

## **Incidencia de hongos del complejo *Fusarium graminearum* y acumulación de Deoxinivalenol en líneas de trigo**

Incidence of fungi from the *Fusarium graminearum* complex and accumulation of Deoxynivalenol in strains of wheat

**Andrea Alejandra Arrúa Alvarenga<sup>1\*</sup>, Juliana Moura Mendes<sup>1</sup>, Cinthia Carolina Casal Martínez<sup>1</sup>, Christian Eduardo Dujak Riquelme<sup>1</sup>, Danilo Fernández Ríos<sup>2</sup>, Rosa María Oviedo de Cristaldo<sup>1</sup> y Man Mohan Kohli<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas, Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica, Universidad Nacional de Asunción. San Lorenzo, Paraguay.

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción. San Lorenzo, Paraguay.

<sup>3</sup> Instituto de Biotecnología Agrícola (INBIO) y Cámara Paraguaya de Exportadores y Comercializadores de Cereales y Oleaginosas (CAPECO). Asunción, Paraguay.

\* Autor para correspondencia (aaarrua@gmail.com)

Recibido: 18/03/2014; Aceptado: 21/05/2014.

### **RESUMEN**

Los hongos del complejo *Fusarium graminearum* son uno de los principales problemas del cultivo del trigo a nivel mundial, debido a que ocasionan pérdidas de rendimiento y producen micotoxinas perjudiciales para la salud humana y animal. El método más eficaz para la solución de estos problemas es la prevención de la contaminación. No existen en la actualidad variedades que presenten resistencia total a estos patógenos. Es importante la identificación de variedades con potencial de resistencia en programas de mejoramiento genético. Se estudiaron *in vitro* 15 líneas avanzadas del Programa de Investigación en Trigo provenientes de Capitán Miranda, Itapúa; estas líneas presentaban infección natural a campo de hongos del Complejo *Fusarium graminearum*. La incidencia de hongos y la acumulación de Deoxinivalenol fueron evaluadas mediante análisis de varianza, comparación de medias por el test de Tukey y correlación de Spearman. Se identificaron dos líneas avanzadas de trigo con potencial de resistencia tipo III y tres con potencial de resistencia tipo V. No se encontró correlación entre la incidencia de hongos del Complejo *Fusarium graminearum in vitro* y la acumulación de Deoxinivalenol en las líneas estudiadas.

**Palabras clave:** *Triticum aestivum*, contaminación, *in vitro*, micotoxinas, resistencia.

### **ABSTRACT**

Fungi members of the *Fusarium graminearum* complex are one of the main problems in wheat crops worldwide because they cause loss of yield and produce mycotoxins harmful to human and animal health. The most effective method for the solution of these problems is to avoid contamination of the crops. Currently there are no varieties with total resistance to these pathogens. It is important to identify varieties that show potential for the development of resistance in breeding programs. Fifteen advanced lines from the Wheat Research Program from Captain Miranda were studied *in vitro*; all of them naturally infected with *Fusarium graminearum* complex in the field. Fungi incidence and accumulation of Deoxynivalenol were analyzed for variance and means were compared using Tukey test and Spearman correlation. Two varieties with type III potential resistance and three with type V potential resistance were identified. No correlation was found between the incidence of the *Fusarium graminearum* complex *in vitro* and the accumulation of Deoxynivalenol.

**Key words:** *Triticum aestivum*, *in vitro*, contamination, mycotoxins, resistance.

## INTRODUCCIÓN

El trigo se ha situado como el cultivo clave para los meses de invierno ya que aporta millones de dólares anuales al patrimonio nacional. En el campo y como parte del sistema de rotación de cultivos, contribuye con una gran cantidad de rastrojos de excelente calidad para cubrir el suelo, lo que ha permitido instalar el sistema de siembra directa en nuestro país (CAPECO 2012).

Entre los patógenos más importantes asociados a este cultivo se encuentra el género *Fusarium*. Este hongo es capaz de sobrevivir en restos de cultivo de trigo y otros cereales, así como en otras especies de gramíneas y malezas (INIA 2002).

Las especies de *Fusarium* constituyen un grupo cosmopolita de hongos filamentosos que están ampliamente distribuidos en el suelo y colonizan partes subterráneas y aéreas de las plantas, residuos vegetales y otras matrices orgánicas.

