FENOTIPADO DE LINEAS DE MAIZ POR CARACTERES ASOCIADOS A LA RESISTENCIA A LAS PODREDUMBRES DE ESPIGAS CAUSADAS POR FUSARIUM Y GIBBERELLA

Trabajo Final de Grado
del alumno

GERMAN ANDRES AVALOS SALEMME

Este trabajo ha sido presentado como requisito
para la obtención del título de

Ingeniero Agrónomo

Carrera

Ingeniería Agronómica

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino, 26/11/2021

FENOTIPADO DE LINEAS DE MAIZ POR CARACTERES ASOCIADOS A LA RESISTENCIA A LAS PODREDUMBRES DE ESPIGAS CAUSADAS POR FUSARIUM Y GIBBERELLA

Trabajo Final de Grado

del alumno

GERMAN ANDRES AVALOS SALEMME

Aprobada por el Tribunal Evaluador

(Nombre y Apellido) **Evaluador**	(Nombre y Apellido) **Evaluador**	(Nombre y Apellido) **Evaluador**

(Gerardo Mario Giomi) **Co-Director**	(Daniel Alberto Presello) **Director**

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires

Pergamino, 26/11/2021

AGRADECIMIENTOS

A mi director de Tesis Daniel Presello por haber confiado en mí, y haberme seleccionado para participar de una comisión de estudio en el INTA, que más tarde me permitiría realizar mi trabajo final de grado. Pero principalmente por haberme colmado de conocimientos y pasión con su predisposición y capacidad de transmitir su experiencia.

A mi codirector de Tesis Gerardo Giomi por haberme ayudado en gran parte de mi trabajo, siempre con buena onda y predisposición.

A la UNNOBA por haberme brindado educación pública y de calidad, y a sus profesores que con su gran vocación transmiten día a día sus conocimientos. También por haberme permitido conocer nuevas personas con la que hoy en día mantengo una amistad.

Al INTA Pergamino (Laboratorio de semillas, laboratorio de biotecnología, y al área de mejoramiento de maíz), por haberme brindado el espacio y la colaboración por parte del personal de dichos sitios.

A mis padres (Andrea y Gerardo) que siempre me inculcaron la educación y por hacer posible con su esfuerzo y apoyo incondicional, que cumpla mi meta.

Y a mí actual familia con quien compartí gran parte de mi carrera, me apoyaron con mucho amor en todos estos años e hicieron posible este sueño, Daiana, (Lola, Mini y Silvestre) 🐾 gracias…

INDICE

CONTENIDO

RESUMEN 1
INTRODUCCIÓN 3
HIPOTESIS 9
OBJETIVO GENERAL 9
OBJETIVOS ESPECIFICOS 9
PALABRAS CLAVE 10
MATERIALES Y METODOS 10
Materiales Genéticos 10
Ensayo a campo 10
Espesor y concentración de fenilpropanoides en el pericarpio 12
Análisis Estadístico 14
RESULTADOS 15
Pruebas de normalidad 15
Resistencia a podredumbres de espiga 15
Espesor y concentración de fenilpropanoides en el pericarpio 21
DISCUSIÓN 27
BIBLIOGRAFIA 30
ANEXOS 35

FENOTIPADO DE LINEAS DE MAIZ POR CARACTERES ASOCIADOS A LA RESISTENCIA A LAS PODREDUMBRES DE ESPIGAS CAUSADAS POR FUSARIUM Y GIBBERELLA

RESUMEN

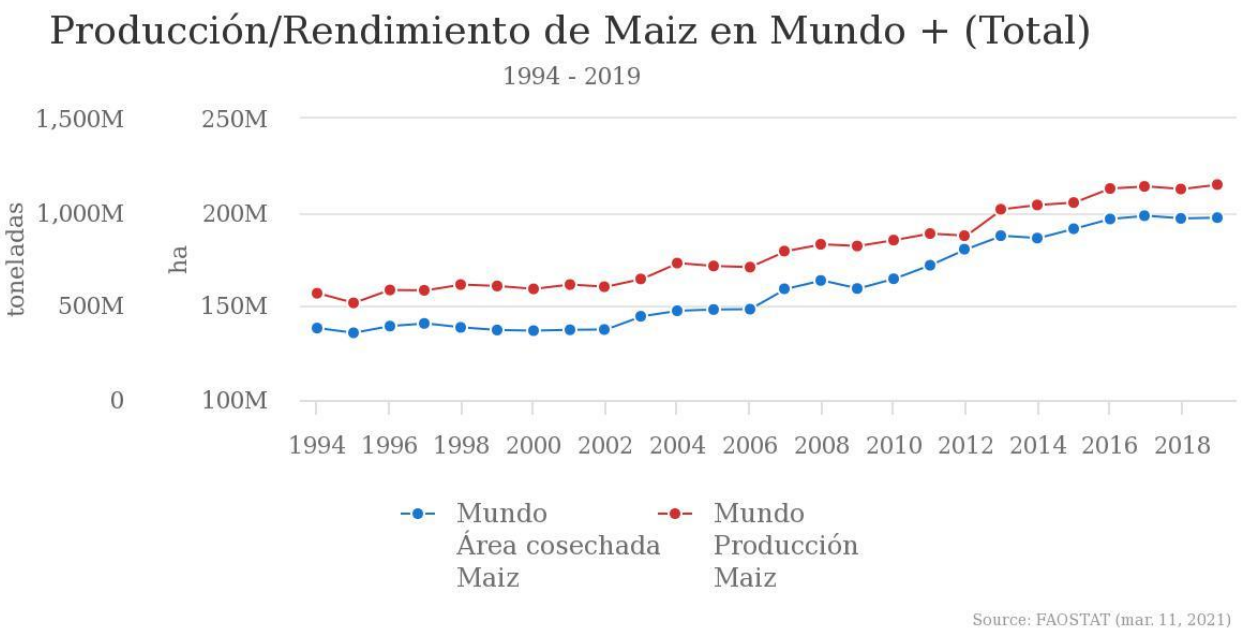
El maíz (*Zea mays* L.) es afectado por varias especies de hongos patógenos, entre ellos: *Fusarium verticillioides* y *Fusarium graminearum.* Ambas especies provocan podredumbres en las espigas y ocasionan perdidas en el rendimiento y la calidad de los granos. Debido a que estos hongos son productores de micotoxinas, y conllevan un riesgo para la salud tanto humana como animal, limitar la síntesis por parte de los hongos es fundamental. Una de las estrategias es desarrollar y promover el uso de materiales genéticos menos susceptibles a las podredumbres de espiga. Se ha demostrado que esa susceptibilidad esta inversamente relacionada con el espesor y concentración de fenilpropanoides del pericarpio de los granos, por lo que estas componentes de resistencia también fueron motivo de determinación en el presente trabajo. En investigaciones previas se detectó un QTL para resistencia a ambas especies de *Fusarium* en el cromosoma 2, *bin* 2.03, de una población segregante del cruzamiento de una línea moderadamente resistente (LP4637) y una muy susceptible (L4674). En esta región se encuentra un gen (*pal* 2) que codifica para la enzima fenilalanina amonio liasa (*PAL)*, interviniente en la ruta metabólica de los fenilpropanoides y otros compuestos que fortalecen la pared celular. A fin de probar el efecto de este segmento en otros fondos genéticos, se realizaron retrocruzas con las líneas recurrentes LP918 y LP564 (susceptibles) y la línea resistente donante del QTL (LP4637). Las líneas segregantes, los parentales y el testigo susceptible (L4674) fueron sembrados en el INTA en la EEA Pergamino bajo infección natural e inoculados con los dos hongos, dispuestos en un diseño en bloques completos aleatorizados con arreglo factorial (genotipo x tratamiento). A cosecha (espiga con aproximadamente 20% de humedad) se evaluó la severidad de síntomas a partir del área de espiga visiblemente afectada por micelio de todas las plantas de cada parcela y se prosiguió con el análisis estadístico mediante análisis de variancia, comparación de medias a través del test LSD de Fisher, y Correlación de Pearson. Se analizó la variabilidad y las medias de la severidad de síntomas de los materiales genéticos, pudiéndose notar que la introgresión de genes del donante resistente

mejoró la reacción a las enfermedades ya que algunas líneas segregantes mostraron menores síntomas que ambos padres recurrentes. En cuanto a los componentes de resistencia, fueron evaluados en base a una investigación anterior, solo en las líneas derivadas de LP564 y si bien se observó variabilidad en el espesor de pericarpio y concentración de fenilpropanoides (ácido trans-ferúlico (tFA), ácido p-cumárico (pCA) y ácido 5,5′-diferúlico (5,5′ DFA)) el análisis de correlación de la sintomatología de las dos enfermedades solo mostró una asociación negativa con espesor de pericarpio y concentración de pCA, indicando en principio que en estos materiales genéticos serian estos caracteres los que estarían relacionados con la resistencia a las podredumbres de espiga. De acuerdo a estos resultados podría confirmarse la efectividad del QTL descripto, extender su estudio, y así poder continuar con un programa de mejora genética.

INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es una especie anual monocotiledónea, perteneciente a la familia de las Poáceas. Actualmente, es el cereal con el mayor volumen de producción a nivel mundial, superando al trigo y al arroz. Los últimos datos disponibles según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) muestran que en el año 2019 se produjeron 1.148,5 millones de toneladas en alrededor de 197 millones de hectáreas. El nivel de producción mundial y el área cosechada en el periodo (1994-2019) se pueden observar en la Figura 1 (FAO, 2020).

Figura 1: nivel de producción mundial y área cosechada.



