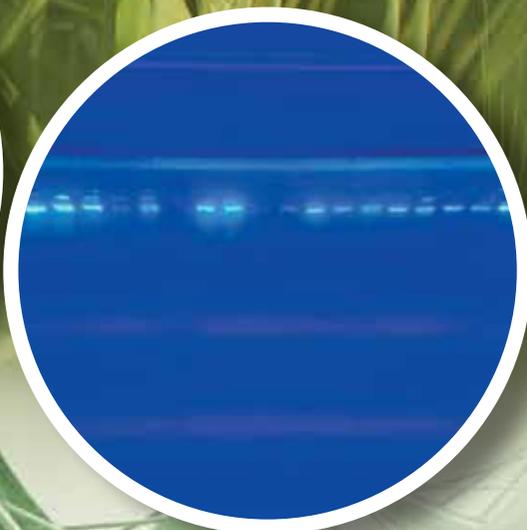
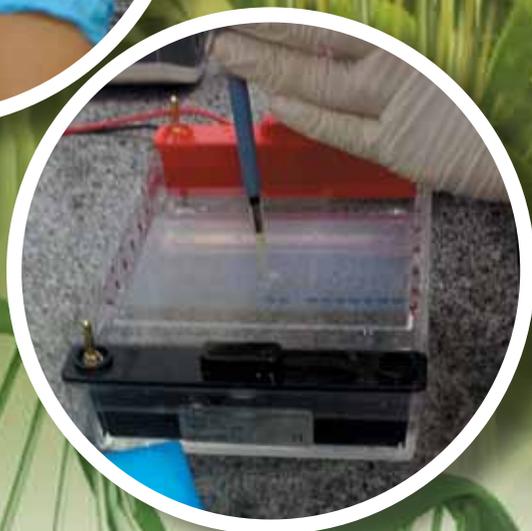


# QUINTO SEMINARIO NACIONAL DE TRIGO

*"Del grano al pan"*



MAN MOHAN KOHLI  
LUIS ENRIQUE CUBILLA  
GRACIELA CABRERA  
EDITORES

## CÁMARA PARAGUAYA DE EXPORTADORES Y COMERCIALIZADORES DE CEREALES Y OLEAGINOSAS “CAPECO”

La Cámara Paraguaya de Exportadores y Comercializadores de Cereales y Oleaginosas “CAPECO”, es una entidad de carácter gremial, sin fines de lucro, fundada el 20 de Febrero de 1980 y su personería jurídica fue reconocida por decreto N° 25.339 del 18 de mayo de 1981. Su misión fundamental es aunar a las empresas para cooperar integralmente en el desarrollo de sus intereses, ejerciendo la representación legal en gestiones de beneficio colectivo.

CAPECO representa a los productores, exportadores y comercializadores de cereales y oleaginosas del país, teniendo como miembros a las principales cooperativas agrícolas, empresas exportadoras nacionales y multinacionales, así como a la industria procesadora de granos.

Sus actividades principales consisten en apoyar proyectos agrícolas para la mejora de la calidad del grano y semillas, la investigación de cultivos, la fertilización del suelo, la prevención de las enfermedades de los cultivos y el cuidado del medio ambiente.

También tiene una participación activa en la mejora de la logística de exportación, búsqueda, apertura y acceso a los mercados principalmente para el maíz, trigo, soja, girasol, canola y subproductos, así como para defender los intereses de los socios a nivel nacional e internacional.

CAPECO es miembro de organizaciones internacionales como: La Alianza Internacional de Productores de Soja (ISGA), el Diálogo Internacional de Productores de Oleaginosas (IOPD) y de la Coalición Internacional del Comercio de Granos (IGTC)

Los agronegocios del sector cereales y oleaginosas (Sistema Soja - Trigo - Maíz - Girasol), representan 81% del PIB agrícola y el 47% del ingreso de divisas por exportaciones, más de US\$ 3.000 millones en inversiones y más de 250.000 puestos de trabajo. Actualmente, el sector es el motor de la “Economía Real del País”. En la última zafra, el sector movilizó alrededor de 4.500 millones de dólares.

## INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA “INBIO”

El Instituto de Biotecnología Agrícola es una asociación civil sin fines de lucro, con el propósito de promover un adecuado acceso al país de los productos derivados de la biotecnología agropecuaria y la incorporación ordenada de los mismos a la producción nacional, así como para la promoción y desarrollo de la investigación de biotecnología nacional.

Son fines y objetivos del INBIO contribuir a la prosperidad y bienestar del agricultor paraguayo mediante la promoción de un ambiente favorable para la inversión en investigación y desarrollo, innovación y adopción de productos y procesos biotecnológicos, compatibles y en armonía con los principios básicos de sustentabilidad y sostenibilidad ambiental, y seguridad para la salud humana y animal; promover las buenas prácticas agrícolas, a fin de proteger la salud de los trabajadores rurales y la inocuidad de los productos agropecuarios derivados de la biotecnología; promover el fortalecimiento de los recursos humanos disponibles en áreas claves para la investigación y desarrollo de la biotecnología; establecer y promover alianzas estratégicas con organismos/instituciones/empresas nacionales e internacionales, involucradas en investigación y desarrollo de biotecnología; cooperar con el Gobierno Nacional, en las negociaciones internacionales que se refieran directa o indirectamente a las materias de genética y biotecnología.

El INBIO está integrado por seis gremios de la producción: APS, APROSEMP, CAP, CAPECO, FECOPROD, UNICOOP.

El INBIO realiza sus funciones por medio de tres pilares programáticos: Información, Comunicación, Difusión; Capacitación de recursos Humanos e Investigación y Desarrollo agrícola.

---

Citación correcta: Quinto Seminario Nacional de Trigo: Del Grano al Pan.

Eds. M. M. Kohli, L. E. Cubilla y Graciela Cabrera. 2015. CAPECO/INBIO, Asunción, Paraguay. p 226

Palabras Claves: Trigo, *Triticum aestivum*, Investigación, Producción, Mejoramiento, Calidad, Mercado, Industrialización, Panificación, Cultivos Extensivos en Paraguay.

ISBN 978-99953-849-6-8

Dewey 633.11

AGRIS F01





# QUINTO SEMINARIO NACIONAL DE TRIGO

"Del grano al pan"

## EDITADO POR

Man Mohan Kohli  
Luis Enrique Cubilla  
Graciela Cabrera

CÁMARA PARAGUAYA DE EXPORTADORES Y COMERCIALIZADORES DE  
CEREALES Y OLEAGINOSAS, CAPECO

.....  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA, INBIO

**Asunción, Paraguay**

Abril de 2015

Quinto Seminario Nacional de Trigo: del grano al pan

Conferencias / Man Mohan Kohli; Luis Enrique Cubilla y Graciela Cabrera, editores.

Asunción: CAPECO/INBIO, 2015.

226 p.

ISBN 978-99953-849-6-8

1- Trigo. 2- Triticum aestivum. 3- Cultivo. 4- Investigación. 5- Producción. 6- Mejoramiento. 7- Calidad. 8- Mercadeo. 9- Control de calidad. 10- Paraguay. I. Kohli, Man Mohan; Cubilla, Luis Enrique; Cabrera, Graciela editores. II. CAPECO/INBIO. III. Título.

AGRIS F01

Dewey 633.11

# Contenido

---

	<i>Prólogo.....</i>	I
	<i>Palabras de bienvenida (Ing. Agr. Luis Enrique Cubilla).....</i>	II
	Una mirada al avance del trigo en el Paraguay <b>Man Mohan Kohli, Graciela Cabrera, Luis Cubilla.....</b>	1
	Situación de la industria molinera y las necesidades futuras <b>Johnny Hildebrand.....</b>	11
	Una visión del campo sobre las necesidades de la producción futura del trigo <b>Simona Cavazutti.....</b>	19
	El papel del trigo en el agronegocio y las oportunidades futuras <b>Ronaldo Dietze.....</b>	25
	La investigación internacional de trigo y los retos futuros <b>Man Mohan Kohli y Hans Braun.....</b>	39
	Estresses de altas temperaturas e deficiência hídrica em trigo ( <i>Triticum aestivum</i> L.) <b>Lauro Akio Okuyama.....</b>	53
	Avances de la biotecnología en trigo y su utilización en el mejoramiento genético. Situación actual en la Argentina <b>Marcelo Helguera.....</b>	67
	Haplodiploidização no melhoramento do trigo brasileiro <b>Pedro Luiz Scheeren, Sandra Maria Mansur Scgliusi.....</b>	77
	Trigo transgénico y nuevas metodologías para introducir atributos de interés <b>Gerónimo Watson.....</b>	91
	Germinação pré-colheita em trigo ( <i>Triticum aestivum</i> L.) <b>Lauro Akio Okuyama.....</b>	105
	Análisis de resistencia genética a la roya de hoja del trigo <b>Ruth Scholz.....</b>	119
	Avances en la investigación de la fusariosis de la espiga en Paraguay <b>Andrea Alejandra Arrúa.....</b>	139
	Fusariosis de la espiga de trigo y micotoxinas: impacto en la seguridad e inocuidad alimentaria <b>Sofia N. Chulze.....</b>	151

Caracterización de los trigos paraguayos por proteínas de reserva,  
translocación 1BL/1RS y su relación con la calidad  
**Lourdes Cardozo Téllez, Graciela Cabrera, Gustavo Benítez,  
Berna Giménez, Nathalia Zaracho, Man Mohan Kohli.....169**

### **Anexos. Posters del Quinto Seminario Nacional del Trigo**

- 1. Identificación de *Coleóperos coccinelidos* presentes en parcelas de trigo.....179**
- 2. Incidencia de *Fusarium graminearum* y determinación de deoxinivalenol en líneas de trigo candidatas a resistencia a la fusariosis de la espiga.....181**
  - 3. Incidencia de *Fusarium* sp. en líneas de trigo del Norte de la región Oriental del Paraguay.....183**
- 4. Selección de líneas de trigo tolerantes a la acumulación de deoxinivalenol..... 185**
- 5. Expresión de los genes NPR1 y PR1 asociados al ácido salicílico en la respuesta de defensa del patosistema trigo – complejo *Fusarium graminearum*.....187**
  - 6. Presencia de deoxinivalenol en trigo zafra 2013.....189**
- 7. Uso de PCR para la detección de aislado de *Fusarium graminearum* productores de deoxinivalenol.....191**
- 8. Efecto del pH sobre el crecimiento in vitro de *Fusarium graminearum*..... 193**
- 9. Caracterización de quimotipos de *Fusarium graminearum* aislados de trigo ..... 195**
- 10. Comparación de métodos de extracción de ADN para *Fusarium graminearum*..... 197**
  - 11. Respuesta de defensa 24 HDI en el patosistema trigo – complejo *Fusarium graminearum*..... 199**
- 12. Evaluación preeliminar de tres métodos de infección forzada del complejo *Fusarium graminearum* en trigo variedad Canindé 11..... 201**
- 13. Enfermedades de la espiga del trigo presentes en campos comerciales de siembra temprana en Itapúa durante el 2013..... 205**
- 14. Patógenos asociados a la punta negra del trigo durante el ciclo 2012..... 209**

# Prólogo

---

El papel del trigo como cultivo principal del ciclo de invierno está bien reconocido e integrado al sistema de cultivo nacional, aun con altibajos que el cultivo ha sufrido por razones climáticas y otros factores, la tendencia de la producción nacional ha sido siempre creciente. En tal sentido, el país se ha incorporado entre los países exportadores del trigo a pequeña escala reconocido por el mundo. En cuanto a la producción nacional, esta abastece la demanda del pueblo paraguayo y además genera más de 200 millones de dólares anuales en valor de exportación.

Todo esto ha sido posible gracias al Proyecto Fortalecimiento de la Investigación y Difusión del Cultivo de Trigo en Paraguay iniciado hace 10 años y que hoy recibe el apoyo del IPTA, CAPECO e INBIO.

Los trabajos presentados en el Quinto Seminario Nacional de Trigo “Del Grano al Pan” enfocan su atención a las investigaciones que se deben desarrollar en el país en el futuro. Mundialmente la revolución biotecnológica ha llevado a lograr avances, no solo en la parte productiva sino que también en la parte de calidad de los granos.

El cultivo de trigo, hasta ahora, no ha aprovechado todas las tecnologías desarrolladas por los biotecnólogos alrededor del mundo. Solo en tiempos recientes, y en algunos países se están aprovechando tecnologías como cultivos de tejidos, doble haploides y selección asistida por marcadores moleculares, principalmente en atributos que son difíciles de seleccionar a simple vista en el campo. Hasta ahora ningún país del mundo ha liberado un trigo transgénico, aunque esta tecnología puede proporcionar la solución para problemas tan graves como daños de la helada en estado de floración o infección por enfermedades como fusariosis de la espiga o piricularia, que tienen una estrecha base de resistencia disponible. Es en este sentido que las nuevas tecnologías abren un camino para los científicos, no solo a nivel nacional, sino también a nivel internacional para crear o desarrollar redes de trabajo colaborativo, con el único objetivo de dar solución a estos problemas de larga data y que hasta ahora no fueron resueltos.

Los trabajos presentados en este volumen del Quinto Seminario, marcan un camino que la agronomía nacional debe encaminar durante la próxima década o más. Para lograr esto, necesitamos formar y capacitar un cuerpo joven de técnicos nacionales, dedicados a tomar estos retos y utilizar las tecnologías modernas para solucionar los problemas del agro.

Este trabajo no solo requiere un decidido apoyo oficial, sino también el apoyo financiero a largo plazo para que las investigaciones iniciadas no se trunquen y queden a medio camino, es aquí que nosotros en CAPECO e INBIO vemos nuestro papel de no ser solo protagonistas del pasado, sino que también participantes en las actividades del futuro que sirvan para aumentar la producción nacional de trigo y lograr que este cultivo siga siendo importante en la cadena productiva y agroindustrial del país.

**JOSE BERA**  
*PRESIDENTE DE CAPECO*

**EUGENIO SCHOLLER**  
*PRESIDENTE DE INBIO*

La renovación del Convenio "Fortalecimiento de la Investigación y Difusión del Cultivo de Trigo en Paraguay" IPTA/CAPECO/Inbio 2014-2018.



Vista general del auditorio del Quinto Seminario.



# Palabras de bienvenida

## Ing. Agr. Luis Enrique Cubilla

Bienvenidos, muchas gracias por acompañarnos. Hoy es un día de fiesta muy especial para nosotros. Es un día donde estamos cumpliendo el décimo aniversario de este extraordinario programa que empezó como proyecto en el 2003. La realidad de haber logrado 12 variedades desde aquella quimera que al inicio pensábamos sería algo inalcanzable. Hubo muchos detractores de este programa; pero felizmente con esfuerzo, dedicación y con resultados hemos demostrado que se puede y vamos a tener que seguir trabajando intensamente en el futuro. Hay gente presente acá que nos ha apoyado. Felizmente mayor fue el número de gente que nos apoyó que la gente que empujó para atrás el programa; pero de cualquier manera estamos muy contentos y muy conformes.



Nuestro relacionamiento con el estado nunca fue un relacionamiento franco. No es fácil ser socio del estado, y menos con gobiernos cargados de vicios, que vienen siendo arrastrados desde hace muchos años.

Estamos muy contentos principalmente con el cambio de las autoridades del IPTA, el instituto que es nuestro compañero de trabajo; con el cual andamos de la mano y deberíamos realmente andar mucho más cerca. Tenemos plena seguridad de que con este nuevo grupo de profesionales que se hizo cargo de la conducción del IPTA, nuestro Proyecto de Fortalecimiento de Investigación de Trigo va a crecer intensamente. Esperamos llegar a tener resultados mucho más positivos y sobre todo resultados más importantes que los que ya tuvimos hasta el momento.

Así, que agradecemos mucho a las autoridades presentes, especialmente a nuestro querido amigo Jorge Gattini, Ministro de Agricultura y Ganadería, a Daniel Idoyaga, Presidente del IPTA, que está haciendo un trabajo ciclópeo para poner en condiciones esa institución desmoronada.

También queremos saludarles a nuestros invitados extranjeros que han venido de muy lejos a colaborar y entregarnos su conocimiento. Es la única forma que nuestros programas, proyectos e ilusiones se hagan realidad: con la capacitación constante. Ellos serán los que nos van a ayudar a capacitar tanto a los jóvenes como también a los viejos profesionales que ya estamos más bien mirando el portón de salida. Estamos muy contentos que haya tanta gente joven, los nuevos profesionales que están presentes hoy que son para nosotros de gran interés.

Nuestros invitados especiales, voy a citarlos a la Dra. Sofía Chulze, Profesora de la Universidad de Río Cuarto, Argentina, al Dr. Lauro Okuyama, Líder de Investigación de Trigo de IAPAR, Brasil, al Dr. Pedro Scheeren, quien es Mejorador de Trigo en EMBRAPA, Brasil, al Dr. Marcelo Huelguera, Jefe de Laboratorio de Biotecnología de Trigo del INTA, Argentina, al Ing. Gerónimo Watson, Gerente de Desarrollo de INDEAR, Argentina. INDEAR es una empresa privada creada por nuestros viejos amigos que muchos de ustedes los deben recordar, Víctor Trucco, Roberto Peiretti, Rogelio Fogante aquellos que son prácticamente los padres de la siembra directa en la Argentina y creadores de AAPRESID; y al Ing. Edgar Guzmán, que es Jefe del Programa de Trigo del CIAT, Santa Cruz, Bolivia. Muchísimas gracias a ellos por estar con nosotros y por venir a transmitirnos todos sus conocimientos.

Esta tarde vamos enfocar temas, que requiere el productor. Creemos saber lo que quiere el productor y vemos la necesidad de dirigirnos hacia allí. Sabemos que el productor quiere altos rendimientos, principalmente kilos por hectárea; porque es lógico ya que el productor está cobrando por toneladas. Al productor no se le paga por calidad, lamentablemente.

En los primeros años del programa, se han desarrollado materiales genéticos de alta productividad, de buena sanidad buscando incorporar esos materiales genéticos a sectores donde no se sembraba trigo, ni siquiera, con el perdón del Dr. Kohli, para cobertura como decían algunos. Muchos hablaban de trigo, vamos a plantar trigo para cobertura invernal, para aumentar la posibilidad de materia orgánica en el suelo mediante su cultivo. Hoy día ese paradigma está destrozado, está fuera de nuestras mentes. El trigo está para venderlo, para exportarlo, para industrializarlo y no solamente para considerarlo un cultivo de cobertura. A pesar que el trigo después del maíz, probablemente, sea el cultivo de mayor importancia dentro del sistema de rotación y para mantener vivo nuestro sistema de siembra directa.

Entre paréntesis voy a hacer un breve, brevísimo recordatorio a nuestro primer Presidente de la FEPASIDIAS que falleció ayer. El Sr. Fukami, de la Cooperativa Yguazú, fue considerado como uno de los líderes principales de la adopción del sistema de siembra directa. Hemos enviado nuestras condolencias a la familia, además de avisar a nuestros amigos del campo y del exterior y hemos recibido una innumera cantidad de correos que lo recuerdan como un hombre que realmente hizo muchísimo por nuestro país.

Vamos a trabajar fuertemente en sistema de siembra directa porque el trigo necesita mucho más fertilidad de lo que hoy el productor le da. El tema de la fertilidad, de la aplicación del nitrógeno al trigo, es un tema que todavía no podemos destrabar. Tenemos un material preparado y está en venta para los estudiantes que no lo tienen todavía, en donde el cultivo de trigo ocupa su espacio como corresponde. Esos trabajos locales fueron hechos por varios profesionales paraguayos y resumen los resultados de 5 maestrías y dos doctorados en una Universidad de Brasil. Todos esos trabajos incluyen en un paquete de fertilización de trigo, maíz y soja.

Bueno, para acortar e ir terminando, vamos a tener a todos los conferencistas mañana para discutir cómo podemos obtener trigo de mejor calidad; que es lo que realmente nos importa en este momento. Tenemos muchos problemas, y vamos a seguir teniendo problemas importantes con nuestros compradores de granos y por supuesto de harina también, por problemas de las micotoxinas. La fusariosis se ha instalado en Paraguay, y este año se ha desarrollado una virulencia impresionante por las condiciones climáticas que se dieron. Hemos entendido que nuestras variedades, y por supuesto las variedades extranjeras que están involucradas en el sistema del cultivo en Paraguay, están muy mal, a expensas de la virulencia de esta enfermedad. La Dra. Chultze nos va a dar una charla importante en lo que corresponde al manejo de las micotoxinas generadas por la enfermedad de la fusariosis.

Entonces, agradecemos nuevamente la presencia de todos ustedes. Agradecemos a nuestro Presidente, el Señor Ulrich Bauer por el apoyo permanente, que tenemos para estos eventos y por llevar adelante las iniciativas de trabajo que le presentamos. Agradezco a la Comisión Directiva del INBIO, que también ha dado apoyo permanente en los programas y procesos que se están desarrollando. Mucha gente del país está siendo favorecida; universidades, grupos de campesinos que están siendo favorecidos por el aporte y el apoyo técnico y financiero que le da el INBIO; y por supuesto al IPTA, deseándole éxito al nuevo presidente Dr. Idoyaga. Nosotros estamos para apoyar como siempre. Estamos viendo como la institución pública se está saneando, está tratando de blanquear y hacer que lo público sea público. Eso es lo más importante y estamos muy contentos con eso Dr. Idoyaga. Ofrecemos y queremos que en el tiempo que nos queda de vida y con fuerza sigamos trabajando en función de las alianzas como ya hemos iniciado desde año 1993. Las alianzas públicas y privadas son las que más funcionan y estamos de acuerdo plenamente con el nuevo gobierno que ha instalado ese nuevo sistema. Nosotros ya desde hace 20 años que estamos trabajando en alianzas, ya sea con el Ministerio de Agricultura o cualquiera de sus dependencias y eso nos ha dado un posicionamiento importante, tanto al gobierno de turno como a las instituciones privadas que inyectaron sus esfuerzos, fondos financieros, y principalmente sus ilusiones en esos trabajos en alianza.

Ahora vamos a dar una mirada a la Investigación Nacional de Trigo durante una década elaborada por el querido amigo el Dr. Man Mohan Kohli, que es nuestro consultor científico desde hace 10 años. Espero que dentro muchos años podamos seguir viéndote acá Dr. Kohli. Muchas gracias.

# Una mirada al avance del trigo en el Paraguay

**MAN MOHAN KOHLI<sup>1</sup>, GRACIELA CABRERA<sup>2</sup>, LUIS CUBILLA<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> CAPECO, Ave. Brasilia 840, Asunción, <sup>2</sup>. IPTA/CIHB, Km 48.5, Ruta 2, Caacupé

Contacto: [mmkohli@gmail.com](mailto:mmkohli@gmail.com)

## Resumen



El cultivo de trigo ha alcanzado un punto clave en el actual sistema productivo del Paraguay. Más allá de su potencial de producción de granos, su siembra en la época de invierno es considerada esencial no solo para lograr una cobertura del suelo sino también por la alta calidad de rastrojo que produce para el sistema de siembra directa instalada en el país. Los cambios en tecnología de producción promovidos durante la última década crearon confianza entre los productores en cuanto a su manejo, llevando a duplicar la superficie del área del cultivo durante este periodo. La combinación del mejor manejo sobre una mayor superficie ha permitido casi cuadruplicar la producción, logrando rendimientos promedios comparables con otros países trigueros de la región. El país ha exportado anualmente alrededor de un millón de toneladas de grano durante los últimos años, permitiendo el ingreso de alrededor de 300 millones de dólares de divisas a la economía nacional. Desde su creación en el año 2003, el proyecto “Fortalecimiento de la Investigación y Difusión del Trigo en Paraguay”, apoyado por una alianza pública-privada (MAG/CAPECO/IN-BIO), tuvo una visión clara de crear tecnologías que se adapten a las condiciones locales, que sean económicamente sostenibles y respondan a las demandas del mercado. La investigación se concentró en la regionalización del área triguera, con la creación de variedades aptas para estas regiones, tecnologías adecuadas del manejo, incluyendo el manejo integrado de enfermedades y mejora de calidad industrial, etc. Todo este esfuerzo fue apoyado por otros actores; los semilleros, los representantes de insumos agrícolas, las concesionarias de maquinarias, etc., y todavía más

importantes, los productores y sus cooperativas que consolidaron la producción durante esta década. Gracias a los esfuerzos de la CAPECO y otros agroexportadores, las puertas de alrededor de 35 países están abiertas para recibir el trigo paraguayo, identificándolo por tener buena calidad. La industria nacional ha utilizado este auge de producción para ocupar la proporción ociosa de los molinos instalados creando nuevas fuentes de trabajo en industrias aliadas, y demás beneficios. En otras palabras, el retorno económico de esta alianza productiva ha sido fenomenal. Sin embargo, hay un largo camino que recorrer para duplicar la producción en la próxima década, acompañado de los avances tecnológicos que se discutirán en este seminario. Paraguay tiene la capacidad para producir más trigo y participar en el esfuerzo mundial de reducir el hambre, asegurando así la seguridad alimentaria nacional e internacional.

## Abstract

---

### A review of the progress made by wheat research in Paraguay

*The wheat crop has been very successful in the current production system of Paraguay. Beyond the grain production potential, its seeding during the winter season is considered essential not only to achieve a good ground cover, but also for the high quality straw it produces; which is essential for the zero tillage system practice in the country. The changes in the production technology promoted over the last decade have helped create confidence among the farming community with regards to the management practices, leading to the doubling of the crop area during this period. The combination of better management practices adopted over a larger area have led to nearly quadruple production, achieving better yields, which are comparable to the neighboring countries. As a result, Paraguay has been able to export approximately 1 million tons of wheat per year over the last few years, and generating an annual income of about 300 million dollars of foreign exchange for the national economy. Since its inception in 2003, the project “**Strengthening Wheat Research and Extension in Paraguay**”, supported by a public/private partnership, (MAG/CAPECO/INBIO), kept a clear vision to create technologies adapted to the local conditions, both economically sustainable and responsive to the market demands. The research focused on the regionalization of the wheat area, development of suitable varieties for these regions, identification of appropriate management technologies including integrated disease and pest management technologies and improvement of industrial quality characters, etc. This effort was supported by additional actors: seed agencies, representatives from agricultural inputs and machinery etc. and most importantly, wheat producers and their cooperatives which helped consolidate the production during this decade. Thanks to the effort of CAPECO and other agricultural exporters, approximately 35 countries have opened their market to receive Paraguayan wheat, identifying it as having good quality. The domestic milling industry has also gained from this boom to fill the idle production capacity of the mills and at the same time create more employment in the allied industries and others. In other words, the economic returns of this productive partnership have been phenomenal. However, there is a long way to go to double the production further over the next decade, utilizing some of the technological advances to be discussed in this Seminar. Paraguay has the ability to produce more wheat and help global effort to reduce hunger, thereby ensuring national and international food security.*

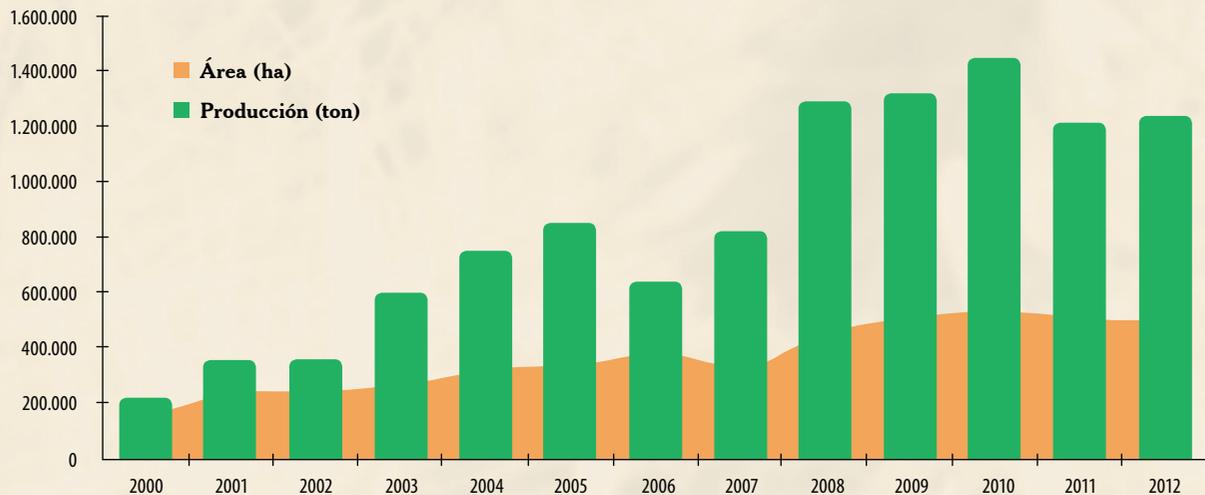
Buenas tardes al señor Ministro de Agricultura y Ganadería, señor Presidente del IPTA, señor Presidente de CAPECO, amigos invitados del extranjero, representantes de distintas instituciones nacionales y las cooperativas; y, especialmente, a los jóvenes presentes. Espero que tengamos dos jornadas excelentes, llenas de informaciones que marquen un rumbo para los próximos 10 a 20 años del trigo y la agricultura del Paraguay.

Nuestro esfuerzo hoy será tratar de hacer una retrospectiva de lo sucedido durante los últimos diez años. Voy a tratar de ser muy breve para dar oportunidad a la discusión sobre el tema y el valor de la investigación. Este tópico se seccionará en tres partes: la evolución triguera nacional, los componentes de esa evolución y el impacto económico de este esfuerzo.

## LA EVOLUCIÓN TRIGUERA NACIONAL

Este año tuvimos un serio problema de producción a causa de tres heladas fuertes en los meses de julio, agosto y septiembre que coincidieron con los estadios más vulnerables del cultivo en diferentes regiones trigueras. Como consecuencia, se estima una pérdida de casi un 50 %, de los cultivos del trigo a nivel nacional. En todas partes los productores se hacían la pregunta, ¿cómo podemos hacer un trigo resistente a heladas? La respuesta no es muy fácil, como tampoco fue fácil en el 2006, cuando se perdió casi el 40% de la producción nacional por heladas. Sin embargo, si observamos la evolución del cultivo de trigo sobre un período más largo a partir del año 2000 cuando la producción era de solo 200.000 toneladas, es todo un logro producir casi 1,5 millones de toneladas en la actualidad. (Fig. 1).

Fig. 1. **Evolución de la producción triguera en Paraguay, 2000-2012.**



Fuente: CAPECO

A pesar de los problemas de heladas en algunos lugares durante los últimos dos años, la producción nacional osciló entre 1.200.000 y 1.300.000 toneladas. Creemos sinceramente que el Paraguay está produciendo una buena cantidad de trigo y que ha logrado entrar en el grupo de países exportadores del mundo.

Nuestra colega, Sonia Tomassone, que maneja el comercio exterior en CAPECO, nos asegura que Paraguay es el 13° en el ranking mundial en exportación de trigo. Este año, el nivel de exportación está cerca de 1,1 millón de toneladas con destino a 13 países. Los esfuerzos de CAPECO, junto con los del Ministerio de Relaciones Exteriores, han tenido un excelente resultado al lograr la apertura del mercado a 38 países para la exportación del trigo nacional. (Fig. 2 y 3).

Fig. 2. **La evolución de la exportación paraguaya del trigo.**

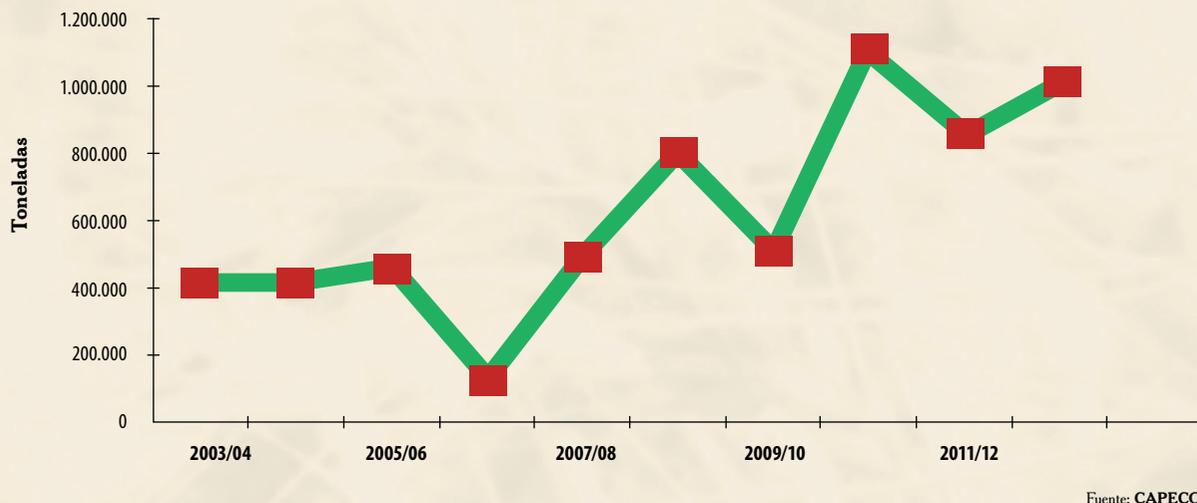
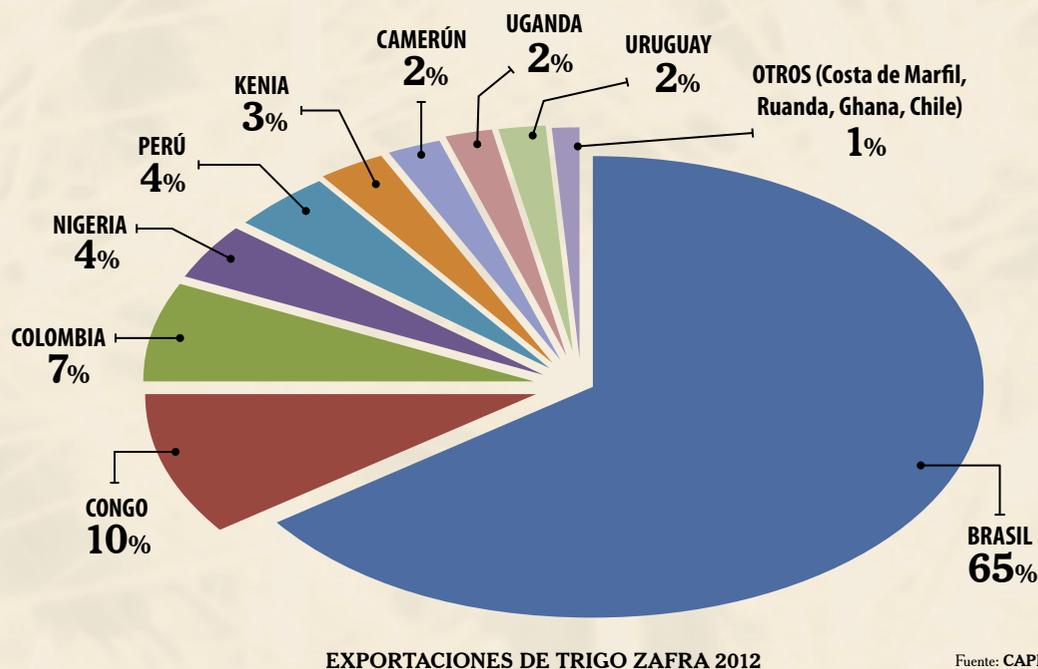


Fig. 3. **Destinos principales de la exportación triguera nacional.**



La producción nacional del trigo representa un valor de 350 millones de dólares, del cual más de 300 millones de dólares provienen de la exportación. Es un ingreso muy importante que agrega valor a la cadena productiva nacional, además de proporcionar una excelente cantidad y calidad de rastrojos para el cultivo de soja.

## PROYECTO DE FORTALECIMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN Y DIFUSIÓN DEL CULTIVO DE TRIGO EN EL PARAGUAY

Este progreso se logró a través de una alianza público-privada, que trató de desarrollar un **Proyecto de Fortalecimiento de Investigación y Difusión del Cultivo de Trigo en el Paraguay** entre los años 2003 y 2013. En la primera fase, el Programa fue apoyado por el Ministerio de Agricultura y Ganadería, MAG, el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, CIMMYT, con sede en México, y la Cámara Paraguaya de Exportadores de Cereales y Oleaginosas, CAPECO. En su segunda fase, el programa recibió el apoyo del MAG, CAPECO y el Instituto de Biotecnología Agrícola, INBIO. Actualmente, estamos terminando la segunda fase y apostando para una tercera fase del proyecto.

### DESARROLLO TECNOLÓGICO

En este momento es oportuno analizar los factores que fueron claves para el éxito logrado en el proyecto. Desde el inicio del mismo se logró identificar y establecer metas claras y prácticas que podían ser alcanzadas a corto y a mediano plazo.

