



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Maestría en Bromatología y Tecnología de la Industrialización de los Alimentos

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 presentada para optar al título de Magíster de la Universidad de Buenos Aires en Bromatología y Tecnología de la Industrialización de los Alimentos

Autor: Ing. Natalia Victoria Pesquero

Director de tesis: Dra. Virginia Fernández Pinto

Co-Director de tesis: Dr. Ricardo Moschini

Lugar de trabajo: UBA, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Química Orgánica, Laboratorio de Microbiología e INTA-CNIA-ITA, Área de protección de Alimentos.

Buenos Aires, Agosto 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.

Fusarium graminearum (Schwabe) [teleomorfo *Gibberella zeae* (Schwein)] es considerado el principal agente causal de la Fusariosis de la espiga de trigo (FET) en Argentina. Se trata de una enfermedad floral, pues el proceso de infección comienza en las anteras, caracterizándose por su fuerte dependencia de factores meteorológicos y por manifestarse esporádicamente. La FET reduce el rendimiento en grano y también afecta su calidad, por la acumulación de micotoxinas de la familia de los tricotecenos, especialmente las del tipo B que incluye al deoxinivalenol (DON), sus acetyl derivados como el 3-acetyldeoxinivalenol (3-ADON) y el 15-acetyldeoxinivalenol (15-ADON), nivalenol (NIV), y fusarenona X. Los objetivos de esta tesis fueron en primer lugar, caracterizar morfológicamente las cepas de *F. graminearum* utilizadas para inocular distintas variedades de trigo y determinar el perfil de tricotecenos del grupo B producido por las mismas. En segundo lugar, analizar el efecto de las variedades de trigo y de un fungicida aplicado en dos momentos post-inoculación, sobre la producción de los tricotecenos en los granos a cosecha. Para analizar la capacidad toxicogénica de las cepas y las toxinas acumuladas en los granos de trigo, se realizó una extracción, purificación y luego detección por cromatografía gaseosa (CG) con detector de captura de electrones y los resultados se confirmaron por cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masa (CG-MS). Un total de ocho variedades de trigo con distinto comportamiento respecto a la FET fueron sembradas a campo en jaulas con malla protectora y humidificador (EEA INTA M. Juárez, campaña 2014). En antesis, todas las variedades se inocularon artificialmente y se trataron con un fungicida triazol aplicado en dos tiempos: un tratamiento fue la aplicación inmediata después de la inoculación y el otro tratamiento fue la aplicación a las 72 horas de la inoculación. Se incluyó un tratamiento testigo que no fue inoculado ni tratado con el fungicida. Se verificó que los cuatro aislamientos utilizados para la inoculación a campo correspondieron a *F. graminearum*. El perfil de tricotecenos tipo B producido por dichas cepas fue similar al encontrado en los granos. En todas las muestras se encontraron niveles significativos de DON y en casi todas se halló 15-ADON en baja concentración. Con menor frecuencia se encontró 3-ADON aunque con valores muy superiores a los encontrados para DON y 15-ADON. En las variedades Baguette P11 y SRM 2333 (variedades de mal comportamiento) se observó la mayor acumulación de toxinas (DON, 3-ADON y 15-ADON) diferenciándose del resto de los cultivares de buen comportamiento. En estas dos variedades de mal comportamiento, resulta indistinto el momento de aplicación del fungicida ya sea al aplicarlo inmediatamente después de la inoculación o pasadas 72 horas. Las variedades de buen comportamiento, presentaron una respuesta errática respecto al momento de aplicación del fungicida, esto puede deberse a los bajos niveles de DON producidos en las muestras. Los resultados de este trabajo permitirían ampliar la ventana de aplicación del fungicida para un efectivo control de DON por lo menos a 72 horas post inoculación en antesis. Lo cual representa una ventaja económica al productor, evitando el uso indiscriminado de agroquímicos (por aplicaciones preventivas) y a su vez contribuye a minimizar los riesgos que producen sobre la salud humana y su impacto en el medio ambiente.

Palabras claves: variedades de trigo, fusariosis, *Fusarium graminearum*, tricotecenos tipo B



Influence of wheat varieties and the application of fungicides on the production of trichothecenes in strains of *Fusarium graminearum* isolated from wheat grown in Argentina.

Fusarium graminearum (Schwabe) [teleomorph *Gibberella zeae* (Schwein)] is considered the main causal agent of Fusarium head blight (FHB) on wheat in Argentina. It is a floral disease, because the infection process begins in the anthers, characterized by strong dependence on meteorological factors and sporadically manifestation. FHB reduces grain yield and also impairs its quality by the accumulation of mycotoxins such as trichothecenes, especially type B, which includes deoxynivalenol (DON), its acetyl derivatives 3-acetyldeoxynivalenol (3-ADON) and 15-acetyldeoxynivalenol (15-ADON), nivalenol (NIV), and fusarenone X. The objectives of this thesis were to characterize morphologically the strains of *F. graminearum* used to inoculate different wheat varieties, to determine the profile of trichothecenes of group B produced and to analyze the effect of wheat varieties and a fungicide applied at two post-inoculation timings, on the production of trichothecenes in grains at harvest. Extraction, purification and then detection by gas chromatography (GC) with electron capture detector and finally a confirmation by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC-MS) was performed to analyze toxicogenic capacity of the strains and the toxins accumulated in the wheat grains at harvest. A total of eight wheat varieties with different behaviour to FHB were planted in cages with protective mesh and humidifier (EEA INTA M. Juarez, 2014 growing season). In anthesis, all varieties were artificially inoculated and treated with a triazole fungicide applied in two timings: immediately after inoculation and at 72 hours after inoculation. A control treatment was included that was neither inoculated nor treated with the fungicide. It was verified that the four isolates used for field inoculation corresponded to *F. graminearum*. The profile of type B trichothecenes produced by these strains was similar to that found in the grains. In all grains samples, significant levels of DON were found and in almost all of them 15-ADON was found in low concentration. With less frequency 3-ADON was found but with values greater than those found for DON and 15-ADON. The highest accumulation of toxins (DON, 3-ADON and 15-ADON) was observed in the varieties Baguette P11 and SRM 2333 (varieties with bad behaviour), differing from the rest of the cultivars with good behaviour. In these two varieties of bad behaviour, the time of application of the fungicide is indistinct either when applied immediately after inoculation or after 72 hours. The varieties of good behaviour, presented an erratic response to the timing of application of the fungicide, this may be due to the low levels of DON produced in the grain samples. The results of this work would allow to extend the application window of the fungicide for an effective control of DON for at least 72 hours post inoculation in anthesis. This represents an economic advantage to the producer, avoiding the indiscriminate use of agrochemicals (by preventive applications) and also helps to minimize the risks that this applications cause to human health and its impact on the environment.

Keywords: Wheat varieties, fusariosis, *Fusarium graminearum*, trichothecenes type B



AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y por dame fortaleza en momentos difíciles.

A mis padres que sin lugar a duda siempre me han apoyado y enseñado que la perseverancia es un valor esencial para alcanzar los sueños. A mi hermano por su apoyo y colaboración.

Agradezco de manera especial a mi esposo y gran compañero Sebastián. Por todas las cosas que hace por mí y por nuestra familia. Por estar de manera incondicional y por entender mis cansancios y frustraciones. Gracias porque sin su paciencia este trabajo no hubiera sido posible.

A mi directora de Tesis Dra. Virginia Fernández Pinto, por darme la posibilidad de realizar esta investigación, por su gran apoyo y motivación.

De igual manera a mi codirector, Dr. Ricardo Moschini por su constante asesoramiento y apoyo durante el desarrollo de esta tesis, como así también por sus valiosos aportes.

A la Magíster Diana Ramírez Albuquerque, por su predisposición y compromiso, por acompañarme en cada momento. Así como también por su ayuda en los ensayos experimentales.

A Ana María Sancho por sus valiosos aportes en los análisis estadísticos.

A mis amigas del alma Eugenia, Trinidad y Natalia simplemente por estar siempre a mi lado y por compartir tantos hermosos momentos.

A todos mis compañeros del Instituto de Alimentos del INTA Castelar quienes han colaborado conmigo, algunos de manera específica con el desarrollo del trabajo y otros, no menos importantes, que me acompañaron en este camino dándome sus consejos y principalmente su amistad.

La presente investigación ha sido desarrollada gracias al aporte del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, a través del Proyecto de INTA PNCyO1127023 (micotoxinas en Cereales y Oleaginosas) coordinado por el Dr. Ricardo C. Moschini, al Ministerio de Ciencia y Tecnología por el financiamiento de mis estudios a través del otorgamiento de mi beca profesional, al proyecto UBACYT (2013- 2016) Nº 20020120100016BA financiado por la Universidad de Buenos Aires y a el proyecto PIP (2012-2014) Nº 11220110100383 financiado por CONICET y dirigidos por la Dra. Fernández Pinto.

Dedico este trabajo a mi hijo Gael, por ser mi norte y sostén emocional.

Por alegrar cada momento de mi vida.





Índice de Contenido

1	INTRODUCCION	11
1.1	Generalidades del cultivo de trigo.	11
1.2	Fusariosis de la espiga del trigo.....	12
1.2.1	Factores predisponentes.....	13
1.2.2	Sintomatología y daños.....	14
1.2.3	Ciclo biológico de la enfermedad.....	15
1.2.4	Control integrado de la enfermedad.....	17
1.3	Género <i>Fusarium</i>	20
1.3.1	Clasificación de especies dentro del género <i>Fusarium</i>	21
1.3.2	Características morfológicas de las especies del género <i>Fusarium</i>	22
1.3.3	Características morfológicas: <i>Fusarium graminearum</i> Schwabe	25
1.3.4	Complejo <i>Fusarium graminearum</i> (Complejo FGSC).	26
1.3.5	Genotipo y quimiotipo de <i>Fusarium graminearum</i>	27
1.4	Micotoxinas.....	28
1.4.1	Micotoxinas producidas por la Fusariosis de la espiga del trigo.....	29
1.4.2	Propiedades toxicológicas producidas por los tricotecenos tipo B.....	32
1.4.3	Ocurrencia natural de tricotecenos tipo B.....	35
1.4.4	Biosíntesis de tricotecenos tipo B.....	36
1.5	Determinación de tricotecenos Tipo B.....	37
2	OBJETIVOS	40
2.1	Objetivo general.....	40
2.2	Objetivos específicos.....	40
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
3.1	Muestras y tratamientos.....	41
3.2	Aislamientos utilizados para inocular en campo.....	43
3.2.1	Re-aislamiento de las cepas utilizadas para inocular en campo.	43
3.3	Determinación de micotoxinas	44
3.3.1	Determinación de la capacidad toxicogénica de los aislamientos de <i>Fusarium graminearum</i> utilizados para inocular el trigo.....	44
3.3.2	Determinación de micotoxinas en muestras de granos.....	44

3.4	Análisis estadístico	53
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
4.1	Caracterización de cepas de <i>Fusarium graminearum</i> utilizadas para inocular en campo....	54
4.2	Determinación de micotoxinas	55
4.2.1	Curvas de calibración	55
4.2.2	Determinación de la capacidad toxicogénica de los aislamientos utilizados para inocular en campo.....	58
4.2.3	Determinación de tricotecenos B en los granos de trigo.....	60
4.2.4	Límite de cuantificación.	62
4.2.5	Confirmación por GC-MS.....	62
4.3	Análisis estadístico	66
4.3.1	Análisis de toxinas en muestras testigo.	66
4.3.2	Análisis de toxinas según el comportamiento varietal y tratamiento con fungicida....	67
4.3.3	Análisis de toxinas para cada una de las variedades.....	69
5	CONCLUSIONES	73
6	PERPECTIVAS FUTURAS.....	75
7	BIBLIOGRAFIA.....	76
8	ANEXOS	85



Índice de Figuras

Figura 1 Triángulo de la enfermedad	13
Figura 2 Ciclo de la Fusariosis de trigo (Reis & Carmona 2002)	16
Figura 3 Estructuras morfológicas encontradas en las especies de <i>Fusarium</i> (Leslie & Summerell 2006)	24
Figura 4 Estructuras morfológicas encontradas en las especies de <i>Fusarium</i> (Leslie & Summerell 2006)	25
Figura 5 <i>Fusarium graminearum</i> . A – D: Macroconidios. Barra de escala = 25 μ m. (Leslie y Summerell 2006).	26
Figura 6 Molécula de Tricoteceno.....	30
Figura 7 Tricotecenos Tipo A.....	30
Figura 8 Tricotecenos Tipo B.....	31
Figura 9 Esquema de la vía biosintética propuesta para la producción de tricotecenos en <i>Fusarium</i> spp. (McCormick et al., 2011).	37
Figura 10 Esquema del proceso de extracción.....	45
Figura 11 Esquema del proceso de purificación	47
Figura 12 Esquema del proceso de derivatización.....	49
Figura 13 Aislamiento <i>Fusarium graminearum</i> LP2A: Colonias en agar PDA (A) y reverso de placa (B). Macroconidios observados a microscopio 100X (C).....	54
Figura 14 Cromatogramas de los estándares.....	57
Figura 15 Cromatograma del aislamiento LP2A.....	59
Figura 16 Cromatograma del aislamiento LP12C.....	59
Figura 17 Cromatograma del aislamiento LP16D.....	59
Figura 18 Cromatograma del aislamiento LP17B.....	59
Figura 19 Cromatograma de la muestra Baguette P 11 Testigo	61
Figura 20 Cromatograma de la muestra SRM 2333 Inoculada con fungicida a las 72 horas.....	61
Figura 21 Cromatograma del estándar DON GCMS.....	63
Figura 22 Cromatograma del estándar 3-ADON GCMS	63
Figura 23 Cromatograma del estándar 15-ADON GCMS	63
Figura 24 Cromatograma GCMS Muestra Baguette P 11 Testigo.....	64
Figura 25 Cromatograma GCMS Muestra SRM 2333 Inoculada con fungicida a las 72 horas.....	65



Índice de Gráficos

Gráfico 1 Curva de calibración para NIV	55
Gráfico 2 Curva de calibración para DON.....	55
Gráfico 3 Curva de calibración para 3-ADON	56
Gráfico 4 Curva de calibración para 15-ADON	56
Gráfico 5 Producción de toxinas de las muestras testigo	67



Índice de Tablas

Tabla 1 Clasificación de <i>Fusarium</i> Según De Hoog et al., (2000) y Leslie y Summerell, (2006).	21
Tabla 2 Especies dentro del complejo <i>Fusarium graminearum</i>	27
Tabla 3 Tricotecenos Tipo A.	31
Tabla 4 Tricotecenos Tipo B.	32
Tabla 5 Variedades sembradas de trigo.	42
Tabla 6 Curvas de calibración de las toxinas.	56
Tabla 7 Tiempo de retención de las toxinas y del estándar interno (ACBP) por GC-ECD.	58
Tabla 8 Capacidad toxicogénica de los aislamientos.	58
Tabla 9 Capacidad toxicogénica de las muestras de granos de trigo.	60
Tabla 10 Medias de producción de toxinas de las muestras testigo.	66
Tabla 11 Medias del análisis factorial.	68
Tabla 12 Medias por variedad de cultivo de trigo.	69
Tabla 13 Medio de cultivo: Agar Afrecho.	85
Tabla 14 Medio de cultivo: SNA.	85
Tabla 15 Medio de cultivo: Agar Agua.	86
Tabla 16 Tiempo de retención y fragmentos de los iones más característicos de cada una de las micotoxinas por Cg-MS.	86

1 INTRODUCCION

1.1 Generalidades del cultivo de trigo.

El cultivo de trigo (*Triticum spp.*) fue uno de los primeros cultivos domesticados, y por más de 8000 años ha sido el alimento básico de las principales civilizaciones de Europa, Asia occidental y África del Norte. 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).

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* o *Triticum durum*: corresponde al trigo duro o candeal. Se destina fundamentalmente a la obtención de semolina para la fabricación de fideos y pastas.

El trigo (*Triticum aestivum* L.) es uno de los tres granos más ampliamente producidos globalmente, junto con el arroz y el maíz. 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, la cual superó los 150 millones de toneladas de producción anuales. La Argentina, por su parte, ocupa el puesto número 11 en el ranking mundial, con una producción record 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, 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 cantidad y calidad) debido a la severa incidencia de *Fusarium spp.*, hongo causante de la Fusariosis de la espiga del trigo. Especialmente en el cuadrante NE de la región pampeana, las fases de espigazón, floración e inicios

de llenado del grano coincidieron con la ocurrencia de periodos muy húmedos y templado-cálidos que favorecieron el desarrollo de *Fusarium* spp. (Anon 2013; Carmona 2012; Velazquez 2012).

1.2 Fusariosis de la espiga del trigo

La fusariosis de la espiga del trigo (FET) es una enfermedad fúngica causada por *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. poae*, *Microdochium nivale* var. *nivale* y *M. nivale* var. *majus* entre otros. En Argentina, es causada predominantemente por *Fusarium graminearum*, convirtiéndose así en una de las enfermedades que más afecta a la producción de trigo y otros cereales, con gran expansión a nivel mundial (Xu et al. 2008). Las pérdidas de rendimiento producidas por esta enfermedad pueden llegar al 50% en casos de epidemias severas, las cuales ocurren cuando se registran condiciones ambientales muy favorables y la siembra de variedades de trigo susceptibles. Con epidemias moderadas, pueden esperarse pérdidas entre un 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 en animales y en el hombre (Ramirez et al. 2004).

El desarrollo de la FET depende fundamentalmente de las condiciones ambientales durante el momento de la floración del cultivo, siendo frecuente en áreas trigueras húmedas (Bai & Shaner 1994). La intensidad de la enfermedad se incrementa con registros térmicos entre 20/30°C, la ocurrencia de precipitaciones, altos valores de humedad relativa del aire y períodos de mojado de larga duración (48 a 60 horas).

La FET es una enfermedad de naturaleza esporádica fuertemente asociada al componente ambiental para su expresión, permitiendo su modelado matemático. Es así que utilizando técnicas de regresión, se ajustaron modelos predictivos empíricos de la incidencia de la FET en base a variables meteorológicas (Moschini & Fortugno 1996). A través de un sistema con base meteorológica que combina elementos derivados del enfoque empírico y fundamental (estudios en ambiente controlado (Andersen 1948; Moschini et al. 2002)) estimaron satisfactoriamente la evolución del Índice de *Fusarium* (incidencia% x severidad%/ 100) a lo largo del período crítico del cultivo.

1.2.1 Factores predisponentes

En la naturaleza, el desarrollo de una enfermedad resulta de la interacción simultánea o sincrónica entre hospedante, patógeno y ambiente (De Wolf & Isard 2007). Estos tres componentes conforman el comúnmente llamado triángulo de la enfermedad como puede verse ejemplificado en la figura 1. Esta rígida estructura geométrica es demasiado simplista para describir las complejas interacciones entre estos tres elementos.

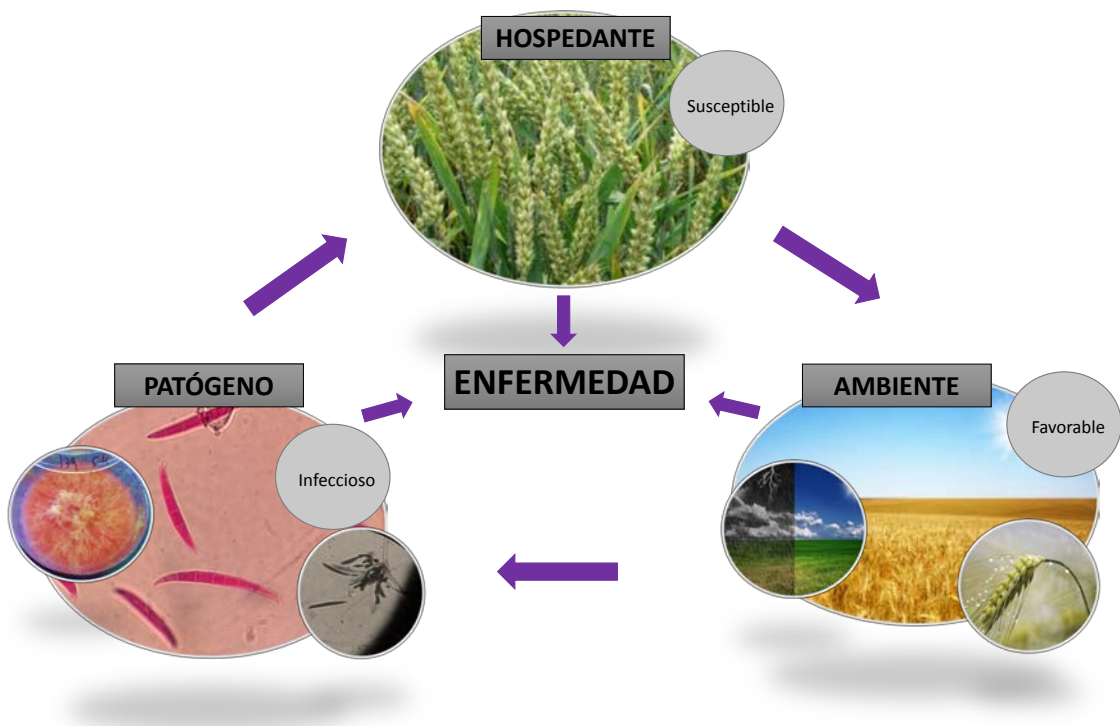


Figura 1 Triángulo de la enfermedad

La severidad 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 temperatura óptima para la infección se sitúa entre 20 y 30°C (Andersen 1948; Sutton, 1982). En ambiente controlado, no se logró infección inoculando con macroconidios (*G. zeae*) a temperaturas de 15 °C y duraciones de mojado de 18 a 72 horas (Andersen 1948). La intensidad de la FET se incrementó claramente a partir de temperaturas de 20 °C, con duraciones de mojado entre 48 a 72 horas. Más recientemente, (Martínez 2009) con ensayos en cámaras e inoculando con cepas de *F. graminearum* de la región pampeana, no observó expresión de síntomas a 9°C. Con temperaturas superiores a los 15°C se registró una respuesta

creciente en la intensidad de la FET ante incrementos de la duración de mojado (24 a 72 horas). También en ambiente controlado, se observó severidades de 68 % con duraciones de mojado superiores a las 35 horas y temperaturas de 25°C (Zoldan 2008). Estos autores observaron niveles bajos de enfermedad a 10°C, diferenciándose de Andersen (Andersen 1948). Se podría concluir que el hongo se estaría adaptando a temperaturas inferiores y que sería más agresivo.

1.2.2 Sintomatología y daños

La enfermedad se manifiesta en los órganos aéreos, especialmente en las espiguillas. *F. graminearum* coloniza los principales 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. Una vez depositadas sobre las anteras, las esporas germinan, penetran y colonizan la flor. Ésta puede ser totalmente destruida por lo que no habrá formación del grano. 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. Este es el síntoma más característico y el de más fácil reconocimiento.

En condiciones de tiempo cálido y húmedo se produce el desarrollo de los macroconidios, lo cual puede observarse en las espiguillas infectadas con 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 ser destruida desde una espiguilla hasta toda la espiga.

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. Los granos infectados crecen de manera deficiente, arrugados con una apariencia áspera debido al crecimiento superficial del micelio (Reis & Carmona 2002).

Cuando la infección de *F. graminearum* es fuerte, los granos dañados son cubiertos por el micelio del hongo y toman una apariencia de masa algodonosa de color rosa (Ireta & Gilchrist 1994). Si la severidad del ataque es moderada, los granos pueden quedar chupados y bajos de peso (chuzos), además de tomar una coloración blanquecina. Esta disminución del peso hectolítrico del grano afecta no sólo el rendimiento y sino también la calidad del grano por las micotoxinas asociadas, las cuales limitan la salud humana y animal.