Para el año 2050 se estima que se tendrán que producir alimentos para 9.100 millones de habitantes, para lo que es necesario preservar áreas ricas en biodiversidad y servicios ecosistémicos (FAO, 2009). Para cumplir con estos objetivos necesitamos alcanzar altos rendimientos en cada hectárea de tierra cultivada, maximizando la eficiencia de uso de los recursos y haciendo un buen uso y desarrollo de las tecnologías. El crecimiento y el rendimiento de las plantas dependen de la disponibilidad de agua, luz y nutrientes, y son afectados por factores ambientales como la temperatura y la radiación. Las causas más comunes de pérdidas de productividad son las enfermedades bióticas, los estreses

abióticos (producidos por algún factor del ambiente que propicia condiciones extremas para el crecimiento y desarrollo normal de la planta), las malezas y las plagas de origen animal (aves, roedores, moluscos, artrópodos). (Agrios, 2005)

El maíz es afectado por diferentes tipos de enfermedades en distintos momentos del ciclo, en distintos órganos de la planta, impidiendo el desarrollo normal del cultivo y por ende provocando pérdidas en el rendimiento y la calidad. Las enfermedades bióticas son producidas por hongos, procariontes (bacterias y micoplasmas) y virus. De estas últimas, las enfermedades provocadas por hongos son las que presentan mayor prevalencia en el campo. (Agrios, 2005)

Uno de los síntomas producidos por ciertas enfermedades fúngicas son las podredumbres de espigas, las cuales afectan el rendimiento del cultivo de dos maneras: en primer lugar, como una pérdida directa del rendimiento, las espigas infectadas por estas enfermedades pueden estar muy degradadas o tener granos significativamente más livianos, lo que resulta en menos kg/ha. El segundo impacto se debe a la penalización al momento de la comercialización por no cumplir con ciertas normas de calidad (Pannar, 2020). Más allá de las pérdidas económicas que ocasionan las podredumbres de espigas al momento de la comercialización, el efecto sobre la inocuidad alimentaria es posiblemente el principal problema que trae aparejado. En el proceso de invasión de los tejidos del grano, estos hongos producen metabolitos contaminantes conocidos como micotoxinas, moléculas orgánicas biológicamente activas que causan intoxicaciones agudas, subagudas o crónicas en poblaciones que consumen esos granos, o derivados contaminados, ya que las micotoxinas no se eliminan mediante ningún proceso de la cadena productiva (FAO, 2003).

Existen varios microrganismos causales de podredumbres de espigas con condiciones predisponentes variables. El conocimiento de cada factor se presenta como una oportunidad para manejar la enfermedad y así adelantarse a un problema potencial.

Dos de los patógenos principales que causan podredumbres de espiga y provocan un daño considerable son: *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg, teleomorfo: *Gibberella moniliformis* (Wineland) y *Fusarium graminearum* (Schwabe), teleomorfo: *Gibberella zeae* (Schwein) Petch. Los mismos pertenecen según Agrios (2005) a la subdivisión: Ascomycotina y causan, respectivamente las podredumbres por Fusarium y Gibberella de

la espiga del maíz. Cabe destacar que estos hongos además de afectar las espigas provocan podredumbres de tallo y tizón en las plántulas (Programa de Maíz del CIMMYT, 2004). *F. verticillioides* es el patógeno más común y limitante de la productividad del maíz en todo el mundo (De la Torre-Hernández *et al*. 2014). El daño en espiga se manifiesta principalmente en granos individuales o en ciertas áreas de la espiga (Anexo, Figura 2). Los granos infectados desarrollan un moho algodonoso o rayas blancas (estriado) en el pericarpio (Anexo, Figura 3) y suelen germinar estando aún sobre la espiga. Para el caso de *F. graminearum,* el primer signo de la infección es la formación de micelio blanco, que va descendiendo desde la punta de la espiga y cambiando de coloración para dar una tonalidad rosada a los granos afectados (Anexo, Figura 4).

Estos hongos sobreviven durante el invierno en semilla, suelo, malezas, cultivos de invierno y/o rastrojos en los que se encuentra el inóculo inicial para producir las infecciones causantes de podredumbres de espiga. Utilizan múltiples rutas de entrada a la planta para colonizar los tejidos (Anexo, Figura 5), incluyendo: 1) Infección sistémica de las plántulas, que ocurre durante la germinación de la semilla y a lo largo del establecimiento de la plántula para luego afectar tejidos de planta adulta. 2) Infección de la espiga por medio de los estigmas. El inóculo, conformado por conidios, es transportado por vía aérea depositándose en los estigmas sobre los que germina y crece hacia el interior colonizando los tejidos. De esa forma se facilita el acceso a las células del pericarpio y las hifas del hongo crecen en la superficie de la cutícula para acceder al grano, a través de la parte inferior del canal estilar, incluso en ausencia de lesiones mecánicas (Duncan y Howard, 2010). 3) Infección del tallo y la espiga por daño mecánico. Varios insectos plagas del maíz al alimentarse de estos órganos de la planta proporcionan un daño mecánico que funciona como ruta de entrada para los conidios. Además, actúan dispersando el hongo ya que se mantienen en la superficie externa de algunos de estos insectos. El efecto de los insectos sobre las podredumbres de espigas, se puede evidenciar con los maíces genéticamente modificados que incorporan los eventos de resistencia a lepidópteros ya que se puede ver que estos presentan una menor incidencia y severidad de pudrición por *Fusarium*. (Munkvold *et al*. 1997).

Estas enfermedades endémicas en maíz reducen el rendimiento (Presello *et al*. 2008), y la calidad de los granos ya que producen la contaminación con micotoxinas. Dentro del género

Fusarium, las micotoxinas de mayor relevancia son las fumonisinas (FBs) producidas por *F. verticillioides* y deoxinivalenol (DON) y zearalenona (ZEA) producidas por *F. graminearum*. Estas micotoxinas causan graves intoxicaciones tanto para animales (Nowak *et al*. 2015) como para el ser humano (Kumi *et al*. 2014).

Las FBs están catalogadas según la Agencia internacional de Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) como posibles carcinógenos humanos. Se han identificado varios tipos de moléculas, incluyendo FB1, FB2 y FB3, que son las que se encuentran en mayor predominancia en los granos de maíz (Munkvold y Desjardins, 1997). Las FB1 son causantes del síndrome de edema pulmonar en cerdos (Harrison *et al*. 1990) y leucoencefalomalacia en caballos (Roos *et al*. 1992), entre otras enfermedades y complicaciones.

El DON es un metabolito perteneciente a la familia de los tricotecenos, potentes inhibidores de la síntesis de proteínas en eucariotas (Rocha *et al*. 2005). La intoxicación aguda por esta micotoxina se caracteriza por producir vómitos, pérdida de peso y diarrea particularmente en el ganado porcino (Rotter *et al*. 1996), además se puede producir necrosis en varios tejidos.

La ZEA es una micotoxina que causa alteraciones en el tracto reproductivo de animales, además por su efecto estrogénico, produce la disminución de la fertilidad, resorción fetal y cambios en el peso de las glándulas endocrinas y de los niveles de hormonas del suero (Suzuki *et al*. 2007).

Debido a los riesgos mencionados anteriormente, los niveles de tolerancia de estas micotoxinas se encuentran regulados, es decir existen límites legales para la concentración de micotoxinas en grano. La Comisión Europea ha establecido un nivel máximo de 350 µg/kg (ppb) para ZEA, 1,75 mg/kg (ppm) para DON y 4 mg/kg (ppm) para FB1 + FB2 en el maíz sin procesar para el consumo humano (Commission Regulation (EC) N° 1126/2007). La Food and Drug Administration de los EE.UU. recomienda rangos máximos para granos destinados a forraje de entre 1 y 5 ppm para DON, menos de 500 ppb para ZEA y rangos máximos de entre 5 y 50 ppm para fumonisinas, dependiendo de la especie, la edad, y el sexo del animal. Los granos o derivados que superen dichos límites no son autorizados

para el consumo, por lo que la reducción de la contaminación con estas micotoxinas son motivo de gran preocupación.

Una de las mejores opciones para reducir esta contaminación es limitar la biosíntesis por parte del hongo durante el desarrollo del cultivo en el campo. Existen medidas de manejo, como reducir la presencia de inoculo natural en rastrojos, utilizar rotaciones de cultivos, reducir daños en espigas por insectos o aves, adelantar la cosecha y usar cultivares menos susceptibles, entre otras. Teniendo en cuenta que uno de los principales factores que influyen en el desarrollo fúngico y la producción de toxinas es el rango de susceptibilidad de los genotipos (Edwards, 2004), desarrollar y promover el uso de cultivares menos susceptibles a las podredumbres de espiga es una de las estrategias de manejo más efectiva para estas enfermedades.

La resistencia a estas enfermedades es un carácter determinado por varios genes de efecto mayormente aditivo (Robertson-Hoyt *et al.* 2006). Se han realizado investigaciones que demuestran que el espesor de pericarpio y la concentración de fenilpropanoides del pericarpio del grano específicamente ácidos hidroxicinámicos [(ácido trans-ferúlico (tFA), ácido cis-ferúlico (cFA), ácido p-cumárico (pCA), ácido 8,5′-diferúlico forma benzofurano (8,5′ DFA bz), ácido 8,5′-diferúlico (8,5′ DFA), ácido 8-O-4′-diferúlico (8O4 DFA), ácido 8,8′-diferúlico (8,8′ DFA), ácido 5,5′-diferúlico (5,5′ DFA)) (fenilpropanoides detectados en el pericarpio de granos de 11 genotipos de maíz evaluados por Sampietro *et al*. (2012))] son dos componentes claves en la resistencia a la enfermedad, donde genotipos con mayor espesor de pericarpio (Hoenisch y Davis, 1994) o mayor concentración de fenilpropanoides (Sampietro *et al.* 2012) expresarían menor susceptibilidad a la enfermedad. El pericarpio es la parte estructural más externa del grano y su espesor generalmente es variable (Wolf *et al*. 1959), además se caracteriza por un elevado contenido de fibra cruda, aproximadamente el 87%, producto de los compuestos que conforman la pared celular, como son la celulosa, hemicelulosa, lignina, pectinas, proteínas y compuestos intermediarios derivados de la vía de los fenilpropanoides. Fundamentalmente, la pared celular da forma y tamaño a las células, pero también les confiere cierta capacidad de resistencia mecánica y de defensa (Azcón-Bieto y Talón, 2008). Varios de sus componentes tienen un papel importante en la resistencia a plagas y enfermedades; aunque, los mecanismos de defensa son muy complejos y varían entre plantas de la misma especie,