La primera meta fue desarrollar tecnologías aptas para las condiciones locales; esto no significaba que el productor no tuviera tecnologías para su producción, sino que la gran mayoría eran posiblemente traídas desde el Brasil o la Argentina, y éstas no se adaptaban a las condiciones locales, como por ejemplo las fechas de siembra, variedades, etc. El esfuerzo del programa fue adaptar estas recomendaciones a las condiciones locales y promover los nuevos conocimientos entre los productores de distintas regiones trigueras.

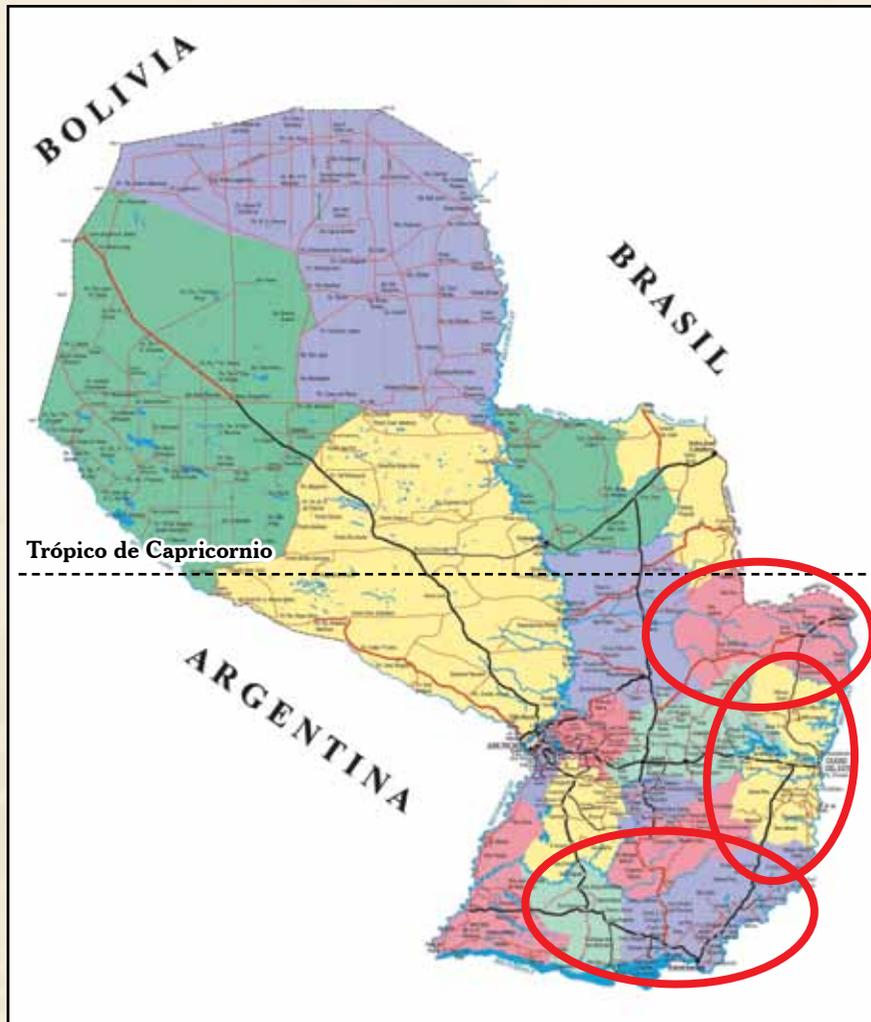
El segundo aspecto se relacionaba con el costo de la producción del trigo. La opinión generalizada era que el cultivo del trigo no era económico y que era riesgoso sembrarlo. El cultivo de trigo cubre una época del año donde el productor tiene muy poco margen de ganancia debido a las inclemencias del tiempo durante los meses de invierno. Si el productor no logra sacar provecho al final del ciclo, o el cultivo no le deja un margen de ganancia, prefiere dejar el suelo en barbecho y sembrar soja más temprano. Era muy importante desarrollar tecnologías que ayudará a bajar el costo y lograr una producción más eficiente.

El tercer aspecto fue cumplir con la demanda del mercado nacional e internacional, no solo en la producción de granos, sino también en la calidad del producto para obtener mejores precios.

En cuanto a las acciones, se dio inicio al trabajo analizando las condiciones agro-climáticas de distintas regiones productoras; y, de esa manera regionalizar el país en base a las temperaturas mínimas durante el ciclo del cultivo (Fig. 4). Entre las tres regiones identificadas existe una diferencia de casi 2 °C en promedio desde el sur hacia el norte, siendo la temperatura media mínima del ciclo menos de 18 grados en el sur, de 18 a 20 grados en el centro y más de 20 grados en el norte. Esta regionalización fue la base para desarrollar un acervo genético totalmente distinto de como era manejado en el pasado.

Anteriormente el programa manejó variedades desarrolladas en la región de Itaipuá en todo el país. Sin embargo, esas variedades no tenían una buena adaptación en las regiones de Alto Paraná, Canindeyú o San Pedro, facilitando así la adopción masiva de variedades brasileñas. El esfuerzo nacional fue crear una colección genética adaptada a la región norteña, bautizado con la sigla de variedades Canindé. Este año se manejan alrededor de 6.000 mil nuevas líneas genéticas o variedades en el norte del país y alrededor de 10.000 materiales en el sur. Se espera que este nivel de compromiso genético pueda producir resultados deseables en corto tiempo.

Fig. 4. **Regionalización del cultivo de trigo en Paraguay basado en las temperaturas mínimas durante el ciclo del cultivo.**



Durante estos 10 años, el programa desarrolló 12 variedades de trigo, algunas específicas para el sur y otras para el norte. La gran mayoría de estas variedades son de alto potencial de rendimiento, sanidad y calidad industrial; y, algunas están mejor adaptadas al suelo ácido con toxicidad de aluminio.

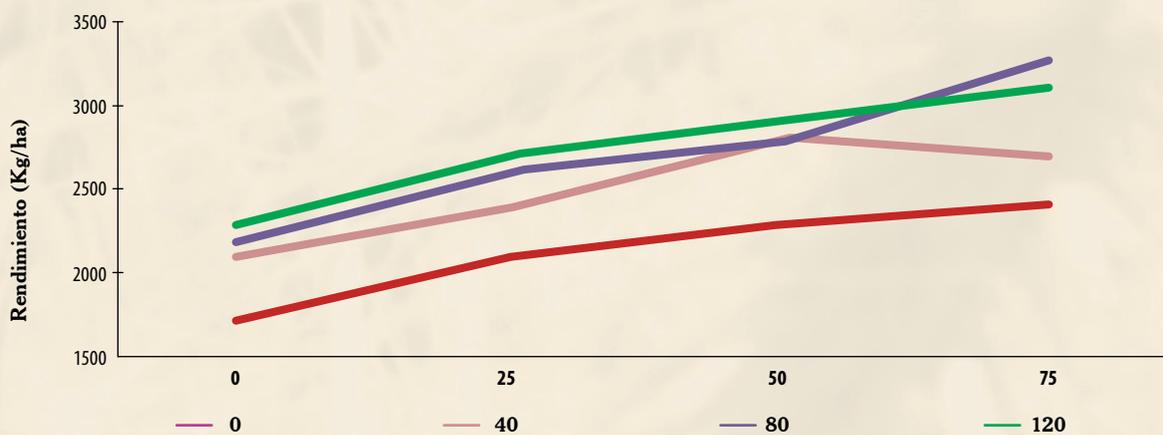
Fue importante divulgar junto con las nuevas variedades, las fechas correctas de siembra en diferentes regiones. No es lo mismo sembrar en cualquier época; los productores iniciaban su siembra a mediados de abril, e inclusive en marzo; y otras veces, sembraban el 30 de mayo o 30 de junio. Fue muy importante mostrarles que sembrando en distintas épocas hay una diferencia en la producción de una tonelada aproximadamente. La siembra en época correcta, para cada región en particular, permite lograr alrededor de 30 % más rendimiento en comparación con las siembras fuera de época.

El tercer aspecto explorado fue la fertilización eficiente, considerando que representa casi la mitad del costo de producción. El Ing. Cubilla habló sobre la colaboración entre CAPECO y la Universidad Federal de Santa María, Brasil, en el desarrollo de la tecnología de fertilización en el país. Además de la información generada, esta colaboración fue clave para capacitar 10 técnicos jóvenes que terminaron sus estudios a nivel de post grado (8 en MSc. y 2 Doctorados).

A nivel local, junto con los técnicos del IPTA se desarrolló una relación entre la aplicación de nitrógeno y fósforo (Fig. 5). Los datos promedios de varios ensayos mostraron una alta acumulación del fósforo en el suelo que permitió un rendimiento de casi 1.700 kilogramos por hectárea sin aplicación de nitrógeno; y una respuesta a la aplicación de 80 kg/ha Nitrógeno con un rendimiento de 2.300 kg/ha. Sin embargo, para lograr un rendimiento de más de 3.000 kg/ha, no es solamente aumentar el nitrógeno, sino mejorar la relación nitrógeno-fósforo. Es muy probable que, para la próxima etapa haya otros elementos como potasio, azufre y otros nutrientes que aún no han sido analizados.

Desde el inicio del cultivo comercial de trigo en Paraguay en la década de 1970, los agricultores adoptaron el control químico de las enfermedades de manera generalizada. Aunque la contribución de esta tecnología a la producción de trigo es innegable, es inaceptable el uso innecesario de fungicidas sobre las nuevas variedades con resistencia genética a varias enfermedades, o su abuso en un ciclo con falta de condiciones climáticas para su desarrollo. Actualmente, los productores cuentan con variedades altamente resistentes a algunas enfermedades y otras que son moderadamente resistentes o moderadamente susceptibles. En este caso, utilizar la genética de estas variedades como aliada puede resultar en la reducción de las aplicaciones, que serán utilizadas solamente en casos necesarios. Además, es importante señalar que únicamente en años húmedos, cuando los problemas de manchas foliares y enfermedades de las espigas son prevalentes, el control químico puede ser importante para la protección de la cosecha.

Fig. 5. **Interacción entre nitrógeno y fósforo para el rendimiento de trigo en Cap. Miranda, Itapúa.**



Fuente: Ing. Alodia Gozáles, IPTA.

Junto con el aumento del rendimiento, fue necesario mejorar la calidad industrial de los materiales genéticos. El atributo que distingue a los trigos paraguayos es su alta proteína, que varía más o menos en el promedio de 12,5 a 14 % (Cuadro 1).

Cuadro 1. **Los parámetros de la calidad industrial de las principales variedades nacionales de trigo.**

Variedad	Proteína (%)	W (10 <sup>4</sup> J)	FN (s)
Canindé 1	13,2 - 16,7	279 - 515	368 - 400
Itapúa 70	12,8 - 15,2	350 - 408	383 - 412
Itapúa 75	13,1 - 16,0	243 - 335	329 - 395
Canindé 11	13,3 - 14,2	167 - 192	374 - 395

Considerando la exigencia del mercado brasileño para mejorar la fuerza del gluten, el programa ha liberado nuevas variedades con un alto valor del W (Fuerza del glúten), pero al mismo tiempo manteniendo una variabilidad entre mediana a alta fuerza del gluten, así se pudo proveer trigos a otros mercados dependiendo de sus necesidades. Debido a los problemas de precipitaciones en época de cosecha, otro parámetro que fue mejorado fue el Índice de Caída o **Falling Number**, indicador de la actividad enzimática en el grano que está relacionado con el pre-brotado.

En resumen, las variedades nacionales pueden ser clasificadas como de alta proteína, de excelente calidad para panificación y aptas para elaborar diferentes productos panificados. La idea es no solo hacer un producto como pan, sino también proporcionar trigos para galletitas, bizcochos y pizza.

## DIVULGACIÓN Y CAPACITACIÓN

La divulgación de nuevas tecnologías y conocimientos desarrollados a través del proyecto nacional fue un aspecto clave para su adopción entre los productores. El contacto directo con los agricultores, agentes de promoción y de tecnología público/privada fue a través de giras técnicas al campo, charlas específicas, días de campo y demostraciones organizadas para mostrar las nuevas tecnologías. Durante el año se desarrollaron 25 demostraciones en distintas partes del país; y, conociendo los problemas reales y buscando las soluciones adecuadas 12 charlas sobre distintos aspectos de la producción fueron compartidas con los agricultores. Estas actividades se llevan a cabo todos los años.

Las publicaciones formales a nivel científico y popular en las revistas del agro fueron utilizadas para diseminar la información desarrollada. Se divulgaron informaciones sobre producción en general, variedades, calidad, enfermedades y publicaciones específicas sobre fusariosis. Además de las guías prácticas sobre el trigo, los trabajos técnicos presentados en los seminarios nacionales fueron publicados para apoyar a los técnicos de campo y estudiantes. Estos materiales son la materia prima para mejorar los conocimientos y la capacitación de los productores y técnicos en general.

## IMPACTOS DE LA INVESTIGACIÓN TRIGUERA NACIONAL

Los impactos de una década de investigación nacional de trigos son resumidos en el Cuadro 2. Una comparación de estadísticas nacionales de trigo entre las décadas de 1993-2002 y de 2003-2012, señala una duplicación de la superficie sembrada durante esta década y casi la triplicación de la producción debido a un aumento sostenido del 50 % en el rendimiento. El promedio de la superficie de trigo en esta década aumentó en un 107 % (de 207.000 a 428.000 hectáreas), la producción en un 203 % (de 340.000 a 1.036.000 toneladas), y el rendimiento de 1600 a 2400 kg/ha.

Más allá del incremento en la producción y exportación lograda en esta década, el impacto económico de la investigación nacional de trigo arroja cifras impresionantes. Si los productores utilizaran las tecnologías viejas de la década del 1993-2002 durante esta década, la superficie actual de 427.000 ha iba a producir casi 700.000 mil toneladas de granos. Con las nuevas tecnologías divulgadas, la producción aumentó un promedio de 350.000 toneladas extras por año durante esta década.

Cuadro 2. **El impacto de la investigación de trigo en Paraguay**

	1993 - 2002	2003 - 2012	Incremento
Área (ha)	206,955	427,924	107%
Producción	341,404	1,035,541	203%
Rendimiento (Kg/ha)	1,611	2,422	50%

Si nos basamos en un precio promedio de 200 dólares americanos por tonelada durante la década, el valor estimativo de la producción adicional llega a ser de 694 millones de dólares americanos. La inversión financiera hecha para la investigación durante este periodo fue de 1.268.000 dólares americanos lo cual arroja una relación de costo beneficio de 1 a 693, un valor muy positivo.

<b>Producción con tecnología 1993</b>	<b>689.385</b>
<b>Producción con tecnología 2003</b>	<b>1.036.541</b>
<b>Producción extra</b>	<b>347.155</b>
<b>Precio promedio</b>	<b>US\$ 200/ton</b>
<b>Valor adicional en 10 años</b>	<b>US\$ 694,310,872</b>
<b>Inversión en investigación</b>	<b>US\$ 1,268,000</b>
<b>RELACIÓN COSTO : BENEFICIO</b>	<b>1:693</b>

En conclusión, la decisión de apostar en la investigación y su desarrollo puede resultar muy atractivo y arrojar impactos económicos mayores a los esperados. Con este criterio, estimamos que es muy importante la continuidad, no de solo de este proyecto, sino también de otros, como la investigación de soja nacional, agricultura extensiva o en pequeñas propiedades, que pueden beneficiarse de una alianza público privada en el futuro.

Antes de terminar, es necesario mencionar que todo este trabajo no sería posible sin la colaboración de muchas personas, presentes en este Seminario o en el campo; personal del IPTA/CAPECO/INBIO, dirigentes y socios de las cooperativas, empresas privadas e industria nacional, etc. A todos estos colaboradores se le da las gracias y se espera seguir contando con su apoyo en el futuro.



Reconocimiento por 10 años de entrega al Proyecto "Fortalecimiento de la Investigación y Difusión del Cultivo de Trigo en Paraguay".



# Situación de la industria molinera y las necesidades futuras

## JOHNNY HILDEBRAND

Hilagro SAE – Ruta Intern. No. 7, Km. 214, J. E. Estigarribia (ex Campo 9)

Contacto: [johnny@hilagro.com.py](mailto:johnny@hilagro.com.py)

## Resumen



La Industria Molinera está procesando trigo importado por primera vez después de 11 años. Esto a consecuencia de las heladas ocurridas en las etapas más críticas del cultivo de trigo este año. Otro cambio sucedido, ya desde enero de este año, fue el crecimiento de la exportación de harina, principalmente al Brasil. Con el bloqueo de la exportación de harina y trigo de Argentina, que ocurrió este año por primera vez en Enero (por un periodo de 3 meses), los compradores Brasileños llegaron desesperado al Paraguay para buscar una alternativa. Esta fue una oportunidad única para los Molinos Paraguayos para dar a conocer nuestros productos en el exterior, lo cual había sido muy difícil en años anteriores por el subsidio al precio de la harina en la Argentina. La capacidad de molienda Paraguaya es de 1.015.000 de toneladas de trigo al año, lo cual significa que el 40 % aproximadamente de esta capacidad es ociosa. El 60 % de la capacidad instalada está localizada en la Zona de Campo 9. La exportación de harinas en el 2013, ya en Setiembre superaron el doble de la exportación total del año 2012. El desafío de los molinos nacionales es ganar confianza en el mercado exterior y aprovechar esta oportunidad para buscar un mercado a largo plazo, principalmente en Brasil. La situación regional del trigo sugiere que a corto plazo la producción no será suficiente para el consumo de Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay y Uruguay, porque el área de producción de trigo en Argentina es un 40 %, comparado al año 2006. Con esta perspectiva la Industria Molinera Paraguaya tiene una oportunidad para abrir nuevos mercados en la región, para lo cual debe adaptarse a las exigencias de calidad del mercado Brasileño principalmente, que no es muy diferente al trigo producido en

el país. El desafío de este año va a ser encontrar la mezcla correcta de trigo nacional e importado, para que no sufra un cambio brusco en la calidad de la harina. En los últimos 5 años Paraguay ha producido un trigo de excelente calidad, es más, en términos de proteína (gluten) tenemos un trigo que ya varios molinos del Brasil usan como mejorador para la harina panadera.

## Abstract

### The situation of the milling industry and future needs

*The milling industry is processing the imported wheat for the first time after 11 years. This happened because of the frost that occurred at the most critical stages of the wheat crop this year. Another aspect which has changed since January of this year is the growth of flour exports mainly to Brazil. As a result of the Argentine blockage on wheat flour exports, Brazilian buyers came to Paraguay desperate to find an alternative. This was a unique opportunity for the Paraguayan mills to learn about the acceptance of their products abroad, which have been difficult in the previous years by the subsidized flour prices in Argentina. Paraguayan milling capacity is a little over 1 million tons per year, which means that approximately 40% of its capacity remains idle during a normal year. Of the installed capacity, almost 60% is located in the Campo 9 region. By the month of September, export of wheat flour in 2013 had exceeded twice the total exports in 2012. The challenge to the local millers is to gain confidence in the market outside and take this opportunity to develop long term market abroad, especially in Brazil. The regional wheat production situation portrays that at least in a short term, the production will not be sufficient for the regional consumption (Argentina, Bolivia, Brazil, Paraguay and Uruguay), because the wheat production area in Argentina is almost 40% of the area in 2006. With this perspective, the Paraguayan milling industry has the opportunity to open new markets in the region that must be adapted to the quality requirements of mainly the Brazilian market, which is not very different from the wheat produced in the country. The challenge this year will be to find the right mix of domestic and imported wheat in order not to suffer a certain change in the quality of flour. During the last 5 years, Paraguay has maintained a very high quality of wheat in terms of protein (gluten) and several mills in Brazil have used our wheat to improve the quality of their flour.*



Vista general del molino comercial.

## LA MOLINERÍA NACIONAL

Gracias a los avances logrados por el programa nacional de trigo y resumidos (por el Dr. Kohli) anteriormente, nosotros como industriales hoy podemos demostrar que somos capaces de entrar con nuestra harina al mercado de exportación especialmente Brasil. Además reconfirmar que la calidad que tenemos es realmente superior en términos de gluten o proteína en relación al trigo de Argentina, Uruguay o de la parte sur del Brasil.

La industria molinera nacional cuenta con 38 molinos actualmente, de los cuales 34 están activos; 5 molinos corresponden a las cooperativas que representan un 18% de la capacidad instalada. El 60% de la capacidad nacional está concentrada en la zona de Campo 9, departamento de Caaguazú. Del total, 45% de la capacidad hoy esta ociosa, es decir, hay una capacidad instalada mayor a lo que realmente se procesa o se consume localmente.

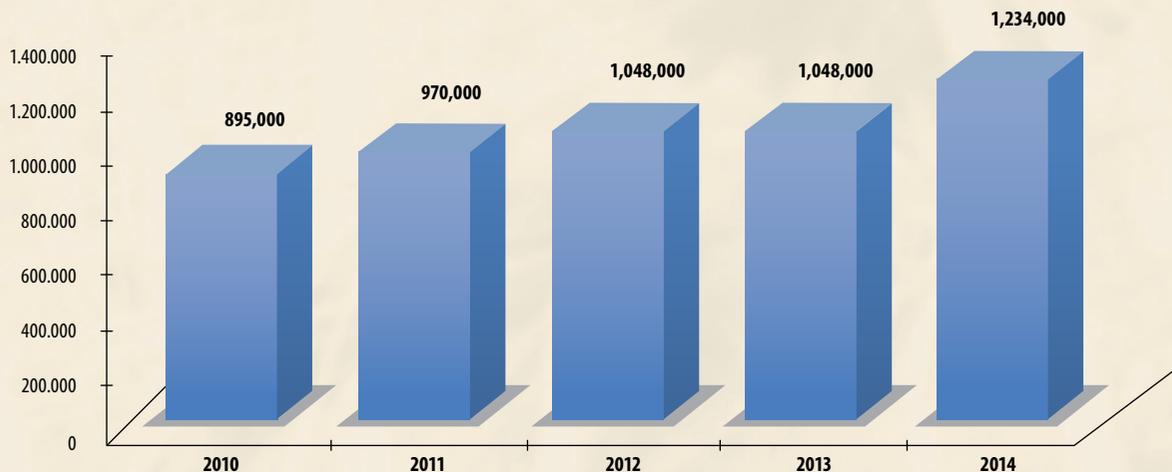
La molinería nacional está muy enfocada a la demanda interna y con la sobre oferta de la harina en el mercado local, especialmente en época de verano, el sector está obligado a buscar salida externa a través de la exportación, y así agregar el valor al trigo nacional, algo que consideramos importante.

El consumo nacional de trigo es aproximadamente 650.000 toneladas. Según algunos sondeos actuales, estimamos que la molienda nacional estará alrededor de 750.000 a 800.000 toneladas. Considerando las mermas en la producción de trigo este año y la exportación de granos estimadas en 100.000 a 150.000 toneladas, la industria necesitará importar trigo, un hecho que ya está ocurriendo hoy. Es la primera vez en 10 años que estaremos importando trigo para nuestra industria, lo que propicia un desafío. No se tiene conocimiento de haber importado trigo durante los últimos 10 años o molido, ya que el trigo importado tiene otras características. Se nos presenta un desafío importante para el año que viene y estimamos la necesidad de la importación como mínimo de 250.000 toneladas.

La industria ha incrementado la capacidad de molienda entre 2010 y 2012, en casi 8% (Fig. 1). Estimamos la capacidad de molienda actual en 1.048.000 toneladas y prevemos un aumento en 2014 a 1.234.000 toneladas, lo que representa un crecimiento de 17% a 18%. Estas inversiones están confirmadas por el sector y estos molinos empezarán a trabajar ya en la próxima zafra.

En la Fig. 2, se muestra el volumen de las exportaciones y su época. Por ejemplo, de la cosecha 2008, las

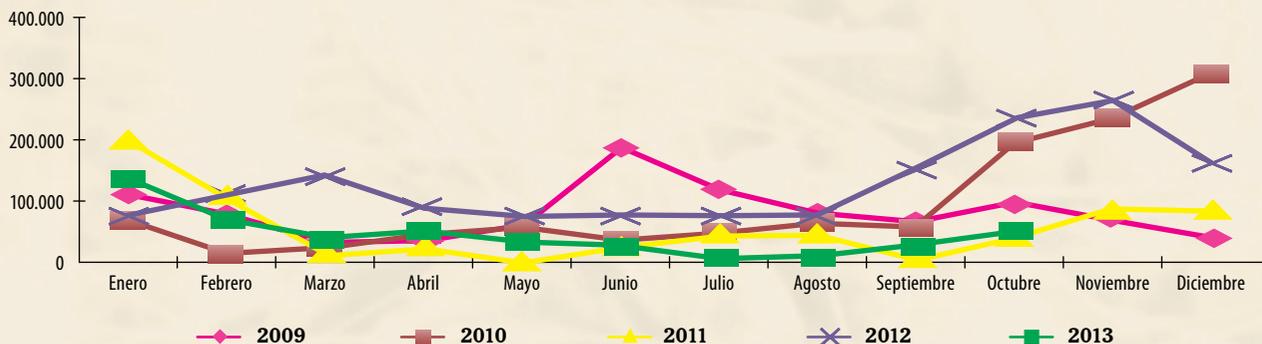
Fig. 1. **Capacidad de la molienda instalada en el Paraguay (toneladas).**



exportaciones realizadas en 2009 llegaron a su tope entre mayo, junio y julio; lo cual es muy diferente a lo normal, donde las exportaciones del grano ocurren casi después de la cosecha y a principios del año.

Se puede interpretar del gráfico que aproximadamente el 100% del stock queda en mano de los moli-

Fig. 2. **El volumen de la exportación del trigo nacional y su época (toneladas).**



neros, quienes son los responsables de decidir la cantidad de compra y precios dependiendo de las demandas externas, que son las que definen el momento en el cual ocurren esos negocios. Por ejemplo, este año con el precio muy alto, no conocido en la historia, los molineros realmente toman un riesgo muy grande al decidir si compran o no para todo un año.

## LA SITUACIÓN REGIONAL

En un seminario de trigo de la ABITRIGO, Brasil, aclaró que es el gobierno nacional el que ayuda al sector molinero a calcular el stock de sus necesidades, ya que las exportaciones e importaciones son libres, o sea es de libre mercado.

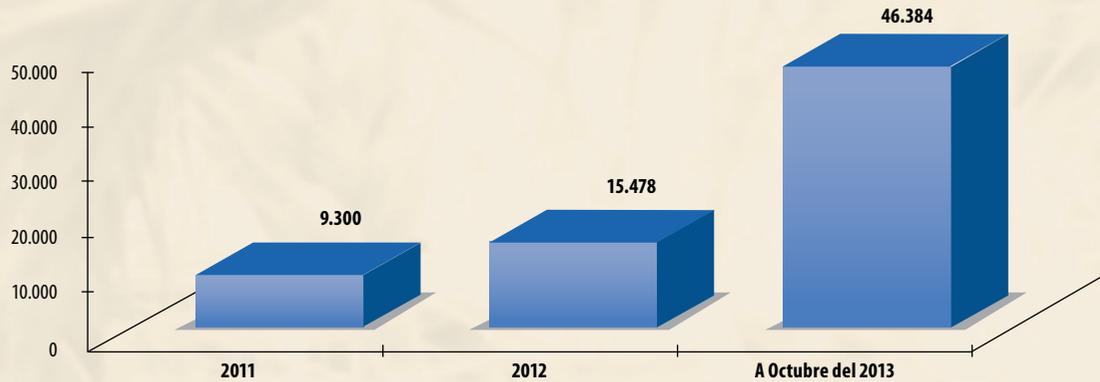
Un análisis de la situación regional muestra cambios definitivos, donde Paraguay ya comenzó a desempeñar un rol muy importante en la industria molinera y en el mercado harinero. Por ejemplo, en los últimos 5 años la molinería en Brasil ha crecido notablemente hacia el Estado de Paraná, principalmente por el aumento de la producción de trigo regional. Varios molinos grandes y nuevos fueron instalados en esa región por la concentración de trigo, sea del Estado de Paraná, Paraguay, Uruguay y/o Argentina. De hecho Argentina siempre estuvo presente en el negocio de la harina, pero ahora Uruguay está entrando a jugar un papel importante. Varios molinos Brasileños son compradores fieles de trigo Paraguayo y tienen conocimiento que nuestro trigo es un trigo mejorador. Percibiendo esta calidad, ellos compran una parte de sus necesidades del Paraguay para mezclarlo con uno que tenga más baja proteína o que no sea tan fuerte para mezclarlo y sacar así mejor promedio de los precios.

La situación regional actual de trigo señala que a corto plazo la producción no será suficiente para el consumo regional. Entre las producciones de Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay, específicamente, y algo de Bolivia, no será suficiente para cubrir la demanda creciente. La principal razón de esta situación es la reducción de entre 35 y 40% del área de producción de trigo en Argentina, desde el año 2006 hasta hoy.

Esta situación es una buena noticia para la industria nacional aunque una mala noticia para los colegas argentinos. Paraguay no puede perder esta oportunidad para buscar un mercado de harina en el Brasil, lo cual ya se está logrando. El problema climático del año pasado, en la cosecha anterior en la Argentina, llevó a un bloqueo por tres meses de las exportaciones de Argentina. Este fue el primer bloqueo del 2013 que inició en enero y fue cuando Paraguay y Uruguay tuvieron una oportunidad única para hacer conocer su harina en el mercado brasileño sin muchas inversiones. A octubre, las exportaciones del Paraguay ya alcanzaron 46.000 toneladas, en comparación al año pasado que fueron 15.000 toneladas, Fig.3.

El avance de las exportaciones de la harina desde el 2011, muestra una tendencia clara y positiva. Estimamos que con los cambios industriales, mencionados anteriormente, podamos llegar a duplicar esta cifra entre 2013 y 2014.

Fig. 3. **Evolución de las exportaciones de la harina de trigo nacional a Brasil (toneladas).**



El mercado de trigo y los precios en Paraguay, como también el mercado de harina en Brasil, son muy importantes a tener en cuenta porque Argentina va a entrar a liderar la exportación de harina en diciembre, pero no la del trigo. Argentina inicia su cosecha a fines de noviembre y diciembre. Por una cuestión local, el gobierno permite la exportación de trigo probablemente recién entre febrero y marzo del 2014. Hoy, la exportación argentina está bloqueada y ellos no pueden exportar harina ni trigo. Se espera que Argentina posea entre 1.8 a 2 millones de toneladas exportables, ya sea en harina o trigo.

Uruguay probablemente obtenga un millón de toneladas para exportar. Esto es muy importante para competir en el mercado de Brasil y de Bolivia. Anteriormente no se podía competir con el precio de la harina argentina, principalmente por las diferencias en las retenciones en exportación de Argentina. En Argentina, el trigo tiene un impuesto, una retención, a la exportación de 23% y la harina tiene solamente 10%.

Entonces es lógico, que la harina argentina pueda entrar al mercado brasileño con una diferencia del 13%. En este sentido, la harina argentina compite con ventaja con la harina brasilera, paraguaya o la uruguaya. Como no hay ningún impuesto interno para importar la harina de la región Mercosur, los molineros argentinos tienen esa ventaja directa.

Los molineros brasileños están pidiendo y presionando al gobierno para que aplique un impuesto para la importación de la harina argentina, lo cual el gobierno hasta hoy no ha aceptado por las normas del Mercosur. Si la política de gobierno argentino sigue igual, nosotros también vamos a encontrarnos con esta barrera en el futuro, si es que Argentina recupera su exportación que por ahora parece difícil hasta la próxima cosecha.

Con el inicio de la cosecha de Rio Grande do Sul, que ya está avanzada en 50% aproximadamente, los molinos de Paraná están comprando trigo de ahí para mezclar con trigo de Paraná y del Paraguay. En otras palabras, el trigo paranaense y paraguayo son de calidades similares en cuanto a nivel de proteína o gluten. Es por esta razón que los molineros brasileños generalmente compran trigo de la Argentina o del sur, para mezclar y bajar los costos de la harina.

El precio del trigo se forma a nivel regional. Las empresas nacionales necesitan observar esto con cuidado para poder competir con los precios a nivel local pero, a su vez, también a nivel regional; si exportamos la harina, tenemos que adaptarnos a los costos regionales. No hay que olvidar que Paraguay entra primero en la cosecha de toda la región incluyendo las zonas del Estado Paraná, Brasil. Entonces lo que ocurrió este año, un año atípico, como las reservas estaban en cero, nuestros precios empezaron con 400 US\$/tonelada al productor y posteriormente, se rebasó este precio.

Las industrias molineras uruguayas tienen un costo de 270 US\$/tonelada pagado al productor y en Rio Grande do Sul el precio promedio es de 280 dólares también por tonelada; dos lugares que están en plena cosecha. Hay ofertas de trigo brasileiro, por ejemplo, a 370 y 380 dólares/tonelada puesto en Campo 9, que llega la próxima semana.

Entonces pueden imaginar las pérdidas que representan 30 dólares por tonelada para la industria nacional. Si alguien compra un volumen grande, puede no llegar a hacer los números. Los molineros de Paraná, Brasil, también compraron a esos precios; entonces los molineros Paraguayos están obligados a importar el trigo a bajos precios para poder promediar sus costos.

Es cierto que la calidad del trigo importado será diferente, es un trigo más débil, pero con una buena mezcla, se va a poder sacar la misma calidad para que el panadero no perciba la diferencia y no tenga problemas en la panificación.

## LOS DESAFÍOS FUTUROS

En términos de trigo nacional, estimamos que se debe mejorar la segregación por calidad tanto en la época de cosecha como en el acopio, sea eso de productores o de las multinacionales, que repentinamente entran a comprar y almacenan para vender más tarde.

La política de la empresa Hilagro es mirar el peso hectolítrico, que es la cantidad de harina y el tamaño del grano; pero los granos brotados medidos por el Falling Number (índice de caída) son factores que determinan directamente la calidad de harina en la panificación.

Actualmente estos parámetros no están reglamentados. Oficialmente hay una norma pero no se utiliza. Se debería buscar la manera de formalizar e implementar la norma nacional. La norma fue hecha en el 2003-2004, donde se involucró a la industria, a la CAPECO, a los productores, a las cooperativas, etc. Entre todos los sectores involucrados debemos volver a dialogar y analizar la actualización de las normas para que se pueda hablar el mismo idioma en términos de calidad.

Para diferenciar un precio por calidad y pagar esta diferencia, se debe tener claro el efecto de distintos parámetros, principalmente brotado, el Falling, el gluten, además del PH y la cantidad de harina, etc.

Los desafíos del futuro son de encontrar el equilibrio en la calidad de las mezclas de los diferentes tipos de trigo, especialmente en zafras como esta, en la cual vamos a procesar trigo Uruguayo y Brasileiro, además del trigo nacional.

La innovación en tecnología y el control de calidad para una mejor estabilidad en la calidad de harina o para disminuir las fluctuaciones de ésta es necesaria. Es un aspecto que solamente se puede hacer en la recepción, en el acopio de grano, porque después ya es tarde. Cuando el trigo está mezclado, su manejo se hace difícil y hay mucho que hacer en el sector industrial para colaborar con todos los sectores productivos desde la cosecha en adelante.

Otro aspecto que el sector quiere incentivar es la búsqueda y desarrollo de mercados regionales, principalmente con Bolivia y, más importante aún, Brasil. La industria nacional tiene que adaptarse a la política de calidad del mercado de harina que hay en Brasil y la región. Hay ciertos aspectos de la harina que ellos manejan de una forma diferente a nosotros. Es por eso, que debemos salir de acá, de nuestra caja, y debemos investigar, invertir, y también, adaptarnos. Por ejemplo, en el mercado brasileiro se le da mucha importancia al color de la harina; tienen valores colorimétricos que hay que respetar. A nivel local, este tema no es importante y quizás podamos hablar del color en 10 o 15 años. Hoy día se puede trabajar ya sobre los colores del grano, es cuestión que las industrias compren un colorímetro de Minolta, pero actualmente este no es un tema clave en Paraguay, ya que aquí no tenemos ningún problema con los colores si se cuida las separaciones y segregaciones; hoy se maneja cenizas; en decir, el tipo de 000 o 0000 se califica con un análisis de cenizas que se hace en Paraguay. Algunos molineros brasileiros no utilizan cenizas y quieren saber el color. En este sentido la industria nacional está obligada a generar esta información si queremos entrar en este mercado.

# Preguntas y comentarios

## Graciela Cabrera

Con respecto a las normas nacionales, estas fueron lanzadas en el 2005 junto a los sectores involucrados en la producción y la Comisión Canadiense de Granos. Estas normas fueron creadas para diferentes tipos de calidades, incluyendo los parámetros del Falling Number y el Gluten. El organismo oficial INTN, que remite esa norma, puede hacer una revisión si fuese necesario. Sin embargo, necesitamos analizar esos parámetros y valores de calidad de nuevo para que puedan ser un instrumento importante en el momento de la comercialización.

En cuanto al color de la harina requerida por la industria de exportación, la investigación nacional debe acompañar al productor para hacer esas determinaciones y adquirir esos nuevos equipos para cumplir con la calidad demandada.

