo distintas condiciones ambientales, la resistencia a la Fusariosis de la espiga de trigo, y analizar caracteres relacionados a parámetros de calidad y aptitud agronómica.

Objetivos específicos:

- Evaluar en invernáculo, con inoculación artificial de las espigas, la resistencia genética de **tipo II** de las líneas de acuerdo a los valores de severidad.
- Caracterizar el desarrollo de la enfermedad a través de la estimación de área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC, Area Under Disease Progress Curve) en líneas seleccionadas por su comportamiento, e identificar aquellas que la limitan genéticamente.
- Evaluar en ensayos a campo, bajo condiciones controladas de humedad e inoculación artificial, la resistencia genética **tipo I** de las RILs de acuerdo con la incidencia y severidad de la enfermedad.
- Evaluar en ensayos a campo la infección natural de las RILs de acuerdo con los valores de incidencia y severidad de la enfermedad.

- Determinar el nivel de micotoxinas en granos en relación al comportamiento de las RILs frente a la enfermedad.
- Analizar la segregación de las unidades de gluteninas en las RILs, considerando su relación con la calidad de las harinas.
- Analizar el efecto de la infección sobre las unidades de gluteninas de acuerdo a las señales proteicas.
- Detectar, a partir del análisis estadístico entre las variables estudiadas, RILs resistentes o moderadamente resistentes a la fusariosis de la espiga de trigo.

Capítulo II: Caracterización Fenotípica

Las enfermedades se originan en la naturaleza por la interacción de un hospedador susceptible, un patógeno virulento y un ambiente favorable; en ese triángulo, el hombre interviene sobre los cultivos con prácticas de manejo y control que provocan alteraciones en el ecosistema. La abundancia del inóculo primario junto a condiciones climáticas predisponentes (duración de mojado y temperatura) son determinantes en el establecimiento de la FET durante la anthesis. Dentro del manejo integrado de una enfermedad, la detección de genotipos resistentes, es uno de los desafíos más importantes. El comportamiento del trigo frente a la Fusariosis de la espiga (FET) es evaluado en los programas de mejoramiento a través de distintas escalas, que miden los rangos de severidad atribuibles a diversas formas de resistencia del trigo.

Materiales y Métodos

1. Material Vegetal

Se trabajó con una población de RILs de 120 individuos estabilizada en la filial F6, originadas a partir de un cruzamiento simple (sin parentesco alguno) entre los cultivares de trigo BIOINTA 1005 y PROINTA Granar llevado a cabo por el Grupo de Mejoramiento de Trigo de la EEA INTA Marcos Juárez. BIOINTA 1005 es una variedad de alto potencial de rendimiento con buena adaptación a las distintas regiones trigueras, con un ciclo vegetativo-reproductivo corto y con moderada resistencia a royas pero muy susceptible a fusariosis de la espiga (INASE, 2008). El progenitor PROINTA Granar es una variedad de buen rendimiento con buena adaptabilidad a las diferentes zonas trigueras, con un ciclo vegetativo-reproductivo corto y muy buen comportamiento a royas y fusariosis de la espiga (INASE, 1997). A modo de controles se utilizaron las variedades Sumai 3# y Alsen, como materiales moderadamente resistentes, y ACA 906 y BioINTA 1007, como materiales susceptibles.

2. Desarrollo de las RILs

El cruzamiento entre los progenitores se realizó en la EEA INTA-Marcos Juárez de acuerdo a los protocolos de rutina, en el año 2010 (Kohli *et al.* 1995; 2003). Las semillas obtenidas a partir de la Filial 1 (F1) se sembraron a campo en un surco de un metro de largo, siendo cosechadas sus semillas en masa. Las semillas F2 fueron sembradas a campo en el año 2012 en una parcela donde se lograron aproximadamente 2000 plantas. De esta parcela se tomaron al azar y se cosecharon a mano 250 plantas, trillándose por separado. Las mismas se avanzaron individualmente por autofecundación hasta lograr la generación F6 (generación estabilizada) de 250 RILs. Se seleccionó al azar una muestra representativa de 120 líneas de la F6 para el desarrollo de la investigación.

3. Obtención del inóculo

Se utilizaron 9 cepas de *F. graminearum* para la inoculación, 4 aportados por el CINDEFI y 5 por la Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales de la UNRC, las cuales fueron caracterizadas morfológica (Kikot *et al.* 2011) y molecularmente (Ortega *et al.* 2016). Estas cepas que algunas presentaron el quimiotipos 3-ADON y otras el 15-

ADON, fueron seleccionadas por su capacidad de esporulación, toxicogénica y enzimática (Ortega *et al.* 2018). Los aislamientos fueron mantenidos en tubos con medio de cultivo agar nutriente sintético (SNA) bajo aceite mineral a 4°C. Al momento de ser utilizados se transfirieron los respectivos inóculos a cajas de Petri con medio de cultivo agar papa glucosado (APG), siendo incubados a 25°C por 7 días, obteniéndose el cultivo fresco para la obtención de los inóculos infectivos.

Para la elaboración del medio de cultivo se siguió el protocolo ajustado y probado por el Laboratorio de Patología de la EEA INTA Marcos Juárez, que favorece a una mayor esporulación del hongo. Este protocolo propone elaborar un medio de cultivo enriquecido con agar-afrecho, evitando que el hongo genere gran cantidad de micelio y favoreciendo una mayor producción de macroconidios (Galich 1997). El primer paso del protocolo es tamizar el afrecho con un colador fino para eliminar el exceso de almidón, ya que este favorece la producción de micelio y reduce la capacidad de generar macroconidios, que son las esporas infecciosas de interés. Para comenzar se pesaron 40 gr de afrecho tamizado y se agregaron 500 mL de agua destilada; esta dilución se llevó a hervor durante 1 h. Con gasas y un colador fino se filtró el medio, separando el afrecho del líquido. En un matraz se disolvieron 20 gr de agar en 500 mL de agua destilada, se agregó el líquido filtrado y se enrasó con agua destilada a 1 L. Luego se colocó este medio en un Erlenmeyer de 2 L y se esterilizó en autoclave.

Una vez esterilizado, se agregaron 25 mL del medio agar-afrecho en Erlenmeyers de 250 mL y estos se volvieron a esterilizar en autoclave. Una vez solidificado el medio en cada Erlenmeyer, se sembró un disco de 5x5 mm aproximadamente de los respectivos aislamientos crecidos en APG. Se los dejó crecer a temperatura ambiente dejándolos expuestos a luz fluorescente continua durante 7 días. Transcurridos 15 días, en cada Erlenmeyer se observó abundante producción de pionnotes (Alberione *et al.* 2016).



Figura 7. Crecimiento de aislamientos de *F. graminearum* en Erlenmeyer de 250 mL.

Para la extracción de los conidios de cada Erlenmeyer, se realizaron lavados con 30 mL de agua destilada estéril y se filtraron con gasa estéril. Se concentraron todas las suspensiones de cada cepa en un Erlenmeyer y, con ayuda de un hematocitómetro (cámara cuenta glóbulos Neubauer), se llevaron todas las suspensiones a una misma concentración (números de conidios/mL). Luego, en un único Erlenmeyer, se unificaron las suspensiones de los 9 aislamientos en cantidades iguales y se llevó a una concentración de 1×10^5 conidios/mL para la inoculación por inyección en invernáculo y a una concentración de 3×10^5 conidios/mL para la inoculación por aspersión a campo.

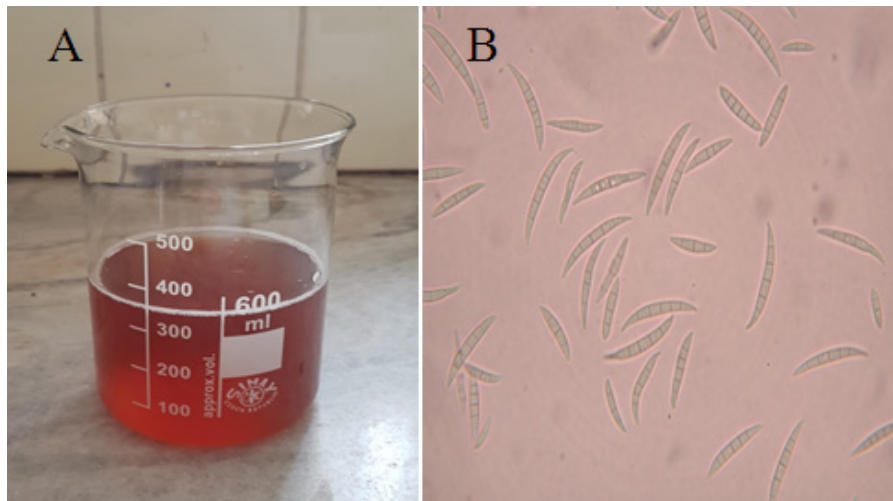


Figura 8. Suspensión de conidios (A) y macroconidios de *F. graminearum* (B).

4. Ensayos en invernáculo

Se evaluaron las 120 RILs seleccionadas al azar, 4 testigos (2 testigos susceptibles y 2 testigos con moderada resistencia a la enfermedad) y los 2 progenitores (ProINTA Granar y BioINTA 1005), resultando un total de 126 individuos a estudiar. El ensayo se realizó con 3 repeticiones, ubicándose cada repetición en un compartimento diferente dentro del invernáculo. Se usaron macetas de 3 L, con un sustrato de 45% de tierra, 30% de abono orgánico, 10% de perlita y 15% de piedras bolas pequeñas, en el fondo; se rotularon y se sembraron 4 semillas de cada RIL, y se ubicaron al azar. Cuando las plantas llegaron al estado de antesis, en Z6.5 según la escala de Zadoks (1974), las espigas se inocularon con una inyección de una pequeña gota (0,15 ml) de una suspensión de macroconidios, a una concentración aproximada de $1,0 \times 10^5$ conidios/mL, aplicada con una jeringa calibrada (SocorexTM) en el centro de la espiga (Bekele 1985). Las espigas inoculadas se marcaron con cintas de diferentes colores para indicar la fecha de inoculación. Inmediatamente finalizada cada inoculación las espigas fueron sometidas a humedad constante por medio de un sistema de aspersión tipo neblina (Nebulizador Fogger-7800, NaanDan MA1) durante 48h (Bai *et al.* 2000). Se inocularon un total de 1512 espigas correspondientes a 378 macetas con 4 plantas cada una. Cuando las espigas llegaron al estado de madurez, se las cosechó manualmente y se las acondicionó en sobres de papel.



Figura 9. Desarrollo de la población en el invernáculo.

Evaluación de la enfermedad:

En condiciones de invernáculo se evaluaron los niveles de severidad empleando la escala de severidad propuesta por Stack & McMullen (1995) para medir el desarrollo de la enfermedad en 4 momentos distintos (7, 14, 21 y 28 días después de la inoculación). Una vez cosechadas las espigas y dispuestas en sobres rotulados, se trabajó en gabinete para determinar el porcentaje final de severidad, calculando (número de espiguillas enfermas/total de espiguillas de cada espiga)*100, y el porcentaje de granos sanos y enfermos de cada espiga.

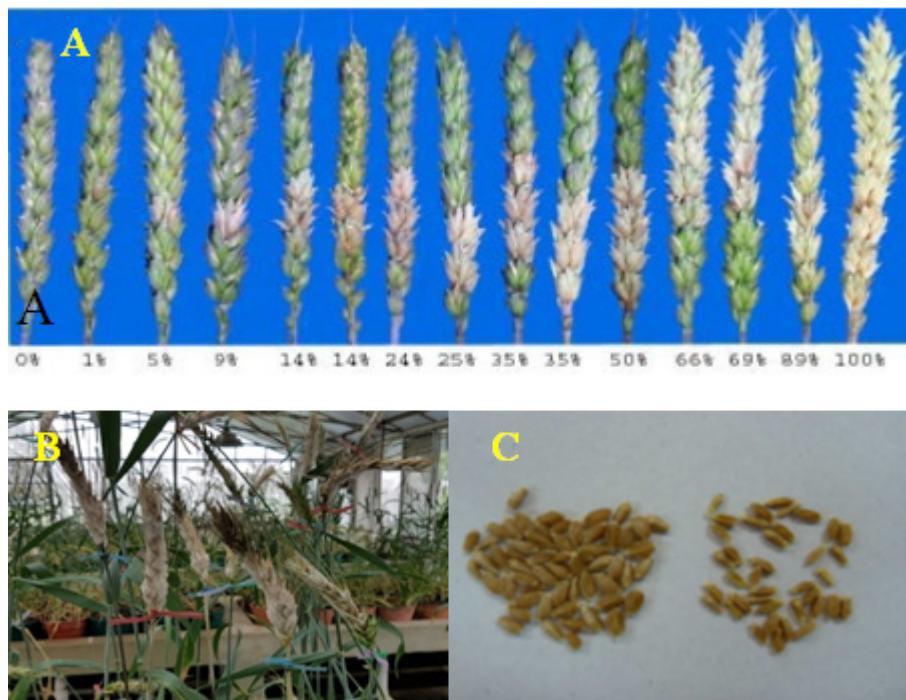


Figura 10. Escala de severidad utilizada para la evaluación de la enfermedad (Stack y McMullen, 1995) (A), espigas de trigo infectadas con *F. graminearum* (B), granos de trigo sanos (izq.) y enfermos (der.) por presencia de *F. graminearum* (C).

5. Ensayos a campo bajo telado con infección artificial y humedad controlada (Jaula)

Este ensayo se sembró a campo, bajo un telado, en hileras o hills plots de 30 cm de longitud y una separación entre ellas de 30 cm. La unidad experimental fueron los hills plots, que tomaron un diseño estadístico al azar constituidos por al menos 20 plantas de cada RILs. Cuando la mayoría de las espigas de cada hilera se encontraban en anthesis (Z6.5 en la escala de Zadoks), se marcaron los hill plots con una cinta e

inmediatamente se inocularon por aspersión las espigas de toda la hilera con una suspensión de macroconidios a una concentración aproximada de $3,0 \times 10^5$ conidios/mL, usando un pulverizador manual que arroja un volumen de inóculo de aproximadamente de 10 mL por cada hill plot aplicado. Después de cada inoculación se les proporcionó humedad en períodos de mojado de 48 h mediante un sistema de riego por aspersión controlada (10 min de riego por 50 min de pausa). El cultivo fue protegido con una malla (telado) para evitar el daño por granizo y el ingreso de insectos y otros animales perjudiciales para el cultivo. Al finalizar el ciclo, se realizó la cosecha manual de las espigas, colocando cada muestra en bolsas de papel hasta su evaluación en gabinete.

Evaluación de la enfermedad:

Se seleccionaron 20 espigas al azar de cada línea para medir la incidencia [(espigas enfermas/espigas totales)*100]. Posteriormente se eligieron al azar 6 espigas enfermas para determinar con ellas un nivel de severidad [(espiguillas enfermas/espiguillas totales)*100]; con esos valores se obtuvo un promedio de la severidad para cada línea. Finalmente se integraron las 2 variables en el índice de fusarium (IF) [(Incidencia x Severidad) / 100].



Figura 11. Hills plots de la población en el ambiente de campo bajo telado con infección artificial y humedad controlada.

6. Ensayos a campo

En los ensayos a campo las RILs se sembraron en hill plots de 30 cm de longitud por 30 cm de separación entre hileras, en 3 repeticiones con un total de al menos 30 plantas por RILs.

Cuando las plantas alcanzaron el estado de Z7.5 de la escala de Zadoks, por observación visual, se evaluó la infección natural a través de incidencia y severidad de la enfermedad.

Evaluación de la enfermedad:

La evaluación de incidencia y severidad se realizó con el cultivo en pie empleando la escala de doble dígito propuesta por el CIMMYT (Kohli *et al.* 1989), donde el primer valor corresponde a la incidencia y el segundo, a la severidad. A partir de estas 2 variables se calculó el IF.



Figura 12. Población en el ambiente de campo con infecciones naturales.

7. Análisis Estadístico

Para el agrupamiento de las líneas se efectuaron análisis multivariados de conglomerados de acuerdo con su comportamiento frente a la enfermedad, utilizando una matriz formada por las variables porcentaje de incidencia, porcentaje de severidad, número de granos sanos, peso de espigas infectadas y altura de plantas, considerando una distancia euclídea con el programa estadístico Infostat. (Di Rienzo *et. al* 2017). La variabilidad fenotípica se analizó utilizando modelos lineales mixtos y test de comparación de medias LSD de Fisher ($p < 0.05$). El AUDPC se calculó por medio del software estadístico R y la relación entre variables se realizó a través de análisis de correlación y regresión.

Resultados y Discusión

Las evaluaciones realizadas en los 126 individuos (120 RILs, 4 testigos y los 2 progenitores) permitieron observar grupos con diferente comportamiento a la Fusariosis de la espiga en los 4 ambientes de evaluación (invernáculo 2015, invernáculo 2016, jaula 2016 y campo 2016). En los ensayos de invernáculo con infección artificial y riego, las variables medidas fueron, severidad y porcentaje de granos sanos (**Tabla 5**). En el ensayo a campo con inoculación artificial y suministro de humedad que estuvo protegido por un telado, llamado “Jaula” (**Tabla 6**), las variables estudiadas fueron incidencia, severidad, altura de plantas, peso de 6 espigas infectadas y porcentaje de granos sanos. Y en el ensayo a campo en condiciones naturales se midieron las variables incidencia, severidad y altura de planta (**Tabla 7**).

Tabla 5. Frecuencias absolutas y relativas de las RILs para las variables medidas en los ensayos de Invernáculo.

Intervalos (%)	Invernáculo 2015				Invernáculo 2016			
	Severidad		GS		Severidad		GS	
	FA	FR	FA	FR	FA	FR	FA	FR
(0 - 20]	4	0,03	10	0,08	-	0	66	0,52
(20 - 40]	38	0,31	41	0,33	-	0	56	0,45
(40 - 60]	60	0,48	58	0,46	1	0,01	4	0,03
(60 - 80]	21	0,17	14	0,12	44	0,35	-	0
(80 - 100]	1	0,01	1	0,01	81	0,64	-	0
	124	1	124	1	126	1	126	1

Referencias: FA, frecuencia absoluta. FR, frecuencia relativa. GS, granos sanos.

En el ensayo del invernáculo en el año 2015, los individuos evaluados fueron 124 porque las líneas 74 y 82 nacieron pero no llegaron a espigar. Ese año solo el 3% de la población, es decir 4 individuos, presentaron muy buena resistencia a la propagación de la enfermedad en espiga, con valores de severidad menor al 20%. El 31% tuvo una buena resistencia a la FET, con valores de severidad entre 21% y 40%. Y un 48% de la población tuvo un

comportamiento moderado, con valores de severidad entre el 41% y 60%. El 18% restante tuvo una mala resistencia a la FET, con valores de severidad entre 61% y 100%

Cuando observamos la infección en los granos, solo un individuo obtuvo una muy buena resistencia, con valores entre 81% y 100% de granos sanos. El 12% de la población, correspondiente a 14 individuos, tuvo entre 61% y el 80% de sus granos sanos. La mayor parte de la población, que abarca el 46%, tuvo un valor de granos sanos entre el 41% y 60%. El resto de la población, que es el 41%, tuvo menos de 40% de los granos sanos.

En el año 2016, se pudo evaluar a los 126 individuos de la población pero los resultados obtenidos fueron muy diferentes a los del año anterior. Solo un individuo presentó una resistencia moderada de tipo II que se ubicó entre 41% y 60% de severidad. El 35% de la población tuvo una mala resistencia a la FET, con valores de severidad entre 61% y 80%, y el resto, que comprende un 64% de la población, obtuvo valores de severidad por arriba del 81%. Algo muy similar paso con la infección de granos donde 4 individuos (3% de la población) presentaron entre el 41% y 60% de sus granos sanos. El 45% de la población mostró un porcentaje de granos sanos entre 21% y 40%. Y el 52% de la población tuvo menos del 20% de sus granos sanos.

Tabla 6. Frecuencias absolutas y relativas de las RILs para las variables que fueron medidas en el ensayo a campo protegido por un telado con inoculación artificial y suministro de humedad.

Intervalos (%)	Incidencia		Severidad		GS		Peso 6 espigas			Altura de plantas		
	FA	FR	FA	FR	FA	FR	Intervalos (g)	FA	FR	Intervalos (cm)	FA	FR
(0 - 20]	5	0,04	8	0,06	8	0,06	(0 - 3]	1	0,01	(50 - 65]	2	0,02
(20 - 40]	6	0,05	53	0,42	21	0,17	(3 - 6]	9	0,07	(65 - 80]	18	0,14
(40 - 60]	14	0,11	50	0,40	37	0,29	(6 - 9]	50	0,40	(80 - 95]	57	0,45
(60 - 80]	34	0,27	10	0,08	46	0,37	(9 - 12]	57	0,45	(95 - 110]	40	0,32
(80 - 100]	67	0,53	5	0,04	14	0,11	(12 - 15]	9	0,07	(110 - 125]	9	0,07
	126	1	126	1	126	1		126	1		126	1

Referencias: FA, frecuencia absoluta. FR frecuencia relativa. GS, granos sanos.

En este ensayo al analizar la incidencia, podemos observar que un 4% de la población tuvo un buen comportamiento a la FET, con menos del 20%, y que otros 6 individuos,

correspondientes a un 5% de la población, obtuvieron valores entre 20% y 40%. Por otra parte 67 individuos (equivalente al 53% de la población) tuvieron un mal comportamiento con valores de incidencia entre un 80% y 100%.

Cuando analizamos la severidad se observa que 8 individuos, es decir un 6% de la población, tuvieron un muy buen comportamiento con valores menores al 20%. Para el 42% de la población su comportamiento fue aceptable, entre un 20% y 40 % de severidad. El resto de las líneas, que comprenden al 52%, tuvieron un comportamiento malo a muy malo con valores de severidad que superan el 40% y llegan hasta un 100%.

En el peso de las espigas se observó que 9 individuos (7% de la población) obtuvieron el mayor peso entre 12.01 g y 15 g. La mayor parte de la población, es decir el 57%, tuvo un peso entre 9.01 g y 12 g, pero también hubo un 50% de la población que obtuvo un peso entre 6.01 g y 9 g. El 8% restante peso menos de 6 g.

En la medición de la altura de las plantas, se registró que 9 individuos fueron los más altos con valores que van de los 111 cm a 125 cm. El 32 % de la población tuvo una altura entre 96 cm y 110 cm, mientras que la mayor parte de la población (45%) tuvo una altura entre 81 cm a 95 cm. Solamente el 2% tuvo una altura menor a 65 cm.

Tabla 7. Frecuencias absolutas y relativas de las RILs para las variables que fueron medidas a campo.

Intervalos %	Incidencia		Severidad		Altura de Plantas		
	FA	FR	FA	FR	Intervalos (cm)	FA	FR
(0 - 20]	91	0,72	71	0,56	(40 - 52]	1	0,01
(20 - 40]	29	0,23	49	0,39	(52 - 64]	9	0,07
(40 - 60]	5	0,04	6	0,05	(64 - 76]	49	0,39
(60 - 80]	1	0,01	-	-	(76 - 88]	50	0,40
(80 - 100]	-	-	-	-	(88 - 100]	17	0,13
	126	1	126	1		126	1

Referencias: FA, frecuencia absoluta. FR frecuencia relativa.

En el ensayo a campo se observó que el 72% de la población tuvo una incidencia que no superó el 20%. Hubo un 23% que mostró una incidencia entre el 21% y 40%. Y el 5% restante mostró una incidencia entre 41% y 80%. Cuando analizamos la severidad ocurre algo similar, donde la mayoría de las líneas (56%) tuvo una severidad menor al 20%. El 39% de la población tuvo un rango de severidad entre 21% y 40%, y el 5% restante, valores entre 41% y 60%. En la altura de planta se observó que el 13% (correspondiente a 17 líneas) obtuvo las medidas de altura máximas entre 89 cm a 100 cm. El 40% se ubicó entre 77 cm y 88 cm, y un 39% de la población se encontró entre 65 cm y 76 cm. Hubo un 8 % de la población no superó los 64 cm.