diferentes tejidos o incluso el mismo tejido en diferentes etapas de desarrollo. Por lo tanto, comprender el papel de estos constituyentes en la resistencia de la pared a distintos estreses puede permitir modificar los cultivos para aumentar su resistencia (Santiago *et al*. 2013). La lignina constituyente de la pared celular tiene una función principal de soporte estructural y de resistencia en las plantas. Es un producto de la ruta metabólica de los fenilpropanoides (Anexo, Figura 6) y está constituida por tres monolignoles (alcohol p coumaryl (H), alcohol coniferílico (G) y alcohol sinapílico (S)) unidos entre sí por enlaces éster o carbono-carbono (Azcón-Bieto y Talón, 2008; Santiago *et al*. 2013). Se ha demostrado que aumentando la lignificación de la pared celular, ésta se vuelve más resistente a la disolución por enzimas fúngicas (Ride, 1980) obstaculizando el crecimiento del hongo. No obstante, los precursores de la lignina y los radicales libres producidos durante la polimerización también pueden aumentar la resistencia al inactivar las membranas, enzimas, toxinas y desencadenantes fúngicos, de modo que no solo un mayor contenido de lignina es sinónimo de mayor resistencia (Funnell y Pedersen, 2006; Santiago *et al*. 2013). Los ácidos hidroxicinámicos se encuentran generalmente en pequeña cantidad en las paredes celulares vegetales (1-8%), siendo los más abundantes en el maíz el ácido ferúlico (FA) y el ácido p-cumárico (pCA) (Cao, 2011). El FA se esterifica a los residuos de las cadenas de arabinoxilanos (polisacárido que conforma la fracción hemicelulósica). El ácido ferúlico esterificado puede dimerizarse mediante reacciones de oxidación por peroxidasas, dando lugar a diferúlicos (DFA) que entrecruzan la pared celular. Por otro lado, el pCA en las paredes celulares parece estar asociado con la lignificación. Pequeñas cantidades pueden estar esterificadas a las cadenas de arabinoxilanos, pero generalmente se incorpora esterificado a monolignoles, principalmente al alcohol sinapílico (S). El pCA no funciona como un agente de entrecruzamiento entre polímeros de la matriz de la pared celular, de modo que se ha sugerido que puede tener una función de transferencia de radicales en el proceso de polimerización de la lignina (Santiago *et al*. 2013).

En investigaciones anteriores, se ha identificado un QTL (*Quantitative trait loci*) para resistencia a *Fusarium* en el bin 2.03 en la región comprendida por los marcadores moleculares de tipo SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) bcd1086d y umc259b en una población segregante derivada del cruzamiento de las líneas LP4637 (moderadamente resistente) x L4674 (susceptible) (Giomi *et al*. 2016). En esta región, se encuentra el gen *pal 2* (posible candidato) que codifica para la enzima fenilalanina amonio liasa (*PAL*), una

enzima clave en la vía metabólica de los fenilpropanoides y derivados complejos que fortalecen las estructuras de los tejidos de la pared celular.

Para validar la efectividad de este segmento genético en el desarrollo de selección asistida mediante marcadores moleculares, es necesario comprobar su funcionalidad en otros fondos genéticos y realizar un mapeo fino, mayormente con marcadores moleculares asociados, principalmente aquellos más estrechamente ligados a *pal 2*.

HIPOTESIS

Existe variabilidad para resistencia a podredumbres de espiga, espesor y contenido de fenilpropanoides del pericarpio, en un grupo de líneas segregantes de maíz derivadas de la retrocruza entre la línea LP4637 y las líneas LP564 y LP918.

OBJETIVO GENERAL

Obtener información sobre reacción a podredumbres de espiga y caracteres asociados en líneas segregantes de maíz.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Analizar la variabilidad para resistencia a las podredumbres de espiga causadas por *F. verticillioides* y *F. graminearum*, espesor del pericarpio y contenido de fenilpropanoides en el pericarpio de líneas segregantes de maíz.
2. Determinar la estabilidad de la resistencia de las líneas segregantes bajo condiciones de infección natural e inoculación con cada uno de los patógenos.
3. Determinar el efecto del espesor de pericarpio y el contenido de fenilpropanoides en el pericarpio, sobre la resistencia a podredumbres de espiga en un grupo de las líneas segregantes.

PALABRAS CLAVE: *Zea mays* L., *Fusarium verticillioides, Fusarium graminearum,* resistencia a enfermedades, espesor de pericarpio, fenilpropanoides.

MATERIALES Y METODOS

Materiales Genéticos

Previo a esta investigación, se realizaron tres generaciones de retrocruzas usando las líneas susceptibles LP564 y LP918 como parentales recurrentes y la línea moderadamente resistente LP4637 como donante de resistencia a podredumbres de espigas. LP4637, LP564 y LP918 habían sido obtenidas mediante autofecundación sucesivas de los híbridos, LP611xLP561, LP562xLP581 y AX888, respectivamente (Presello D.A., comunicación personal). LP4637 es portadora de un QTL de resistencia a podredumbres de espiga (Giomi *et al*. 2016). Durante las generaciones de retrocruza, se seleccionaron las líneas menos susceptibles luego de la inoculación con *F. verticillioides* y *F. graminearum,* a fin de aumentar la probabilidad de seleccionar aquellas portadoras del QTL. La semilla de las progenies selectas fue mezclada en cantidades iguales y sembrada en una parcela para su autofecundación, lo que fue repetido durante dos generaciones (Presello D.A., comunicación personal) quedando como resultado 26 líneas segregantes (LP4637xLP918) $BC_3@_2$ y 22 líneas segregantes (LP4637xLP564) $BC_3@_2$.

Las 48 líneas segregantes junto a los materiales parentales, LP4637, LP564, LP918 y el testigo susceptible L4674 (obtenida por autofecundaciones sucesivas del híbrido comercial AX934), fueron utilizadas como materiales genéticos para la presente investigación.

Ensayo a campo

Los experimentos fueron conducidos en el campo experimental de la EEA INTA Pergamino durante la campaña 2017/2018. Se utilizó un diseño en bloques completos aleatorizados con un arreglo factorial de dos niveles, el genotipo (líneas parentales, líneas segregantes y testigo susceptible) y la fuente de inóculo (*F. verticillioides*, *F. graminearum* e infección natural). Se utilizaron dos repeticiones y cada unidad experimental consistió en un surco de 5 metros, con una separación entre surcos de 0,7 m y una densidad de 6 plantas por metro lineal.

La inoculación se realizó mediante inyecciones de 2 ml de suspensiones conidiales en el canal de los estigmas según protocolos descriptos por Reid *et al*. (1996). La concentración del inóculo fue de $1x10^6$ esporas por ml. La inoculación se realizó 4 días después de la emergencia de estigmas. El propósito de la inoculación se basa en aumentar la presión de los patógenos sobre las plantas, ya que estas enfermedades resultan esporádicas en condiciones naturales en el campo, además permite una correcta lectura del comportamiento de los distintos genotipos a cada uno de los hongos porque permite asegurarnos la infección especifica en todas las plantas evaluadas. La infección natural además representar las condiciones reales de campo, las espigas con este tratamiento se cosecharon y usaron para medir el espesor y contenidos de fenilpropanoides del pericarpio del grano. A cosecha (espiga con aprox. 20% de humedad), se evaluó visualmente el área de la espiga afectada por micelio en cada planta mediante la escala y diagramas estándar (Figura 7) propuestos por Reid *et al*. (1996). Las evaluaciones se realizaron sobre todas las plantas de cada parcela y se tomaron los valores medios como variable de análisis. Dada la falta de linealidad entre los grados de la escala y los porcentajes de severidad de síntomas que representan, las medias fueron transformadas a porcentaje de área de la espiga afectada siguiendo Campbell y Madden (1990). Para este cálculo, los valores de la escala asignados a cada planta fueron reemplazados por la media del intervalo que cada grado representa (ej. 1 = 0%, 2 = 2%, 3 = 7%, etc.) y las medias por parcela fueron computadas en base a estos valores.

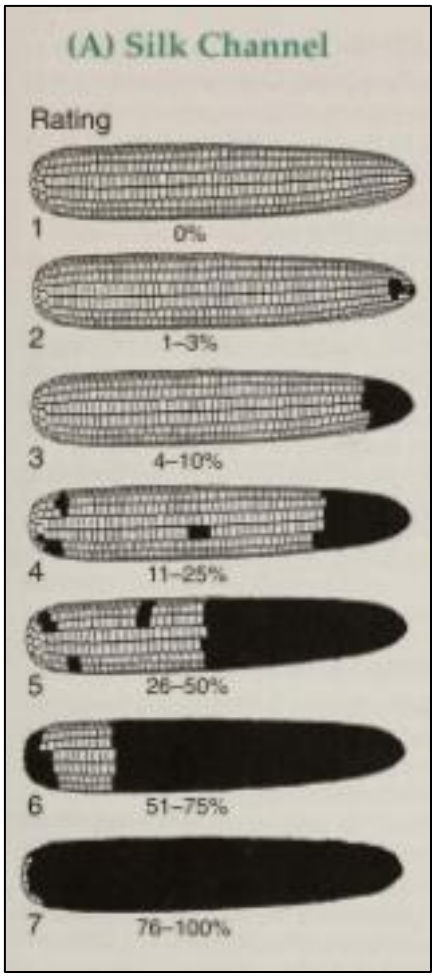


Figura 7: Escala utilizada (Fuente Reid *et al.* 1996)

<u>Espesor y concentración de fenilpropanoides en el pericarpio</u>

Estudios preliminares realizados sobre estos materiales con un grupo de marcadores moleculares (Hirsch *et al*. 2018), revelaron un alto grado de polimorfismo entre líneas (LP4637xLP564) $BC_3@_2$ asociados en parte a la resistencia, mientras que las líneas derivadas de (LP4637xLP918) $BC_3@_2$ presentaron escaso nivel de polimorfismo y mayormente independientes de la severidad de síntomas. A partir de estos resultados, se decidió evaluar los componentes de resistencia sólo en las líneas segregantes derivadas de la línea LP564, en las líneas parentales LP4637, LP564, en el testigo susceptible L4674 y a pesar de que las progenies derivadas de LP918 no fueron evaluadas, el parental fue conservado como segundo testigo ya que también es susceptible a ambas enfermedades.