## Ing. Cubilla

Entonces vamos a considerar para nuestro programa una revisión de las normas, desarrolladas en 2005, que fue un proyecto de CAPECO con la Junta Canadiense de Granos. La verdad es que en la creación de las normas nacionales de calidad hace muchos años, aún no había un acercamiento tan importante como lo hay actualmente entre productores, exportadores, molineros; faltan los panaderos. Así que vamos a tratar de proponer una revisión de las normas para nuestro calendario de trabajo en la siguiente etapa del proyecto nacional de trigo.

## Johnny Hildebrand

Disculpenme, parece que no fui muy claro. La norma es excelente. Nosotros la aplicamos para medir internamente las calidades, pero no se usa en la comercialización. Yo hice referencia para formalizar la norma en la comercialización, pero la norma está perfecta, o sea, está muy clara, los grados con un Falling, a lo que tiene que tener. En la cosecha no se puede hacer todos los análisis. Cuando se acopia, el productor siempre está apurado, hay ciertas cosas que se pueden hacer rápido para determinar porque generalmente tiene consecuencia como el valor del Falling bajo o no. El principal punto a analizar del Falling es el brotado, entonces nosotros lo separamos ahí, pero no toquemos la norma. No creo para nosotros, ni para Brasil o la región; no necesitan tocar la norma. Lo que faltaría es formalizarla para la comercialización.

## Ing. Cubilla

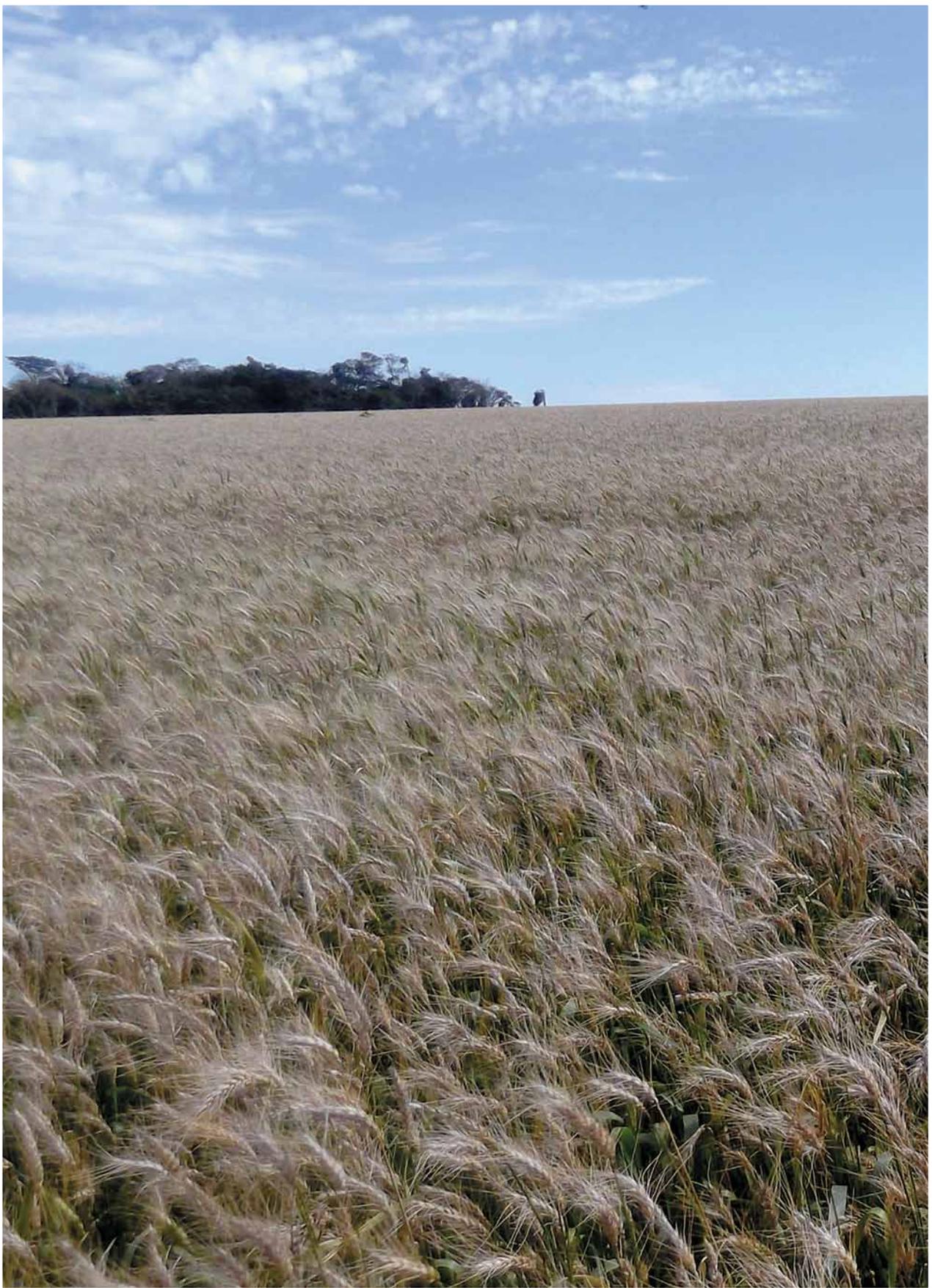
Probablemente con Sonia Tomassone vamos a ver eso. Internacionalizar nuestras normas, quizás eso también haga falta. Yo creo va a ser un programa, que podamos trabajarlo el próximo año.

## Graciela Cabrera

Es importante internalizar primero en los silos y en las cooperativas. Primero, enseñarles a usar esas normas porque les va a servir a ellos en la comercialización, inclusive en la recepción de sus silos. Ellos pueden estar equilibrando los precios en lo que están recibiendo y pagar por calidad. Esa es la oportunidad que se tiene; si usan una norma, están cumpliendo con la calidad y pueden pagar por esa calidad, de manera que el productor tenga ese incentivo de producir esa calidad.

La otra cosa es dejar un poco lo que son las mezclas de los trigos recibidos. Los molinos o las industrias deben monitorear lo que están recibiendo, del lugar, de la calidad que tienen y no mezclar los trigos; y, acondicionarlos en diferentes silos, para hacer después la harina o sus mezclas correspondientes.

*Campo de trigo de siembra temprana afectado severamente por Brusone y causando pérdidas totales.*



# Una visión del campo sobre las necesidades de la producción futura del trigo

**SIMONA CAVAZUTTI**

UNICOOP, Av. Santa Rita c/ Alejo García, Santa Rita - Alto Paraná

Contacto: [simonacavazzutti@hotmail.com](mailto:simonacavazzutti@hotmail.com)

## Resumen



Siendo el cultivo de trigo una parte importante del sistema de producción, la presente intervención está construida alrededor de la contra-posición entre lo que el agricultor quiere y lo que tendría que querer. Lo que el agricultor quiere hoy es tener una alta producción en primer lugar, una mejor sanidad y la asistencia técnica oficial. Cuando hablamos del rendimiento, es sin importar la calidad, considerando que el sistema de comercialización actual está sin premios para quien produce mejor. La sanidad es importante para reducir los costos de producción, y la asistencia técnica oficial es para recibir las novedades sin depender de las firmas comerciales. En este caso, lo que se tendría que hacer es un mix de rendimiento/calidad, tendiente a maximizar los ingresos del productor, obviamente conjugado con un sistema de comercialización que premie la calidad, con una ampliación de la segregación de los diferentes tipos de trigo. También se requiere un abordaje mucho más agresivo en el campo de la fertilización, pero no solamente nitrogenada, con el propósito de obtener retornos rentables. Es importante mencionar que no hay un solo tipo de trigo, ni un solo tipo de agricultor. Por esta razón, hay que pensar en la creación y difusión de nuevos cultivares, teniendo en cuenta el ambiente agronómico, el destino del producto y el ámbito socio-cultural donde tiene que difundirse. En esta charla se dan ejemplos sobre los puntos enfocados.

# Abstract

---

## A farmer's view on the needs of the future wheat production

*Given the importance of the wheat crop in the production system, this presentation analyzes the counter-positions between what farmers want and what they should be wanting. What farmers want today is to have high productivity, better crop sanitation and official technical and extension support. When we talk about productivity, it is without any regard to the quality of the product considering that the present commercialization system does not reward anyone who produces with better quality. The crop sanitation is important to reduce the production costs and the official extension assistance is a key to receive the new production knowledge without having to depend on the commercial enterprises. In this case, what needs to be done is a mix of productivity and quality with a vision to maximize the income of the farmer and obviously taking into account a commercialization system that rewards high quality and extends to the segregation of wheat into different types. We also need an aggressive research activity in the field of fertilization, but not only limited to Nitrogen and with an objective to obtain maximum economic returns possible. It is important to mention that there is not a single type of wheat or a single type of farmer. For this reason, we have to think about creating and distributing newer varieties which will take into account the economic environment, the destination of the product and the socio cultural environment in which it needs to be distributed. Examples of the aspects mentioned above will be covered in this talk.*

Asistencia técnica oficial es uno de los reclamos más fuertes de productores.



## INTRODUCCIÓN

Responder a la pregunta acerca de qué los agricultores desean en el campo de la evolución triguera es difícil, porque puede llevar a interpretaciones equivocadas y peor aún, a evaluaciones estrictamente personales que se derivan de la especificidad y aún individualidad del productor de trigo. Además, es incómodo y difícil para cualquiera analizar críticamente un complejo de tecnologías y técnicas que hasta ahora han demostrado ser exitosas. Se considera, sin embargo que algunos puntos, por tener muchas comprobaciones que pueden ser aceptados sin muchas objeciones. Entre estos, se tiene que expresar que el actual paradigma de producción de trigo ha llegado a su éxito máximo y difícilmente podrá producir más.

Por lo tanto, todos los actores, deben preguntarse qué tienen que cambiar para la construcción de un paradigma nuevo. Para esto, es indispensable recoger las opiniones de los actores principales de la producción: los agricultores mismos.

Aunque sea otro el convencimiento de uno mismo se tiene que responder a esas opiniones que se basan realmente en una razón simple y poderosa; **el cultivo y la comercialización del trigo no se desarrollan en un plano raso, sino en un contexto mundial competitivo, cambiante y no controlado por ellos**. Por lo tanto, el productor debe y siempre deberá amoldar su producción a un mercado, técnica y economía parecido a aquello perfecto según economistas clásicos: algo donde debido a la gran cantidad de actores nadie tiene poder de decisión sino son las interacciones que crean lo que llamamos la realidad.

## INQUIETUD DE LOS PRODUCTORES

Cuando se pregunta qué quiere el productor triguero, se puede responder desde la vivencia de ser productora y las conversaciones tenidas con los colegas. Son esencialmente tres aspectos concretos lo que el agricultor demanda:

- a) variedades productivas
- b) cultivares sanos
- c) asistencia técnica oficial.

La productividad es fundamental y todo gira alrededor de ella. Sin embargo, en este pedido falta (o parece faltar) la calidad del producto.

Se debe admitir que no faltan razones para este olvido. La remuneración de lo cosechado, infelizmente, depende en gran parte de la calidad del producto entregado, y lo que es peor, nunca premia trigos con características superiores. Si a esto añadimos que los parámetros de la calidad, en su mayoría, escapan de las decisiones productivas del agricultor, podemos tener un fuerte argumento para anular sus esfuerzos del mejoramiento cualitativo.

En la de calidad de trigo para la exportación, son cuatro los parámetros a considerar: humedad, peso hectolítrico, Falling number y tenor de proteína.

Cuadro 1. **Parámetros de calidad propuestos para la clasificación del trigo paraguayo.**

ESPECIFICACIÓN TIPOS TRIGO			
Parámetros	Tipos de trigo		
	TIPO I MEJORADOR	TIPO II SUPERIOR	TIPO III COMÚN
PH - mínimo (kg/hl)	80	78	76
Humedad - máxima (%)	13	13	13
FallingNumber-mínimo (seg)	300	250	220
Proteína base seca (%)	13,5	13,0	12,0

Se sabe muy bien que el peso hectolítrico y el Falling number son fuertemente influenciados por las condiciones climáticas en el momento de la cosecha, situación que no está bajo control del productor. El pensará muchas veces antes de plantar un trigo que puede producir un grano de mejor calidad pero seguramente tiene un rendimiento inferior, en lugar de un material que rinde mucho pero que tiene una calidad inferior.

Se debe recordar que la variedad brasileña BR 23, material productivo (para la época) que infelizmente producía un grano de calidad inferior, era muy usada porque rendía una cosecha segura y su inferior calidad no acarrea daños económicos al productor al productor.

Si se busca que el productor utilice materiales de calidad, es necesario por parte de los compradores focalizarse en los años que tienen una cosecha en condiciones óptimas y no en los años con problemas climáticos.

Si en las cosechas positivas, se premia el producto que muestra características superiores a los parámetros mínimos, con plus de precio se enviaría la señal al agricultor que la calidad paga. Esto lo induciría a utilizar los materiales superiores y lo prepararía para cosechas en condiciones ambientales difíciles donde las pérdidas serían debido al ambiente y no a la variedad.

Actualmente todo gira alrededor de los años negativos. Como no hay incentivo para los estándares superiores a lo mínimos, el productor se cubre intentando maximizar la cantidad de producción, muchas veces olvidando la calidad del producto.

Todo esto tiene que ser acompañado por una política, por parte de los acopiadores, de segregación mucho más selectiva de como se ha hecho hasta ahora. No existe trigo, sino se tienen varios trigos que deben ser considerados, tratados y comercializados como entidades independientes.

## SANIDAD DESEABLE

Sobre el requerimiento de materiales genéticos sanos, poco hay que comentar. La sanidad de la planta es fundamental para una producción cualitativa y cuantitativamente óptima. Esta opinión resume los comentarios de productores, la mayoría de ellos, sobre la sanidad de los cultivares. Sin embargo, se ha observado más de una vez que variedades que permiten llegar a cosecha con uno o máximo dos, tratamientos de fungicidas, son fumigados tres, cuatro hasta cinco veces con resultados previsibles en los balances económicos, especialmente en años de precios no alentadores.

## AQUÍ VIENE A TONO EL PEDIDO DE LA ASISTENCIA TÉCNICA OFICIAL

La gran mayoría de las informaciones sobre manejo y productos para el cultivo del trigo llegan al productor vía empresas comerciales que, y no se busca hacer crítica en este punto, sino que se confirma la realidad, desean maximizar las ganancias vía maximización de las ventas de productos.

Esto induce al productor a “super” cuidar el cereal, pulverizando a intervalos fijos, subestimando la observación metódica del estado sanitario de la planta, algo que no se puede nunca subestimar ni menos olvidar. Se debe siempre recordar que el trigo, un organismo vivo, crece en un ambiente extremadamente variable. No se tendrán nunca dos años de cultivo iguales, que a su vez serán compuestos de semanas diferentes entre sí. Solo la observación sistemática y continua de las parcelas, diferentes entre sí, permitirá al productor tomar las decisiones que le permitirá obtener un resultado técnicamente y económicamente exitoso.

Es igualmente necesario abordar el ámbito de la fertilización del trigo, ámbito que se puede extender a otros cultivos.

No sería equívoco afirmar que la fertilización como se viene practicando, llegó a un tope de resultados. Siguiendo así como se está operando, no se puede esperar un aumento, por esta vía, de los rendimientos de los cultivos.

En realidad el productor debería tener en cuenta no solo los análisis de suelo, sino las interacciones entre los varios elementos con el pH del suelo, considerar la textura específica de cada parcela, integrar a esto las diferentes dinámicas de descomposición (y consiguiente efecto fertilizante) de la materia orgánica en áreas sometidas a la siembra directa. Además debe intentar optimizar las interacciones, aportes y extracciones entre los varios cultivos de la rotación. Y esto con meses y hasta años de antelación al cultivo objetivo.

## ¿ESTÁ AHORA EN CONDICIÓN DE HACERLO SOLO? PROBABLEMENTE NO.

Si a esto se añade que seguramente los niveles de aporte de fertilizantes de nitrógeno y fósforo tienen que ser superiores a los distribuidos actualmente, entramos en el campo minado de la rentabilidad inmediata.

En cuanto a la sanidad: el técnico en este ámbito tiene que fomentar la capacidad del agricultor en extraer todas las bondades del material sembrado en el campo de la resistencia a las enfermedades y no un mero indicador de recetas fijas (que como tales no pueden no ser redundantes en cantidad de productos).

Aquí se puede ver un aspecto fundamental de la asistencia técnica: **tiene y tendrá que ser siempre más sofisticada y personalizada**, considerando que existen muchas tipologías de productores, cada una con sus exigencias y problemas.

**Tendrá que ser al mismo tiempo práctica** (para mostrar soluciones reproducibles a las exigencias de los asistidos) **y continuamente innovativa para impulsar las transformaciones indispensables** en un mundo que tiene que aumentar del 50% la producción agrícola en pocos años.

## CONSIDERACIONES FINALES

En el ámbito del desarrollo de nuevas variedades la especialización geográfica que se está haciendo, tiene que ser conservada y potenciada. Acoplada a esta especialización ambiental hay una diferenciación clara de regionalización. Es aquí que la interacción con productores y exportadores es esencial. Una especialización con vista al productor, no todos los agricultores son iguales, (en realidad, probablemente no existan dos que sean perfectamente comparables) y los fitomejoradores deben tener en cuenta este hecho. Algo tímidamente parecido existe en el campo de los híbridos de maíz, las distinciones de alta, media y baja tecnología indican a grandes rasgos el agricultor-objetivo.

De esa misma manera, se confirma, la necesaria creación de una serie de cultivares modulados sobre distintas tipologías o prácticas de agricultores, eso permitiría al trigo amoldarse mejor a los planes de rotación y superar las barreras que lo limitan en su expansión.

Una matriz de cultivares optimizados sobre los ambientes de cultivos, tipos de agricultores y destinos de uso, una capacidad más específica de transferencia tecnológica, sea en el campo genético, fitosanitario o nutricional, y una diferente política de acopio y comercialización son fuertes e indispensables puntos para afianzar el futuro mejoramiento, fortalecimiento y expansión del cultivo del trigo en el Paraguay.

*Productores primarios e industriales llevando a la práctica las actividades productivas.*

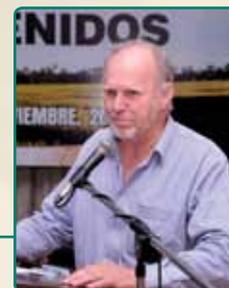


# El papel del trigo en el agronegocio y las oportunidades futuras

## RONALDO DIETZE

Rector, Universidad San Carlos, Gral. Garay 798 c/ España. Barrio Villa Morra, Asunción.  
Contacto: [energia5813@gmail.com](mailto:energia5813@gmail.com)

## Resumen



El trigo marca un importante rol en la economía paraguaya. Siendo, el trigo, un rubro originario de latitudes templadas se ha logrado su viabilidad agronómica y financiera en el país gracias a la constante investigación e innovación, al emprendimiento del sector público y privado y al interés que manifiestan los productores primarios y los industriales llevando a la práctica las actividades productivas.

El trigo es un alimento básico conocido en todo el mundo, la demanda desde su inicio hasta la fecha ha experimentado un crecimiento sin descanso. La población y el consumo de alimentos crece a nivel mundial, actualmente existen más de 7 mil millones de personas en el mundo y esta aumentará rápidamente por lo que es de esperar que en unos pocos años más (2.020) la población mundial aumente a más de 9 mil millones de personas.

La seguridad alimentaria global constituye uno de los principales desafíos de la ciencia, la técnica, la innovación y la práctica productiva, etc.; el compromiso es producir más alimentos con menos RRNN disponibles. La seguridad alimentaria como un sistema complejo, pasa por una concepción holística que por lo menos incluye los tres aspectos centrales: a) la oferta agraria de alimentos en cantidad, calidad, variabilidad e inocuidad para una inmensa cantidad de personas; b) la accesibilidad a los alimentos que es una cuestión de ingresos de las personas, de aspectos culturales relacionados a la alimentación y la distribución comercial de los alimentos; y, c) la sostenibilidad que incluye los dos aspectos centrales: la oferta agregada continua y a largo plazo, y, la accesibilidad también a largo plazo.

Siendo el trigo un alimento básico de suma importancia, es necesario considerar en su manejo integral estos tres aspectos centrales, el de la seguridad alimentaria y al mismo tiempo aprovechar las ventajas comparativas y competitivas, estas últimas logradas hasta la fecha en el país (tierra y capital ocioso en invierno con menor costo de oportunidad, demanda mundial de alimentos insatisfecha, resultados tecnológicos e investigativos disponibles, productores experimentados, cooperativas y otras empresas productivas y comerciales exitosas, industrias molineras florecientes y con alta capacidad y calidad de molienda, logística e infraestructura disponible, entre otros).

Finalmente cabe mencionar que el trigo constituye una cadena productiva con un elevado contenido de valor agregado y generadora de empleo. Esto se inicia con la semilla y otros insumos, pasa por la producción primaria agrícola, el transporte de los insumos, productos y los subproductos, la industrialización de la materia prima, la elaboración de panificados hasta luego llegar al consumidor final. En esta cadena quedan involucrados también los vendedores de maquinarias, los mecánicos, los fabricantes y vendedores de silos y maquinas panificadoras, financistas, técnicos, promotores, investigadores, comerciantes en general y otros.

Siendo un alimento de alta difusión y uso, como también un gran generador de valor agregado, riquezas y empleo, es necesario darle la mayor atención posible al trigo, en lo que respecta a su avance técnico, comercial y de transformación, buscando el aumento de su productividad y calidad, su consideración en el marco de la política investigativa, innovativa, de financiamiento, de mejoramiento comercial, logística, etc.

## Abstract

### The role of wheat in agribusiness and future opportunities

*Wheat plays an important role in the Paraguayan economy. In spite of its being native of temperate latitudes, the country has achieved its production and financial liability thanks to the continuous research and innovation, entrepreneurship of the public and private sectors, interest of the primary producers and that of industrialists leading to a successful production. Wheat is a staple food throughout the world and its demand has grown relentlessly. The world population and the food consumption have also grown globally in the sense that the world population is likely to increase from 7 billion people today to approximately 9 billion people by 2020. Global food security is one of the major challenges in science technology innovation and productive practices, etc. Our challenge today is to produce more food with less natural resources. Food security as a complex system encompasses a holistic approach that includes at least three main aspects: a) availability of food supply in quantity, quality, safety and variability for a large number of people, b) the accessibility of food is a matter of personal income, cultural aspects related to food and commercial distribution, and c) sustainability including two central aspects such as continuous and long term total supply and also its long term accessibility. Being a staple crop, the importance of wheat needs to be considered in the comprehensive management of these three aspects of food security, and at the same time utilize the comparative and competitive advantages of the country. These latter aspects have been achieved in the country due to availability of idle land and capital during the winter with low opportunity cost, unsatisfied global food demand, availability of technological and research results, experienced producers, cooperatives and other productive and successful business enterprises, flourishing milling industries with high capacity and milling quality, availability of logistics and infrastructure, amongst others. Finally, it is important to mention that wheat forms a part of a production chain which is of very high value and creates jobs. It starts with the seed and other inputs, passes through the primary agricultural production, transportation of inputs or by products, industrialization of raw materials, processing and bakery to reach the end consumers. Other sectors such as machinery dealers, mechanics, manufacturers and sellers of silos and baking machines, financiers, technical agents, researchers and merchants at large are benefitted. Being a food of extensive use, it generates high added value, wealth and employment. Therefore, it is necessary to provide the best attention possible to the wheat crop as so far as technical and commercial advances looking for an increase in productivity and quality and its consideration as a part of research innovation, financing, business, logistics and policies are concerned.*

## INTRODUCCIÓN

El trigo constituye un alimento básico para el desarrollo humano. Cabe mencionar que Paraguay ha apuntado a un Plan Nacional de Trigo y otras iniciativas, con la decidida participación del sector privado en el desarrollo de este en el país. El trigo, siendo un rubro de origen y difusión de las latitudes templadas, se ha adaptado bien a regiones tropicales y subtropicales, como el caso de Paraguay, gracias a la ciencia y la tecnología.

Hoy después de mucho esfuerzo Paraguay es un productor y exportador de trigo (aunque este último de manera incipiente). Sin embargo, existe a nivel regional y mundial una demanda insatisfecha de trigo y sus derivados de la que Paraguay podría lograr un aprovechamiento importante.

Basado en la demanda insatisfecha y en la paulatina reducción de los subsidios agrícolas en muchos países industriales es de esperar que el comportamiento de los precios del trigo mejore en el futuro en valores reales. Paraguay por su esfuerzo y resultado ha logrado hasta la fecha posicionarse, y podría aprovechar con ventajas esta situación produciendo aún más y mejor trigo en el futuro.

## EL COMPLEJO SOJA –TRIGO

La producción agrícola empresarial de granos debe analizarse y declararse como un todo. Es un error hablar solo de “soja”, solo de “trigo”, solo de “maíz”, solo de “girasol”, etc. La verdad hay que encuadrarlo en “el todo” y no “es sus partes”. Caso contrario se cometerían errores que finalmente pueden perjudicar enormemente al país y a su gente. Nadie puede hacer trigo solo, sería financiera y económicamente inviable.

La soja sola desde la perspectiva financiera y económica en un plazo mediano podría ser posible; pero no conveniente desde el punto de vista ecológico y social. Tampoco es conveniente analizar y juzgar a la soja y a otros rubros exclusivamente como un acontecimiento en las chacras, por más importante que este eslabón fuera, las actividades productivas, económicas y sociales no terminan allí. Este complejo **soja-trigo-maíz-abono verde, etc.** es una cadena y como tal, es hasta la fecha la más importante del país como fuente generadora de empleo y riqueza.

La producción de leche, cerdos, aves, huevos y otros es sumamente dependiente del “complejo soja”.

El complejo soja–trigo–maíz, entre otros, es un elevado contribuyente a la alimentación directa o indirecta mundial, y es necesario verlo y valorarlo en ese contexto. Cada vez se requieren más alimentos para una población en franco nivel de crecimiento y Paraguay juega un papel significativo como actor directo en esta importante función.

Con este complejo productivo, se ha podido aprender de los errores y sobre todo de las observaciones, de la generación y transferencia de tecnología y de las innovaciones productivas. Estamos listos para ofrecer a una demanda insatisfecha creciente de alimentos obtenidos con alta tecnología, observando el manejo sostenible de los RRNN, y respetando el ambiente, aplicando las buenas prácticas productivas, los aspectos de la responsabilidad social entre otros.

Dentro de este contexto, el trigo ha ido evolucionando históricamente, desde su ausencia total en nuestro país, hasta la sustitución de las importaciones del mismo y de sus derivados, llegando en la actualidad al punto de exportación de excedentes.

## ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA PRODUCCIÓN DURANTE LOS ÚLTIMOS AÑOS Y BREVE HISTORIA DEL TRIGO EN PARAGUAY

Según referencias de Sánchez Quell, 1947, el trigo, la caña de azúcar, el arroz, la cebada y la vid fueron introducidos al Paraguay, durante el segundo gobierno de Domingo Martínez de Irala (1542-57). Ningún Espa-

ñol del Mediterráneo concebía la vida sin el pan del trigo, el vino y el aceite de olivo. Un segundo interés por la harina de trigo y el vino provino de la iglesia Católica, por la ostia y el vino (citado por E. Alarcón en su libro: El cultivo del trigo en Paraguay, 2010). Las variedades más cultivadas eran el trigo duro (*Triticum durum*), las semillas eran traídas de Buenos Aires a Villarrica en época del gobierno del Dr. Francia (1814–1840). El cultivo del trigo fue perdiendo su importancia siendo remplazado por el maíz, debido a las altas temperaturas y las sequías. Los cultivos en esta época se limitaban alrededor de Villarrica, Jesús y Trinidad (Itapuá), y Santa María (Misiones).

Durante el gobierno de Carlos Antonio López (1844–1862), el trigo no figuraba como cultivo de importancia en el país. El Dr. De Bourade La Dardye (1885-1889) escribe que a pesar del aumento del consumo de trigo en el país ocasionado por la llegada de los europeos, no se incrementó su cultivo debido a la introducción de harina Argentina como resultado de la gran producción en este país y sus bajos precios. Los primeros molinos con molienda rudimentarias se instalaron en 1885 en el país (Alarcón, E., 2010).

La llegada del Dr. Moisés Bertoni al Paraguay en 1887, marcaría el inicio de la investigación del cultivo de trigo en el país. Moisés Bertoni fue el primero que se interesó en estudiar científicamente el comportamiento del trigo en Paraguay. En 1896, se creó la escuela agrícola y se inició la investigación con cooperación de M. Bertoni.

M. Bertoni dio sus primeras recomendaciones sobre el cultivo del trigo en Paraguay:

1. La producción de trigo en Paraguay es posible.
2. La siembra debe hacerse a fines de marzo y en el mes de abril.
3. La fertilidad de la tierra para el trigo es importante, a pesar de trabajar con muchas variables.
4. El clima es el factor más importante para el trigo, especialmente las temperaturas altas en Octubre y Noviembre.
5. La obtención y aclimatación del trigo de pan blanco (*Triticum aestivum*) es importante y debe ser resuelta.
6. La exportación de trigo, incluso el duro, queda descartado para Paraguay.

El Dr. Breitenbach, especialista en trigo del **Servicio Técnico Interamericano de Cooperación Agrícola (STICA)**, en su informe de 1.954, señala que la producción de trigo en las Colonias Extranjeras era de 3 mil hectáreas en invierno de 1.938, con una producción de 734 toneladas (citado por Alarcón, E, 2.010).

El gobierno del General Higinio Morinigo, 1942, creó el Instituto Agronómico Nacional (IAN) y firma un convenio con STICA.

Entre los años 1888 y 1960 la producción de trigo estaba casi ausente en el país, salvo algunas producciones de las colonias extranjeras de Itapuá y los Menonitas del Chaco.

Otro factor que afectó negativamente la producción de trigo en Paraguay fue la fijación de precios de mismo al finalizar la segunda guerra mundial. Los aliados, especialmente los EEUU por medio del “Plan Marshall”, comprometieron a la Argentina como productor y exportador con buenos precios de trigo. Aumentando su cuota con la finalidad de alimentar a millones de personas en Europa, cuyas producciones quedaron destruidas por la guerra (La tribuna, mayo de 1947).

En el año 1.950 durante el gobierno de Federico Chávez, fue creado el Ministerio de Agricultura y Ganadería, y la Extensión Agrícola. En el año 1952, por decreto se crea la Comisión Nacional del Trigo para desarrollar e implementar un plan de producción de trigo. Se pretendía producir las 70.000 toneladas que eran el consumo del país en aquella época (El País, 24 de nov. de 1952). Las 70.000 toneladas recién se alcanzaron en el año 1982 con el programa nacional del trigo.

En el año 1.953, fue creada la Chacra Experimental de Capitán Miranda. En el año 1971 la Chacra Experimental se convirtió en Estación Experimental. Que en el año 1979 pasó a ser el Centro. Regional de Investigación Agrícola (CRIA).

Entre los años 1947 y 1953, se desarrolló un exitoso programa de mejoramiento del trigo en el país con cooperación del gobierno Norteamericano (STICA). Se reconoce la cooperación del especialista de trigo norteamericano, el Señor Charles Breitenbach. Se introdujeron 89 variedades en el IAN en el año 1947; de las cuales solo 8 sobrevivieron.

En el año 1955 se inicia el Plan Familiar de trigo. El plan familiar de trigo fue muy difícil por no contar con técnicos extensionistas familiarizados con este rubro, máquinas ni conocimientos empresariales de los pequeños productores. Los lugares para la ejecución del programa familiar de trigo fueron: Colonia Pirareta, San Juan y San Ignacio de Misiones, que no manifestaron condiciones agro-culturales suficientes para el desarrollo del trigo en aquella época. También se inició el cultivo del trigo dentro del plan familiar en Col. Apereá (Fram), Itapuá. A pesar de los esfuerzos hechos por el gobierno el plan familiar de trigo fracasó. Los pequeños productores tenían grandes limitaciones para la buena preparación de la tierra, los cuidados culturales, la cosecha (trilla), secado y almacenamiento del cereal.

Solo en la década de 1970 y 1980, se logra en el IAN iniciar el proceso metodológico sobre la investigación de trigo.

**El Plan Familiar de Trigo** fue sustituido luego por el **Plan Nacional de Trigo**

Con el decreto 14.880 del año 1965 se crea el Programa Nacional del Trigo. El plan fue acompañado con créditos y apoyo técnico especialmente en el área de la investigación. En la zona de la Cordillera, Misiones Chaco y San Pedro (a excepción en esta última zona de las colonias de Volendam y Friesland), el programa fracasó como lo fue también el plan familiar de trigo (para productores no empresariales).

La investigación dentro del plan nacional de trigo hasta la fecha puede ser considerada como exitosa dado que Paraguay no solo ha sustituido la importación del trigo, sino que ha llegado a exportar los excedentes.

El sector privado ha representado un papel importante, principalmente en las dos últimas décadas, respecto al desarrollo del trigo en el país. A través de sus agremiaciones como CAPECO y otros, y con la incorporación definitiva de científicos de primer nivel como el caso del Dr. Man Mohan Kohli, entre otros, el programa de trigo finalmente ha logrado establecerse en el país.

Actualmente el trigo, en su histórica evolución a sitiales positivos sin precedentes gracias al esfuerzo y la iniciativa privada, con muy buena cooperación Estatal, principalmente en sus inicios hace algunas décadas atrás.

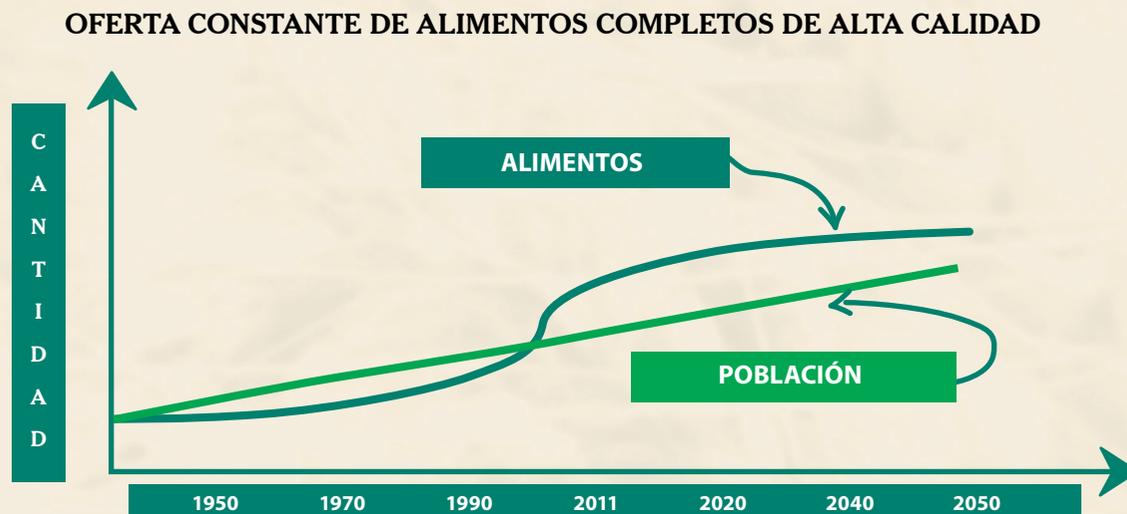
Hoy la producción de trigo está en condiciones de sostenerse técnicamente, si los precios se mantienen sobre niveles mínimos de rentabilidad y si las decisiones políticas se nutren permanentemente de sabidurías para evitar errores perjudiciales. Un ejemplo de este fue la reciente decisión de gravar en estado natural a trigo y otros rubros, que afortunadamente finalmente, se rechazó, gracias a los argumentos sólidos que las agremiaciones productivas hicieron llegar a las instancias políticas de decisión. De no lograrse este rechazo el esfuerzo de casi un siglo en investigación, innovación, aprendizaje, etc., se habría perdido para siempre.

## EL MERCADO Y LOS PRECIOS

En términos generales se puede afirmar que la demanda insatisfecha de alimentos a nivel mundial aumenta y por lo cual constituye un inmenso desafío la de producir más alimentos con menos RRNN disponibles. Los suelos arables per-cápita han disminuido significativamente a nivel mundial y la necesidad de fuentes alimentarias ha evolucionado por encima del crecimiento de la población mundial.

Frecuentemente reflota la trampa de Maltus, por lo que el desafío sin descanso y por vía de la innovación y la tecnología es la producción alimentaria (oferta) por encima del crecimiento de la población mundial (Fig. 1).