1. Análisis multivariado por Conglomerado o Cluster

A través de este análisis se buscó identificar líneas resistentes o moderadamente resistentes y líneas muy susceptibles a la FET (es decir, los extremos). Para eso se realizó un análisis por conglomerado contemplando todas las variables medidas en la población para los 4 ambientes de evaluación que se mencionaron anteriormente. El resultado del dendrograma obtenido (**anexo I**), no permitió agrupar a las líneas por su comportamiento fenotípico, probablemente debido a que las variables analizadas y los ambientes medidos fueron muy diferentes. El dendrograma agrupaba líneas muy susceptibles con líneas que presentaban bajos valores de incidencia y severidad. Se decidió realizar otro análisis por conglomerado pero esta vez estudiando cada ambiente por separado para después comparar los resultados individualmente. Los resultados que se obtuvieron fueron determinantes, y permitieron diferenciar grupos para los distintos ambientes (**anexo II**).

Dentro de los clusters, se diferencia cada grupo con un color distinto y se observa que la cantidad de grupos dependió de cada ambiente. El criterio para la selección de las líneas fue tomar de cada cluster los grupos que presentaban los niveles más bajos de incidencia y de severidad. Y a partir de estos resultados se realizó una lista para cada ambiente con todas las líneas seleccionadas. Allí se identificaron cuáles de estas las líneas resistentes o moderadamente resistentes a la FET coincidían en 3 o 4 ambientes; los resultados se pueden observar a continuación en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Resultado del análisis por conglomerado de líneas moderadamente resistentes a la FET en cada ambiente de evaluación.

Invernáculo	Invernáculo	Jaula	Campo
2015	2016	2016	2016
-	17	17	17
19	19	19	19
25	-	25	25
-	42	42	42
52	52	52	52
62	62	-	62
75	75	75	75
76	76	-	76
-	Alsen	Alsen	Alsen
Sumai 3#	Sumai 3#	Sumai 3#	Sumai 3#

En este análisis se destacaron 8 líneas y los 2 testigos resistentes (Alsen y Sumai 3#), en azul se resaltan las líneas 19, 52, 75 y Sumai3# que tuvieron un destacado comportamiento a la FET en los 4 ambientes. Las demás líneas, 25, 42, 62 y 76 y el cultivar Alsen presentaron una moderada resistencia a la enfermedad en 3 de los 4 ambientes de evaluación.

Del mismo modo se realizó el análisis para determinar las líneas que fueron muy susceptibles a la FET, escogiendo de los clusters los grupos que presentaban los mayores valores de incidencia y severidad (**Tabla 9**).

Tabla 9. Análisis por conglomerado de líneas susceptibles a la FET en cada ambiente de evaluación.

Invernáculo	Invernáculo	Jaula	Campo
2015	2016	2016	2016
31	31	31	-
37	-	37	37
-	41	41	41
64	64	64	-
70	-	70	70
-	74	74	74
86	86	86	86
120	120	120	120
BioINTA 1005	-	BioINTA 1005	BioINTA 1005
-	BioINTA 1007	BioINTA 1007	BioINTA 1007

En este caso también se diferenciaron 8 líneas además del parental BioINTA 1005 y el testigo BioINTA 1007. En color rojo se remarcaron las líneas 86 y 120, que mostraron ser muy susceptibles en los 4 ambientes. En tanto las demás líneas, el testigo BioINTA 1007 y el parental BioINTA 1005 formaron parte del cluster por sus resultados en 3 de los 4 ambientes de evaluación.

Evaluar todas estas variables en 4 ambientes diferentes permitió hacer una buena caracterización fenotípica de la población. Se pueden observar los diferentes niveles de infección y tipos de resistencia a *F. graminearum* que existen en la población, porque la selección de los genotipos se realiza en condiciones semicontroladas y de campo (Ireta-Moreno & Gilchrist-Saavedra 1994). El análisis estadístico por conglomerado o clúster es una técnica muy útil para clasificar y asociar líneas de trigo con patrones de interés (Kohli *et. al* 2001). En este estudio se detectaron líneas de moderada resistencia y otras que mostraron ser muy susceptibles a la FET, coincidiendo con otros grupos de trabajo que han

estudiado la FET en RILs en diferentes ambientes, obteniendo resultados similares (Jiang *et al.* 2006, Bonin 2009).

El Conglomerado o Cluster es un análisis multivariado que permite analizar muchas variables a la vez; por este motivo, se pensó que podía haber alguna variable de poco peso para este estudio que pudiera generar distorsiones en el análisis; se decidió hacer otro análisis estadístico considerando solamente la severidad, que es la variable de mayor importancia en este trabajo, y comparar los resultados.

2. Análisis de la varianza de medias para la severidad (ANAVA)

Se realizó un análisis estadístico de la severidad para cada uno de los ambientes. Los resultados demostraron diferencias significativas dentro de la población en todos los ambientes de evaluación. Como los valores de severidad fueron muy fluctuantes debido a las diferentes condiciones ambientales a las que fue sometida la población, se realizó un test de comparación de medias y a través de las diferencias mínimas significativas (DMS) de cada ensayo (**anexo III**), se pudo seleccionar los extremos (líneas muy susceptibles y líneas resistentes o con moderada resistencia) que coincidieran en los 4 ambientes de evaluación.

El ANAVA demostró que las líneas moderadamente resistentes a la FET resultaron ser casi las mismas que se diferenciaron por conglomerado. Se destacaron 9 líneas y Sumai 3# para los 4 ambientes; 6 de esas líneas (17, 19, 42, 52, 75 y 76) y el cultivar Sumai 3# coincidieron con los resultados obtenidos con el método por conglomerado (**Tabla 10**).

Tabla 10. Valores medios de Severidad de las líneas que mostraron moderada resistencia a la FET.

Líneas	Invernáculo	Invernáculo	Jaula	Campo
	2015	2016	2016	2016
52	7,41	73,82	26,71	0,5
42	33,56	71,24	10,44	0
19	23,55	66,25	21,32	10
75	38,07	70,52	22,76	0
Sumai 3#	32,99	73,55	20,49	5,5
107	38,91	68,3	16,15	15
76	28,03	72,69	30,42	10
53	33,93	69,01	28,83	10
1	34,94	73,52	30,86	10
17	41,39	73,53	30,35	10

Del mismo modo se realizó el análisis para ver el caso de las líneas susceptibles (**Anexo III**) donde se observaron 6 líneas y el parental BioINTA 1005 como muy susceptibles a la FET en los 4 ambientes evaluados. En este análisis solamente tres líneas (37, 70 y 120) y BioINTA 1005 coincidieron con el análisis realizado por el método de conglomerado (**Tabla 11**).

Tabla 11. Valores medios de Severidad de las líneas más susceptibles a la FET por ANAVA.

Líneas	Invernáculo	Invernáculo	Jaula	Campo
	2015	2016	2016	2016
22	66,03	80,91	55,37	35
37	63,1	81,38	62,26	35
106	70,09	90,48	62,96	25
93	70,38	85,73	89,04	20
70	56,56	88,42	87,17	40
BioINTA 1005	72,93	81,85	79,19	45
120	67,22	94,3	88,83	55

Se demostró que ambos análisis resultaron apropiados para seleccionar RILs de acuerdo a su comportamiento a la FET; no obstante, el análisis por conglomerado tiene a favor la posibilidad de seleccionar grupos de líneas de manera más estricta debido a que considera un mayor número de variables. Para ver las similitudes y diferencias en la selección de materiales por ambos métodos se realizó la **Tabla 12** para una mejor apreciación.

Tabla 12. Comparación en el agrupamiento de líneas según análisis de varianza de medias (severidad) y análisis de conglomerado.

Líneas moderadamente resistentes		Líneas muy susceptibles	
Varianza	Conglomerado	Varianza	Conglomerado
1		22	
17	17		31
19	19	37	37
	25		41
42	42		64
52	52	70	70
53			74
	62		86
75	75	93	
76	76	106	
107		120	120
	Alsen	BioINTA 1005	BioINTA 1005
Sumai 3#	Sumai 3#		BioINTA 1007

Las líneas que se muestran resaltadas en colores fueron identificadas por ambos métodos. Se pudo observar una mayor similitud entre las líneas de mejor comportamiento a la FET que en las líneas más susceptibles, donde solo coincidieron las líneas 37, 70, 120 y el parental BioINTA 1005. Los materiales resistentes o moderadamente resistentes de esta población pueden ser seleccionados para ser evaluados como futuros cultivares o pueden ser utilizados como padres en cruzamientos como fuente de resistencia en el Programa de Mejoramiento Genético de trigo del INTA.

A partir de los resultados obtenidos se elaboraron tablas con las 22 líneas seleccionadas, 11 líneas moderadamente resistentes y 11 líneas muy susceptibles, y se las comparó con los progenitores y los testigos, basados en los valores de severidad de cada ensayo ordenados de mayor a menor. Además, se analizaron el porcentaje de granos sanos, la incidencia y el índice de Fusarium (IF) para cada ambiente de evaluación.

3. Ensayo en Invernáculo

En primer lugar se comparó el ambiente de invernáculo para los años 2015 y 2016, para evaluar el comportamiento de las líneas en el tiempo para un mismo ambiente.

En color rojo se resaltan las líneas muy susceptibles, y en azul, las líneas moderadamente resistentes a la FET; se indica para cada una de ellas el método con que fue seleccionada (conglomerado y/o análisis de la varianza), comparándolas con los progenitores y testigos.

Tabla 13. Severidad y porcentaje de granos sanos de las líneas seleccionadas.

Invernáculo 2015				Invernáculo 2016			
Líneas	Método	Sev.	% GS	Líneas	Método	Sev.	% GS
BioINTA 1005	V - C	72,93	14,99	74	C	95,77	7,18
93	V	70,38	23,53	86	V	94,91	7,2
106	V	70,09	36,11	64	C	94,33	12,68
120	V - C	67,22	18,2	120	V - C	94,3	8,51
22	V	66,03	24,68	ProINTA Granar		93,21	13,59
ACA 906	C	65,17	25	106	V	90,48	12,06
64	C	64,19	26,99	31	C	90,48	7,87
37	V - C	63,1	32,54	70	V - C	88,42	16,86
86	C	60,5	38,6	BioINTA 1007	C	87,28	10,91
70	V - C	56,56	43,07	41	C	86,91	11,9
31	C	52,85	29,69	ACA 906		85,99	17,52
BioINTA 1007	C	48,85	51	93	V	85,73	13,67
41	C	47,02	47,56	25	C	82,98	29,06
17	V - C	41,39	57,26	BioINTA 1005	V - C	81,85	10,89
107	V	38,91	53,47	37	V - C	81,38	11,33
62	C	38,5	62,65	22	V	80,91	23,93
75	V - C	38,07	60,58	Alsen	C	74,71	34,53
1	V	34,94	56,33	52	V - C	73,82	51,15
53	V	33,93	69	Sumai 3#	V - C	73,55	25,76
42	V - C	33,56	36,28	17	V - C	73,53	32,87
Sumai 3#	V - C	32,99	60,12	1	V	73,52	27,82
25	C	30,46	69,37	62	C	73,28	23,97
76	V - C	28,03	50,69	76	V - C	72,69	35,19
ProINTA Granar		27,47	8,33	42	V - C	71,24	45,35
19	V - C	23,55	32,19	75	V - C	70,52	31,72
52	V - C	7,41	77,49	53	V	69,01	26,76
74	C	s/d	s/d	107	V	68,3	34,61
Alsen		s/d	s/d	19	V - C	66,25	48,75

Referencias: Sev.: severidad promedio. % GS: porcentaje de granos sanos. s/d: sin datos. V: método varianza. C: método conglomerado.

Como se observa en la **Tabla 13**, la severidad fue mucho más elevada en el año 2016 que en el 2015 para todos los materiales evaluados; si bien la evaluación se realizó en condiciones controladas, el año 2016 se caracterizó por ser un año conducente para la FET, lo que influyó también en el interior del invernáculo donde no hubo una buena discriminación entre susceptibles y resistentes ese año. Los eventos de infección relacionados a la FET identificados por la ocurrencia simultánea de precipitación y alta humedad relativa del aire, generaron períodos de mojado estimados de 27, 51 y 72 h, explicando la evolución de la enfermedad (Martínez *et al.* 2017).

Se encontraron diferencias relacionadas con mayor temperatura ambiental en el año 2016, lo que se magnificó en el interior del invernáculo. Este aumento en la temperatura, coincidente con el momento de anthesis y posterior a ella, favoreció el crecimiento del hongo, generando una mayor infección en las espigas (**Tabla 14**).

Tabla 14. Temperatura máxima en los meses de cultivo.

Año	JUL	AGO	SET	OCT	NOV	DIC
2015	27,1	30,3	27,8	29,2	31,9	35,2
2016	21,9	29,2	31,4	31,7	35,0	37,8

Referencias: Sombreado, los meses de inoculación y posterior a ella.

Si se observan los resultados de los métodos de selección, se ve una selección de las líneas semejante en ambos años de evaluación. La línea 25 mostró una moderada resistencia (sev. 30,46%) en el año 2015 pero fue susceptible (sev. 82,98%) en el año 2016; esta línea, a presiones de enfermedad muy altas, quiebra su moderada resistencia y se vuelve susceptible. En ambos años este material tuvo un buen porcentaje de granos sanos, condición que podría indicar presencia de resistencia **tipo IV**. Con el parental ProINTA Granar pasa lo mismo que con la línea 25, con la diferencia de que en ambos años su porcentaje de granos sanos fue muy bajo y se vieron muchas espiguillas abortadas, por lo que se infiere poca resistencia del **tipo IV** a la FET. Por otro lado, las líneas 19, 52 y 76 tuvieron una buena resistencia de **tipo II** en el año 2015 y una moderada resistencia en el año 2016, aunque la línea 19 fue superior al resto destacándose ambos

años. La línea 52 se destacó por su porcentaje de granos sanos en ambos años (podría tener resistencia **tipo IV**). Los resultados observados en estas líneas son consistentes en ambos análisis (conglomerado y varianza de la severidad). Por otra parte, como materiales muy susceptibles y de baja resistencia **tipo II** se observan las líneas 22, 93, 106, 120 y el parental BioINTA 1005 en el año 2015, y las líneas 64, 74, 86, 120 para el año 2016; la línea 120 fue la única que tuvo una baja resistencia **tipo II** en ambos años, seleccionada por conglomerado y ANAVA.

También se decidió hacer un análisis de correlación (**Tabla 15**) para ver como la severidad se relaciona con el porcentaje de granos sanos.

Tabla 15. Correlación de Pearson entre Severidad y % de Granos Sanos.

	Severidad	% GS
Severidad	1.00	2.2 E-12
% GS	-0.78	1.90

Este análisis mostró una correlación negativa entre la severidad y el porcentaje de granos sanos, con un $p < 0,05$ y un coeficiente $-0,78$, coincidiendo con lo dicho por Hernández (2010), quien observó una correlación positiva entre la severidad y el porcentaje de granos dañados.

4. Ambiente de campo bajo telado con infección artificial y riego

En este ensayo las principales variables medidas fueron la severidad y la incidencia, las cuales se utilizaron para calcular el índice de fusarium (IF). En este ambiente se obtuvieron valores altos de IF debido a las condiciones de altas temperaturas que favorecieron el desarrollo de la enfermedad y permitieron realizar una buena caracterización. En la **Tabla 16** se destacan en color azul las líneas moderadamente resistentes y en rojo las líneas muy susceptibles, además se consideró el método de selección.

Tabla 16. Incidencia, Severidad e Índice de Fusarium de las líneas seleccionadas.

Jaula 2016				
Líneas	Mét.	Inc.	Sev.	IF.
BioINTA 1007	C	100	90,72	90,72
93	V	100	89,04	89,04
70	V - C	100	87,17	87,17
120	V - C	95	88,83	84,39
64	C	95	83,46	79,29
BioINTA 1005	V - C	95	79,19	75,23
37	V - C	100	62,26	62,26
106	V	95	62,96	59,81
41	C	90	61,44	55,3
ACA 906		100	55,27	55,27
22	V	85	55,37	47,06
74	C	95	48,78	46,34
31	C	66,67	54,53	36,36
86	C	75	46,74	35,06
ProINTA Granar		90	34,99	31,49
62	C	86,67	34,61	30
53	V	90	28,83	25,95
1	V	75	30,86	23,15
76	V - C	73,33	30,42	22,31
52	V - C	55	26,71	14,69
75	V - C	60	22,76	13,66
17	V - C	40	30,35	12,14
107	V	75	16,15	12,11
Sumai 3#	V - C	55	20,49	11,27
19	V - C	40	21,32	8,53
42	V - C	66,67	10,44	6,96
Alsen	C	40	15,47	6,19
25	C	26,67	22,45	5,99

Referencias: Inc: promedio de incidencia Sev.: promedio de severidad IF.: índice de Fusarium V: método ANAVA C: método conglomerado.

Como referencia de materiales moderadamente resistentes se tomaron aquellos que tuvieron un valor de IF debajo de 15 y como materiales muy susceptibles, a los que tuvieron un IF superior a 75. Se destacaron 7 líneas (52, 75, 17, 107, 19, 42 y 25) y dos cultivares testigos (Sumai 3# y Alsen) por presentar un IF menor a 15, además estas líneas tuvieron una severidad inferiores al 30%. La línea 25 se destaco sobre el resto por su resistencia de **tipo I**, sin embargo otras 3 líneas (52, 17 y 19) obtuvieron una moderada resistencia de **tipo I** con valores igual o menor que los testigos. Por otro lado, se observaron 4 líneas que se vieron muy afectadas (93, 70, 120 y 64), además del cultivar BioINTA 1007 y el parental BioINTA 1005; en estos materiales se observaron valores de incidencia del 95% y una alta severidad, entre 80% y 90%.

5. Ensayo a campo bajo infección natural

El año 2016 fue un año conducente a la FET porque se dieron buenas condiciones ambientales para que se exprese la enfermedad, permitiendo hacer una buena evaluación sobre los distintos materiales. Cuando las plantas entraron en antesis (Z 6.5) se acumularon 13 días de lluvias y llovizna, sumando 99 mm en un periodo de 35 días, con temperaturas promedio de 31.5°C y humedad relativa de 77%.

Tabla 17. Incidencia, Severidad e Índice de Fusarium de las líneas seleccionadas.

Campo 2016				
Líneas	Mét.	Inc.	Sev.	IF.
120	V - C	60	55	33
BioINTA 1007	C	65	40	26
BioINTA 1005	V - C	45	45	20,25
37	V - C	50	35	17,5
70	V - C	40	40	16
86	C	50	30	15
41	C	30	40	12
22	V	25	35	8,75
74	C	25	35	8,75
93	V	30	20	6
31	C	20	25	5
106	V	15	25	3,75
ACA 906		30	10	3
64	C	15	15	2,25
53	V	15	10	1,5
1	V	10	10	1
ProINTA Granar		10	10	1
19	V - C	10	10	1
25	C	10	10	1
76	V - C	10	10	1
107	V	5	15	0,75
17	V - C	5	10	0,5
Sumai 3#	V - C	5,5	5,5	0,3
62	C	5	5	0,25
Alsen	C	5	5	0,25
52	V - C	0,5	0,5	0,002
42	V - C	0	0	0
75	V - C	0	0	0

Referencias: Inc: promedio de incidencia Sev.: promedio de severidad IF.: Índice de Fusarium V: método ANAVA C: método conglomerado.

Al ser un ensayo realizado en el campo con infección natural hubo una menor cantidad de inóculo que en los ensayos realizados con infección artificial; la expresión de la FET en los materiales evaluados fue menor; por esto, se observan algunas líneas resistentes y muchas líneas con moderada resistencia. Como se muestra en la **Tabla 17**, el umbral que se eligió para los materiales moderadamente resistentes fue un IF de 1 o menor. Se destacaron en este ambiente de evaluación 10 líneas, el parental ProINTA Granar y los cultivares Alsen y Sumai 3#. Las líneas 75 y 42 registraron valores de IF igual a 0, y se comportaron como materiales resistentes en estas condiciones. También se destacó la línea 52 que tuvo un IF de 0,002, valor muy bajo o cercano a 0. Los testigos Sumai 3# y Alsen mostraron una moderada resistencia a la enfermedad junto a las líneas 62, 17 y 107. Todos ellos presentaron un IF menor a 1, con incidencias menores a 5% y severidad inferior a 15%. La mayor severidad se observó en la línea 107 (sev. 15%); la enfermedad se propagó un poco más que en otros materiales del mismo grupo aunque tuvo una incidencia baja (5%). El parental ProINTA Granar y las líneas 1, 19, 25, 76 y 107 también presentaron una moderada resistencia a la enfermedad con IF igual a 1, y los valores de incidencia y severidad no superaron el 10%.

Para las líneas susceptibles se tomó un valor de IF superior a 15; en este grupo se encontraron las líneas 37, 70, el parental BioINTA 1005 y el cultivar BioINTA 1007 con un IF de 26. Y como muy susceptible se observó la línea 120 con un valor de IF de 33.

6. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC)

En la **Tabla 18** se muestran los valores de AUDPC obtenidos en las evaluaciones realizadas en el invernáculo en el año 2015. Se ordenaron los valores de menor a mayor y se analizaron respecto a los valores de severidad de ese año y a la severidad promedio de todos los ensayos.

Tabla 18. Comparación del AUDPC, severidad invernáculo 2015 y severidad promedio de las líneas seleccionadas.

Líneas	AUDPC	Sev. 2015	Sev. Prom
52	453,04	7,41	30,65
ProINTA Granar	1142,4	27,47	48,29
19	1189,32	23,55	32,62
76	1397,16	28,03	40,65
53	1773,02	33,93	43,71
25	1789,12	30,46	37,00
Sumai 3	1864,75	32,99	37,45
42	1948,34	33,56	35,84
75	2120,51	38,07	37,68
1	2144	34,94	42,85
107	2188	38,91	41,32
17	2269,86	41,39	39,40
BioINTA 1007	2607,78	48,85	71,00
31	2784,17	52,85	56,61
62	2784,85	38,5	44,36
41	2943,83	47,02	61,16
ACA 906	3089,54	65,17	62,20
70	3366,13	56,56	69,64
86	3473,67	60,5	64,07
37	3761,51	63,1	67,03
106	3764,61	70,09	64,89
120	3793,6	67,22	77,73
22	4102,31	66,03	61,78
64	4342,63	64,19	65,69
93	4467,67	70,38	68,91
BioINTA 1005	4643,94	72,93	71,72

En esta evaluación la línea 52 se destacó sobre el resto con una gran diferencia; además otras líneas que tuvieron un AUDPC bajo fueron la 19 y 76 con valores similares al comportamiento de ProINTA Granar.

Para poder ver la relación entre las variables, se realizó un análisis de correlación de Pearson que se muestra en la **Tabla 19**.

Tabla 19. Coeficientes de correlación de Pearson y sus probabilidades entre el AUDPC, severidad invernáculo 2015 y severidad promedio.

	AUDPC	Severidad 2015	Severidad Promedio
AUDPC	1.00	0.00	2.0 E-08
Severidad 2015	0.97	1.00	6.4 E-10
Severidad Promedio	0.86	0.90	1.00

Este análisis permitió ver una correlación positiva con la severidad registrada durante el año 2015 y una correlación altamente significativa y positiva con la severidad promedio de todos los ensayos ($p < 0,05$) con un coeficiente de 0,86. A partir de esos resultados se realizó un análisis de regresión lineal para entender mejor la relación entre ambas variables (**Tabla 20 y 21**).

Tabla 20. Coeficiente de regresión para el AUDPC.

Variable	N	R ²	R ² Aj
AUDPC	26	0.74	0.73

Tabla 21. Coeficientes de regresión y estadísticos asociados.