Para la medición de ambos parámetros, se tomaron muestras de seis espigas al azar de cada repetición del tratamiento bajo infección natural. Las espigas fueron dejadas secar naturalmente para luego extraer y mezclar muestras de 50 granos de la parte central.

El espesor de pericarpio fue medido, sobre una muestra de 20 granos por repetición, mediante la metodología de Wolf *et al*. (1969) modificado por Giomi. Los granos se humedecieron por 8 horas y se les realizaron cortes transversales finos con bisturí entre el ápice del escutelo y la corona, bajo lupa binocular estereoscópica. Los cortes obtenidos se colocaron en portaobjetos y se fijaron con albúmina de huevo al 50%, luego se observaron en microscopio óptico con un aumento de 20X, se fotografiaron con cámara incluida en microscopio y se midió el espesor del pericarpio en micrómetros (µm) con el software Paint de Microsoft (versión 2018). Para la medición primero se fotografió una reglilla de microscopio de 1000 µm con un aumento de 20X, a la imagen obtenida se le midió con el software la longitud total de la reglilla, obteniendo la equivalencia correspondiente donde 1000 µm es igual a 562 pixeles. Dado que las mediciones sobre las imágenes del pericarpio dan una composición XY a los valores obtenidos se les aplico el teorema de Pitágoras para calcular el vector correspondiente al valor del espesor del pericarpio.

Para medir la concentración de fenilpropanoides se siguió la metodología propuesta por Sampietro *et al*. (2012). Se pesaron 15 g de las muestras de grano de cada unidad experimental y dichas muestras fueron sumergidas en agua a temperatura ambiente por 24 horas para poder separar el pericarpio del grano manualmente. Una vez separados los pericarpios, se mezclaron y liofilizaron en el laboratorio por 12 horas. Las muestras liofilizadas fueron sumergidas en nitrógeno líquido (-195,8 °C) y pulverizadas durante 5 minutos con mortero. Se tomaron muestras de 0,1 g de pericarpio pulverizado y fueron digeridas con 4 ml de hidróxido de sodio 2N por 3hs en oscuridad y agitación constante. Para el saponificado, se acidificó con 780 µl de ácido clorhídrico 12N a un pH 2, se agitó vigorosamente y posteriormente se extrajo dos veces con 5 ml de acetato de etilo. Este último se evaporó a completa sequedad mediante calor y vacío quedando un residuo en el recipiente, que se disolvió en metanol (3 ml) para su posterior análisis mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Para identificar los tipos y concentración (mg/g de pericarpio) de fenilpropanoides, cada muestra se filtró (membrana de nylon 0,22 µm) y se inyectó en columna GraceSmart C18 (25 mm x 4,7 mm, 5 µm), flujo 1 ml/min en

un HPLC Agilent® acoplado a un detector de absorción ultravioleta. La fase móvil consistió en agua (solvente A) y acetonitrilo (solvente B), ambos acidificados con 2% de ácido fórmico, realizándose un gradiente de elución entre ambos solventes. Después del proceso analítico, mediante el software (Empower Pro) que controla el HPLC se identificaron 3 tipos de ácidos: ácido trans-ferúlico (tFA), ácido p-cumárico (pCA) y ácido 5,5′-diferúlico (5,5′ DFA).

Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software estadístico INFOSTAT (Di Rienzo *et al.* 2020).

Los datos de severidad de síntomas fueron analizados siguiendo el modelo factorial:

$Y_{ijk} = \mu + T_i + \beta_j + (T \times \beta)_{ij} + r_k + \varepsilon_{ijk}$

Cada observación incluye los efectos de la media (μ), el tratamiento de inoculación (T) con i = 1, 2, 3, el genotipo (β) con j = 1 … 52, la interacción tratamiento de inoculación x genotipo (T×β), la repetición (r) con r = 1, 2 y el error experimental (ε).

Los datos de espesor de pericarpio y concentración de fenilpropanoides en el pericarpio, que fueron obtenidos sobre muestras de las parcelas no inoculadas, se analizaron con un modelo de bloques completos aleatorizados sin los efectos asociados al tratamiento de inoculación ($Y_{ij} = \mu + \beta_j + r_k + \varepsilon_{ij}$).

Cada observación incluye los efectos de la media (μ), el genotipo (β) con j = 1 … 26, la repetición (r) con r = 1, 2 y el error experimental (ε).

Se realizaron las pruebas de normalidad de distribución de los errores (Prueba de Shapiro-Wilk) y las pruebas de homocedasticidad de las variancias (Prueba de Levene), análisis de variancia (ANOVA) y pruebas de comparación de medias entre las líneas de retrocruza, así como comparaciones entre las medias de las líneas con parentales y testigos para severidad de síntomas, espesor de pericarpio y concentración de fenilpropanoides. Todas las comparaciones de medias se realizaron a través de la prueba LSD de Fisher a un nivel de probabilidad $P < 0,05$. Además, se establecieron asociaciones entre variables mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

RESULTADOS

Pruebas de normalidad

Las pruebas de Shapiro-Wilk no mostraron evidencias de falta de normalidad en la distribución de los errores, al igual que las pruebas de Levene que no detectaron falta de homogeneidad de variancias, por lo que fue posible realizar los análisis de todas las variables sin transformaciones.

Resistencia a podredumbres de espiga

El análisis de variancia del porcentaje de severidad de síntomas (Tabla 1) mostró efectos significativos para el tratamiento de inoculación, genotipo y la interacción entre ambas variables.

Tabla 1: Análisis de variancia para porcentaje de la espiga visiblemente cubierta por micelio en genotipos de maíz inoculados con *F. verticillioides, F. graminearum* y en condiciones de infección natural.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	P < 0,05
Repetición	1	544,2	6,07	*
Genotipo	51	896,6	10,00	*
Tratamiento de inoculación	2	23158,8	258,20	*
Genotipo x tratamiento de inoculación	102	144,3	1,60	*
Error	153	89,7		
Total	309			

Ajuste del modelo (R^2) = 0,89

Coeficiente de variación = 37,7 %*

DMS Fisher P < 0,05 = 19,5 %

*: El coeficiente de variación (CV) es elevado debido a la naturaleza de la variable porcentaje. El mismo análisis realizado sobre la variable 100 – Porcentaje del área de la espiga afectada tiene un CV de 12,7 % con el mismo valor de R^2.

Todas las fuentes de variación fueron estadísticamente significativas, pero se destaca la magnitud de los efectos de tratamiento de inoculación que fueron sustancialmente mayores que los de genotipo e interacción. Dada la presencia de interacción, se realizaron las pruebas de comparación de medias entre genotipos dentro de cada tratamiento de inoculación. Se observaron diferencias entre genotipos para severidad de síntomas tanto

para las dos especies fúngicas como en infección natural (Tabla 2). En la mayoría de los genotipos la inoculación causó mayor nivel de síntomas en relación al tratamiento bajo infección natural y existe una tendencia aunque no generalizada de que *F. graminearum* resulta más sintomático que *F. verticillioides*. Las líneas segregantes $BC_3@_2$ expresaron valores de severidad de síntomas similares y en algunos casos inferiores a los del parental recurrente, por lo que se infiere que la introgresión de genes del donante resistente mejoró la reacción a las enfermedades y que existe variabilidad entre líneas dentro de cada retrocruza. No se observaron líneas segregantes con mejor comportamiento que el de la línea donante de resistencia que puedan indicar herencia transgresiva.

Tabla 2: Medias de porcentaje de espiga cubierta por micelio en genotipos de maíz inoculados con *F. verticillioides, F. graminearum*, y en condiciones de infección natural.

Genotipo	Área de la espiga cubierta por micelio (%)		
	Infección Natural	*Fusarium verticillioides*	*Fusarium graminearum*
L4674	85,5	88,0	83,0
LP4637	3,25	3,0	3,3
LP564	6,9	38,6	52,6
LP564 - 13.2990-1-1-1	4,0	20,1	34,0
LP564 - 13.2990-1-1-2	7,5	26,7	50,4
LP564 - 13.2990-1-1-3	8,4	44,0	59,5
LP564 - 13.2990-1-1-4	8,0	37,4	46,2
LP564 - 13.2990-5-1-1	6,8	18,4	29,7
LP564 - 13.2990-5-1-2	6,0	12,9	26,9

LP564 - 13.2990-5-1-3	4,4	18,1	32,0
LP564 - 13.2990-5-1-4	5,9	10,6	32,0
LP564 - 13.2990-5-1-5	6,6	6,1	14,9
LP564 - 13.2990-5-1-6	4,5	10,1	24,4
LP564 - 13.2992-6-1-1	4,0	32,4	45,0
LP564 - 13.2992-6-1-2	6,3	16,5	32,2
LP564 - 13.2992-6-1-3	7,5	25,6	16,8
LP564 - 13.2992-6-1-4	5,9	26,2	47,1
LP564 - 13.2992-6-1-5	5,2	11,4	46,4
LP564 - 13.2992-6-1-6	11,9	27,8	57,9
LP564 - 13.2998-1-1-1	3,6	31,7	22,3
LP564 - 13.2998-1-1-2	4,1	10,0	29,5
LP564 - 13.2998-1-1-3	3,0	7,2	2,0
LP564 - 13.2998-1-1-4	6,5	5,1	39,3
LP564 - 13.2998-1-1-5	9,1	36,6	33,5
LP564 - 13.2998-1-1-6	3,7	5,5	2,0
LP918	16,9	47,9	56,1
LP918 - 13.2972-5-1-1	11,6	34,9	51,0
LP918 - 13.2972-5-1-2	8,9	36,5	65,3
LP918 - 13.2972-5-1-3	9,15	44,7	58,5
LP918 - 13.2972-5-1-4	7,0	44,2	56,1
LP918 - 13.2972-5-1-5	8,8	30,6	49,9
LP918 - 13.2974-1-1-1	7,9	36,4	49,4
LP918 - 13.2974-1-1-2	6,5	30,9	43,4