Fig 1. **La seguridad alimentaria se sostiene en tres pilares básicos**

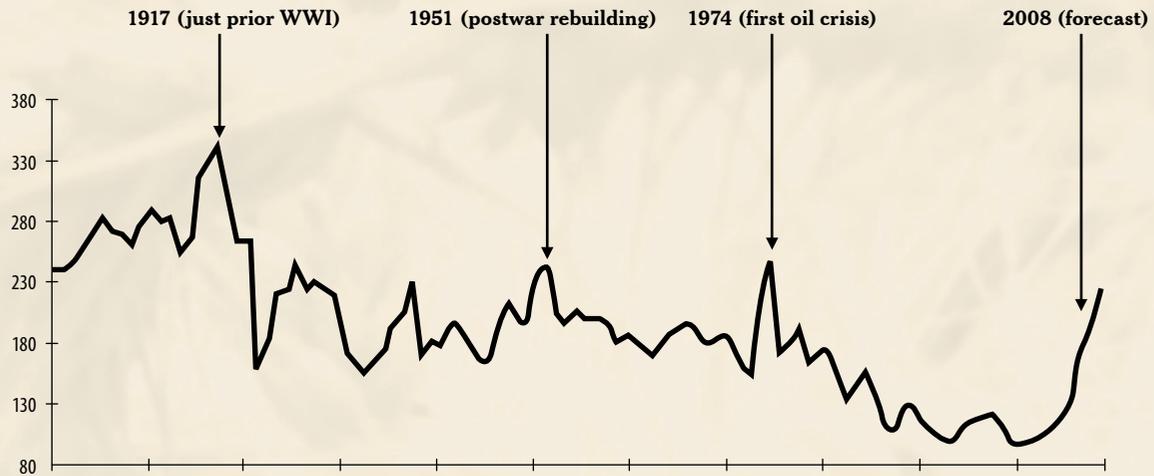


En términos generales existe una gran probabilidad que los precios de los alimentos disminuyan en el mediano plazo (Fig. 2). Aunque este comportamiento puede manifestarse de manera errática, habrá incrementos de los productos alimentarios en ciertos momentos; sobre todo dependiente del comportamiento del precio de los fertilizantes, del combustible y otros insumos. El destino de los alimentos para la producción de biocombustibles, las trabas ambientales y del trabajo podrían incidir en un aumento en el costo de la producción de alimentos. Sin embargo, una consideración de largo plazo es de esperar una disminución del precio de los alimentos dado el avance tecnológico, las innovaciones y una mayor concentración de la tierra (menos productores con mayores niveles de producción) aprovechando las ventajas de la economía de escala que trae aparejado una disminución de los costos medios de la producción de alimentos.

Requerimientos de una alimentación completa.

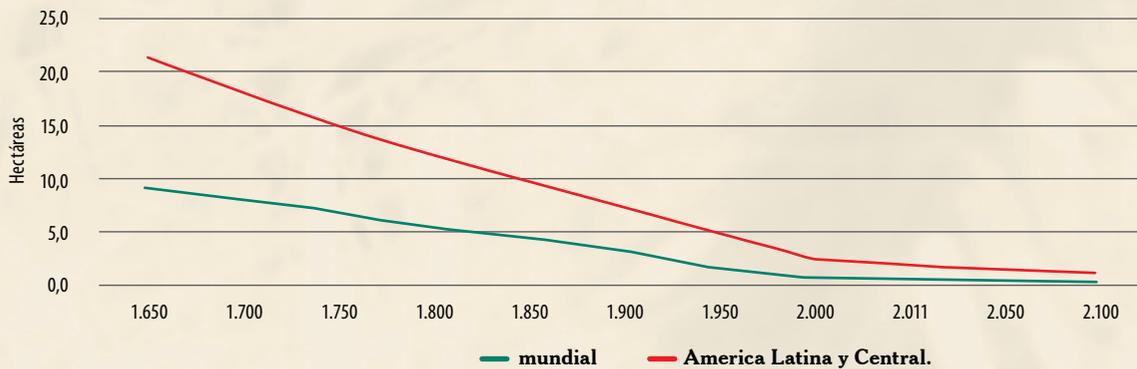


Fig 2. **Evolución de los precios de los commodities no energéticos (dólares constantes)**



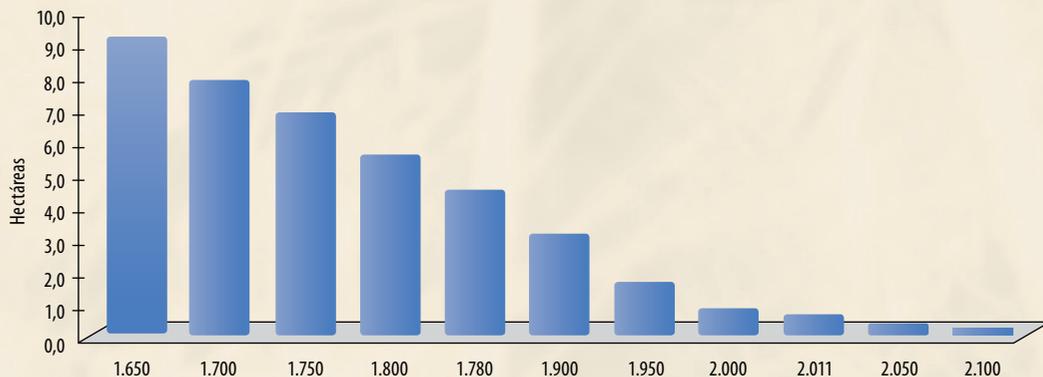
La disponibilidad per-cápita de tierra arable es escasa y representa tan solo una hectárea por persona (Fig. 3 al 6). América Latina tiene una posición más privilegiada por su mayor disponibilidad de tierras agrícolas. Paraguay está aún mejor posicionado en cuanto a su potencial agrícola.

Fig 3. **Superficie agropecuaria por persona**



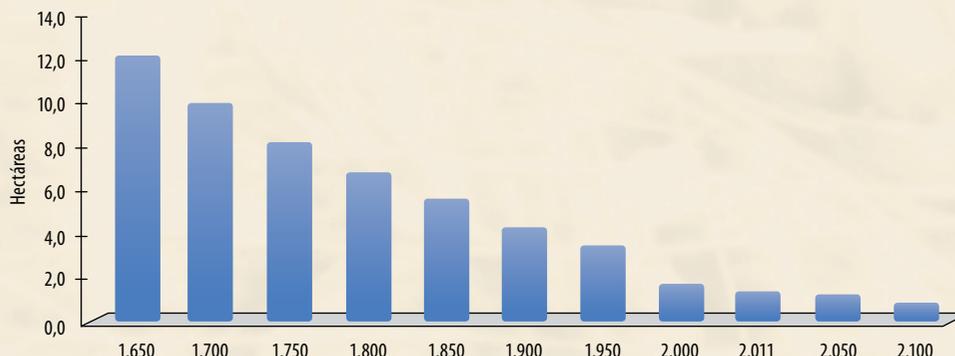
En la Fig. 4 se observa la disminución de la disponibilidad de tierra per-cápita a nivel mundial y sus proyecciones.

Fig 4. **Superficie agrícola por persona**



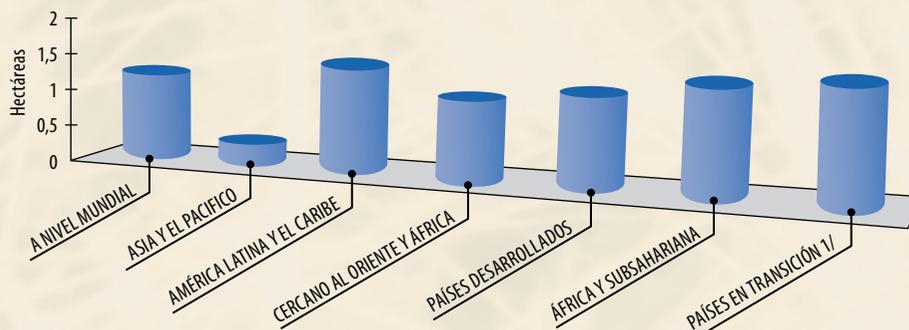
La disponibilidad de tierras arables en América Latina y el Caribe es comparativamente buena (Fig. 5). Los Países del Sur (PS) disponen de un gran potencial y se convertirán pronto en el mayor oferente de alimentos para el mundo.

Fig 5. **Superficie agrícola por persona en America Latina y Central.**



En la Fig. 6 se presentan las comparaciones de disponibilidad de tierra arable para la producción de alimentos de América Latina comparado con otras regiones.

Fig 6. **Superficie agrícola por persona en distintas regiones del mundo.**



## VISIÓN FUTURA QUE IMPULSA LA SEGURIDAD ALIMENTARIA

La visión de una agricultura ampliada o de los agro-negocios incluye los sistemas agroalimentarios, agroindustriales, la distribución, la accesibilidad, entre otros.

- Las fuerzas impulsoras que aseguran la satisfacción alimenticia mundial deben incluir:
  - Un marco Macroeconómico y Político estable, propicio para el crecimiento.
  - La apertura de los mercados y la integración económica eficiente y eficaz.
  - La revolución científica, tecnológica y el incremento de la productividad.
  - La educación, capacitación e información.
  - La transformación de la estructura de consumo y de las preferencias.

- El predominio de la calidad, sanidad y salubridad, tanto animal, vegetal como humana y de la conservación del medio ambiente.
- La descentralización y democratización.

El primer punto representa un marco MACROECONÓMICO Y POLÍTICO adecuado a escala mundial y nacional de cada país, que propicia el crecimiento con fuerte base económica y en función de lograr el equilibrio ambiental y social a partir de estrategias que promuevan un proceso de desarrollo sostenible y de equidad. Este escenario debe asegurar el acceso a los recursos productivos a quienes están en condiciones de usarlos productivamente y cuenten con vocación productiva. Esta incluye la promoción de inversiones productivas, la innovación tecnológica y el manejo sostenible de los recursos naturales, entre otros.

Lo que respecta al **segundo** punto es la creciente integración de las economías y la globalización pero con eficiencia y eficacia, donde el predominio de los mercados exige operar bajo condiciones de demanda, eficiencia y competitividad. La apertura de las economías y la integración de los mercados darán oportunidades para incrementar las ventajas comparativas llevándolas a ventajas competitivas. Es importante llegar a mercados cada vez más abiertos, transparentes y dinámicos.

La **tercera** fuerza impulsora es la revolución científica-tecnológica centrada en los conocimientos que llevan al incremento de la productividad de los factores productivos y de los recursos. La tecnología podrá crear ventajas competitivas dinámicas.

La **cuarta** fuerza es la educación y la capacitación que sin su mejoría no se podrá lograr la productividad y la competitividad. La capacitación, educación e información podrán transformar cuantitativamente y cualitativamente la oferta y demanda de alimentos, las condiciones agropecuarias y el medio rural regional y mundial. Son acciones claves para la eficiencia, la productividad, la competitividad, la innovación tecnológica, la calidad, la sanidad e inocuidad de los alimentos y de la materia prima, las negociaciones comerciales, la información, la comunicación, la conservación del medio ambiente, la solución del empleo y de la pobreza, y el mejoramiento de la capacidad agro-empresarial.

La **quinta** fuerza es la exigencia por un desarrollo y mejoramiento de la calidad de vida, donde la salud y medio ambiente, representan las condiciones básicas de todo acto productivo, comercial y social. Con el desarrollo de los intercambios comerciales y del comercio, tanto internacional como local, predominan tanto la exigencia de la calidad, la sanidad, y la salubridad, tanto animal como vegetal, como para el humano y de conservación del medio ambiente. La aplicación de mecanismos de producción limpia y las buenas prácticas agrícolas son condiciones básicas para una buena alimentación humana.

La **sexta** fuerza impulsora es la transformación del consumo, las preferencias y los gustos de los consumidores. La demanda actual de alimentos es de alta calidad, precios competitivos, puntualidad y regularidad en el suministro.

La séptima fuerza del cambio lo representa la democratización y descentralización. Esto crea condiciones para lograr importantes modificaciones en los procesos de generación y distribución de la riqueza y por ende acercará a la población al bienestar.

## FACTORES FAVORABLES AL DESARROLLO DEL POTENCIAL PRODUCTIVO DEL TRIGO

Existen factores sumamente favorables para el incremento de la producción del trigo en el marco del ya experimentado complejo productivo de la soja-trigo-maíz, y otros:

1. Experiencias acumuladas e informaciones tecnológicas disponibles
2. Demanda insatisfecha de trigo a nivel regional y mundial
3. El consumo mundial de alimentos se incrementa por el aumento de los accesos al mercado de muchos países (Asia y otros), crecimiento de la población, mejores ingresos, etc.

4. Escasa disponibilidad per cápita de suelos agrícolas (arables) en muchos países
5. Envejecimiento de los productores agrícolas, fenómeno observado en muchos países del mundo.
6. Alta probabilidad de una paulatina disminución de los subsidios agrícolas en los países desarrollados.
7. Avance permanente en el mejoramiento tecnológico en el país.
8. Posible inicio de la era del riego en el país, también aplicable al trigo, si el incremento de la productividad con riego amerita el costo de la inversión en sistemas de riego.
9. Capacidad instalada de molinos de harina en el país con tecnología moderna.
10. Mercado insatisfecho de trigo en Brasil y en otros lugares de A.L. y el mundo.
11. Existencia de una superficie ociosa en invierno que podría incrementarse con cultivos de rentas, entre ellos el trigo (el costo de oportunidad de la tierra y el capital es bajo en invierno).

## CREACIÓN DE ESCENARIOS PROPICIOS PARA EL INCREMENTO DE LA PRODUCCIÓN Y EXPORTACIÓN

Paraguay es un país que estratégicamente depende del agro negocio. Es altamente conveniente que el desarrollo del país siga proyectándose en este sector, bajo los criterios de su concepción ampliada y no en una idea fija que el agro negocio es sinónimo de la producción primaria. Si bien Paraguay no debe despreciar a los otros sectores económicos como la industria (basada en la elaboración de materia prima, las construcciones y los otros servicios no relacionados al agro), su verdadera estrategia de desarrollo, por muchos años más, debe basarse en el complejo alimentario y todo aquello relacionado al mismo.

Estos criterios se basan en las dificultades que tiene el Paraguay para competir ventajosamente en los sectores fuera del complejo agropecuario-forestal y las industrias, construcciones y servicios que derivan del mismo. Los países más avanzados cuentan con ventajas competitivas fuertes en relación a la industria no basada en la transformación de materia prima agropecuaria-forestal y en los servicios no agropecuarios. Por otro lado cuentan con experiencia acumulada, dominio tecnológico, elevada capitalización en el sector industrial y en los servicios, recursos humanos calificados, protecciones industriales. Los aranceles para la importación de materias primas agropecuarias en esos países son nulos o bajos y se incrementan a medida que los bienes contienen mayor valor agregado por razones de proteger sus industrias.

En el caso particular del trigo, por ser un alimento ampliamente difundido por su variable uso, tiene muchas posibilidades de incrementar sosteniblemente su demanda, tanto doméstica como en el exterior, principalmente en Brasil, así como otros países de AL y Asia. Es necesario seguir con el mismo ímpetu del pasado con los temas investigativos, buscando cada vez variedades más promisorias, con mayor rendimiento a nivel del productor primario, más rendimiento industrial y sobre todo el mejoramiento de sus cualidades panificadoras y alimentarias.

Paraguay puede fácilmente duplicar la superficie de siembra de trigo en un tiempo prudencialmente corto, así como su volumen de producción buscando elevar su rendimiento (Fig. 7 y 8). El productor como todo ser humano, se motiva en función al precio de venta de sus productos y esta motivación se traduce pronto en una mayor superficie sembrada y mayor productividad., es decir el productor lleva la motivación a la práctica concreta en un corto plazo de tiempo (Fig. 9).

Es necesario que en la cadena productiva del trigo se insista en la aplicación de la frase “ganar-ganar”. Es necesario que la intermediación comercial y financiera traslade también beneficios hacia los productores primarios, de manera que esta motivación se traduzca en un aumento de la producción y productividad (Fig. 10, 11 y 12).

Es de esperar que los precios internacionales del trigo se incrementen en valores reales en el futuro, afirmación basada en la demanda insatisfecha existente a nivel regional y mundial. Por lo que no constituye un error concentrar esfuerzos para incrementar este rubro en Paraguay.

## CONCLUSIONES

Actualmente podemos afirmar que la producción de trigo en Paraguay cuenta con resultados exitosos gracias al esfuerzo de la ciencia, la política y la organización en torno a este importante rubro. Siendo el trigo un alimento básico central para la humanidad y habiendo una demanda creciente y actualmente insatisfecha, es de esperarse tiempos favorables para el incremento de su producción y productividad. Crece la población del país, de la región y del mundo (especialmente India, China y otros países en desarrollo), además se observa mejoramiento de los ingresos per cápita de la población en muchos países del mundo lo cual sin dudas incrementara el consumo de este y otros alimentos del agro negocio.

Estas observaciones conllevan al mismo tiempo a un incremento de los precios en el futuro y ello a una suficiente motivación de los actores que operan como distintos eslabones de la cadena del trigo.

Fig 7. **Área de siembra y volúmen de producción de trigo en Paraguay**

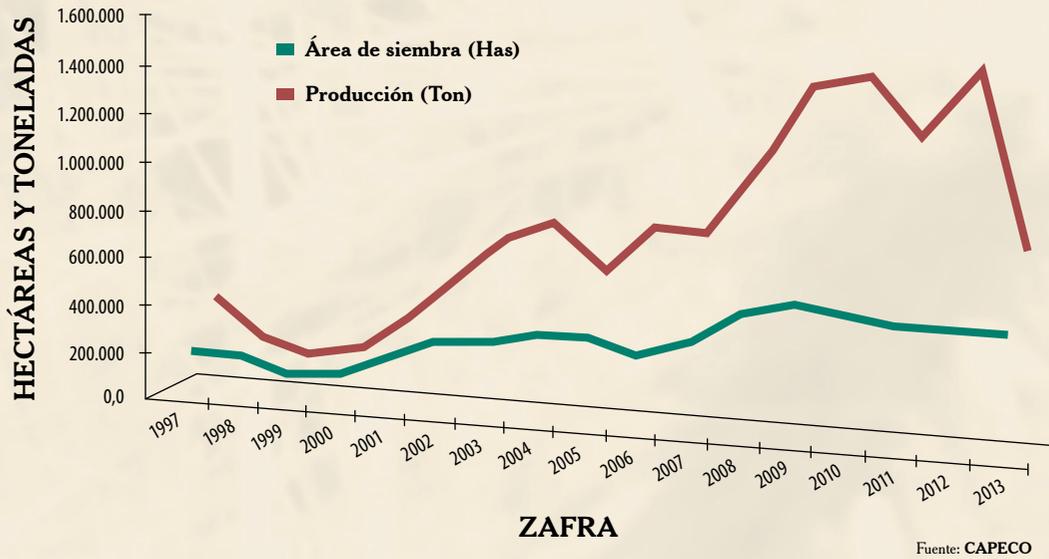


Fig 8. **Rendimiento (kg/ha) de trigo en Paraguay**

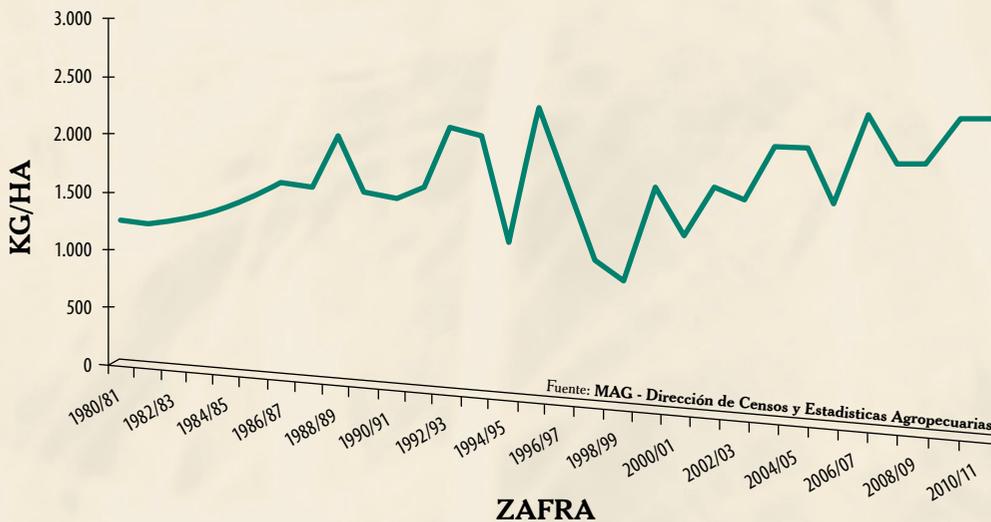


Fig 9. Precios promedio del trigo a nivel internacional

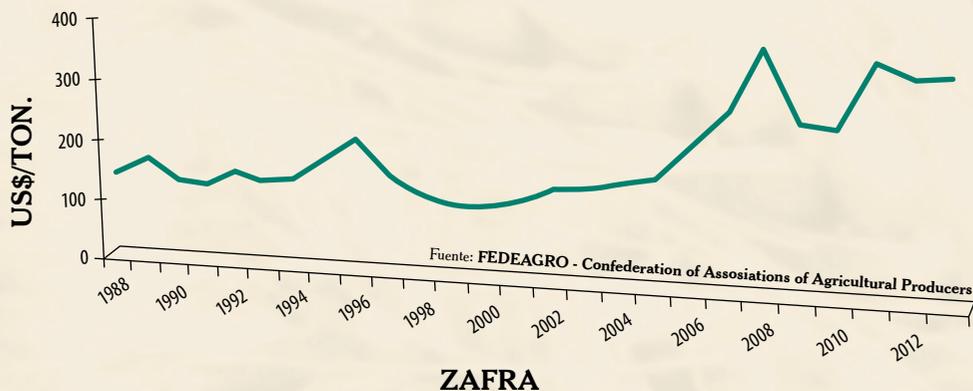


Fig 10. Precios promedio de panificados en Paraguay

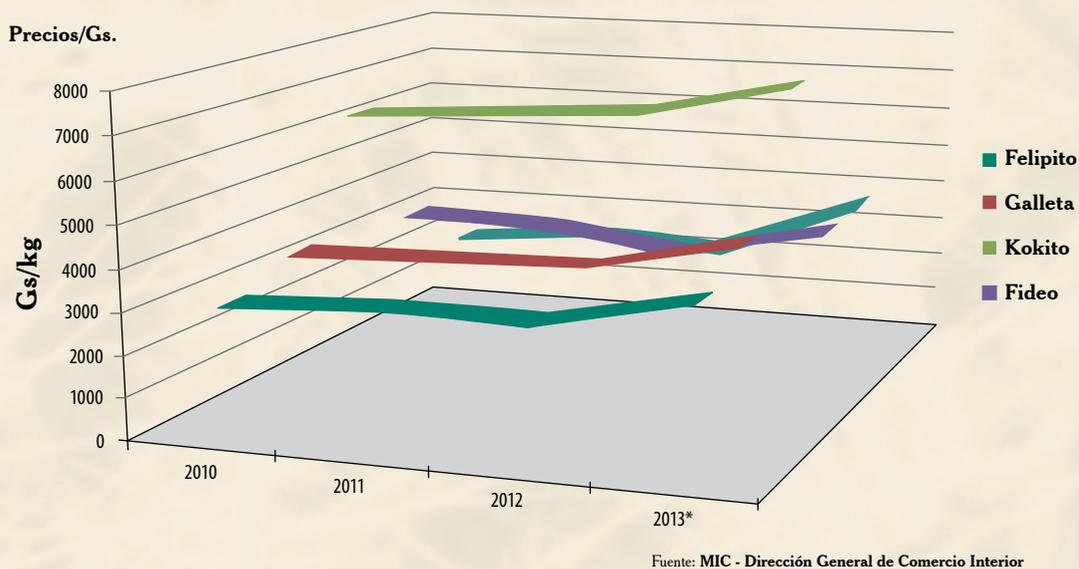


Fig 11. Exportaciones de harina paraguaya de trigo por destino

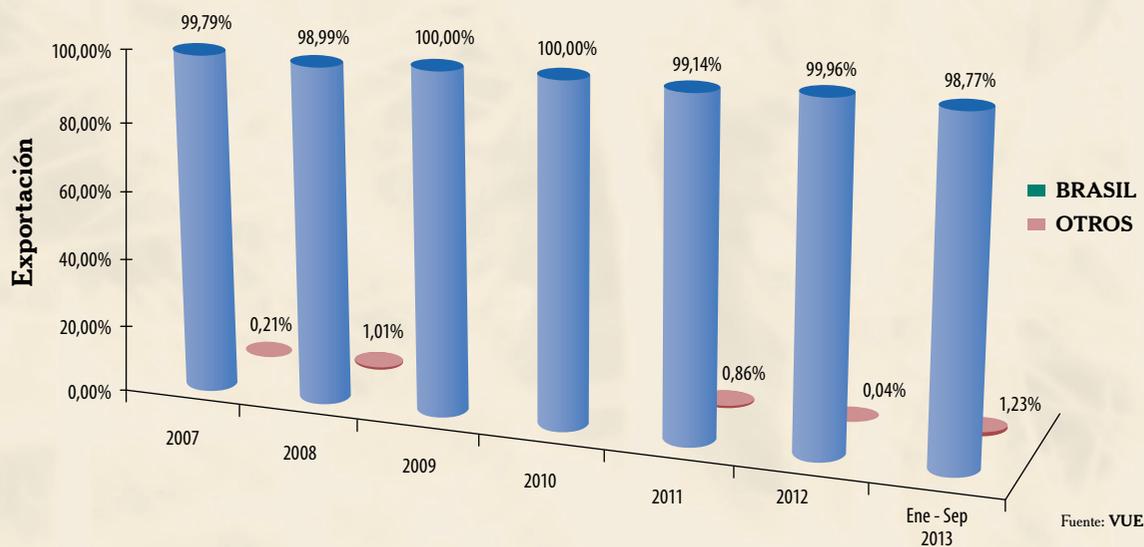
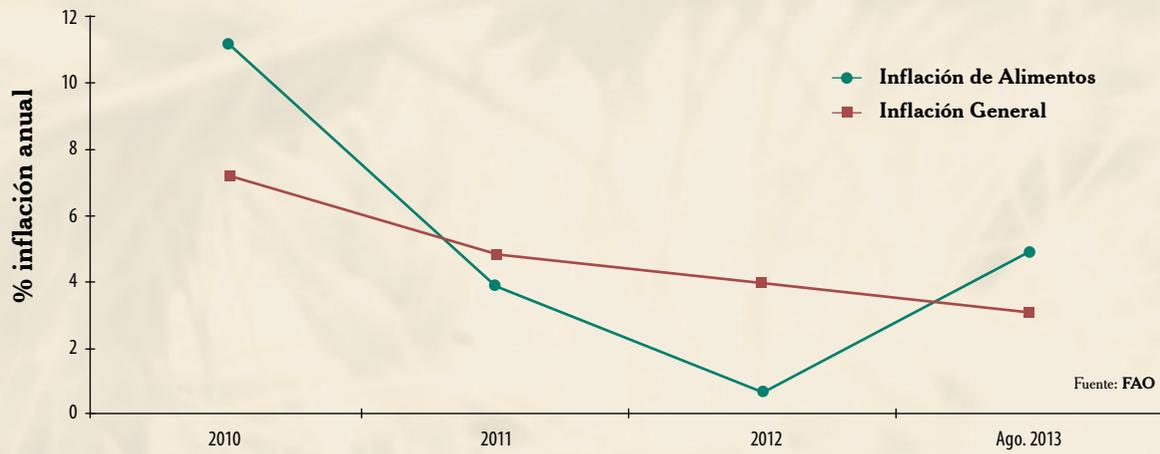


Fig 12. **Inflación de Alimentos - Inflación General**

## Bibliografía

- \_ Alarcón, E. 2010. El cultivo de trigo en el Paraguay. Editorial El Lector, Asunción. Pp 192.
- \_ Bertoni, M.S. 1897. Mis ensayos de aclimatación de plantas extranjeras en el Paraguay y en las Misiones Argentina. Asunción. Revista de Agronomía. Vol. 1. No 4-5 (julio-agosto, 1897).
- \_ Breitenbach, C. 1954. Progress of STICA's wheat program in Paraguay: Informe al Director General del STICA, correspondiente al Año 1953. Material inédito.
- \_ Sánchez Quell, H. 1947. Estructura y Fundación del Paraguay Colonial. Editorial Tupã, Buenos Aires.

*Brasil es el principal destino de exportación del trigo nacional.*



*Los estreses de sequía y calor siguen siendo factores más limitantes a la expansión del trigo en el país.*



*La fusariosis de la espiga sigue siendo la enfermedad de más difícil control y necesita medidas innovadoras.*



# La investigación internacional de trigo y los retos futuros

**MAN MOHAN KOHLI<sup>1</sup> Y HANS BRAUN<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Convenio MAG/CAPECO/INBIO, Asunción, Paraguay;

<sup>2</sup> Programa de Trigo, Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, México

Contacto: [mmkohli@gmail.com](mailto:mmkohli@gmail.com)

## Resumen



Con todo el progreso logrado hasta ahora en la producción de alimentos, se ve con cierta preocupación que la Meta del Milenio para la reducción del hambre mundial, acordada por las Naciones Unidas en el año 2015 está lejos de ser lograda. La FAO prevé la necesidad de aumentar la producción de alimentos en un 70% para el año 2050 bajo un escenario de cambio climático donde las altas temperaturas y eventos extremos como sequía serán comunes. En el caso del trigo, que es un alimento esencial para cerca de 1.2 billones de personas de bajos ingresos y que provee alrededor del 20% de todas las calorías y proteínas del mundo, la tasa actual del aumento de productividad (<1% anual) debe ser mejorada urgentemente. Las razones del estancamiento de su productividad en diferentes regiones trigueras son variadas incluyendo su traslado a las áreas marginales (suelos con problemas de erosión, fertilidad, salinización, acidez, sequías etc.), como también las condiciones climáticas, especialmente altas temperaturas nocturnas y un aumento de nuevos biotipos de enfermedades y plagas, etc. El aumento del rendimiento de trigo hasta ahora tuvo su base en la utilización de genes para baja estatura, exploración de la diversidad disponible en los trigos invernales y algunas especies aliadas que además, permitieron lograr una amplia adaptación y resistencia a algunas enfermedades. Los retos futuros complejos no sólo requieren una intensificación de esfuerzos ya conocidos y exitosos, sino también la incorporación de todas las nuevas tecnologías disponibles o en vía de desarrollo. El mejoramiento internacional de trigo prevé aumentar el potencial genético de rendimiento en un 50%, modificando los procesos fisiológicos de la planta que

le permitan acumular una mayor cantidad de biomasa y su conversión al rendimiento del grano en todos los ambientes y sin problemas estructurales como por ejemplo, el de acame. Los avances de las herramientas biotecnológicas son esenciales para un mejoramiento molecular que pueda explorar toda la diversidad presente en el trigo y las especies aliadas, no sólo para aumentar el rendimiento, sino también para incrementar la resistencia o tolerancia a los estreses bióticos y abióticos previstos por el cambio climático. Los retos de mejorar la eficiencia en el uso del agua y nutrientes para lograr una producción sostenible requieren combinar los productos del mejoramiento fisiológico y molecular con los atributos agronómicos necesarios. La colaboración internacional, el libre intercambio y evaluación de germoplasma en localidades claves son esenciales para el progreso en el futuro. Los logros en la decodificación del genoma de trigo solo pueden ser útiles si toda la comunidad triguera mundial coopera para revertir la actual tendencia de la productividad global. Nuestro reto es proveer suficiente cantidad y calidad de trigo en 2050 y en años sucesivos de manera sustentable.

## Abstract

### The international wheat research and future challenges

*With all the progress made in food production, it is with some concern that the millennium development goals of the United Nations to reduce world hunger by 2015 remain far from being achieved. The FAO figures point out to the need of increase production by 70% by 2050 and all this under a scenario of climate change where high temperatures and extreme events such as drought will be common. In the case of wheat, which is an essential food for about 1.2 billion low income people and provides approximately 20% of all calories and protein in the world, the current rate of productivity growth (less than 1% per year) must be improved urgently. The productivity stagnation in different wheat growing regions is being caused by varied reasons including (soil erosion, fertility problems, salinity, acidity, drought, etc.). Other factors include unpredictable weather conditions, especially high night temperatures and increase of new biotypes and new races or biotypes of diseases and pests, etc. The increase in wheat yield so far has been based on the utilization of genes for short stature, exploration of genetic diversity in the winter wheat and some allied species to help achieve broad adaptation and resistance to multiple diseases. Complex future challenges not only require the intensification of already known and tested successful efforts, but also incorporating all new technologies available or under development. International wheat breeding plans to increase the genetic wheat potential by 50% by changing the physiological characters that allow the plant to accumulate a larger proportion of biomass and its conversion to grain yield in all environments without structural problems such as lodging, etc. Advances in biotechnology are essential tools for molecular breeding which will allow to explore all the diversity present in wheat and allied species, not only to increase productivity, but also resistance or tolerance to biotic and abiotic stresses caused by the climatic change. The challenges of improving the efficiency of water and nutrients for sustainable production require combining physiological and molecular breeding with the required agronomic attributes. International cooperation, the free exchange of germplasm and evaluation at key locations are essential for future progress. Achievements in decoding the wheat genome can only be useful if all the world wheat community cooperates to reverse the current trend of global productivity. Our challenge is to provide sufficient quantity and quality of wheat in 2050 and further in a sustainable manner.*

## INTRODUCCIÓN

Hace una década, la reorganización del programa de trigo en Paraguay fue un reto. Los resultados logrados en este periodo y su adopción por parte de productores convirtieron al país entre los exportadores del trigo a pequeña escala. La historia del incremento de producción triguera nacional es única en el mundo durante la última década, y ha contribuido de alguna manera a aliviar la presión sobre la seguridad alimentaria nacional e internacional. Sin embargo, con todo el progreso logrado hasta ahora en la producción de alimentos a nivel mundial, aún existen más de 800 millones de personas que sufren desnutrición. Se ve con cierta preocupación que la Meta del Milenio para la reducción del hambre mundial, acordada por las Naciones Unidas en el año 2015 está lejos de ser lograda y lamentablemente el nombre del Paraguay está en la lista de los países que necesitan mejorar.

La FAO prevé la necesidad de aumentar la producción de alimentos en un 70% para el año 2050 bajo un escenario de cambio climático donde las altas temperaturas y eventos extremos como sequía serán comunes. En el caso del trigo, que es un alimento esencial para cerca de 1.2 billones de personas de bajos ingresos y que provee alrededor del 20% de todas las calorías y proteínas del mundo, la tasa actual del aumento de productividad (<1% anual) debe ser mejorada urgentemente.

En este sentido, los retos que enfrenta Paraguay en la producción de trigo en el futuro son las mismas o más agudas que otros países productores tradicionales. Las razones del estancamiento de la productividad en diferentes regiones trigueras del mundo son variadas, incluyendo su traslado a las áreas marginales (suelos con problemas de erosión, fertilidad, salinización, acidez, sequías etc.), como también las condiciones climáticas, especialmente altas temperaturas nocturnas y un aumento de nuevos biotipos de enfermedades y plagas, etc. Estos problemas se observan con más severidad en las regiones tropicales y subtropicales y requieren de esfuerzo internacional colaborativo para ser resueltos.

## PROGRESO HASTA AHORA

Todos están conscientes del gran progreso logrado en la producción mundial de trigo durante las décadas de 1960 y 1970, llamada Revolución Verde. Al Dr. Norman Borlaug, artífice de esta revolución, le fue otorgado el Premio Nobel de la Paz por su contribución a desarrollar nuevas variedades de trigo que eran más productivas y de esta manera reducir la hambruna que afectaba a millones de personas en el sureste de Asia durante esa época. Desde este periodo hasta ahora, el progreso en la producción de trigo en la India, uno de los países beneficiados por la Revolución Verde, aumentó de un poco de más de 10 millones de toneladas en la década de 1960, a casi 95 millones de toneladas en el 2012. Una gran parte de este incremento en la producción fue por el aumento del rendimiento (promedio nacional), aunque la superficie bajo trigo también se incrementó de casi 12 millones de hectáreas a 29 millones de hectáreas durante este periodo.

El primer hito importante responsable para mejorar este potencial de rendimiento, no solamente en la India sino a nivel mundial, fue la introducción del enanismo en los trigos modernos desde una variedad japonesa **Norin 10**. Estos genes, más tarde nombrados como *Rht 1* y *Rht 2*, fueron responsables para reducir la altura de los trigos altos (120 a 140 cm) a una altura de 60 a 90 cm., reduciendo así el problema del acame en los campos de alta productividad.

Los trigos mexicanos que fueron distribuidos alrededor del mundo durante el periodo mencionado, no sólo eran de baja altura sino también incluían un paquete de otras características favorables para su adaptación en distintas latitudes. Entre estos caracteres, los más importantes fueron la insensibilidad al fotoperiodo de los trigos semi enanos. La insensibilidad al fotoperiodo junto con la adaptación a distintos rangos de temperatura, permitieron la gran aceptación de estas nuevas variedades resultando en un alto nivel de productividad alrededor del mundo.