Coef.	Est.	E.E.	LI (95%)	LS (95%)	T	p-valor	Cp Mallows
Const.	-789.67	440.29	-1698.38	119.04	-1.79	0.0855	
Sev. Prom.	66.03	8.04	49.44	82.62	8.21	<0.0001	65.82

La directa relación encontrada entre ambas variables permite estimar el valor de AUDPC conociendo la severidad. La ecuación que resultó de este análisis indica que:

$$\text{AUDPC} = -789,67 + 66,03 * \text{severidad}.$$

Es decir, que si se incrementa en una unidad la severidad, el AUDPC aumenta 66,03 unidades. En la **Tabla 20**, se muestra que el $R^2 = 0,73$; esto indica que el 73% de la variable AUDPC es explicada por la variable severidad (**Figura13**).

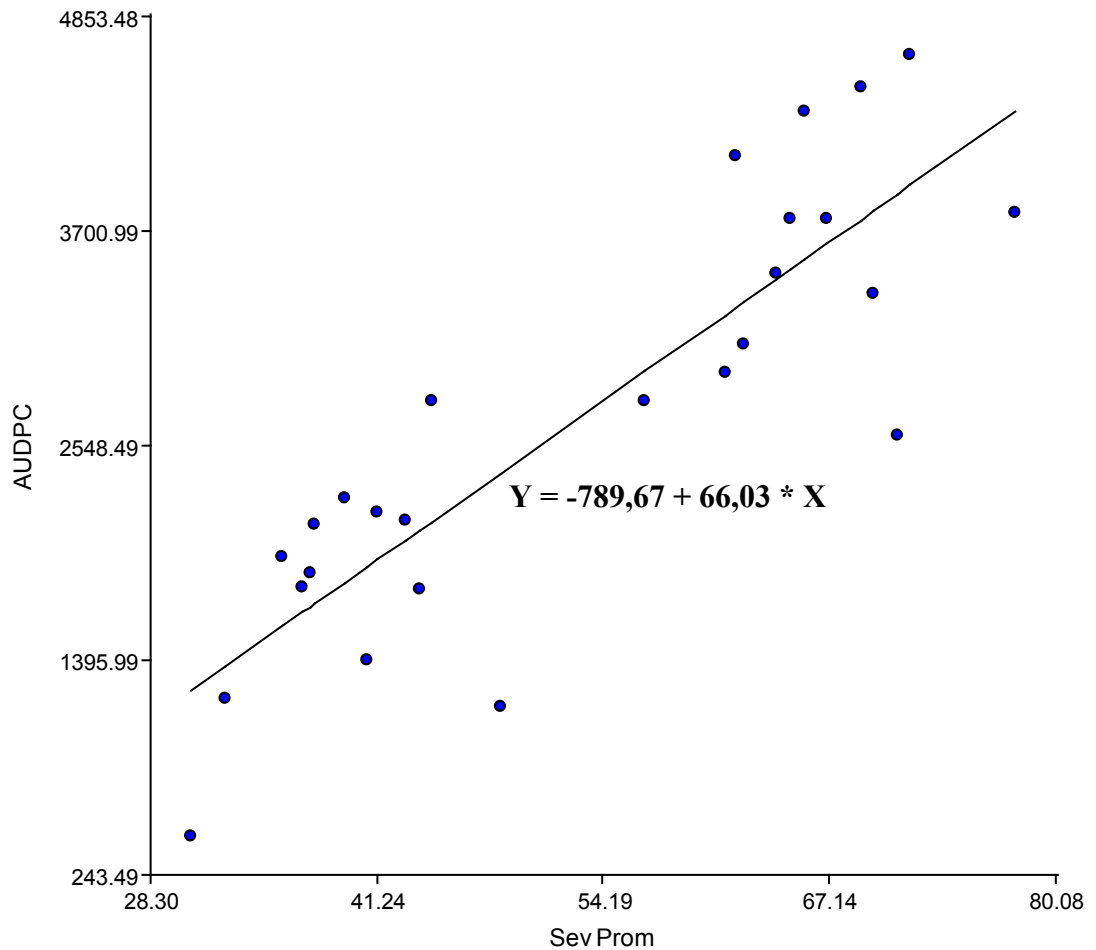


Figura 13. Regresión entre el AUDPC y la severidad promedio de todos los ensayos.

Conclusiones

- En la población de 120 RILs estudiada se identificaron 11 líneas moderadamente resistentes, a través de dos métodos de selección: análisis de conglomerado y análisis de la varianza, de las cuales 6 líneas (17, 19, 42, 52, 75 y 76) fueron seleccionadas por ambos métodos.
- La línea 19 se destacó por su resistencia a la propagación de la infección en la espiga (**tipo II**) y además tuvo una moderada resistencia a la penetración del hongo (**tipo I**), comportándose mejor que Sumai 3#, testigo moderadamente resistente a la FET. También se destacó por presentar un menor valor de área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC), similar al que presentó su parental ProINTA Granar.
- La línea 52 presentó muy buen comportamiento en la mayoría de las variables analizadas. Se destacó por presentar el mayor porcentaje de granos sanos, lo que se relaciona con una baja infección de granos, respuesta atribuida a la resistencia de **tipo IV**. Esta línea además presentó, por gran diferencia, el valor más bajo de AUDPC. También tuvo una buena resistencia en la dispersión de la enfermedad en la espiga (**tipo II**) y una moderada resistencia a la infección primaria del hongo en las espigas (**tipo I**). Además se comportó muy bien a campo en condiciones naturales, superando a los testigos Alsen y Sumai 3#.
- La línea 76 presentó una buena resistencia **tipo II** y además obtuvo un valor de AUDPC bajo, similar al que presentó ProINTA Granar.
- Las líneas 75 y 42 se destacaron porque no se observó presencia de la enfermedad en sus espigas en el ensayo a campo con infección natural. Superando en comportamiento a los testigos moderadamente resistentes Alsen y Sumai 3#.
- La línea 25, seleccionada únicamente por conglomerado, se destacó por tener la mayor resistencia a la penetración del hongo (**tipo I**), mostrando mejores valores que el testigo Alsen.

Capitulo III: Análisis de las Harinas

La harina de trigo es una de las principales fuentes de alimentación en todo el mundo, es un importante producto que nos aporta nutrientes, proteínas, carbohidratos, vitaminas y fibras necesarias para nuestro organismo. El mayor problema de las harinas son los granos con Fusariosis, estos contienen micotoxinas que afectan la calidad de las misma disminuyendo la fuerza del gluten y la estabilidad de la masa además de alterar el sabor, color y olor. La técnica más utilizada para la determinación de las micotoxinas (tricotecenos tipo B) es la cromatografía gaseosa (CG), que ofrece como ventaja alta sensibilidad, especificidad y el análisis simultáneo de varios tricotecenos.

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

Materiales y Métodos

A partir de los análisis por Conglomerados (cluster) y ANAVA presentados en la **Tabla 12** se seleccionaron 22 RILs para los siguientes estudios. De acuerdo a las respuestas de las mismas frente a la FET, fueron caracterizadas como líneas moderadamente resistentes y líneas muy susceptibles.

1. Molienda de las muestras de trigo

A partir de las muestras cosechadas en el ensayo en invernáculo del año 2015, se obtuvieron las harinas para su posterior análisis. Las muestras se molieron con molinillo de laboratorio (24000 rpm) hasta conseguir una harina con tamaño de partícula de 88 a 250 micrones, la cual fue utilizada tanto para el análisis proteico como el de micotoxinas.

2. Análisis de Micotoxinas

La técnica utilizada para el análisis de tricotecenos fue la descrita por Trucksess *et al.* (1984) y modificada por Rizzo *et al.* (1995, 1997). Se efectuó una extracción con acetato de etilo-acetonitrilo-agua (50:41:9) agregando sulfato de amonio al extracto antes de su elución en la columna; para incrementar la recuperación de los tricotecenos menos polares (3- y 15-ADON) por efecto del salting-out. Con estas condiciones fue posible obtener una recuperación del 90%. El ensayo se realizó por triplicado para todos los tricotecenos analizados.

2.1 Extracción

Las correspondientes harinas fueron colocadas en Erlenmeyers con 60 mL de la mezcla de extracción, manteniéndose en agitación por una hora a 300 rpm. Luego se filtraron con papel Whatman n°1 y se tomaron 20 mL del filtrado en una probeta de 100 mL, al que se le agregó 1,4 g de sulfato de amonio

2.2 Limpieza (clean-up)

Se preparó una columna cromatográfica de 10 mm de diámetro interno y 50 mm de alto con 0,7 g de carbón activado (charcoal), 0,5 g de alúmina neutra y 0,3 g de celite. La columna se rellenó con un disco de papel Whatmann°1, sobre el cual se colocó 0,1 g de celite y 1,5 g

de la mezcla, golpeándola suavemente para compactarla (Trucksess *et al.* 1984; Rizzo *et al.* 1997).

La columna se fijó a un kitasato de 125 mL conectado a una trampa de agua a través de la cual se reguló la velocidad de flujo del solvente, a 2 a 3 mL por minuto. Se pasaron por la columna 20 mL del extracto, seguido por 2 lavados con 10 mL del solvente de extracción. El eluato se evaporó a sequedad a Baño María y se añadieron 3 mL de acetato de etilo al residuo; se calentó a ebullición en Baño María y se filtró con papel Whatman n°1; este procedimiento se repitió dos veces. El residuo resultante se recolectó en un matraz y se lo llevó a secado en rotavapor. Luego se traspasó a un tubo Eppendorf, re-suspendiendo con 500 µL de acetato de etilo-metanol (95:5). Se colocaron 100 µL del extracto en un vial y los 400 µL restantes en otro. El primer vial se utilizó para el análisis de las toxinas y los 400 µL restantes fueron utilizados cuando fue necesario repetir muestras. Ambos viales fueron secados en corriente suave de nitrógeno y se almacenaron a -18°C hasta su análisis por cromatografía gaseosa.

2.3 Detección y cuantificación de DON, 15-ADON, 3-ADON

Para la detección y cuantificación de tricotecenos se utilizó un cromatógrafo de gases Shimadzu Modelo GC17 con detección de captura de electrones 63N, equipado con inyector Split/splitless y equipado con columna capilar RX-5MS (25 m x 0,2 mm id). Los límites de detección fueron de 0,02 µg/g para DON y sus derivados acetilados. Los estándares de DON, 15-ADON y 3-ADON fueron obtenidos de SIGMA chemicalcompany (St Louis, MO, USA). La presencia de tricotecenos se confirmó con un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS QP 5050A, Shimadzu).

3. Análisis de Proteínas

Debido a la importancia de la calidad de las harinas en la industria, el análisis proteico se centró en las gluteninas de alto peso molecular.

3.1 Extracción proteica

La extracción proteica de gluteninas que a continuación se detalla es igual para el análisis de HPLC-FR y de SDS-PAGE. Se realizó por duplicado a partir de muestras de 50 mg de harina, de acuerdo al protocolo propuesto por Naeem & Sapirstein (2007). La fracción de gliadinas se extrajo utilizando 500 µL de solución 1-propanol al 50% v/v, agitando las

muestras con vortex e incubándolas 15 min a temperatura ambiente. Luego fueron centrifugadas durante 3 min a 15000 g. A partir de la obtención del pellet, se realizó la extracción de la fracción gluteninas totales (GAPM y GBPM respectivamente), para lo cual se agregaron 150 μ L de buffer de extracción (0,08M Tris-HCl, 1-propanol al 50%v/v, pH 7,5) y DTT al 1% p/v, y se las incubó 30 min a 60°C. Luego, se agregaron 150 μ L de buffer de extracción, con 4-vinilpiridina al 4% v/v y se incubó durante 30 min a 60°C; finalmente, se centrifugaron las muestras 3 min a 15000 g. Una alícuota de 150 μ L del sobrenadante fue inmediatamente inyectada en HPLC para su análisis. El sobrenadante restante se fraccionó en alícuotas de 50 μ L y se liofilizó para su posterior análisis por SDS-PAGE.

3.2 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

La electroforesis en geles de poliacrilamida se realizó en condiciones desnaturalizantes (Laemmli 1970). Cada gel estuvo conformado por dos partes, un gel empaquetador (de poro grueso) en la parte superior, y un gel separador (al 8% de poliacrilamida) en la parte inferior.

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

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

Para la tinción de los geles, se realizaron tres lavados consecutivos con solución de 1^{ra} fijación (**Tabla 22**) por 30 min. Posteriormente se realizaron tres lavados consecutivos con solución de lavado, de 20 min cada uno, con agitación moderada. Por último, se agregaron 50 ml de solución de 2^{da} fijación, se incubó por 30 min y se agregó 1,5% del volumen de una solución al 2% de Coomassie coloidal (G-250). Finalmente se incubaron los geles durante 12 h, luego se enjuagaron con agua destilada y se los dejaron reposar en agua destilada por 2 h. Se realizó una captura fotográfica de los mismos con un equipo de fotodocumentación Bio Rad, utilizando el software QuantityOne (BioRad).

El análisis del patrón de bandas se realizó utilizando el software GelAnalyzer2010, se asignaron los pesos moleculares de las bandas proteicas, y se analizó la densidad de las mismas.

Tabla 22. Composición de las soluciones de fijación de la tinción.

Reactivos	Solución de 1 ^{ra} fijación	Solución de lavado	Solución de 2 ^{da} fijación
Etolol (96%)	156,25 mL	-	46,9 mL
Ácido fosfórico (85%)	11,76 mL	11,76 mL	29,4 mL
Sulfato de amonio	-	-	37,5 g
Volumen Final	500 mL	500 mL	250 mL

3.3 Cromatografía Líquida de Alta Resolución por Fase Reversa HPLC-FR

A partir de las extracciones proteicas frescas (Item 3.1) se realizaron los análisis cromatográficos. Se inyectaron de manera independiente alícuotas de 150 µL del sobrenadante fresco en el HPLC para su análisis. El equipo de HPLC-FR que se utilizó es el modelo Waters 717 con una columna de fase reversa Aquapore RP-300 7 m, (tamaño de poro: 300 µm, tamaño de partícula 7 µm). Como solventes de corrida se utilizaron: solvente A (1 L): 1 L de agua y 80 µL de ácido trifluoroacético (TFA); solvente B (1 L): 440 mL de acetonitrilo (ACN), 560 mL de agua destilada y 80 µL de TFA. La detección se realizó con un equipo de arreglo de diodos marca Waters a 206 nm.

3.4 Análisis de calidad de las harinas: Score de Payne

A partir de los patrones obtenidos en los geles de poliacrilamida, se realizó un análisis de calidad de acuerdo al puntaje de calidad de gluteninas, o score desarrollado por Payne *et al.* (1987). Además, se estimó el efecto de la infección de acuerdo a la reducción en las señales o bandas proteicas, medido por densitometría con el programa GelAnalyzer2010.

3.5 Análisis de los perfiles cromatográficos

A partir de los perfiles cromatográficos, se analizaron los picos proteicos de las gluteninas de alto peso molecular obtenidos por HPLC, se calculó el área con el programa Empower

Software, y se analizó el efecto de los mismos sobre la infección y las concentraciones de micotoxinas.

4. Análisis Estadísticos

Los datos obtenidos se analizaron con el programa estadístico Infostat. Se realizaron análisis descriptivos con medidas resúmenes y tablas de frecuencias para categorizar los niveles de micotoxinas. Se realizaron análisis de variancias y comparación de medias LSD de Fisher ($p < 0.05$) para los patrones de las GAPM de cada parental. Para estudiar las posibles relaciones entre las variables analizadas se utilizó el test de correlación de Pearson.

Resultados y Discusión

A partir de los ensayos de trigo bajo distintos ambientes, se caracterizó la respuesta de las RILs a la infección por parte de *F. graminearum* de acuerdo con parámetros analizados en granos, espigas y plantas. A partir de esos análisis, se decidió continuar caracterizando líneas seleccionadas en cuanto a los niveles de micotoxinas y perfiles proteicos según su respuesta a la enfermedad.

1. Micotoxinas

A partir de las harinas se realizó la extracción de micotoxinas de acuerdo con el ítem 2 de materiales y métodos. Su análisis por GC-masa dio valores de contenido de DON comprendidos entre 0,67 µg/g y 4259,69 µg/g. En los acetilados los valores obtenidos fueron entre 0 µg/g y 1599,76 µg/g para el 3-ADON y de 0,74 µg/g a 299,05 µg/g para el 15-ADON. Para categorizar estos niveles de micotoxinas se realizaron tablas de frecuencia. Los resultados obtenidos en los análisis de micotoxinas se presentan en dos tablas, una con líneas y testigos moderadamente resistentes a la FET (**Tabla 23**) y otra con líneas y testigos susceptibles a la enfermedad (**Tabla 25**), junto a los valores de severidad.

Tabla 23. Contenido de micotoxinas en líneas moderadamente resistentes a la FET.

Líneas	DON µg/g	3ADON µg/g	15ADON µg/g	DON	3ADON	15ADON	Severidad
25	0,67	0	0,74	+	-	+	30,46
53	2,12	4,35	0,74	+	+	+	33,93
52	4,67	25,16	1,06	+	++	+	7,41
1	5,7	22,8	1,43	+	++	+	34,94
42	6,27	5,8	1,36	+	+	+	33,56
17	13,12	87,44	2,92	+	++	+	41,39
76	44,02	156,78	3,95	++	++	+	28,03
19	52,99	280,37	5,39	++	++	+	23,55
107	77,66	37,06	8	++	++	+	38,91
ProINTA Granar	177,44	421,09	42,55	++	++	++	27,47
Sumai 3#	211,49	409,5	24,66	++	++	++	32,99
62	313,69	177,11	1,96	++	++	+	38,50
75	787,38	1514,52	299,05	+++	++++	+++	38,07

= Baja
 = Media
 = Alta
 = Muy Alta

Límites: **DON** = de 0 – 20 µg/g, de 21 – 500 µg/g, de 501 – 1500 µg/g, > 1501 µg/g.

3ADON = de 0 – 20µg/g, de 21 – 500 µg/g, de 501 – 1500 µg/g, > 1501 µg/g.

15ADON = de 0 – 20 µg/g, de 21 – 100 µg/g, > 101 µg/g.

La línea 25 presentó el valor más bajo para DON y 15-ADON, no detectándose en sus harinas 3-ADON. Su severidad fue del 30,46%, un valor medio si se compara con los valores de las demás líneas y testigo de este grupo. La línea 53 también presentó valores bajos para DON con una concentración de 2,12 µg/g (valor muy cercano a lo permitido en la comercialización), además tuvo bajos valores para los derivados acetilados, 4,35 µg/g para 3-ADON y 0,74 µg/g para 15-ADON, y con una severidad del 33,93%. Otra línea con bajos valores de micotoxinas fue la 42, con 6,27 µg/g para DON, 5,8 µg/g para 3-ADON y 1.38 µg/g para 15-ADON y con una severidad de 33,56%. La línea 1 registró valores bajos para DON y 15-ADON y valores medios para 3-ADON y severidad.

La línea con menor severidad fue la 52, con 7,41%, presentando además un bajo valor de DON y 15-ADON, con un valor moderado para 3-ADON de 25,16 $\mu\text{g/g}$. Otra línea que presentó buena respuesta a la FET, con una severidad de 23,55% fue la 19, con un bajo valor para 15-ADON y valores intermedios de DON y 3-ADON.

Los testigos ProINTA Granar y Sumai 3# presentaron valores intermedios para las 3 micotoxinas y para los valores de severidad, aunque ProINTA Granar mostró una severidad de 27,47%, más baja que la de Sumai 3# que registró una severidad de 32,99%.

La línea que más se vio afectada por la FET dentro de este grupo fue la línea 17, con una severidad de 41,39%, aunque mantuvo niveles bajos de DON y 15-ADON, y valores medios para 3-ADON. La línea que tuvo los valores más altos de micotoxinas dentro de este grupo fue la 75, registrando valores altos para DON (787,38 $\mu\text{g/g}$) y 15-ADON (299,05 $\mu\text{g/g}$) y muy altos para 3-ADON (1514,52 $\mu\text{g/g}$) y una severidad del 38,07%, elevada para este grupo.

Al realizar un análisis de correlación entre los valores de micotoxinas y los de severidad de la enfermedad, se observó ausencia de correlación entre ambos parámetros (**Tabla 24**).

Tabla 24. Correlación de Pearson: Coeficientes\probabilidades.

	DON $\mu\text{g/g}$	3-ADON $\mu\text{g/g}$	15-ADON $\mu\text{g/g}$	Severidad
DON $\mu\text{g/g}$	1.00	1.4 E-06	9.4 E-06	0.32
3-ADON $\mu\text{g/g}$	0.94	1.00	8.3 E-08	0.55
15-ADON $\mu\text{g/g}$	0.92	0.97	1.00	0.48
Severidad	0.30	0.18	0.22	1.00

El análisis evidenció que no existió correlación significativa entre contenido de micotoxinas y severidad ($p > 0.05$ y coeficiente 0,30), pero permitió ver que hubo correlación entre DON y sus formas acetiladas ($p < 0.05$ y coeficientes 0.94, 0.92). Esto indica que, en este grupo, cuando aumentó el DON aumentaron los valores de los derivados acetilados. También se evaluaron las líneas y testigos susceptibles a la FET (**Tabla 25**).

Tabla 25. Contenido de micotoxinas en líneas susceptibles a la FET.

Líneas	DON	3ADON	15ADON	DON	3ADON	15ADON	Severidad
	µg/g	µg/g	µg/g				
22	4	0	2	+	-	+	66.03
37	4,15	0	2,2	+	-	+	63.10
70	4,7	0	1,18	+	-	+	56.56
41	9,22	8,38	1,29	+	+	+	47.02
31	11,96	62,5	6,2	+	++	+	52.85
86	20,51	21,84	2,4	+	++	+	60.50
ACA 906	45,72	371,6	99,78	++	++	++	65.17
93	63,59	22,14	7,67	++	++	+	70.38
64	161,58	1182,54	129,14	++	+++	+++	64.19
BioINTA 1007	517,76	620,35	19,47	+++	+++	+	48.85
106	975,02	1070,72	55,47	+++	+++	++	70.09
120	1000,35	1599,76	22,39	+++	++++	++	67.22
BioINTA 1005	4259,69	768,57	2,2	++++	+++	+	72.93

= Baja
 = Media
 = Alta
 = Muy Alta

Límites: **DON** = de 0 – 20 µg/g, de 21 –500 µg/g, de 501 –1500 µg/g, >1501 µg/g.

3ADON = de 0 – 20 µg/g, de 21 –500 µg/g, de 501 –1500 µg/g, >1501 µg/g.

15ADON = de 0 – 20 µg/g, de 21 –100 µg/g, > 101 µg/g.

Las líneas que presentaron valores promedio altos en severidad en todos los ensayos se incluyeron en este grupo. Se destacan las líneas 22, 37 y 70 por presentar concentraciones bajas de DON, 15-ADON, sin detección de la forma acetilada 3-ADON, a pesar de tener valores altos de severidad.

Por otro lado la línea con mayores valores de micotoxinas fue la 120 que registró un valor alto para DON (1000,35 µg/g), muy alto de 3-ADON (1599,76 µg/g) y medio para 15-ADON (22,39µg/g).

Además se observó que la línea 41 tuvo el valor más bajo de severidad (47,02%) para este grupo, registrando valores bajos para DON (9,2 µg/g) y 3-ADON (8,38 µg/g) y muy bajo para 15-ADON (1,29 µg/g). El testigo que mejor se comportó en este grupo fue ACA 906

con valores intermedios para las 3 micotoxinas, en tanto que el parental BioINTA 1005 presentó valores muy altos de severidad (72,93%) y DON (4259,69 $\mu\text{g/g}$) y una concentración alta para 3-ADON de 768,57 $\mu\text{g/g}$, aunque registró una concentración baja para 15-ADON de 2,2 $\mu\text{g/g}$.

Con estos valores se realizó un análisis de correlación para ver la relación entre la concentración de micotoxinas y la severidad (**Tabla 26**).