LP918 - 13.2974-1-1-3	3,75	34,9	43,8
LP918 - 13.2974-1-1-4	9,1	35,4	44,4
LP918 - 13.2974-1-1-5	5,85	15,8	35,1
LP918 - 13.2974-1-1-6	9,0	20,4	40,8
LP918 - 13.2976-1-1-1	12,0	16,2	25,3
LP918 - 13.2976-1-1-2	6,25	6,6	39,9
LP918 - 13.2976-1-1-3	10,4	18,3	30,3
LP918 - 13.2976-1-1-4	7,35	11,0	23,3
LP918 - 13.2976-1-1-5	18,7	35,4	40,2
LP918 - 13.2980-1-1-1	7,55	8,8	45,6
LP918 - 13.2980-1-1-2	9,0	20,3	35,9
LP918 - 13.2980-1-1-3	16,9	21,3	50,0
LP918 - 13.2980-1-1-4	8,4	19,3	46,2
LP918 - 13.2980-1-1-5	11,9	21,4	35,2
LP918 - 13.2980-3-1-1	13,5	20,2	31,5
LP918 - 13.2980-3-1-2	8,6	23,8	50,5
LP918 - 13.2980-3-1-3	10,3	36,3	45,8
LP918 - 13.2980-3-1-4	14,0	22,3	37,4
LP918 - 13.2980-3-1-5	16,8	25,1	28,0
DMS Fisher P < 0,05		19,5	

En forma consistente con los bajos valores de interacción genotipo por tratamiento de inoculación, se observaron coeficientes de correlación positivos entre las medias de severidad de síntomas causadas por ambas especies fúngicas (r = 0,74), lo que indica que

existen materiales que expresan resistencia genética amplia a ambos patógenos (Figura 7).

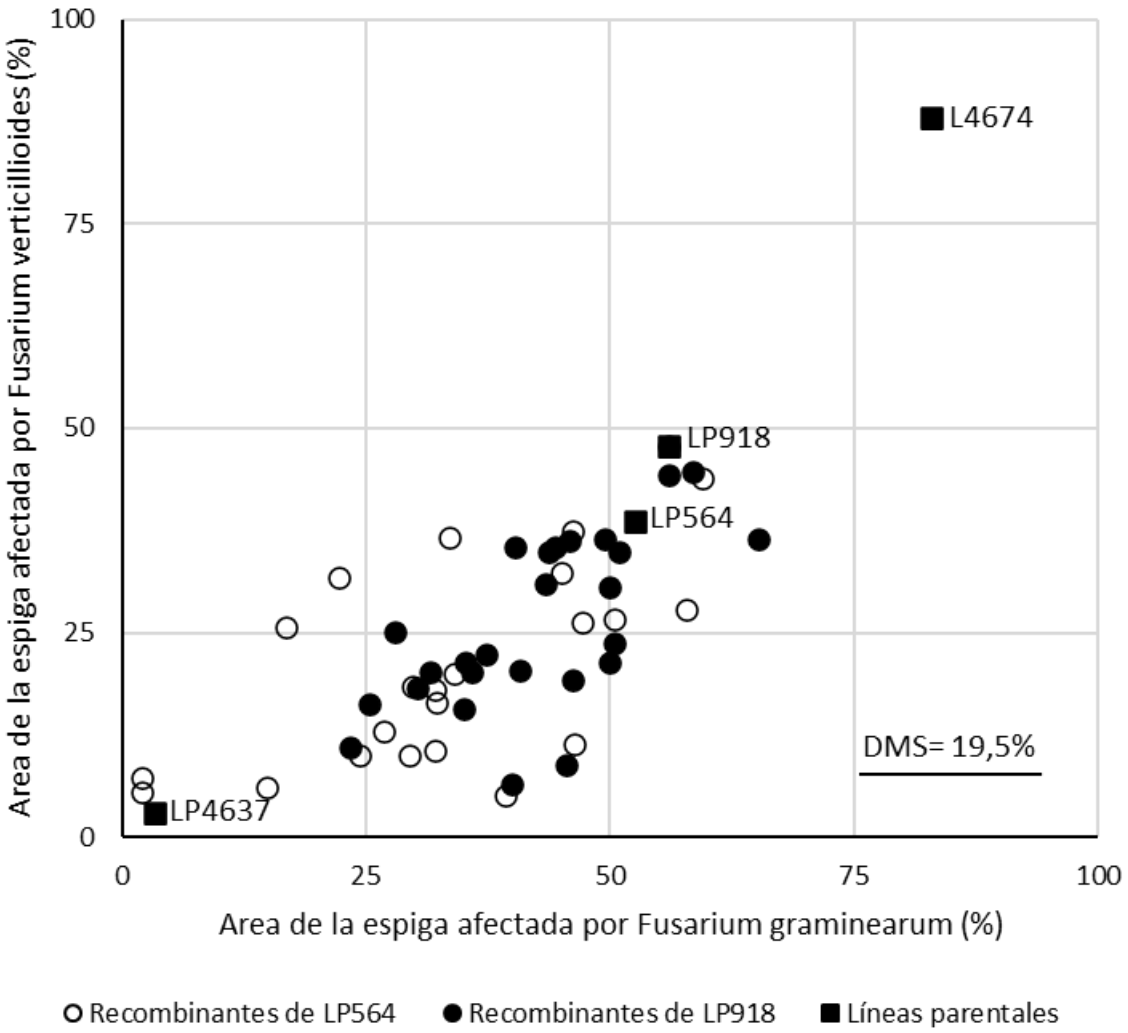


Figura 7: Área de la espiga cubierta por micelio (%) en líneas de maíz luego de la inoculación con *F. verticillioides* y *F. graminearum*

En la Figura 7 se puede visualizar como las dos líneas, susceptible (L4674) y moderadamente resistente (LP4637) se encuentran en extremos opuestos, indicando que se mantiene su comportamiento frente a las dos enfermedades. El testigo susceptible presenta alta susceptibilidad a ambas especies fúngicas ya que este mostró espigas con 80 a 90 % de síntomas, mientras que LP4637 presenta alto grado de resistencia para las

dos enfermedades. Las líneas parentales recurrentes (LP564 y LP918) y sus líneas segregantes se comportan con distintos grados de resistencia ante las dos enfermedades.

Espesor y concentración de fenilpropanoides en el pericarpio

El análisis de variancia mostró efectos significativos para cada una de las variables analizadas (Tablas 3, 4, 5 y 6)

Tabla 3: Análisis de variancia para espesor de pericarpio (µm)

Fuente de variación	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	P < 0,05
Repetición	1	95,58	0,87	
Genotipo	25	3707,92	33,76	*
Error	25	109,83		
Total	51			

Ajuste del modelo (R^2) = 0,97

Coeficiente de variación = 5,93 %

DMS Fisher P < 0,05 = 21,58 µm

Tabla 4: Análisis de variancia para la concentración de ácido t-ferúlico (mg/g de pericarpio)

Fuente de variación	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	P < 0,05
Repetición	1	0,54	0,66	
Genotipo	25	1,63	2,00	*
Error	25	0,82		
Total	51			

Ajuste del modelo (R^2) = 0,67

Coeficiente de variación = 11 %

DMS Fisher P < 0,05 = 1,86 mg/g

Tabla 5: Análisis de variancia para la concentración de ácido p-cumárico (mg/g de pericarpio)

Fuente de variación	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	P < 0,05
Repetición	1	5,6E-4	0,05	
Genotipo	25	0,10	9,22	*
Error	25	0,01		
Total	51			

Ajuste del modelo (R^2) = 0,90

Coeficiente de variación = 13,4 %

DMS Fisher P < 0,05 = 0,21 mg/g

Tabla 6: Análisis de variancia para la concentración de ácido 5,5′-diferúlico (mg/g de pericarpio)

Fuente de variación	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	P < 0,05
Repetición	1	0,01	0,27	
Genotipo	25	0,06	3,38	*
Error	25	0,02		
Total	51			

Ajuste del modelo (R^2) = 0,77

Coeficiente de variación = 10,6 %

DMS Fisher P < 0,05 = 0,28 mg/g

Las líneas parentales presentaron mayor espesor de pericarpio en comparación al testigo susceptible. El pericarpio de LP564 mostró mayor espesor que el de LP4637. Algunas líneas segregantes exhibieron pericarpios más gruesos que el del parental recurrente indicando la presencia de herencia transgresiva (Tabla 7).

El contenido de fenilpropanoides en el pericarpio de las líneas parentales fue mayor a los del testigo susceptible pero ambos materiales no mostraron diferencias entre ellos. Las líneas segregantes mostraron variabilidad con efectos de herencia transgresiva para concentración de ácido p-cumárico y 5,5′-diferúlico (Tabla 7).

Tabla 7: Medias de espesor de pericarpio y concentración de fenilpropanoides en el pericarpio de líneas de maíz.