En gran parte, la alta productividad de los trigos semi enanos es por la mayor fertilidad de la espiga (mayor número de granos por hectárea), combinándose en algunos casos con el mayor peso del grano. Además, estos trigos tenían un alto nivel de resistencia a las royas, principalmente a la roya de la hoja y del tallo, basado en variadas fuentes de resistencia de origen africano, australiano, europeo, norteamericano y de los países del

Cono Sur, especialmente Argentina y Brasil. Lo que los trigos semi enanos lograron es combinar varios caracteres de adaptación con resistencia a los estreses bióticos y abióticos y a un mejor índice de cosecha. Estos aspectos fueron claves para su adopción y utilización en distintas partes del mundo.

La segunda contribución al rendimiento se logró en las décadas de 1970 y 1980 con la exploración de la variabilidad genética en los trigos invernales y principalmente el papel de una translocación de centeno en los trigos. La utilización masiva del germoplasma europeo, especialmente ruso en cruzas con trigos semi enanos, permitieron elevar el techo de biomasa que se podía producir en los trigos primaverales. Es importante mencionar la contribución de una variedad alemana llamada Riebesel que contiene una translocación del cromosoma 1R de origen centeno (Petkus) en el cromosoma 1B del trigo. En este caso, el brazo corto del 1B fue remplazado por el brazo corto del 1R, dando origen a la translocación 1BL/1RS. Los cultivares que llevan esta translocación muestran un alto potencial de rendimiento, amplia adaptación y resistencia a enfermedades, especialmente manchas foliares. Cabe señalar que el brazo corto del cromosoma 1R localiza el sitio de varios genes de resistencia para royas (*Sr 31* para la roya del tallo, *Lr 26* para la roya de la hoja y *Yr 9* para la roya estriada) y el gen *PM 8* para la resistencia al oídio. Debido a esta combinación de caracteres, los cultivares con la translocación 1BL/1RS fueron exitosos en gran parte del mundo a pesar de sus problemas de calidad, especialmente la baja proteína y pobre panificación en algunos casos.

Dos líneas avanzadas del CIMMYT, llamadas **Veery** y **Bobwhite**, que contienen la translocación 1B/1R tuvieron gran aceptación en el Cono Sur dando origen a un gran número de variedades. Los estudios fisiológicos realizados por el Dr. Fischer en el CIMMYT mostraron que entre 1962 y 1988, ocho variedades semi enanas desarrolladas por ese Centro lograron 27% más del rendimiento y 38% más del número de granos/m<sup>2</sup>, en comparación con las variedades altas y tradicionales. Explicando estas ganancias en términos fisiológicos, Dr. Fischer observó que las variedades semi enanas representaban una superioridad del 63% en la conductancia estomatal y eran 23% más eficientes en términos de actividad fotosintética para lograr los altos rendimientos que se habían observado en distintos países.

Apoyado en el éxito de las cruzas entre trigos invernales y primaverales que permitieron aumentar, no solamente la cantidad de la biomasa y el potencial de rendimiento, sino también mejoraron la adaptación de trigos a las regiones marginales que ocasionaban estrés bióticos y abióticos; el CIMMYT y otras instituciones de avanzada iniciaron la exploración de una mayor variabilidad presente en las distintas especies de trigo y especies aliadas. Durante este periodo una cantidad de cruzas amplias fueron realizadas incluyendo la recreación de un trigo sintético (*T. dicoccoides*/ *A. squarrosa*), primero logrado por el Dr. Kihara en Japón en 1950.

Las cruzas amplias representadas por trigos sintéticos, agropoliteta y distintas translocaciones como *2B/2R*, *1A/1R* y *7D/7Ag*, ampliaron la diversidad genética en un gran número de programas de mejoramiento de trigo en el mundo. Esta mayor diversidad genética fue responsable de lograr una mejor adaptación de trigos de alto potencial de rendimiento a las regiones marginales, especialmente secas y calurosas, donde mostraron su capacidad de mantener el verdor de la hoja por periodos prolongados. Aun cuando no se han hecho estudios fisiológicos sobre la mejora fotosintética representada por estos trigos, se ha comprobado su tolerancia a la sequía y al calor en muchos países. La introducción de trigos sintéticos también fue responsable de aumentar el peso de 1000 granos siempre manteniendo el mayor número de granos/ m<sup>2</sup>.

## SIGLO XXI Y LA REVOLUCIÓN GENÓMICA

Desde el inicio del siglo XXI, los avances logrados, en los estudios genómicos en general y en la familia *Triticea* en especial, han sido sorprendentes. Los estudios de la genética comparativa nos permiten entender y analizar los sitios cromosómicos comunes entre el trigo, cebada, arroz, avena y maíz. Una mayor exploración de genética comparativa nos permite pronosticar probables sitios de características agronómicas claves de forma acelerada. Estos avances han permitido desarrollar marcadores moleculares que pueden ser utilizados para asistir a la selección de caracteres específicos. Varios programas de mejoramiento hoy utilizan marcadores moleculares para seleccionar distintos caracteres como la vernalización, fotoperiodo, resistencia a enfermedades por ejemplo, royas, manchas foliares, fusariosis de la espiga, nemátodos del quiste y los aspectos de calidad industrial, etc.

Hay un esfuerzo mundial para decodificar el genoma del trigo. Debido al gran número de cromosomas del trigo, solo se ha podido terminar la decodificación del cromosoma 3B hasta ahora. Sin embargo, se están diseñando los mapas físicos que permitirán localizar los genes y los caracteres asociados a éstos.

Los avances en la transgénesis de distintas características cualitativas y ahora cuantitativas en cultivos como maíz y soja han permitido un gran avance de producción de estas especies en los países donde fueron adoptados. El cultivo del algodón transgénico es, en gran parte, responsable de crear la revolución productiva algodонера en la India. Sin embargo, debido a la gran complejidad del genoma del trigo, esta especie no fue una de las elegidas para la transgénesis y modificaciones genómicas. Actualmente, esta situación está cambiando y hoy, países como Argentina están listos para liberar un trigo transgénico con tolerancia a la sequía. Hay muchas otras características, como la resistencia a la fusariosis de la espiga, que pueden beneficiarse con los avances de esta tecnología y otras que actualmente están bajo prueba. Sin lugar a dudas, la revolución genómica es la siguiente etapa que permitirá el continuo avance del rendimiento y la producción de trigo a nivel mundial.

## LOS RETOS FUTUROS

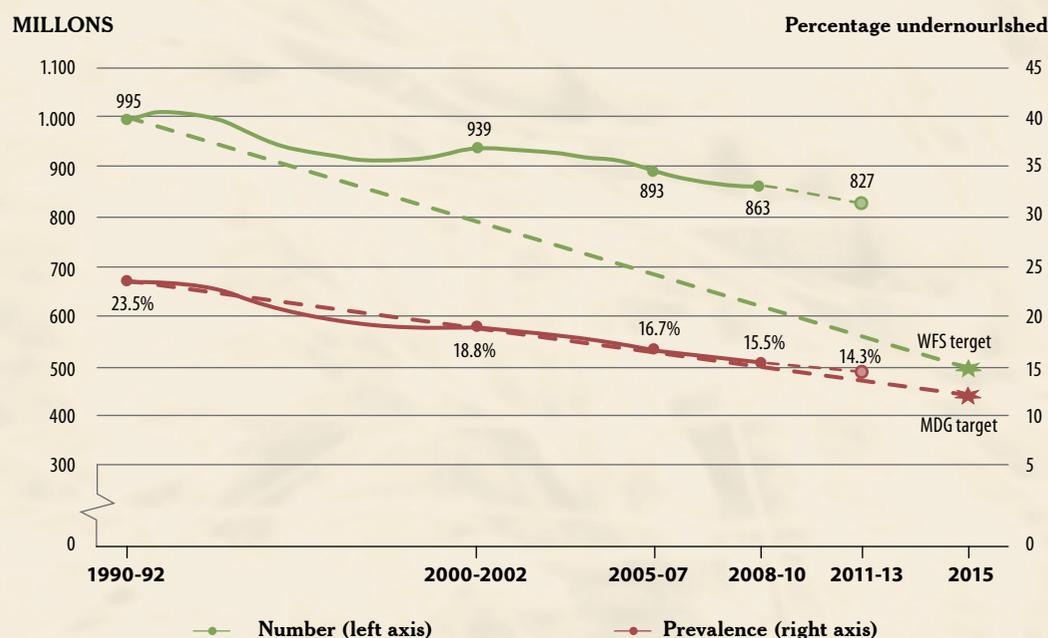
Es muy importante utilizar todas las tecnologías y herramientas disponibles para revertir la tendencia declinante de la tasa del incremento de rendimiento mundial de trigo que durante los últimos 50 años ha bajado de más del 3% anual a menos de 1% anual. Se ha mencionado anteriormente que aún existen millones de personas desnutridas en el mundo y que están esperando los avances tecnológicos para mejorar su condición.

En 1990, cuando las Naciones Unidas declaró las metas del milenio, una de éstas fue la de reducir el hambre o la desnutrición en un 50% hasta el 2015. A pesar de todo el progreso y el aumento de la producción hasta la actualidad, estamos lejos de lograr esta meta ya que la desnutrición mundial sigue afectando a más del 14% de la población. Los datos presentados en la Fig. 1 también muestran que estamos lejos de la meta fijada por el Foro Mundial de Alimentación en 1996, que era reducir en un 50% el número de personas con desnutrición. En este caso tampoco estamos siguiendo la trayectoria planeada, teniendo alrededor de 827 millones de personas desnutridas en el 2013. Para lograr estas metas, la FAO estima necesario incrementar la producción mundial en un 70%, lo que señala que la tendencia de la tasa de aumento en el rendimiento del trigo debe ser revertida para lograr como mínimo un aumento de 1.6% anual de rendimiento.

### Los retos principales que se necesitan atender en el corto a mediano plazo son:

1. Aumentar el promedio mundial del rendimiento de trigo de 3 ton/ha a 5 ton/ha. Además, todo esto se debe lograr de manera sostenible y frente a los cambios climáticos pronosticados. Es previsible que en los países tropicales y subtropicales, la frontera del cultivo de trigo va a sufrir los aumentos de la temperatura al desmedro de la producción futura si no se toman acciones concretas en la investigación hoy día.
2. El cambio climático está caracterizado por un aumento en la frecuencia de los eventos extremos: periodos de sequía, inundaciones, altas temperaturas, heladas, tormentas fuertes, etc. A nivel mundial, se está pronosticando una escasez de agua dulce. Conociendo que un 70% de agua es usada para la agricultura, necesitaríamos desarrollar no sólo los cultivos que puedan producir eficientemente con una menor cantidad de agua, sino también tecnologías eficientes de riego que representen la máxima cantidad de producto por cada gota de agua utilizada.
3. Altos costos energéticos y consecuentemente de los fertilizantes. Muchos recuerdan los altos costos de los fertilizantes que llegaron a ser entre \$600 y \$700 dólares la tonelada de urea en el 2008, junto a los precios del petróleo de entre \$100 y \$120 dólares el barril. El alto costo energético no sólo afectó la producción por los altos precios de los fertilizantes, sino también por el mayor costo de fletes marítimos y terrestres en los países importadores de granos.
4. El incremento de plagas y enfermedades emergentes: Los cambios climáticos también ponen presión sobre la diversidad de los microorganismos causantes de las enfermedades y plagas. Este aspecto se puede ejemplificar con la aparición de piricularia o brusone en el trigo, cuyas epidemias han causado impactos devastadores en Paraguay, Brasil y Bolivia en algunos años húmedos.

Fig. 1. **Número de personas y la prevalencia de desnutrición en el mundo.**



Note: Data for 2011-13 in all graphics refer to provisional estimates.  
Source: FAO.

5. Demandas para una mejor calidad o calidad específica: Con el incremento de los ingresos per cápita en algunos países en vías de desarrollo, la población de la clase media y alta está en condiciones de gastar más dinero para exigir una mejor calidad de pan o de cualquier otro producto que estén consumiendo. En un ambiente donde los científicos están preocupados en aumentar el rendimiento en diferentes partes del mundo, especialmente en las regiones marginales, esta demanda sobre una mejor calidad o una calidad específica pone mayores presiones sobre los programas que deben responder de una manera más eficiente.

A nivel mundial hay suficientes datos e informaciones que indican el aumento de temperatura en distintas zonas productoras, lo que se engloba en la palabra "calentamiento". En un estudio publicado por Lobell y Field (2007), se señala que en la mayoría de los países de las regiones tropical y subtropical, cada grado Centígrado de aumento en la temperatura está relacionado con la disminución del rendimiento de trigo. Con esta premisa, las prioridades de mejoramiento de trigo en el futuro están resumidas en el Cuadro 1.

Cuadro 1. **Futuras prioridades del mejoramiento de trigo en el mundo.**

Atributos claves (para todos los ambientes)	Atributos claves mega-ambientes específicos
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Potencial de <b>rendimiento</b> alto y estable</li> <li>- Resistencia durable a <b>royas</b>: hoja, estriada y tallo (Ug99)</li> <li>- Tolerancia a la <b>sequía</b> y eficiencia en el uso del agua</li> <li>- Tolerancia al <b>calor</b></li> <li>- <b>Calidad</b> adecuada</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Resistencia duradera para plagas y enfermedades               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Septoriosis de la hoja (ME2)</li> <li>- Helmintosporiosis (ME5)</li> <li>- Mancha amarilla (ME4)</li> <li>- Fusarium y micotoxinas (ME2/4/5)</li> <li>- Pudriciones radiculares y nemátodos (ME4)</li> </ul> </li> <li>• Incremento de Fe y Zn (ME1/5)</li> <li>• Resistencia al brotado (ME2/4/5)</li> </ul>

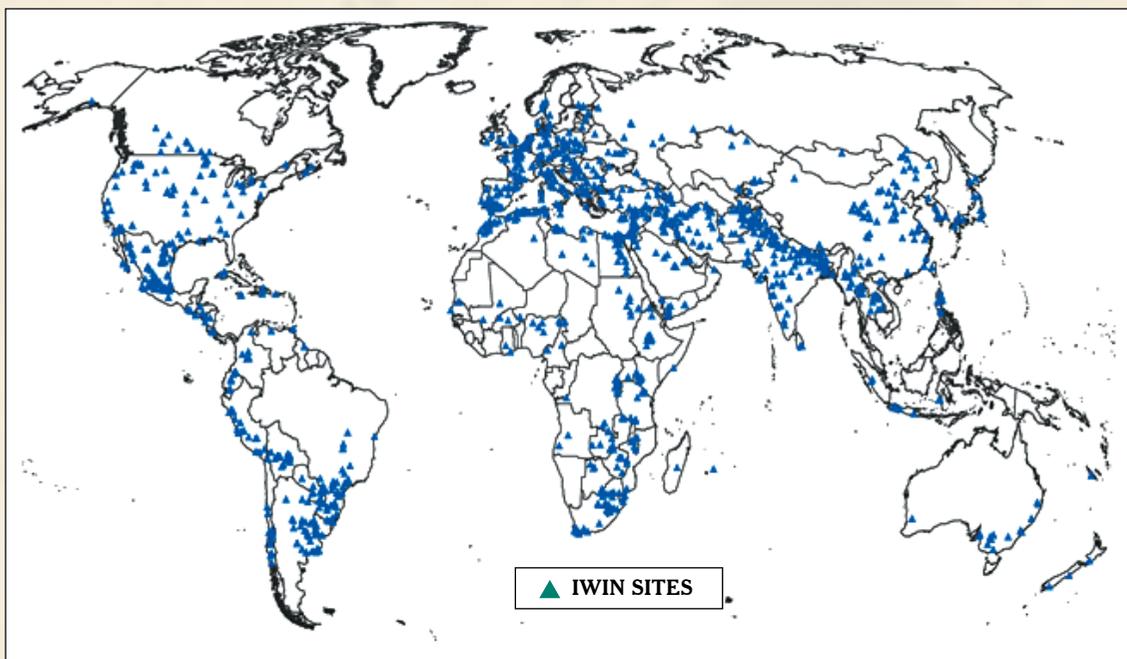
Considerando que estas prioridades son generales, lo que varía son los atributos claves para ser mejorados en cada mega ambiente o región agroecológica. En un mega ambiente húmedo, la resistencia duradera a las enfermedades, especialmente las manchas foliares y/o enfermedades de la espiga como fusariosis de la espiga que son generadores de micotoxinas, pueden ser importantes, no solo bajo el punto de vista de la producción, sino también de la salud humana y animal. Por otra parte, en un ambiente seco las características fisiológicas de la planta que la hacen eficiente para aprovechar la poca disponibilidad de agua o aguantar la sequía en estadios críticos de producción, manteniendo el área fotosintética y transpiración activa, puede ser más importante. En un ambiente como el norte de Paraguay, la tolerancia a altas temperaturas y a la sequía en estadios críticos del desarrollo del trigo junto a la resistencia a las enfermedades como la roya de la hoja, mancha amarilla y piricularia pueden ser factores que se pueden mejorar.

## ¿CÓMO INCREMENTAR EL RENDIMIENTO?

En todos estos ambientes, la pregunta clave es: ¿Cómo incrementar el potencial de rendimiento? Lo cierto es que debemos explorar toda la variabilidad genética y tecnologías disponibles para incrementar el número de granos por unidad de superficie y el peso del grano. En algunos ambientes, esto se puede lograr a través de variedades con espigas grandes y fértiles que permitan tener un mayor número de granos por espiga, cuando en otros ambientes esto puede ser logrado incrementando el número de espigas por m<sup>2</sup> sin importar el tamaño de la espiga.

Lo que está claro, es que el 50% de todo el progreso del rendimiento actual es el resultado del intercambio libre del germoplasma a nivel mundial liderado por el CIMMYT. Las evaluaciones de los ensayos internacionales en diversos sitios del mundo representadas en la Fig. 2 permiten no sólo identificar los mejores genotipos para rendimiento, adaptación o cualquier otra característica agronómica, sino también permiten resaltar las excepciones o aquéllos genotipos que pueden ser utilizados como donadores de una característica específica. Hasta ahora, el mejoramiento convencional ha tenido éxitos al incrementar la biomasa total, mejorar el índice de cosecha, alargar la duración del verdor de la hoja, aumentar el peso de 1000 granos, etc., que son los responsables del incremento en el rendimiento.

Fig. 2. **La red de ensayos internacionales de trigo del CIMMYT**



Con los avances en distintas disciplinas científicas y tecnologías disponibles para apoyar el proceso de mejoramiento, hoy es más necesario utilizar estos conocimientos en cuatro áreas principales:

- Caracterización parental molecular, fisiológica y química combinada con los datos de campo para ser usado en el mejoramiento o en el desarrollo del trigo híbrido en el futuro.
- Una mayor exploración de la diversidad utilizando toda la base genética disponible en la especie o especies distantes para lograr mayores expresiones de la biomasa y eficiencia de la producción bajo condiciones de estrés. Los ejemplos pueden ser: nuevas combinaciones de trigos invernales y primaverales basadas en su genotipado, creación y evaluación de nuevos trigos sintéticos y la exploración de nuevas translocaciones por su potencial de otorgar características específicas, sean de orden agronómico, fisiológico o patológico, etc.
- Uso de herramientas moleculares, especialmente una mayor exploración de doble haploides, selección genómica, transgénesis o cisgénesis y silenciamiento de genes para lograr la expresión de características deseables.
- Mejor uso de procesos fisiológicos para lograr la mayor actividad fotosintética, conductancia estomatal, reducción en la temperatura del follaje, etc. con el fin de identificar fuentes más eficientes en la producción de biomasa o tolerancia a los estreses abióticos etc.

En un proyecto denominado "Quebrando las barreras del rendimiento", el CIMMYT prevé hacer las siguientes modificaciones fisiológicas a la planta de trigo.

- Mejorar la fotosíntesis para aumentar la biomasa total de la planta
- Asegurar que la biomasa extra se convierta en un mayor rendimiento de granos en todos los ambientes y sin problemas estructurales, como el de acame.
- Mejoramiento fisiológico y molecular para combinar los productos de los temas expuestos en los puntos a) y b) con los atributos agronómicos necesarios.

El CIMMYT, junto con otros centros de estudios avanzados está liderando la aplicación de la reflectancia espectral en el mejoramiento de trigo, y los primeros resultados representan una excelente correlación de la mayor biomasa con el índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI). Fig. 3. Usando todas estas herramientas disponibles y combinándolas con métodos de mejoramiento convencional, el CIMMYT está avanzando en identificar no solamente las nuevas líneas superiores a los mejores testigos utilizados en los ensayos, sino también se está observando un lento incremento en lograr el mayor potencial de rendimiento, Fig. 4.

Fig. 3. **La relación entre la producción de biomasa e índice de vegetación de diferencia normalizada, NDVI.**

#### ESTADÍO PRIMER NUDO VS. BIOMASA EN EL LLENADO DE GRANO

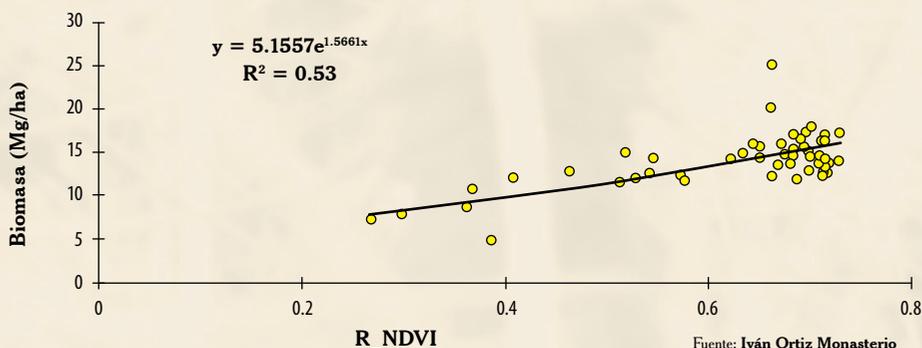
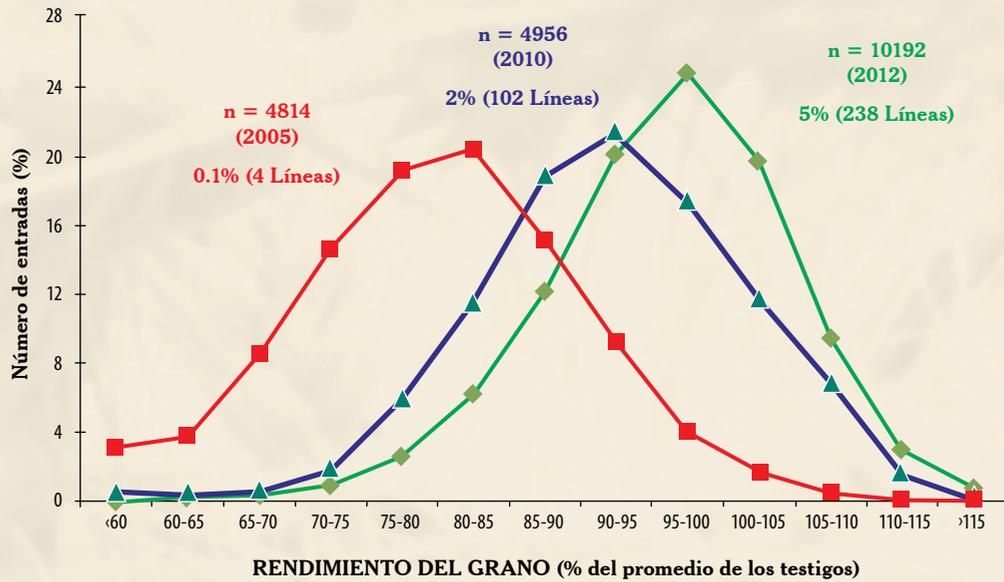


Fig. 4. **Potencial de rendimiento de las nuevas líneas de trigo evaluadas en CIMMYT, México.**



## ESTABILIZACIÓN DE LAS RESISTENCIAS A ENFERMEDADES Y PLAGAS

El segundo aspecto necesario para mejorar la tasa del aumento de rendimiento es proteger las plantas de las enfermedades y plagas o sus nuevos biotipos, que pueden generar pérdidas específicas o generales en distintas partes del mundo. Una vez más, la red de evaluaciones mundial, presentada en la Fig. 5, es clave para lograr la identificación y estabilización de los estreses bióticos y abióticos. La misma figura muestra la importancia de las distintas regiones del mundo para la evaluación de diferentes enfermedades y plagas (o para estreses abióticos), no solo para caracterizar el germoplasma mundial, sino también para identificar fuentes de variabilidad utilizables por los programas de mejoramiento.

Fig. 5. **Algunas regiones claves para evaluaciones de estreses bióticos y abióticos.**



Actualmente, el mejoramiento internacional de trigo en el CIMMYT sigue acumulando genes para lograr un mayor nivel de resistencia duradera a las royas. Las nuevas líneas como Kingbird basadas en la acumulación de genes menores, con efecto aditivo, tienen de cuatro a cinco genes para resistencia a la roya de la hoja. La experiencia nos ha mostrado que tres a cuatro genes aditivos son suficientes para otorgar un nivel de resistencia que puede llegar a parecer como la inmunidad y que puede durar más de 30 años. De la misma manera, y frente a las amenazas de la raza Ug 99 y sus variantes en la roya del tallo, se dispone de mayor diversidad basada en una cantidad de genes mayores y menores como *Sr22*, *Sr25*, *Sr26*, *Sr33*, *Sr35*, *Sr42/SrCad*, *Sr45*, *Sr50*, *SrSha7*, *SrNing*, *SrTmp*, *SrND643*, *SrHUW234*. También se está explorando nueva diversidad de resistencia para la roya del tallo en segmentos cromosómicos reducidos de las especies aliadas. En este caso, los genes de resistencia que están siendo explorados son *Sr32*, *Sr37*, *Sr39*, *Sr40*, *Sr43*, *Sr44*, *Sr47*, *Sr50*, *Sr51*, *Sr53*.

Todos estos estudios, junto al apoyo de la tecnología molecular han ayudado a una mejor comprensión de la resistencia a las royas en estado de planta adulta. El apoyo molecular fue clave en identificar cuatro bloques de genes conocidos con efectos pleiotrópicos. Estos son el: *Sr*, *Lr 46*, *Yr 29* y *Pm 39* en el cromosoma *1B*; *Sr 2*, *Lr 27*, *Yr 30* y *Pm?* en el cromosoma *3B*; *Sr 55*, *Lr 67*, *Yr 46* y *Pm 46* en el cromosoma *4D* y *Sr 57*, *Lr 34*, *Yr 18* y *Pm 38* en el cromosoma 7D.

Cabe señalar que las especies aliadas de trigo son un reservorio de genes no explorados hasta ahora. Tomando el ejemplo de la enfermedad pircularia o brusone de trigo, que ha creado estragos en Bolivia, Brasil y Paraguay, se ha podido identificar un segmento 2 NS de *Triticum ventricosa* que fue transferido al cromosoma 2 AS y que hasta ahora ha mostrado inmunidad contra esta enfermedad. El Dr. Jorge Dubcovsky, de la Universidad de California, está transfiriendo este segmento a varios fondos genéticos para evaluar su efecto en distintas regiones del mundo.

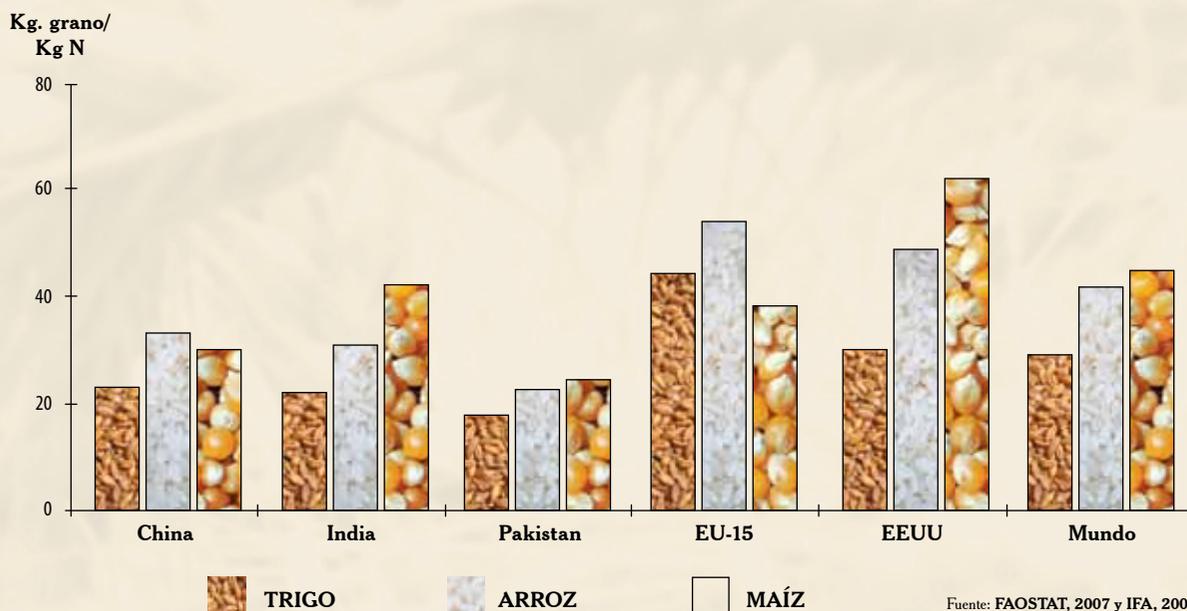
Muchos de estos problemas, como el de pircularia, sólo se pueden manejar de una forma colaborativa a nivel mundial. Para lograr los éxitos en éstos y otros problemas, se están creando redes o consorcios mundiales para avanzar en la resolución de estos conflictos de una manera multidisciplinaria. En el caso de la pircularia, los estudios de la variabilidad patogénica se están haciendo en los tres países de la región mencionados y en los Estados Unidos. Por otra parte, la transformación de trigo con genes de resistencia conocidos en arroz está en progreso sin conocerse la factibilidad de su expresión en el fondo genético de trigo hasta ahora.

## EFICIENCIA EN EL USO DE NUTRIENTES

Se ha mencionado que los trigos de la Revolución Verde fueron capaces de utilizar mayores niveles de fertilización para lograr las altas productividades. Varios estudios confirman que los trigos semi enanos también fueron más eficientes en la absorción y utilización de N en comparación con los trigos altos y tradicionales. Sin embargo, en comparación con otras especies como arroz y maíz, la eficiencia en el uso de N indicada por kilo de granos/kg N es baja en trigo, Fig. 6. Excepto en los países de la Unión Europea, la eficiencia del uso del N en trigo no pasa del 30%. En otras palabras, el 70% del N que se aplica al trigo se pierde, y es un aspecto que debe ser mejorado, sea del punto de vista de mejoramiento de plantas o agronómico.

Tal como en el caso de las enfermedades, las especies aliadas al trigo son fuentes de variabilidad no exploradas. Actualmente, algunos científicos japoneses están estudiando la eficiencia de la utilización del N en la especie *Leymus racemosus*, cuyas raíces producen exudados que inhiben la nitrificación (el 90% del N queda en forma estable de  $\text{NH}_4^+$  después de 60 días). Ellos conocen la localización cromosómica del gen responsable de la inhibición biológica de la nitrificación y han transferido este gen al trigo con la misma expresión que en la especie parental. Otros colegas europeos y de Irán han estudiado colecciones de los trigos antiguos y silvestres que demuestran mejor capacidad de utilización de N. Toda esta variabilidad está disponible para ser utilizada en el mejoramiento convencional y/o utilizando las herramientas moleculares de la biotecnología.

Fig. 6. Eficiencia en el uso de nitrógeno en cereales en diferentes países.



## CALIDAD NUTRICIONAL

Lo que fue mencionado anteriormente sobre las nuevas demandas en mejores productos panificados y específicos trataba la calidad industrial del trigo. Sin embargo, no se puede olvidar el extenso alcance de las deficiencias nutricionales en la población mundial. Casi 2000 millones de personas en el mundo son anémicas y padecen de deficiencia en Hierro (Fe). Un gran porcentaje de esta población está formada por mujeres y niños. Más del 20% de la población mundial es deficiente en cinc (Zn), y alrededor de 250 millones de personas son deficientes en vitamina A. Estas deficiencias, no sólo son visibles en los países pobres o en África, sino también se observan en países ricos y desarrollados y en América Latina.

Considerando la importancia del trigo en la dieta humana y en un programa colaborativo con Harvest Plus, el CIMMYT está abocado a identificar la variabilidad genética que existe en el germoplasma de trigo alrededor del mundo. Los primeros datos de las evaluaciones de germoplasma han mostrado una gran variabilidad en todos los caracteres estudiados. Además, los trabajos de mejoramiento muestran que es posible mejorar el nivel de estos minerales en el grano de trigo en el futuro, Fig. 7.

## CONSIDERACIONES FINALES

Uno de los aspectos importantes para lograr la seguridad alimentaria en el futuro es desarrollar prácticas de manejo que puedan reducir la brecha entre los rendimientos potenciales y los actuales. Los datos presentados en la Fig. 8 son un testimonio de estas brechas en el cultivo de trigo en diferentes países. En la mayoría de los casos esta brecha, o una parte de ésta, puede ser reducida con prácticas muy sencillas como adecuación de la fecha de siembra, como es en el caso de la India. Los datos presentados en la Fig. 9 muestran los altos rendimientos logrados en las siembras del mes de noviembre, y su disminución cada vez que la siembra se retrasa. El mismo tipo de datos han sido generados en Paraguay donde las siembras tempranas pierden el rendimiento debido al problema de pircularia, y las siembras tardías pierden rendimiento por causa de las altas temperaturas.

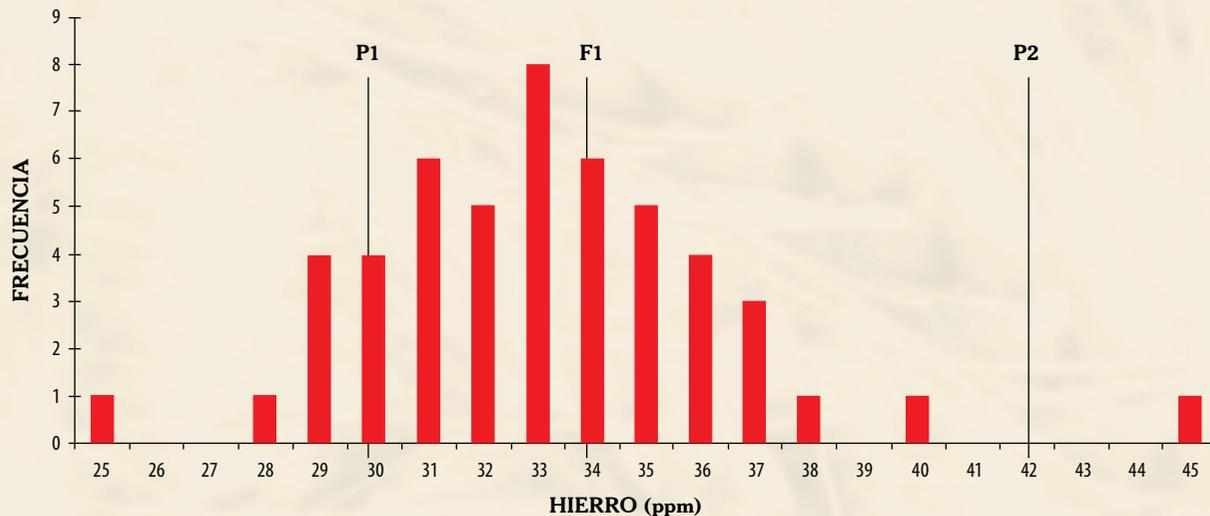
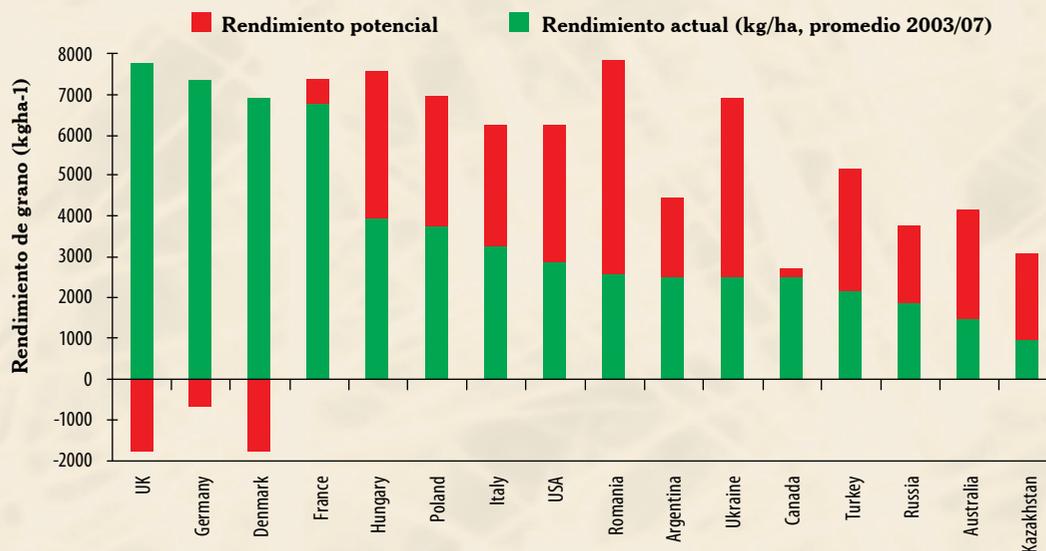
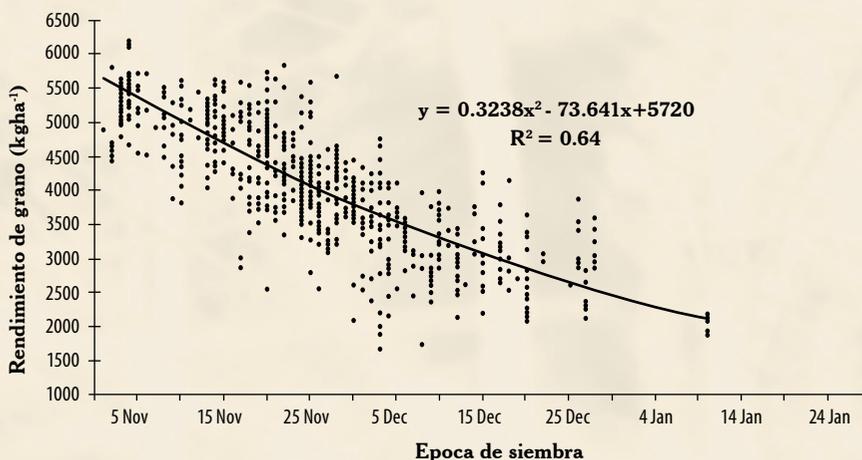
Fig. 7. Frecuencia de la concentración del hierro observada en una población F<sub>2</sub> del trigo.