Tabla 26. Correlación de Pearson entre el contenido de micotoxinas y la severidad.

	DON $\mu\text{g/g}$	3-ADON $\mu\text{g/g}$	15-ADON $\mu\text{g/g}$	Severidad
DON $\mu\text{g/g}$	1.00	0.15	0.70	0.11
3-ADON $\mu\text{g/g}$	0.43	1.00	0.07	0.20
15-ADON $\mu\text{g/g}$	-0.12	0.52	1.00	0.46
Severidad	0.46	0.38	0.23	1.00

Se pudo observar que no hubo correlación entre contenido de micotoxinas y severidad ($p > 0,05$ y coeficiente de 0,46); tampoco hubo correlación entre deoxinivalenol y sus derivados acetilados ($p > 0,05$ y coeficientes 0.43, -0,12) como ocurre con el grupo de materiales moderadamente resistentes a la FET.

La relación entre la intensidad de la enfermedad y la presencia de micotoxinas es contrastante, debido a que otros estudios han informado una correlación positiva entre ellas, relacionándolas con su rol en la propagación o desarrollo de la enfermedad (Arseniuk *et al.* 1999; Miedaner *et al.* 2006), observaron altas correlaciones entre los rasgos de resistencia y el contenido de DON, donde las variedades más resistentes presentaban menos acumulación de DON.

Los resultados observados en la presente investigación fueron coincidentes con los de Alexander *et al.* (1997), Chen *et al.* (1995), Liu *et al.* (1997) y Alberione *et al.* (2015) donde tampoco se detectó correlación entre los niveles de infección y el contenido de micotoxinas.

Mesterházy *et al.* (1999) indican que la variabilidad se explica por la presencia de mecanismos de tolerancia que afectan la relación entre la severidad de la FET y la respuesta del rendimiento. La resistencia a la infección del grano incide en los valores de FET,

observándose genotipos con baja severidad de infección pero con alta contaminación de DON y viceversa. Los genotipos tienen una influencia significativa en la producción de DON en el tejido infectado, es decir, genotipos altamente susceptibles pueden tener una acumulación moderada o baja de DON, sin embargo, los genotipos más resistentes que no muestran infección en ninguno de los aislamientos o solo desarrollaron síntomas esporádicos, no se detectó acumulación de DON o fue muy baja. Los genotipos más resistentes tienen un comportamiento más estable que los genotipos susceptibles, los cuales son muy inestables en condiciones de epidemias.

Por lo tanto, la variación genotípica en el trigo ofrecería buenas posibilidades para reducir el contenido de DON en los granos mediante la selección de resistencia. Dado que la intensidad de la enfermedad no siempre es un indicador del contenido de micotoxina, la comprensión acerca de los mecanismos involucrados en estas respuesta, resulta aún un desafío a dilucidar (Bai *et al.* 2001; Hart & Schabenberger 2001; Erlanger *et al.* 2003; Shaner & Buechley 2004). De lo expuesto se desprende el potencial peligro para la salud humana y animal en la ingesta de granos y/o harinas aparentemente sanos, los cuales podrían contener valores considerables de micotoxinas.

2. Análisis de Proteínas

Debido al rol preponderante de las proteínas en la calidad de las harinas, se realizaron análisis con el fin de identificar las gluteninas de alto peso molecular y medir la densidad de las bandas proteicas para detectar líneas con buena calidad panadera. Los datos proteicos resultan de gran importancia en los Programas de Mejoramiento de Trigo.

2.1 Identificación alélica de las Gluteninas de Alto Peso Molecular

Las bandas proteicas fueron analizadas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) para las harinas de las 21 líneas seleccionadas, los 2 cultivares parentales y los testigos. Esta técnica permitió identificar los alelos correspondientes a las bandas proteicas, datos con los cuales se determinó el Score de Payne (Payne *et al.* 1987). En la **Figura 14** se muestran los perfiles proteicos obtenidos, en un gel modelo.

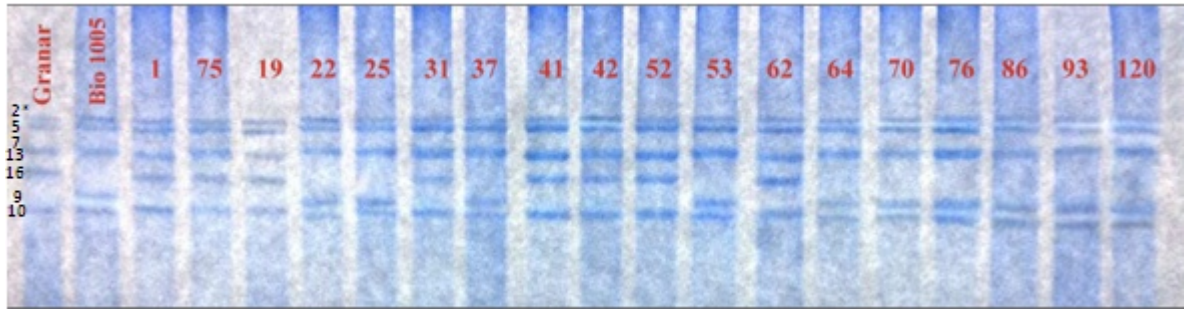


Figura 14. Gel de poliacrilamida-SDS para la identificación de patrones de GAPM en las líneas seleccionadas.

Las líneas seleccionadas presentaron los mismos patrones proteicos GAPM que los padres, por lo cual no hubo recombinación en las RILs para esta característica. El 43% de las líneas presentó el perfil del parental ProINTA Granar y el 57%, el de BioINTA 1005 (1: 1). Por otra parte, los perfiles proteicos observados en los cultivares testigos y parentales coincidieron con lo descrito en la bibliografía (Vanzetti *et al.* 2013, Zhao *et al.* 2013, Xiyong *et al.* 2012).

En el trigo hexaploide, las GAPM están codificadas por los loci *Glu-1*, de los tres subgenomas *Glu-A1*, *Glu-B1* y *Glu-D1*, que se ubican en el brazo largo de los cromosomas del grupo 1. Cada locus contiene un par de genes ligados entre sí que codifica dos subunidades diferentes, indicadas como subunidades de tipo x e y, respectivamente, las cuales no pueden desacoplarse usando estrategias convencionales de mejoramiento de plantas; es decir, una subunidad específica de tipo x es usualmente asociada a una subunidad de tipo y definida (Payne *et al.* 1987, Shewry *et al.* 2002 B). Para los cultivares de trigo pan hexaploide se citan seis tipos posibles de GAPM, incluidos en 1Ax, 1Ay, 1Bx, 1By, 1Dx y 1D y pero debido al silenciamiento génico de algunas subunidades, normalmente se expresan de 3 a 5 genes con pesos moleculares que van de 60 a 90 KDa (Shewry *et al.*, 1989, Shan *et al.* 2007).

En las RILs obtenidas por el cruzamiento de ProINTA Granar x BioINTA 1005 solamente hubo diferencia en los alelos del locus *GluB1* porque para los locus del *GluA1* y *GluD1* los alelos son iguales en ambos padres. Para el locus *GluA1* ambos padres tienen el alelo 2* y para *GluD1* ambos padres tienen los alelos (5+10). Para el locus *GluB1*, ProINTA Granar presenta los alelos (13 + 16) y BioINTA 1005 tiene los alelos (7+9). La ausencia de nuevos

fenotipos se asociaría a la similitud entre los padres en cuanto a los perfiles proteicos, lo que conlleva a escasa probabilidad de recombinación.

2.2 Asignación del Score de Payne

La importancia del estudio y caracterización de la fracción proteica de las gluteninas de alto peso molecular se refleja en diversos estudios que han relacionado los alelos de esta fracción con un parámetro de calidad y han permitido desarrollar un score de calidad basado en este perfil (Payne *et al.* 1987); este valor es de utilidad como indicador de la calidad del grano (Cornish *et al.* 2001; Horvat *et al.* 2009). El cálculo del score para los cultivares analizados se muestra en la **Tabla 27** junto a los datos promedio de severidad de todos los ensayos.

Tabla 27. Score de calidad obtenida a partir de SDS-PAGE y datos de severidad promedio.

Líneas	Patrón			Score			Score	Sev.
	GlaA1	GluB1	GluD1	GluA1	GluB1	GluD1	Total	Prom.
52	2*	13 + 16	5 + 10	3	3	4	10	30,65
19	2*	13 + 16	5 + 10	3	3	4	10	32,62
42	2*	13 + 16	5 + 10	3	3	4	10	35,84
75	2*	13 + 16	5 + 10	3	3	4	10	37,68
1	2*	13 + 16	5 + 10	3	3	4	10	42,85
62	2*	13 + 16	5 + 10	3	3	4	10	44,36
ProINTA Granar	2*	13 + 16	5 + 10	3	3	4	10	48,29
31	2*	13 + 16	5 + 10	3	3	4	10	56,61
41	2*	13 + 16	5 + 10	3	3	4	10	61,16
106	2*	13 + 16	5 + 10	3	3	4	10	64,89
25	2*	7 + 9	5 + 10	3	2	4	9	37
17	2*	7 + 9	5 + 10	3	2	4	9	39,40
76	2*	7 + 9	5 + 10	3	2	4	9	40,65
107	2*	7 + 9	5 + 10	3	2	4	9	41,32
53	2*	7 + 9	5 + 10	3	2	4	9	43,71
22	2*	7 + 9	5 + 10	3	2	4	9	61,78
86	2*	7 + 9	5 + 10	3	2	4	9	64,07
64	2*	7 + 9	5 + 10	3	2	4	9	65,69
37	2*	7 + 9	5 + 10	3	2	4	9	67,03
93	2*	7 + 9	5 + 10	3	2	4	9	68,91
70	2*	7 + 9	5 + 10	3	2	4	9	69,64
BioINTA 1005	2*	7 + 9	5 + 10	3	2	4	9	71,72
120	2*	7 + 9	5 + 10	3	2	4	9	77,73
BioINTA 1007	2*	7 + 9	5 + 10	3	2	4	9	71,00
ACA 906	1	7 + 9	5 + 10	3	2	4	9	62,20
Sumai 3	nulo	7 + 8	2 + 12	1	3	2	6	37,45

Azul: líneas y cultivares moderadamente resistentes a la FET.

Rojo: líneas y cultivares susceptibles a la FET.

La asignación del Score de Payne con la técnica de SDS-PAGE como parámetro de calidad de las harinas, es un estudio de rutina al momento de analizar las harinas en los laboratorios de cereales (Park *et al.* 2003).

De las 21 líneas analizadas en este estudio, el 42,85% es decir 9 líneas, presentaron el patrón de ProINTA Granar. Entre ellas, el 66.67% mostraron ser líneas con una buena y moderada resistencia a la FET, con valores de severidad menores al 44,36%, mientras que el 33,33% de este patrón se mostraron susceptibles con valores de severidad por encima del 55%.

El 57,15% que corresponde a las 12 líneas restantes mostró el patrón de BioINTA 1005. En ellas, se vio que 41,67% presentaron una moderada resistencia a la FET con valores de severidad que van desde el 37% al 43,71%, en tanto que el 58,33% resultó ser muy susceptible a la FET con valores de severidad superiores al 61,78%.

2.3 Análisis de densitometría en las Gluteninas de Alto Peso Molecular

Se analizó con el programa GelAnalyzer 2010 la densidad proteica de las bandas en los geles de poliacrilamida, con la finalidad de determinar si estos valores resultan modificados por la magnitud de la infección, estimada de acuerdo a los datos de severidad.

En el análisis se tuvieron en cuenta todas las líneas seleccionadas y los parentales. Las líneas que compartían un mismo genotipo se sembraron en un mismo gel, junto al respectivo progenitor para evaluar la respuesta de las 5 subunidades GAPM.

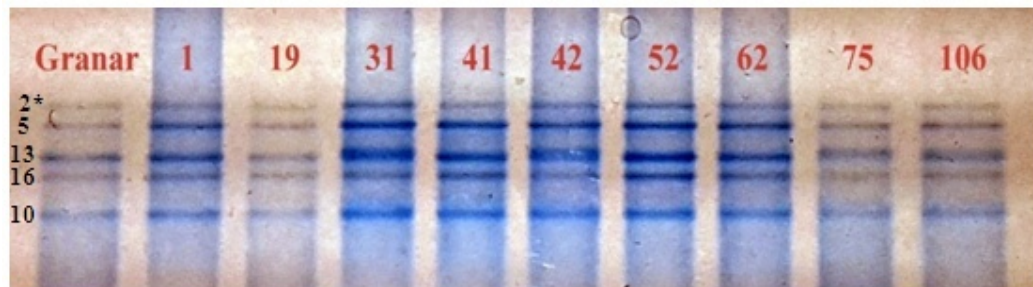


Figura 15. Gel de poliacrilamida para el análisis de densitometría.

Los valores promedio obtenidos en el estudio por densitometría se observan en la **Tabla 28** juntos al test de comparación de medias.

Tabla 28. Análisis comparativo de medias para los valores de densitometría en los geles de poliacrilamida en líneas que presentaron el patrón de GAPM del parental ProINTA Granar.

Líneas	2*		5		13		16		10	
	RAW	DS	RAW	DS	RAW	DS	RAW	DS	RAW	DS
19	14,5	A	50,5	A	122,5	A,B,C	23	A,B	25,5	A
ProINTA Granar	36	A	111,5	A,B	174,5	B,C	71,5	A,B,C	33	A,B
106	4,5	A	179,5	B,C	47	A,B	19,5	A,B	45	A,B
75	34	A	215	C	4,5	A	7	A	67	A,B
62	145	B	475	D	379,5	D	185,5	D,E	154,5	A,B,C
42	165,5	B	522	D,E	144	A,B,C	94	B,C	193,5	B,C,D
1	178,5	B	595,5	E,F	525,5	E	240	E	252,5	C,D
31	209	B	619	F	217	C	116	C,D	248,5	C,D
41	209	B	705,5	G	570,5	E	365,5	F	254	C,D
52	327,5	C	741,5	G	883	F	437	F	353	D

Los valores son datos promedios n=2

La línea 52 se diferenció de las demás por su mayor densidad en las bandas proteicas, la mayor diferencia se da en las bandas 2* y 13 indicando que existe una mayor concentración de proteínas y por consiguiente una menor degradación de estas en presencia de *F. graminearum*.

A partir de los datos de la **Tabla 28**, se realizó un análisis de correlación de Pearson, el cual indicó que no existe relación entre la intensidad de las señales proteicas y los valores de severidad ($p > 0,05$), aunque se observó alta correlación entre las distintas subunidades de las GAPM ($p < 0,05$ y coeficientes altos), de modo que cuando aumenta la señal de una de las bandas, aumenta la señal en todas las demás bandas de la misma línea (**Tabla 29**).

Tabla 29. Análisis de correlación entre los valores de intensidad en las bandas de GAPM y la severidad.

	2*	5	13	16	10	Severidad
2*	1.00	2.1 E-05	1.6 E-03	8.9 E-04	3.0 E-07	0.31
5	0.95	1.00	0.01	2.6 E-03	1.5 E-06	0.76
13	0.85	0.77	1.00	9.9 E-07	2.6 E-03	0.15
16	0.88	0.84	0.98	1.00	1.3 E-03	0.27
10	0.98	0.98	0.84	0.86	1.00	0.47
Severidad	-0.36	-0.11	-0.49	-0.39	-0.26	1.00

Estos mismos análisis se repitieron para el parental BioINTA 1005 y todas las líneas con el mismo patrón de GAPM.

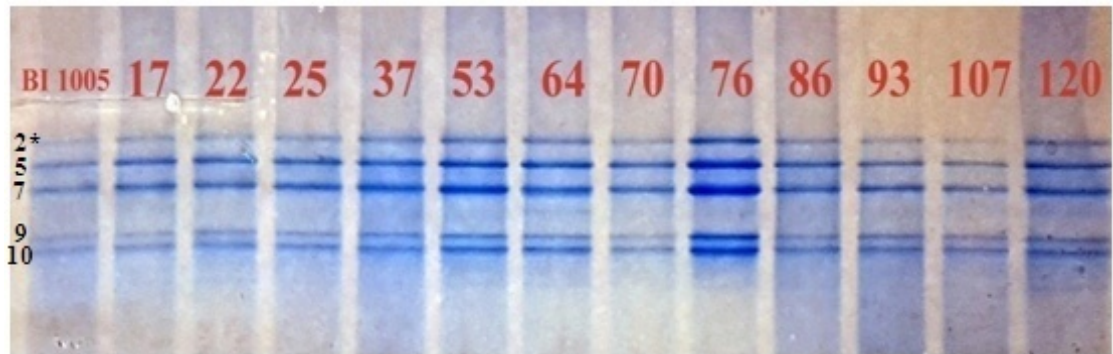


Figura 16. Gel de poliacrilamida para el análisis de densitometría.

Los resultados obtenidos en el análisis por densitometría con el programa GelAnalyzer2010 se presentan en la tabla (**Tabla 30**) junto a los resultados del test de comparativo de medias.

Tabla 30. Análisis comparativo de medias para los valores de densitometría de las líneas con el patrón de GAPM correspondiente al parental BioINTA 1005.

Líneas	2*		5		7		9		10	
	RAW	DS	RAW	DS	RAW	DS	RAW	DS	RAW	DS
107	82,5	A	218	A	197	A,B	63	A	101,5	A,B
BioINTA 1005	105	A,B	193	A	172,5	A	37,5	A	51	A
93	123,5	A,B	252,5	A,B	269,5	A,B,C,D,E	105,5	A	115,5	A,B
17	134,5	A,B	325	A,B,C	263,5	A,B,C,D	28	A	99,5	A,B
86	130	A,B	309,5	A,B,C	243	A,B,C	93	A	146,5	A,B,C
120	159,5	A,B	358,5	A,B,C,D	292,5	B,C,D,E	116	A	176	A,B,C
22	173	A,B	381,5	A,B,C,D	323	C,D,E	120,5	A	182,5	A,B,C
25	159,5	A,B	338,5	A,B,C,D	328	C,D,E	95	A	173	A,B,C
37	211	A,B	358	A,B,C,D	367	E	127	A	185	A,B,C
70	169,5	A,B	420,5	B,C,D	358,5	D,E	107	A	200,5	A,B,C
53	304,5	A,B,C	508,5	C,D	603	G	169	A	277	B,C
64	334	B,C	528,5	D	481	F	174,5	A	312	C
76	500	C	821	E	901,5	H	455,5	B	578,5	D

Los valores son datos promedios n=2

El análisis aparta a la línea 76 del resto por la alta densidad en sus bandas proteicas; la diferencia más marcada se da en las bandas 5, 7, 9 y 10. La mayor densidad en estas bandas indica la presencia de una mayor concentración de proteínas y, por consiguiente, una menor degradación de estas por la FET.

En la **Tabla 31** se muestra un análisis de correlación para estudiar la relación entre la densidad de las bandas GAPM y la severidad.

Tabla 31. Análisis de correlación entre la densidad de banda de las subunidades de las GAPM y la severidad.

	2*	5	7	9	10	Severidad
2*	1.00	3.4 E-08	1.5 E-08	4.2 E-08	3.1 E-08	0.16
5	0.97	1.00	3.3 E-08	3.9 E-06	1.6 E-09	0.11
13	0.98	0.97	1.00	1.3 E-06	3.1 E-08	0.07
16	0.93	0.93	0.94	1.00	1.9 E-08	0.17
10	0.97	0.98	0.97	0.97	1.00	0.11
Severidad	-0.41	-0.46	-0.53	-0.40	-0.46	1.00

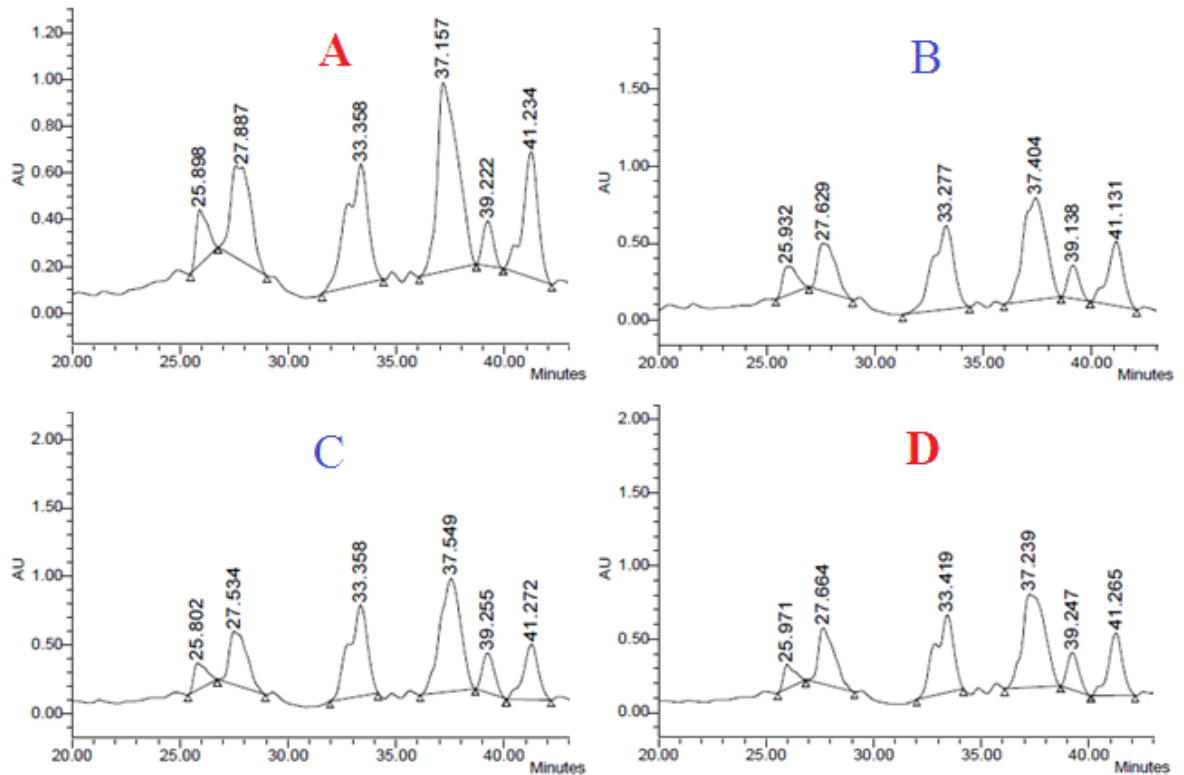
El comportamiento observado fue similar al otro patrón, por lo que si bien no existe correlación entre la densidad de las bandas proteicas de las GAPM y la severidad, hubo correlación positiva entre la densidad de las bandas de las GAPM.

3. Análisis de gluteninas por cromatografía líquida de alta eficacia por fase reversa.

Para el análisis de las gluteninas fueron seleccionadas las líneas 22, 25, 53 y 120 con el patrón de GAPM perteneciente a BioINTA 1005, y las líneas 31, 41, 52, 62 y 75 con el perfil proteico de ProINTA Granar. Las 9 líneas fueron seleccionadas de acuerdo a los valores extremos (máximos y mínimos) en la respuesta a la severidad frente a la FET y la producción de micotoxinas. Es decir, líneas que presentaban las siguientes características: alta severidad con valores altos de micotoxinas, alta severidad con valores bajos de micotoxinas, baja severidad con valores altos de micotoxinas y baja severidad con valores bajos de micotoxinas.

A partir de los extractos proteicos obtenidos de acuerdo con el ítem 3.1 de materiales y métodos, se obtuvieron las muestras para analizar con HPLC. Los cromatogramas muestran

picos proteicos de gluteninas de alto peso molecular de acuerdo al tiempo de retención, según lo reportado en diversos trabajos (Suchy *et al.* 2003; Naeem & Sapirstein 2007; Qian *et al.* 2008). En la **Figura 17** se muestran los cromatogramas de las líneas 22, 25, 53 y 120 obtenidos con el programa Empower Software, lo cual da un valor representativo de contenido proteico.



Azul: líneas moderadamente resistentes a la FET.