Genotipo	Espesor de Pericarpio (µm)	Concentración de fenilpropanoides en pericarpio (mg/g)		
		trans-ferúlico	p-cumárico	5-5´-diferúlico
L4674	82,07	6,75	0,56	0,98
LP4637	132,17	8,48	0,59	1,46
LP564	151,35	8,71	0,63	1,33
LP564 - 13.2990-1-1-1	157,71	7,85	0,71	1,12
LP564 - 13.2990-1-1-2	151,39	7,54	0,52	1,07
LP564 - 13.2990-1-1-3	115,10	8,20	0,63	1,14
LP564 - 13.2990-1-1-4	153,68	9,33	0,75	1,44
LP564 - 13.2990-5-1-1	177,33	9,32	0,98	1,33
LP564 - 13.2990-5-1-2	162,30	8,77	0,84	1,25
LP564 - 13.2990-5-1-3	166,37	9,77	0,74	1,35
LP564 - 13.2990-5-1-4	190,64	8,67	0,71	1,35
LP564 - 13.2990-5-1-5	144,60	7,70	0,64	1,11
LP564 - 13.2990-5-1-6	203,64	7,82	0,68	1,20
LP564 - 13.2992-6-1-1	202,44	7,95	1,00	1,29
LP564 - 13.2992-6-1-2	185,56	7,32	0,85	1,23
LP564 - 13.2992-6-1-3	201,82	7,09	0,97	1,22
LP564 - 13.2992-6-1-4	183,53	7,58	0,63	1,21
LP564 - 13.2992-6-1-5	210,57	6,62	0,74	1,05
LP564 - 13.2992-6-1-6	210,53	8,48	0,61	1,39
LP564 - 13.2998-1-1-1	192,55	7,82	0,82	1,40

LP564 - 13.2998-1-1-2	209,71	10,37	1,15	1,78
LP564 - 13.2998-1-1-3	270,08	7,98	1,35	1,37
LP564 - 13.2998-1-1-4	216,81	9,14	0,87	1,58
LP564 - 13.2998-1-1-5	170,68	7,63	0,79	1,25
LP564 - 13.2998-1-1-6	255,20	8,01	1,12	1,26
LP918	100,62	8,72	0,29	1,55
DMS Fisher P < 0,05	21,58	1,86	0,21	0,28

En el análisis de correlación de los componentes de resistencia con la severidad de síntomas para ambas enfermedades (Tabla 8), se puede observar una asociación negativa entre el espesor de pericarpio y la concentración del ácido p-cumárico con la expresión de síntomas para ambas enfermedades, esto indicaría que parte de la resistencia de estas líneas podría estar asociada a estas dos componentes.

Tabla 8: Análisis de correlación de Pearson entre espesor de pericarpio y concentración de fenilpropanoides con la severidad de síntomas de las dos enfermedades.

	FG % Severidad	FV % Severidad	[tFA]	[pCA]	[5-5´ DFA]	Pericarpio
FG % Severidad	1,00	2.90E-06	0,60	1.80E-03	0,27	2.60E-03
FV % Severidad	0,74	1,00	0,17	0,04	0,11	5.90E-04
[tFA]	-0,11	-0,28	1,00	0,42	1.40E-06	0,85
[pCA]	-0,58	-0,41	0,16	1,00	0,20	2.80E-06
[5-5´ DFA]	-0,22	-0,32	0,79	0,26	1,00	0,23
Pericarpio	-0,57	-0,63	0,04	0,78	0,24	1,00

DISCUSIÓN

Uno de los objetivos de la presente investigación fue estudiar el comportamiento de las líneas ante las podredumbres de espigas causadas por *F*. verticillioides y *F. graminearum.* La severidad de síntomas observada en la mayoría de los genotipos evaluados, indicó que ambos tratamientos de inoculación fueron efectivos para incrementar la expresión de síntomas de las enfermedades y reflejó la importancia de la inoculación artificial al momento de determinar el comportamiento de los materiales genéticos ante las podredumbres por *Fusarium*. El tratamiento de inoculación con *F. graminearum* fue más sintomático en comparación al de *F. verticillioides* en la mayoría de los genotipos, resultados acordes a los obtenidos por Löffler *et al*. (2010).

Se observó variabilidad entre genotipos para resistencia a las podredumbres, con algunas líneas segregantes que manifestaron valores de severidad de síntomas inferiores a los del parental recurrente y similares a los del donante, por lo que se infiere que la introgresión de genes del donante resistente mejoró la reacción a ambas enfermedades. En este estudio no se observaron segregantes transgresivos que pudieran indicar efecto de los genes de las líneas recurrentes en la respuesta de las líneas segregantes. En un estudio de marcadores moleculares, Perez-Brito *et al*. (2001) encontraron segregación transgresiva para este carácter en la evaluación de familias F_3 derivadas de otros parentales

El alto grado de asociación entre los valores de severidad de síntomas causados por *F. verticillioides* y *F. graminearum* (r=0,74) indica que la resistencia disponible en estos materiales genéticos es de naturaleza amplia y efectiva ante ambos patógenos. Resultados similares fueron publicados por Presello *et al*. (2006) y Giomi *et al*. (2016).

Se han descripto diferentes componentes que podrían mediar la resistencia de materiales con buen comportamiento ante la infección con estos patógenos. En este trabajo fue de interés evaluar solo el espesor de pericarpio y el contenido de fenilpropanoides en el pericarpio del grano debido a que estudios previos indicaron que la resistencia de LP4637 se debe mayormente a estos dos componentes (Fauguel, 2012).

El análisis de variancia para los componentes de resistencia mostro efectos significativos para cada variable y se observó que existe variabilidad entre y dentro de las retrocruzas.

Las líneas parentales y la mayor parte de las segregantes expresaron mayor espesor de pericarpio en comparación al testigo susceptible L4674, indicando que este carácter tiene efecto en la expresión de resistencia. Además, se observaron asociaciones significativas (r_V= -0,63 y r_G= -0,57) entre el espesor del pericarpio con la severidad de síntomas de las podredumbres ocasionadas por *F. verticillioides* y *F. graminearum* respectivamente. Estos resultados son consistentes con los de otros autores que informaron que, tanto la acumulación de micotoxinas (Hoenisch y Davis, 1994), como la severidad de podredumbre de espiga (Giomi *et al.* 2021) tienen una asociación negativa con el espesor de pericarpio.

En esta investigación, el parental recurrente presentó un pericarpio más grueso en relación al del donante, lo que da indicios de que LP564 tiene sus propios genes para el carácter, que parecen haberse recombinado con los de LP4637 para producir segregantes transgresivos. Estas líneas segregantes no sólo expresaron pericarpios más gruesos en comparación al de LP564 sino que también algunas de ellas presentaron bajos niveles de severidad de síntomas confirmando el efecto de la variable en la reacción a la enfermedad (Ver tablas 2 y 7).

Para fenilpropanoides, se encontró que en las líneas parentales el contenido de estos compuestos fue mayor que en el testigo susceptible, aunque entre ellas no mostraron diferencias significativas. Este comportamiento frente al testigo susceptible es consistente con estudios previos (Sampietro *et al*. 2012) y estaría indicando que la expresión de un pericarpio con mayor contenido de estos compuestos aporta parte de la resistencia frente a la infección por *Fusarium*. En cuanto a las líneas segregantes mostraron variabilidad para el contenido de ácido p-cumárico y 5,5′-diferúlico, además de reflejar un tipo de herencia transgresiva ya que hubo líneas con mayores contenidos de estos ácidos en relación a los parentales.

De los tres fenilpropanoides analizados, sólo se encontraron asociaciones negativas con severidad de síntomas para ácido p-cumárico ((r_V = -0,41 y r_G = -0,58) correlaciones para *F. verticillioides* y *F. graminearum*, respectivamente). Estos resultados indican que los fenilpropanoides tienen una función en la resistencia a las enfermedades, lo que es consistente con otros estudios, aunque el compuesto más eficaz parece ser el ácido t-ferúlico y sus diferulatos (Bily *et al*. 2003, Sampietro *et al*. 2012, Shull *et al*. 2020, Giomi *et*

al. 2021). En los materiales genéticos utilizados en esta investigación, el ácido p-cumárico pareció contribuir para la resistencia a ambas podredumbres, resultados consistentes con los de Shull *et al*. (2020) que observaron el poder de inhibición de los intermediarios de la ruta de los fenilpropanoides entre ellos el ácido p-cumárico sobre el crecimiento fúngico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *nicotianae* en Tabaco*,* o la investigación realizada por Ponts *et al.* (2011) que probaron el efecto inhibitorio de los compuestos fenólicos entre ellos el ácido t-ferúlico y el ácido p-cumárico con niveles muy altos de toxicidad que impiden el desarrollo fúngico.

Mientras en la mayoría de estudios previos el ácido t-ferúlico y sus diferulatos tienen un rol relevante en la resistencia, en esta investigación el ácido p-cumárico pareció tener mayor influencia en la expresión de la resistencia, lo que debería asociarse a la variabilidad genética utilizada, en tanto sería recomendable continuar los estudios para validar esta información.

Para concluir, dado que se encontró variabilidad entre las líneas segregantes para severidad de síntomas y esta variabilidad se encuentra, en parte, asociada a los componentes de resistencia estudiados, estos resultados podrían en principio validar la efectividad del segmento genético descripto por Giomi *et al*. (2016) en otros fondos genéticos como el de la línea LP564. Se debería seguir profundizando el estudio de la línea LP4637 donante del QTL mediante un mapeo fino que permita ajustar selección asistida por marcadores moleculares a fin de mejorar otros fondos genéticos susceptibles a podredumbres de espiga.

BIBLIOGRAFIA

Agrios, GN. 2005. Fitopatología. Segunda edición. México, Limusa, 952 p.

Azcón-Bieto, J. y Talón, M. 2008. Fisiología vegetal. Introducción a las células de las plantas: membranas y pared. In: Revilla, G. et Zarra, I. (Eds.). Fundamentos de fisiología vegetal. Madrid, España: McGraw-Hill Interamericana de España S.L., pp. 3-22.

Bily, AC; Reid, LM; Taylor, JH; Johnston, D; Malouin, C; Burt, AJ; Bakan, B; Regnault-Roger, C; Pauls, KP; Arnason, JT; Philogène, BJR. 2003. Dehydrodimers of Ferulic Acid in Maize Grain Pericarp and Aleurone: Resistance Factors to *Fusarium graminearum*. Phytopathology. 93:712-719.