Un problema asociado a estas especies es la producción de metabolitos secundarios tóxicos, llamados micotoxinas, responsables de síndromes llamados micotoxicosis en humanos y animales, que ocurren al ingerir productos contaminados por ellos (Gómez 2008, Marín García 2010, Walter et al. 2010). El principal metabolito tóxico asociado a especies del complejo *Fusarium graminearum* es el Deoxinivalenol (Cabañes et al. 2007, Leslie y Summerell 2006).

El incremento de la utilización de prácticas de laboreo de conservación ha sido reportado como una de las principales causas de epidemias de fusariosis de la espiga en países como EEUU y Canadá (INIA 2002). La identificación de especies del género es compleja; no existe un sistema taxonómico unificado, de modo que existen autores que reconocen treinta especies y otros más de sesenta (Cabañes et al. 2007). La clasificación se basa en diferencias microscópicas que en muchos casos pueden ser muy sutiles y variables según las condiciones de crecimiento de los cultivos. La fusariosis de la espiga es una enfermedad importante en Paraguay; afecta la producción de grano y su calidad, y el daño más significativo es la producción de micotoxinas. En los últimos años se ha incrementado la presencia de la enfermedad en el país, principalmente debido a cambios en los sistemas de producción. Las especies de *Fusarium* sp. reportadas en nuestro país son *Fusarium graminearum*, *F. semitectum*, *F. avenaceum*, *F. equiseti* y

*F. culmorum* (Quintana y Morel 2004), siendo la especie predominante *F. graminearum* con una frecuencia de 90%.

Trabajos previos indican que Deoxinivalenol es la micotoxina de mayor relevancia en este cultivo en Paraguay, encontrada en 100% de las muestras analizadas en concentraciones que variaron de 0,247 a 10,13 ppm (Quintana 2004, Quintana y Morel 2004). Para el control de la fusariosis de la espiga el método más eficaz es la prevención de la contaminación.

La resistencia a la fusariosis de la espiga se da a distintos niveles: I resistencia a la infección, II resistencia a la dispersión en la espiga (Schroeder y Christensen 1963), III resistencia a la infección del grano, IV tolerancia a la infección y V resistencia a la acumulación de Deoxinivalenol (Miller et al. 1985, Mesterházy 2002).

Para iniciar un programa de mejoramiento genético de germoplasma tolerante a la fusariosis de la espiga y a la acumulación de Deoxinivalenol es necesario identificar líneas nacionales con potencial para este fin. Por estas razones, tanto sanitarias como económicas, se planteó el estudio de la incidencia de hongos del complejo *Fusarium graminearum* en líneas avanzadas del Programa de Investigación en Trigo, en función a las resistencias tipo III y V, a fin de seleccionar líneas potencialmente tolerantes a la fusariosis de la espiga y a la acumulación de Deoxinivalenol a partir de la incidencia *in vitro* para ser probados en ensayos de campo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras fueron proveídas por el Programa de Investigación en Trigo del Centro de Investigación de Capitán Miranda, Itapúa, dependiente del Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria (IPTA), del periodo agrícola 2013.

Para este estudio se mantuvieron los códigos proveídos. Se estudiaron muestras de grano y espigas de trigo de 15 líneas avanzadas, consideradas a partir de ensayos de campo como potencialmente resistentes a la fusariosis de la espiga.

Las muestras fueron etiquetadas y transportadas en condiciones adecuadas al Laboratorio de Biotecnología del Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas, Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica, Universidad Nacional de

Asunción (CEMIT, DGICT, UNA), en el Campus Universitario, San Lorenzo. Las muestras luego fueron trilladas, desinfestadas con Hipoclorito de Sodio al 3% y enjuagadas con agua destilada estéril. Una vez secas fueron sembradas en placas de Petri con Papa Dextrosa Agar (PDA) por duplicado y colocadas en cámara de crecimiento a 22°C y luz constante. A los 7 días se analizaron las placas a través de la observación de características macro y micromorfológicas de las colonias por medio de microscopio compuesto (Leslie y Summerell 2006).