1.2.3 Ciclo biológico de la enfermedad

La FET es una enfermedad floral y monocíclica. Como puede observarse en la figura 2, en su fase inicial, el hongo sobrevive entre las estaciones del cultivo como saprófito en residuos vegetales que quedaron en el 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 quedaron en el suelo después de la cosecha hasta el siguiente ciclo. 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, INIA (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 de inóculo anual. Las ascosporas (esporas sexuales) se liberan de los peritecios en condiciones favorables de temperatura ambiente de 12 a 34°C (preferentemente de 25°C) y a una humedad relativa mayor al 80% durante al menos 18 horas. Las ascosporas pueden ser dispersadas por cientos de kilómetros con el viento. Los conidios se producen en masas viscosas llamadas esporodoquios. Los conidios, sin embargo, 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 período entre la floración y el inicio del desarrollo del grano (alrededor de 10 - 20 días), las plantas de trigo son muy susceptibles a infección por *Fusarium* spp., especialmente durante el lapso con presencia de anteras expuestas. Las anteras fueron reportadas como el primer sitio de infección donde las esporas se depositan, germinan y colonizan las flores. Por lo tanto la infección puede darse desde el momento de antesis hasta la formación del grano.

Fusarium spp. no tiene estructuras especializadas de penetración a la célula huésped, el hongo entran por aberturas naturales o penetra directamente en las paredes de las células epidérmicas directamente con hifas cortas de infección. Las hifas de la germinación de esporas de *F. graminearum* utilizan diferentes caminos de infección en el trigo. La capacidad de los macroconidios a adherirse a y germinar en el tejido del huésped, presumiblemente, juega un papel crítico en la difusión localizada. Una vez dentro del tejido, *F. graminearum* es capaz de propagarse sistémicamente. El crecimiento de las hifas en la espiguilla infectada se extiende a lo largo de espiguillas adyacentes del raquis. La extensión de las hifas del patógeno tanto inter e intracelularmente en todo el parénquima y tejidos

vasculares del lema, gluma, ovario y raquis causa graves daños a los tejidos del huésped. Ocurre crecimiento subcuticular del hongo y el tejido, con el tiempo, se coloniza inter e intracelularmente. Se han observado dos estructuras de hifas morfológicamente distintas, hifas - subcuticular e hifas – bulbosas que producen la infección durante la invasión de las glumas del trigo.

En síntesis, la progresión de la infección se basa en la entrada del patógeno a través de las anteras expuestas, seguido por la penetración del ovario y de la infección sucesiva de las flores. Las hifas se desarrollan en las superficies exteriores de flores y glumas permitiendo al hongo crecer hacia los estomas y otros sitios sensibles. El hongo crece tanto inter e intracelularmente en el ovario y brácteas y se contagia de una espiguilla a la otra a lo largo del raquis. Finalmente, el crecimiento de las hifas del hongo durante las etapas posteriores de la infección es acompañado de una desintegración de los orgánulos de la célula huésped, junto con una degeneración del citoplasma y el posterior colapso de parénquima celular. Todos estos efectos drásticos resultan de la acción de las enzimas y las micotoxinas, que juegan un papel esencial en la patogenicidad fúngica. (Alconada Magliaro & Kikot 2013).

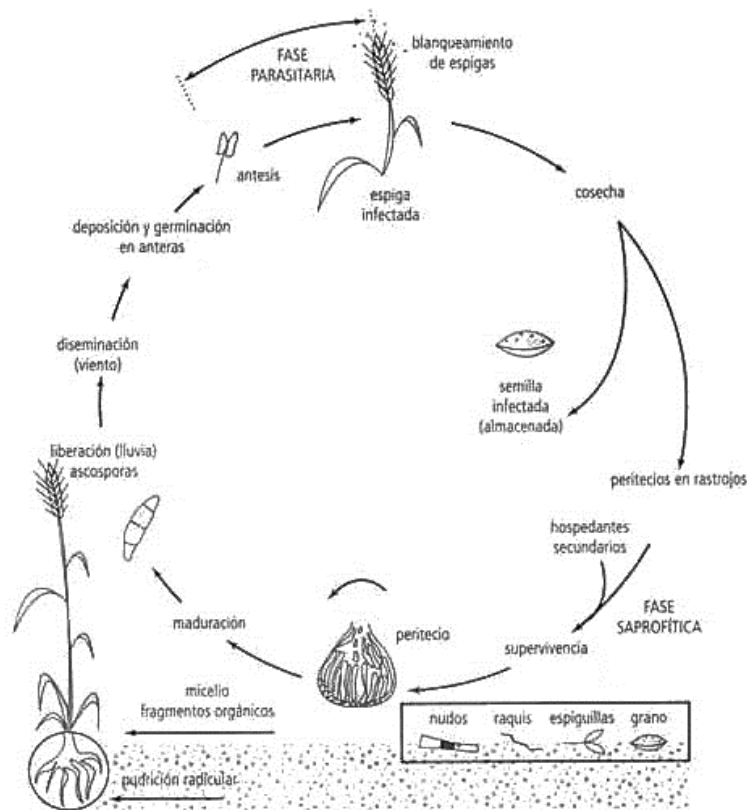


Figura 2 Ciclo de la Fusariosis de trigo (Reis & Carmona 2002)

1.2.4 Control integrado de la enfermedad

Los métodos de control están basados fundamentalmente en la reducción del inóculo inicial, impedir la dispersión del mismo y proteger las espigas cuando el inóculo esté presente (Parry et al. 1995). Con el fin de lograr estos objetivos, se emplean varias medidas de control que incluyen el uso de técnicas de control biológico, control cultural, cultivo de variedades resistentes y control químico por medio de fungicidas.

1.2.4.1 Control biológico

La estrategia de control biológico implica la aplicación de otros microorganismos, generalmente bacterias, a las espigas de las plantas para limitar la infección por *Fusarium* spp. y sus efectos adversos. Para ello se deben realizar muchos ensayos in Vitro para identificar microorganismos agresivos que puedan competir o ser antagonistas de *Fusarium* spp. y para analizar el momento óptimo de la aplicación en el cultivo. Asimismo es necesario efectuar rigurosas pruebas en campo para asegurar la eficacia del agente y la supresión del desarrollo de la enfermedad y la producción de micotoxinas (Leonard & Bushnell 2003).

1.2.4.2 Control cultural

En la mayoría de las regiones, epidemias de las FET son originadas por inóculo (en su mayoría ascosporas) presentes en los residuos de cultivos anteriores que quedaron en el suelo. Cualquier medida que reduzca este residuo de la cosecha colonizada también reducirá el potencial de inóculo del patógeno. El arado y /o la combustión pueden reducir significativamente la cantidad de residuo infectado en el campo. Sin embargo, estas prácticas tienen inconvenientes, como por ejemplo, el arado puede dejar al descubierto la superficie del suelo generando una mayor erosión y pérdida de humedad del mismo. A su vez, el arado es una práctica costosa que consume mucho tiempo y energía. Por otra parte, la quema de los campos conlleva la contaminación ambiental (Parry et al. 1995). Otra práctica de control es la rotación de cultivos, con otros cultivos que no son afines a *Fusarium graminearum* (por ejemplo, soja, girasol, canola). La fusariosis no se controla eficazmente con la rotación de cultivos por la amplia gama de hospedantes y la alta diseminación anemófila. Para complementar un control eficiente es necesario, también, eliminar las malezas hospedantes y las plantas cultivadas susceptibles durante el verano, disminuyendo los restos culturales, y en consecuencia la cantidad del inóculo (Reis & Carmona 2002).

1.2.4.3 Cultivo de variedades resistentes

La complejidad de la FET y su amenaza multifacética, imponen el uso de múltiples e integradas estrategias de manejo de la enfermedad. La utilización de cultivares de trigo resistentes es crucial para reducir daños de 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 inoculo y la rotación de cultivo. El cultivar de origen chino Sumai 3 y sus derivados proveen actualmente el máximo grado de resistencia tipo II (menor velocidad de invasión). A la fecha no están disponibles cultivares de trigo altamente resistentes a la enfermedad o tolerantes a las micotoxinas (Goswami & Kistler 2004). Este hecho se explica en la complejidad de la herencia de la resistencia, la pobre aptitud agronómica y la baja calidad de las principales fuentes de resistencia (Villar de Galich 2002). En 1929, Christensen, declaró que "el único método eficaz para controlar la fusariosis de trigo es cultivar variedades resistentes" (Christensen et al. 1929) . No ha cambiado mucho desde entonces.

1.2.4.4 Control químico

El uso de fungicidas para controlar esta enfermedad muchas veces es poco factible debido a que resulta difícil proteger un campo de trigo que no presenta una emergencia simultánea de las espigas, y donde la floración ocurre en forma escalonada. Los fungicidas pueden ser útiles cuando las condiciones meteorológicas u otras asociadas a prácticas de cultivo son particularmente favorables para el desarrollo epidémico (Bai & Shaner 2004). Los fungicidas aplicados en antesis pueden ayudar a prevenir pérdidas económicas pero su eficacia depende del momento de aplicación y tecnología para lograr una buena cobertura de la espiga (Del Ponte et al. 2004).

Algunos fungicidas disponibles en el mercado tienen una eficiencia de control cercana al 90% en condiciones de invernáculo, pero a campo difícilmente supera el 60%. Los principios activos pertenecen a los grupos de los triazoles (metconazole, tebuconazole, flutriafol), imidazoles (prochloraz), bencimidazoles (carbendazim, benomil, tiabendazole, m-tiofanato) y sus mezclas (epoxiconazole más carbendazim, difenoconazole más propiconazole más carbendazim). La menor eficacia del control químico a campo radica en la dificultad para alcanzar la totalidad de las anteras con la aspersion debido a la estructura de la espiga, a la variación del inicio de la antesis en el cultivo y a las técnicas de aplicación (Villar de Galich 2002). En estudios realizados en condiciones de laboratorio, se determinó que existe una interacción entre el aislamiento involucrado (cepa fúngica), las condiciones ambientales, el fungicida y la dosis, que determina variaciones en los contenidos de DON (deoxinivalenol) en el grano (Ramirez et al. 2004).

Existen una serie de trabajos que muestran que las dosis sub-letales de fungicida incrementan la producción de DON (Ramírez et al., 2004). En este sentido, se realizaron ensayos en donde se aplicaron diferentes fungicidas y se evaluaron los cambios en la población de hongos que provocan la FET. Como resultado se encontró que las aplicaciones de azoxystrobin (estrobirulina) fueron efectivas en el control de *Microdochium* spp., pero no controlaron satisfactoriamente *Fusarium* spp., mientras que tebuconazol mostró un efecto contrario. Esto podría explicar por qué las aplicaciones de azoxystrobin aumentaron los niveles de toxinas, ya que pueden eliminar las poblaciones de hongos no toxicogénicos y dar espacio para el desarrollo de los toxicogénicos (Simpson et al. 2001).

1.2.4.5 Modelos de predicción

Como consecuencia de la ocurrencia esporádica de la FET y la variabilidad en las condiciones ambientales favorables para la ocurrencia de la enfermedad, se desarrollaron/validaron sistemas predictivos de la enfermedad, como una herramienta auxiliar para la decisión del control químico. Se definieron dos enfoques para construir estos sistemas de pronóstico basados en el ambiente: fundamental y fundamental-empírico (Moschini et al. 2013). En el enfoque fundamental o inductivo, utiliza información generada en laboratorio, en cámaras con ambiente controlado, invernáculos o campo y se evalúa el efecto de la temperatura y de la duración de mojado sobre la infección. El enfoque empírico o deductivo, por su parte, surge del análisis de datos históricos de registros de enfermedad y condiciones ambientales de un sitio dado (Krause & Massie 1975).

Bajo el enfoque empírico, en Pergamino se pudieron identificar los factores hídricos y térmicos asociados con la incidencia de la FET (porcentaje de espigas afectadas), cuantificando esta relación a través de un modelo bivariado (Moschini & Fortugno 1996). La variable hídrica del modelo simula la duración de mojado de la espiga combinando, en períodos de dos días, la ocurrencia de precipitación y altos registros de humedad relativa. González Montaner explicó que en el sur de la región pampeana decisiones de manejo sanitario del trigo son tomadas al verificarse al menos dos períodos hídricos definidos por el modelo desarrollado en Pergamino, complementado con valores promedio de humedad relativa, en los 10 días previos a antesis, superior a 70% y 80% para trigo candeal y pan respectivamente (González Montaner 2004). Igualmente en Uruguay se consideró el criterio de no aplicación de fungicidas hasta que ocurran dos eventos infectivos (períodos hídricos definidos por el modelo), evitando el control químico en 22 de las 28 fechas de floración analizadas (Mazzilli et al. 2011). Recientemente el modelo predictivo empírico (Moschini & Fortugno 1996) fue validado, junto a 8 modelos desarrollados a nivel mundial, bajo las condiciones de cultivo de Quebec (Canadá) (Giroux et al. 2016). El trabajo concluye que dos modelos de Estados Unidos y el desarrollado en

Argentina fueron los más confiables, pudiéndose integrar a un sistema de toma de decisión respecto a la aplicación de fungicida. Sobre la base del modelo empírico, se desarrolló y validó un sistema de pronóstico fundamental-empírico (Moschini et al. 2002; Moschini et al. 2016) para estimar el índice de *Fusarium* ($\text{IndF\%} = \text{Incidencia\%} * \text{Severidad\%/100}$), pudiendo cuantificar la evolución diaria del proceso múltiple de infección (evento por evento). Este modelo fue el primero en ser incorporado a un nuevo sistema de información de alerta de enfermedades (<http://agrometeorologia.inta.gob.ar/modeloenfermedad/>), desarrollado en el Instituto de Clima y Agua a partir de la campaña 2015/16.

1.3 Género *Fusarium*

Desde que fuera descrito por primera vez por Link en 1809, la importancia del género *Fusarium* como agente causal de diversas enfermedades en un amplio número de cultivos de importancia económica ha hecho de éste un género ampliamente estudiado. Distintas escuelas taxonómicas han prevalecido a lo largo de los años y el concepto de especie dentro del género ha variado enormemente entre criterios amplios y estrechos. Como consecuencia, la historia de la sistemática del género (y de *F. graminearum* como una de sus especies más importantes) resulta compleja. La mayor parte de la investigación temprana en el género *Fusarium* se enfocó en el diagnóstico y la identificación de las especies causantes de enfermedades en las plantas utilizando como principal carácter la forma de sus conidios descrita por Link, especies de forma hialina, con esporas no septadas que nacían en un estroma con forma de canoa o banana. En poco tiempo, más de 1.000 especies habían sido identificadas y caracterizadas dentro del género (Leslie & Summerell 2006).

El primer intento de organizar y ordenar a las especies de *Fusarium* spp. tuvo lugar en 1935 con la publicación del trabajo de Wollenweber y Reinking (sobre la taxonomía del género, el cual constituyó el material de referencia más importante para los trabajos subsiguientes. Los autores reformularon las más de 1.000 especies reconocidas hasta ese momento sobre la base de caracteres morfofisiológicos (fundamentalmente aquellos relacionados con la producción, forma y tamaño de las esporas), reduciéndolas a 65 y ubicándolas dentro de 16 secciones. Durante las décadas de 1940 y 1950, Snyder y Hansen publicaron cuatro artículos en los que reconfiguraron la taxonomía del género, reduciendo el número de especies a 9. Dentro de los cambios más importantes implementados, 4 de las 16 secciones definidas por Wollenweber y Reinking fueron reducidas a una única especie, *F. roseum*, dentro de la cual se ubicó a *F. graminearum*. El uso y los estudios

posteriores de esta clasificación permitieron concluir que esta reducción no podía ser justificada y debía abandonarse (Nelson 1991). Sin embargo, las bases establecidas en los trabajos de Snyder y Hansen persistieron por casi 50 años, derivaron en grandes pérdidas de información y ocasionaron que los resultados obtenidos durante esos años resultasen difíciles de evaluar e interpretar *a posteriori*. A pesar de ello, algunos de los aportes realizados por los autores, como la importancia de los aislamientos monospóricos en la correcta identificación de las especies o la amplia variabilidad intra-específica presente en el género (incluso entre sub-cultivos pertenecientes a un único aislamiento monospórico), mantienen su vigencia. Durante la década del 1970 y principios de 1980, los trabajos de Wollenweber y Reinking fueron retomados por un gran número de autores, derivando en la obtención de una serie de esquemas de clasificación que intentaron arrojar luz sobre la complejidad del género (Nelson et al. 1983).

1.3.1 Clasificación de especies dentro del género *Fusarium*

Fusarium spp. se encuentra dentro de la división Ascomycota (tabla 1). Según la clasificación de Nelson, et al., 1994 el género *Fusarium* comprende 70 especies, que a su vez están agrupadas en 12 secciones. Cada sección es un conjunto de especies relacionadas entre sí. Más de la mitad de las especies son parásitas de plantas y entre ellas se encuentran algunos de los más serios patógenos del mundo agrícola (Leslie & Summerell 2006; Nelson et al. 1994).

División:	Ascomycota
Subdivisión:	Pezizomycotina
Clase	Sordariomycetes
Subclase	Hypocreomycetidae
Orden:	Hypocreales
Familia:	Hypocreaceae
Genero	<i>Fusarium</i>

Tabla 1 Clasificación de *Fusarium* Según De Hoog et al., (2000) y Leslie y Summerell, (2006).

Dentro del género *Fusarium* existen especies que presentan formas con reproducción sexual conocida, como *F. solani*, y otras, como *F. oxysporum*, en las que no se conoce fase sexual. Este hecho dificulta la clasificación, ya que, tradicionalmente las formas sexuales de una especie se han incluido en un grupo diferente y con un nombre distinto de las que presentan las formas sin reproducción sexual. Diferentes teleomorfos se han asociado con las especies de *Fusarium*, la mayoría de los teleomorfos son miembros de los Hypocreales, ubicados en la clase Ascomycetes. Tres teleomorfos se relacionan con los anamorfos del género *Fusarium*: *Gibberella*, *Haematonectria* y *Albonectria*. *Gibberella* es el género más comúnmente asociado a la mayoría de las especies de *Fusarium* e incluye a los patógenos de plantas como *Gibberella zeae* (*F. graminearum*), *G. moniliformis* (*F. verticillioides*) y otras especies incluidas en el complejo *G. fujikuroi*. El género *Haematonectria* incluye *H. haematococca* (*F. solani*), de distribución cosmopolita, patógeno de plantas de importancia económica tales como porotos, cítricos, soja, maní, pimienta, papa, calabaza. El género *Albonectria* se asocia con un número pequeño de especies de *Fusarium*, entre ellas la más importante es *F. decemcellulare*, patógeno en regiones tropicales y subtropicales asociado a canchros de varias especies de frutales, tales como cacao, aguacate, mango y guaraná (Leslie & Summerell 2006).

En la actualidad, a pesar de que la mayor parte de las especies continúan siendo descritas a partir de conceptos morfo-fisiológicos, la aplicación del concepto biológico y filogenético de especie dentro del género *Fusarium* ha ganado relevancia.

1.3.2 Características morfológicas de las especies del género *Fusarium*.

Las características morfológicas son el criterio más comúnmente utilizado para la identificación de las especies de *Fusarium*. El crecimiento de cultivos monospóricos en medios apropiados permite la observación de tres tipos de esporas llamadas macroconidios, microconidios y clamidosporas como puede observarse en las figuras 3 y 4. Algunas especies producen los tres tipos de esporas, mientras que otras especies no lo hacen.

Características morfológicas de la especie según (Nelson et al. 1983; Leslie & Summerell 2006):

- Macroconidios: Es el órgano principal para la caracterización no sólo de la especie, sino también del género *Fusarium*; su forma y tamaño varía según la especie. Este se puede formar en una estructura especializada llamada esporodoquio, como también en monofialides, polifialides y en el micelio aéreo. Para algunas especies es una característica relativamente constante y estable, pero se debe usar cautelosamente como criterio

taxonómico. La presencia de una célula basal con forma de pie en los macroconidios se considera característica del género *Fusarium*, pero varios géneros de *Coelomycetes* también la tienen.

- **Microconidios:** La presencia o ausencia de los microconidios es una característica principal en la taxonomía de *Fusarium* spp. Si el microconidio está presente, las características consideradas son: forma, modo de formación, si está solo, en falsas cabezas, en cabezas o en cadenas. Estos se forman en el micelio aéreo a partir de monofiálides o polifiálides pero no en el esporodoquio. Se pueden ver aislados, en masas o en cadenas.
- **Clamidosporas:** La presencia o ausencia de clamidosporas también es una característica principal en la taxonomía de *Fusarium* spp. Si están presentes, pueden estar solas, en pares, en grupos, o en cadenas. Su pared puede ser gruesa, rugosa o lisa. Son esporas de supervivencia ante ambientes adversos que garantizan la propagación y supervivencia del hongo.
- **Conidióforos:** Contienen el microconidio. Son de carácter taxonómico primario y dependiendo de la especie, se pueden encontrar en monofiálides o contener monofiálides y polifiálides reduciendo microconidios. .
- **Esporodoquios:** Son masas de conidióforos cortos y estrechamente ramificados que nacen directamente de una maraña de hifas. Se producen más frecuentemente en la naturaleza que en los cultivos de laboratorio.



Figura 3 Estructuras morfológicas encontradas en las especies de *Fusarium* (Leslie & Summerell 2006)

En la figura 3 puede observarse: Morfología de macroconidios (A-D): A: macroconidio típico, con célula apical a la izquierda y célula basal a la derecha. B: *F. avenaceum*; C: *F. equiseti* y D: *F. crookwellense*. Formas de la célula apical de los macroconidios (E-H): E: *F. culmorum*; F: *F. sambucinum*; G: *F. lateritium*; H: *F. equiseti*. Formas de la célula basal de los macroconidios (I-L): I: *F. crookwellense*; J: *F. longipes*; K: *F. avenaceum*; L: *F. solani*. Formas de los microconidios (M-T): M: Ovalado; N: Biseptado; O: con tres septos; P: Reniforme; Q: ovoide con base truncada; R: Piriforme; S: Napiforme; T: Globoso. Formas de la fiálide (U-X): Monofiálide de *F. solani* (U) y de *F. oxysporum* (V) y Polifiálides de *F. polyphialidicum* (W) y de *F. semitectum* (X) que portan mesoconidios. Microconidios en cadenas cortas (Y) en *F. nygamai* y de cadenas largas (Z) en *F. verticillioides*. (Leslie & Summerell 2006).

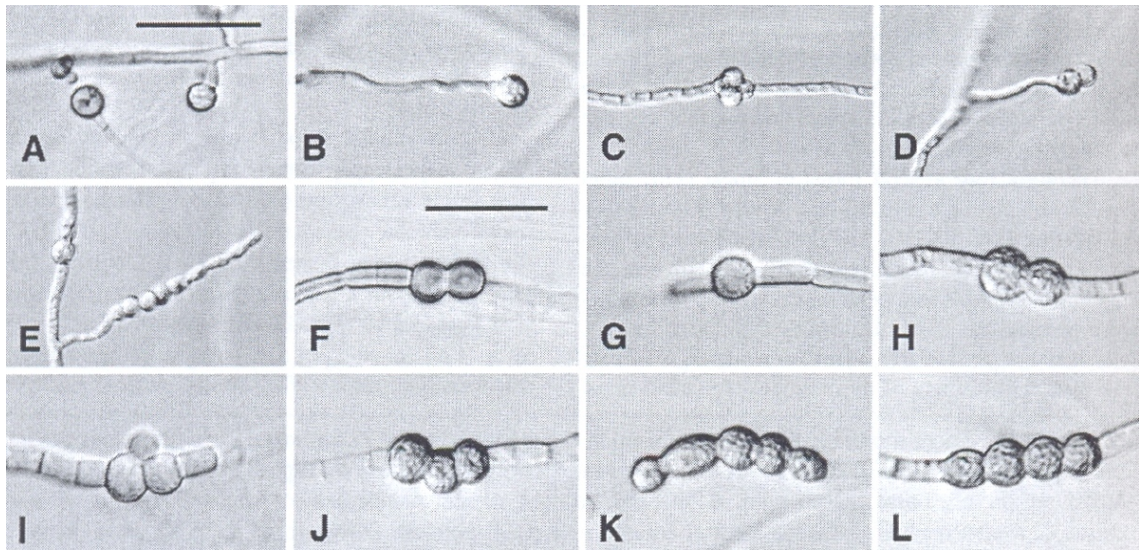


Figura 4 Estructuras morfológicas encontradas en las especies de *Fusarium* (Leslie & Summerell 2006)

En la figura 4 se observan clamidosporas de especies de *Fusarium*: con disposición solitaria y de paredes rugosas se encuentran en *F. solani* (A y B) y *F. scirpi* (G). En racimos y de paredes gruesas en *F. compactum* (C y D) y de paredes lisas en *F. scirpi* (I). Se encuentran de a pares en *F. solani* (F) con pared lisa y con pared rugosa en *F. compactum*. Por último, se encuentran formando cadenas en *F. compactum* (E, J y L) y en *F. scirpi* (K). Escala: A-E 50 μm ; F-L 25 μm . (Leslie & Summerell 2006).