Fig. 8. El rendimiento del trigo actual y agroecológicamente posible en algunos países.



Source: Bruinsma (2009) referred to in Foresight, FFF, Gov. Office for Science London, 2011

Fig. 9. El impacto de la época de siembra sobre el rendimiento potencial de trigo en la India.

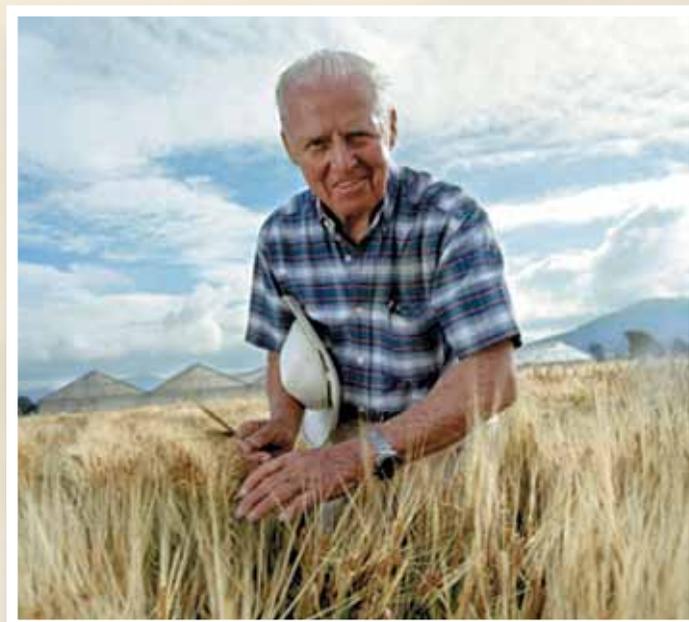
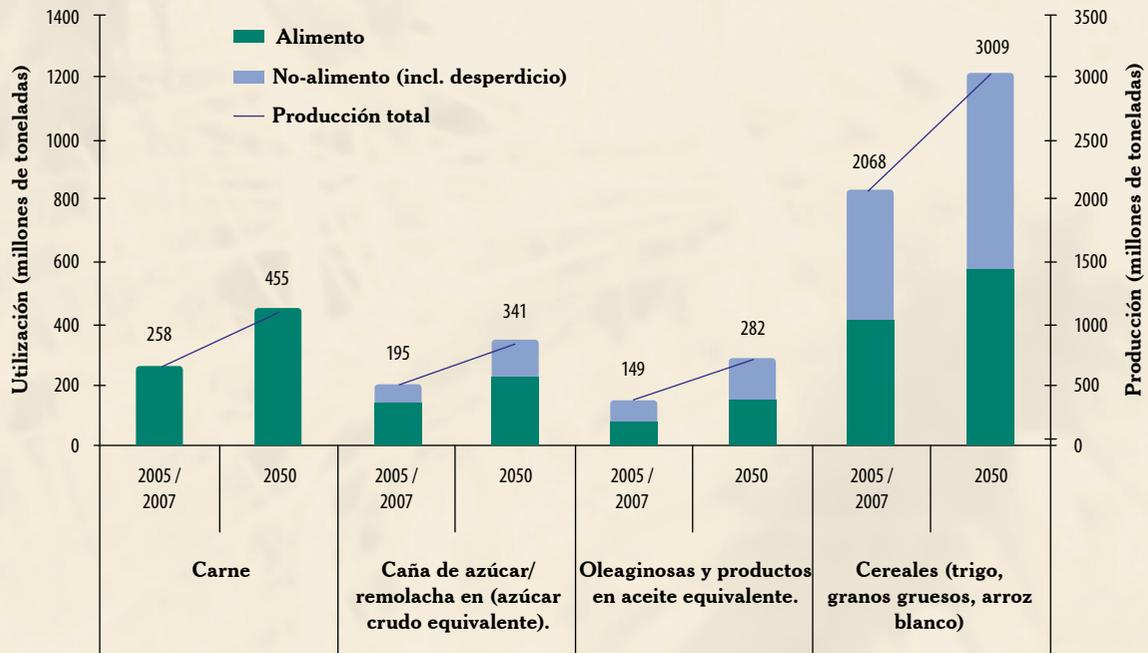


Fuente: M.L. Jat from CSISA reports (2010-12) &amp; R.K. Malik, EUP CSISA reports (2011)

Se espera que la población mundial llegue a 9000 millones de personas en el 2050. Para alimentar a toda esta población de una manera adecuada y nutritiva, considerando los cambios de la dieta observada, los requerimientos de aumento de producción no sólo en los cereales, sino también en las oleaginosas, cultivos azucareros y carne presentan un tremendo reto a todos los que están involucrados en la producción y disponibilidad de alimentos, los agrónomos, científicos, asesores, políticos y sociedad civil, Fig. 10. Sólo la utilización de todas las tecnologías es nuestra salida para alcanzar estos enormes requerimientos en el futuro.

Cabe mencionar lo que diría el Dr. Borlaug: *“No hay tiempo para la complacencia”*.

Fig. 10. **La producción y utilización de principales alimentos en el mundo.**



Dr. Norman Borlaug, premio Nobel de la Paz, 1970. instó a los agrónomos a seguir desarrollando nuevas tecnologías para lograr la seguridad alimentaria mundial.

# Preguntas y comentarios

¿Una consulta sobre el crecimiento, usted había mostrado en los primeros gráficos mayor cantidad en volumen de toneladas en los últimos años, pero hay un decrecimiento en la tasa de crecimiento, como se entiende ese relacionamiento entre los dos gráficos?

**Dr. Kohli:** Hay un aumento en el rendimiento, pero la tasa de este aumento o cuánto va aumentando cada año puede variar sobre un periodo. La primera grafica era del volumen total, pero la tasa del aumento que anteriormente era más de 3% anual se ha decaído a menos de 1% anual, lo que no es suficiente si queremos llegar a producir trigo suficiente para la población esperada en el 2050.

Quiero volver a la parte del nitrógeno. Pienso que quizás deberíamos abrir un poco nuestras mentes para no solo preocuparnos del trigo. Algunos experimentos hechos en CETAPAR mostraron la factibilidad de sustituir totalmente el nitrógeno fertilizante por nitrógeno biológico o las leguminosas. En ese caso, se puede conseguir producir 7 toneladas de masa seca por hectárea en 80 días. Se pudo lograr buenas producciones de trigo sobre este sin aplicar ni un kilo de nitrógeno al trigo.

Yo pienso que la *Crotalaria* tiene su problema; la semilla es muy cara. De repente habría que trabajar también en la genética de la *Crotalaria* y de los otros abonos verdes para producir semillas baratas que el agricultor pueda utilizar.

**Dr. Kohli:** Estoy de acuerdo, sobre el uso de los abonos verdes no solo para complementar la fertilización necesaria, sino también del punto de vista de mejorar el suelo *per se*. De todas maneras es necesario identificar y mejorar la eficiencia del uso del nitrógeno porque la planta no identifica si es nitrógeno sintético u orgánico. La planta convierte kilo nitrógeno en kilos de granos y esta relación es la que se necesita mejorar en las futuras variedades. La planta del trigo parece ser menos eficiente en la utilización del nitrógeno en comparación con otros cereales como arroz o maíz. Es esta relación o eficiencia que necesitamos mejorar, donde en lugar de una eficiencia media de 30% a nivel mundial y pérdida de un 70% del nitrógeno aplicado, podamos llegar a una eficiencia mayor a través de los cambios genéticos en la planta y/o mejores formulaciones de los fertilizantes disponibles hoy.

Vista de participantes del seminario.



# Estresses de altas temperaturas e deficiência hídrica em trigo

## (*Triticum aestivum* L.)

**LAURO AKIO OKUYAMA**

Instituto Agronômico do Paraná – IAPAR, Caixa Postal 301, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 375,  
CEP 86047-902, Londrina, Paraná, Brasil.  
Contacto: [lauro.okuyama@iapar.br](mailto:lauro.okuyama@iapar.br)



## Resumo

Os estresses provocados pelas altas temperaturas e deficiência hídrica, que normalmente ocorrem conjuntamente, são os principais fatores abióticos que reduzem a produção de trigo em muitas regiões do mundo. Com o cenário de aquecimento global, aumento da população mundial e redução de disponibilidade hídrica, vislumbra-se cada vez mais a necessidade de cultivares produtivos e com tolerância ao calor e a seca. Esta revisão tem o objetivo de abordar o rendimento de grãos, os efeitos do calor e da seca, os caracteres morfológicos e fisiológicos, os métodos de seleção de plantas, as cultivares tolerantes e os avanços em tolerância ao calor e a seca. Os efeitos do estresse de calor no rendimento de grãos são mais imediatos e a planta é mais suscetível no período de florescimento e enchimento de grãos, enquanto que os da seca são de longa duração, possibilitando maior tempo para a planta utilizar mecanismos adaptativos. A deficiência hídrica, quando ocorre na fase vegetativa, promove a redução no número de espigas por unidade de área, no número de espiguetas na espiga, no número de grãos na espiguetas e no peso médio de grãos. Em termos fisiológicos, promove redução da fotossíntese, aumento da respiração, redução na estabilidade das membranas celulares, desnaturação de proteínas e perda de atividade enzimática. O “stay-green”, termoestabilidade de membrana, proteína de choque térmico, atividade antioxidante, depressão da temperatura do dossel e precocidade estão associados a tolerância ao calor, enquanto que o sistema radicular, colmo, temperatura do dossel, ajustamento osmótico e adaptações morfológicas estão relacionados a seca. A seleção assistida por marcadores moleculares, em função de QTLs

identificados como relacionados ao calor e a seca, pode representar uma ferramenta auxiliar no melhoramento. Para que novos avanços em tolerância ao calor e a seca ocorram há necessidade de trabalhos multidisciplinares que envolvam os conhecimentos de comportamento fenológico, fisiológico e bioquímico, de caracteres de plantas, de materiais exóticos e de métodos eficazes de seleção que possibilitem avaliação em grande número de genótipos.

Palavras-chave: calor, seca, componentes do rendimento, caracteres de planta, métodos de seleção.

## Abstract

### High temperature and drought stresses in wheat

*The yield reduction caused by high temperature and drought, which usually occur together, are main abiotic stresses that reduce wheat production in many regions of the world. In a scenario of global warming, population growth and reduced water availability, there is an urgent need to identify productive cultivars tolerant to wheat and drought. This presentation aims to discuss the effects of heat and drought on yield including the morphological and physiological characters, the methods of germplasm selection and advances in the identification of tolerance to heat and drought in wheat. The effects of heat stress on grain yield are immediate and the plant is more susceptible during flowering and grain filling stage. On the other hand, drought can take place over a long period of time which allows the plants more time to use adaptive mechanisms to overcome its effects. When the drought occurs in the vegetative stage of the crop, it results in the reduction of spike number, spikelets per spike, number of grains per spikelet and the average grain weight. In physiological terms, drought causes a decrease in photosynthesis, an increase in respiration, a reduction in the stability of cell membranes, protein denaturation and loss of enzymatic activity. The "stay-green", thermostability membrane, heat shock protein, antioxidant activity, depression of canopy temperature and its timing are characters associated with heat tolerance. The root system, stem, canopy temperature, osmotic adjustment and morphological adaptations are related with drought tolerance. Based on the QTLs identified with heat and drought, the molecular marker assisted selection can become an important selection tool in the breeding program. Further advances in heat and drought tolerance require multidisciplinary approach which involves the knowledge of phenology, physiology, biochemistry, characterization of plants and exotic germplasm and effective selection methods that allow evaluation of large number of genotypes.*

El estrés de sequía y calor siguen siendo factores más limitantes a la expansión del trigo en el país.



## INTRODUÇÃO

Com a perspectiva de aquecimento global, há previsão de muitas mudanças climáticas. Em regiões onde atualmente a baixa temperatura é fator limitante para o crescimento e desenvolvimento das culturas, a elevação de temperatura trará benefícios. Entretanto, em regiões onde atualmente a temperatura é favorável e em áreas onde já ocorrem problemas de calor e/ou seca os riscos serão maiores. Os estresses de altas temperaturas e de deficiência hídrica podem ser atenuados pelas seguintes práticas: manejo do solo, escolha de espécies, cultivares tolerantes, épocas de semeadura e adequação de ciclo das cultivares. Para a obtenção de novas cultivares de trigo tolerantes ao calor e à seca faz-se necessário trabalhos conjuntos de várias especialidades de pesquisa. Nesta revisão serão abordados o rendimento de grãos, os efeitos do calor e da seca, os caracteres morfológicos e fisiológicos, os métodos de seleção de plantas, as cultivares tolerantes e os avanços em tolerância ao calor e a seca.

## RENDIMENTO DE GRÃOS

Os ganhos em rendimento de grãos tem sido em função do aumento do número de grãos por unidade de área, promovido pela redução da altura da planta, do aumento do índice de colheita e de adubação que favoreceram o aumento do número de espigas por unidade de área e de número de grãos por espiga.

O rendimento de grãos de trigo é limitado pela força da demanda durante o enchimento de grãos, em função disso novos incrementos dependem do aumento desta após a antese, por meio do aumento adicional do número de grãos por unidade de área ou do peso de grãos (ARAUS *et al.*, 2008).

Os efeitos de calor e seca no rendimento de grãos dependem do estágio da planta e da duração do período de estresse (OKUYAMA *et al.*, 2004). De um modo geral, quando ocorrem da fase vegetativa a maturação de grãos, promovem a redução no ciclo, na altura de planta, no número de espigas por unidade de área, no número de espiguetas na espiga, no número de grãos na espiguetas e no peso médio de grãos. Na fase reprodutiva, desde diferenciação floral até a floração, os impactos são mais acentuados, pela redução do número de espiguetas e no número de grãos por espiguetas. Na fase final do ciclo, afetam o enchimento de grãos, resultando em menor peso médio de grãos.

Fig. 1. Efecto de la sequia de 64 dias sobre el rendimiento y sus componentes en variedad A.

### Amostra 16 - agricultor - 2013 (64 dias do ciclo final sem precipitação)



Média de grãos / espiga = 0,62 g  
Número de grãos / m<sup>2</sup> = 8.083

	ESPIGAS		
	0,36 m <sup>2</sup>	1 m <sup>2</sup>	%
Graúda	43	119	24.2
Média	44	122	24.7
Pequena	77	214	43.3
Miúda	14	39	7.9
<b>Total</b>	<b>178</b>	<b>494</b>	<b>100.0</b>

Espigas	1000 grãos (g)	Peso grãos espiga (g)	No. grãos espiga	No. espigas (m <sup>2</sup> )
Graúda	38,33	1,02	27	122,22
Média	35,48	0,78	22	119,44
Pequena	37,80	0,43	11	213,89
Miúda	30,80	0,09	3	38,89

**Produção = 3050,8 kg/hectare**  
**= 123,1 sacas / alqueire**

Fig. 2. Efecto de la sequia de 64 dias sobre el rendimiento y sus componentes en variedad B.

**Amostra 04 - agricultor - 2013**  
**(64 dias do ciclo final sem precipitação)**

- Al tóxico, excesso chuvas, geadas, doenças e seca -



Média de grãos / espiga = 0,34 g

Número de grãos / m<sup>2</sup> = 3.628



ESPIGAS			
	0,36 m <sup>2</sup>	1 m <sup>2</sup>	%
Graúda	10	28	8,9
Média	17	47	15,2
Pequena	43	119	38,4
Miúda	42	117	37,5
<b>Total</b>	<b>112</b>	<b>311</b>	<b>100,0</b>

Espigas	1000 grãos (g)	Peso grãos espiga (g)	No. grãos espiga	No. espigas (m <sup>2</sup> )
Graúda	34,35	0,84	25	27,78
Média	29,80	0,51	17	47,22
Pequena	28,40	0,32	11	119,44
Miúda	23,35	0,14	6	116,67

**Produção = 1048,3 kg/hectare**

**= 42,3,1 sacas / alqueire**

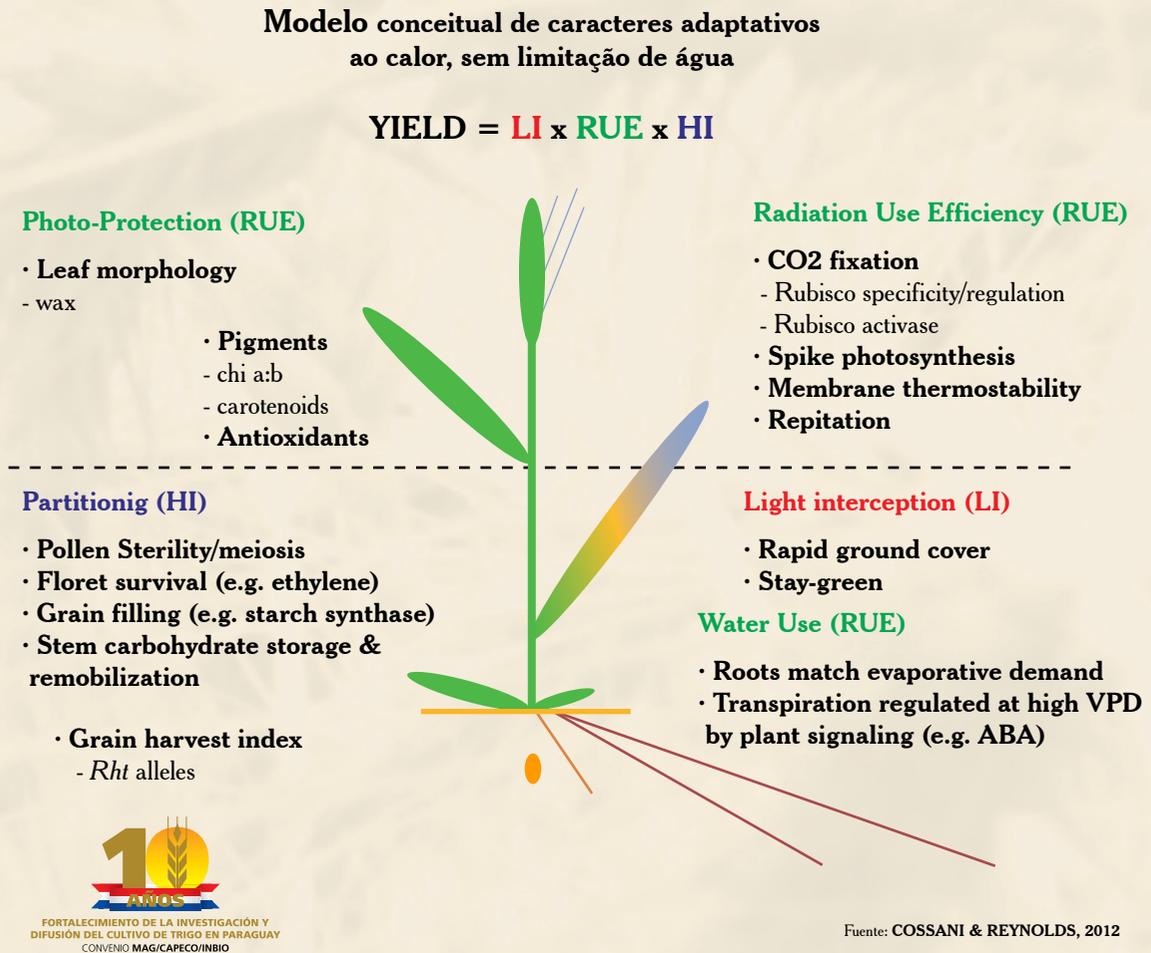
O melhoramento genético de plantas pode ser por meio empírico de seleção direta para a característica de interesse, ex. produção de grãos, ou por meio indireto por meio de caracteres associados ao rendimento potencial de grãos e/ou desempenho superior em condições de estresse. Como o melhoramento tradicional (empírico) parece estar chegando a um platô, faz-se necessário uma compreensão completa da fisiologia para definir os caracteres morfo-fisiológicos alvos de enfoque para seleção assistida por marcadores moleculares (ARAUS *et al.*, 2008).

## EFEITOS DO CALOR E DA SECA

O estresse de calor ocorre quando há aumento da temperatura acima do valor crítico, por período de tempo suficiente para causar danos ao crescimento e desenvolvimento das plantas. Em revisão baseada em vários artigos, FAROOQ *et al.* (2011) relacionam as temperaturas mínimas, ótimas e máximas em °C, respectivamente, para os seguintes estágios da planta: a) espiguetas terminal:  $1.8 \pm 0.25$ ;  $11.7 \pm 1.61$  e  $21.4 \pm 2.33$ ; b) antese:  $9.7 \pm 0.43$ ;  $23.0 \pm 1.15$ ;  $32.0 \pm 1.74$  e c) enchimento de grãos:  $9.6 \pm 0.75$ ,  $21.3 \pm 1.27$ ,  $34.3 \pm 2.66$ .

A fotossíntese é um dos processos fisiológicos mais sensíveis ao calor, principalmente por causa da sensibilidade da membrana do tilacóide e da redução da produção de clorofila (RISTIC *et al.*, 2007). Nessas condições há aumento da respiração e com conseqüente redução do ciclo, área foliar, estatura de plantas, número de grãos por espiga, peso e qualidade de grãos.

A tolerância ao calor está associada à capacidade dos genótipos em manter estáveis as taxas fotossintéticas sob condições de altas temperaturas (BLUM *et al.*, 1994). Como ainda não existe um quadro definitivo das bases fisiológicas que reduzem a taxa de crescimento sob condições de estresse de calor, muitos dos caracteres adaptativos podem ser úteis para estas condições (COSSANI & REYNOLDS, 2012).

Fig. 3. **Modelo conceptual de caracteres adaptativos al calor, sin limitacion de agua.**

Apesar da maioria dos efeitos de estresses de calor e de seca serem similares, entretanto, nem todos os caracteres que conferem tolerância ao calor estão associados à tolerância à seca, como exemplo a termoestabilidade de membrana (BLUM, 1988).

## CALOR

A compreensão e avaliação de mecanismos bioquímicos e fisiológicos aos níveis celular, molecular e morfológico, junto com os métodos tradicionais de seleção, constituem alternativas para seleção de genótipos tolerantes ao estresse de calor (SOUZA *et al.*, 2011). A capacidade das plantas de sobreviverem e, principalmente, produzir elevados rendimentos de grãos é considerado como o principal mecanismo de tolerância ao calor (WAHID *et al.*, 2007) (Cuadro 1). Na sequência são apresentadas algumas características de plantas relacionadas ao estresse de calor (Cuadro 2).

Cuadro 1. **Promedio de datos agronómicos sobre Ensayo Internacional de Genotipos Tolerantes al Calor, Londrina, Brasil.**

Genotipo	Orden	Granos	Biomasa	Paja	Índice de Cosecha	PMG g	Espigas m <sup>2</sup>	Granos/ espiga	Granos m <sup>2</sup>	Antesis Días	Madurez Días
		kg/ha									
Seri	1	4440	11259	6819	0.39	34	380	34	12949	82	121
Fang60	2	4190	9036	4846	0.46	35	357	34	12110	68	136
Bacanora	3	4041	10387	6346	0.39	35	382	30	11469	80	116
Genaro	4	3028	10571	6643	0.29	31	361	35	12705	54	122
Glennson	5	3906	10102	6197	0.39	35	356	32	11235	73	119
Pavon	6	3634	9087	5453	0.40	32	392	29	11268	79	121
Nacozari	7	3434	7948	4515	0.43	32	360	30	10630	77	139
IP4	8	3416	8868	5452	0.39	37	532	17	9245	68	119
Cno79	9	3245	9030	5785	0.36	30	325	34	10903	72	122
Anza	10	3193	9337	6144	0.34	28	492	23	11266	79	123
7Cerros	11	3186	8040	4854	0.40	32	297	34	10101	69	116
Nesser	12	3145	9237	6093	0.34	30	443	23	10328	80	123
Kanchan	13	3062	7979	4917	0.38	44	368	19	6893	68	139
Son64	14	2762	6424	3662	0.43	3	378	23	8395	66	104
Trigo3	15	2671	8420	5749	0.32	33	372	22	8037	69	114
Debeira	16	2611	10028	7417	0.26	31	399	22	8562	62	126
Media		3429	9110	5681	0.38	33	387	27	10382	72	123

Cuadro 2. **Mecanismo de estrés térmico y su asociación con el rendimiento en el Ensayo Internacional de Genotipos Tolerantes al Calor (IHSGE).**

Reported heat stress mechanism	Accounting for genetic variation in yield in IHSGE
Accelerated development (Midmore <i>et al.</i> , 1984)	Yes, lateness associated with higher yield in many environments
Stand establishment (Rawson, 1988)	No, poor correlation with early growth
Evaporative cooling (Idso <i>et al.</i> , 1984)	Yes, strong correlation of CTD with yield
Inhibition of meiosis (Saini <i>et al.</i> , 1983; Zeng <i>et al.</i> , 1985)	No, sterility not observed. Grain: spikelet ratio not correlated with yield
Sensitive growth phase (Fischer, 1985; Shpiler and Blum, 1991)	Partial least squares analysis confirmed spike growth sensitivity, especially to high night temperatures (Vargas <i>et al.</i> , 1988)
Photosynthesis/chlorosis (Al-Khatib and Paulsen, 1990; Shpiler and Blum, 1991)	Yes, high association of photosynthesis and stay-green with yield in field plots
Thylakoid thermostability (MT) (Moffatt <i>et al.</i> , 1990)	Preliminary data on IHSGE lines confirms association of chlorophyll fluorescence with yield (Balota <i>et al.</i> , 1996)
Membrane thermostability (MT) (Shanahan <i>et al.</i> , 1990)	Yes, MT measured on seedlings and flag leaves associated with yield at several sites
Inhibition of starch synthase (Bhullar and Jenner, 1986; Rijven, 1986)	No clear evidence, but yield not associated with TGW

Fonte: REYNOLDS *et al* 2001

**Stay-Green.** O “stay-green” é caracterizado por um prolongamento da duração da área verde dos colmos e das folhas, possibilitando assim um incremento na produtividade e na qualidade de grãos. Sob estresse térmico, há aumento da senescência foliar, principalmente nas fases de pós-florescimento e enchimento de grãos. Com isso é possível identificar genótipos tolerantes a senescência foliar, ou seja, com a presença do caráter “stay-green”, esta pode ser uma eficiente estratégia no melhoramento para tolerância ao calor (FAROOQ *et al.*, 2011; LOPES & REYNOLDS, 2012).

**Termoestabilidade de Membrana.** As altas temperaturas promovem a diminuição da estabilidade das membranas celulares, com isso, há modificação da composição e suas estruturas, podendo levar a perda de íons, inibição da fotossíntese e aumento da respiração. A excessiva fluidez de lipídeos da membrana faz com que as mesmas percam a sua função (COSSANI & REYNOLDS, 2012). Esta característica herdável tem sido usada em estudos de tolerância ao calor (FOKAR *et al.*, 1998) e com alta correlação com o rendimento de grãos (REYNOLDS *et al.*, 2001).

**Proteínas de Choque Térmico (HSP).** É um grupo de proteínas que aumenta rapidamente sua concentração em resposta a exposição das células a estresses ambientais (LATCHMAN, 2003). Essas proteínas desempenham um papel importante na proteção a estresses celulares, auxiliando na recuperação da conformação de proteínas (PARSELL *et al.*, 1993). Baseado nas características dessas proteínas HSP, Garg *et al.* (2012) encontraram um marcador SNP associado a stress térmico terminal no trigo, que podem ser utilizados para melhorar a tolerância a altas temperaturas.

**Atividade antioxidante.** O fechamento estomático, queda na taxa fotossintética líquida e excesso de energia resultante do aumento na fração do fluxo de fótons fotossintéticos não utilizados na fotossíntese nem dissipados como calor, promove aumentos na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o radical hidroxila (OH<sup>-</sup>) e o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) que constituem o estresse oxidativo (ASADA, 1999). Estes causam peroxidação lipídica, com consequentes danos na membrana, degradação e inativação de proteínas e rompimento da estrutura do DNA (SAIRAM *et al.*, 2000). A tolerância ao estresse de calor implica na eliminação desses radicais pelo sistema antioxidante, que envolve um grupo de enzimas como dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e redutase da glutatona (GR) e, por meio de metabólitos secundários, como ácido ascórbico, glutatona e carotenoides.

**Depressão da temperatura do dossel.** A diferença da temperatura do dossel com a temperatura do ar ambiente tem sido utilizada para estimar o efeito do estresse térmico em trigo, por apresentar correlação com rendimento de grãos (REYNOLDS *et al.*, 1994; MOHAMMADI *et al.*, 2012). Quanto maior a diferença da temperatura representa maior a tolerância ao calor, inferindo dessa forma que as plantas vêm mantendo normais as atividades de respiração e de transpiração. **Precocidade.** A precocidade representa uma característica de escape ao estresse térmico e/ou deficiência hídrica. Esta característica é desejável em trigo cultivado sob condições de umidade residual e em locais onde ocorrem altas temperaturas no período de florescimento a maturação de grãos. Cultivares precoces, associadas a um longo período da fase de emergência ao florescimento e com alto potencial de rendimento de grãos, são desejáveis para as regiões semiáridas do Mediterrâneo (AL-KARAKI, 2012). Para as condições do norte e oeste do Paraná, as cultivares precoces, em função do baixo potencial produtivo, são pouco utilizadas pelos agricultores. Entretanto, para semeaduras tardias, estas são mais indicadas do que cultivares de ciclo longo.

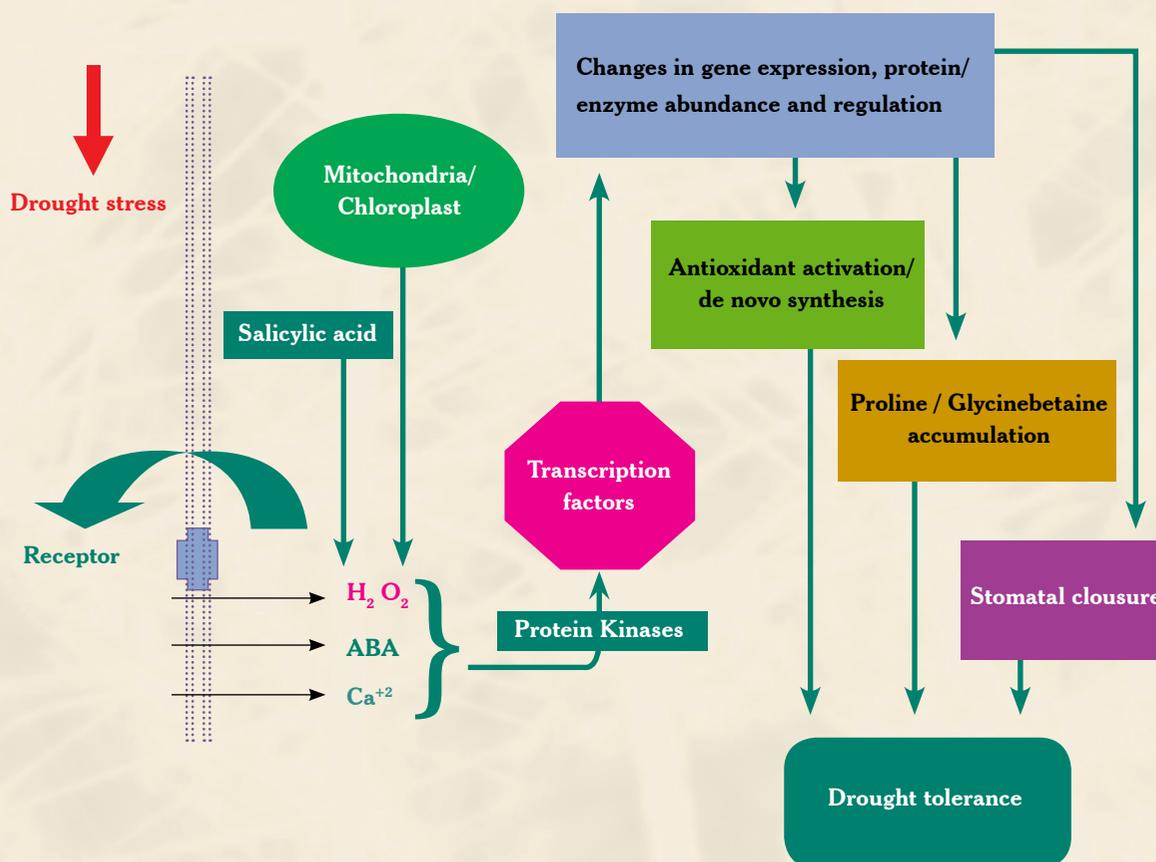
## SECA

O desenvolvimento de cultivares tolerantes à seca tem sido um dos objetivos em muitos programas de melhoramento genético em trigo (Fig. 4). Os mecanismos de resistência à seca podem ser de três tipos: “evitamento”, “tolerância” e “escape” (LEVITT, 1972). O evitamento à seca ocorre quando a planta mantém potenciais elevados por meio do fechamento dos estômatos, do aprofundando das raízes para extração de água, da diminuição do tamanho das células, do espessamento das paredes celulares e do aumento da cerosidade da cutícula. A tolerância à seca ocorre quando as funções das plantas são mantidas em equilíbrio durante um déficit hídrico interno elevado, com baixos potenciais de água. O escape à seca ocorre quando a planta completa o seu ciclo antes do advento da seca. Muitos caracteres morfológicos, fisiológicos e bioquímicos são considerados como relacionados com tolerância à seca em trigo, entre esses:

Fig. 4. Evaluación de la tolerancia a sequía usando aspersores en línea, (a) PF020037 (tolerante) y (b) PF 23201A (susceptible)



Fig. 5. Probables cambios celulares para el desarrollo de tolerancia a sequía. Fuente: Farooq et al. 2008.



**Sistema radicular.** O sistema radicular que extrai água em maiores profundidades do solo é uma característica adaptativa importante para a planta suportar longos períodos de estresse hídrico. É um indicador importante da capacidade da planta em atender a demanda evaporativa da atmosfera por meio da exploração e extração de água do solo (MONNEVEUX *et al.*, 2012)

**Colmo.** Está relacionado ao acamamento, tolerância à seca e produtividade. A seleção direta de plantas com colmos mais grossos pode contribuir para maior aumento de grãos por espiga (OKUYAMA, 2005). Além disso, os colmos mais grossos podem reduzir o acamamento e possibilitar maior fluxo de água na planta e

acumular maior quantidade de assimilados. O enchimento de grãos sob condições de estresse hídrico pode ser melhorado pela mobilização de reservas acumuladas no colmo (EHDAIE & WAINES, 1996; BLUM, 1998; FOULKES *et al.*, 2002; GUPTA *et al.*, 2011; MONNEVEUX *et al.*, 2012).