Todos los hongos con características pertenecientes al género *Fusarium* fueron aislados y purificados. Por medio de diluciones seriadas se realizaron cultivos monoconidiales. Para la identificación a nivel de especie fue utilizada la clave de Leslie y Summerell (2006). Las colonias unicelulares fueron sembradas en placas con *Spezieller* Nährstoffarmer Agar (SNA) y posteriormente transvasadas a placas con PDA para medir el crecimiento y observar la coloración de las colonias, y a placas con SNA y Agar clavel (CLA) para observar características conidiales y medir macro y micro conidias (Leslie y Summerell 2006). Se determinaron las especies presentes y se calculó la frecuencia absoluta de hongos del complejo *Fusarium graminearum* en cada línea estudiada (Marasas et al. 1988) mediante el uso del paquete estadístico Infostat (Di Rienzo et al. 2013). Se calculó el porcentaje de incidencia de las especies presentes en las muestras colectadas, se realizó análisis de varianza y se utilizó el Test de Tukey al nivel de significancia de 0,05.

Para clasificar las líneas a partir de su resistencia y susceptibilidad se utilizó la escala para evaluar la fusariosis en grano (Kohli 1989). Se cuantificó el nivel de Deoxinivalenol (DON) en las muestras por inmunofluorescencia mediante el uso de Vertu Lateral Flow Reader, de Vicam Technologés, siguiendo las

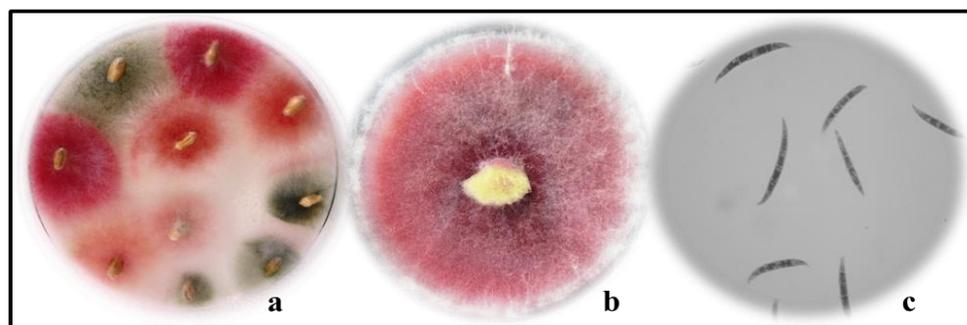
instrucciones del manual del fabricante (VICAM 2011). Se analizó la correlación entre la incidencia y la acumulación de DON en ppm en las líneas estudiadas por medio del Coeficiente de Spearman.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron un total de 59 aislados identificados como pertenecientes al complejo *Fusarium graminearum* en las muestras analizadas, siguiendo las indicaciones de la clave de Leslie y Summerell (2006) (Figura 1).

La incidencia in vitro de hongos del Complejo *Fusarium graminearum* en líneas avanzadas de trigo fue variable (Tabla 1). En el 6,66% de ellas no se detectó la presencia de estos patógenos. Se identificaron además otras especies como *Fusarium culmorum*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium verticilloides*. Éstas coinciden con las reportadas por Quintana y Morel (2004). Dichos autores indicaron que *Fusarium graminearum* estuvo presente en 90% de las muestras analizadas, siendo el hongo de mayor incidencia. Las especies identificadas coinciden con reportes de Argentina, Brasil y Uruguay que indican que el Complejo *Fusarium graminearum* es el predominante (Del Ponte et al. 2004, Carranza et al. 2008, Stenglein et al. 2012, Faria et al. 2012).

Se observaron diferencias significativas en las muestras analizadas. De acuerdo con Kohli (1989), a los intervalos de porcentajes de incidencia en grano se los categorizó como inmune, moderadamente resistente, susceptible y muy susceptible (Tabla 1). De acuerdo a los resultados obtenidos, las líneas PIT02 y PIT48 se presentan como potencialmente resistentes a la fusariosis de la espiga en referencia a la resistencia tipo III, resistencia a la infección del grano (Kohli 1989, Miller et al. 1985, Mesterházy 2002, Boutigny et al. 2008).