1.3.3 Características morfológicas: *Fusarium graminearum* Schwabe

Fusarium graminearum Schwabe (Teleomorfo *Gibberella zeae*) es una especie cosmopolita y presenta una amplia gama de hospedantes. Se encuentra principalmente en cultivos de: trigo, cebada, avena, centeno, maíz, trébol, alfalfa, batata y arroz. Esta especie, como puede observarse en la figura 5, presenta las siguientes características (Leslie & Summerell 2006):

- Macroconidios: son relativamente delgados en forma de hoz de 2,5 x 35-63 μm , puede contener entre 5 a 6 septos, se caracterizan por presentar una célula apical en forma de cono y una célula basal con forma de pie.
- Microconidios: están ausentes.
- Clamidosporas: su formación varia, son globosas, midiendo entre 10 a 12 μm de diámetro, pueden ser simples o en cadena.
- Esporodocios: escasos, pero si están presentes son de color naranja pálido y pueden estar ocultos bajo el micelio.

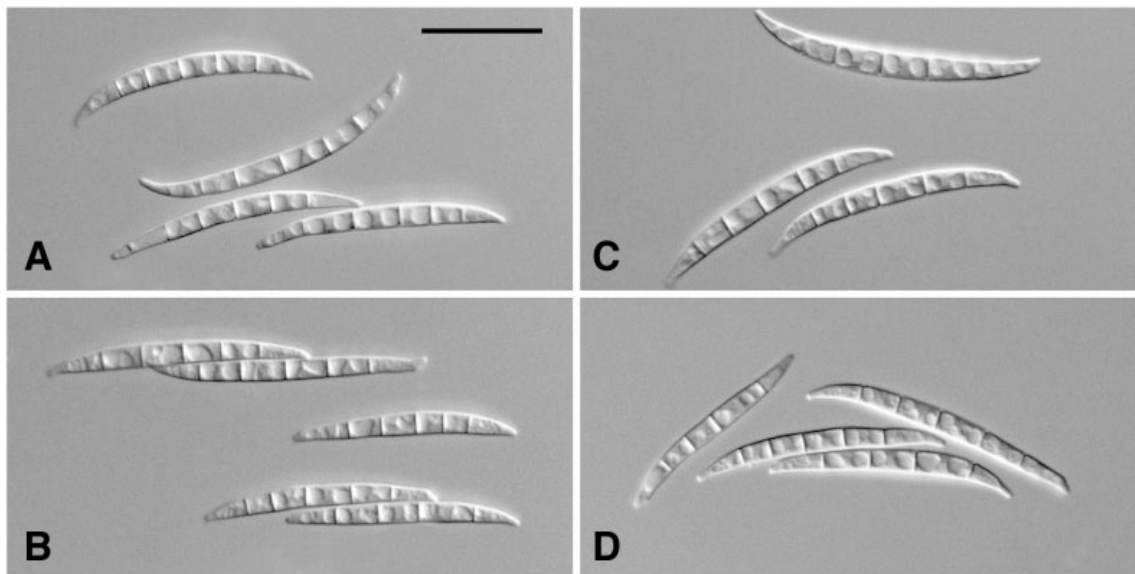


Figura 5 *Fusarium graminearum*. A – D: Macroconidios. Barra de escala = 25 μ m. (Leslie y Summerell 2006).

1.3.4 Complejo *Fusarium graminearum* (Complejo FGSC).

El concepto morfológico y biológico de especie se ha utilizado tradicionalmente para asignar la especie a aislamientos de *Fusarium*. Actualmente, *Fusarium graminearum* es considerado un complejo (FGSC) formado por al menos 15 especies de *Fusarium* filogenéticamente definidas, basadas en las secuencias de ADN de 12 genes. Las especies dentro del complejo se observan en la tabla 2.

Especie	Linaje	Autores de la especie
<i>Fusarium brasiliicum</i>	No posee	Aoki, Kistler, Geiser y O'Donnell
<i>Fusarium austroamericanum</i>	1	Aoki, Kistler, Geiser y O'Donnell
<i>Fusarium meridionale</i>	2	Aoki, Kistler, Geiser y O'Donnell
<i>Fusarium boothii</i>	3	O'Donnell, Aoki, Kistler y Geiser
<i>Fusarium mesoamericanum</i>	4	Aoki, Kistler, Geiser y O'Donnell
<i>Fusarium acacia-mearnsii</i>	5	O'Donnell, Aoki, Kistler y Geiser
<i>Fusarium asiaticum</i>	6	O'Donnell, Aoki, Kistler y Geiser
<i>Fusarium graminearum</i>	7	Schwabe
<i>Fusarium cortaderiae</i>	8	O'Donnell, Aoki, Kistler y Geiser
<i>Fusarium vorosii</i>	No posee	Tóth, Starkey, O'Donnell, Suga y Aoki
<i>Fusarium gerlachii</i>	No posee	Aoki, Starkey, Gale, Kistler y O'Donnell
<i>Fusarium aethiopicum</i>	No posee	O'Donnell et al. 2008
<i>Fusarium ussurianum</i>	No posee	Yli-Mattila et al. 2009
<i>Fusarium louisianense</i>	No posee	Sarver et al. 2011
<i>Fusarium nepalense</i>	9	Sarver et al. 2011

Tabla 2 Especies dentro del complejo *Fusarium graminearum*.

1.3.5 Genotipo y quimiotipo de *Fusarium graminearum*.

Ambos el genotipo y quimiotipo de *F. graminearum* se han utilizado para caracterizar la especie por su potencial toxigénico. Un genotipo es una secuencia de ADN o una constitución genética y un quimiotipo es la caracterización de un aislamiento de acuerdo al patrón de producción de metabolitos secundarios determinado por métodos químicos. El término quimiotipo debe ser usado solo cuando el fenotipo químico se expresa y es detectado por análisis químicos, porque la detección

de un dado genotipo de tricotecenos no siempre predice correctamente la presencia de los correspondientes metabolitos (Desjardins 2008).

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

De acuerdo a la producción de tricotecenos tipo B *Fusarium graminearum* puede clasificarse en dos quimiotipos: quimiotipo I, donde las cepas producen DON y sus acetyl derivados: 3-acetildeoxinivalenol (3-ADON) y 15-acetildeoxinivalenol (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 quimiotipo: **quimiotipo DON** para aislamientos que producen DON y 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 (DON y acetyl-derivados) (Alvarez et al. 2009).

1.4 Micotoxinas

Como ya hemos visto anteriormente, la severidad de la fusariosis depende de factores climáticos, agronómicos y genéticos. Lluvias frecuentes, alta humedad y rocío prolongado, coincidentes con la floración y llenado de grano favorecen la infección y desarrollo de la enfermedad. Como resultado se obtienen rendimientos bajos en grano y se producen micotoxinas, principalmente tricotecenos (Fernández Pinto et al. 2013).

Según una definición de Pitt (1996), las micotoxinas son "metabolitos fúngicos cuya ingestión, inhalación o absorción cutánea reduce la actividad, hace enfermar o causa la muerte de animales (sin excluir las aves) y personas". El término micotoxinas, deriva de las palabras griegas *mikes* y *toxina*, que significan hongo y veneno respectivamente. Las micotoxinas son un grupo de metabolitos de los hongos filamentosos de peso molecular relativamente bajo, que pueden contaminar los alimentos para hombres y animales, en los cuales, los hongos han crecido en algún momento del ciclo de cultivo-almacenamiento hasta llegar al consumidor (Moss 1989).

Las micotoxinas son objeto de interés mundial debido a las importantes pérdidas económicas que generan, sus efectos sobre la salud de las personas, la productividad de los animales y el comercio nacional e internacional. Por ejemplo, se ha calculado, que en los Estados Unidos de América y el Canadá, las pérdidas anuales debidas a los efectos de las micotoxinas en las industrias forrajeras y ganaderas son del orden de 5 000 millones de dólares. En los países en desarrollo, donde los alimentos básicos (como el maíz y el maní) son susceptibles de contaminación, la población está expuesta a verse significativamente afectada por la morbilidad y las muertes prematuras relacionadas con las micotoxinas (FAO 2007).

Desde que el hombre comenzó a cultivar plantas de forma organizada, las micotoxinas han ocasionado enfermedades. La exposición a micotoxinas puede producir toxicidad tanto aguda como crónica, con resultados que van desde la muerte a efectos nocivos en los sistemas: nervioso central, cardiovascular y respiratorio y en el aparato digestivo. Las micotoxinas pueden también ser agentes cancerígenos, mutágenos, teratógenos e inmunodepresores. Actualmente está muy extendida la opinión de que el efecto más importante de las micotoxinas, particularmente en los países en desarrollo, es la capacidad de algunas micotoxinas de obstaculizar la respuesta inmunitaria y, por consiguiente, de reducir la resistencia a enfermedades infecciosas.

Los géneros fúngicos frecuentemente asociados a la producción de micotoxinas son *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, siendo los metabolitos de mayor importancia producidos por estos microorganismos las mencionadas aflatoxinas, las ocratoxinas, la patulina, los tricotecenos, la zearalenona (ZEA) y las fumonisinas (Moss 1998).

1.4.1 Micotoxinas producidas por la Fusariosis de la espiga del trigo

Los tricotecenos son una familia de micotoxinas producidas por diferentes especies del género *Fusarium*. Son de la familia de los sesquiterpenos y se han aislado y caracterizado hasta el momento más de 200 tricotecenos (Fernández Pinto et al. 2013). Biológicamente activos, de bajo peso molecular y de elevada termoestabilidad, son tóxicos potentes de las células eucarióticas y causan lesiones dérmicas, alteraciones de la respuesta inmunológica e inhibición de la síntesis de macromoléculas, con acción letal en dosis altas (Desjardins et al. 1993). No se degradan en el procesamiento normal de alimentos y son estables a temperatura ambiente (Eriksen 2003).

Desde el punto de vista químico, estos terpenos contienen carbono, hidrógeno y oxígeno y poseen un esqueleto tetracíclico. Los tricotecenos naturales tienen un doble enlace en la posición 9, 10 y un grupo epóxido entre los carbonos 12 y 13 (Figura 6). El anillo 12, 13 epoxi es requerido para la

actividad y el número y posición del grupo hidroxilo y el número, posición y tipo de esterificación pueden afectar si los tricotecenos inhiben la síntesis de proteínas (Fernández Pinto et al. 2013).

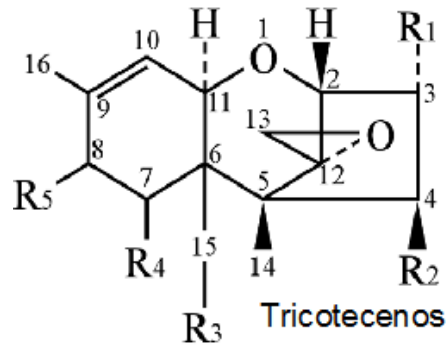


Figura 6 Molécula de Tricoteceno

Este grupo de toxinas se puede dividir en cuatro subgrupos (A, B, C y D) según su estructura química. Los del tipo A, pueden ser diferenciados en base a la sustitución del C-8 (Figura 7) por un hidrógeno, un hidroxilo o una función éster. Este es el tipo más grande e incluye toxinas como: toxina T-2, toxina HT-2, diacetoxiscirpenol (DAS) y neosolaniol (NEO), como puede observarse en la tabla 3. Se encuentran sobre todo, en cereales y derivados contaminados por cepas del genero *Fusarium*, principalmente *F. sporotrichioides*, *F. equiseti* y *F. poae*.

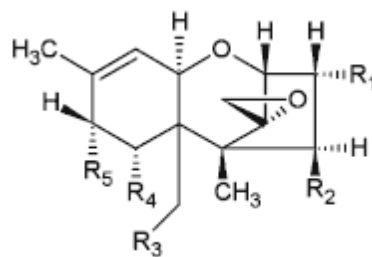


Figura 7 Tricotecenos Tipo A

Toxina	Abreviación	R1	R2	R3	R4	R5
--------	-------------	----	----	----	----	----

Neosolaniol	NEO	OH	OAc	OAc	H	OH
Diacetoxiscirpenol	DAS	OH	OAc	OAc	H	H
T-2	T-2	OH	OAc	OAc	H	Olval
HT-2	HT-2	OH	OH	OAc	H	Olval
T-2 triol	-	OH	OH	OH	H	Olval
T-2 tetraol	-	OH	OH	OH	H	OH

OAc: O-acetil Olval: O-isovaleril

Tabla 3 Tricotecenos Tipo A.

Los tricotecenos del tipo B contiene una función carbonilo en el carbono 8 (Figura 8) e incluye tricotecenos como deoxinivalenol (DON), sus acetil derivados como 3-acetildeoxinivalenol (3-ADON), 15-acetildeoxinivalenol (15-ADON), nivalenol (NIV), y fusarenona X, como pueden observarse en la tabla 4. Son producidos por cepas del genero *Fusarium*, principalmente *F. graminearum*, *F. culmorum* y *F. crookwellense* (Fernández Pinto et al. 2013).

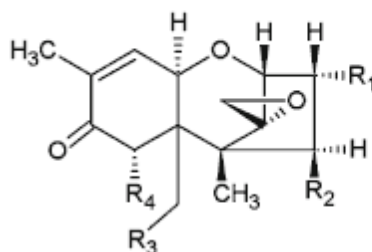


Figura 8 Tricotecenos Tipo B

Toxina	Abreviación	R1	R2	R3	R4
Nivalenol	Niv	OH	OH	OH	OH
Deoxinivalenol	DON	OH	H	OH	OH
3-acetil-DON	3-ADON	OAc	H	OH	OH
15-acetil-DON	15-ADON	OH	H	OAc	OH
Fusarenona X	FUS-X	OH	OAc	OH	OH

OAc: O-acetil

Tabla 4 Tricotecenos Tipo B.

La tercera categoría tipo C posee un grupo funcional epóxido entre los carbonos 7, 8 o 9, 10. Generalmente son producidos por los géneros *Acremonium* y *Tricothecium*. La cuarta categoría o tipo D contienen un anillo macrocíclico entre el carbono 4 y 15 con dos acoplamiento éster, y son producidos por hongos del género *Myrothecium*, *Stachybotrys* y *Tricothecium* (Desjardins 2008).

1.4.2 Propiedades toxicológicas producidas por los tricotecenos tipo B.

La identificación química de los metabolitos secundarios del género *Fusarium* ha mostrado gran variabilidad en el potencial toxicogénico. El potencial toxicogénico se refiere a la habilidad de una cepa para producir determinadas toxinas. Dicha capacidad está dada por el crecimiento de la cepa bajo condiciones conocidas de cultivo que permitan la formación de cada micotoxina. La variabilidad que presentan diferentes cepas de una misma especie tiene graves implicancias toxicológicas (Miller 1991). A los tricotecenos se les han reconocido propiedades biológicas muy amplias, ya que poseen efectos antifúngicos, antibacterianos, antivirales, fitotóxicos, e incluso actividad citostática e insecticida (Pacin 1988). Son sustancias con una potente acción irritativa local (Bhavanishankar et al. 1988; Ueno & Hsieh 1985). Son embriotóxicos en ratas, ratones y cerdos (Khera et al. 1982; Morrissey et al. 1985; Morrissey ' & Vesonder2 1985). La irritación severa de la piel y mucosa puede llegar a producir úlceras. Las alteraciones neurológicas del sistema nervioso central son responsables del rechazo al alimento en algunas especies y de la desorientación del vuelo de las aves.

Existen manifestaciones de la actividad tóxica de los tricotecenos como: a) Inhibición de la biosíntesis proteica, que se expresa especialmente en los tejidos de rápido recambio celular, debido a la inhibición de la peptil-transferasa, que impide la incorporación de aminoácidos al comienzo o al final de la cadena proteica (Osweiler et al. 1993; Pacin 1991); b) la inhibición de la producción de energía, afectando el funcionamiento de las membranas celulares (Pacin 1991) y c) la inhibición en la síntesis de monoaminooxidasa, actuando sobre el metabolismo de las aminas biógenas del cerebro ocasionando diversos trastornos neurológicos (Wang et al. 1993; Prelusky et al. 1992; Sirkka et al. 1992; Pacin 1991). Probablemente las manifestaciones más evidentes son en el sistema hemopoyético y linfático, las cuales adquieren distinta gravedad según la toxina y el tiempo de exposición a la misma. De las micotoxinas estudiadas, los tricotecenos son los que presentan mayor efecto. Además producen diátesis hemorrágica y aplasia medular en casos severos. En los animales de producción es frecuente que se observen alteraciones hepáticas, pero es necesario tener en cuenta que cuando se está frente a un brote epidémico, existe una elevada probabilidad que la intoxicación sea producida por más de una micotoxina (Joffe & John Wiley & Sons 1986; Committee on Protection against Mycotoxins 1983; Ueno & Hsieh 1985).

La Agencia Internacional de Investigación en cáncer (International Agency for Research on Cancer, IARC) en función de la limitada información disponible para seres humanos y animales, determinó que los tricotecenos DON, NIV, toxina T-2 y FUS X no pueden ser clasificados como cancerígenos para el hombre por lo que fueron asignados al grupo 3, en la categoría de “evidencias de carcinogenicidad insuficiente” en animales (Castegnaro & McGregor 1998). El efecto causado por los tricotecenos se debe al consumo por vía oral de los mismos. Pruebas in vivo con cerdos alimentados con trigo contaminado con DON mostraron reducción en la ganancia de peso, combinado con T-2 se observó antagonismo. En cambio, estudios con pollos mostraron un efecto aditivo en la ganancia de peso. Estos resultados indican la necesidad de más estudios relacionados con los efectos combinados de las toxinas. La Comisión Europea determinó las Tasas de consumo diario para las toxinas en 1µg para DON, 0.7µg para NIV y 0.06µg para T-2 y HT-2 por kg de peso corporal.

El deoxinivalenol (12,13-epoxy-3 α ,7 β ,15-trihidroxitricoteo-9-ene-8-ona; DON también conocido como vomitoxina) es la micotoxina producida mayormente por los hongos *Fusarium graminearum* y *F. culmorum*. La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera al DON como una toxina teratogénica, neurotóxica e inmunosupresora. El DON tiene un Peso Molecular de 296.32 g/mol, es soluble en agua y en solventes polares como el Metanol y el Acetonitrilo; es una molécula químicamente muy estable. El NIV tiene un Peso Molecular de 312.3 g/mol es soluble en solventes orgánicos polares como Metanol, Acetonitrilo y Acetato de Etilo y ligeramente soluble en agua y

cloroformo. El DON y el NIV son estructuralmente muy similares, sólo que el NIV presenta un grupo Oxhidrilo en el Carbono 4; pero la toxicidad es muy diferente, siendo el NIV 10 veces más tóxico que el DON. Deoxinivalenol y NIV se encuentran como contaminantes naturales de gramíneas y otras plantas destinadas a consumo humano y animal, y se desarrollan tanto durante el cultivo como en el almacenamiento (Mirocha et al. 1976; Kamimura et al. 1981; Ueno 1983; Ueno & Hsieh 1985).

Si bien muchos países de todo el mundo han establecido niveles máximos (NM) para el DON en diversos cereales crudos y/o alimentos a base de cereales, casi todos se concentran en el trigo y los alimentos a base de trigo. Los NM del trigo sin elaborar van de 0,7 mg/kg (ppm) en Armenia, Belarús y la Federación de Rusia, hasta 2 mg/kg para el trigo pan que no está destinado a alimentos básicos en Canadá (el NM de este último actualmente está en revisión). La UE y Ucrania permiten concentraciones más altas de DON en las variedades sin elaborar de trigo duro que en las variedades de trigo pan. Los NM de la harina de trigo van de 0,5 mg/kg para la harina de trigo pan (Ucrania) a 1,0 mg/kg para la harina y los productos de trigo en Uruguay.

Algunos países también han establecido NM para otros cereales sin elaborar, sobre todo el maíz, la cebada y la avena. Se han establecido NM para el maíz en China, la UE e Irán, de 1, 1,25 y 1 mg/kg, respectivamente. En Armenia, Belarús, China, Irán y la Federación de Rusia se estableció 1 mg/kg como NM para la cebada. La UE estableció un NM de 1,75 mg/kg para la avena sin elaborar.

Mientras que varios países tienen un NM para el trigo, la harina de trigo y los alimentos a base de trigo, en la UE hay NM diferentes para una variedad de alimentos terminados: 0,75 mg/kg para el DON en los cereales para consumo humano directo y la pasta seca, y 0,5 mg/kg para el DON en el pan, pastelillos, galletas, golosinas de cereales y cereales para el desayuno.

La UE y Ucrania establecieron un NM de 0,2 mg/kg para los alimentos a base de cereales elaborados y alimentos para lactantes y niños pequeños. Canadá está revisando su NM de 1,0 mg/kg para el DON en trigo suave sin limpiar para alimentos para bebés.

Hasta hoy ningún país ha establecido NM para los derivados acetilados del DON. Pocos estudios se han publicado acerca de la toxicidad de los acetilderivados. Como unos estudios metabólicos indicaron que el 3-ADON se deacetila rápida y abundantemente en DON y, por lo tanto, contribuye al total de la toxicidad inducida por DON, la ingesta diaria tolerable máxima provisional (IDTMP) del DON debería convertirse en IDTMP de grupo de 1 µg/kg pc para el DON y sus derivados acetilados, 3AcDON y 15AcDON. Por considerar los acetil derivados tan tóxicos como el DON (FAO/OMS 2011).

1.4.3 Ocurrencia natural de tricotecenos tipo B.

Algunos estudios informaron que la diversidad de quimiotipos depende de la distribución geográfica (O'Donnell et al. 2000; O'Donnell et al. 2004; Aoki et al. 2012). Y si bien los distintos quimiotipos pueden estar presentes en la misma ubicación geográfica; sólo uno es predominante. Por ejemplo, en América del Norte, predomina el quimiotipo 15-ADON (Gale et al. 2007). En cambio, el quimiotipo 3-ADON predomina en algunas partes de Asia, Australia y Nueva Zelanda (Guo et al. 2008). Sin embargo, un cambio sustancial se está reportando en América del Norte respecto al quimiotipo de la población de *F. graminearum* s.s. que se encuentra en esta región. El quimiotipo 3-ADON estaría reemplazando al quimiotipo 15-ADON, siendo los aislamientos de la población pertenecientes al quimiotipo 3-ADON más agresivos y con la particularidad de poder acumular más DON que el quimiotipo 15-ADON (Ward et al. 2007). En China y Japón se identificaron cepas con los quimiotipos 3-ADON, 15-ADON y NIV y sugieren que las cepas DON están desplazando cepas NIV en China (Suga et al. 2008; Yang et al. 2008). En Brasil, todas las cepas de *Fusarium graminearum* S. S. tenían el genotipo de 15-ADON mientras que los de linaje 2 tenían el genotipo NIV (Reynoso et al. 2013).