Rojo: líneas susceptibles a la FET.

Figura 17. Cromatografías en HPLC-RP de las fracciones de las gluteninas de alto peso molecular en: **A** - línea 22, **B** - línea 25, **C** - línea 53 y **D** - línea 120. Sobre los picos se muestran los valores de las áreas calculadas.

En la **Tabla 32** se observan los valores de las áreas de cada subunidad proteica para las líneas evaluadas junto a los de severidad y DON.

Tabla 32. Área de los picos proteicos para cada subunidad de las GAPM obtenidos por HPLC, contenido de micotoxinas y valores de severidad.

Líneas	2*	5	7	9	10	DON µg/g	3ADON µg/g	15ADON µg/g	Sev. 2015
25	2,12 E07	2,44 E07	4,85 E07	1,25 E07	1,81 E07	0,67	0	0,74	30,46
53	1,94 E07	3,15 E07	5,47 E07	1,39 E07	2,26 E07	2,12	4,35	0,74	33,93
22	2,63 E07	2,41 E07	5,30 E07	1,49 E07	2,60 E07	4	0	2	66,03
120	1,96 E07	2,83 E07	4,63 E07	8,14 E06	2,03 E07	1000,35	1599,76	22,39	67,22

Azul: líneas moderadamente resistentes a la FET.

Rojo: líneas susceptibles a la FET.

Límites: **DON** = + de 0 – 20 µg/g, ++ de 21 –500 µg/g, +++ de 501 –1500 µg/g,

3ADON = + de 0 – 20 µg/g, ++ de 21 –500 µg/g, +++ de 501 –1500 µg/g,

15ADON = + de 0 – 20 µg/g, ++ de 21 –100 µg/g, +++ > 101 µg/g.

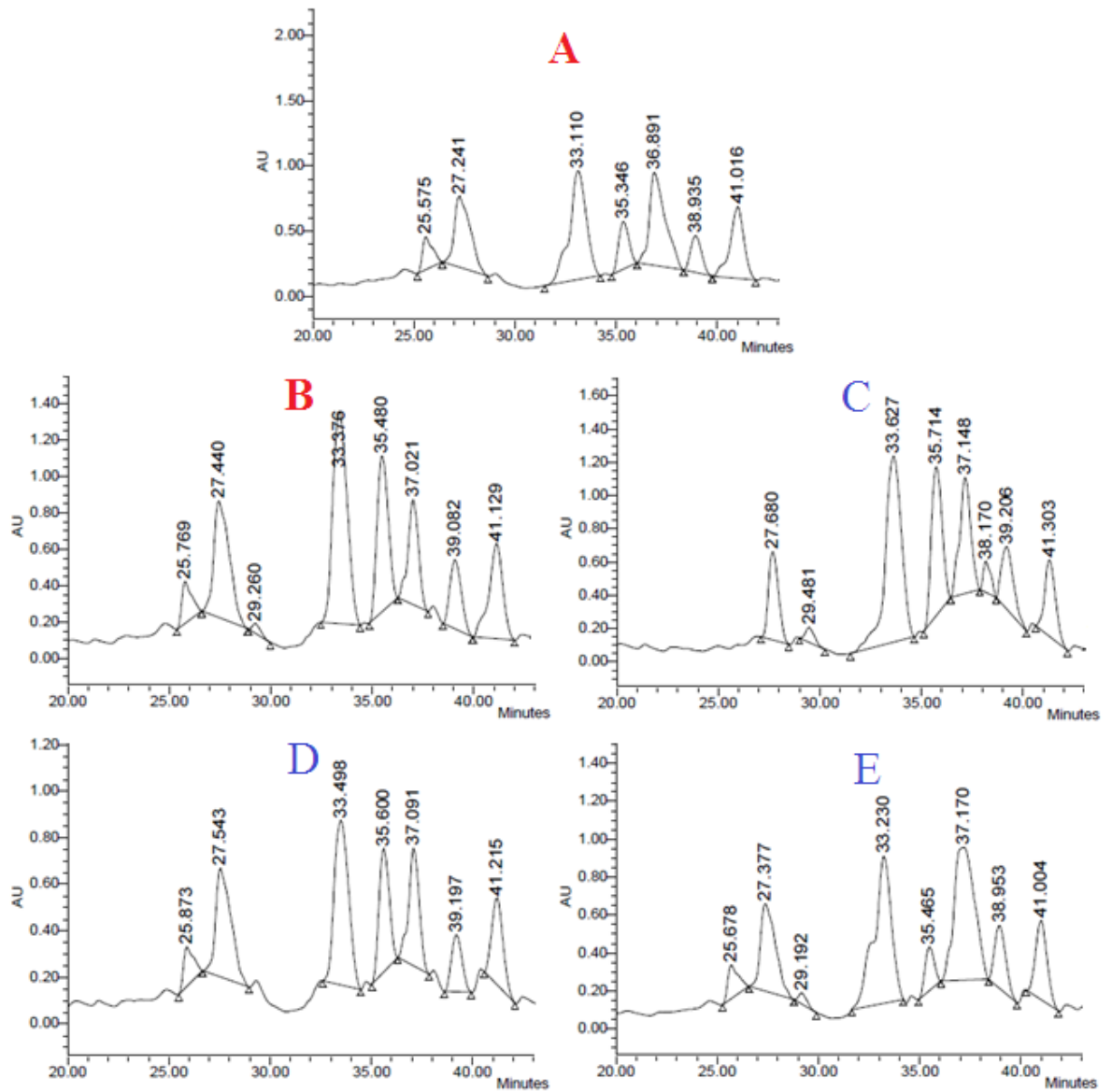
A partir de los valores de la tabla anterior se realizó un análisis estadístico de correlación de Pearson, como muestra la **Tabla 33**.

Tabla 33. Correlación de Pearson entre el área de los picos proteicos, micotoxinas y severidad.

	2*	5	7	9	10	DON	3-ADON	15-ADON	Sev. 2015
2*	1.00	0.26	0.68	0.41	0.30	0.58	0.58	0.63	0.57
5	-0.74	1.00	0.73	0.79	0.96	0.76	0.76	0.79	0.78
7	0.32	0.27	1.00	0.14	0.30	0.26	0.26	0.27	0.74
9	0.59	-0.21	0.86	1.00	0.42	0.05	0.05	0.07	0.66
10	0.70	-0.04	0.70	0.58	1.00	0.72	0.71	0.76	0.50
DON	-0.42	0.24	-0.74	-0.95	-0.28	1.00	7.5 E-06	1.4 E-03	0.40
3-ADON	-0.42	0.24	-0.74	-0.95	-0.29	1.00	1.00	1.6 E-03	0.41
15-ADON	-0.37	0.21	-0.73	-0.93	-0.24	1.00	1.00	1.00	0.36
Sev. 2015	0.43	-0.22	-0.26	-0.34	0.50	0.60	0.59	0.64	1.00

No se determinó correlación entre las variables analizadas, bajo las condiciones de estudio. ($p > 0,05$).

En la **Figura 18** se muestran los cromatogramas de los perfiles proteicos de las líneas 31, 41, 52, 62 y 75 con el patrón de GAPM de BioINTA 1005, y el área calculada.



Azul: líneas moderadamente resistentes a la FET.

Rojo: líneas susceptibles a la FET.

Figura 18. Cromatografías en HPLC-RP de las fracciones de las GAPM en: **A** – línea 31, **B** – línea 41, **C** – línea 52, **D** – línea 62 y **E** – línea 75.

La **Tabla 34** muestra los valores de las áreas determinadas a partir de los picos proteicos junto a los datos de contenido de micotoxinas y severidad.

Tabla 34. Área de los picos proteicos obtenidos por HPLC para las subunidades de las GAPM, contenido de micotoxinas y valores de severidad.

Líneas	2*	5	13	16	10	DON µg/g	3ADON µg/g	15ADON µg/g	Sev. 2015
52	1,69 E07	6,27 E07	2,66 E07	3,29 E07	1,81 E07	4,67	25,16	1,06	7,41
62	1,45 E07	3,48 E07	1,84 E07	1,85 E07	2,46 E07	313,69	177,11	1,96	38,5
41	2,50 E07	5,73 E07	2,06 E07	3,28 E07	3,43 E07	9,22	8,38	1,29	47,02
31	2,62 E07	4,91 E07	3,90 E07	1,28 E07	3,00 E07	11,96	62,5	6,2	52,85
75	1,63 E07	4,67 E07	4,98 E07	7,33 E06	2,39 E07	787,38	1514,52	299,05	38,07

Azul: líneas moderadamente resistentes a la FET.

Rojo: líneas susceptibles a la FET.

Límites: **DON** = + de 0 – 20 µg/g, ++ de 21 –500 µg/g, +++ de 501 –1500 µg/g,
3ADON = + de 0 – 20 µg/g, ++ de 21 –500 µg/g, +++ de 501 –1500 µg/g,
15ADON = + de 0 – 20 µg/g, ++ de 21 –100 µg/g, +++ > 101 µg/g.

En la siguiente tabla se muestra la correlación de Pearson realizada con los datos de la tabla anterior.

Tabla 35. Correlación de Pearson ente el área de las subunidades proteicas, micotoxinas y severidad.

	2*	5	13	16	10	DON	3-ADON	15-ADON	Sev. 2015
2*	1.00	0.52	0.95	0.82	0.11	0.30	0.49	0.56	0.29
5	0.38	1.00	0.98	0.23	0.93	0.38	0.66	0.77	0.44
7	0.04	-0.02	1.00	0.14	0.84	0.28	0.12	0.10	0.79
9	0.14	0.66	-0.76	1.00	0.98	0.17	0.19	0.22	0.43
10	0.79	-0.06	-0.13	0.01	1.00	0.67	0.71	0.74	0.06
DON	-0.58	-0.51	0.61	-0.72	-0.26	1.00	0.01	0.03	0.91
3-ADON	-0.42	-0.27	0.77	-0.70	-0.23	0.95	1.00	4.4 E-04	0.93
15-ADON	-0.35	-0.18	0.80	-0.66	-0.20	0.92	0.99	1.00	0.94
Sev. 2015	0.60	-0.46	0.17	-0.47	0.87	0.07	0.06	0.05	1.00

De acuerdo al análisis realizado, no se encontró relación entre los parámetros evaluados en las líneas bajo las condiciones evaluadas ($p > 0,05$), esto quiere decir que los niveles de

infección no se relacionan con un mayor o menor contenido de gluteninas de las harinas, que son las responsables de la elasticidad y cohesividad de la masa. Estos datos difieren de la relación detectada en otras investigaciones (Ortega *et al.* 2018), de la misma manera resultados contrastantes fueron citados entre los niveles de infección y contenido de micotoxinas.

La importancia de la caracterización de las gluteninas de alto peso molecular, se basa en su elevada contribución a la calidad industrial de las harinas. La técnica de SDS-PAGE empleada en este trabajo, es ampliamente utilizada en estudios de mejoramiento de trigo, dado que es una técnica simple y fiable, que permite determinar un parámetro de calidad de las harinas (Jang *et al.* 2017).

La resolución de las proteínas por HPLC es extremadamente precisa, totalmente automatizada y altamente reproducible para identificar y cuantificar las GAPM individualmente, pero esta técnica es más compleja, lenta y costosa. Sin embargo, hay GAPM que tienen hidrofobicidades similares que no pueden diferenciarse por este método; la combinación de ambos métodos, HPLC y la electroforesis de proteínas por SDS-PAGE, proporciona una identificación precisa, eficiente y confiable de las GAPM, contribuyendo a los esfuerzos para mejorar la calidad del trigo en su uso final (Jang *et al.* 2017).

La mayoría de los programas de mejoramiento tienen como objetivos el rendimiento y la resistencia a enfermedades. Pero a medida que se avanza en el mejoramiento, los esfuerzos se centran en mejorar la calidad industrial del uso final del cultivo de trigo; por eso se ha vuelto esencial para los mejoradores seleccionar los alelos de las GAPM asociados a la buena calidad panadera. Las líneas seleccionadas a través de este estudio serán evaluadas en ensayos de rendimiento y además serán utilizadas como padres en futuras cruzas con el fin de aportar caracteres de buen comportamiento a la FET y calidad panadera.

Conclusiones

- La mayor densidad en las bandas proteicas para las GAPM, para el perfil proteico 2*, 13+16, 5+10, la presentó la línea 52, que además demostró valores bajos de DON y 15-ADON, aunque un poco más elevados para 3-ADON. Esta línea presentó buen comportamiento en muchas de las variables analizadas.
- Asimismo, la línea 76 se destacó por presentar la mayor densidad de bandas proteicas del perfil 2*, 7+9, 5+10. Ambas líneas (52 y 76) presentaron la mayor concentración proteica en las bandas estudiadas, lo que permite inferir que ambas líneas tuvieron una baja degradación de esas proteínas por acción de *F. graminearum*.
- Las líneas 25, 53 y 42 se destacaron por presentar valores bajos en las concentraciones de micotoxinas y niveles bajos de severidad. Contrariamente las líneas 22, 37 y 70 presentaron valores mínimos de micotoxinas a pesar de tener niveles elevados de severidad. Estos datos demostraron que no hay relación directa entre severidad y el contenido de micotoxinas.
- El análisis proteico con SDS-PAGE, resultó ser una técnica útil tanto para la determinación de la huella proteica como para el cálculo del score de calidad de líneas.
- El análisis de las áreas correspondientes a la densidad de las bandas proteicas de las GAPM determinó que en las líneas analizadas no hubo cambios proteicos como resultado de la infección.
- El score calculado a partir de la presencia/ausencia de proteínas con diferente implicancia en la calidad del trigo, resulta un método rápido y sencillo.
- El análisis por HPLC permitió la obtención de perfiles proteicos o cromatogramas característicos de las líneas analizadas, sin evidenciarse modificaciones proteicas resultantes de la infección.

Conclusiones Finales

A partir de las evaluaciones realizadas en la población de 120 RILs, se identificaron 4 líneas con buenos niveles de resistencia genética a la FET que además presentan valores bajos en las concentraciones de micotoxinas y tienen bandas proteicas que se asocian a buenos parámetros de calidad en sus harinas. Estas líneas candidatas serán incorporadas a partir de este año en el Programa de Mejoramiento de Trigo de INTA, ya que aportarían buenos caracteres para la mejora en sanidad y calidad panadera.

- La línea 52 presentó el mejor comportamiento frente a la FET, que se evidenció en la mayoría de los ensayos. Mostró una buena resistencia a la propagación de la enfermedad en las espigas (**tipo II**) con un alto porcentaje de granos sanos, respuesta que podría atribuirse a una resistencia de **tipo IV**. También tuvo un desarrollo de la enfermedad muy bajo, observado en su valor de AUDPC, que la diferenció ampliamente del resto. Su comportamiento sanitario a campo en condiciones naturales fue muy destacado, superó incluso al comportamiento de los cultivares testigo Alsen y Sumai 3#. Además, a nivel de bandas proteicas, presentó la mayor densidad en las GAPM para el perfil proteico 2*, 13+16, 5+10, lo que permite inferir una baja degradación de esas proteínas por acción de *F. graminearum*, lo que se manifiesta en sus bajos valores de DON y 15-ADON que son los causantes de fitotoxicidad, por su capacidad de inhibir las síntesis proteica o desencadenar la muerte celular. Estas características no solo las posicionan como un aporte a la sanidad sino también a la calidad panadera.

- La línea 76 se destacó por presentar la mayor densidad de bandas proteicas en las GAMP para el perfil 2*, 7+9, 5+10 lo que indicó una baja degradación de esas proteínas como con secuencia de la FET. Otra característica a destacar fue su bajo valor de AUDPC asociado a una buena resistencia a la difusión de la enfermedad en las espigas (**tipo II**), lo que determinó bajos valores de severidad.

- La línea 25 tuvo los valores mas bajos de micotoxinas, apenas detectable. Además registró una buena resistencia a la penetración del hongo (**tipo I**) tanto en el ensayo con inoculación artificial como en el ensayo con infección natural.

- La línea 42 se destacó por su comportamiento frente a la FET en condiciones de infección natural, incluso superando a los testigos Alsen y Sumai 3#; en estas condiciones no se observaron espigas enfermas. También manifestó bajos valores en las concentraciones de micotoxinas y su perfil proteico de 2*, 13+16, 5+10 para las GAMP le aporta condiciones de buena calidad panadera.

Por otra parte, la línea 19 presentó muy buenos niveles de resistencia a la FET de **tipo I y II**, además de un perfil proteico 2*, 13+16, 5+10 para las GAPM, que le confiere buena calidad panadera. Sin embargo, no quedó dentro del grupo de las líneas seleccionadas por dos aspectos no deseados, su alto contenido de micotoxinas y la baja densidad proteica de sus bandas en las GAPM.

Bibliografía

- AACC (2000). Approved Methods of American Association of Cereal Chemists, 10th ed. The Association, St. Paul, MN, USA.
- Alberione EJ (2009). Selección asistida por marcadores moleculares para la resistencia a Fusariosis de la espiga y calidad panadera en familias derivadas del cruzamiento entre los cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.) SUMAI 3X por PROINTA Granar. Tesis. Maestría en Genética Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias - Universidad Nacional de Rosario.
- Alberione EJ, Bainotti C, Donaire G, Fraschina J, Salines J, Salines N, Gómez D, Chulze S, Palazzini J, Formica MB, Cuniberti M (2015). Incidencia de Fusariosis de la espiga en cultivares de trigo pan durante 2012-13 en Marcos Juárez (Córdoba - Argentina). Revista FAVE - Ciencias Agrarias 14 (2): 1-13.
- Alberione EJ, Ortega LM, Salines N, Astoreca AL, Alconada Magliano TM (2016). Genetic behavior of different wheat genotypes against *Fusarium graminearum*. Agrociencias 50 (3): 335-346.
- Alconada Magliano T, Kikot G (2013). Fungal infection and disease progression. *Fusarium* spp. Enzymes associated with pathogenesis and loss of commercial value of wheat grains. En Teresa M. Alconada Magliano & Sofía Noemí Chulze, eds. Fusarium Head Blight in Latin America. Chapter 7, 99-116.
- Alexander NJ, Proctor RH, McCormick SP, Plattner RD (1997). Genetic and molecular aspects of the biosynthesis of trichothecenes by *Fusarium*. Cereal Research Communications 25(3): 315-320.
- Alvarez CL, Azcarate MP, Fernández Pinto VE (2009). Toxigenic potential of *Fusarium graminearum sensu stricto* isolates from wheat in Argentina. International Journal of Food Microbiology 135 (2):131-35.
- Andersen AL (1948). The development of *Gibberella zeae* head blight of wheat. Phytopathology 38 (8): 595-611.
- Anderson JA, Stack RW, Liu S, Waldron BL, Fjeld AD, Coyne C, Moreno-Sevilla B, Mitchell Fetch J, Song QJ, Cregan PB, Froberg RC (2001). DNA markers for Fusarium

- head blight resistance QTLs in two wheat populations. *Theoretical and Applied Genetics* 102 (8): 1164-1168.
- Anone (2013). Trigo Argentino, Informe Institucional sobre su Calidad. <http://www.trigoargentino.com.ar/ImagenesTrigo/Biblioteca/LIBROS/12-13.pdf> [Acceso 5 de Mayo, 2019].
- Arfvidsson C, Wahlund KG, Eliasson AC (2004). Direct molecular weight determination in the evaluation of dissolution methods for unreduced glutenin. *Journal of Cereal Science* 39 (1): 1-8.
- Arseniuk E, Foremska E, Óral TG, Chelkowski J (1999). *Fusarium* head blight reactions and accumulation of deoxynivalenol (DON) and some of its derivatives in kernels of wheat, triticale and rye. *Journal of Phytopathology* 147 (10): 577-590.
- Bai G, Shaner, G (1994). Scab of Wheat: Prospects for control. *Plant Disease* 78 (8): 760-766.
- Bai G, Shaner G, Ohm H (2000). Inheritance of resistance to *Fusarium graminearum* in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 100 (1): 1-8.
- Bai G, Plattner RD, Desjardins AE, Kolb F, McIntosh RA (2001). Resistance to *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat. *Plant Breeding* 120 (1): 1-6.
- Bai G, Shaner G (2004). Management and resistance in wheat and barley to *Fusarium* head blight. *Annual Review of Phytopathology* 42: 135-61.
- Balakireva AV, Zamyatnin AA (2016). Properties of gluten intolerance: gluten structure, evolution, pathogenicity and detoxification capabilities. *Nutrients*, 8(10): 644.
- Barneix AJ (2007). Physiology and biochemistry of source-regulated protein accumulation in the wheat grain. *Journal of Plant Physiology* 164 (5): 581-90.
- Bekele GT (1985). Head scab screening methods used at CIMMYT. In: *Wheats for more tropical environments*. CIMMYT, D.F., Mexico, p 169-173.
- Belderok B (2000). Developments in bread-making processes. *Plant Foods Hum Nutr (Revisión)* 55 (1): 1-86.
- Belton PS (2005). New approaches to study the molecular basis of the mechanical properties of gluten. *Journal of Cereal Science* 41 (2): 203-211.
- Bennett JW, Klich M (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology (Revision)* 16 (3): 497-516.

- Biología de cultivos anuales (2018). Morfología y estados de desarrollo en cereales. Trigo harinero, http://www7.uc.cl/sw_educ/cultivos/cereales/trigo.htm [9 de mayo, 2019].
- Bonin CM, Kolb FL (2009). Resistance to *Fusarium* head blight and kernel damage in a winter wheat recombinant inbred line population. *Crop Science - Crop Breeding & Genetics* 49 (4): 1304-1312.
- Bressan P, Kramer P (2016). Bread and other edible agents of mental disease. *Frontiers in Human Neuroscience (Revisión)* 10: 130.
- Brzozowski B, Dawidziuk K, Bednarski W (2008). Gliadin degradation by proteases of *Fusarium* genus fungi in different *in vivo* and *in vitro* conditions. *Polish Journal of Natural Science* 23 (1): 188-206.
- Buerstmayr H, Lemmens M, Hartl L, Doldi L, Steiner B, Stierschneider M, Ruckenbauer P (2002). Molecular mapping of QTLs for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat. I. Resistance to fungal spread (Type II resistance). *Theoretical and Applied Genetics* 104: 84-91.
- Bushnell WR, Hazen BE, Pritsch C (2003). Histology and physiology of *Fusarium* head blight. En *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*, (K. J. Leonard, W. R. Bushnell eds.), 44-83.
- Capouchová I, Papoušková L, Kostelanská M, Prokinová E, Škeříková A, Hajšlová J, Konvalina P, Faměra O (2012). Effect of different intensities of *Fusarium* infestation on grain yield, deoxynivalenol content and baking quality of winter wheat. *Romanian Agricultural Research* 29: 297-306.
- Carmona M (2012). Alerta por fusariosis de la espiga en lotes con trigo - 27.10.2012 - LA NACION. *La Nacion*. <https://www.lanacion.com.ar/economia/campo/alerta-por-fusariosis-de-la-espiga-en-lotes-con-trigo-nid1520725> [Acceso 5 de Mayo, 2019].
- Chen LF, Song YL, Xu YG (1995). In the concentrations of deoxynivalenol in the spikes of winter wheat infected by *Fusarium graminearum* Schw. *Acta Phytopathologica Sinica* 26 (1): 25-28.
- Comisión del Codex Alimentarius (2013). Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. Comité del codex sobre contaminantes de los alimentos. Séptima reunión, 8-12 de Abril del 2013.