**Figura 1.** a: Micobiota de granos de trigo en PDA; b: Observación de la coloración y velocidad de crecimiento de *F. graminearum* en PDA; c: Micromorfología de Conidias del complejo *Fusarium graminearum* en SNA, 40x. San Lorenzo, Paraguay, 2013.

**Tabla 1.** Comparación de medias y categorización de líneas según la incidencia de hongos del Complejo *Fusarium graminearum*, San Lorenzo, Paraguay, 2012.

Línea	Incidencia (%)	Categorización de Resistencia tipo III <sup>†</sup>		
PIT02	0,00	A <sup>††</sup>		
PIT48	10,00	A	B	Moderadamente resistente
PIT16	30,00	A	B	C
PIT28	30,00	A	B	C
PIT23	30,00	A	B	C
PIT26	40,00	A	B	C
PIT35	40,00	A	B	C
PIT05	40,00	A	B	C
PIT34	40,00	A	B	C
PIT17	40,00	A	B	C
PIT38	50,00		B	C
PIT47	50,00		B	C
PIT32	60,00			C
PIT24	60,00			C
PIT36	70,00			C

<sup>†</sup> Según escala para evaluar la *Fusariosis* en grano (Kohli 1989); <sup>††</sup> medias con una letra común no son significativamente diferentes por el Test de Tukey ( $p>0,05$ ).

El Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) ha identificado a esta enfermedad como la principal limitante para la producción de trigo, ya que a los problemas en rendimiento se le suma la acumulación de micotoxinas en granos (Xu 2003).

Entre las líneas de trigo analizadas en relación a la acumulación de Deoxinivalenol, tres de ellas (PIT02, PIT17 Y PIT24) expresaron potencial de resistencia tipo V, tolerancia a la acumulación de DON (Tabla 2). Los resultados obtenidos no coinciden con lo observado por Quintana (2004), en un trabajo realizado con variedades comerciales, en el que se detectaron concentraciones de DON en 100% de las muestras analizadas, que variaron de 0,247 a 10,13 ppm. DON es la micotoxina de mayor relevancia en el cultivo del trigo en Paraguay (Quintana 2004, Quintana y Morel 2004). Esto indica que el uso de nuevas variedades comerciales que no acumulen DON se torna cada vez más importante, por tanto es necesaria la búsqueda de fuentes de resistencia tipo V en los materiales con los que se cuenta en el país actualmente.

Para número de muestras analizadas *in vitro*, no se encontró correlación entre la incidencia de hongos del Complejo *Fusarium graminearum* y la acumulación de Deoxinivalenol.

**Tabla 2.** Comparación de medias de acumulación de Deoxinivalenol (DON) en líneas de trigo. San Lorenzo, Paraguay, 2012.

Línea	DON (ppm)	Categorización de Resistencia tipo III <sup>†</sup>		
PIT24	0,00	A <sup>†</sup>		
PIT17	0,00	A		
PIT02	0,00	A		
PIT23	0,31	A	B	C
PIT38	0,61	A	B	C
PIT48	0,64	A	B	C
PIT32	0,66	A	B	C
PIT36	0,72	A	B	C
PIT26	0,77	A	B	C
PIT05	0,79	A	B	C
PIT35	0,80		B	C
PIT47	0,83		B	C
PIT16	0,84		B	C
PIT28	0,92		B	C
PIT34	1,14		B	C

<sup>†</sup> Medias con una letra común no son significativamente diferentes por el test de Tukey ( $p>0,05$ ).