Los estudios sobre la producción de tricotecenos en Argentina por especies dentro del complejo (FGSC) presentan resultados diferentes. Por ejemplo, Ramírez y colaboradores en el año 2006 informaron que todas las cepas producen DON y algunas de ellas producen 3-ADON. Lori y colaboradores en 1992 reportaron que las cepas producían DON, 3-ADON y NIV, finalmente Fernández Pinto y colaboradores en el año 2008 informaron la producción de DON, 3-ADON, NIV y principalmente de 15 ADON. Reynoso y colaboradores realizaron un estudio usando PCR para determinar el genotipo de 116 cepas de *F. graminearum* aisladas en el año 2002 de la cosecha de trigo en Buenos Aires y Córdoba. A su vez, se verificó el quimiotipo por análisis químicos. Este estudio mostró que la mayoría de las cepas tenían el genotipo 15-ADON y una minoría de cepas tenían el genotipo DON / NIV. No se detectaron cepas de los genotipos NIV ni 3-ADON. Las cepas con cualquiera de los dos genotipos 15-ADON o DON / NIV, produjeron DON / 15-ADON y pertenecen al linaje 7 (Reynoso et al. 2011). Alvarez et al. en el año 2009 aisló 144 cepas de *F. graminearum* de 3 subregiones de producción de trigo, recolectadas durante la cosecha de 2001 (Epidemia), 2003 y 2004 (epidemia). El quimiotipo 15-ADON fue el tipo más común. La presencia simultánea de 3-ADON y 15-ADON en los mismos aislamientos es sorprendente ya que la base genética de los quimiotipos 3-ADON y 15-ADON se ha establecido en base a diferentes formas de TRI8 en cepas productoras de 3-ADON y 15-ADON (Reynoso et al. 2013).

1.4.4 Biosíntesis de tricotecenos tipo B.

La vía biosintética de los tricotecenos en las especies de *Fusarium* comienza con una ciclación de pirofosfato de farnesilo, el primer intermediario metabólico, para formar tricodieno. Esta reacción es codificada por el gen TRI5, el cual fue caracterizado por primera vez en la toxina T-2 producida por un aislamiento de *F. sporotrichioides*. Posteriormente, con la secuenciación del genoma de *F. graminearum* realizada en 2003 en el “Broad Institute” (Desjardins 2006), se determinó que los genes (TRI) que regulan la biosíntesis de tricotecenos están involucrados en tres loci: un “cluster” central que contiene la mayoría de los genes que controlan la biosíntesis de tricotecenos (TRI8, TRI7, TRI3, TRI4, TRI6, TRI5, TRI10, TRI9, TRI11, TRI12, TRI13, TRI14), un “cluster” conformado por los genes TRI1-TRI16 y el gen TRI101 (McCormick et al. 2011).

Dentro de los tricotecenos de tipo B, NIV y DON difieren en la presencia/ausencia de un grupo hidroxilo en la posición del C-4. La producción de DON versus NIV es catalizada por los genes TRI13 y TRI7. En los aislamientos productores de DON, estos genes tienen múltiples inserciones y deleciones que impiden la formación de un grupo hidroxilo en la posición del C-4 (Lee et al. 2002). En cuanto a 3-ADON y 15-ADON, estos difieren en la presencia de un grupo acetilo en los C-3 o C-15, respectivamente, como se observa en la Figura 9 (McCormick et al. 2011). Tres genes pueden controlar la presencia y ausencia de las funciones acetilo en las posiciones de C-3 y C-15: TRI101 que codifica la acetilación en C-3 de isotricodermol a isotricodermin; TRI3 que codifica una enzima que cataliza la acetilación en el C- 15; TRI8 que cataliza la eliminación del grupo acetilo en el C-3 (Desjardins 2006). Se ha formulado la siguiente hipótesis: la falta de expresión o función del TRI3 o TRI8 provoca la formación de 3-ADON (Kimura et al. 2003).

A su vez, respecto a los derivados acetilados de DON, inicialmente se correlacionaron los polimorfismos en la secuencia de los genes TRI3 y TRI12 con los genotipos 3-ADON y 15-ADON y se utilizaron como marcadores para distinguir entre estos genotipos (Starkey et al. 2007). El gen TRI12 es una bomba de eflujo de tricotecenos, aislado en un principio del “cluster” TRI5 de *F. sporotrichioides*, que cuando se expresa junto al gen TRI3 incrementa significativamente la tasa de conversión y acumulación de calonectrin en transformantes de levadura (Desjardins 2006).

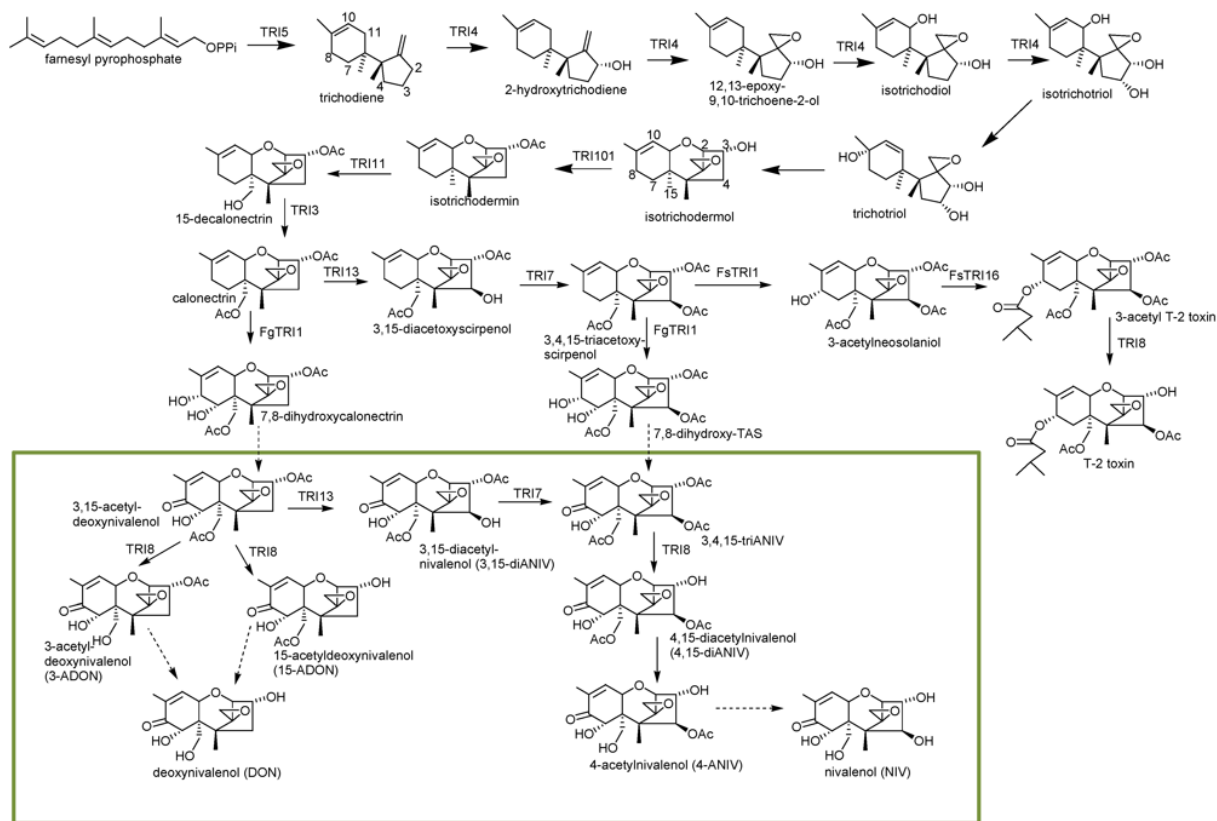


Figura 9 Esquema de la vía biosintética propuesta para la producción de tricotecenos en *Fusarium* (McCormick et al., 2011).

1.5 Determinación de tricotecenos Tipo B

La técnica más utilizada para la determinación química de los tricotecenos tipo B es la cromatografía gaseosa (CG) (Langseth & Rundberget 1998; Krska et al. 2001). Como ventaja ofrece el análisis simultaneo de varios tricotecenos (Krska et al. 2001) y mayor sensibilidad y especificidad que la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Arroyo-Manzanares et al. 2014). Por HPLC no se obtiene un adecuado poder de resolución para la separación de los dos isómeros posicionales 3-ADON y 15-ADON (Cheikowski 1989). Asimismo, existen trabajos que muestran varios métodos químicos que permiten, a partir de un mismo extracto purificado, determinar la contaminación con DON, 15-ADON y 3-ADON, NIV y zearalenona, realizando la separación de las toxinas en el extracto final por cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía de gases (GC), o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los métodos de detección utilizados incluyen espectrofotometría UV-Visible, fluorescencia (en caso de moléculas fluorescentes o con derivatización pre o post columna), captura electrónica y espectrometría de masa (Krska & Molinelli 2009). Sin embargo, los nuevos métodos desarrollados para la detección y cuantificación de micotoxinas en alimentos, se basan en el uso de

espectrometría de masa (MS), en particular espectrometría de masa en tándem (MS/MS o MS²) para confirmar la presencia de las moléculas de interés (Berthiller et al. 2005; Berthiller et al. 2007; Krska et al. 2007; Ren et al. 2007).

El procedimiento más utilizado para la determinación de tricotecenos tipo B es el que se describe a continuación. Para la extracción de los tricotecenos tipo B en la muestra, se utiliza generalmente una mezcla de acetonitrilo:agua en una relación de 84:16, v/v (Langseth & Rundberget 1999), aunque en ocasiones se han utilizado otras mezclas de disolventes (Langseth & Rundberget 1998; Wetter et al. 1999). Por lo general, posteriormente, en el proceso de purificación, se utilizan diferentes columnas de extracción en sólido. Estas columnas están armadas con una mezcla de carbón activado y alúmina o con otros compuestos adsorbentes (Croteau et al. 1994). Los tricotecenos son normalmente derivatizados para lograr la volatilidad y sensibilidad requerida antes de inyectar en el cromatógrafo de gases (Langseth & Rundberget 1998). La etapa de derivatización es una de las más críticas en la determinación de tricotecenos (Kientz & Verweij 1986). La derivatización de los tricotecenos tipo B está basada usualmente en la derivatización de los grupos hidroxilo mediante la trimetilsililación o la fluoroacilación. Los reactivos que se suelen utilizar para la sililación son: bis (trimetilsilil) acetamida (BSA), trimetilsililimidazol (TMSI), una mezcla de TMSI y trimetilclorosilano (TMCS) y mezclas comerciales. En la derivatización con compuestos fluorados se suelen utilizar reactivos como heptafluorobutirilimidazol (HFBI), anhídrido heptafluorobutírico (HFBA), pentafluoropropionilimidazol (PFPI), anhídrido pentafluoropropionilo (PFPA) y anhídrido trifluoroacético (TFAA) (Langseth & Rundberget 1998; Nielsen & Thrane 2001). Para su determinación, los detectores utilizados suelen ser el de captura electrónica (ECD) o el detector de espectrometría de masas (EM). El ECD es selectivo para la detección de los tricotecenos tipo B derivatizados con reactivos trimetilsilil debido al grupo carbonilo conjugado en su molécula. También se consigue muy buena sensibilidad y selectividad con el ECD al derivatizar con los fluoroacilados (Langseth & Rundberget 1998).

El detector de captura de electrones (ECD), mejora la sensibilidad frente al detector de ionización de llama (FID) para los tricotecenos. El sistema se basa en la electronegatividad de las sustancias eluidas y su habilidad para formar iones negativos por captura de electrones. Es un detector muy selectivo, y es sensible a la presencia de moléculas con grupos electronegativos como halógenos, peróxidos, quinonas y grupos nitro. Otros grupos como el alcohol, amina e hidrocarburos no dan señal. Se aplica en la detección de moléculas que contienen halógenos, principalmente cloro, de ahí que sea importante en ensayos medioambientales para la detección y determinación de insecticidas clorados. El detector de captura de electrones tiene la ventaja de no alterar la muestra de manera

significativa (a diferencia del detector de llama). El detector de espectrometría de masas (EM) es un instrumento que permite analizar con una gran precisión la composición de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación masa-carga (m/z). En términos generales, las moléculas diferentes tienen masas distintas, hecho utilizado por un espectro de masas para determinar qué moléculas están presentes en una muestra. En el caso de una micotoxina, se vaporiza y se analizan los iones en la primera parte del espectro de masa. Estos iones tienen pesos moleculares específicos. También tienen una carga, que significa que debido a ella tendrán movimientos bajo la influencia de un determinado campo eléctrico. Los iones se envían en un compartimiento de aceleración y se pasan a través de una lámina metálica. Se aplica un campo magnético a un lado del compartimiento que atrae a cada uno de los iones con la misma fuerza (suponiendo carga idéntica) y los desvía sobre un detector. Naturalmente, los iones más ligeros se desviarán más que los iones pesados ya que tienen menos masa. El detector mide exactamente cuán lejos se ha desviado cada ion y dependiendo de esto, se calcula el “coeficiente masa por unidad de carga (m/z)”. Con esta información es posible determinar con un alto nivel de probabilidad la composición química de la muestra original. El acoplamiento técnico cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-ME) ha revolucionado el análisis de muestras complejas, ya que las características del alto poder de resolución que da la cromatografía de gases con la alta sensibilidad suministrada por el espectrómetro de masas, convierte a este acoplamiento CG-ME en un método poderoso para la identificación y cuantificación de moléculas orgánicas volátiles (Arroyo-Manzanares et al. 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Debido a que la presencia de los hongos toxicogénicos y sus metabolitos tóxicos en los productos de interés agroalimentario es uno de los principales problemas sanitarios y económicos en nuestro país, el objetivo general de la presente tesis fue estudiar la influencia de los cambios en el hospedante (variedades de trigo con distintas resistencia a la fusariosis) y las prácticas de manejo (tiempo de aplicación del fungicida) en la producción de tricotecenos B por un inóculo mixto de cepas de *Fusarium graminearum*. El logro de este objetivo permitirá valorar el riesgo micotoxicológico a que están expuestos los diferentes cultivares de trigo, prevenir la difusión de la fitopatías, reducir la ingesta de micotoxinas, prevenir las patologías humanas y animales y desarrollar estrategias de prevención y control de hongos toxicogénicos y micotoxinas en los alimentos.

2.2 Objetivos específicos

Objetivo 1: Caracterizar morfológicamente las cepas utilizadas para inocular las distintas variedades de trigo y determinar el perfil de tricotecenos del grupo B producido por las mismas.

Objetivo 2: Analizar el efecto de los cultivares de trigo y del tiempo de aplicación de fungicida sobre la producción de tricotecenos del grupo B en los granos a cosecha.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Muestras y tratamientos.

Las muestras de granos de trigo utilizadas para la realización del presente trabajo se colectaron de ensayos realizados y diseñados por el Ing. Agr. Enrique Alberione de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Marcos Juárez, Provincia de Córdoba, República Argentina. Dichos ensayos estuvieron enmarcados en actividades definidas en el proyecto INTA del programa Cereales y Oleaginosas: PNCyO 1127023 (iniciado en 2013). En esta tesis se aprovechó el muestreo granario de los ensayos para analizar la influencia de cultivares de trigo tratados con un fungicida en distintos momentos pos-inoculación, sobre la producción de tricotecenos por cepas de *Fusarium graminearum*.

Las 8 variedades de trigo analizadas en dichos ensayos se seleccionaron en base a un estudio previo realizado por el Ing. Enrique Alberione, el cual evaluó el comportamiento de los cultivares de trigo frente a Fusariosis de la espiga en Marcos Juárez (Alberione, E. comunicación personal, 8 de abril de 2016). Teniendo en cuenta este comportamiento, se seleccionaron variedades con distintos índice de fusariosis (IF) (tabla 5).

En la campaña 2014/15, en condiciones de campo, en una jaula protegida con malla para prevenir daños por pájaros y granizo, se sembraron los 8 cultivares de trigo según su ciclo de crecimiento, primer semana de Junio para cultivares de ciclo largo e intermedio y última semana de Junio para los de ciclo corto. Asimismo se utilizó un generador artificial de humedad (bomba y picos aspersores) para satisfacer el requerimiento de mojado de las anteras para la infección del hongo. Las parcelas donde se llevó a cabo la siembra a chorrillo de los granos consistieron en 2 hileras (de 30 cm de largo por 40 cm de ancho). Entre hileras se dejó una separación de 20 cm. El desmalezado se realizó manualmente con un carpidor.

Cultivar	Ciclo	Fecha de siembra	Fecha de cosecha	IF*	Tipos de reacción**
ACA 906	Corto	24/06/2014	05/12/2014	18	MR
BioINTA 1005				21.8	MR
AGP Fast				11.8	MR
LE 2333				5.9	MR
ACA 320	Largo	04/06/2014	05/12/2014	19.6	MR
Baguette P 11				42.8	MS
SRM Nogal				17.3	MR
BioINTA 3005				30.7	MS

* Índice de *Fusarium* = (Incidencia x severidad) / 100. Informe técnico Evaluación del comportamiento de cultivares de trigo pan y trigos blandos frente a Fusariosis de la espiga en ambiente Marcos Juárez.

** MR: moderadamente resistente 5 a 25% IF MS: moderadamente sensible 25 a 50% IF (Kohli 1989)

Tabla 5 Variedades sembradas de trigo.

Las muestras de granos de trigo se obtuvieron tomando al azar 0.25 kg de semillas de varios puntos del campo de cultivo en el momento de la cosecha. Luego de homogeneizar la muestra se conservó la misma en bolsas de polietileno a -18°C. Se aplicó un diseño experimental en bloques completamente aleatorizados con estructura factorial de los tratamientos con tres repeticiones.

En antesis, cada cultivar fue tratado con fungicida aplicado por separado en dos momentos: i) Inoculado e inmediata aplicación del fungicida (Zadoks 6.5) (Zadoks et al. 1974) e ii) Inoculado y aplicación del fungicida a las 72 horas de la inoculación (evento infectivo derivado de 72 horas de mojado). Adicionalmente se contó con un tratamiento testigo sin aplicación de inóculo y sin fungicida. En los tratamientos en los que se aplicó fungicida el mismo fue Tebuconazol al 25% (850 cc/Ha).

3.2 Aislamientos utilizados para inocular en campo

Los 8 cultivares fueron inoculados con cepas de *Fusarium graminearum* sensu stricto que se aislaron de muestras de trigo obtenidas de la provincia de Córdoba, localidad de Marcos Juárez en el año 2010. Las 4 cepas utilizadas fueron: LP2A, LP12C, LP16D y LP17B, de la colección de la Universidad de La Plata.

Los aislamientos de *F. graminearum*, se cultivaron durante 48 horas a 22°C en Erlenmeyer conteniendo 50 ml de medio de cultivo Agar afrecho (AAF, Anexo). Se extrajeron los conidios de cada Erlenmeyer con lavados de agua destilada estéril y se filtró con gasa estéril. Se mezclaron las suspensiones de los cuatro aislamientos en partes iguales y se llevó a una concentración de 3×10^5 para realizar la inoculación por aspersión.

Luego de inoculadas y para favorecer la germinación de los macroconidios, se prendieron los aspersores para mantener la humedad relativa y asegurar el largo período de mojado requerido para la infección.

3.2.1 Re-aislamiento de las cepas utilizadas para inocular en campo.

Para caracterizar morfológicamente las 4 cepas (objetivo 1) en primer lugar se sembraron cada una de ellas en cajas de Petri conteniendo el medio Agar Papa Dextrosa (PDA, Anexo) y se incubaron a 25°C por 3-4 días. Se realizó una inspección visual y fueron repicadas en medio Synthetischer Nährstoffärmer Agar (SNA, Anexo) por 5-7 días a 25°C. Transcurrido este tiempo, se les hizo cultivos monospóricos con el fin de obtener cultivo puro proveniente de una sola espora germinada. Para ello se preparó una solución al 1% de Twen 80-Agua. Se colocaron 10 gotas de solución con un ansa en una caja de Petri con medio de cultivo Agar -Agua 2% (AA, Anexo). Con el ansa estéril se tomó una porción de macroconidios del esporodocio producido en SNA y se colocó en una de las gotas. Se extendió cuidadosamente haciendo girar la placa para pasar la gota más cargada hacia las otras gotas con el fin de ir diluyendo la concentración de macroconidios. Se incubó a 25°C por 24 horas. Pasado este tiempo se observó la placa bajo lupa estereoscópica para encontrar un conidio germinado lo suficientemente aislado de los otros de manera que sea sencillo separar el trozo de agar. Se transfirió el trozo de agar con el conidio germinado a una placa de SNA y se incubó a 25 °C por 5-7 días. Finalmente, se realizó la identificación morfológica de los aislamientos según las claves de Nelson et al., 1983 y Leslie y Summerell, 2006.

3.3 Determinación de micotoxinas

3.3.1 Determinación de la capacidad toxicogénica de los aislamientos de *Fusarium graminearum* utilizados para inocular el trigo.

El perfil de producción de tricotecenos B de las cepas utilizadas para inocular (objetivo 1) se determinó colocando 25 g de arroz y 50 ml de agua destilada en un erlenmeyer de 250 ml y se esterilizó a 121 °C por 15 minutos. La inoculación del arroz se realizó colocando separadamente para cada una de las 4 cepas un cuadrado de agar de 0.5 x 0.5 cm del cultivo de SNA por erlenmeyer. Se incubó durante 15 días a 15 °C y luego 15 días a 25 °C. Se conservó a -30 °C hasta su extracción (Abbas et al. 1984) como se detalla a partir del punto 3.3.2.2.

3.3.2 Determinación de micotoxinas en muestras de granos

Para comenzar con el análisis del efecto de los cultivares de trigo y del tiempo de aplicación de fungicida sobre la producción de tricotecenos del grupo B en los granos a cosecha (objetivo 2) se pesaron 25 g de cada una de las muestras de grano previamente molidos en un Erlenmeyer de 250 ml para continuar con el proceso de extracción.

3.3.2.1 Análisis de micotoxinas

Con el fin de cuantificar los tricotecenos producidos por *Fusarium graminearum* (DON, 3-ADON y 15-ADON) presentes en las muestras y los sintetizados en arroz autoclavado por las cepas inoculadas, se utilizó la técnica de extracción descrita por Trucksess et al. (1984) y modificada por Rizzo et al. (1995, 1997) para incrementar la recuperación de los tricotecenos menos polares (3 y 15-ADON). Se incluyó además el agregado de sulfato de amonio al extracto antes de su elución en la columna para favorecer el “salting out” de los tricotecenos más polares (Corteau et al., 1994). En estas condiciones fue posible obtener una recuperación del 90% para todos los tricotecenos analizados, como fue reportado por Rizzo et al. (1995, 1997).

3.3.2.2 Extracción de la toxina del cultivo de arroz y de las muestras de granos

Se comenzó adicionando 125 ml del solvente de extracción (SE) Acetonitrilo:Acetato de etilo:Agua (50:41:9) tanto para los erlenmeyers con los granos molidos como para los que contenían el arroz con las cepas inoculas. Se agitaron en agitador rotatorio durante 60 minutos a 300 rpm. Finalizado ese tiempo se filtraron por papel Whatman Nº1 tomándose 20 ml del filtrado en una probeta de 100 ml, a este filtrado se le agregó 1.4 gr de sulfato ácido de amonio para para incrementar la

recuperación de los tricotecenos menos polares (3- y 15-ADON) por efecto del salting-out (Rizzo, 1997). El procedimiento de extracción se detalla en la figura 10.