Campbell, CL; Madden, LV. 1990. Introduction to Plant Epidemiology. Wiley-Interscience, New York, 532pp.

Cao, A. 2011. Papel de los ácidos hidroxicinámicos de las sedas del maíz en la resistencia a la infección por Fusarium graminearum. Facultad de Biología. Universidad de Vigo.

De la Torre-Hernández, ME; Sánchez-Rangel, D; Galeana-Sánchez, E; Plasencia-De la Parra, J. 2014. Fumonisinas -síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides* - maíz. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. 17(1):77-91.

Di Rienzo, JA; Casanoves, F; Balzarini, MG; Gonzalez, L; Tablada, M; Robledo, CW. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL http://www.infostat.com.ar

Duncan, KE; Howard, RJ. 2010. Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. Molecular Plant-Microbe Interactions. 23(1):6-16.

Edwards, SG. 2004. Influence of agricultural practices on *Fusarium* infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins. Toxicol. Lett. 153:29-35.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2003. Manual Sobre la Aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la Prevención y Control de las Micotoxinas. [online]. Disponible en: https://www.fao.org/3/y1390s/y1390s00.htm#Contents [Acceso: 31 octubre 2021].

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2009. Como alimentar al mundo en 2050. [online]. Disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/synthesis_papers/C%C3%B3mo_alimentar_al_mundo_en_2050.pdf [Acceso: 7 abril 2021].

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2020. FAOSTAT - Base de datos de cultivos. [online]. Disponible en: http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize [Acceso: 6 marzo 2021].

Fauguel, CM. 2012. Bases bioquímicas de la resistencia a *Fusarium verticillioides* en germoplasma argentino de maíz. Caracterización de fracciones proteicas y compuestos volátiles. Tesis Doctoral, Facultad de ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.

Fornalé, S; Rencoret, J; García-Calvo, L; Capellades, M; Encima, A; Santiago, R; Rigau, J. 2015. Cell wall modifications triggered by the down-regulation of Coumarate 3-hydroxylase-1 in maize. Plant Sci. 236:272-282.

Funnell, DL y Pedersen, JF. 2006. Reaction of sorghum lines genetically modified for reduced lignin content to infection by Fusarium and Alternaria spp. Plant Dis. 90:331-338.

Giomi, GM; Kreff, ED; Iglesias, J; Fauguel, CM; Fernández, M; Oviedo, MS; Presello, DA. 2016. Quantitative trait loci for Fusarium and Gibberella ear rot resistance in Argentinian maize germplasm. Euphytica. 211:287-294.

Giomi, GM; Sampietro, DA; Velazco, JG; ; Iglesias, J; Fernández, M; Oviedo, MS; Presello, DA. 2021. Map overlapping of QTL for resistance to Fusarium ear rot and associated traits in maize. Euphytica. 217:81.

Harrison, LR; Colvin, BM; Greene, JT; Newman, LE; Cole, JR. 1990. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produce by fumonisin B1 a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. J. Vet. Diagn. Investig. 2:217-221.

Hirsch, M; Avalos, G; Napoli, M; Giomi, G; Fernández, M; Presello, D; Díaz Paleo, A. 2018. Mapeo fino de un QTL para resistencia a Fusarium en maíz. XI Congreso Nacional de Maíz: Sea maíz integrando ciencia, producción, ambiente y comunidad. Primera edición. Pergamino, Bs. As. Argentina. Área Genética y Mejoramiento Genético Vegetal. P:175-178.

Hoenisch, RW; Davis, RM. 1994. Relationship between kernel pericarp thickness and susceptibility to Fusarium ear rot in field corn. Plant Disease. 78:517-19.

Kumi, J; Mitchell, NJ; Asare, GA; Dotse, E; Kwaa, F; Phillips, TD; Ankrah, NA. 2014. Aflatoxin and fumonisin contamination of home-made food (Weanimix) from cereal-legume blends for children. Ghana Med. J. 48:121-126.

Löffler, M; Kessel, B; Ouzunova, M; Miedaner T. 2010. Population parameters for resistance to *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides* ear rot among large sets of early, mid-late and late maturing European maize (*Zea mays* L.) inbred lines. Theor Appl Genet 120:1053-1062.

Munkvold, GP; McGee, DC; Carlton, WM. 1997. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. Phytopathology. 87:209-217.

Munkvold, GP; Desjardins, AE. 1997. Fumonisins in Maize: Can We Reduce Their Occurrence?. Plant Disease. 81:556-565.

Nowak, A; Slizewska, K; Gajecka, M; Piotrowska, M; Zakowska, Z; Zielonka, L; Gajecki, M. 2015. The genotoxicity of caecal water from gilts following experimentally induced *Fusarium* mycotoxicosis. Vet. Med. Czech. 60:133-140.

Pannar. 2020. Managing common maize ear rots. [online]. Disponible en: https://www.pannar.com/blog/detail/managing_common_maize_ear_rots [Acceso: 10 abril 2021].

Pérez-Brito, D; Jeffers, DP; González de León, D; KhairallaH, MM; Cortés-Cruz, CM; Velázquez-Cardelas, C; Azpíroz-Rivero, S; Srinivasan, G. 2001. QTL mapping of Fusarium moniliforme ear rot resistance in highland maize, Mexico. Agrociencia. 35:181-196.

Presello, DA; Iglesias, J; Botta, G; Reid, LM; Lori, GA; Eyhérabide, GH. 2006. Estabilidad de la resistencia del maíz a la pudrición de la mazorca causada por *Fusarium graminearum y F. verticillioides* en ambientes argentinos y canadienses. Euphytica. 147:403-407.

Presello, DA; Botta, G; Iglesias, J; Eyhérabide, GH. 2008. Effect of disease severity on yield and grain fumonisin concentration of maize hybrids inoculated with *Fusarium verticillioides*. Crop Protection. 27:572-576.

Programa de Maíz del CIMMYT. 2004. Enfermedades del maíz: una guía para su identificación en el campo. Cuarta edición. México, D.F.: CIMMYT.

Ponts, N; Pinson-Gadais, L; Boutigny, AL; Barreau, C; Forget, F. 2011. Cinnamic-derived acids significantly affect *Fusarium graminearum* growth and in vitro synthesis of type B trichothecenes. Phytopathology, American Phytopathological Society. 101(8):929-934.

Ride, JP. 1980. The effect of induced lignification on the resistance of wheat cell walls to fungal degradation. Physiol. Plant Pathol. 16:187-192.

Reid, LM; Hamilton, RI; Mather, DE. 1996. Screening maize for resistance to Gibberella ear rot. Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa. Technical. Bulletin. Publ. 1996-5E.

Robertson-Hoyt, LA; Jines, MP; Balint-Kurti, PJ; Kleinschmidt, CE; White, DG; Payne, GA; Maragos, CM; Molnár, TL; Holland, JB. 2006. QTL mapping for Fusarium ear rot and fumonisin contamination resistance in two maize populations. Crop Sci. 46:1734-1743.

Rocha, O; Ansari, K; Doohan, FM. 2005. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. Food Addit. Contam.. 22:369-378.

Ross, PF; Rice, LG; Osweiler, GD; Nelson, PE; Richard, JL; Wilson, TM. 1992. A review and update of animal toxicoses associated with fumonisin-contaminated feeds and production of fumonisins by *Fusarium* isolates. Mycopathologia. 117:109-114.

Rotter, BA; Prelusky, DB; Pestka, JJ. 1996. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). J. Toxicol. Environ. Health. 48:1-34.

Sampietro, DA; Fauguel, CM; Vattuone, MA; Presello, DA; Catalán, CAN. 2012. Phenylpropanoids from maize pericarp: Resistance factors to kernel infection and fumonisin accumulation by *Fusarium verticillioides*. European Journal of Plant Pathology. 135:105-113.

Santiago, R; Barros-Ríos, J; Malvar, AR. 2013. Impact of cell wall composition on maize resistance to pest and diseases. Int. J. Mol. Sci. 14:6960-6980.

Shull, TE; Kurepa, J; Miller, RD; Martinez-Ochoa, N; Smalle, JA. 2020. Inhibition of *Fusarium oxysporum* f. sp. *nicotianae* Growth by Phenylpropanoid Pathway Intermediates. Plant Pathol J. 1;36(6):637-642.

Suzuki, T; Munakata, Y; Morita, K; Shinoda, T; Ueda, H. 2007. Sensitive detection of estrogenic mycotoxin zearalenone by open sandwich immunoassay. Anal. Sci. 23:65-70.

Wolf, MJ; Cull, IM; Helm, JL; Zuber, MS. 1969. Measuring Thickness of Excised Mature Corn Pericarp. Agronomy Journal 61(5):777-779.