## CONCLUSIONES

La incidencia de hongos del complejo *Fusarium graminearum* es alta en las líneas estudiadas. Asimismo, existen entre las líneas avanzadas del Programa de Investigación en Trigo materiales con potencial de resistencia a la infección de *Fusarium graminearum* en grano y la acumulación de Deoxinivalenol. Para resultados más concluyentes es necesaria la realización de ensayos con un mayor número de muestras e infecciones forzadas a nivel de invernadero.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Boutigny, AL; Richard-Forget, F; Barreau, C. 2008. Natural mechanisms for cereal resistance to the accumulation of *Fusarium trichothecenes*. *European Journal of Plant Pathology* 121(4): 411-423.
- Cabañes, F; Abarca, L; Bragulat, R; Castella, G. 2007. *Micotoxinas en alimentos*. España, Ediciones Díaz de Santos. 425 p.
- CAPECO (Cámara Paraguaya de Exportadores y Comercializadores de Cereales y Oleaginosas). 2012. Proyecto Fortalecimiento de la Investigación y Difusión del Cultivo de Trigo en Paraguay (en línea). Consultado el 23 de nov. 2013. Disponible en <http://www.capeco.org.py/>
- Di Rienzo, JÁ; Casanoves, F; Balzarini, MG; González, L; Tablada, M; Robledo, CW. 2013. Grupo InfoStat, InfoStat versión 2013 (en línea) Córdoba, AR. Consultado 22 ago. 2013. Disponible en <http://www.InfoStat.com.ar>
- Carranza, M; Lori, G; Sisterna, M. 2008. Wheat fusarium head blight 2001 epidemic in the southern Argentinian pampas. *Summa Phytopathologica* 34(1):93-94.
- Faria, CB; Almeida-Ferreira, GC; Gagliardi, KB; Alves, TCA; Tessmann, DJ; Machinski Junior, M; Barbosa-Tessmann, IP. 2012. Use of the polymerase chain reaction for detection of *Fusarium graminearum* in bulgur wheat. *Food Science and Technology (Campinas)* 32(1):201-208.
- Gómez, D. 2008. Caracterización de cepas toxigénicas del género *Fusarium* mediante técnicas de biología molecular. Valencia, Universidad Politécnica de Valencia. 256 p.
- INIA La estanzuela (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, UR). 2002. Fusariosis de la espiga del trigo y cebada. Colonia, UY, INIA. 27 p. (Seminario Discusión Técnica).
- Kohli, MM. 1989. Taller sobre la fusariosis de la espiga en América del Sur. México, D.F., CIMMYT. 144 p.
- Leslie, JF; Summerell, BA. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Ames, Iowa, Wiley-Blackwell, 388 p.
- Marasas, WFO; Burgess, LW; Anelich, RY; Lamprecht, SC; Van Shalkwyk, DJ. 1988. Survey of *Fusarium* species associated with plant debris in South African soils. *South African Journal of Botany* 54(1):63-71.
- Marín García, P. 2010. Análisis de factores ecofisiológicos que influyen en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de toxinas en especies de *Fusarium*. Tesis Doctoral en Biología. Madrid, Universidad Complutense de Madrid. 233 p.
- Mesterházy, Á. 2002. Role of Deoxynivalenol in Aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and in Resistance to Fusarium Head Blight. *European Journal of Plant Pathology* 108(7): 675-684.
- Miller, JD; Young, JC; Sampson, DR. 1985. Deoxynivalenol and Fusarium Head Blight Resistance in Spring Cereals. *Journal of Phytopathology* 113(4):359-367.
- Del Ponte, EM; Fernandes, JMC; Pierobom, CR; Bergstrom, GC. 2004. Giberela do trigo: aspectos epidemiológicos e modelos de previsão. *Fitopatologia Brasileira* 29(6):587-605.
- Quintana, Ly Morel, W. 2004. Especies de *Fusarium* que afectan a semillas de trigo en Paraguay: avances y resultados de la investigación del trigo en el Paraguay. Itapúa, PY, MAG/DISE-APROSEM. 328 p.
- Quintana, L. 2004. Toxinas de *Fusarium* en semilla de trigo en el Paraguay: avances y resultados de la investigación del trigo en el Paraguay. Itapúa, PY, MAG/DISE-APROSEM. 335 p.
- Schroeder, HW; Christensen, JJ. 1963. Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*. *Phytopathology* 53:831-838.

- Stenglein, SA; Dinolfo, MI; Bongiorno, F; Moreno, MV. 2012. Respuesta del trigo (*Triticum* spp.) y la cebada (*Hordeum vulgare*) a *Fusarium poae*. *Agrociencia* 46(3):299-306.
- VICAM. 2011. DON-V Instruction Guide. Milford, MA, Waters Corporation. 8 p.
- Walter, S; Nicholson, P; Doohan, FM. 2010. Action and reaction of host and pathogen during *Fusarium* head blight disease. *New Phytologist* 185(1):54-66.
- Xu, X. 2003. Effects of environmental conditions on the development of fusarium ear blight. *European Journal of Plant Pathology* 109(7):683-689.