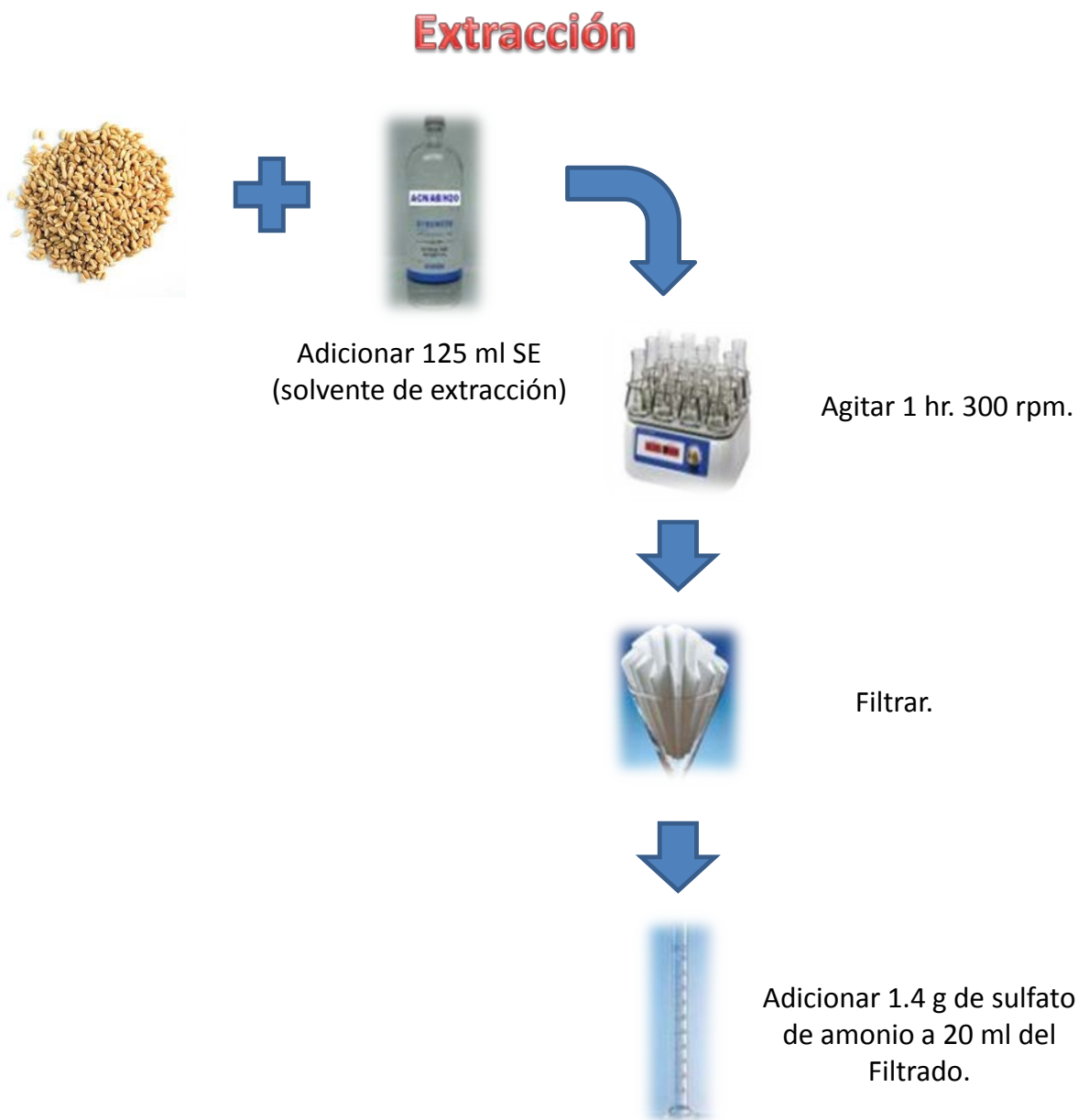


Figura 10 Esquema del proceso de extracción

3.3.2.3 Purificación (clean-up)

La purificación del extracto se efectuó en una columna cromatográfica de 10 mm de diámetro interno y 50 mm de alto con preparadas con un disco de papel Whatman N°1 más 0.7 gr de carbón activado (charcoal), 0.5 gr de alúmina neutra y 0.3 gr de celite. La columna preparada se colocó en un kitasato de 125 ml que se conectó a una trampa de agua donde se pudo regular la velocidad de flujo

del solvente (2 a 3 ml por minuto). Se pasaron por la columna 20 ml del extracto, seguido por dos lavados con 20 ml del solvente de extracción. El eluato se evaporó a sequedad en baño María. Se añadió 3 ml de acetato de etilo al residuo, se calentó a ebullición en baño María y se filtró por papel Whatman Nº1, este procedimiento se realizó dos veces. El extracto se llevó a sequedad en rotavapor marca Büchi bajo presión a 45°C. El residuo resultante se resuspendió en 500 µl de acetato de etilo:metanol (95:5). De los cuales se colocaron 100 µl en un vial para su derivatización y los 400 µl restantes fueron secados en corriente suave de nitrógeno y almacenados a -18°C para posteriores análisis por cromatografía gaseosa. El procedimiento para la purificación de micotoxinas se detalla en la figura 11.

Purificación



Pasar 20 ml del extracto por Columna.
Lavar con 20 ml del SE (repetir lavado)



Evaporar a sequedad.
Adicionar 3 ml acetato de etilo y hervir.



Filtrar.
Adicionar 3 ml acetato de etilo y hervir
nuevamente.



Llevar a sequedad el extracto seco
en Rotavapor



Resuspender el residuo en 500 μ l de
Acetato de etilo: metanol (95:5)

Figura 11 Esquema del proceso de purificación

3.3.2.4 Cuantificación de toxinas por patrón interno

Se utilizó la técnica del patrón interno con el fin de mejorar la precisión del método y del instrumento para obtener la concentración de tricotecenos.

Como patrón interno se utilizó 2-amino-5-clorobenzofenona (ACBP). Se preparó una solución de 500 µg/ml de 2-amino-5-clorobenzofenona (ACBP) en tolueno, esta solución se mantuvo en heladera a 5 °C envuelta en papel de aluminio hasta el momento de su utilización. De esta solución se tomaron 200 µl, se llevaron a un matraz de 10 ml y luego se enrasó con tolueno, esta última solución se debió preparar el mismo día del análisis y es la que se utilizó en la derivatización.

3.3.2.5 Derivatización de los tricotecenos

Antes de comenzar con la cromatografía de los tricotecenos, los mismos necesitan ser derivatizados, para aumentar su volatilidad, sensibilidad y especificidad. Se seleccionó un agente derivatizante teniendo en cuenta los tricotecenos a analizar y el tipo de detector a utilizar.

Se tomaron 100 µl de derivatizante (Anhídrido trifluoracético, TFAA) y se agregaron a 100 µl del producto de extracción previamente secado con nitrógeno, a su vez se adicionaron 35 mg de bicarbonato de sodio (NaHCO₃). Se agitó 10 segundos en vortex y se colocó en baño de seco a 80°C por 30 minutos. Luego, la mezcla se dejó a temperatura ambiente. Al residuo se le agregaron 100 µl de solución de 2-amino-5-clorobenzofenona (ACBP) en una concentración de 10 µg/ml, que se utilizó como estándar interno.

Nuevamente, se agitó por 10 segundos en vortex y se adicionó 1 ml de agua desionizada con el fin de eliminar excesos de reactivo. Se volvió a repetir la agitación por 10 segundos y se dejó reposar hasta separación de las fases (acuosa y orgánica). La fase orgánica (tolueno) se colocó en un vial y se adicionó 0,2 mg de sulfato anhidro para eliminar restos de agua. La muestra resultante se analizó con un cromatógrafo gas-líquido (CG) con detector de captura de electrones (ECD) (Schwadorf y Muller, 1991; Schollenberger et al., 1998). El método para la derivatización de tricotecenos se detalla en la figura 12.

Derivatización

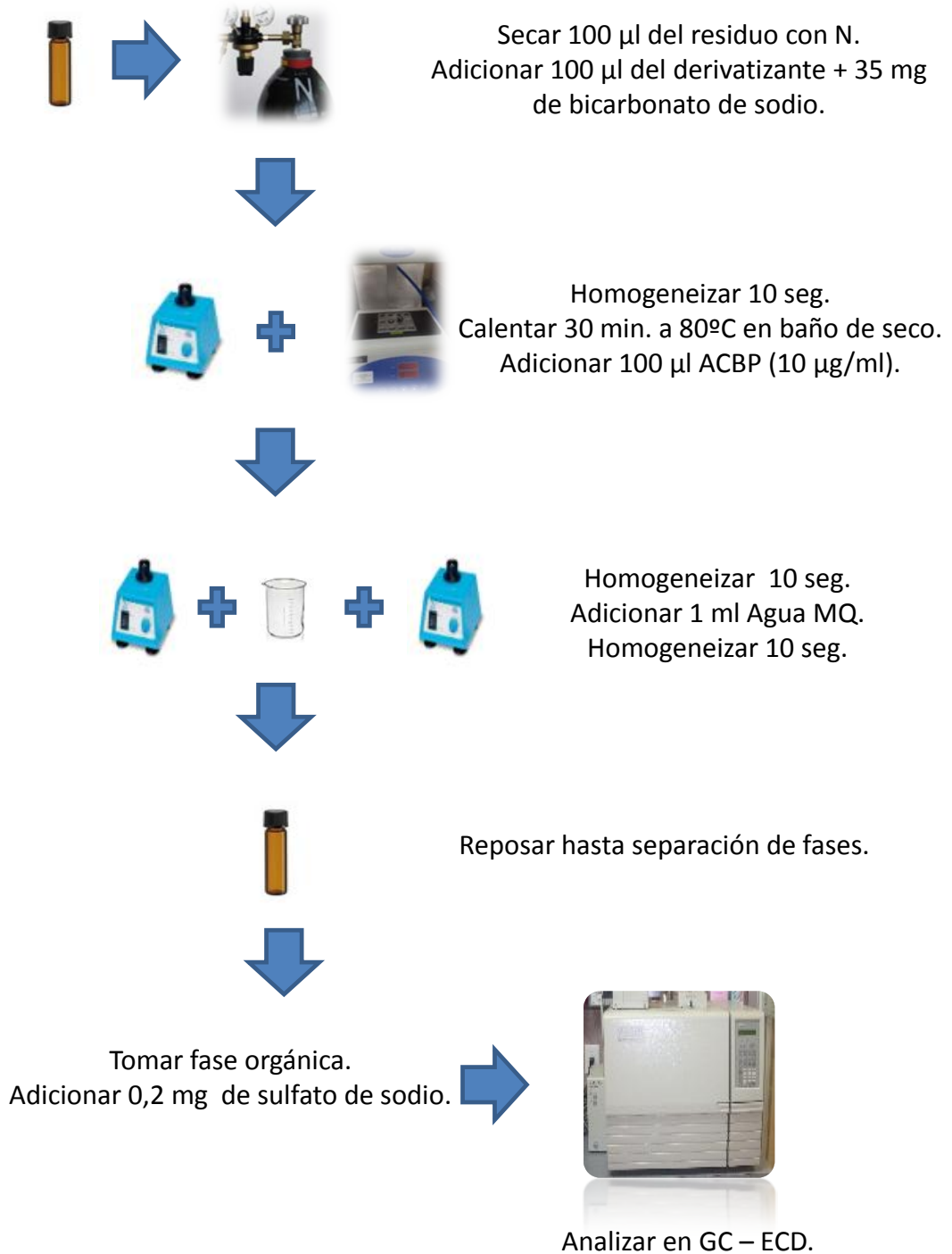


Figura 12 Esquema del proceso de derivatización

3.3.2.6 Determinación de tricotecenos

Se realizó la determinación de los tricotecenos por cromatografía gaseosa (CG) con un detector de captura de electrones (ECD) ya que tiene una alta sensibilidad y selectividad a los compuestos electronegativos. Por otro lado también se utiliza este detector ya que los tricotecenos no son analitos fluorescentes y tampoco absorben intensamente en el rango de UV-visible. Los métodos de CG requieren derivatización de los grupos hidroxilos de estas toxinas, aumentando de esta manera la sensibilidad. La elección del reactivo para la derivatización depende del tipo de tricoteceno que va a ser analizado y del método de detección. En este trabajo, se utilizó como derivatizante el anhídrido trifluoroacético (TFAA) que es más reactivo y más volátil al fijar átomos de flúor en las toxinas haciéndolas más estables térmicamente y más fácilmente detectables por ECD.

Para poder separar bien los picos de interés de las interferencias se programaron distintas rampas de temperatura. En los primeros minutos de la corrida suele eluir la mayoría de picos, con lo cual la primer rampa sirve para eliminar las interferencias del extracto de las muestras y los solventes utilizados. En la segunda y tercer rampa se separan las diferentes toxinas entre sí. Se consideró que algunas toxinas pueden ser termosensibles, con lo cual se incrementaron los cuidados en las temperaturas para que no aparezcan picos de degradación en los cromatogramas.

Es importante en el “modo” en que se trabaje el inyector pues en el análisis de trazas la muestra debe entrar completamente en la columna. Esto, permite una mayor concentración de las toxinas. Controlar el modo de inyección se logra por medio del manejo de la válvula de purga en el momento de la inyección. En el presente trabajo se utilizó el modo “splitless” sin división, válvula de purga cerrada, para que entre toda la muestra. Si la válvula se encuentra abierta, modo “Split” con división, parte de la muestra se pierde y disminuye la sensibilidad. La temperatura del inyector fue elegida de modo tal que volatilice la muestra derivatizada pero que no la altere térmicamente (pirolisis) y de esa forma entre intacta a la columna.

La temperatura del detector fue elegida de modo que diferentes sustancias cuando salgan de la columna no queden retenidas por el detector. La temperatura del detector fue superior en unos 20-30°C a la de la columna, para mantener de esta forma limpio el detector y mantener la sensibilidad del mismo.

El equipo utiliza dos gases, el gas carrier y el gas auxiliar. Pueden seleccionarse el mismo o distintos según la conveniencia o el grado de exactitud y rapidez que se requiera en el análisis. El gas auxiliar es el que circula por el detector ECD, debe ser de muy buena calidad, necesita un alto flujo (50-60

ml/min). Puede utilizarse nitrógeno o helio. En este caso se decidió utilizar nitrógeno ya que a igualdad de comportamiento éste es más económico que el helio. Por otro lado, el gas carrier es el que va por la columna y es el que eluye a la muestra. También puede usarse nitrógeno o helio o hidrógeno. El hidrógeno es de mejor resolución que el helio y éste que el nitrógeno. Debido a que la resolución fue suficiente con nitrógeno como gas carrier, se lo seleccionó, además, por razones económicas y de seguridad.

La columna que se empleó fue una columna capilar de mediana polaridad (RX-5MS), debido a que ésta presenta una excelente performance, permitiendo separar perfectamente DON, 3- y 15-ADON.

Como patrón interno se utilizó 2-amino-5-clorobenzofenona (ACBP) debido a que tiene una estructura similar a la de los analitos a cuantificar; además porque es detectada con una sensibilidad y reproducibilidad adecuada; y también porque eluye en la mitad del cromatograma y próximo a los analitos de interés. Con la técnica del patrón interno, se estandarizan los parámetros y los resultados y permite asegurarse además que la corrida y el equipo se encuentran en correctas condiciones.

Condiciones de la corrida cromatográfica

La determinación de tricotecenos se realizó con un cromatógrafo gas-líquido Shimadzu GC-17 con detector de captura de electrones (ECD), provisto de una columna capilar RX-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). La temperatura del inyector fue de 300 °C y la del detector 330 °C.

Se utilizó un programa de temperatura que consistió en las siguientes rampas:

- 90°C 2 minuto
- de 90°C a 275°C a una velocidad de 23°C por minuto (por dos minutos)
- de 275°C a 290°C a una velocidad de 30°C por minuto (por cinco minutos)

Tanto el gas auxiliar como el carrier utilizado fue nitrógeno. El volumen de inyección fue de 2 µl y el tiempo de corrida por muestra fue de 18 minutos.

3.3.2.7 Curvas de calibración

Las curvas de calibración de cinco puntos se realizaron con estándares de micotoxinas de la marca Sigma-Aldrich en un volumen de 1 ml con una concentración de 100 µg/ml en acetonitrilo. Las curvas fueron realizadas de en un rango de concentración tal que la cantidad de masa de toxina inyectada fuese de 50, 100, 200, 300 y 400 pg. Se construyeron las curvas de calibración para cada una de las toxinas graficando el área relativa (AR) (que es la relación del área de la toxina y del estándar interno,

ACBP) versus la concentración en cada punto y se comprobó el rango de linealidad mediante una curva de regresión.

3.3.2.8 Confirmación por Cromatografía Gaseosa acoplada a un detector de Espectrometría de Masa (GC-MS).

Los aislamientos y algunas muestras de granos de trigo fueron confirmados por Cromatografía Gaseosa acoplada a un Espectrómetro de masa. El equipo utilizado fue un Perkin Elmer modelo Clarus 600 con puerto de inyección con vaporizador de temperatura programable y control programable del sistema neumático con inyección de grandes volúmenes y muestreador automático, provisto de una columna capilar DB-SMS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m). La temperatura del inyector fue de 250 °C y la del detector 300 °C.

Las condiciones elegidas para el cromatógrafo y más concretamente para las temperaturas del detector, inyector y horno fueron optimizadas con la finalidad de obtener la máxima separación posible entre las diferentes micotoxinas a estudiar, especialmente 3-ADON y 15-ADON, ya que sus tiempos de retención son muy próximos. Tanto el gas auxiliar como el carrier utilizados fueron Helio. El volumen de inyección fue de 1 μ l y el tiempo de corrida por muestra fue de 18 minutos. La derivatización se realizó con Anhídrido Trifluoroacético (TFAA).

Se utilizó un programa de temperatura que consistió en las siguientes rampas:

- 90°C 2 minuto
- de 90°C a 275°C a una velocidad de 23°C por minuto (por dos minutos)
- de 275°C a 290°C a una velocidad de 30°C por minuto (por cinco minutos)

Los iones empleados para confirmar la presencia de las micotoxinas se muestran en el anexo.

3.4 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en el ensayo fueron analizados estadísticamente mediante análisis univariado (ANOVA) ejecutados con el SPSS 12.0.1 software (SPSS, Inc., Chicago, IL).

Para la comparación del efecto de las variedades, sobre el tratamiento Testigo, se realizó el análisis de un factor (variedad) de los datos pertenecientes a las mediciones de DON, 3-ADON y 15-ADON.

El efecto del fungicida fue evaluado para cada variedad en los tratamientos Testigo, inoculado y aplicación del fungicida en antesis (ICF) e inoculado en antesis y aplicación del fungicida a los 3 días (ICF72) sobre los datos de DON, 3-ADON y 15-ADON.

Para la comparación de medias se utilizó la prueba de Bonferroni. En los casos de heterogeneidad de varianza cuando la prueba de Levene resultó con $p=0,02$, se empleó la prueba de Tamhane (con un nivel de significancia de $p<0,05$).

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización de cepas de *Fusarium graminearum* utilizadas para inocular en campo.

Como resultados del primer objetivo planteado, los cuatro aislamientos utilizados para las inoculaciones de los cultivares de trigo a campo (LP2A, LP12A, LP16A y LP17A) sembrados en PDA, mostraron características de *Fusarium* spp. Produjeron abundante micelio aéreo blanco amarillento a marrón rosa de textura algodonosa. En el reverso de la placa pudo observarse coloración roja por la formación de pigmentos (figura 13). La caracterización microscópica se realizó en medio SNA. La misma se realizó en base a las características de los macroconidios. Se evaluó tanto las células apicales como las basales y la ausencia de microconidios. Los aislamientos se presumieron como *Fusarium* spp. y se les realizó el cultivo monospórico para asegurar la pureza del cultivo.

En base a las características microscópicas y macroscópicas definidas en el manual de identificación de Nelson, Toussoun y Marasas (1983) y Leslie y Summerell (2006), se identificaron los 4 aislamientos. Pudiendo así confirmar que las 4 cepas se correspondían a *Fusarium graminearum*.

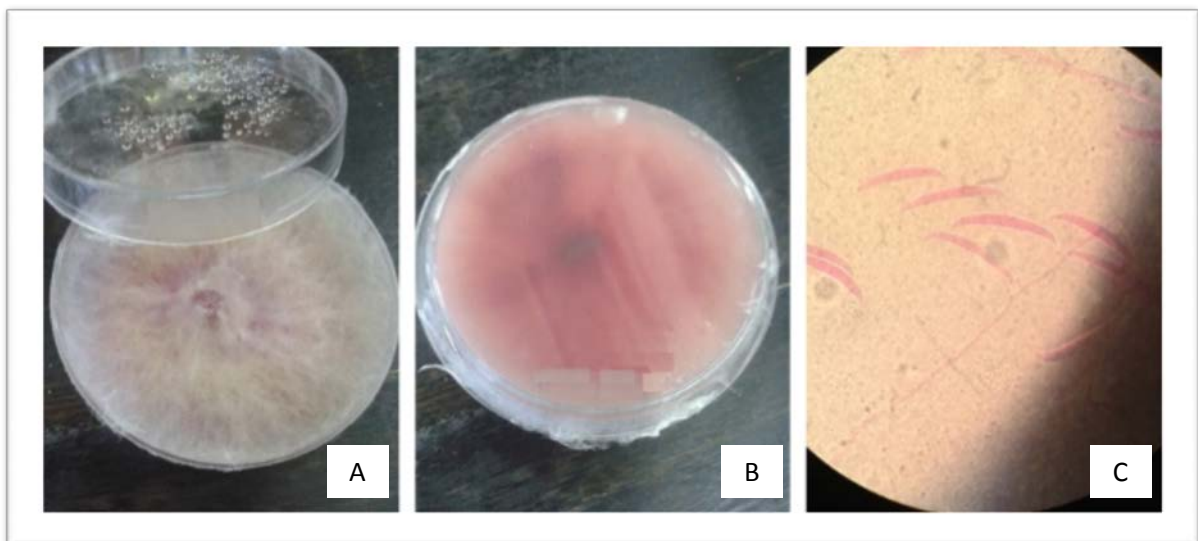


Figura 13 Aislamiento *Fusarium graminearum* LP2A: Colonias en agar PDA (A) y reverso de placa (B). Macroconidios observados a microscopio 100X (C)

4.2 Determinación de micotoxinas

4.2.1 Curvas de calibración

Como primer paso para determinar el perfil de tricotecenos B producido por las cepas utilizadas para inocular en campo y de los granos a cosecha (objetivos 1 y 2) se realizaron las curvas de calibración.

Al graficar el área relativa (AR) versus la concentración en cada punto (datos en tabla 6) se obtuvieron las curvas de calibración para cada estándar como puede verse en los gráficos 1, 2, 3 y 4.

La figura 14 muestra los cromatogramas correspondientes a los estándares de las toxinas. Los datos de tiempos de retención de las toxinas y del estándar interno se detallan en la tabla 7.