**Temperatura do dossel.** Os termômetros de radiação a infravermelho portáteis possibilitam seleção de plantas tolerantes à seca (BLUM *et al.*, 1982; BILGE *et al.*, 2008; ORTIZ *et al.*, 2008; KUMARI *et al.*, 2013). A temperatura do dossel pode fornecer informações sobre a transpiração como o fator principal para a redução da temperatura da folha. A menor temperatura do dossel em plantas submetidas a estresse hídrico indica uma maior capacidade de extração de água do solo ou de manter uma boa condição de água na planta. Assim, a maior transpiração é uma característica positiva quando se seleciona para maior potencial de rendimento ou uma melhor adaptação ao estresse hídrico moderado. Resultados similares de correlação do rendimento de grãos com a temperatura da copa e com a depressão da temperatura da copa sugerem que a temperatura da copa e/ou a depressão da temperatura da copa podem ser utilizados como critérios para seleção de genótipos tolerantes à seca (GUENDOUZ *et al.*, 2012).

**Ajustamento osmótico.** É um dos mecanismos de tolerância à seca que a planta desenvolve para a manutenção do turgor e equilíbrio do potencial hídrico na célula, por meio de produção e/ou acúmulo de solutos osmoticamente ativos como prolina, glutamina, betaína, sorbitol e manitol, açúcares solúveis, açúcar alcoólico, ácidos orgânicos, cálcio, potássio, íons cloreto. Por meio do ajustamento osmótico, as organelas e as atividades citoplasmáticas são mantidas em ritmo normal, ajudando assim o desempenho das plantas em termos de fotossíntese, crescimento translocação de assimilados para os grãos (LUDLOW & MUCHOW, 1990; SUBBARAO *et al.*, 2000).

**Discriminação de carbono.** A discriminação isotópica de carbono, devido à alta herdabilidade, possibilita seleção de genótipos que apresentem melhor eficiência de uso da água em condições de déficit hídrico (SHRESTHA *et al.*, 2012). A única limitação ao uso desta técnica é o seu alto custo. Duas cultivares de trigo tolerantes à seca (Drysdale em 2002 e Rees em 2003) foram lançadas pelo Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation - CSIRO, na Austrália. Detalhes respectivamente nos sites: <http://www.csiro.au/files/files/p2jr.pdf>; <http://www.csiro.au/files/files/p2ik.pdf>.

**Adaptações morfológicas.** Muitas variedades de trigo têm adaptações para reduzir a quantidade de radiações que atingem os tecidos fotossintetizantes, aliviando assim os problemas de calor intenso e de efeitos adversos de danos fotoquímicos. A interceptação da radiação solar é reduzida pelas várias adaptações à seca, tais como: aumento da reflectância pela presença de uma cobertura densa de tricomas de cor clara sobre a superfície da folha, revestimentos resinosos sobre a folhagem, ou cutículas cerosa espessa (XIPING *et al.*, 2002).

Evaluación de materiales genéticos para tolerancia al calor bajo condiciones de campo.



## CULTIVARES TOLERANTES

Nos quadros 3 e 4 são apresentados, respectivamente, cultivares e linhagens tolerantes ao calor e a seca, país onde os dados foram obtidos e as fontes de informações.

Cuadro 3. **Cultivares y líneas de trigos reportadas con tolerancia al calor**

CULTIVARES / LINHAGENS	PAÍS	FONTE
<b>Cultivares tolerantes durante a germinação:</b> . Hindi 62, Kharcha65, C306, Narbada4, PissiLocal, NI 8223, HI 1101, Malvilocal, JijagaYellowe HI 8351 <b>Cultivares tolerantes durante enchimento de grãos:</b>	India	SAUNDERS & HETTEL, 1993
HD2285, HD2402, HD2270, AKW381 e NP2 (dicocum).	India	SAUNDERS & HETTEL, 1993
Anahuac, BH 1146, BR 24, CPAC 9186 e EP 93541.	Brasil	SOUZA & RAMALHO, 2001
Anahuac, BH 1146, BR 24 e EP 93541, e as populações segregantes:Aliança/EP 93541, EP 93541/CPAC 9662 e BH 1146/BR 24	Brasil	CARGNIN <i>et al.</i> , 2006
Aliança e PF 020037	Brasil	RIBEIRO JÚNIOR <i>et al.</i> , 2006
CT-01217, CT-01222 andCT-01085	Pakistan	KHAN <i>et al.</i> , 2007
BR 24, Aliança e EP 93541 e as populações segregantesBH1146/BR24// Aliança/EP93541, BR24/Aliança//EP93541/CPAC9662,Aliança/EP93541// CPAC9662/Pioneiro.	Brasil	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2011
Karim(T.AEST/SPRW'S//CA8055/3/ BACANORA86)	Iran	MOHAMMADI <i>et al.</i> , 2012
SKAUZ/BAV92//PASTOR e T.AEST/SPRW'S//CA8055/3/ BACANORA86.	Iran	SHEFAZADEH <i>et al.</i> , 2012
HI-8638	Iran	KAUSHIK <i>et al.</i> , 2013

Canindé 11 es una variedad precoz de alto rendimiento también se considera tolerante al stress hídrico.



Cuadro 4. Cultivares e linhagens de trigo tolerantes a sequía

CULTIVARES / LINHAGENS	PAÍS	FONTE
Etruria, Spada, Pandas, Centauro, Oderzo, Costantino e Gladio	Itália	GAVUZZI <i>et al.</i> , 1993
C 306	India	BANSAL & SINHA, 1991
Kosuta, Slavija, Stepa, Evropa 90 (Yugoslavia), Huelquen (Chile), Stephens (USA) e Pavlovska 102 (Russia).	Yugoslavia	DENCIC <i>et al.</i> , 2000
Drysdale	Australia	<a href="http://www.csiro.au/files/files/p2jr.pdf">http://www.csiro.au/files/files/p2jr.pdf</a>
Rees	Australia	<a href="http://www.csiro.au/files/files/p2ik.pdf">http://www.csiro.au/files/files/p2ik.pdf</a> .
C 306 and Kharchia 65	India	DHANDA & SETHI, 2008
IAC 289-L4 e IAC 350	Brasil	CONDÉ <i>et al.</i> , 2010
Karahan-99, Bayraktar-2000, Gerek- 79, PL-7, Sönmez-2000, Kıraç-66 e PL-5.	Turquía	AKÇURA <i>et al.</i> , 2011
Agawam, McNeal e Alpowa.	EEUU	LI <i>et al.</i> , 2011
HAMAM-4 (ICARDA); CHEN/AEGILOPSSQUARROSA(TAUS)//BCN/3/VEE#7/BOW/4/PASTOR (CIMMYT)	Iran	MOHAMMADI <i>et al.</i> , 2011
RS=5.2664, RS=8.737 e RS=11.3364	Iran	FARSHADFAR <i>et al.</i> , 2012
Materiais do CIMMYT (CHAM//PTZ NISKA/VT 1556-170 WRB856; OMID//H7/4/839/3/OMID/TDO/5/40-71-23; PASTOR/3/VORONA/CON79//KAUZ ).	Iran	SAYYAH <i>et al.</i> , 2012.
TAM 111 and TAM 112	EEUU	<a href="http://southwestfarmpress.com/grains/drought-tolerance-variety-selection-key-topics-wheat-field-day">http://southwestfarmpress.com/grains/drought-tolerance-variety-selection-key-topics-wheat-field-day</a>
Mahdavi	Iran	ABDOLSHAHI <i>et al.</i> , 2013
TR39477	Turquía	BUDAK <i>et al.</i> , 2013
1F103-L-1-12//PONY/OPATA; ORF1.158/FDL//BLO/3/SH14414/CROW/4/CICWH99381-0AP-0AP-OMAR-6MAR; CA8055//KS82W409/STEPHENS; Shahriar; KAUZ'S/MACHETE; M-79-7 e Chamran	Iran	PARCHIN <i>et al.</i> , 2013

Para que novos avanços em tolerância ao calor e a seca ocorram há necessidade de trabalhos multidisciplinares que envolvam os conhecimentos de comportamentos fenológicos, fisiológicos e bioquímicos, de caracteres de plantas, de materiais exóticos e de métodos eficazes de seleção que possibilitem avaliações em grande número de genótipos.

O melhoramento para caracteres fisiológicos adaptativos ao estresse hídrico pode ser realizado com base em parâmetros que apresentem alta herdabilidade como: vigor do crescimento, dias para maturação, altura da planta, comprimento do pedúnculo, número de grãos por espiga, senescência da folha bandeira, comprimento da espiga, peso de mil grãos e peso do hectolitro (MOHAMMADI *et al.*, 2011).

Apesar da existência de diferenças entre os genótipos de trigo, novas fontes de diversidade genética devem ser exploradas. Uma destas opções é o cruzamento do trigo (*Triticum aestivum*) com seus ancestrais *Aegilops tauchii* e *Triticum durum* (FAROOQ *et al.* 2011). Neste contexto, o trigo sintético, derivado do cruzamento entre *Triticum turgidum* L. e *Aegilops tauschii* (ancestrais do trigo pão; *Triticum aestivum*), vem provando ser uma grande fonte de variabilidade genética inexplorada e com boas características de alta produtividade e de tolerância a estresses abióticos e bióticos. O novo trigo sintético denominado "super trigo" tem, pelo menos, 30% de rendimento superior às cultivares existentes (RANA *et al.*, 2013).

Vários métodos e técnicas de seleção de plantas para tolerância ao calor e a seca têm sido apresentados. Entretanto, em função dos custos e da pouca aplicabilidade, os seus usos têm sido limitados. Os mais utilizados, pela possibilidade de avaliar grande número de genótipos, vem sendo: vigor inicial, ciclo de florescimento e maturação, manutenção das folhas verdes, temperatura do dossel e fertilidade de espiga. A seleção assistida por marcadores moleculares, baseados principalmente em caracteres morfológicos, fisiológicos e bioquímicos vem sendo amplamente pesquisados. Apesar de seus usos ainda serem de abrangência local como para calor (PINTO *et al.*, 2010; GARG *et al.*, 2012; PALIWAL *et al.*, 2012; Sadat *et al.*, 2013) e para seca (HUSEYNOVA & RUSTAMOVA, 2010; ELSAYED & RAFUDEEN, 2012) podem representar uma importante ferramenta para o desenvolvimento de novas cultivares.

## Referências

- ABDOLSHAHI, R.; SAFARIAN, A.; NAZARI, M.; POURSEYEDI, S.; MOHAMADINEJAD, G. Screening drought-tolerant genotypes in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) using different multivariate methods. **Archives of Agronomy and Soil Science**, 59(5):685-704, 2013.
- AKÇURA, M.; PARTİGOÇ, F.; KAYA, Y. Evaluating of drought stress tolerance based on selection indices in turkish bread wheat landraces. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, 21(4): 700-709, 2011.
- AL-KARAKI, G.N. Phenological development yield relationships in durum wheat cultivars under late-season high- temperature stress in a semiarid environment. **ISRN Agronomy**, v.2012, 7p., 2012.
- ARAUS, J. L.; SLAFER, G. A.; ROYO, C.; SERRET, M. D. Breeding for yield potential and stress adaptation in cereals. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 27: (6):377-412, 2008.
- ASADA, K. The water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 50:601-639, 1999.
- BANSAL, K.C. & SINHA, S.K. Assessment of drooght resistance in 20 accessions of *Triticum aestivum* L. and related species II. Stability in yield components. **Euphytica** 56: 15-26, 1991.
- BILGE, B.; YILDIRIM, M.; BARUTCULAR, C.; GENÇ, I. Effect of canopy temperature depression on grain yield and yield components in bread and durum wheat. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, 36 (1):34-37, 2008.
- BLUM, A.; MAYER, J.; GOZLAN, G. Infrared thermal sensing of plant canopies as a screening technique for dehydration avoidance in wheat. **Field Crops Research**, 5: 137-146, 1982.
- Blum, A., Sinmena, B., Mayer, J., Golan, G., Shpiler, L. Stem reserve mobilisation supports wheat-grain filling under heat stress. **Australian Journal of Plant Physiology**, 21:771-781, 1994.
- Blum, A. Plant breeding for stress environment.** Boca Raton, FL, USA, CRC Press, 1988.
- BLUM, A. Improving wheat grain filling under stress by stem reserve mobilization. **Euphytica**, 100:77-83, 1998.

- BUDAK, H.; KANTAR, M.; KURTOGLU, K.Y. 2013. Drought tolerance in modern and wild wheat. **The Scientific World Journal**, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/548246>. Acesso em 14 out. 2013.
- CARGNIN, D.; SOUZA, M.A.; DIAS, D.C.F.S.; MACHADO, J.C.; MACHADO, C.G.; SOFIATTI, V. Tolerância ao estresse de calor em genótipos de trigo na fase de germinação. **Bragantia**, 65(2):245-251, 2006.
- CONDÉ, A.B.T.; COELHO, M.A.O.; YAMANAKA, C.H.; CORTE, H.R. Adaptabilidade e estabilidade de genótipos de trigo sob cultivo de sequeiro em Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 40(1):45-52, 2010.
- COSSANI, C.M. & REYNOLDS, M.P. Physiological traits for improving heat tolerance in wheat. **Plant Physiology**, 160:1710-1718, 2012.
- DENCIC, S.; KASTORI, R.; KOBILJSKI, B.; DUGGAN, B. Evaluation of grain yield and its components in wheat cultivars and landraces under near optimal and drought conditions. **Euphytica** 113: 43-52, 2000.
- DHANDA, S. S. & G.S. SETHI, G.S. Drought tolerance among 30 cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.) For water relation parameters. **Agricultural Science Digest**, 28 (3):182-185, 2008
- EHDAIE, B.; WAINES, J.G. Genetic variation for contribution of preanthesis assimilates to grain yield in spring wheat. **Journal Genetics and Breeding**, 50(1):47-55, 1996.
- ELSAIED, A.I. & RAFUDEEN, M.S. Molecular marker assisted for recognition drought tolerant in some of bread wheat genotypes. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, 15(1): 17-23, 2012.
- FAROOQ, M.; BRAMLEY, H.; PALTA, J. A.; H.M. SIDDIQUE, K.H.N. Heat stress in wheat during reproductive and grain-filling phases. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 30:1-17, 2011.
- FARSHADFAR, E.; JAMSHIDI, B.; AGHAEI, M. Biplot analysis of drought tolerance indicators in bread wheat landraces of Iran. **International Journal of Agriculture and Crop Sciences**, 2012. Disponível em: [www.ijags.com](http://www.ijags.com), Acesso em 20 out. 2013.
- FOULKES, M.J.; SCOTT, R.K.; BRADLEY, R.S. The ability of wheat cultivars to withstand drought in UK conditions: formation of grain yield. **The Journal of Agricultural Science**, 38:153-169, 2002.
- GARG, D.; SAREEN, S.; DALAL, S.; TIWAR, R.; SINGH, R. Heat shock protein based SNP marker for terminal heat stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Australian Journal of Crop Science**, 6(11):1516-1521, 2012.
- GAVUZZI, P.; DELOGU, BOGGINE, G.; DI FONZO, N.; BORGHI, B. Identification of bread wheat, durum wheat and barley cultivars adapted to dry areas of Southern Italy. **Euphytica**, 68: 131-145, 1993.
- GUENDOUZ, A.; GUESSOUM, S.; MAAMRI, K.; BENIDIR, M.; HAFSI, M. Canopy temperature efficiency as indicators for drought tolerance in durum wheat (*Triticum Durum* Desf.) in semi arid conditions. **Journal of Agriculture and Sustainability**, 1(1): 23-38, 2012.
- GUPTA, A.K.; KAUR, K.; KAUR, N. Stem reserve mobilization and sink activity in wheat under drought conditions. **American Journal of Plant Sciences**, 2, 70-77, 2011.
- HUSEYNOVA, I.M.; RUSTAMOVA, S.M. Screening for drought stress tolerance in wheat genotypes using molecular markers. **Proceedings of ANAS (Biological Sciences)**, 65(5-6): 132-139, 2010.
- KAUSHIK, SK.; TOMAR, DS.; DIXIT, AK.; SAXENA, AK. Assessment of wheat varieties in Central India under changed climatic scenario. **Wudpecker Journal of Agricultural Research**, 2(2): 64-66, 2013.
- KHAN, M.I.; MOHAMMAD, T.; SUBHAN, F.; AMIN, M.; SHAH, S.T. Agronomic evaluation of different bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes for terminal heat stress, **Pakistan Journal of Botany**, 39(7): 2415-2425, 2007.
- KUMARI, M.; PUDAKE, R.N.; SINGH, V.P.; JOSHI, A.K. Association of staygreen trait with canopy temperature depression and yield traits under terminal heat stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Euphytica**, 190:87-97, 2013.
- Latchman, D.S. Protective effect of heat shock proteins: potential for gene therapy. **Gene Therapy & Molecular Biology**, 7:245-254, 2003
- LEVITT, J. **Responses of Plants to Environmental Stress**. New York: Academic Press, 1972. 697p.
- LI, P.; CHEN, J., WU, P. Agronomic characteristics and grain yield of 30 spring wheat genotypes under drought stress and nonstress conditions. **Agronomy Journal**, 103(6):1619-1628, 2011.
- LOPES, M.S. & REYNOLDS, M.P. Stay-green in spring wheat can be determined by spectral reflectance measurements (normalized difference vegetation index) independently from phenology. **Journal of Experimental Botany** 63 (10), 3789-3798, 2012.
- LUDLOW, M.M. & MUCHOW, R.C. A critical evaluation of traits for improving crop yields in water-limited environments. **Advances in Agronomy**, 43:107-153, 1990.
- MOHAMMADI, M.; KARIMIZADEH, R.; SHEFAZADEH, M.K.; SADEGHZADEH, B. Statistical analysis of durum wheat yield under semi-warm dryland condition. **Australian Journal of Crop Science**, 5(10):1292-1297, 2011.
- MONNEVEUX, P.; JING, R.; MISRA, S.C. Phenotyping for drought adaptation in wheat using physiological traits. **Frontiers in Physiology**, 3:1-13, 2012.

- OKUYAMA, L.A.; FEDERIZZI, L.C.; BARBOSA NETO, J.F. Correlation and path analysis of yield and its components and plant traits in wheat. **Ciência Rural**, 34(6):1701-1708, 2004.
- OKUYAMA, L.A.; FEDERIZZI, L.C.; BARBOSA NETO, J.F. Plant traits to complement selection based on yield components in wheat, **Ciência Rural**, 35(5):1010-1018, 2005
- OLIVEIRA, D.M.; SOUZA, M.A.; ROCHA, V.S.; ASSIS, J.C. Desempenho de genitores e populações segregantes de trigo sob estresse de calor. **Bragantia**, Campinas, 70(1):25-32, 2011
- ORTIZ, R.; BRAUN, H.J.; CROSSA, J.; CROUCH, J.H. *et al.* Wheat genetic resources enhancement by the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT). **Genetic Resources and Crop Evolution** 55 (7): 1095-1140, 2008.
- PALIWAL, R.; RODER, M.R.; KUMAR, U.; SRIVASTAVA, J.P.; JOSHI, A.K. QTL mapping of terminal heat tolerance in hexaploid wheat (*T. aestivum* L). **Theoretical and Applied Genetics**, 25:561-575, 2012.
- PARCHIN R.A.; NAJAPHY, A.; FARSHADFAR, E.; HOKMALIPOUR, S. Assessment of drought tolerance in genotypes of wheat by multivariate analysis. **World Applied Sciences Journal** 22 (4): 594-600, 2013.
- PARSELL, D. A. & LINDQUIST, S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. **Annual Review of Genetics**, 27:437-496, 1993.
- PINTO, R.S.; REYNOLDS, M.P.; MATHEWS, K.L.; MCINTYRE, C.L.; OLIVARES-VILLEGAS, J.J.; CHAPMAN, S.C. Heat and drought adaptive QTL in a wheat population designed to minimize confounding agronomic effects. 2010. **Theoretical and Applied Genetics**, 121 (6): 1001-1021, 2010.
- RANA, R.M.; BILAL, M.; REHMAN, S.; IQBAL, F.; SHAH, M.K.N. Synthetic wheat; a new hope for the hungry world. **Asian Journal of Agriculture and Biology**, 1(2):91-94, 2013.
- REYNOLDS, M. P., BALOTA, M., DELGADO, M. I. B., AMANI, I., AND FISCHER, R. A. Physiological and morphological traits associated with spring wheat yield under hot, irrigated conditions, **Functional Plant Biology**, 21: 717-730. 1994.
- REYNOLDS, M.P., TRETOWAN, R.T., VAN GINKEL, M. & RAJARAM, S. Application of physiology to wheat breeding. In M.P. Reynolds, I. Ortiz-Monasterio & A. McNab, eds. **Application of physiology in wheat breeding**. Mexico, DF, CIMMYT, p.2-10, 2001.
- RIBEIRO JÚNIOR, W. Q.; RAMOS, M. L. G.; VASCONCELOS, U. *et al.* Fenotipagem para tolerância à seca visando o melhoramento genético do trigo no cerrado. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2006. 24 p. html. (Embrapa Trigo. Circular técnica Online, 21). Disponível em: <[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/ci/p\\_ci21.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/ci/p_ci21.htm)>.
- RISTIC, Z.; BUKOVNIK, U.; PRASAD, P.V.V. Correlation between heat stability of thylakoid membranes and loss of chlorophyll in winter wheat under heat stress. **Crop Science**, 47:2067-2073, 2007.
- SADAT, S.; SAEID, K.A.; BIHAMTA, M.R.; TORABI, S.; SALEKDEH, S.G.H.; AYENEH, G.A.L. Marker Assisted Selection for Heat Tolerance in Bread Wheat. **World Applied Sciences Journal**, 21 (8): 1181-1189, 2013
- SAIRAM, R.K.; SRIVASTAVA, G.C.; SAXENA, D.C. Increased antioxidant activity under elevated temperatures: A mechanism of heat stress tolerance in wheat genotypes. **Biologia Plantarum**, 43(2):245-251, 2000.
- SAUNDERS, D.A. & HETTEL, G.P. Wheat in heat-stressed environments: irrigated, dry areas and rice-wheat farming systems. Sudan. **Agricultural Research corporation**, 1993, 402 p.
- SAYYAH, S.S.; GHOBADI, M.; MANSOORIFAR, S.; ZEBARJADI, A.R. Evaluation of drought tolerant in some wheat genotypes to post-anthesis drought stress. **Journal of Agricultural Science**, 4(11):248-256, 2012.
- SHEFAZADEH, M.K.; MOHAMMADI, H.; KARIMIZADEH, R.; MOHAMMADINIA, G. Tolerance study on bread wheat genotypes under heat stress. **Annals of Biological Research**, 3(10):4786-4789, 2012.
- SHRESTHA, S.L.; HULBERT, S.H.; CAMPBELL, K.G.; 1, STEBER, C.M.; PUMPHREY, M.; CARTER, A. Screening of spring and winter wheat for water use efficiency by carbon isotope discrimination analysis, 2012. Disponível em: <http://scisoc.confex.com/crops/2012am/webprogram/Paper72989.html>, 2012.
- SOUZA, M.A.; RAMALHO, M.A.P. Controle genético e tolerância ao estresse de calor em populações híbridas e em cultivares de trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 36:1245-1253, 2001.
- SOUZA, M.A.; PIMENTEL, A.J.B.; RIBEIRO, G. Melhoramento para tolerância ao calor. In: FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. (Eds.) **Melhoramento de plantas para condições de estresses abióticos**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011. cap.9. p.199-226.
- SUBBARAO G.V., NAM, N.H., CHAUHAN Y.S., JOHANSEN C. Osmotic adjustment, water relations and carbohydrate remobilization in pigeonpea under water deficits, **J. Plant Physiology**, 157, 651-659, 2000.
- WAHID, A.; GELANI, S.; ASHRAF, M. *et al.* Heat tolerance in plants: an overview. **Environmental and Experimental Botany**, 61:199-223, 2007.
- XIPING, D.; LUN, S.; SHINOBU, I. Assessments on the water conservation practices and wheat adaptations to the semiarid and eroded environments. 12th ISCO Conference, Beijing, p.348-360, 2002. Disponível em: <http://www.tucson.ars.ag.gov/isco/isco12/VolumeIII/AssessmentsontheWaterConservation.pdf>

# Avances de la biotecnología en trigo y su utilización en el mejoramiento genético. Situación actual en la Argentina

## MARCELO HELGUERA

Laboratorio de Biotecnología, INTA EEA Marcos Juárez.  
Ruta 12 Km3 (2580) Marcos Juárez, Provincia de Córdoba, Argentina.  
Contacto: [helguera.marcelo@inta.gob.ar](mailto:helguera.marcelo@inta.gob.ar)



## Resumen

Dentro de la biotecnología en tiempos recientes se han producido importantes avances en la decodificación del genoma de trigo. Desde el punto de vista del mejoramiento genético dos de los principales productos del genoma decodificado son: (1) el descubrimiento de genes asociados a características de valor agronómico (2) la identificación y uso de variantes superiores de estos genes (alelos) en programas de mejoramiento. Partiendo del hecho de que los genes son secuencias únicas de ADN dentro del genoma, el marcador molecular surge de tecnologías capaces de diagnosticar rápidamente una secuencia de ADN (en este caso del gen) usando como muestra el ADN genómico (total) de un individuo. En el Programa de Mejoramiento de Trigo del INTA se utiliza esta herramienta para selección indirecta de caracteres de interés agronómico (adaptación/rendimiento, calidad, resistencia a patógenos) en poblaciones segregantes y para caracterizar material avanzado y los bloques de cruzamiento. Ejemplos de materiales desarrollados por mejoramiento asistido con marcadores son el cultivar Bointa 2004 (portador del gen Lr47 de resistencia a roya de la hoja) y las líneas avanzadas R111117 y R111171 portadoras del gen Fhb1 de resistencia a fusariosis de la espiga. Nuevos desafíos: trabajar con caracteres más complejos como tolerancia a sequía, temperaturas extremas, salinidad, rendimiento, etc.

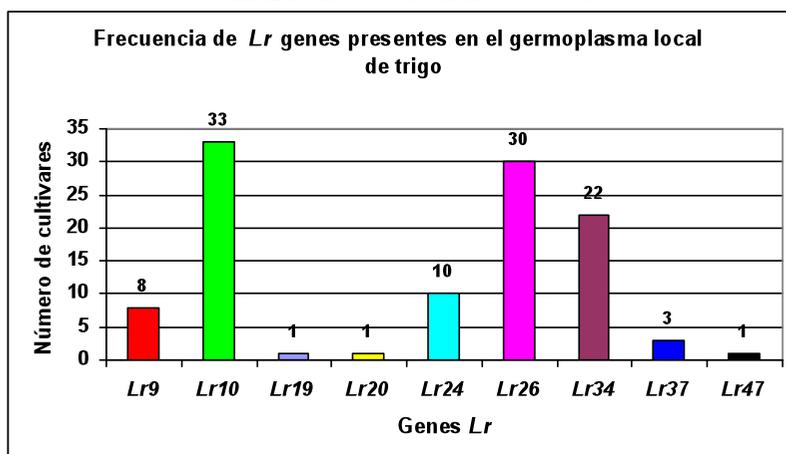
# Abstract

## Advances in biotechnology and its utilization in wheat breeding: Current situation in Argentina

There have been significant recent advances in the field of biotechnology especially in decoding the wheat genome. From the point of view of wheat improvement, two main products of decoded genome are: 1) the discovery of genes associated with characteristics of agronomic value, and 2) identification and use of superior variants of these genes (alleles) in the crop improvement programs. Considering that the genes are unique DNA sequences, within the genome, the molecular marker technology can rapidly diagnose a DNA sequence (in this case the gene) using a sample of genomic DNA of an individual. In the wheat breeding program of INTA, this tool has been used for indirect selection of agronomic traits of interest (adaptation/performance, quality, pathogen resistance etc.) in the segregating populations and characterization of advanced materials. Examples of materials developed by marker assisted selections in breeding are the cultivar BioINTA 2004 (carrying a leaf rust resistance gene *Lr47*) and advanced lines such as: R 11117 and 11171 carrying the resistance gene *Fhb1* for head scab. New challenges involve working with more complex characters such as tolerance to drought, extreme temperatures, salinity and grain yield, etc.

Caracterización de germoplasma argentino utilizando marcadores para genes *Lr* (diagnóstico).

**Genes evaluados: 15**  
**Cultivares evaluados: 98**

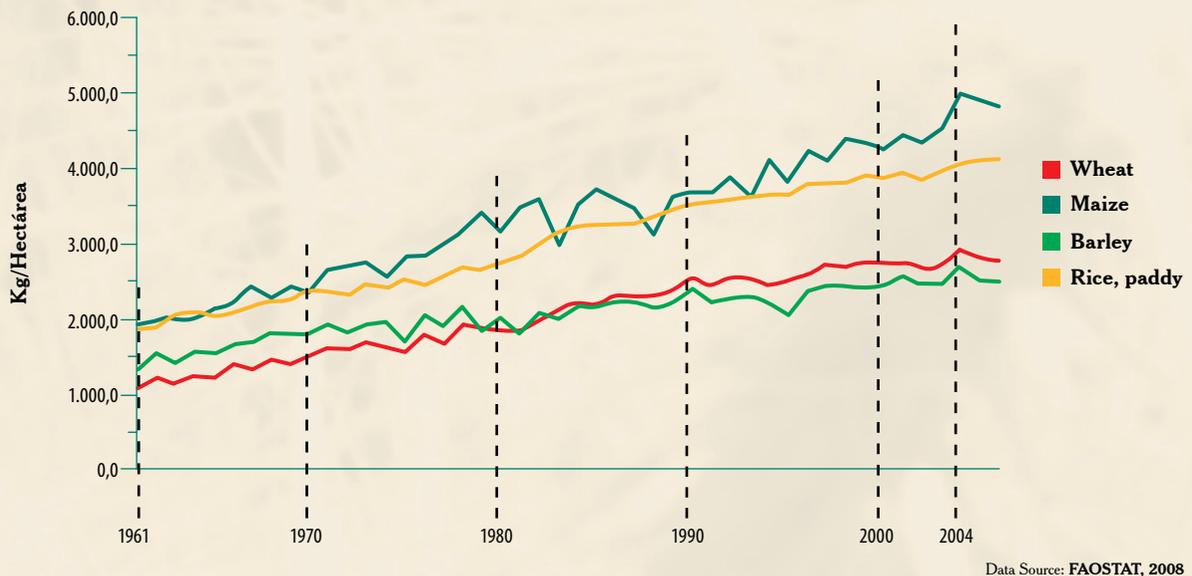


**Genes no detectados en germoplasma local: 6 (Lr21, Lr25, Lr28, Lr29, Lr35 y Lr51)**

## IMPORTANCIA DEL TRIGO EN UN CONTEXTO GLOBAL

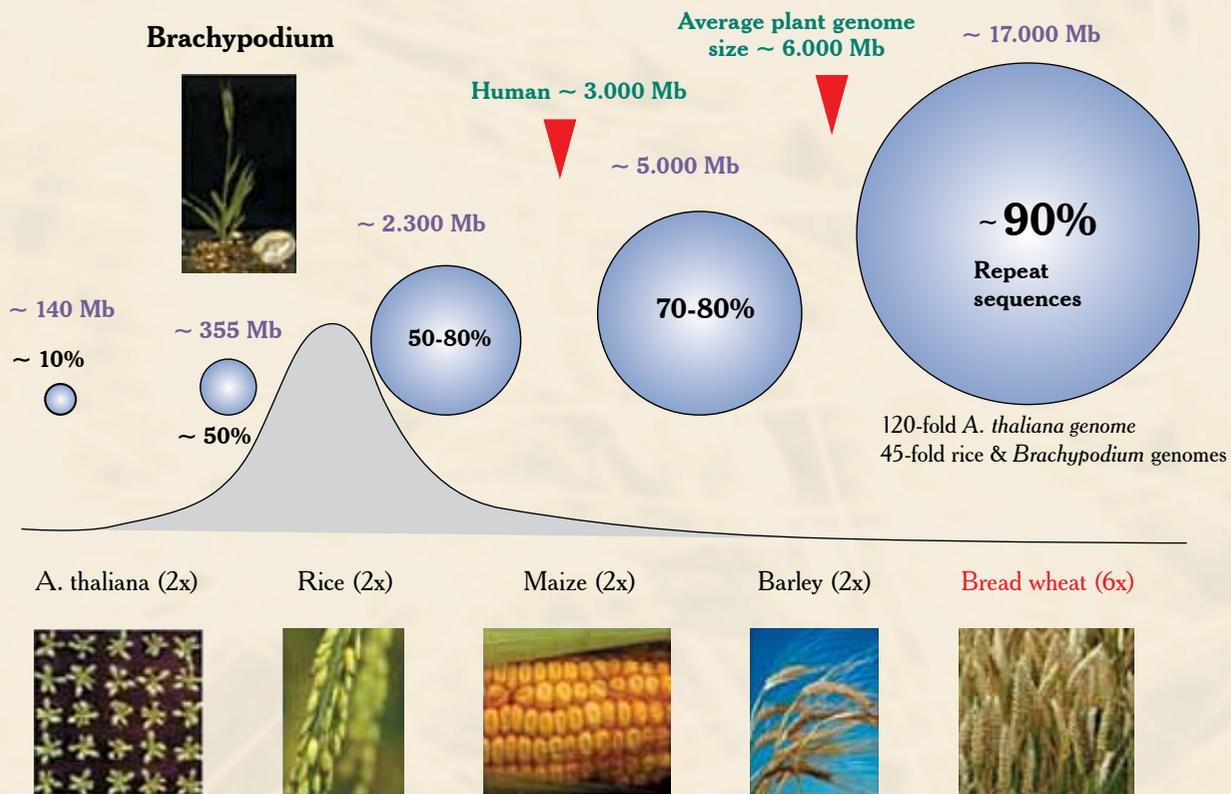
Como proveedor de un quinto del total de las calorías ingeridas diariamente por la población (FAOSTAT 2013), el trigo es un componente esencial de la alimentación humana. Por otro lado, desde mediados del siglo pasado la producción mundial de trigo ha mostrado incrementos sostenidos acordes al crecimiento vegetativo de la población de la mano del mejoramiento genético, sin embargo estudios recientes indicarían los primeros signos de estancamiento en los rendimientos de trigo a nivel global (Ray *et al.* 2012; Lin and Huybers 2012), Fig. 1., lo cual contrasta con demandas proyectadas de cultivos agrícolas (entre ellos el trigo) para el 2050 que casi duplican la producción actual (Godfray *et al.* 2010). Bajo este contexto el incremento y la estabilización de los rendimientos pasarían a ser máximas prioridades en la ciencia agrícola (Reynolds *et al.* 2009), esto se haría en un contexto de amenazas como cambio climático, competencia creciente de la producción de granos para bio-combustibles, limitada oportunidad de sumar nuevas tierras cultivables, etc. En este escenario, la posibilidad de secuenciar (y descifrar) el genoma de trigo pasa a ser central al objeto de acercar al mejoramiento genético todo el potencial de la variación genética natural sobre la base de la secuencia de genes de interés agronómico.

Fig. 1. Incremento de los rendimientos de trigo a nivel global



## SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE TRIGO

Históricamente la secuenciación del genoma de trigo ha sido percibida como un desafío para la ciencia debido a (1) su tamaño, 17 Gb (Fig. 2), lo cual representa 40 veces el genoma de arroz, 7 veces el genoma de maíz, 5-6 veces el genoma humano; (2) su complejidad, resultante de su naturaleza hexaploide ( $2n= 6x= 42$  genoma AABBDD) y (3) alto contenido de ADN repetitivo, estimado en un 80 % (Smith and Flavell 1975), lo cual dificulta el ensamblado de la secuencia.

Fig. 2. **El tamaño comparativo del genoma de trigo**

La primera consecuencia de esta situación es un rezago en el conocimiento del genoma de trigo respecto al genoma de otras plantas modelo que ya tienen el genoma secuenciado, como por ejemplo, *Arabidopsis* (The Arabidopsis Genome Initiative 2000), arroz (Goff *et al.* 2002), *Brachypodium* (The International Brachypodium Initiative 2010), etc. El conocimiento de genomas combinado con el desarrollo de disciplinas como la genómica comparativa y la genómica estructural han permitido avanzar en el estudio del genoma de trigo, particularmente en la identificación de genes ortólogos a partir de la anotación de genes de los genomas ya secuenciados.