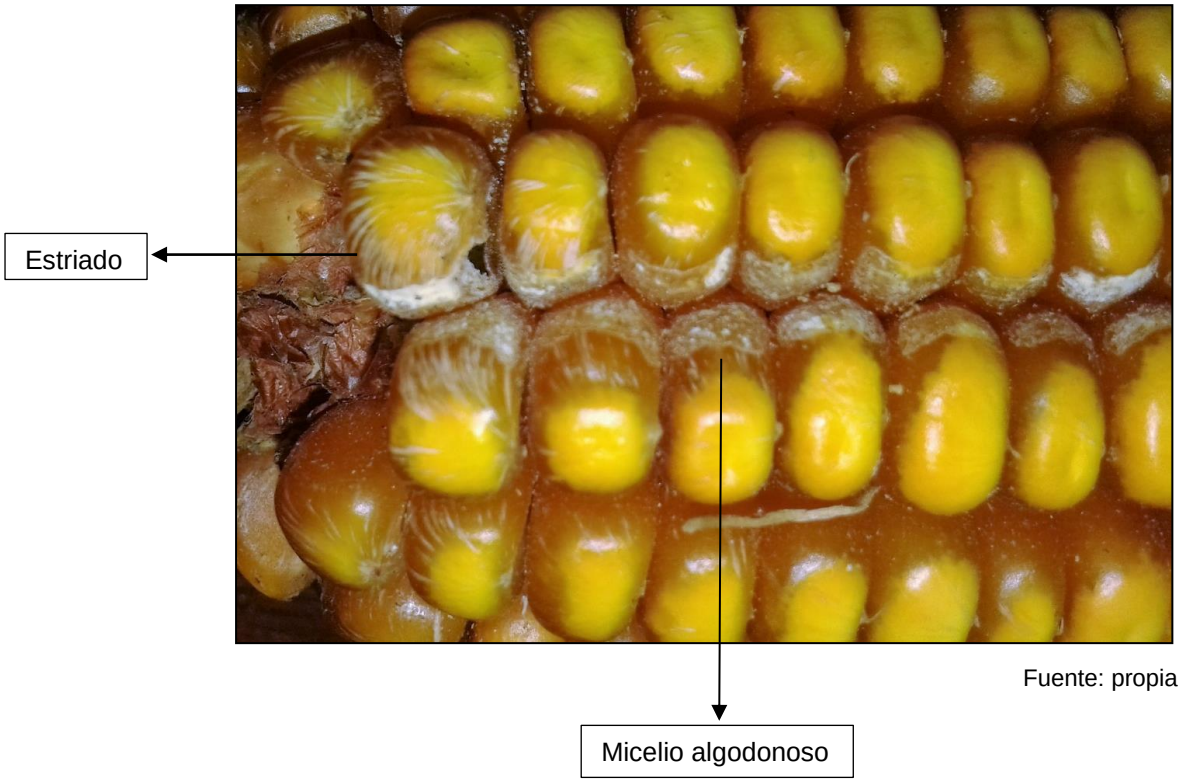
Wolf, MJ; Buzan, CL; MacMasters, MM; Rist CE. 1959. Cereal Chem. 29,321.

ANEXOS

Figura 2: Síntoma y signo de la podredumbre por Fusarium en granos aislados de la espiga.

Fuente: propia

Figura 3: Síntoma y signo de la podredumbre por Fusarium.

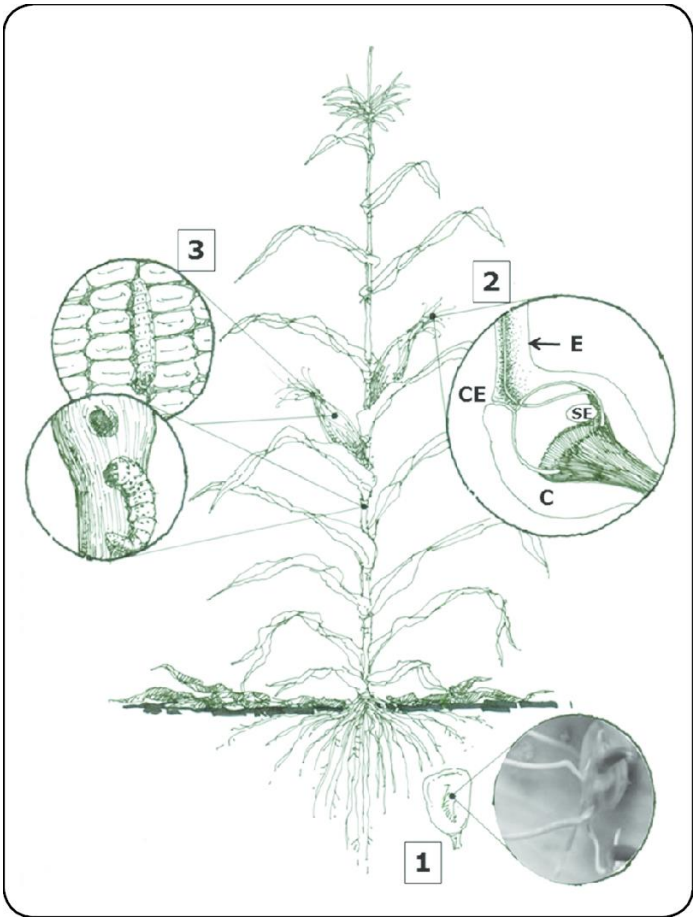


Fuente: propia

Figura 4: Síntoma y signo de la podredumbre por Gibberella.

Fuente: Enfermedades del maíz - CIMMYT 2004

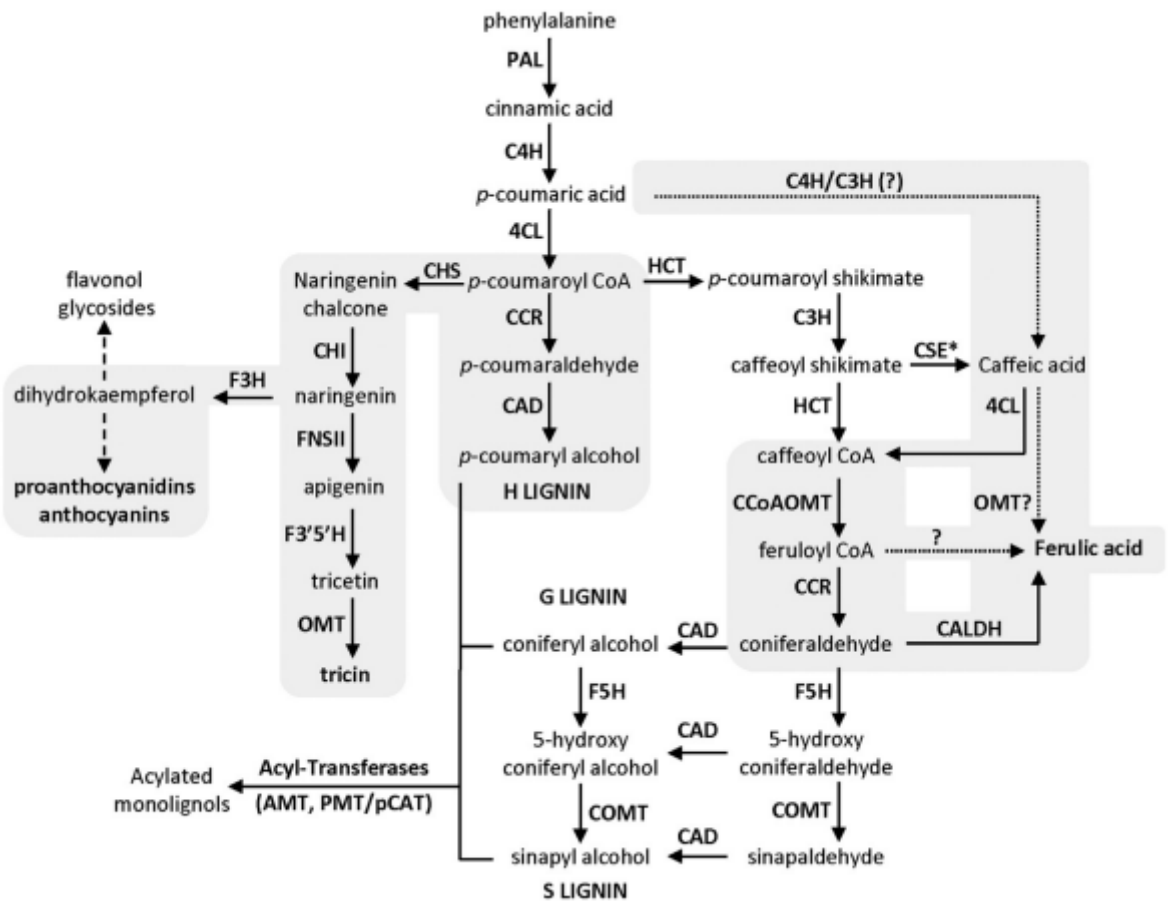
Figura 5: Rutas de entrada del hongo a la planta.



1: infección sistémica de la plántula, 2: infección por medio de los estigmas, 3: infección por daño mecánico, E: estigma, CE: canal estilar, SE: saco embrionario, C: carpelo

Fuente: (De la Torre-Hernández *et al*. 2014)

Figura 6: Ruta de biosíntesis de los fenilpropanoides.



The phenylpropanoid pathway. PAL, phenylalanine ammonia-lyase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; 4CL, 4-coumarate-CoA ligase; CCR, cinnamoyl-CoA reductase; CAD, cinnamyl alcohol dehydrogenase; HCT, hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransferase; C3H, 4-coumarate 3-hydroxylase; CSE, caffeoyl shikimate esterase; COMT, caffeic acid O-methyltransferase; CCoAOMT, caffeoyl-CoA O-methyltransferase; F5H, ferulate-5-hydroxylase, HCALDH, hydroxycinnamaldehyde dehydrogenase; AMT, acetyl-CoA:monolignol transferase; PMT, p-coumarate:monolignol transferase; pCAT, p-coumaroyl CoA:hydroxycinnamyl alcohol transferase; CHS, chalcone synthase; CHI, chalcone isomerase; F3H, flavanone 3-hydroxylase; FNSII, flavone synthase II; F3'5'H, flavonoid 3',5'-hydroxylases; pCA-Lignin, p-coumarate linked to the lignin polymer. The metabolic steps required to produced flavonoids from dihydrokaempferol are represented by single broken arrows. Grey dotted arrows represent putative pathways through which ferulic acid can be synthesized. The enzymatic steps involved in the production of three main lignin-related metabolites (p-coumaryl alcohol, ferulic acid and tricin) and flavonoids that are over-accumulated in C3H1-RNAi plants are shown under a grey background (only the possible pathways that could produce ferulic acid without the involvement of C3H are marked). Enzymes with asterisks refer to enzymatic steps that have been described in Arabidopsis thaliana but still not described in maize or in any grass plant species.

Fuente: (Fornalé *et al*. 2015)

VILLALÓN José Gastón
Digitally signed by VILLALÓN José Gastón
Date: 2021.12.23 09:11:14 -0300