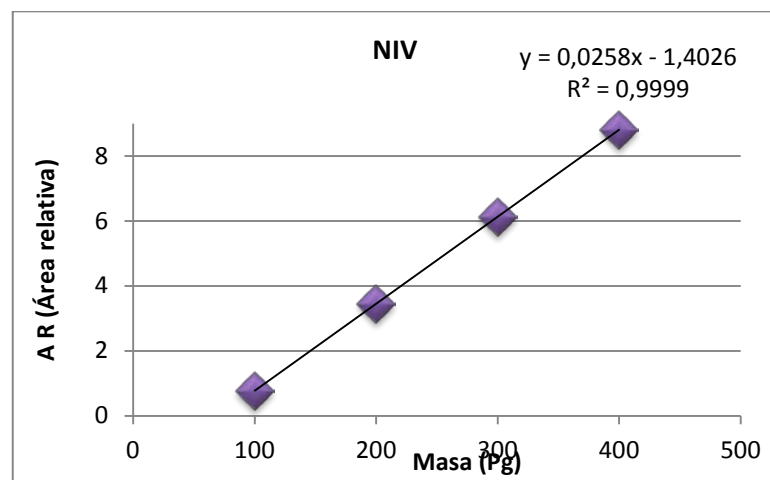


Gráfico 1 Curva de calibración para NIV

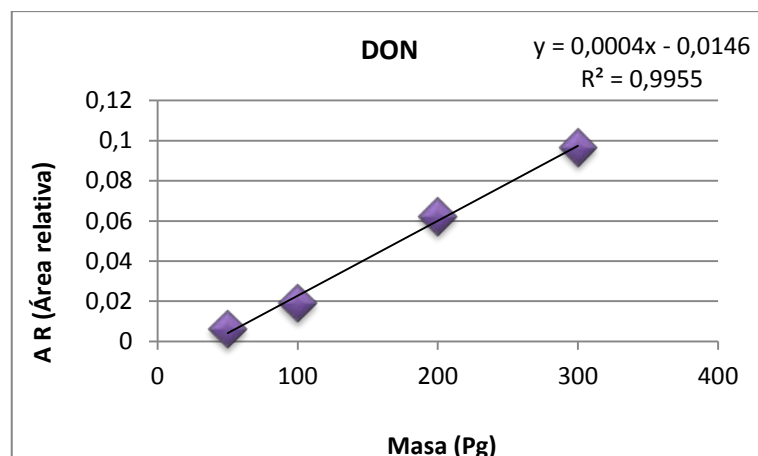


Gráfico 2 Curva de calibración para DON

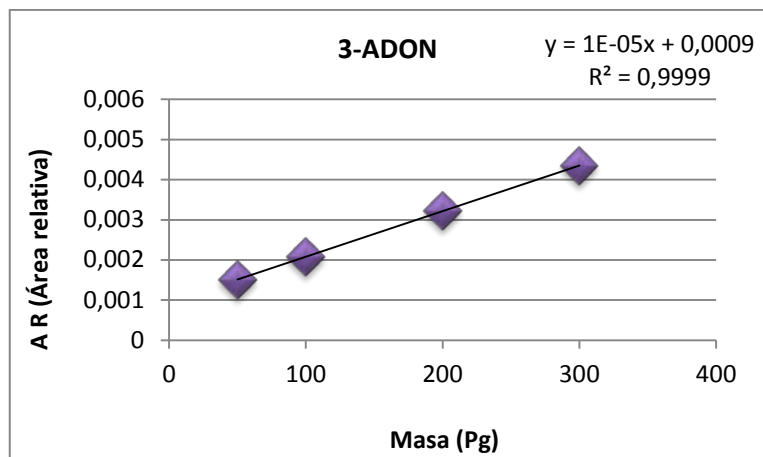


Gráfico 3 Curva de calibración para 3-ADON

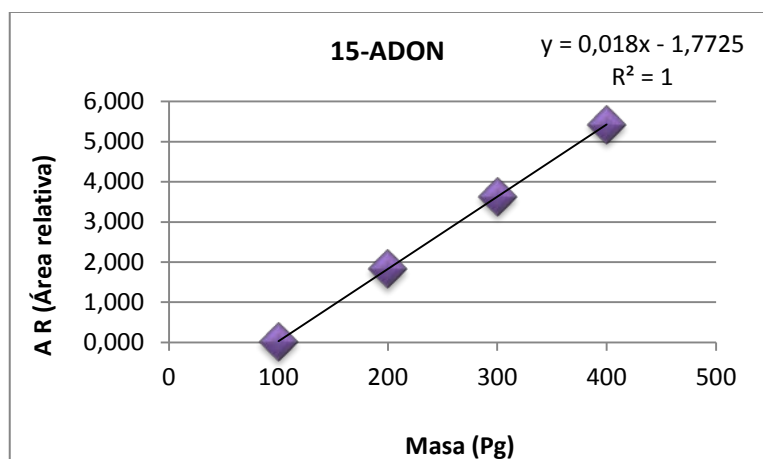


Gráfico 4 Curva de calibración para 15-ADON

Área relativa (AR)

Masa (pg)	NIV	DON	3-ADON	15-ADON
50	--	0,00609	0,00151	--
100	0,77737	0,01906	0,00207	0,02800
200	3,45374	0,06228	0,00323	1,82800
300	6,13372	0,09672	0,00434	3,62700
400	8,81373	--	--	5,42900

Tabla 6 Curvas de calibración de las toxinas.

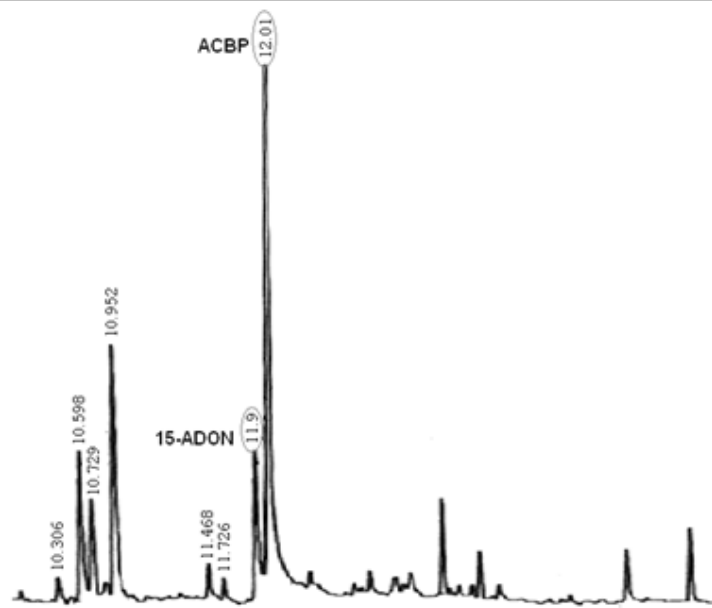
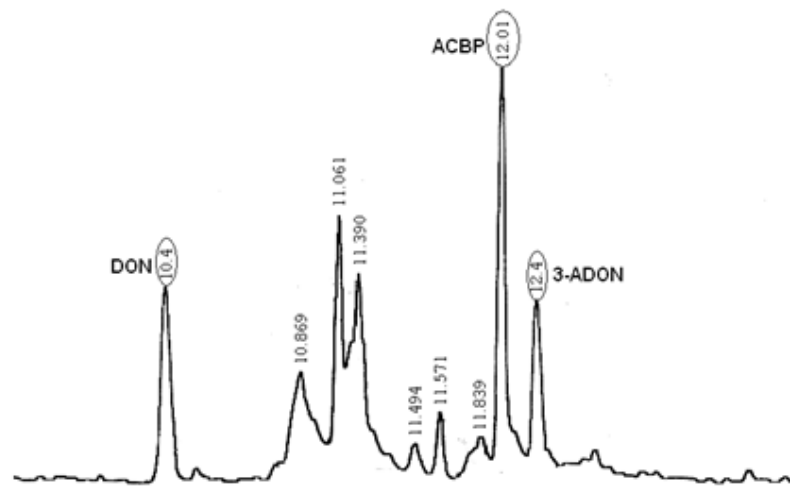
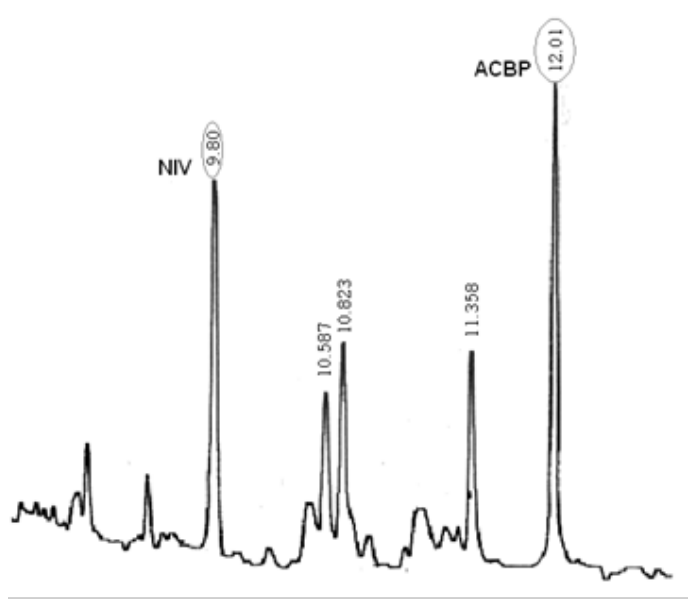


Figura 14 Cromatogramas de los estándares

Micotoxina	Tiempo de retención de la toxina (min)	Tiempo de retención del ACBP (min)	Tiempo de retención relativo (TR)
NIV	9,8	12,01	0,8159
DON	10,4	12,01	0,8659
3-ADON	12,4	12,01	1,0325
15-ADON	11,9	12,01	0,9908

Tabla 7 Tiempo de retención de las toxinas y del estándar interno (ACBP) por GC-ECD.

4.2.2 Determinación de la capacidad toxicogénica de los aislamientos utilizados para inocular en campo

Como resultado de haber analizado los perfiles de producción de los aislamientos en el cromatógrafo gaseoso se obtuvieron los datos que se observan en la tabla 8 para las mediciones de tricotecenos (DON, 3-ADON y 15-ADON) en arroz autoclavado. No se obtuvieron valores detectables para nivalenol. Sus respectivos cromatogramas se pueden apreciar en las figuras 15, 16, 17 y 18.

Aislamiento	Resultados (µg/g)		
	DON	3-ADON	15-ADON
LP2A	7118,58	12743,00	68,60
LP12C	2641,19	668,91	53,93
LP16D	14850,86	1125,83	19,96
LP17B	1165,50	ND	15,14

Tabla 8 Capacidad toxicogénica de los aislamientos.

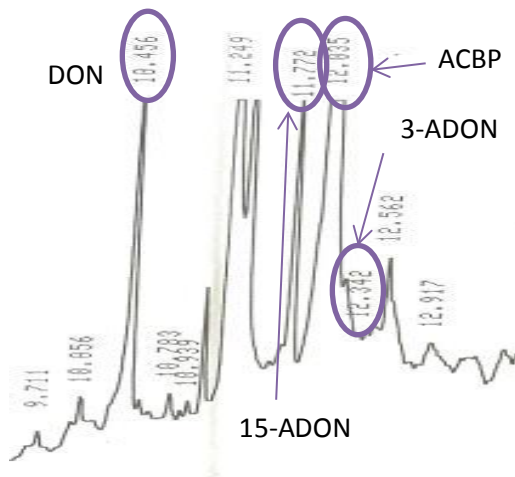


Figura 16 Cromatograma del aislamiento LP2A

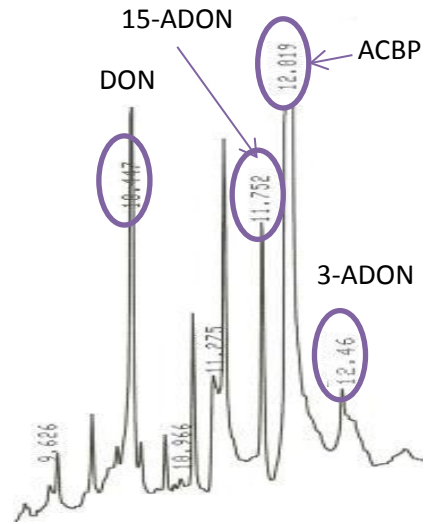


Figura 15 Cromatograma del aislamiento LP12C

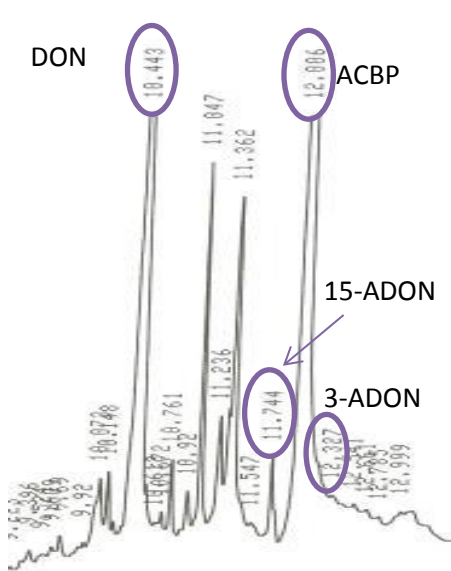


Figura 18 Cromatograma del aislamiento LP16D

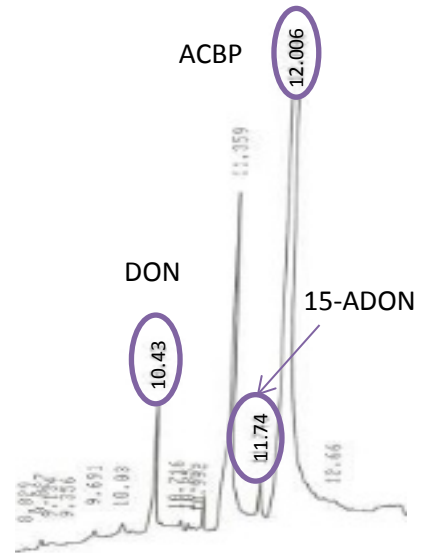


Figura 17 Cromatograma del aislamiento LP17B

4.2.3 Determinación de tricotecenos B en los granos de trigo

Como resultado de haber analizado las muestras de trigo obtenidas del ensayo experimental en el cromatógrafo gaseoso se obtuvieron los datos que se observan en la tabla 9 para las mediciones de tricotecenos (DON, 3-ADON y 15-ADON). No se obtuvieron valores detectables para nivalenol. Los cromatogramas pueden observarse en las figuras 19 y 20.

Tratamiento	Variedad de Trigo	Resultados ($\mu\text{g/g}$)		
		DON	3-ADON	15-ADON
Testigo	ACA 320	0,391	3,123	0,037
	ACA 906	0,348	ND	ND
	AGP Fast	0,341	ND	0,034
	BioINTA 1005	0,096	2,020	0,034
	BioINTA 3005	0,419	ND	Trazas
	Baguette P 11	6,229	4,562	0,344
	SRM LE 2333	5,131	6,095	0,059
	SRM Nogal	0,815	ND	0,035
ICF	ACA 320	1,147	ND	0,036
	ACA 906	0,134	ND	0,176
	AGP Fast	0,457	ND	Trazas
	BioINTA 1005	0,313	ND	0,034
	BioINTA 3005	0,455	ND	0,035
	Baguette P 11	0,521	4,636	0,035
	SRM LE 2333	0,305	4,375	0,034
	SRM Nogal	0,160	6,660	0,034
ICF72	ACA 320	0,446	ND	0,034
	ACA 906	0,280	1,972	0,025
	AGP Fast	0,992	ND	ND
	BioINTA 1005	0,296	3,936	0,034
	BioINTA 3005	0,456	4,939	0,038
	Baguette P 11	0,207	ND	0,034
	SRM LE 2333	0,189	4,318	0,036
	SRM Nogal	1,140	ND	0,035

Tabla 9 Capacidad toxicogénica de las muestras de granos de trigo.

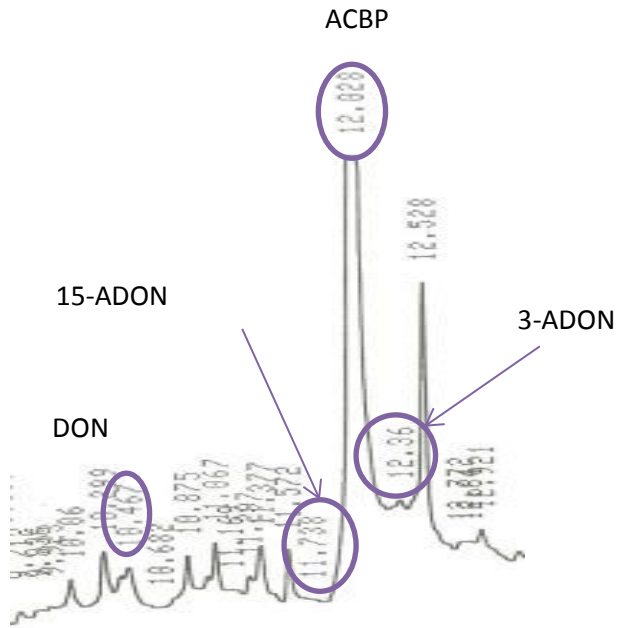


Figura 19 Cromatograma de la muestra Baguette P 11 Testigo

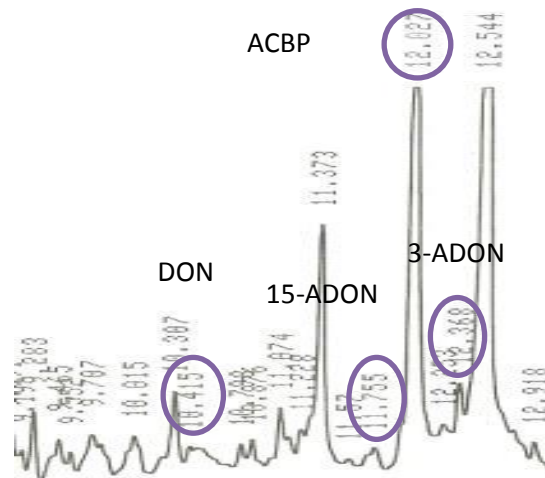


Figura 20 Cromatograma de la muestra SRM 2333 Inoculada con fungicida a las 72 horas

4.2.4 Límite de cuantificación.

El valor del límite de detección fue de 0,010 µg/g para DON, 3-ADON y 15-ADON, a una relación señal/ruido de 3. El límite de cuantificación es la mínima concentración cuantificable con una precisión y exactitud aceptable y se define como 3 veces el límite de detección, 0,030 µg/g.

4.2.5 Confirmación por GC-MS

Tal como se detalló en Materiales y Métodos, la confirmación de los tricotecenos se llevó a cabo por espectrofotometría de masa.

A continuación se presentan los cromatogramas de los estándares DON, 3-ADON y 15-ADON en las figuras 21, 22 y 23 respectivamente. Así como también de las muestras analizadas figura 24 y 25.