- Cuniberti MB. (2003). Sistema de clasificación de variedades en grupos de calidad. AAPROTRIGO. INTA Marcos Juárez. Argentina. INTA Marcos Juárez. Argentina.
- Cuniberti MB (2004). Propuesta de clasificación del trigo Argentino. Revista IDIA-INTA 6: 21-25.
- Cornish GB, Békés F, Allen HM, Martin DJ (2001). Flour proteins linked to quality traits in an Australian doubled haploid wheat population. Australian Journal of Agricultural Research 52: 1339-48.
- Daniel C, Triboui E (2000). Effects of temperature and nitrogen nutrition on the grain composition of winter wheat: Effects of gliadin content and composition. Journal of Cereal Science 32 (1): 45-56.
- De Souza Diniz SPS (2017). Micotoxinas del trigo. Engormix, <https://www.engormix.com/micotoxinas/articulos/micotoxinas-trigo-t41043.htm> [Acceso 9 de Mayo, 2019].
- Delcour JA, Joye IJ, Pareyt B, Wilderjans E, Brijs K, Lagrain B (2012). Wheat gluten functionality as a quality determinant in cereal-based food products. Annual Review of Food Science and Technology (Revisión) 3: 469-92.
- Desjardins AE (2008). Natural product chemistry meets genetics: When is a genotype a chemotype? Journal of Agricultural and Food Chemistry 56(17):7587-92.
- De Wolf ED, Isard SA (2007). Disease cycle approach to plant disease prediction. Annual Review of Phytopathology 45 (1): 203-220.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW (2017). Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar> [Acceso 5 de Mayo, 2019].
- Don C, Mann G, Bekes F, Hamer RJ (2006). HMW-GS affect the properties of glutenin particles in GMP and thus flour quality. Journal of Cereal Science 44: 127-136.
- D'Ovidio R, Masci S (2004). The Low-Molecular-Weight glutenin subunits of wheat gluten. Journal of Cereal Science 39 (3): 321-339.
- DuPont FM, Altenbach SB(2003). Molecular and biochemical impacts of environmental factors on wheat grain development and protein synthesis. Journal of Cereal Science 38:133-146.

- Faergestad EM, Flaete NES, Magnus EM, Hollung K, Martens H, Uhlen AK (2004). Relationships between storage protein composition, protein content, growing season and flour quality of bread wheat. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84 (8): 877-886.
- Fasano A, Sapone A, Zevallos V, Schuppan D (2015). Nonceliac gluten sensitivity. *Gastroenterology* (Revisión) 148 (6): 1195-1204.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (1999). Wheat: Post-harvest operations. A Global Perspective. *Agricultural Services Bulletin* 138. Roma, Italia.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2004). Food and Nutrition papers 81: Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. Roma, Italia.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2012). *Perspectivas alimentarias. Analisis del mercado mundial.*
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2013). Dietary protein quality evaluation in human nutrition. Report of an FAO Expert Consultation.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2015). El estado de los mercados de productos básicos agrícolas 2015-16. <http://www.fao.org/publications/soco/2015/es/> [Acceso 9 de Mayo, 2019].
- Fernandez Pinto V, Patriarca A, Pose G (2013). Mycotoxins associated to *Fusarium* species that caused Fusarium head blight in wheat in Latin-America. *Fusarium* En Teresa M. Alconada Magliano & Sofia Noemí Chulze, eds. *Fusarium Head Blight in Latin America*. Chapter 5, 59-73.
- Erlanger KY, Miedaner T, Schneider B, Geiger HH (2003). Deoxynivalenol (DON) content and Fusarium head blight resistance in segregating populations of winter rye and winter wheat. *Crop Science* 43 (2): 519-26.
- Evans LT, Peacock WJ (1981). Yield improvement in wheat: empirical or analytical. Evans LT, Peacock WJ (Eds.), *Wheat Science - Today and Tomorrow*, Cambridge University Press, Cambridge. p 203-222.

- Galich MTV (1997). Fusarium head blight in Argentina. In *Fusarium Head Scab: Global Status and Future Prospects*, edited by Dubin HJ, Gilchrist L, Reeves J and McNab A. CIMMYT, p 19-28.
- Gianibelli MC, Larroque OR, MacRitchie F, Wrigley CW (2001). Biochemical, genetic, and molecular characterization of wheat glutenin and its component subunits. *Cereal Chemistry* 78 (6): 635-646.
- Goswami RS, Kistler HC (2004). Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology* 5 (6): 515-525.
- Gras PW, Anderssen RS, Keentok M, Békés F, Appels R(2001). Gluten protein functionality in wheat flour processing: a review. *Australian Journal of Agricultural Research* 52: 1311-23.
- Hamazu, ZI, Toyomasu T, Yonezawa D (1974). Molecular weight determination of gliadin fractions in gel filtration by SDS polyacrylamide gel electrophoresis and sedimentation equilibrium. *Agricultural and Biological Chemistry* 38 (12): 2445-2450.
- Hart P, Schabenberger O (2001). Early detection of deoxynivalenol in wheat grain. In *National Fusarium Head Blight Forum Proceedings*, 164-167.
- Haller Gartner B, Munich M, Kleijer G, Mascher F (2008). Characterization of kernel resistance against Fusarium infection in spring wheat by baking quality and mycotoxins assessments. *European Journal Plant Pathology* 120 (1): 61-68.
- He ZH, Liu LY, Xia XC, Liu JJ, Peña Bautista RJ (2005). Composition of HMW and LMW glutenin subunits and their effects on dough properties, pan bread, and noodle quality of chinese bread wheats. *Cereal Chemistry* 82 (4): 345-350.
- Hernandez Nopsa JF (2010). Fusarium head blight: Winter wheat cultivar responses and characterization of pathogen isolates. ETD collection for University of Nebraska – Lincoln, <https://digitalcommons.unl.edu/agronhortdiss/19/> [Acceso 9 de Mayo, 2019].
- Hernández Espinosa N, Posadas Romano G, Cervantes López F, González Santoyo HI, Santacruz Varela A, Benítez Riquelme I, Peña Bautista RJ (2013). Protein fraction distribution and their contribution to quality characteristics in wheat. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36: 137-145.

- Horvat DI, Kurtanjek Z, Drezner G, Šimic G, Magdic D (2009). Effect of HMM glutenin subunits on wheat quality attributes. *Food Technology and Biotechnology* 47 (3): 253-59.
- Ichinoe M, Kurata H, Sugiura Y, Ueno Y (1983). Chemotaxonomy of *Gibberella zeae* with special reference to production of Trichothecenes and Zearalenone. *Applied and environmental microbiology* 46 (6):1364-1369.
- INASE (1997). Registro Nacional de cultivares, Legajo de la nueva variedad de trigo pan PROINTA Granar N° 4882.
- INASE (2008). Registro Nacional de cultivares, Legajo de la nueva variedad de trigo pan BIOINTA 1005 N° 10721.
- Ireta-Moreno J, Gilchrist-Saavedra L (1994). Fusarium head scab of wheat (*Fusarium graminearum* Schwabe). Wheat Special Report No. 21b. México, D.F. CIMMYT. 25 p.
- Ivancovich A, Botta G, Ploper DA, Laguna I, Annone JG (1998). IV Curso de diagnóstico y manejo de enfermedades de soja. EEA INTA Pergamino, Buenos Aires, Argentina. 54 p.
- Jang YR, Beom HR, Altenbach SB, Lee MK, Lim SH, Lee JY (2017). Improved method for reliable HMW-GS identification by RP-HPLC and SDS-PAGE in common wheat cultivars. *Molecules* 22: 1055.
- Jiang G-L, Dong Y, Lewis JM, Siler L, Ward RW (2006). Characterization of resistance to *Fusarium graminearum* in a recombinant inbred line population of wheat. *Crop Science - Crop Breeding & Genetics*. 46 (6): 2590-97.
- Kamal AHM, Kim KH, Shin KH, Seo HS, Tsujimoto H, Heo HY, Choi JS, Park CS, Woo SH(2009). Diversity of novel glutenin subunits in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Plant Biology* 52 (6): 533-542.
- Kang Z, Zingen-Sell I, Buchenauer H (2005). Infection of wheat spikes by *Fusarium avenaceum* and alterations of cell wall components in the infected tissue. *European Journal of Plant Pathology* 111 (1): 19-28.
- Khatkar BS, Schofield JD. (2002). Dynamic rheology of wheat flour dough. II. Assessment of dough strength and bread making quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82 (8): 823-826.

- Kikot GE, Hours RA, Alconada-Magliano TM (2009). Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: A Review. *Journal of Basic Microbiology* 49 (3): 231-241.
- Kikot G, Moschini R, Consolo F, Rojo R, Hours R, Salerno G, Gasoni L, Arambarri MA, Alconada TM (2011). Occurrence of *Fusarium graminearum* from wheat in relation to climatic models in Argentina Pampas Region. *Mycopathologia* 171: 139-149.
- Kohli MM (1989). Análisis de la Fusariosis del trigo en el cono sur. In taller sobre la Fusariosis de la espiga en América del Sur, edited by M. M. Kohli, 1-6. Asunción, Paraguay: CIMMYT.
- Kohli MM, Nisi J, Rajaram S (1995). El mejoramiento de trigo en Argentina. Treinta años de investigación cooperativa con el CIMMYT. Balcarce, Argentina, 7 al 8 de octubre de 1992. Uruguay, CIMMYT. ISBN: 9968 - 6923 - 55-1.
- Kohli MM, Díaz de Ackermann M, Castro M (2001). Estrategias y metodologías utilizadas en el mejoramiento del Trigo: Un enfoque multidisciplinario. Seminario Internacional. La Estanzuela, Colonia, Uruguay: 8-11 de octubre, 2001. xiv, 409 p. Uruguay. CIMMYT. INIA.
- Kohli MM, Díaz M, Castro M, (2003). Estrategias y metodologías utilizadas en el mejoramiento de trigo. Seminario Internacional, La Estanzuela, Uruguay. CIMMYT-INIA. ISBN: 9974 - 7586 - 2-9.
- Larroque OR, Gianibelli MC, Gomez Sanchez M, MacRitchie F (2000). Procedure for obtaining stable protein extracts of cereal flour and whole meal for size-exclusion HPLC Analysis. *Cereal Chemistry* 77: 448-450.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-85.
- Liu WZ, Langseth W, Skinnies H, Elen ON, Sundheim L (1997). Comparison of visual head blight ratings, seed infection levels, and deoxynivalenol production for assessment of resistance in cereals inoculated with *Fusarium culmorum*. *European Journal of Plant Pathology* 103 (7): 589-595.
- MacRitchie F, Du Cros DL, Wrigley CW (1990). Flour polypeptides related to wheat quality. In *Advances in Cereal Science and Technology*, edited by Y. Pomeranz. American Association of Cereal Chemists 79-145.

- Marasas WFO, Nelson PE, Tousson TA (1984). Toxigenic *Fusarium* species. Identity and mycotoxicology. Pennsylvania State University Press. 320 p.
- Martinez MI (2009). Efecto del ambiente sobre la intensidad de la Fusariosis de la espiga de trigo y el contenido de Deoxinivalenol en grano. Tesis de Magister en Producción Vegetal de la Universidad de Buenos Aires. Facultad de Agronomía.
- Martínez M, Castellarín J, Martín N, Moschini R (2017). Análisis de la Fusariosis de la espiga de trigo en Oliveros. Campaña 2016/17. <https://inta.gov.ar/sites/default/files/inta.analisis-fusariosis-espiga-trigo.pdf> [Acceso 5 de Mayo, 2019].
- Matz, S (1999). Bakery technology and engineering. Edited by S. Matz. Pan Tech International.
- McMullen MP, Jones RK, Gallemborg D (1997). Scab of wheat and barley: A Re-Emerging Disease of Devastating Impact. *Plant Disease* 81: 1340-48.
- Mesterházy Á, Bartók T, Mirocha CG, Komoróczy R (1999). Nature of wheat resistance to *Fusarium* head blight and the role of deoxynivalenol for breeding. *Plant Breeding* 118: 97-110.
- Miedaner T, Wilde F, Steiner B, Buerstmayr H, Korzun V, Ebmeyer E (2006). Stacking quantitative trait loci (QTL) for *Fusarium* head blight resistance from non-adapted sources in an European elite spring wheat background and assessing their effects on deoxynivalenol (DON) content and disease severity. *Theoretical and Applied Genetics* 112 (3): 562-569.
- Miranda R (2001). Calidad comercial e industrial in trigo. Cuaderno de Actualización 63 de AACREA, 113-117.
- Monds RD, Cromey MG, Lauren DR, Di Menna M, Marshall J (2005). *Fusarium graminearum*, *F. cortaderiae* and *F. pseudograminearum* in New Zealand: molecular phylogenetic analysis, mycotoxin chemotypes and coexistence of species. *Mycological Research* 109 (4): 410-420.
- Murray MG, Thompson WF (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321-4325.

- Naeem HA, Sapirstein HD (2007). Ultra-fast separation of wheat glutenin subunits by reversed-phase HPLC using a superficially porous silica-based column. *Journal of cereal science*, 46 (2): 157-168.
- Nightingale MJ, Marchylo BA, Clear RM, Dexter JE, Preston KR (1999). *Fusarium* head blight: Effect of fungal proteases on wheat storage proteins. *Cereal Chemistry* 76 (1): 150-158.
- Ortega LM, Dinolfo MI, Astoreca AL, Alberione EJ, Stenglein SA, Alconada TM (2016). Molecular and mycotoxin characterization of *Fusarium graminearum* isolates obtained from wheat at a singlefield in Argentina. *Mycological Progress* 15:1.
- Ortega LM, Moure MC, Astoreca AL, Alberione EJ, Alconada TM (2018). Wheat grains damaged by *Fusarium graminearum*: alterations in yield, toxicity and protein composition. *Vegetos: An International Journal of Plant Research*, 31: 2.
- Ortolan F, Steel JC (2017). Protein characteristics that affect the quality of vital wheat gluten to be used in baking: a Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 16 (3): 369-381.
- Osborne, TB. (1907). The proteins of the wheat kernel. Carnegie institution of Washington 84.
- Papoušková L, Capouchová I, Kostelanská M, Škeříková A, Prokinová E, Hajšlová J, Salavaand J, Faměra O (2011). Changes in baking quality of winter wheat with different intensity of *Fusarium* spp. contamination detected by means of new rheological system mixolab. *Czech Journal of Food Sciences* 29: 420 - 429.
- Pariaud B, Ravigné V, Halkett F, Goyeau H, Carlier J, Lannou C (2009). Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathology* 58 (3): 409-424.
- Park CS, Hong BH, Baik BK (2003). Protein quality of wheat desirable for making fresh white salted noodles and its influences on processing and texture of noodles. *Cereal Chemistry* 80 (3): 297-303.
- Payne PI, Lawrence GJ (1983). Catalogue of alleles for the complex gene loci, Glu-A1, Glu-B1, and Glu-D1 which code for high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. *Cereal Research Communications* 11 (1): 29-35.

- Payne PI, Jackson EA, Holt LM (1984). The Association between γ -gliadin 45 and gluten strength in Durum wheat varieties: a direct causal effect or the result of genetic linkage? *Journal of Cereal Science* 2 (2): 73-81.
- Payne PI (1987). Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality. *Annual Review of Plant Physiology*, 38: 141-153.
- Payne PI, Nightingale MA, Krattiger AF, Holt LM (1987). The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of british-grown wheat varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 40 (1): 51-65.
- Pereyra S, Acosta Y (2014). Guía para el manejo de la Fusariosis de la espiga en trigo. [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) [Acceso 5 de Mayo, 2019].
- Pesquero NV (2017). Influencia de las variedades de trigo y la aplicación de fungicidas en la producción de tricotecenos en cepas de *Fusarium graminearum* aisladas de trigo cultivado en Argentina. Tesis. Maestría en Bromatología y Tecnología de la Industrialización de los Alimentos, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires.
- Prange A, Birzele B, Kramer J, Meier A, Modrow H, Kohler P (2005). *Fusarium*-inoculated wheat: deoxynivalenol contents and baking quality in relation to infection time. *Food Control* 16: 739-745.
- Pritsch C, Muehlbauer GJ, Bushnell WR, Somers DA, Vance CP (2000). Fungal development and induction of defense response genes during early infection of wheat spikes by *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13 (2): 159-169.
- Qian Y, Preston KR, Krokhin O, Mellish J, Ens W (2008). Characterization of wheat gluten proteins by HPLC and MALDI TOF mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 19 (10): 1542-1550.
- Ramirez ML, 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: 117-125.
- Reis E, Carmona M (2002). Fusariosis del trigo. Biología, epidemiología y estrategias para su manejo. BASF Argentina SA.

- Reynoso MM, Ramírez ML, Farnochi MC, Torres AM, Chulze SN (2013). Population structure of *Fusarium graminearum* species complex genotypes and chemotypes in relation to trichothecenes production. En Teresa M. Alconada Magliano & Sofía Noemí Chulze, eds. *Fusarium Head Blight in Latin America*. Chapter 1, 3-13.
- Rizzo I, Lory G, Carranza M, Kneetman E, Vedoya G (1995). Wheat and byproducts: trichothecenes, zearalenone and *Fusarium* spp. occurrence in Argentina (1986-1994). Libro de Resúmenes del International Seminaron Fusarium Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity. Martina Franca, Italia, 16 p.
- Rizzo I, Lori GA, Vedoya G, Carranza M. (1997). Sanitary factor and mycotoxin contamination in the argentinian wheat crop 1993/94. *Mycotoxin Research* 13 (2): 67-72.
- Rogers WJ, Payne PI, Harinder K (1989). The HMW Glutenin subunits and gliadin compositions of German-grown wheat varieties and their relationship with bread-making quality. *Plant Breeding* 103 (2): 89-100.
- Sands DC, Morris CE, Dratz EA, Pilgeram A (2009). Elevating optimal human nutrition to a central goal of plant breeding and production of plant-based foods. *Plant Science (Revisión)* 177 (5): 377-389.
- Sapirstein HD, Fu BX (1998). Intercultivar variation in the quantity of monomeric proteins, soluble and insoluble glutenin, and residue protein in wheat flour and relationships to breadmaking quality. *Cereal Chemistry* 75 (4): 500-507.
- Sapirstein HD, David P, Preston KR, Dexter JE (2007). Durum wheat breadmaking quality: Effects of gluten strength, protein composition, semolina particle size and fermentation time. *Journal of Cereal Science* 45 (2): 150-161.
- Schafer W (1994). Molecular mechanisms of fungal pathogenicity to plants. *Annual Review of Phytopathology* 32 (1): 461-477.
- Schneider, K. (2005). Mapping populations and principles of genetic mapping. The handbook of plant genome mapping. Genetic and physical mapping. Meksem K, Guenter K, Wiley-VCH. Chapter 1.
- Semagn K, Ndjiondjop A, Bjørnstad A (2006). Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants. *African Journal of Biotechnology* 5 (25): 2569-2587.

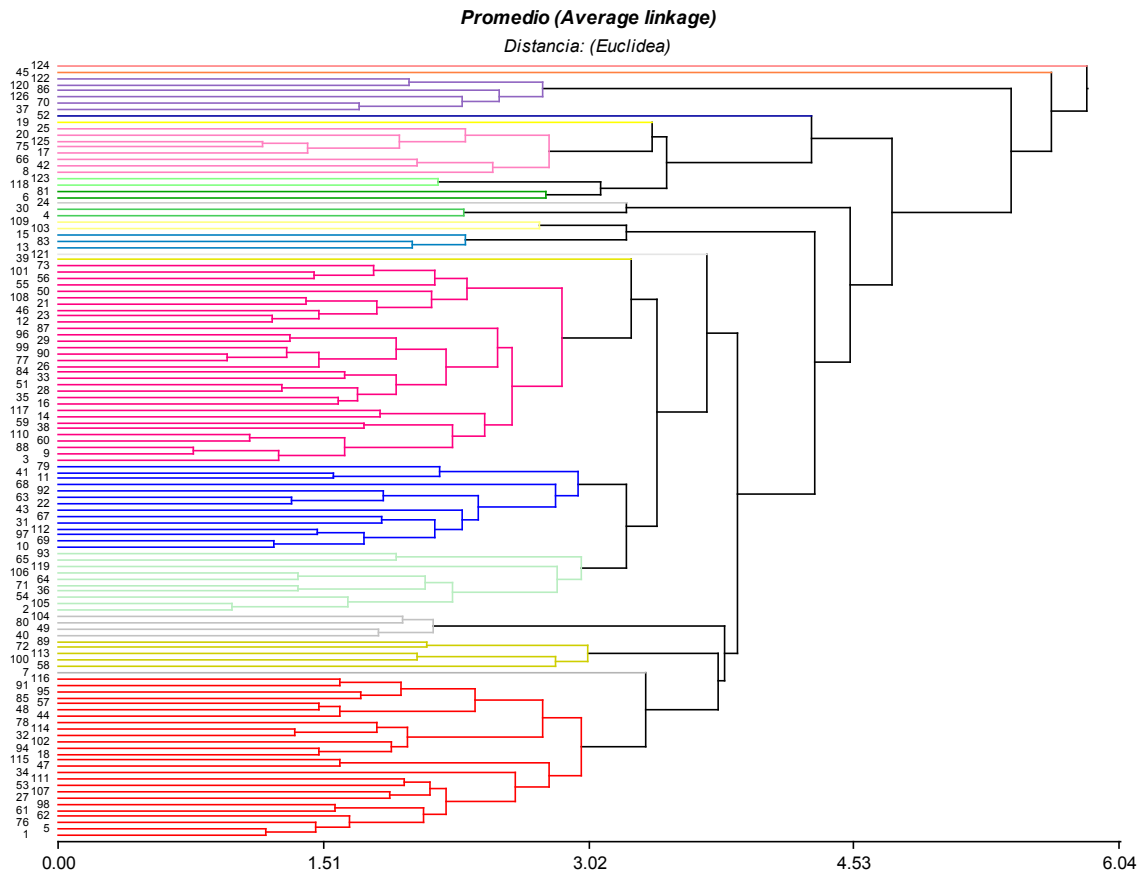
- Shan X, Clayshulte SR, Haley SD, Byrne PF (2007). Variation for glutenin and waxy alleles in the US hard winter wheat germplasm. *Journal of Cereal Science* 45:199-208.
- Shaner G, Stromberg EL, Lacy GH, Barker KR, Pirone TP (1992). Nomenclature and concepts of pathogenicity and virulence. *Annual Review of Phytopathology* 30 (1): 47-66.
- Shaner G, Buechley G (2004). Relation between head blight severity and DON in natural epidemics of FHB. In 2nd international symposium on *Fusarium* head blight, 518. Orlando, FL.
- Shen X, Zhou M, Lu W, Ohm H (2003). Detection of *Fusarium* head blight resistance QTL in a wheat population using bulked segregant analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 106 (6): 1041-1047.
- Shewry PR, Halford NG, Tatham AS (1989). The high molecular weight subunits of wheat, barley and rye: genetics, molecular biology, chemistry and role in wheat gluten structure and functionality. In *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell biology*. Vol. 6, ed. B.J. Mifflin. Oxford University 163-219.
- Shewry PR, Popineau Y, Lafiandra D, Belton PS (2001). Wheat glutenin subunits and dough elasticity: Findings of the euro-wheat project. *Trend in Food Science & Technology* 11: 433-441.
- Shewry PR, Halford NG, Belton P, Tatham A (2002 A). The structure and properties of gluten: An elastic protein from wheat grain. *Philosophical Transactions of The Royal Society B, Biological Sciences* 357 (1418): 133-42.
- Shewry PR, Halford NG (2002 B). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botanic* 53 (370): 947-958.
- Singh H, MacRitchie F (2001). Application of polymer science to properties of gluten. *Journal of Cereal Science*, 33 (3): 231-43.
- Stack RW, McMullen M.P (1995). A visual scale to estimate severity of *Fusarium* head blight in wheat. North Dakota State University, Plant Pathology pp. 1095. <https://www.ag.ndsu.edu/ndipm/publications/wheat/documents/pp1095.pdf> [Acceso 5de Mayo, 2019]

- Stack R.W. (2000). Return of an old problem: Fusarium head blight of small grains. <https://www.apsnet.org/edcenter/apsnetfeatures/Pages/HeadBlight.aspx> [Acceso 5 de Mayo, 2019].
- Suchy J, Lukow OM, Fu BX (2003). Quantification of monomeric and polymeric wheat proteins and the relationship of protein fractions to wheat quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83 (10): 1083-1090.
- Sulyok M, Berthiller F, Krska R, Schuhmacher R (2006). Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20 (18): 2649-2659.
- Sutton JC (1982). Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 4 (2): 195-209.
- Sutton KH (1991). Qualitative and quantitative variation among high molecular weight subunits of glutenin detected by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Cereal Science* 14 (1): 25-34.
- Triboi E, Martre P, Triboi-Blondel AM (2003). Environmentally-induced changes in protein composition in developing grains of wheat are related to changes in total protein content. *Journal of Experimental Botany* 54 (388): 1731-1742.
- Trombete FM, Saldanha T, Direito GM, Fraga ME (2013). Trichothecenes and aflatoxins contamination in wheat and wheat products: occurrence and methods of determination. *Revista chilena de nutrición* 40 (2) 181-188.
- Trucksess MW, Nesheim S, Eppley RM (1984). Thin layer chromatographic determination of deoxynivalenol in wheat and corn. *Journal Association Official Analytical Chemists* 67 (1): 40-43.
- Torbica A, Antov M, Mastilovic J, Knezevic D (2007). The influence of changes in gluten complex structure on technological quality of wheat (*Triticum aestivum L.*). *Food Research International* 40 (8): 1038-1045.
- Törjék O, Witucka-Wall H, Meyer RC, Von Korff M, Kusterer B, Rautengarten C, Altmann T. 2006. Segregation distortion in arabidopsis C24/Col-0 and Col-0/C24 recombinant inbred line populations is due to reduced fertility caused by epistatic interaction of two loci. *Theoretical Applied Genetics* 113 (8): 1551-1561.