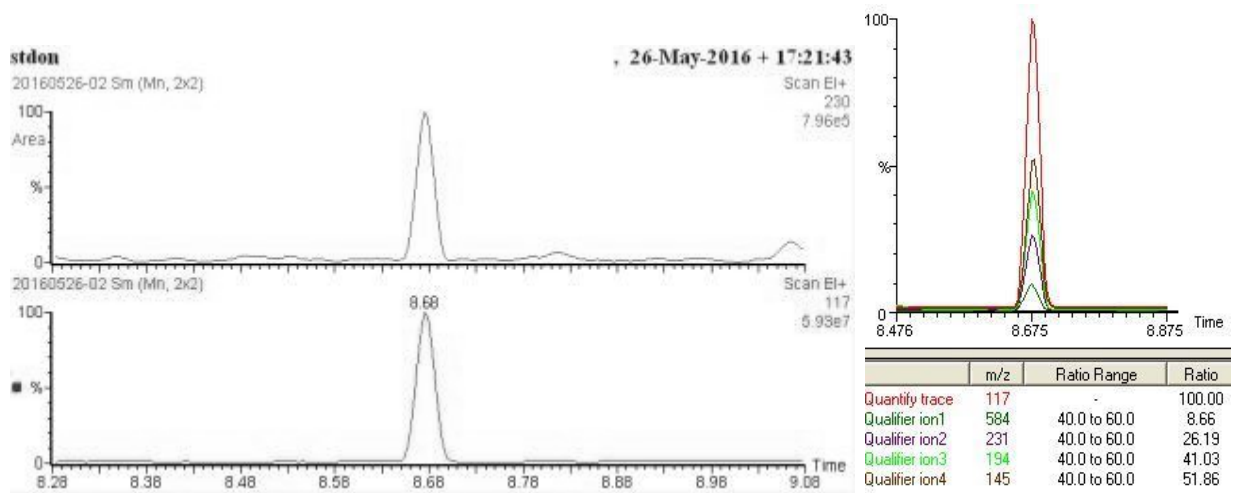


Figura 21 Cromatograma del estándar DON GCMS

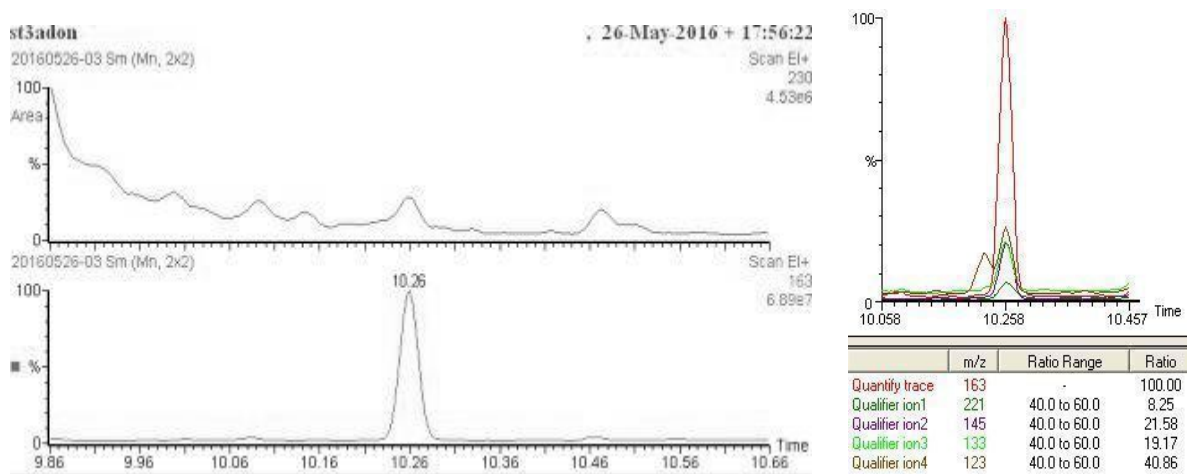


Figura 22 Cromatograma del estándar 3-ADON GCMS

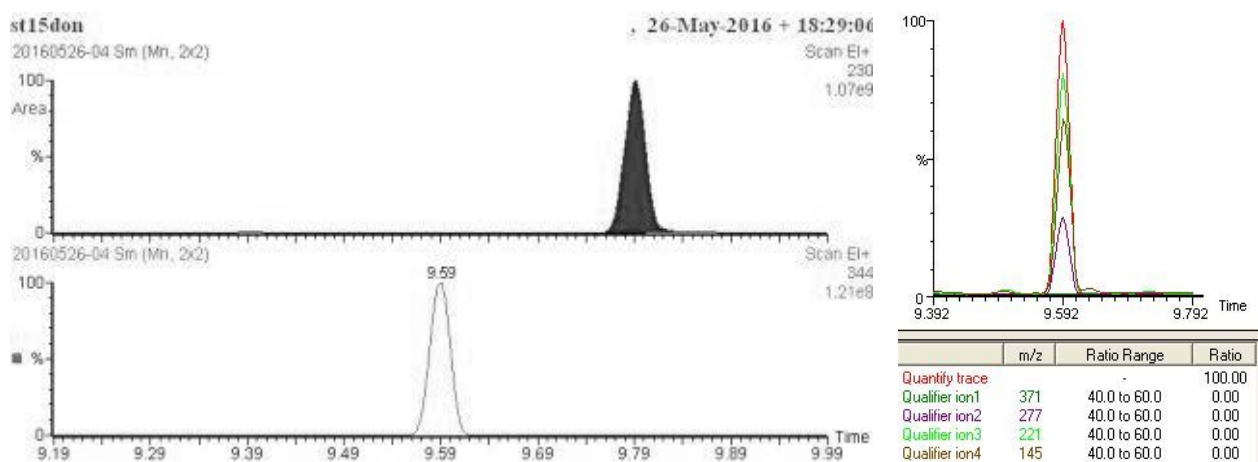


Figura 23 Cromatograma del estándar 15-ADON GCMS

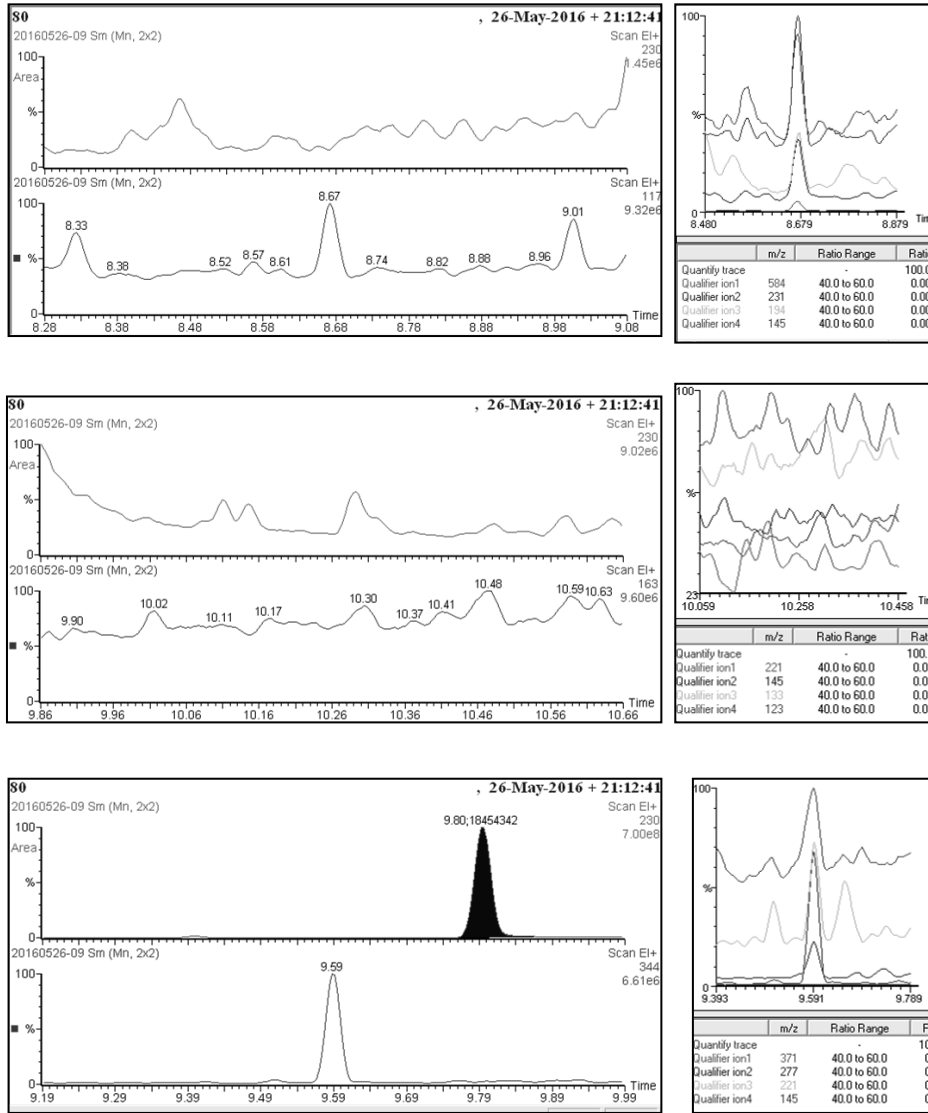


Figura 24 Cromatograma GCMS Muestra Baguette P 11 Testigo

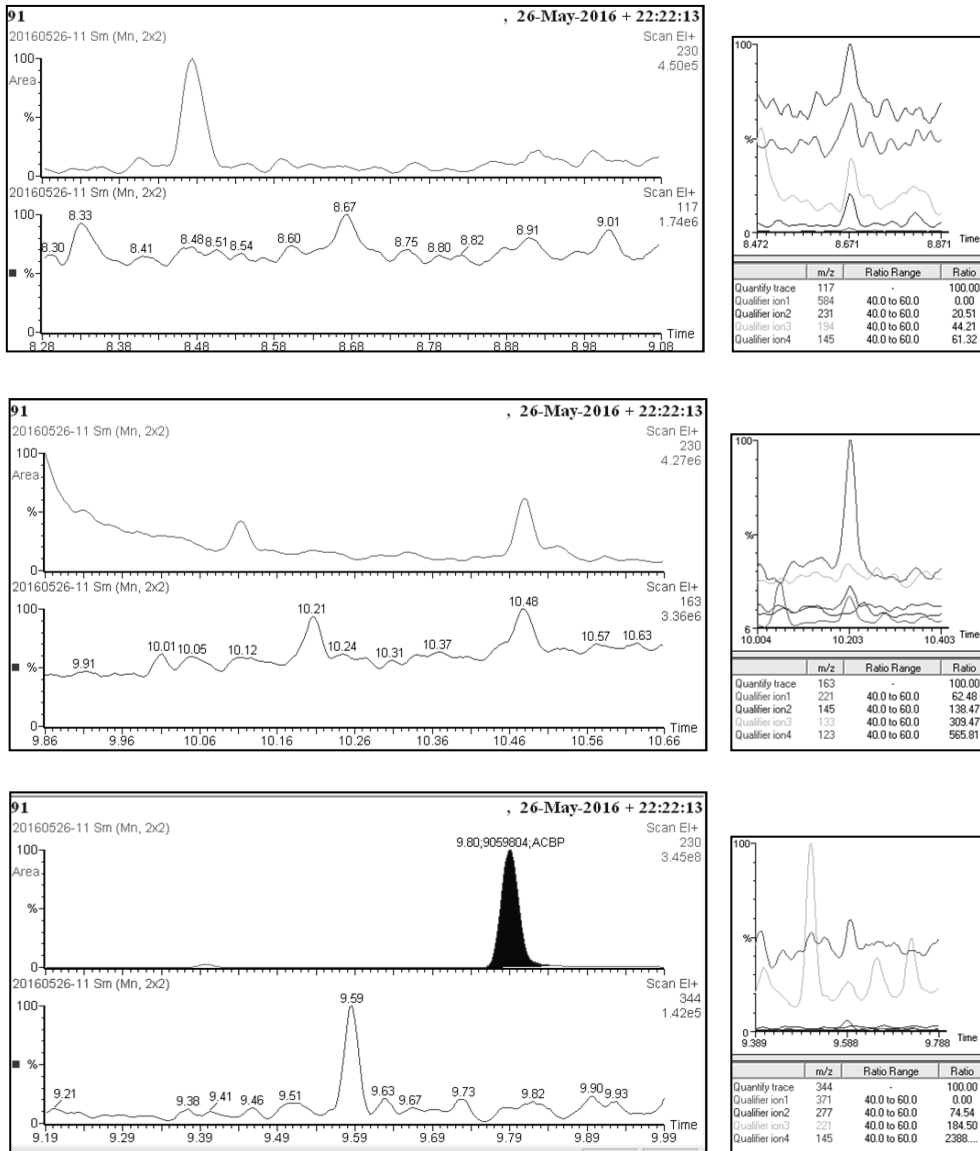


Figura 25 Cromatograma GCMS Muestra SRM 2333 Inoculada con fungicida a las 72 horas

4.3 Análisis estadístico

4.3.1 Análisis de toxinas en muestras testigo.

Los resultados del ANOVA para las muestras testigo respecto de la toxina DON indicaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0005$) entre las variedades como puede observarse en la tabla 10. Las variedades ACA 320, ACA 906, AGP Fast, BioINTA 1005, BioINTA 3005 y SRM Nogal fueron similares entre sí, con los menores valores (0,0956 – 0,815 ppm) en comparación a Baguette P 11 y SRM LE 2333 (6,229 y 5,131 ppm, respectivamente) que presentaron los mayores valores.

Los resultados del ANOVA para 3-ADON indicaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las variedades. BioINTA 1005 acumula la menor cantidad de toxina y es significativamente diferente de SRM LE 2333 (2,020 y 6,095 ppm, respectivamente) en la cual se obtiene el mayor valor.

Respecto de 15-ADON las variedades ACA 320, AGP Fast, BioINTA 1005, BioINTA 3005 y SRM Nogal presentaron los menores valores y diferencias significativas ($p < 0,0005$) respecto de las variedades Baguette P 11 y SRM LE 2333, que a su vez fueron diferentes entre sí, presentando Baguette P 11 el mayor valor. Cabe destacar que estas diferencias significativas son en rangos mucho menores que para DON y 3-ADON.

	DON ($\mu\text{g/g}$)		3-ADON ($\mu\text{g/g}$)		15-ADON ($\mu\text{g/g}$)	
ACA 320	0,391±0,001	a	3,123±1,077	ab	0,037±0,000	a
ACA 906	0,348±0,000	a	ND		ND	
AGP Fast	0,341±0,006	a	ND		0,034±0,000	a
Baguette P 11	6,229±0,818	b	4,562±1,575	ab	0,344±0,007	c
BioINTA 1005	0,096±0,070	a	2,020±0,226	a	0,034±0,000	a
BioINTA 3005	0,419±0,032	a	ND		0,028±0,013	a
SRM LE 2333	5,131±0,918	b	6,095±2,009	b	0,059±0,001	b
SRM Nogal	0,815±0,256	a	ND		0,035±0,000	a

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas

Tabla 10 Medias de producción de toxinas de las muestras testigo.

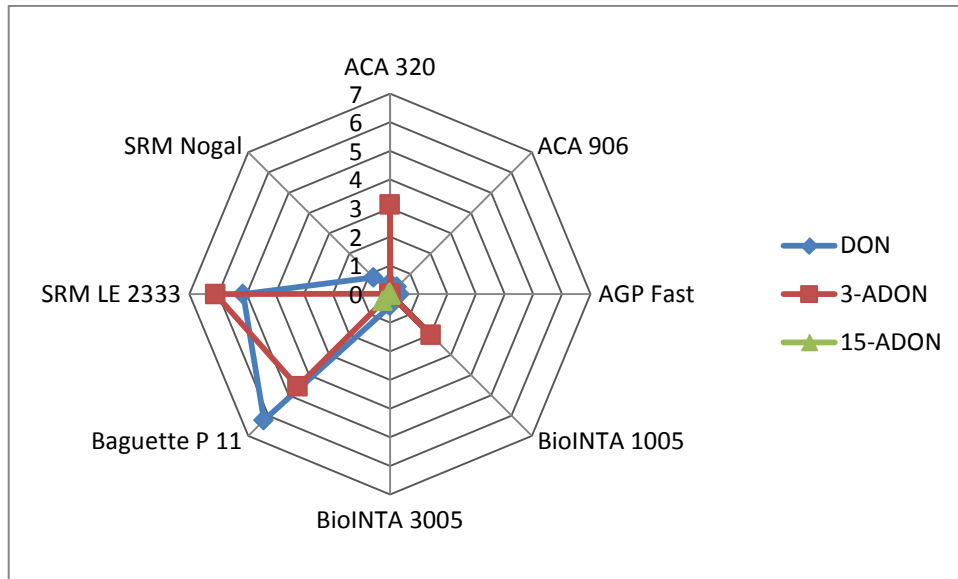


Gráfico 5 Producción de toxinas de las muestras testigo

Si bien existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto al contenido de DON en las variedades Baguette P11 y SRM 2333 en comparación al resto de las variedades (ACA 320, ACA 906, AGP Fast, BioINTA 1005, BioINTA 3005 y SRM Nogal), estas diferencias no resultaron significativas cuando se analizó la concentración de 3-ADON y 15-ADON. Pero pudo observarse que estas dos variedades poseen un comportamiento distinto al resto, puesto que acumularon la mayor cantidad de toxinas (DON, 3-ADON y 15-ADON). Y en función a este comportamiento es que seguimos el análisis considerando dos grupos de variedades: de mal comportamiento (Baguette P11 y SRM 2333) y de buen comportamiento (ACA 320, ACA 906, AGP Fast, BioINTA 1005, BioINTA 3005 y SRM Nogal).

4.3.2 Análisis de toxinas según el comportamiento varietal y tratamiento con fungicida.

El análisis continuó aplicando un diseño factorial de dos factores: comportamiento varietal (en función del contenido de micotoxinas) y tratamiento con fungicida. El factor comportamiento tuvo dos niveles (expresiones): mal y buen comportamiento y el factor tratamiento con fungicida consideró tres niveles: Testigo (T), Inoculado con inmediata aplicación de fungicida (ICF) e inoculado con aplicación de fungicida a las 72 horas (ICF72), lo cual puede observarse en la tabla 11.

Los resultados obtenidos para el diseño factorial para DON muestran que existe efecto del comportamiento varietal, observando que los mayores valores de DON correspondieron a las muestras granarias de variedades de trigo de mal comportamiento. No obstante, no se registraron diferencias significativas por el efecto del tratamiento con fungicida cuando se analizó el contenido

de DON. Esto podría deberse a la gran variabilidad de resultados obtenidos con respecto a las muestras utilizadas. Respecto a la interacción entre el comportamiento varietal y el tratamiento con fungicida, existen diferencias significativas siendo las muestras de buen comportamiento similares entre sí (Testigo, ICF e ICF72) y también similares a las muestras de mal comportamiento ICF pero distintas de las otras de mal comportamiento (testigo e ICF72) en especial del testigo que presenta los mayores valores. La comparación de medias múltiples se observaron por la prueba de Tamhane debido a la heterogeneidad de varianzas. MxICF72 tiene el menor valor dentro de todas las interacciones analizadas, lo que podría indicar que el efecto del fungicida fue contundente.

Respecto a 3-ADON también se ve una diferencia significativa en el comportamiento varietal, alcanzando los mayores valores las muestras de mal comportamiento varietal. No existe un efecto del tratamiento con fungicida, pero si hay interacción entre el tratamiento y el comportamiento. Aquí puede observarse, al igual que con los resultados de DON, que las muestras de buen comportamiento son similares entre sí (Testigo, ICF e ICF72) y también similares a las muestras de mal comportamiento x ICF, pero distintas de las otras de mal comportamiento (testigo e ICF72). MxICF72 muestra los mayores valores de 3-ADON dentro de las de mal comportamiento en comparación con el mínimo valor que se obtuvo en DON. Esto puede deberse a el gran número de muestras con valores ND. La comparación de medias múltiples se observaron por la prueba de Bonferroni ya que las varianzas fueron homogéneas.

Los resultados para 15-ADON no muestran efecto del comportamiento varietal, ni del tratamiento con fungicida y tampoco interacción entre el comportamiento varietal y el tratamiento con fungicida.

		DON (µg/g)	3-ADON (µg/g)	15-ADON (µg/g)
Comportamiento	Bueno	0,483±0,323 b	1,268±2,099 b	0,039±0,046
	Malo	2,097±2,664 a	4,000±2,220 a	0,090±0,157
Tratamiento	Testigo	1,721±2,388	1,982±2,443	0,073±0,100
	ICF	0,437±0,311	1,903±2,706	0,091±0,070
	ICF72	0,886±1,508	1,968±2,207	0,031±0,080
Comportamiento x tratamiento	BxTestigo	0,401±0,230 bc	1,122±2,560 b	0,030±0,090
	BxICF	0,445±0,350 b	1,815±2,200 b	0,057±0,078
	BxICF72	0,601±0,348 b	0,867±1,330 b	0,030±0,090
	MxTestigo	5,680±0,983 a	4,504±1,039 a	0,202±0,156
	MxICF	0,412±0,160 b	2,166±2,400 ab	0,035±0,001
	MxICF72	0,197±0,070 c	5,328±1,860 a	0,035±0,001

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas

Tabla 11 Medias del análisis factorial.

Los resultados obtenidos para el tratamiento no lograron mostrar diferencias significativas. Esto podría deberse a que el comportamiento de las variedades fue diferente. Por ello, a continuación, se evaluó el efecto de los tratamientos para cada una de las variedades de trigo por separado, los resultados se muestran en la tabla 12.

4.3.3 Análisis de toxinas para cada una de las variedades

Variedades	Tratamiento	DON ($\mu\text{g/g}$)	3-ADON ($\mu\text{g/g}$)	15-ADON ($\mu\text{g/g}$)
ACA 320	Testigo	0,391±0,001 b	3,123±1,077	0,037±0,001 a
	ICF	1,147±0,067 a	ND	0,036±0,001 a
	ICF72	0,446±0,044 b	ND	0,034±0,001 b
ACA 906	Testigo	0,348±0,001 a	ND	ND
	ICF	0,134±0,078 b	ND	0,176±0,161
	ICF72	0,280±0,001 a	1,972±0,678	0,025±0,010
AGP Fast	Testigo	0,341±0,006 c	ND	0,034±0,001
	ICF	0,457±0,029 b	ND	0,025±0,011
	ICF72	0,992±0,023 a	ND	ND
BioINTA 1005	Testigo	0,096±0,070 b	2,020±0,226	0,034±0,001
	ICF	0,313±0,058 a	ND	0,034±0,001
	ICF72	0,296±0,020 a	3,936±1,424	0,034±0,001
BioINTA 3005	Testigo	0,419±0,032	ND	0,028±0,013
	ICF	0,455±0,057	ND	0,035±0,001
	ICF72	0,456±0,008	4,939±1,706	0,038±0,001
SRM Nogal	Testigo	0,815±0,256 a	ND	0,035±0,001
	ICF	0,160±0,014 b	6,660±0,759	0,034±0,001
	ICF72	1,140±0,066 a	ND	0,035±0,001
Baguette P 11	Testigo	6,229±0,818 a	4,562±1,575	0,344±0,007 a
	ICF	0,521±0,057 b	4,636±1,601	0,035±0,001 b
	ICF72	0,207±0,012 b	ND	0,034±0,001 b
SRM LE 2333	Testigo	5,131±0,918 a	6,095±2,106	0,059±0,001 a
	ICF	0,305±0,151 b	4,375±0,298	0,034±0,001 b
	ICF72	0,189±0,113 b	4,318±0,687	0,036±0,001 b

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas

Tabla 12 Medias por variedad de cultivo de trigo.

Las variedades de buen comportamiento presentaron una respuesta errática respecto al momento de aplicación del fungicida, esto puede deberse a los bajos niveles de DON producidos en las muestras. Analizando el contenido de DON para las distintas variedades se observaron diferencias significativas en todas las variedades menos en BioINTA 3005. ACA 906 y SRM Nogal que presentaron

similar comportamiento. Las muestras ICF fueron significativamente diferentes y presentaron los menores valores respecto a las muestras ICF72. Y a su vez, las muestras testigo fueron similares a las ICF72. La variedad AGP fast también mostró similar comportamiento, ICF significativamente diferente de ICF72 con menores valores de toxina en ICF, pero su muestra testigo fue significativamente diferente de los dos tratamientos con fungicida. Por su parte la variedad ACA 320 también presentó diferencias significativas entre los tratamiento ICF e ICF72 pero con menores valores en ICF72 que a su vez no mostró diferencias significativas con la muestra testigo. En la variedad BioINTA 1005 no se observaron diferencias significativamente estadísticas entre las muestras ICF e ICF72 pero estas son diferentes de la muestra testigo que tienen los menores valores. Para las variedades de mal comportamiento Baguette P 11 y SRM LE 2333, las muestras testigo se diferenciaron significativamente de las muestras ICF e ICF72. A su vez estos dos tratamientos no mostraron diferencias significativas entre sí, pero presentaron los menores valores de toxinas respecto de las muestras testigo.

Respecto a los resultados de 3-ADON no se encontraron diferencias significativas en las variedades de trigo.

Observando los valores obtenidos para 15-ADON, se encontraron diferencias significativas en las variedades ACA 320, Baguette P 11 y SRM LE 2333. En la variedad ACA 320 (de buen comportamiento) los tratamientos testigo e ICF resultaron similares entre sí y diferentes del tratamiento ICF72, obteniendo para este último tratamiento los menores valores. En las variedades de mal comportamiento, Baguette P 11 y SRM LE 2333, las muestras testigo se diferenciaron significativamente de las muestras ICF e ICF72. A su vez estos dos tratamientos no mostraron diferencias significativas entre sí y obtuvieron los menores valores de toxinas respecto de las muestras testigo. Este comportamiento resultó similar al encontrado en la toxina DON para estas dos mismas variedades.

Según estudios basados en análisis químicos realizados en el área de cultivo de trigo de Argentina, aislamientos de *Fusarium graminearum* s.s., producían simultáneamente DON, 15-ADON y 3-ADON, y en algunos casos ambos acetilderivados eran producidos en cantidades similares (Fernández Pinto et al. 2008)(Alvarez et al. 2009). Esto pudo evidenciarse en los resultados obtenidos en el presente trabajo, ya que del total de los 4 aislamientos utilizados para inocular, 3 de ellos (LP2A, LP12C y LP16D) generaron las 3 toxinas (DON, 3-ADON y 15-ADON) y el aislamiento restante (LP17B) solo generó DON y 15-ADON. Con lo cual los aislamientos LP2A, LP12C y LP16D pertenecerían al quimiotipo 3 y 15-ADON y el aislamiento LP17B al quimiotipo 15-ADON.

Cuando se analizó el efecto de las variedades de trigo sobre la producción de tricotecenos, se observó que Baguette P 11 acumuló los mayores valores de DON (Testigo sin inoculación 6,229 µg/g). También esta variedad se consideró susceptible a la enfermedad (Índice de *Fusarium*: IF=42,8%) de acuerdo al análisis realizado por Alberione (Alberione, E. comunicación personal, 8 de abril de 2016). Con la variedad SRM LE 2333 no se repitió el mismo patrón de comportamiento respecto al complejo relación FET/DON. Esta variedad presentó altos valores de DON (5,131 µg/g), en contraste con el bajo IF (IF=5,9%, moderadamente resistente) registrado por Alberione. Esta discrepancia también pudo observarse en la variedad BioINTA 3005, la cual se clasificó como moderadamente susceptible de acuerdo a su alto valor de IF (IF=30,7%), mientras que su contenido de DON presentó valores menores a 0,5 µg/g. Estos resultados estarían indicando que las variedades tienen una respuesta diferente si se evalúa su comportamiento respecto al desarrollo de la enfermedad (IF) o si se evalúa la acumulación de toxinas. En relación al impacto del momento de aplicación de fungicidas sobre el control del complejo enfermedad/micotoxinas asociadas otros autores encontraron que el control óptimo del desarrollo de síntomas de la Fusariosis de la espiga se observó cuando el fungicida metconazole se aplicó en antesis (Tateishi et al. 2014). En cambio, para controlar la contaminación con micotoxinas, el momento óptimo de aplicación fue en grano lechoso. Resultados similares fueron alcanzados analizando aplicaciones de un fungicida (metil tiofanato: fungicida sistémico con actividad preventiva y curativa) en antesis y hasta 30 días pos-antesis (inoculación artificial y humidificador) (Yoshida et al. 2012).

Respecto al comportamiento de las variedades, se nota que los valores mayores tanto de DON, 3-ADON y 15-ADON se presentan en las variedades Baguette P 11 y SRM LE 2333. Otro resultado interesante se obtuvo al realizar el análisis factorial, las de mal comportamiento tuvieron menores valores de DON al aplicar el fungicida a las 72 horas de inoculadas. No así las de buen comportamiento, que presentaron un comportamiento errático.

En el período susceptible en el cual el lote de cultivo presenta espigas con anteras expuestas (25-30 días), epidemias severas se asocian a la ocurrencia de largos períodos de mojado (24 a 72 h) y temperaturas de 15 a 25°C (Reis & Carmona 2002). Los fungicidas aplicados en el período susceptible pueden ayudar a prevenir pérdidas económicas pero su eficacia depende del momento de aplicación y tecnología para lograr una buena cobertura de la espiga. Los fungicidas que se disponen deben aplicarse en forma preventiva (antes de que ocurran eventos infectivos) o semi-preventiva (máximo 2 a 3 días después del evento infectivo) (Annone 2003). Una estrategia de control racional puede basarse en el uso de modelos predictivos de la FET para alertar en tiempo real sobre la ocurrencia de condiciones meteorológicas favorables para la infección (en niveles severos) y de esta forma estar a

tiempo para el control químico pos-infección. En el presente trabajo, en especial para variedades que alcanzan altos valores de contaminación con micotoxinas (mal comportamiento), la respuesta a la aplicación de fungicida triazol pos infección (hasta 72 horas) fue promisorio. Coincidentemente, con otro autor, que con el fin de reducir la enfermedad y los niveles de DON encontró que aplicaciones de fungicidas triazoles realizadas hasta 6 días pos antesis pueden ser igual de efectivas o más que las hechas en antesis, para reducir la enfermedad (FET) y los niveles de DON (D'Angelo et al. 2014). Bajo un enfoque holístico, al momento de diseñar una racional estrategia de control del complejo fúngico/micotoxinas analizado, resulta relevante conocer la ventana temporal de aplicación de un fungicida, para un efectivo control de la enfermedad/micotoxinas. Aunque preliminares, los resultados obtenidos en esta tesis aportan en tal sentido.

5 CONCLUSIONES

- Las cuatro cepas utilizadas para inocular en campo corresponden a *Fusarium graminearum*. Tres de las cepas produjeron tres toxinas determinadas químicamente: DON, 3-ADON y 15-ADON. La cepa restante solo produjo dos toxinas determinadas químicamente: DON y 15-ADON.
- Pudo constatar la presencia de tricotecenos del tipo B en los granos de trigo de las muestras testigo siguiendo un patrón parecido al observado en las cepas utilizadas para inocular.
- En todas las muestras granarias se detectó DON. En la mayoría se halló 15-ADON en baja concentración. Con menor frecuencia se encontró 3-ADON aunque con valores muy superiores a los encontrados para DON y 15-ADON.
- La mayor acumulación de toxinas, DON, 3-ADON y 15-ADON, se encontró en las variedades Baguette P 11 y SRM LE 2333 (variedades de mal comportamiento respecto a la producción de micotoxinas), diferenciándose de las otras variedades caracterizadas como de buen comportamiento.
- En el estudio de interacción entre mal comportamiento y tiempos de aplicación del fungicida, resultó más eficiente (menor acumulación de DON) la aplicación de fungicida a las 72 horas.
- Las variedades de buen comportamiento presentaron una respuesta errática respecto al momento de aplicación del fungicida, esto puede deberse a los bajos niveles de DON producidos en las muestras.
- Las variedades de buen comportamiento, ACA 906, AGP Fast y SRM Nogal presentaron los menores valores de DON cuando fueron tratadas con el fungicida triazol aplicado inmediatamente a la inoculación, diferenciándose de las muestras fumigadas pasadas las 72 horas. Contrariamente la variedad ACA 320, también de buen comportamiento, presentó los menores valores de DON para aquellas muestras en las que se aplicó el fungicida a las 72 horas, diferenciándose de las muestras a las que se aplicó el fungicida al momento de la inoculación. Otra variedad de buen comportamiento, INTA 1005, no presentó diferencias en el contenido de DON al comparar los dos tiempos de aplicación del fungicida.

Los resultados del presente trabajo preliminar podrán ser utilizados para determinar el tiempo óptimo de aplicación de fungicidas para controlar la síntesis de micotoxinas en los granos. En especial cuando se siembran variedades de trigo de mal comportamiento respecto a la producción de DON, se deriva de este trabajo la posibilidad de ampliar la ventana de aplicación del fungicida por lo menos a 72 horas post inoculación en anthesis. De esta forma se evitaría el uso indiscriminado de agroquímicos (por aplicaciones preventivas), contribuyendo a minimizar los riesgos que producen sobre la salud humana y su impacto en el medio ambiente.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Tener en cuenta otros principios activos para utilizar como fungicida en la producción.
- Evaluar el efecto del fungicida teniendo en cuenta otros tiempos de aplicación respecto a la ocurrencia del evento de infección.
- Analizar realizar los ensayos sobre otras variedades de trigo.
- Investigar nuevas metodologías moleculares para determinar la capacidad de producir tricotecenos de los aislamientos.
- Todos estos datos permitirían ampliar la ventana de los tiempos de aplicación del fungicida para el control de la FET y producción de DON pudiendo flexibilizar la aplicación del fungicida varios días después de eventos de lluvia.

7 BIBLIOGRAFIA

- Abbas, H.K., Mirocha, C.J. & Shier, W.T., 1984. Mycotoxins produced from fungi isolated from foodstuffs and soil: Comparison of toxicity in fibroblasts and rat feeding tests. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(3), pp.654–661.
- Alconada Magliaro, T. & Kikot, G., 2013. Fungal Infection and Disease Progression. *Fusarium* spp. Enzymes Associated with Pathogenesis and Loss of Commercial Value of Wheat Grains. In T. Alconada Magliano & S. Chulze, eds. *Fusarium Head Blight in Latin America*. Springer, pp. 99–102.
- Alvarez, C.L., Azcarate, M.P. & Pinto, V.F., 2009. Toxigenic potential of *Fusarium graminearum* sensu stricto isolates from wheat in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 135, pp.131–135.
- Andersen, A.L., 1948. The development of *Gibberella-Zeae* headblight of wheat. *Phytopathology*, 38(8), pp.595–611.
- Annone, J.G., 2003. Particularidades del control químico de la FET. In *Seminario: problemas asociados a la Fusariosis en trigo y estrategias para su prevención*. Bolsa de Cereales de Buenos Aires.
- Anon, 2013. Trigo Argentino. Informe Institucional sobre su Calidad.
- Aoki, T. et al., 2012. Systematics, Phylogeny and Trichothecene Mycotoxin Potential of *Fusarium* Head Blight Cereal Pathogens. *Mycotoxins*, 32(2), pp.90–102.
- Arroyo-Manzanares, N. et al., 2014. *Control de micotoxinas en alimentos*, Available at: www.ugr.es/~fqm302/ [Accessed October 9, 2016].
- Bai, G. & Shaner, G., 2004. MANAGEMENT AND RESISTANCE IN WHEAT AND BARLEY TO FUSARIUM HEAD BLIGHT 1. *Annu. Rev. Phytopathol*, 42, pp.135–61.
- Bai, G. & Shaner, G., 1994. Scab of Wheat: Prospects for Control. *American Phytopathological Society*, 78 (8), pp.760–766. Available at: https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1994Articles/PlantDisease78n08_760.pdf [Accessed September 14, 2016].
- Berthiller, F. et al., 2007. Chromatographic methods for the simultaneous determination of

- mycotoxins and their conjugates in cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1–2), pp.33–37. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160507003832> [Accessed October 9, 2016].
- Berthiller, F. et al., 2005. Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1062(2), pp.209–216. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967304020205> [Accessed October 9, 2016].
- Bhavanishankar, T.N., Ramesh, H.P. & Shantha, T., 1988. Dermal toxicity of Fusarium toxins in combinations. *Archives of Toxicology*, 61(3), pp.241–244.
- Carmona, M., 2012. Alerta por fusariosis de la espiga en lotes con trigo - 27.10.2012 - LA NACION. *La Nación*.
- Castegnaro, M. & McGregor, D., 1998. Carcinogenic risk assessment of mycotoxins. *Revue de Medecine Veterinaire*, 149(6), pp.671–678.
- Cheikowski, J., 1989. *Topics in Secondary Metabolism. Fusarium Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity* J. Cheikowski, ed., Poland: Elsevier.
- Christensen, J.J., Stakman, E.C. & Immer, F.R., 1929. Susceptibility of wheat varieties and hybrids to fusarial head blight in Minnesota.
- Committee on Protection against Mycotoxins, 1983. *Protection Against Trichothecene Mycotoxins - Google Libros*, Washington.
- Croteau, S.M., Prelusky, D.B. & Trenholm, H.L., 1994. Analysis of Trichothecene Mycotoxins by Gas Chromatography with Electron-Capture Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(4), pp.928–933. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00040a018> [Accessed October 9, 2016].
- D’Angelo, D.L. et al., 2014. Efficacy of Fungicide Applications During and After Anthesis Against Fusarium Head Blight and Deoxynivalenol in Soft Red Winter Wheat. *APS Journal*, 98(10), pp.1387–1397.
- Desjardins, A.E., 2006. *Fusarium mycotoxins chemistry, genetics, and biology*, American Phytopathological Society.
- Desjardins, A.E., 2008. Natural product chemistry meets genetics: When is a genotype a chemotype? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

- Desjardins, A.N., Hohn, T.M. & McCormick, S.P., 1993. Trichothecene Biosynthesis in *Fusarium* Species: Chemistry, Genetics, and Significance. *American Society for Microbiology*, 57(3), pp.595–604.
- Eriksen, G.S., 2003. *Metabolism and Toxicity of Trichothecenes*. Available at: <http://pub.epsilon.slu.se/287/1/Thesis.pdf> [Accessed October 8, 2016].
- FAO, 2007. *Manual sobre la aplicación del sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas*,
- FAO, 2012. *Perspectivas alimentarias. Análisis del mercado mundial.*,
- FAO, 1999. *WHEAT: Post-harvest Operations*,
- FAO/OMS, 2011. ANTEPROYECTO DE NIVELES MÁXIMOS PARA EL DEOXINIVALENOL (DON) Y SUS DERIVADOS ACETILADOS EN LOS CEREALES Y PRODUCTOS A BASE DE CEREALES,
- Fernández Pinto, V., Patriarca, A. & Pose, G., 2013. Mycotoxins Associated to *Fusarium* Species that Caused *Fusarium* Head Blight in Wheat in Latin-America. In *Fusarium Head Blight in Latin America*. pp. 59–73.
- Fernández Pinto, V.E. et al., 2008. Natural occurrence of nivalenol and mycotoxigenic potential of *Fusarium graminearum* strains in wheat affected by head blight in Argentina. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(1), pp.157–162.
- Gale, L.R. et al., 2007. Population Subdivision of *Fusarium graminearum* Sensu Stricto in the Upper Midwestern United States. *Phytopathology*, 97(11), pp.1434–1439. Available at: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PHTO-97-11-1434> [Accessed October 8, 2016].
- Giroux, M.-E. et al., 2016. Evaluation of Forecasting Models for *Fusarium* Head Blight of Wheat Under Growing Conditions of Quebec, Canada. *Plant Disease*, 100(6), pp.1192–1201.
- González Montaner, J., 2004. Avances en el control de enfermedades en trigo. In *Congreso A Todo Trigo. Mar del Plata, Argentina Acta del Congreso*. pp. 43–54.
- Goswami, R.S. & Kistler, H.C., 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*, 5(6), pp.515–525.
- Guo, X.W., Fernando, W.G.D. & Seow-Brock, H.Y., 2008. Population Structure, Chemotype Diversity, and Potential Chemotype Shifting of *Fusarium graminearum* in Wheat Fields of Manitoba. *Plant Disease*, 92(5), pp.756–762. Available at: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-92-5-0756> [Accessed October 8, 2016].

- Ichinoe, M. et al., 1983. Chemotaxonomy of *Gibberella zeae* with Special Reference to Production of Trichothecenes and Zearalenone. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 46(6), pp.1364–1369.
- Ireta, J. & Gilchrist, S., 1994. *Roña o Tizón de la espiga del Trigo*, México D.F.
- Joffe, A.Z. & John Wiley & Sons, 1986. *Fusarium species: their biology and toxicology.*, New York: John Wiley & Sons New York USA.
- Kamimura, H. et al., 1981. Simultaneous detection of several *Fusarium* mycotoxins in cereals, grains, and foodstuffs. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 64(5), pp.1067–73.
- Khera, K.S. et al., 1982. Embryotoxicity of 4-deoxynivalenol (vomitoxin) in mice. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 29(4), pp.487–491.
- Kientz, C.E. & Verweij, A., 1986. Trimethylsilylation and Trifluoroacetylation of a number of trichothecenes followed by gas chromatographic analysis on fused-silica capillary columns. *Journal of Chromatography A*, 355, pp.229–240. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967301973194> [Accessed October 9, 2016].
- Kimura, M. et al., 2003. The trichothecene biosynthesis gene cluster of *Fusarium graminearum* F15 contains a limited number of essential pathway genes and expressed non-essential genes. In *FEBS Letters*.
- Kohli, M.M., 1989. Taller sobre la Fusariosis de la espiga en América del Sur. In M. M. Kohli, ed. México, D. F.: CIMMYT.
- Krause, R.A. & Massie, L.B., 1975. Predictive Systems : Modern Approaches to Disease Control. *Annual review of phytopathology*, 13, pp.31–47.
- Krska, R. et al., 2007. Determination of molar absorptivity coefficients for major type-B trichothecenes and certification of calibrators for deoxynivalenol and nivalenol. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388(5–6), pp.1215–1226. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-007-1369-x> [Accessed October 9, 2016].
- Krska, R., Baumgartner, S. & Josephs, R., 2001. The state-of-the-art in the analysis of type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 371(3), pp.285–299. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s002160100992> [Accessed October 9, 2016].
- Krska, R. & Molinelli, A., 2009. Rapid test strips for analysis of mycotoxins in food and feed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(1), pp.67–71. Available at:

- <http://link.springer.com/10.1007/s00216-008-2424-y> [Accessed October 9, 2016].
- Langseth, W. & Rundberget, T., 1998. Instrumental methods for determination of nonmacrocytic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. *Journal of Chromatography A*, 815(1), pp.103–121. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967398003884> [Accessed October 9, 2016].
- Langseth, W. & Rundberget, T., 1999. The occurrence of HT-2 toxin and other trichothecenes in Norwegian cereals. *Mycopathologia*, 147, pp.157–165. Available at: <http://sci-hub.cc/10.1023/A:1007153416269>.
- Lee, T. et al., 2002. Tri13 and Tri7 Determine Deoxynivalenol- and Nivalenol-Producing Chemotypes of *Gibberella zeae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), pp.2148–2154.
- Leonard, K.J. & Bushnell, W.R., 2003. *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*,
- Leslie, J.F. & Summerell, B.A., 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*, Blackwell.
- Martínez, M.I., 2009. *Efecto del ambiente sobre la intensidad de la Fusariosis de la espiga de trigo y el contenido de Deoxinivalenol en grano*.
- Mazzilli, S., Pérez, C. & Ernst, O., 2011. Una alternativa para optimizar el uso de fungicidas para controlar fusariosis de espiga en trigo. *Agrociencia Uruguay*, 15(2), pp.60–68.
- McCormick, S.P. et al., 2011. Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins*, 3(12), pp.802–814.
- Miller, J.D., 1991. Fungi and Mycotoxins in Stored Products. In B. R. Champ et al., eds. *Significance of Mycotoxins for Health and Nutrition* . p. 126.
- Mirocha, C.J. et al., 1976. Natural Occurrence of Fusarium Toxins in Feedstuffl. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 32(4), pp.553–556.
- Morrissey, R.E., Norred, W.P. & Vesonder, R.F., 1985. Subchronic toxicity of vomitoxin in Sprague-Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology*, 23(11), pp.995–999.
- Morrissey', R.E. & Vesonder2, R.F., 1985. Effect of Deoxynivalenol (Vomitoxin) on Fertility, Pregnancy, and Postnatal Development of Sprague-Dawley Rats. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 49(5), pp.1062–1066.
- Moschini, R.C. et al., 2002. ENFOQUE FUNDAMENTAL-EMPÍRICO PARA ESTIMAR LA EVOLUCIÓN DEL INDICE DE FUSARIUM EN TRIGO. *RIA*, 31, pp.39–53. Available at: <http://www.redalyc.org/pdf/864/86431304.pdf> [Accessed September 14, 2016].

- Moschini, R.C. et al., 2016. Validación de sistemas de pronóstico del impacto de la Fusariosis de la espiga en cultivares de trigo. *Meteorológica*, 41(1), pp.37–46.
- Moschini, R.C. & Fortugno, C., 1996. Predicting wheat head blight incidence using models based on meteorological factors in Pergamino, Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, 102(3), pp.211–218.
- Moschini, R.C., Martinez, M.I. & Sepulcri, M.G., 2013. Modeling and Forecasting Systems for Fusarium Head Blight and Deoxynivalenol Content in Wheat in Argentina. In T. M. Alconada Magliano & S. N. Chulze, eds. *Fusarium Head Blight in Latin America*. pp. 205–227. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84928854391&partnerID=tZOtx3y1>.
- Moss, M.O., 1989. Mycotoxins of *Aspergillus* and other filamentous fungi. *Journal of Applied Bacteriology*, 67, p.69s–81s. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.1989.tb03771.x> [Accessed October 8, 2016].
- Moss, M.O., 1998. Recent studies of mycotoxins. *Symposium series (Society for Applied Microbiology)*, pp.62–76.
- Nelson, P.E., 1991. History of Fusarium systematics. *Phytopathology*, 81(9), pp.1045–1048. Available at: http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1991Articles/phyto81n09_1045.pdf.
- Nelson, P.E., Dignani, M.C. & Anaissie, E.J., 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of Fusarium species. *Clinical Microbiology Reviews*, 7(4), pp.479–504. Available at: <http://cmr.asm.org/content/7/4/479.abstract> [Accessed September 29, 2016].
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A. & Marasas, W.F.O., 1983. *Fusarium species : an illustrated manual for identification*, Pennsylvania State University Press.
- Nielsen, K.F. & Thrane, U., 2001. Fast methods for screening of trichothecenes in fungal cultures using gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 929(1–2), pp.75–87. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967301011748> [Accessed October 9, 2016].
- O’Donnell, K. et al., 2004. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the Fusarium graminearum clade. *Fungal Genetics and Biology*.
- O’Donnell, K. et al., 2000. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and

- reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 97(14). Available at: <http://www.pnas.org/content/97/14/7905.short>.
- Osweller, G.D. et al., 1993. Effects of fumonisin-contaminated corn screenings on growth and health of feeder calves. *Journal of animal science*, 71, pp.459–466.
- Pacin, A., 1988. Micotoxicosis por tricotecenos en la población humana. *Hospital de niños de Buenos Aires*, xxx(127), pp.45–51.
- Pacin, A., 1991. Seminario Internacional de Micotoxinas. In *Las micotoxinas como factor de riesgo para la salud humana*. Bogota, Colombia, pp. 87–108.
- Parry, D.W., Jenkinson, P. & McLord, L., 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals. *Plant Pathology*, 44(2), pp.207–238.
- Pereyra, S. & Acosta, Y., 2014. *Guía para el manejo de la FUSARIOSIS DE LA ESPIGA EN TRIGO*,
- Del Ponte, E.M. et al., 2004. Giberela do trigo - Epidemiological aspects and forecast models. *Fitopatologia Brasileira*, 29(6), pp.587–605.
- Prelusky, D.B. et al., 1992. Effect of deoxynivalenol on neurotransmitters in discrete regions of swine brain. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 22(1), pp.36–40.
- Ramirez, M.L., Chulze, S. & Magan, N., 2004. Impact of environmental factors and fungicides on growth and deoxinivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentinian wheat. *Crop Protection*, 23, pp.117–125. Available at: http://ac.els-cdn.com/S026121940300190X/1-s2.0-S026121940300190X-main.pdf?_tid=8b712cba-84b4-11e6-a4bb-00000aab0f6c&acdnat=1474982345_f3c1c423a1e2cbf811611705d3d9cde4 [Accessed August 17, 2016].
- Reis, E.M. & Carmona, M., 2002. *Fusariosis del trigo. Biología, epidemiología y estrategias para su manejo.*, Buenos Aires: BASF Argentina S.A.
- Ren, Y. et al., 2007. Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1143(1–2), pp.48–64. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967306023880> [Accessed October 9, 2016].
- Reynoso, M.M. et al., 2013. Population Structure of *Fusarium graminearum* Species Complex Genotypes and Chemotypes in Relation to Trichothecenes Production. In T. M. Alconada Magliano & S. N. Chulze, eds. *Fusarium Head Blight in Latin America*. pp. 3–13.

- Reynoso, M.M. et al., 2011. Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* strains isolated from wheat in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 145(2–3), pp.444–448. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160511000274> [Accessed October 8, 2016].
- Simpson, D.R. et al., 2001. Differential control of head blight pathogens of wheat by fungicides and consequences for mycotoxin contamination of grain. *European Journal of Plant Pathology*, 107(4), pp.421–431. Available at: <http://download.springer.com/static/pdf/757/art%25253A10.1023%25252FA%25253A1011225817707.pdf?originUrl=http%253A%252F%252Flink.springer.com%252Farticle%252F10.1023%252FA%253A1011225817707&token2=exp=1474986730~acl=%252Fstatic%252Fpdf%252F757%252Fart%2525253A10.1023%2525252FA%2525253A1011>.
- Sirkka, U. et al., 1992. Acute Neurobehavioural Toxicity of Trichothecene T-2 Toxin in the Rat. *Pharmacology & Toxicology*, pp.11–14.
- Starkey, D.E. et al., 2007. Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity. *Fungal Genetics and Biology*.
- Suga, H. et al., 2008. Molecular Characterization of the *Fusarium graminearum* Species Complex in Japan. *APS*, 98(2), pp.159–166.
- Tateishi, H. et al., 2014. Effect of application timing of metconazole on *Fusarium* head blight development and mycotoxin contamination in wheat and barley. *J. Pestic. Sci*, 39(1), pp.1–6.
- Ueno, Y., 1983. *Trichothecenes: Chemical, biological, and toxicological aspects*, Elsevier Science Ltd.
- Ueno, Y. & Hsieh, D.P.H., 1985. The Toxicology of Mycotoxins. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 14(2), pp.99–132.
- USDA, 2017a. *Wheat Data: Yearbook Tables*,
- USDA, 2017b. *Wheat Outlook June 2017*.
- Velazquez, P., 2012. *Efecto de la fusariosis de la espiga del trigo (Fusarium graminearum y Fusarium spp.) en un cultivar susceptible.*,
- Villar de Galich, M.T., 2002. Fusariosis de la espiga de Trigo. Desarrollo de Cultivares Resistentes. Available at: <http://www.redagraria.com.ar/divulgaci%F3n t%E9cnica/articulos de dt/fu> [Accessed August 17, 2016].
- Wang, J., Fitzpatrick, D.W. & Wilson, J.R., 1993. EFFECT OF DIETARY T-2 TOXIN ON BIOGENIC

- MONOAMINES IN DISCRETE AREAS OF THE RAT BRAIN. *Fd Chem. Toxic*, 31(3), pp.191–197.
- Ward, T.J. et al., 2007. An adaptive evolutionary shift in *Fusarium* head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America. *Fungal Genetics and Biology*.
- Wetter, M.T. et al., 1999. Occurrence and distribution of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol in sweet corn ears. *Food Additives and Contaminants*, 16(3), pp.119–124. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/026520399284163> [Accessed October 9, 2016].
- De Wolf, E.D. & Isard, S.A., 2007. Disease Cycle Approach to Plant Disease Prediction. *Annual Review of Phytopathology*, 45(1), pp.203–220. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143329> [Accessed September 20, 2016].
- Xu, X.-M. et al., 2008. Relationship Between the Fungal Complex Causing *Fusarium* Head Blight of Wheat and Environmental Conditions. , 98(1).
- Yang, L. et al., 2008. *Fusarium* Populations on Chinese Barley Show a Dramatic Gradient in Mycotoxin Profiles. *APS*, 98(6), pp.719–727.
- Yoshida, M. et al., 2012. Effect of the Timing of Fungicide Application on *Fusarium* Head Blight and Mycotoxin Contamination in Wheat.
- Zadoks, J.C., Chang, T.T. & Konzak, C.F., 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, 14(6), pp.415–421. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x> [Accessed October 28, 2016].
- Zoldan, S.M., 2008. *Regioes de risco, caracterizacao da antese em cereais de inverno e sistema de alerta para a Giberela, em trigo.*

8 ANEXOS

AGAR AFRECHO

Afrecho de trigo	40 g
Agar	20 g
Agua destilada	1 litro

Tabla 13 Medio de cultivo: Agar Afrecho

SPEZIELLER NÄHRSTOFFARMER AGAR (SNA)

KH ₂ PO ₄	1 g
KNO ₃	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
KCl	0.5 g
Glucosa	0.2 g
Sacarosa	0.2 g
Agar	20 g
Agua destilada	1 litro

Tabla 14 Medio de cultivo: SNA

AGAR AGUA (AA)

Agar	20 g
Agua destilada	1 litro

Tabla 15 Medio de cultivo: Agar Agua

Micotoxina	Tiempo de retención (min)	Masa de fragmentos (m/z)
NIV	9,01	153 229 244 257 358 371 525 598 696
DON	9,76	117 145 231 194 259 343 371 584
15-ADON	10,86	133 145 221 277 344
3-ADON	11,30	123 163 221
ACBP	11,05	230

Tabla 16 Tiempo de retención y fragmentos de los iones más característicos de cada una de las micotoxinas por Cg-MS.