- Neuhof, T, Ganzauer N, Koch M, Nehls I (2009). A Comparison of Chromatographic methods for the determination of deoxynivalenol in wheat. *Chromatographia* 69 (11): 1457-1462.
- USDA, 2017a. Wheat Data: Yearbook Tables. <https://www.ers.usda.gov/data-products/wheat-data/> [Acceso 5 de Mayo, 2019].
- USDA, 2017b. Wheat Outlook June 2017. <https://www.ers.usda.gov/publications/pub-details/?pubid=83864> [Acceso 5 de Mayo, 2019].
- Vanzetti LS, Yerkovich N, Chialvo E, Lucio Lombardo, Vaschetto L, Helguera M (2013). Genetic structure of Argentinean hexaploid wheat germplasm. *Genetics and molecular biology* 36 (3): 391-399.
- Váňová M, Klem K, Míša P, Matušinsky P, Hajšlová J, Lancová K (2008). The content of *Fusarium* mycotoxins, grain yield and quality of winter wheat cultivars under organic and conventional cropping systems. *Plant, Soil and Environment* 54 (9): 395-402.
- Velazquez P (2012). Efecto de la fusariosis de la espiga del trigo (*Fusarium graminearum* y *Fusarium* spp.) en un cultivar susceptible. INTA, https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-_efecto_de_la_fet-_trigo_susceptible.pdf [acceso 5 de Mayo. 2019].
- Veraverbeke WS, Delcour JA (2002). Wheat protein composition and properties of wheat glutenin in relation to breadmaking functionality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 42 (3): 179-208.
- Waldron BL, Moreno-Sevilla B, Anderson JA, Stack RW, Frohberg RC (1999). RFLP mapping of QTL for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Crop Science* 39 (3): 805-811.
- Wanjiru, WM, Zhensheng K, Buchenauer H (2002). Importance of cell wall degrading enzymes produced by *Fusarium graminearum* during Infection of wheat heads. *European Journal of Plant Pathology* 108 (8): 803-810.
- Weegels PL, Hamer RJ, Schofield D (1996). Critical Review. Functional properties of wheat glutenin. *Journal of Cereal Science* 23 (1): 1-18.
- Wieser H (2007). Chemistry of Gluten Proteins. *Food Microbiology* 24 (2): 115-119.

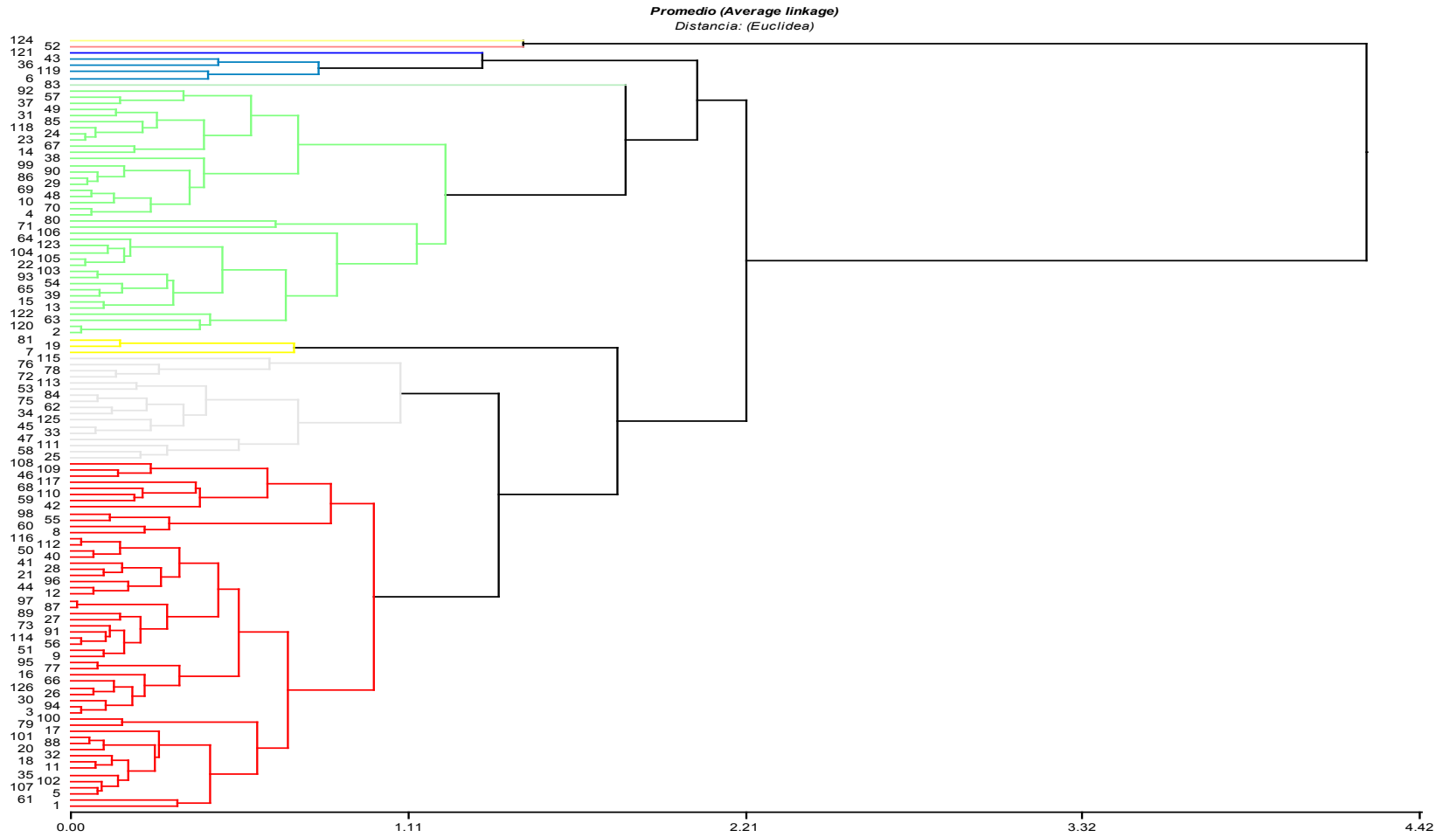
- Xiyong C, Haixia X, Zhongdong D, Feng C, Kehui Z, Dangqun C (2012). Genetic evolution and utilization of wheat germplasm resources in Huanghuai winter wheat region of China. *Pakistan journal of Botany* 44 (1): 281-288.
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research* 14 (6): 415-421.
- Zhao D, Mulvaney S, Chinnaswamy R, Rayas-Duarte P, Allvin B, Wang M (2010). Elastic properties of gluten representing different wheat classes. *Journal of Cereal Science* 52: 432-437.
- Zoldan SM (2008). Regiões de risco, caracterização da antese em cereais de inverno e sistema de alerta para giberela, em trigo. Teses e Dissertações dos Programas de Pós-Graduação da UPF. Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

Anexo I

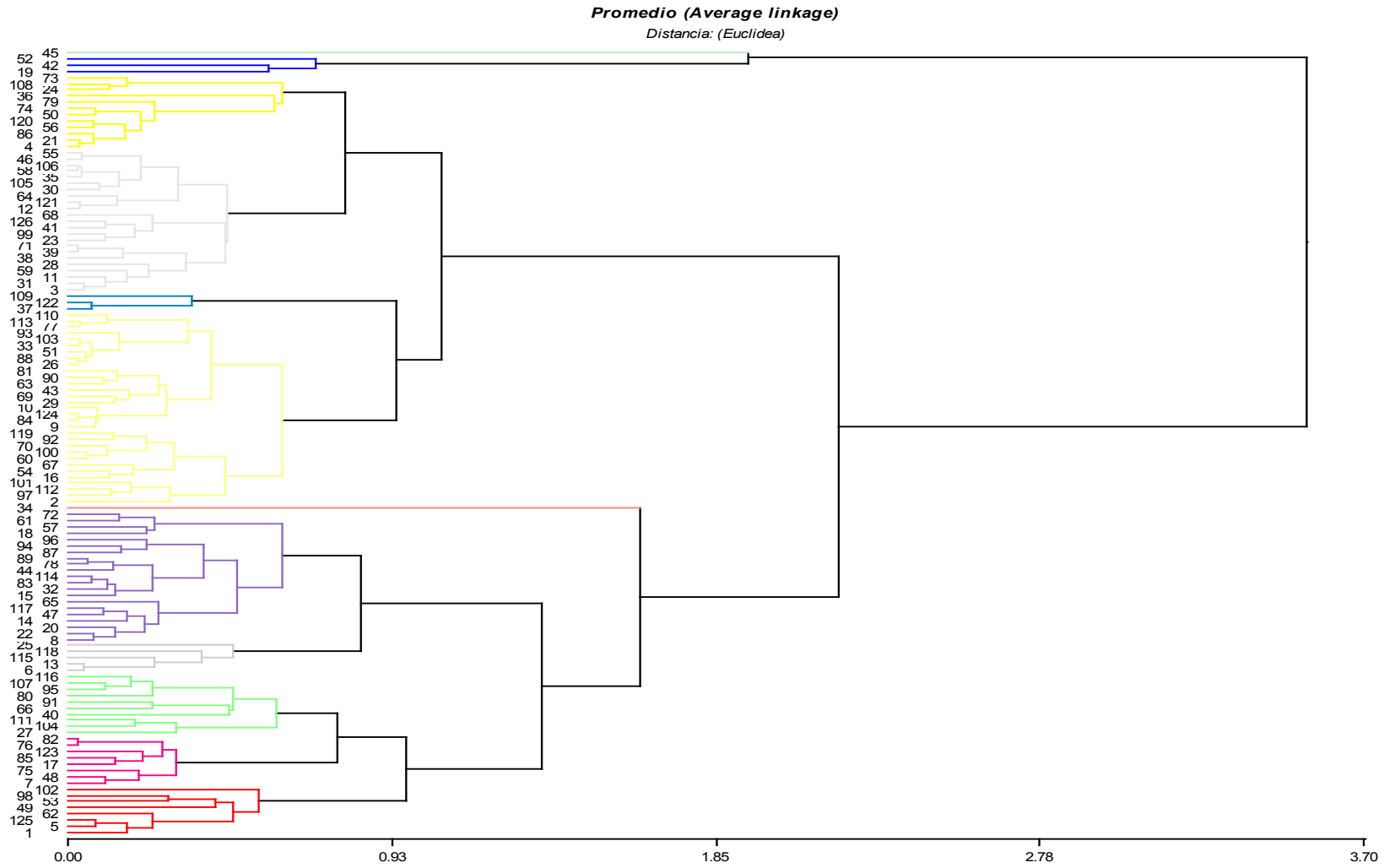


Anexo II

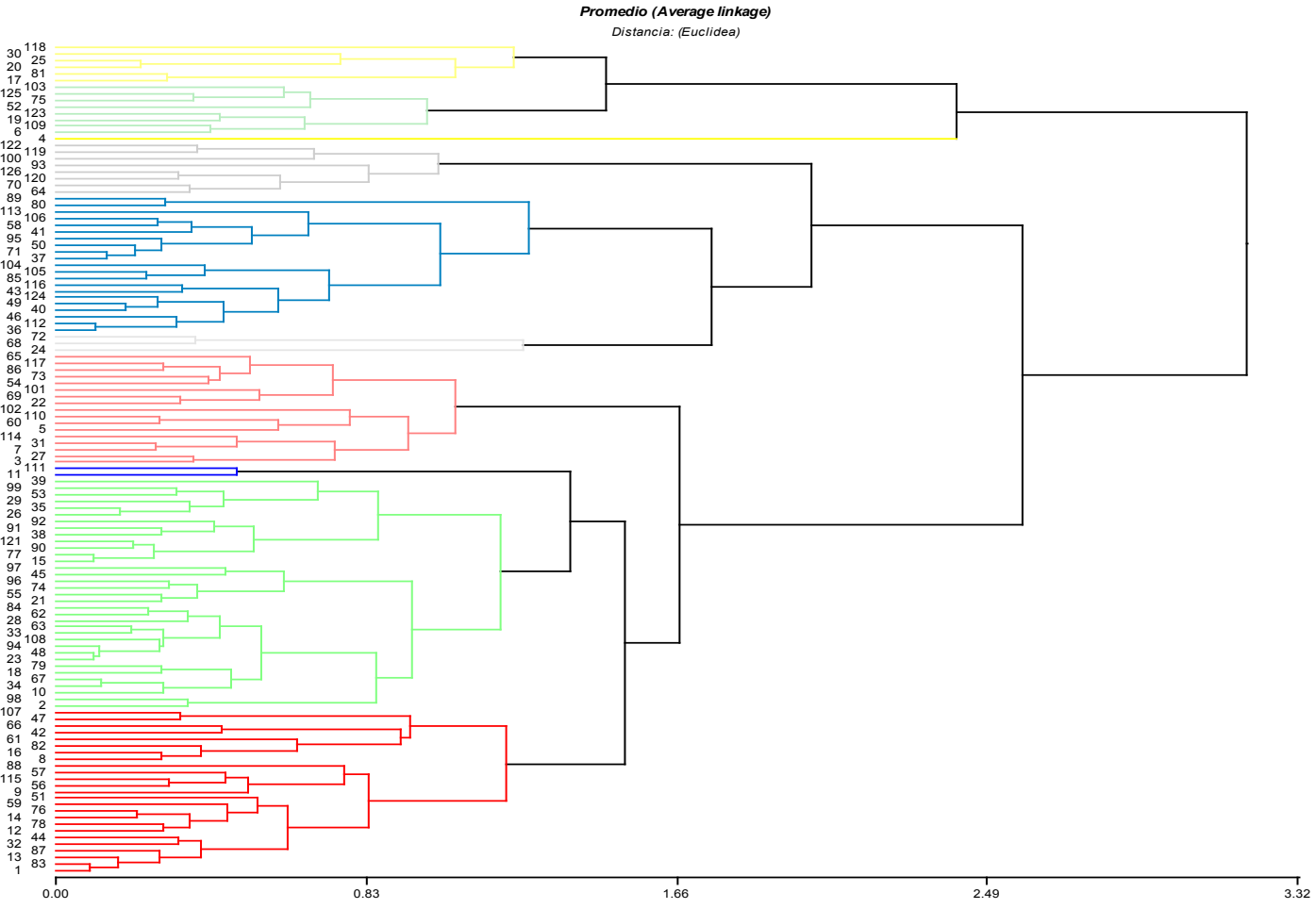
Dendrograma Invernáculo 2015



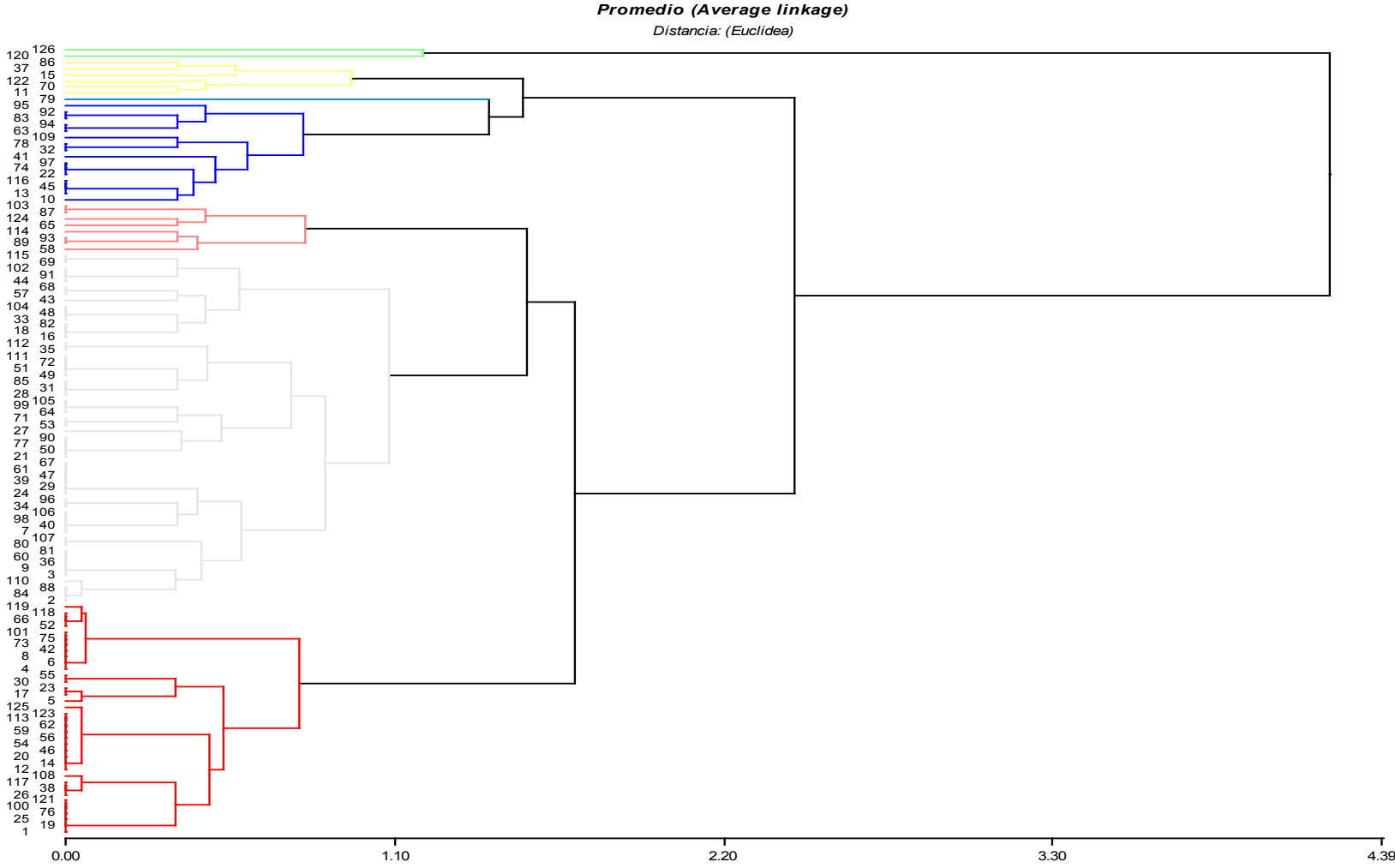
Dendrograma Invernáculo 2016



Dendrograma Jaula 2016



Dendrograma campo 2016



Anexo III

Análisis de la varianza de medias para la severidad en Invernáculo 2015

Modelos lineales generales y mixtos

Medidas de ajuste del modelo

n	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2_0	R2_1
360	2398.30	2834.74	-1073.15	17.18	0.49	0.52

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	234	334.51	<0.0001
n.de.entrada	123	234	1.92	<0.0001

Pruebas de hipótesis marginales

Source	numDF	denDF	F-value	p-value
n.de.entrada	125	234	1.89	<0.0001

Severidad - Medias ajustadas y errores estándares para n.de.entrada

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: Bonferroni

n.de.entrada	Medias	E.E.	
83.00	83.57	10.20	A
13.00	75.40	10.20	A B
15.00	73.86	10.20	A B
122.00	72.93	10.20	A B
103.00	71.43	10.20	A B C
54.00	71.34	12.40	A B C
39.00	71.06	10.20	A B C
93.00	70.38	10.20	A B C
106.00	70.09	10.20	A B C
65.00	69.82	10.20	A B C
2.00	67.70	10.20	A B C
120.00	67.22	10.20	A B C
105.00	66.61	10.20	A B C D
63.00	66.36	10.20	A B C D
22.00	66.03	10.20	A B C D
123.00	65.17	12.40	A B C D
104.00	64.57	10.20	A B C D
64.00	64.19	10.20	A B C D
37.00	63.10	10.20	A B C D
99.00	61.34	10.20	A B C D
57.00	60.93	10.20	A B C D
86.00	60.50	10.20	A B C D
29.00	59.83	10.20	A B C D
90.00	59.77	10.20	A B C D
92.00	59.75	10.20	A B C D
38.00	59.70	10.20	A B C D

80.00	56.97	10.20	A B C D
70.00	56.56	10.20	A B C D
24.00	55.58	10.20	B C D
4.00	55.56	10.20	B C D
85.00	55.36	10.20	B C D
23.00	55.29	10.20	B C D
48.00	55.29	10.20	B C D
10.00	55.21	10.20	B C D
69.00	54.43	10.20	B C D E
71.00	54.14	10.20	B C D E
77.00	53.32	10.20	B C D E
118.00	53.17	10.20	B C D E
31.00	52.85	10.20	B C D E
95.00	52.16	10.20	B C D E
14.00	52.13	10.20	B C D E
49.00	51.24	10.20	B C D E
96.00	50.72	10.20	B C D E
66.00	50.69	10.20	B C D E
67.00	49.74	10.20	B C D E F
26.00	49.65	10.20	B C D E F
28.00	49.32	10.20	B C D E F G
44.00	49.25	10.20	B C D E F G
21.00	48.97	10.20	B C D E F G
126.00	48.85	10.20	B C D E F G
12.00	48.80	10.20	B C D E F G
16.00	48.51	10.20	B C D E F G H
46.00	47.86	10.20	B C D E F G H
3.00	47.84	10.20	B C D E F G H
94.00	47.56	10.20	B C D E F G H
41.00	47.02	10.20	B C D E F G H
40.00	46.49	10.20	B C D E F G H
108.00	46.47	10.20	B C D E F G H
79.00	46.34	10.20	B C D E F G H
36.00	46.28	10.20	B C D E F G H
30.00	46.05	10.20	B C D E F G H
109.00	45.92	10.20	B C D E F G H
100.00	45.47	10.20	B C D E F G H
50.00	45.41	10.20	B C D E F G H
27.00	44.59	10.20	B C D E F G H
73.00	44.50	10.20	B C D E F G H
116.00	44.24	10.20	B C D E F G H
20.00	44.03	10.20	B C D E F G H
119.00	43.88	17.39	B C D E F G H I
112.00	43.79	10.20	C D E F G H I
91.00	43.36	10.20	C D E F G H I
88.00	42.91	10.20	C D E F G H I
56.00	42.75	10.20	C D E F G H I
114.00	42.45	10.20	C D E F G H I
89.00	42.43	10.20	C D E F G H I
101.00	42.01	10.20	C D E F G H I
43.00	41.77	10.20	C D E F G H I
17.00	41.39	10.20	C D E F G H I
51.00	41.18	10.20	C D E F G H I
18.00	41.00	10.20	C D E F G H I
9.00	40.79	10.20	C D E F G H I
110.00	40.78	10.20	C D E F G H I
11.00	40.36	10.20	C D E F G H I
87.00	39.76	10.20	C D E F G H I
59.00	39.73	10.20	C D E F G H I
5.00	39.64	10.20	C D E F G H I
97.00	39.54	10.20	C D E F G H I
34.00	39.42	10.20	C D E F G H I

32.00	39.42	10.20	C D E F G H I
107.00	38.91	10.20	C D E F G H I
117.00	38.60	10.20	C D E F G H I
62.00	38.50	10.20	C D E F G H I
102.00	38.15	10.20	C D E F G H I
75.00	38.07	10.20	C D E F G H I
84.00	37.59	10.20	C D E F G H I
68.00	37.20	10.20	C D E F G H I
35.00	36.93	10.20	C D E F G H I
113.00	36.80	10.20	C D E F G H I
8.00	35.16	10.20	C D E F G H I
1.00	34.94	10.20	C D E F G H I
33.00	34.61	10.20	C D E F G H I
61.00	34.18	10.20	C D E F G H I
53.00	33.93	10.20	C D E F G H I
45.00	33.77	10.20	C D E F G H I
6.00	33.72	17.39	C D E F G H I
42.00	33.56	10.20	D E F G H I
60.00	33.16	10.20	D E F G H I
125.00	32.99	10.20	D E F G H I
98.00	30.51	10.20	D E F G H I
25.00	30.46	10.20	D E F G H I
111.00	29.50	10.20	D E F G H I
55.00	28.99	10.20	D E F G H I
58.00	28.19	10.20	D E F G H I
76.00	28.03	10.20	D E F G H I
121.00	27.47	17.39	D E F G H I
78.00	26.15	10.20	E F G H I
72.00	24.56	10.20	E F G H I
19.00	23.55	12.40	E F G H I
81.00	22.68	10.20	F G H I
47.00	21.76	10.20	G H I
115.00	17.84	10.20	H I
7.00	17.73	12.40	H I
52.00	7.41	10.20	I
124.00	2.38	17.39	I

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Parámetros de los efectos aleatorios

Modelo de covarianzas de los efectos aleatorios: pdldent

Formula: ~1 | rep

Desvíos estándares y correlaciones

	(Intercept)
(Intercept)	4.16

Análisis de la varianza de medias para la severidad en Invernáculo 2016

Modelos lineales generales y mixtos

Medidas de ajuste del modelo

n	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2_0	R2_1
374	2393.92	2843.64	-1068.96	13.51	0.38	0.47

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	246	649.11	<0.0001
n.de.entrada	125	246	1.42	0.0104

Pruebas de hipótesis marginales

Source	numDF	denDF	F-value	p-value
n.de.entrada	125	246	1.42	0.0104

Severidad - Medias ajustadas y errores estándares para n.de.entrada

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: Bonferroni

n.de.entrada	Medias	E.E.	
24.00	100.00	8.42	A
108.00	99.07	8.42	A B
36.00	98.49	8.42	A B C
73.00	98.03	8.42	A B C D
50.00	96.18	8.42	A B C D E
74.00	95.77	8.42	A B C D E
86.00	94.91	8.42	A B C D E F
2.00	94.52	8.42	A B C D E F G
4.00	94.41	8.42	A B C D E F G H
64.00	94.33	8.42	A B C D E F G H
120.00	94.30	8.42	A B C D E F G H
21.00	94.09	8.42	A B C D E F G H
56.00	93.63	8.42	A B C D E F G H
12.00	93.51	8.42	A B C D E F G H
79.00	93.38	8.42	A B C D E F G H
121.00	93.21	8.42	A B C D E F G H
119.00	93.11	10.08	A B C D E F G H I
101.00	92.56	8.42	A B C D E F G H I
71.00	92.52	8.42	A B C D E F G H I
39.00	92.41	8.42	A B C D E F G H I
38.00	92.34	8.42	A B C D E F G H I
112.00	92.22	8.42	A B C D E F G H I
30.00	92.00	8.42	A B C D E F G H I
105.00	91.28	8.42	A B C D E F G H I
97.00	91.27	8.42	A B C D E F G H I
46.00	91.25	8.42	A B C D E F G H I
55.00	91.10	8.42	A B C D E F G H I
106.00	90.48	8.42	A B C D E F G H I J
35.00	90.48	8.42	A B C D E F G H I J

31.00	90.48	8.42	A B C D E F G H I J
3.00	90.27	8.42	A B C D E F G H I J
59.00	90.22	8.42	A B C D E F G H I J
58.00	90.19	8.42	A B C D E F G H I J
92.00	89.70	8.42	A B C D E F G H I J
11.00	89.61	8.42	A B C D E F G H I J
54.00	89.25	8.42	A B C D E F G H I J
99.00	89.21	8.42	A B C D E F G H I J
67.00	88.68	8.42	A B C D E F G H I J
70.00	88.42	8.42	A B C D E F G H I J
23.00	88.32	8.42	A B C D E F G H I J K
16.00	88.30	8.42	A B C D E F G H I J K
28.00	88.18	8.42	A B C D E F G H I J K
100.00	87.79	8.42	A B C D E F G H I J K
68.00	87.70	8.42	A B C D E F G H I J K
60.00	87.64	8.42	A B C D E F G H I J K
126.00	87.28	8.42	A B C D E F G H I J K
13.00	86.99	8.42	A B C D E F G H I J K
115.00	86.96	8.42	A B C D E F G H I J K
41.00	86.91	8.42	A B C D E F G H I J K
6.00	86.74	8.42	A B C D E F G H I J K
10.00	86.49	8.42	A B C D E F G H I J K
84.00	86.24	8.42	A B C D E F G H I J K
81.00	86.02	8.42	A B C D E F G H I J K
124.00	85.99	8.42	A B C D E F G H I J K
103.00	85.97	8.42	A B C D E F G H I J K
93.00	85.73	8.42	A B C D E F G H I J K
9.00	85.73	8.42	A B C D E F G H I J K
33.00	85.67	8.42	A B C D E F G H I J K
88.00	85.41	8.42	A B C D E F G H I J K
26.00	85.28	8.42	A B C D E F G H I J K
63.00	85.17	8.42	A B C D E F G H I J K
51.00	85.11	8.42	A B C D E F G H I J K
43.00	84.62	8.42	A B C D E F G H I J K L
90.00	84.62	8.42	A B C D E F G H I J K L
118.00	84.29	8.42	A B C D E F G H I J K L
34.00	83.83	8.42	A B C D E F G H I J K L
110.00	83.43	8.42	A B C D E F G H I J K L
29.00	83.42	8.42	A B C D E F G H I J K L
25.00	82.98	8.42	A B C D E F G H I J K L
69.00	82.86	8.42	A B C D E F G H I J K L
117.00	82.60	8.42	A B C D E F G H I J K L
14.00	82.54	8.42	A B C D E F G H I J K L
113.00	82.51	8.42	A B C D E F G H I J K L
77.00	82.27	8.42	A B C D E F G H I J K L
122.00	81.85	8.42	A B C D E F G H I J K L
47.00	81.70	8.42	A B C D E F G H I J K L
37.00	81.38	8.42	A B C D E F G H I J K L
65.00	81.10	8.42	A B C D E F G H I J K L
22.00	80.91	8.42	A B C D E F G H I J K L
20.00	80.59	8.42	A B C D E F G H I J K L
8.00	80.32	8.42	A B C D E F G H I J K L
15.00	79.70	8.42	A B C D E F G H I J K L
72.00	78.86	8.42	A B C D E F G H I J K L
114.00	78.78	8.42	A B C D E F G H I J K L
32.00	78.53	8.42	A B C D E F G H I J K L
83.00	78.45	8.42	A B C D E F G H I J K L
109.00	78.40	8.42	A B C D E F G H I J K L
18.00	78.07	8.42	B C D E F G H I J K L
61.00	77.70	8.42	B C D E F G H I J K L
87.00	77.29	8.42	C D E F G H I J K L
89.00	77.14	8.42	C D E F G H I J K L

78.00	77.03	8.42	C D E F G H I J K L
96.00	76.80	8.42	C D E F G H I J K L
94.00	76.60	8.42	D E F G H I J K L
57.00	76.21	8.42	E F G H I J K L
44.00	75.91	8.42	E F G H I J K L
123.00	74.71	8.42	E F G H I J K L
85.00	74.69	8.42	E F G H I J K L
52.00	73.82	8.42	F G H I J K L M
125.00	73.55	8.42	F G H I J K L M
17.00	73.53	8.42	F G H I J K L M
1.00	73.52	8.42	F G H I J K L M
62.00	73.28	8.42	F G H I J K L M
5.00	72.80	8.42	G H I J K L M
76.00	72.69	8.42	H I J K L M
82.00	72.58	8.42	H I J K L M
102.00	72.31	8.42	H I J K L M
48.00	71.55	8.42	H I J K L M
42.00	71.24	8.42	H I J K L M
98.00	71.15	8.42	H I J K L M
75.00	70.52	8.42	H I J K L M
7.00	70.14	10.08	H I J K L M
40.00	69.16	8.42	I J K L M
53.00	69.01	8.42	I J K L M
49.00	68.47	8.42	J K L M
107.00	68.30	8.42	J K L M
95.00	68.19	8.42	J K L M
116.00	68.17	8.42	J K L M
19.00	66.25	10.08	J K L M
27.00	65.46	8.42	K L M
91.00	65.24	8.42	K L M
66.00	65.00	8.42	K L M
80.00	64.10	10.08	K L M
111.00	63.32	8.42	L M
104.00	62.98	8.42	L M
45.00	52.69	8.42	M

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Parámetros de los efectos aleatorios

Modelo de covarianzas de los efectos aleatorios: pdIdent

Formula: ~1 | Rep

Desvíos estándares y correlaciones

	(Intercept)
(Intercept)	5.50

Análisis de la varianza de medias para la severidad en Jaula 2016

Modelos lineales generales y mixtos

Medidas de ajuste del modelo

n	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2_0	R2_1
745	5897.14	6463.94	-2820.57	19.21	0.47	0.47

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	614	2087.78	<0.0001
N.de.Muestra	125	614	4.34	<0.0001

Pruebas de hipótesis marginales

Source	numDF	denDF	F-value	p-value
N.de.Muestra	125	614	4.34	<0.0001

Severidad - Medias ajustadas y errores estándares para N.de.Muestra

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: Bonferroni

N°	Medias	E.E.	
126	90.72	7.86	A
93	89.04	7.86	A B
120	88.83	7.86	A B
70	87.17	7.86	A B C
64	83.46	7.86	A B C D
122	79.19	7.86	A B C D E
119	75.35	7.86	A B C D E F
113	68.70	7.86	B C D E F G
100	66.52	7.86	C D E F G H
50	65.00	7.86	D E F G H I
106	62.96	7.86	D E F G H I J
37	62.26	7.86	D E F G H I J
58	62.14	7.86	D E F G H I J K
41	61.54	7.86	E F G H I J K L

71	61.43	7.86	EFGHIJKLM
72	58.96	7.86	EFGHIJKLMN
95	58.49	7.86	EFGHIJKLMNO
68	57.39	7.86	FGHIJKLMNOP
22	55.37	7.86	FGHIJKLMNOPQ
124	55.27	7.86	FGHIJKLMNOPQR
49	55.14	7.86	FGHIJKLMNOPQR
31	54.53	7.86	FGHIJKLMNOPQR
45	54.46	7.86	FGHIJKLMNOPQR
89	53.69	7.86	FGHIJKLMNOPQR
40	53.55	7.86	GHIJKLMNOPQR
69	53.31	7.86	GHIJKLMNOPQR
112	52.65	7.86	GHIJKLMNOPQR
24	52.59	7.86	GHIJKLMNOPQRS
65	52.42	7.86	GHIJKLMNOPQRS
80	51.87	7.86	GHIJKLMNOPQRST
55	51.49	7.86	GHIJKLMNOPQRST
73	51.21	7.86	GHIJKLMNOPQRST
36	51.04	7.86	GHIJKLMNOPQRST
7	50.67	7.86	GHIJKLMNOPQRSTU
114	50.56	7.86	GHIJKLMNOPQRSTUW
21	50.32	7.86	GHIJKLMNOPQRSTUWX
46	49.17	7.86	GHIJKLMNOPQRSTUWXY
101	48.89	7.86	GHIJKLMNOPQRSTUWXYZ
74	48.78	7.86	GHIJKLMNOPQRSTUWXYZ
10	48.77	7.86	GHIJKLMNOPQRSTUWXYZ
97	48.34	7.86	GHIJKLMNOPQRSTUWXYZa
54	47.98	7.86	GHIJKLMNOPQRSTUWXYZa
43	47.38	7.86	GHIJKLMNOPQRSTUWXYZab
116	47.06	7.86	GHIJKLMNOPQRSTUWXYZab
86	46.74	7.86	HIJKLMNOPQRSTUWXYZabc

96	46.64	7.86	HIJKLMNOPQRSTUVWXYZ abc
67	46.61	7.86	HIJKLMNOPQRSTUVWXYZ abc
34	46.18	7.86	HIJKLMNOPQRSTUVWXYZ abc
117	45.52	7.86	HIJKLMNOPQRSTUVWXYZ abc
94	44.97	7.86	HIJKLMNOPQRSTUVWXYZ abc
4	44.96	7.86	HIJKLMNOPQRSTUVWXYZ abc
27	44.90	7.86	HIJKLMNOPQRSTUVWXYZ abc
23	44.65	7.86	IJKLMNOPQRSTUVWXYZ abc
3	44.64	7.86	IJKLMNOPQRSTUVWXYZ abc
48	44.20	7.86	IJKLMNOPQRSTUVWXYZ abc
110	44.04	7.86	IJKLMNOPQRSTUVWXYZ abc
79	43.52	7.86	IJKLMNOPQRSTUVWXYZ abc
104	43.42	7.86	IJKLMNOPQRSTUVWXYZ abc
63	42.94	7.86	JJKLMNOPQRSTUVWXYZ abc
60	42.85	7.86	JJKLMNOPQRSTUVWXYZ abc
18	41.78	7.86	JJKLMNOPQRSTUVWXYZ abc
5	41.44	7.86	JJKLMNOPQRSTUVWXYZ abc
105	41.25	7.86	JJKLMNOPQRSTUVWXYZ abc
108	40.37	7.86	KLMNOPQRSTUVWXYZ abc
33	40.27	7.86	LMNOPQRSTUVWXYZ abc
28	39.72	7.86	MNOPQRSTUVWXYZ abc
85	38.98	7.86	NOPQRSTUVWXYZ abc
91	38.67	7.86	NOPQRSTUVWXYZ abc
38	38.14	7.86	NOPQRSTUVWXYZ abc
84	37.43	7.86	NOPQRSTUVWXYZ abcd
51	37.38	7.86	NOPQRSTUVWXYZ abcd
9	37.27	7.86	NOPQRSTUVWXYZ abcd
29	37.24	7.86	NOPQRSTUVWXYZ abcde
92	37.11	7.86	OPQRSTUVWXYZ abcde
90	35.67	7.86	PQRSTUVWXYZ abcdef
121	34.99	7.86	QRSTUVWXYZ abcdef

2	34.71	7.86	Q R S T U W X Y Z a b c d e f
62	34.61	7.86	Q R S T U W X Y Z a b c d e f
77	34.15	7.86	Q R S T U W X Y Z a b c d e f
56	34.10	7.86	Q R S T U W X Y Z a b c d e f
15	33.96	7.86	Q R S T U W X Y Z a b c d e f
57	33.86	7.86	Q R S T U W X Y Z a b c d e f
14	33.66	7.86	Q R S T U W X Y Z a b c d e f
35	33.55	7.86	R S T U W X Y Z a b c d e f
11	33.37	7.86	R S T U W X Y Z a b c d e f
32	33.15	7.86	R S T U W X Y Z a b c d e f
98	32.91	7.86	R S T U W X Y Z a b c d e f
115	32.89	7.86	R S T U W X Y Z a b c d e f
78	31.95	7.86	R S T U W X Y Z a b c d e f g
83	31.94	7.86	R S T U W X Y Z a b c d e f g
44	31.92	7.86	R S T U W X Y Z a b c d e f g
102	31.85	7.86	R S T U W X Y Z a b c d e f g
26	31.67	7.86	R S T U W X Y Z a b c d e f g
12	31.33	7.86	R S T U W X Y Z a b c d e f g
30	30.93	9.63	R S T U W X Y Z a b c d e f g
1	30.86	7.86	S T U W X Y Z a b c d e f g
87	30.46	7.86	T U W X Y Z a b c d e f g
76	30.42	7.86	T U W X Y Z a b c d e f g
17	30.35	7.86	T U W X Y Z a b c d e f g
103	28.93	7.86	U W X Y Z a b c d e f g
53	28.83	7.86	W X Y Z a b c d e f g
13	28.75	7.86	X Y Z a b c d e f g
81	28.42	7.86	Y Z a b c d e f g
99	28.00	7.86	Y Z a b c d e f g
88	27.48	7.86	Y Z a b c d e f g
111	27.30	7.86	Z a b c d e f g
52	26.70	7.86	a b c d e f g

59	26.10	7.86	b c d e f g
16	25.98	7.86	b c d e f g
20	24.86	7.86	b c d e f g
75	22.75	7.86	b c d e f g
39	22.71	7.86	b c d e f g
25	22.56	9.63	b c d e f g
19	21.32	7.86	b c d e f g
8	20.88	11.11	b c d e f g
61	20.80	7.86	c d e f g
125	20.49	7.86	c d e f g
0	20.24	7.86	c d e f g
6	20.08	7.86	c d e f g
47	18.58	7.86	c d e f g
118	16.20	13.61	c d e f g
107	16.15	7.86	d e f g
123	15.47	7.86	e f g
109	14.19	7.86	f g
66	10.81	7.86	g
42	10.44	7.86	g

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Parámetros de los efectos aleatorios

Modelo de covarianzas de los efectos aleatorios: pdIdent

Formula: ~1 | Espiga

Desvíos estándares y correlaciones

	(Intercept)
(Intercept)	1.48

Análisis de la varianza de medias para la severidad en Campo 2016

Medidas de ajuste del modelo

n	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2_0	R2_1
250	825.84	1186.84	-284.92	1.70	0.70	0.70

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	N	umDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)		1	123	583.03	<0.0001
Lineas		125	123	2.34	<0.0001

Pruebas de hipótesis marginales

Source	numDF	denDF	F-value	p-value
Lineas	125	123	2.34	<0.0001

raizsev - Medias ajustadas y errores estándares para Lineas

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: Bonferroni

Lineas	Medias	E.E.	
79	7.41	1.21	A
120	7.35	1.21	A
11	6.70	1.21	A B
92	6.70	1.21	A B
83	6.61	1.21	A B
122	6.61	1.21	A B
126	6.27	1.21	A B C
95	6.27	1.21	A B C
70	6.27	1.21	A B C
41	6.27	1.21	A B C
15	6.27	1.21	A B C
45	5.90	1.21	A B C D
97	5.90	1.21	A B C D
104	5.90	1.21	A B C D
116	5.90	1.21	A B C D
22	5.90	1.21	A B C D
78	5.90	1.21	A B C D
102	5.90	1.21	A B C D
44	5.77	1.21	A B C D
37	5.77	1.21	A B C D
91	5.77	1.21	A B C D
48	5.77	1.21	A B C D
43	5.77	1.21	A B C D
74	5.77	1.21	A B C D
32	5.77	1.21	A B C D
33	5.77	1.21	A B C D
94	5.76	1.21	A B C D
63	5.76	1.21	A B C D
68	5.57	1.70	A B C D E
82	5.48	1.21	A B C D E
13	5.45	1.21	A B C D E
16	5.40	1.21	A B C D E F

18	5.40	1.21	A B C D E F
86	5.40	1.21	A B C D E F
57	5.40	1.21	A B C D E F
10	5.40	1.21	A B C D E F
109	5.40	1.21	A B C D E F
69	5.12	1.21	A B C D E F
115	5.12	1.21	A B C D E F
35	4.97	1.21	A B C D E F
29	4.97	1.21	A B C D E F
98	4.97	1.21	A B C D E F
114	4.97	1.21	A B C D E F
112	4.97	1.21	A B C D E F
28	4.97	1.21	A B C D E F
67	4.97	1.21	A B C D E F
31	4.97	1.21	A B C D E F
39	4.97	1.21	A B C D E F
7	4.74	1.21	A B C D E F G
47	4.74	1.21	A B C D E F G
106	4.74	1.21	A B C D E F G
40	4.74	1.21	A B C D E F G
85	4.74	1.21	A B C D E F G
61	4.74	1.21	A B C D E F G
24	4.74	1.21	A B C D E F G
36	4.47	1.21	A B C D E F G
96	4.47	1.21	A B C D E F G
89	4.47	1.21	A B C D E F G
93	4.47	1.21	A B C D E F G
60	4.32	1.21	A B C D E F G H
72	4.32	1.21	A B C D E F G H
51	4.32	1.21	A B C D E F G H
3	4.32	1.21	A B C D E F G H
34	4.32	1.21	A B C D E F G H
49	4.32	1.21	A B C D E F G H
81	4.32	1.21	A B C D E F G H
58	4.32	1.21	A B C D E F G H
9	4.32	1.21	A B C D E F G H
111	4.32	1.21	A B C D E F G H
27	3.82	1.21	B C D E F G H I
88	3.82	1.21	B C D E F G H I
90	3.82	1.21	B C D E F G H I
64	3.82	1.21	B C D E F G H I
65	3.82	1.21	B C D E F G H I
50	3.82	1.21	B C D E F G H I
77	3.82	1.21	B C D E F G H I
105	3.82	1.21	B C D E F G H I
2	3.82	1.21	B C D E F G H I
84	3.82	1.21	B C D E F G H I
99	3.82	1.21	B C D E F G H I
21	3.82	1.21	B C D E F G H I
110	3.24	1.21	C D E F G H I J
1	3.16	1.21	C D E F G H I J
124	3.16	1.21	C D E F G H I J
103	3.16	1.21	C D E F G H I J
19	3.16	1.21	C D E F G H I J
76	3.16	1.21	C D E F G H I J
25	3.16	1.21	C D E F G H I J
87	3.16	1.21	C D E F G H I J
121	3.16	1.21	C D E F G H I J
53	3.16	1.21	C D E F G H I J
80	3.16	1.21	C D E F G H I J
107	3.16	1.21	C D E F G H I J
71	3.16	1.21	C D E F G H I J

100	3.16	1.21	C D E F G H I J
55	2.74	1.21	D E F G H I J
30	2.74	1.21	D E F G H I J
5	2.74	1.21	D E F G H I J
23	2.24	1.21	E F G H I J
17	2.24	1.21	E F G H I J
125	2.08	1.21	E G H I J
108	2.08	1.21	E G H I J
20	1.58	1.21	E G H I J
12	1.58	1.21	E G H I J
56	1.58	1.21	E G H I J
46	1.58	1.21	E G H I J
117	1.58	1.21	E G H I J
59	1.58	1.21	E G H I J
38	1.58	1.21	E G H I J
62	1.58	1.21	E G H I J
26	1.58	1.21	E G H I J
54	1.58	1.21	E G H I J
113	1.58	1.21	E G H I J
14	1.58	1.21	E G H I J
123	1.58	1.21	E G H I J
119	1.00	1.21	H I J
66	0.50	1.21	I J
52	0.50	1.21	I J
118	0.50	1.21	I J
75	0.09	1.70	I J
6	0.00	1.21	J
4	0.00	1.21	J
73	0.00	1.21	J
8	0.00	1.21	J
101	0.00	1.21	J
42	0.00	1.21	J

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Parámetros de los efectos aleatorios

Modelo de covarianzas de los efectos aleatorios: pdIdent

Formula: ~1 | rep

Desvíos estándares y correlaciones

	<u>(Intercept)</u>	
<u>(Intercept)</u>		0.18