El reciente advenimiento de nuevas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento (Mardis 2008) facilitó y aceleró enormemente el desarrollo de proyectos de secuenciación de genomas para un amplio espectro de organismos que incluye versiones preliminares del genoma de ancestros diploides del trigo pan como *Aegilops tauschii* ( $2n=2x=14$  genoma DD, Jia *et al.*, 2013) y *Triticum urartu* ( $2n=2x=14$  genoma AA, Ling *et al.*, 2013), así como una primera versión preliminar del propio genoma de trigo pan (Brenchley *et al.* 2012). Estos estudios proveen una primera estimación sobre contenido y orden de genes así como de la organización del genoma. Una ingeniosa idea aplicada a reducir la complejidad del genoma de trigo consiste en la purificación de cromosomas individuales mediante citometría de flujo (Dolezel *et al.* 2007; Doležel *et al.* 2012). Esta estrategia ha sido adoptada por la Iniciativa Internacional de Secuenciación del Genoma de Trigo (IWGSC por siglas en inglés, [www.wheatgenome.org](http://www.wheatgenome.org)) con los objetivos de (1) generar secuencias de cromosomas individuales (Vitulo *et al.* 2011; Berkman *et al.* 2011; Hernandez *et al.* 2012; Berkman *et al.* 2012; Tanaka *et al.* 2013), (2) generar mapas físicos de cromosomas individuales (Paux *et al.* 2008; Lucas *et al.* 2013; Raats *et al.* 2013), (3) el objetivo final de obtener una secuencia de alta calidad del genoma completo de trigo pan (Fig. 3).

En el marco de la IWGSC la Argentina a través de INTA y CONICET participa desde el 2011 del proyecto de estudiar la estructura y organización del cromosoma 4D a partir de una versión preliminar de su secuencia. Un primer análisis mostró la existencia de 1973 genes ortólogos (identificados a partir de la comparación de la secuencia del cromosoma 4D vs los genomas secuenciados de *Brachypodium*, arroz y sorgo, Fig. 4) y permitió estimar el número total de genes (ortólogos + específicos de trigo) en 5649.

Fig. 3. **Métodos rápidos y económicos para estudios del genoma del trigo**

**Faster and cheaper methods enable tackling the wheat genome**



1. Chromosome sorting

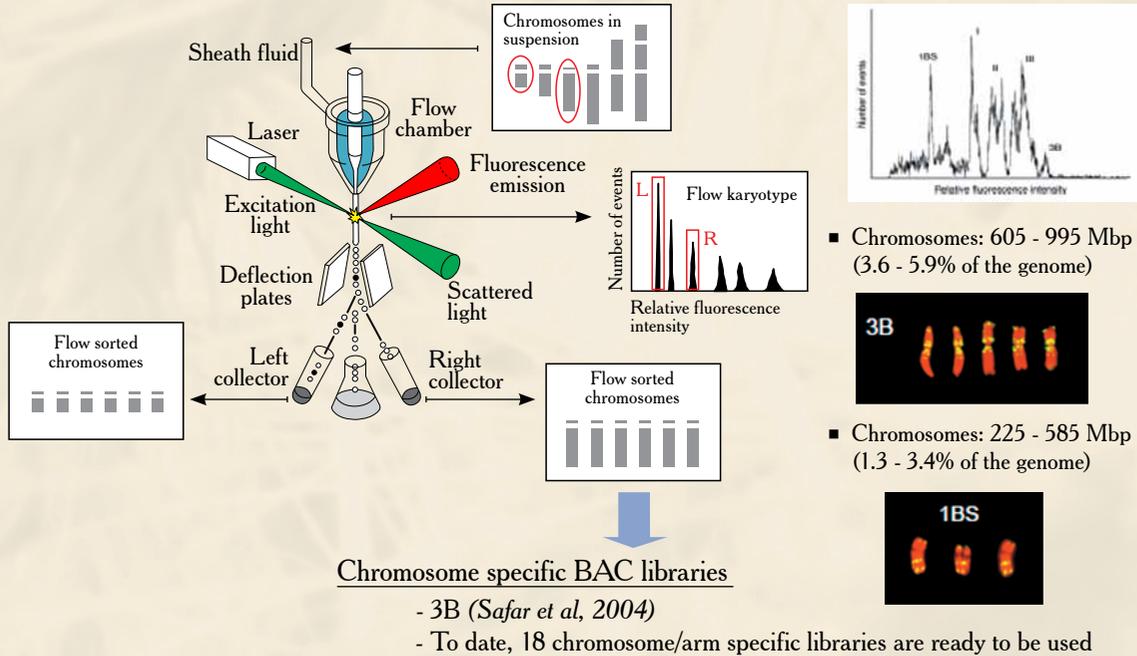
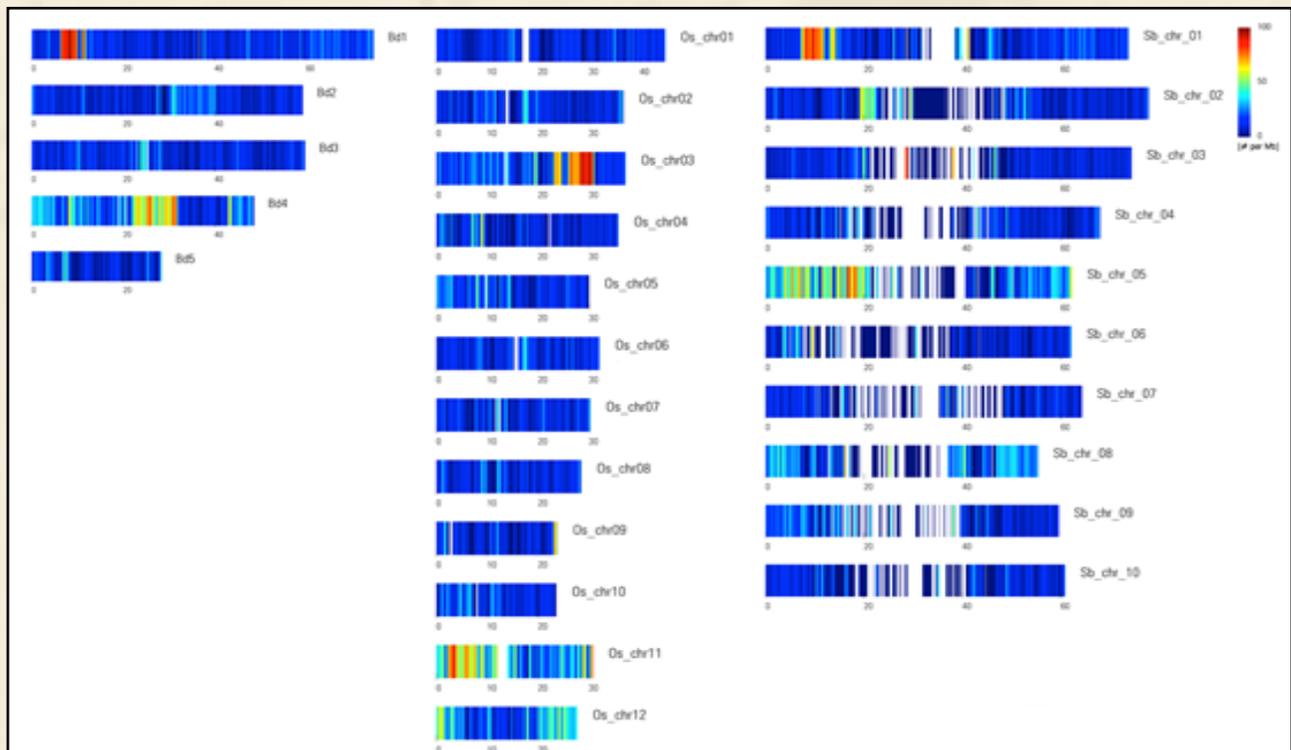


Fig.4. **Análisis comparativo de la secuencia del brazo cromosómico 4DS vs los genomas completos de *Brachypodium distachyon* (A) *Oryza sativa* -arroz- (B) y *Sorghum bicolor* (C). El mapa calórico ilustra la densidad de secuencias ortólogas (similares) a lo largo de cada cromosoma utilizando la escala de color azul (0 homología) - rojo (+80 homología).**



## USO DEL GENOMA SECUENCIADO DE TRIGO EN EL MEJORAMIENTO

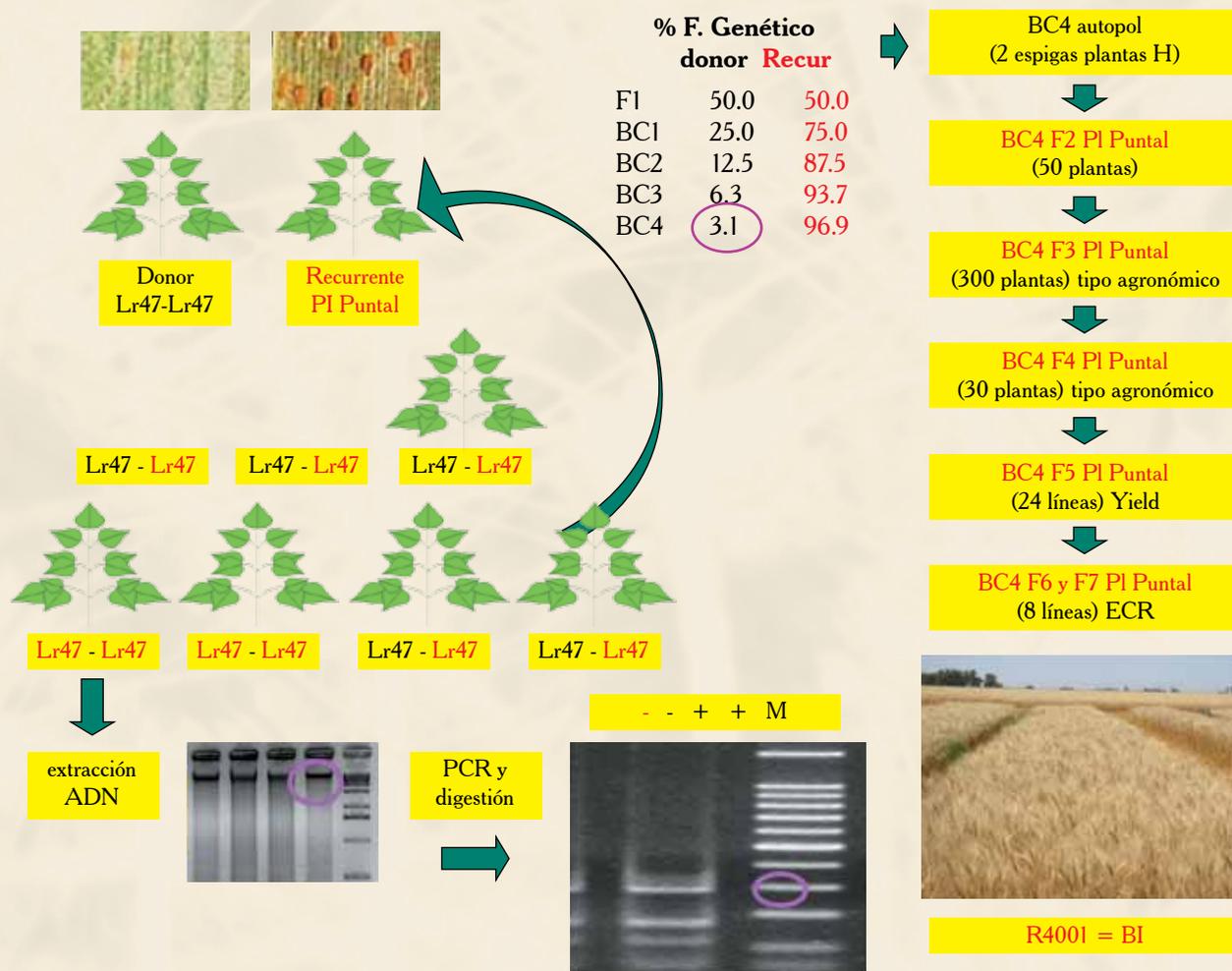
Desde el punto de vista del mejoramiento genético dos de los principales productos del genoma decodificado son: (1) el descubrimiento de genes asociados a características de valor agronómico (2) la identificación y uso de variantes superiores de estos genes (alelos) en programas de mejoramiento.

Por otro lado, la posibilidad de disponer gran cantidad de información sobre un genoma acelera el proceso de descubrimiento de genes. Por ejemplo, en el caso de trigo, Bagge *et al.* (2007) describen la existencia de 25 marcadores basados en 19 genes clonados hasta ese momento vinculados con resistencia a patógenos, calidad y adaptación. Cinco años después, en una revisión similar se informa la existencia de 63 marcadores basados en 30 genes clonados de trigo (Liu *et al.* 2012).

Partiendo del hecho de que los genes son secuencias únicas de ADN dentro del genoma, el marcador molecular surge de tecnologías capaces de diagnosticar rápidamente la presencia/ausencia de una secuencia de ADN (en este caso del gen) usando como muestra el ADN genómico (total) de un individuo. La utilización de marcadores moleculares en un programa de mejoramiento puede representar una ventaja importante, y es que la selección se independiza del fenotipo y el ambiente. Esta característica permite identificar rápidamente genotipos únicos en poblaciones segregantes e incorporar varios genes de interés en un fondo genético, proceso también denominado "piramidización" o "apilamiento" de genes.

En el Programa de Mejoramiento de Trigo del INTA se utiliza esta herramienta para selección indirecta de caracteres de interés agronómico (adaptación/rendimiento, calidad, resistencia a patógenos) en poblaciones segregantes y para caracterizar material avanzado y los bloques de cruzamiento. La información técnica so-

Fig. 5 Selección asistida por marcadores utilizado en la creación de la variedad Bointa 2004.

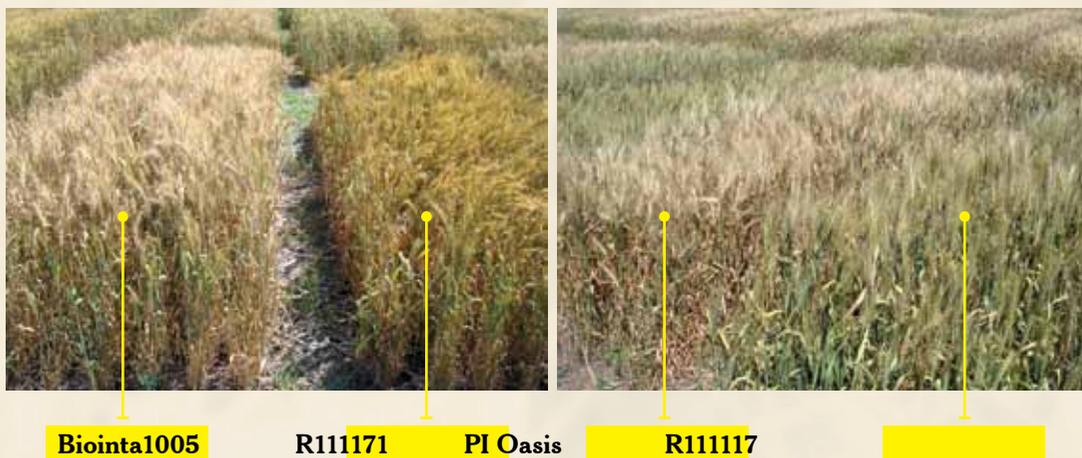
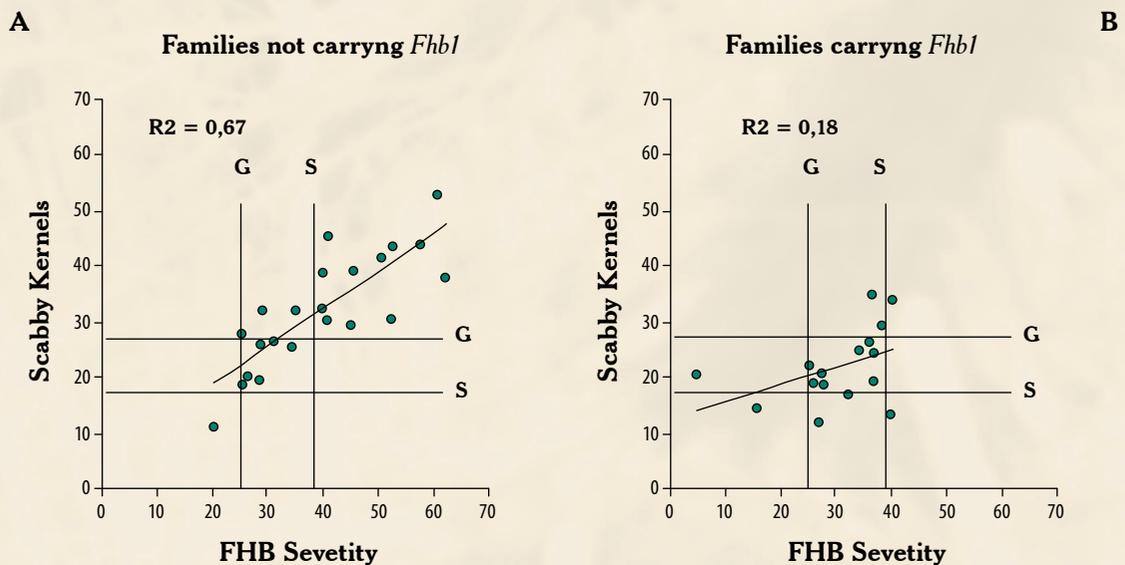


bre marcadores y protocolos utilizados se encuentra disponible en <http://inta.gov.ar/documentos/inta-marcos-juarez.-laboratorio-de-biotecnologia-en-trigo>. Ejemplos de materiales desarrollados por mejoramiento asistido con marcadores son el cultivar Biointa 2004, portador del gen Lr47 de resistencia a roya de la hoja combinado con Lr34 (Bainotti *et al.* 2009) (Figs. 5 y 6) y las líneas avanzadas R111117 y R111171 portadoras del gen Fhb1 de resistencia a fusariosis de la espiga (Bainotti *et al.* 2013) (Fig. 7).

Fig. 6 **Infección de roya de la hoja en un cultivar susceptible (hoja superior) y en BioINTA2004, portador del gen Lr47 (hoja inferior).** Foto cortesía Lucio Lombardo, INTA EEA Marcos Juárez.



Fig. 7 **Uso de marcadores moleculares para la selección de líneas resistentes a Fusariosis de la Espiga**



Los marcadores moleculares también han utilizado para caracterizar el germoplasma (cultivares) de Argentina en función de la resistencia genética a roya de la hoja (Vanzetti *et al.* 2011) (Cuadro 1), la base genética de respuesta a fotoperiodo, vernalización, precocidad intrínseca y ciclo de cultivo (Gomez *et al.* 2014), calidad del almidón (Vanzetti *et al.* 2009), la base genética de trigos blandos adaptados (Moiraghi *et al.* 2013), etc.

Nuevos desafíos: trabajar con caracteres más complejos como tolerancia a sequía, temperaturas extremas, salinidad, rendimiento, etc. En este sentido, en el laboratorio de biotecnología del INTA EEA Marcos Juárez está utilizando la selección asistida por marcadores moleculares para varios caracteres de estrés biótico y abiótico.

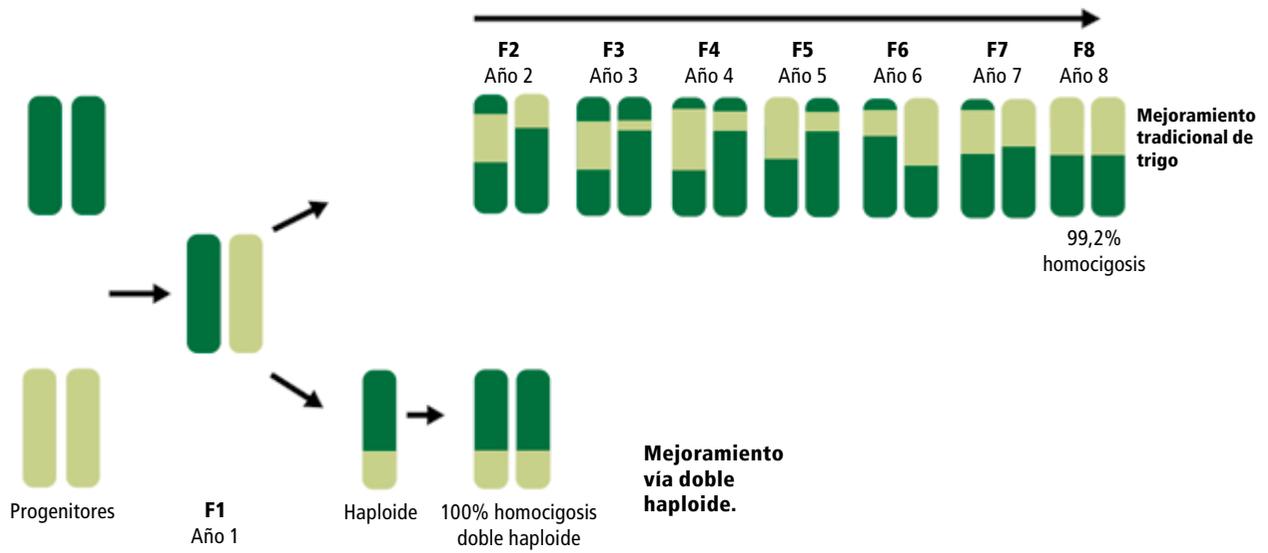
Cuadro 1. **Lista de marcadores moleculares disponibles para análisis de la roya de la hoja**

Gene	Name	Primer sequences (5' - 3')	Annealing temp. (°C)	Product size (bp)	Reference
Lr9	J13/1 J13/2	TCCTTTATTCCGCACGCCGG CCACATACCCCAAAGAGACG	55	1110	Schachermayr <i>et al.</i> 1994
Lr10	Lik 10D1 Lik 10D2	GAAGCCCTTCGTCTCATCTG TTGATTCATTGCAGATGAGATCACC	55	282	Schachermayr <i>et al.</i> 1997
Lr19	GbF GbR	CATCCTTGGGGACCTC CCAGCTCGCATACATCCA	60	130	Prinse <i>et al.</i> 2001
Lr20	STS63 8-L STS63 8-R	GCGGTGACTACACAGCGATGAAGCAATGAAA GCGGTGACTAGTCCAGTTGGTTGATGGAAT	60	542	Neu <i>et al.</i> 2002
Lr21	F R	CCAAAGAGCATCCATGGTGT CGCTTTTACCGAGATTGGTC	54	885	Huang <i>et al.</i> 2001
Lr24	J09-1 J09-2	TCTAGTCTGTACATGGGGGC TGGCATGAACTCCATACG	55	350	Schachermayr <i>et al.</i> 1995
Lr25	Lr25F20 Lr25F19	CCACCCAGAGTATACCAGAG CCACCCAGAGCTCATAGAA	50	1800	Procnier <i>et al.</i> 1995
Lr26	IB-267L IB-267R	GCAAGTAAGCAGCTTGATTTAGC AATGGATGTCCCGGTGAGTGG	55	267	Mago <i>et al.</i> 2002
Lr29	Lf29F24 Lf29R24	GTGACCTCAGGCAATGCACACAGT GTGACCTCAGAACCGATGTCCATC	55	900	Procnier <i>et al.</i> 1995
Lr34	caLV34F caLV34R	GTTGGTTAAGACTGGTGATGG TGCTTGCTATTGCTGAATAGT	55	150	Lagudah <i>et al.</i> 2006
Lr35	Lr35F Lr35R	AGAGAGAGTAGAAGAGCTGC AGAGAGAGAGCATCCACC	55	900	Gold <i>et al.</i> 1999
Lr37	URIC LN2	GGTCGCCCTGGCTTGACCT TGCAGCTACAGCAGTATGTACACAAAA	60	285	Helguera <i>et al.</i> 2003
Lr47	PS10L FS10L2 PCAPSR	TCTTCATGCCCGGTGCGGT GGGCAGGCGTTTATTCCAG CGTGAGACTCGCCGTTACCTTG	60	224	Helguera <i>et al.</i> 2000
Lr51	S30-13L AGA7-759R	GCATCAACAAGATATTCGTTATGACC TGGCTGCTCAGAAAAGTGGACC	52	422 + 397	Helguera <i>et al.</i> 2005

# Referencias

- Bagge M, Xia X, Lübberstedt T (2007) Functional markers in wheat. *Curr Opin Plant Biol* 10:211–6. doi: 10.1016/j.pbi.2007.01.009
- Bainotti C, Alberione E, Lewis S, *et al.* (2013) Fusarium Head Blight in Latin America. In: Alconada Magliano TM, Chulze SN (eds) *Fusarium Head Blight Lat. Am.* Springer Netherlands, Dordrecht, pp 231–240
- Bainotti C, Frascina J, Salines JH, *et al.* (2009) Registration of “BIOINTA 2004” Wheat. *J Plant Regist* 3:165. doi: 10.3198/jpr2008.12.0713crc
- Berkman PJ, Skarshewski A, Lorenc MT, *et al.* (2011) Sequencing and assembly of low copy and genic regions of isolated *Triticum aestivum* chromosome arm 7DS. *Plant Biotechnol J* 9:768–75. doi: 10.1111/j.1467-7652.2010.00587.x
- Berkman PJ, Skarshewski A, Manoli S, *et al.* (2012) Sequencing wheat chromosome arm 7BS delimits the 7BS/4AL translocation and reveals homoeologous gene conservation. *Theor Appl Genet* 124:423–32. doi: 10.1007/s00122-011-1717-2
- Brenchley R, Spannagl M, Pfeifer M, *et al.* (2012) Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. *Nature* 491:705–710. doi: 10.1038/nature11650
- Dolezel J, Kubaláková M, Paux E, *et al.* (2007) Chromosome-based genomics in the cereals. *Chromosome Res* 15:51–66. doi: 10.1007/s10577-006-1106-x
- Doležel J, Vrána J, Safář J, *et al.* (2012) Chromosomes in the flow to simplify genome analysis. *Funct Integr Genomics* 12:397–416. doi: 10.1007/s10142-012-0293-0
- Godfray HCJ, Beddington JR, Crute IR, *et al.* (2010) Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science* 327:812–8. doi: 10.1126/science.1185383
- Goff S a, Ricke D, Lan T-H, *et al.* (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science* 296:92–100. doi: 10.1126/science.1068275
- Gomez D, Vanzetti L, Helguera M, *et al.* (2014) Effect of *Vrn-1*, *Ppd-1* genes and earliness per se on heading time in Argentinean bread wheat cultivars. *F Crop Res* 158:73–81. doi: 10.1016/j.fcr.2013.12.023
- Hernandez P, Martis M, Dorado G, *et al.* (2012) Next-generation sequencing and syntenic integration of flow-sorted arms of wheat chromosome 4A exposes the chromosome structure and gene content. *Plant J* 69:377–86. doi: 10.1111/j.1365-3113.2011.04808.x
- Jia J, Zhao S, Kong X, *et al.* (2013) *Aegilops tauschii* draft genome sequence reveals a gene repertoire for wheat adaptation. *Nature* 496:91–5. doi: 10.1038/nature12028
- Lin M, Huybers P (2012) Reckoning wheat yield trends. *Environ Res Lett* 7:024016. doi: 10.1088/1748-9326/7/2/024016
- Ling H-Q, Zhao S, Liu D, *et al.* (2013) Draft genome of the wheat A-genome progenitor *Triticum urartu*. *Nature* 3–6. doi: 10.1038/nature11997
- Liu Y, He Z, Appels R, Xia X (2012) Functional markers in wheat: current status and future prospects. *Theor Appl Genet* 125:1–10. doi: 10.1007/s00122-012-1829-3
- Lucas SJ, Akpinar BA, Kantar M, *et al.* (2013) Physical mapping integrated with syntenic analysis to characterize the gene space of the long arm of wheat chromosome 1A. *PLoS One* 8:e59542. doi: 10.1371/journal.pone.0059542
- Mardis ER (2008) The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet* 24:133–41. doi: 10.1016/j.tig.2007.12.007
- Moiraghi M, Vanzetti L, Pflüger L, *et al.* (2013) Effect of high molecular weight glutenins and rye translocations on soft wheat flour cookie quality. *J Cereal Sci*. doi: 10.1016/j.jcs.2013.08.007
- Paux E, Sourdille P, Salse J, *et al.* (2008) A physical map of the 1-gigabase bread wheat chromosome 3B. *Science* 322:101–4. doi: 10.1126/science.1161847
- Raats D, Frenkel Z, Krugman T, *et al.* (2013) The physical map of wheat chromosome 1BS provides insights into its gene space organization and evolution. *Genome Biol* 14:R138. doi: 10.1186/gb-2013-14-12-r138
- Ray DK, Ramankutty N, Mueller ND, *et al.* (2012) Recent patterns of crop yield growth and stagnation. *Nat Commun* 3:1293. doi: 10.1038/ncomms2296
- Reynolds M, Foulkes MJ, Slafer GA, *et al.* (2009) Raising yield potential in wheat. *J Exp Bot* 60:1899–918. doi: 10.1093/jxb/erp016
- Smith DB, Flavell RB (1975) Characterisation of the wheat genome by renaturation kinetics. *Chromosoma* 50:223–242. doi: 10.1007/BF00283468
- Tanaka T, Kobayashi F, Joshi GP, *et al.* (2013) Next-Generation Survey Sequencing and the Molecular Organization of Wheat Chromosome 6B. *DNA Res* 1–12. doi: 10.1093/dnares/dst041
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796–815. doi: 10.1038/35048692
- The International Brachypodium Initiative (2010) Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* 463:763–8. doi: 10.1038/nature08747
- Vanzetti LS, Campos P, Demichelis M, *et al.* (2011) Identification of leaf rust resistance genes in selected Argentinean bread wheat cultivars by gene postulation and molecular markers. *Electron J Biotechnol*. doi: 10.2225/vol14-issue3-fulltext-14
- Vanzetti LS, Pflüger LA, Rodríguez-Quijano M, *et al.* (2009) Genetic variability for waxy genes in Argentinean bread wheat germplasm. *Electron J Biotechnol* 12:1–9. doi: 10.2225/vol12-issue1-fulltext-2
- Vitulo N, Albiero A, Forcato C, *et al.* (2011) First survey of the wheat chromosome 5A composition through a next generation sequencing approach. *PLoS One* 6:e26421. doi: 10.1371/journal.pone.0026421

Mejoramiento de trigo vía doble haploides - homocigosis instantánea en líneas de trigo.



Cultivo de microsporas aisladas.



# Haplodiploidização no melhoramento do trigo brasileiro

**PEDRO LUIZ SCHEEREN**

**SANDRA MARIA MANSUR SCGLIUSI**

Pesquisadores Embrapa Trigo, Rodovia BR 285, Km 294, CEP 99001-970  
Passo Fundo, RS.

Contacto: [pedro.scheeren@embrapa.br](mailto:pedro.scheeren@embrapa.br)



## Resumen

O uso da técnica de produção de linhagens duplo-haploides de trigo, pelo Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo, permitiu a redução do tempo, de oito para menos de três anos, para que seja cumprido um ciclo de melhoramento tradicional de trigo, desde os blocos de cruzamentos, a seleção de indivíduos superiores com as características desejadas incorporadas nas gerações F2 a F8, até a obtenção de uma linhagem. Durante o período de 40 anos de atividades da Embrapa Trigo, foram usadas três metodologias, a saber: inicialmente, foi empregada a cultura de anteras; nos anos 1990, passou a empregar a polinização trigoXmilho; e, atualmente, está sendo aperfeiçoado o método de cultura de micrósporos isolados.

A cultura de anteras foi usada nos anos 70 e 80 do século passado e foi efetiva para a produção da cultivar de trigo BR 43, sendo a primeira cultivar de trigo desenvolvida por esta metodologia nas Américas e a quarta no mundo. No entanto, a cultura de anteras se mostrou dependente do genótipo usado, que era a chamada “dependência genótipo específica” e, assim, funcionou somente para poucos cruzamentos. Em outras palavras, só havia a formação de estruturas embriogênicas quando determinados cultivares eram usadas como pais nos cruzamentos doadores de anteras. O uso de genitores responsivos nos cruzamentos revelou uma relação custo/benefício muito elevada para a resposta alcançada no seu uso.

A polinização trigoXmilho (gimnogênese) desenvolvida por Laurie & Bennett, 1986, e revisada por Moraes-Fernandes, *et al.*, 1991, que começou a ser empregada na Embrapa Trigo a partir de 1992, permitiu a criação de linhagens geneticamente uniformes, com a redução em até seis anos para a criação de linhagens e cultivares de trigo, em comparação ao método convencional, com uma geração por ano, durante o inverno. Nesta metodologia existe a necessidade da sincronia de

desenvolvimento do trigo e do milho, para que ambos cheguem à fase de antese ao mesmo tempo, permitindo a coleta de pólen do milho para a polinização do trigo (cruzamento intergenérico). No caso de ambientes frios, como no Sul do Brasil, existe a necessidade de cultivo do milho em estufa com ambiente de calor adaptado ao desenvolvimento do milho e à produção de pólen de milho de boa qualidade. No caso da gimnogênese, não ocorreu a “dependência genótipo específica”, que era comum na cultura de anteras. No entanto, algumas cultivares de milho revelaram melhor resposta do que outras quanto à qualidade do pólen produzido para a polinização do trigo e indução de fertilização. A partir da produção de linhagens duplo-haploides via gimnogênese foram produzidas as cultivares: BRS Canela, BRS Tangará, BRS 254, BRS 328 e BRS 331.

Em 2007, a Embrapa Trigo passou a testar e desenvolver o cultivo de micrósoros isolados. Nesta nova metodologia, as espigas de trigo são coletadas na fase de emborrachamento para posterior extração e cultivo do pólen. Contudo, neste método, a produção de embriões e a regeneração de plântulas também parece ser “genótipo específica”. Por outro lado, parece ser extremamente importante que as plantas doadoras tenham excelente desenvolvimento vegetativo e sanidade, para que as espigas coletadas possam ser consideradas como doadoras de micrósoros. Nesta fase inicial de validação desta metodologia já foram produzidas mais de 500 linhagens duplo-haploides de trigo.

## Abstract

### The utilization of double haploids in Brazilian wheat breeding

*The production of wheat double haploid lines in the Biotechnology Laboratory of EMBRAPA Wheat Center, Passo Fundo, has allowed reducing the wheat breeding cycle from 8 to less than 3 years. The traditional wheat breeding methodology starts from the crossing block to selection of superior and desirable individuals in segregating generations (F2 to F8) until the identification of an advanced line. During the last 40 years of research at EMBRAPA Wheat Center, three methodologies have been used to produce double haploid lines. Initially, the anther culture process was used in the 1990s; later, crosses between wheat and maize were employed and currently culture of isolated microspores is being improved. The anther culture was used during the 1970s and 80s and was successful in the development of wheat cultivar BR 43, the first variety developed by this methodology in the Americas and fourth variety in the world. However, anther culture showed to be genotype dependent and worked only with few crosses. In other words, embryogenic structures were formed only when certain cultivars were used as parents in the crosses as anther donors. The use of selected and responsive parents in the crosses showed a very high cost/benefit ratio for the results achieved by this process. On the other hand, wheat x maize pollination technique (gimnogenesis) developed by Laurie and Bennett, 1986, and modified by Moraes-Fernandes, et al. in 1991, is much more effective to produce double haploid lines. The EMBRAPA wheat breeding program started using this technique in 1992 to develop genetically uniform lines, with reduction of up to 6 years of breeding cycle compared with the conventional method, using one generation per year. The key aspect of this technology is the need to sync the development of wheat and maize plants, so that they reach anthesis at the same time. This allows the collection of maize pollen for pollination of emasculated wheat lines (inter-generic crossing). In the case of temperate environments, such as Southern Brazil, greenhouse conditions need to be adapted to grow maize during the winter season and produce good quality pollen. In the case of gimnogenesis, no genotype specific dependence was observed. However, some maize cultivars showed better response than others with regards to the quality of pollen produced and the induction of wheat fertilization. The production of double haploid lines via gimnogenesis has helped produce several new cultivars: BRS Canela, BRS Tangará, BRS 254, BRS 328 and BRS 331. In 2007, EMBRAPA started testing and developing the methodology involving culture of isolated microspores. In this new methodology, wheat spikes are collected in the boot stage to extract and culture the pollen grains. However, the production of embryos and the regeneration of plantlets also appear to be genotype specific in this method. It is extremely important that the donor plants have excellent growth and sanitation so that the spikes collected can be considered as donors of microspores. At this early stage of validation of this methodology, we have been able to produce more than 500 double haploid lines of wheat using microspore culture.*

Fig.1 **Regiones trigueras de Brasil.**

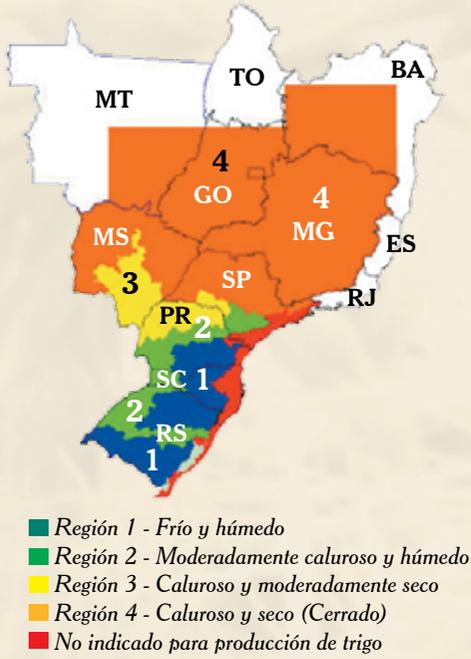


Fig.2 **Porcentaje de producción triguera de distintas regiones en Brasil.**

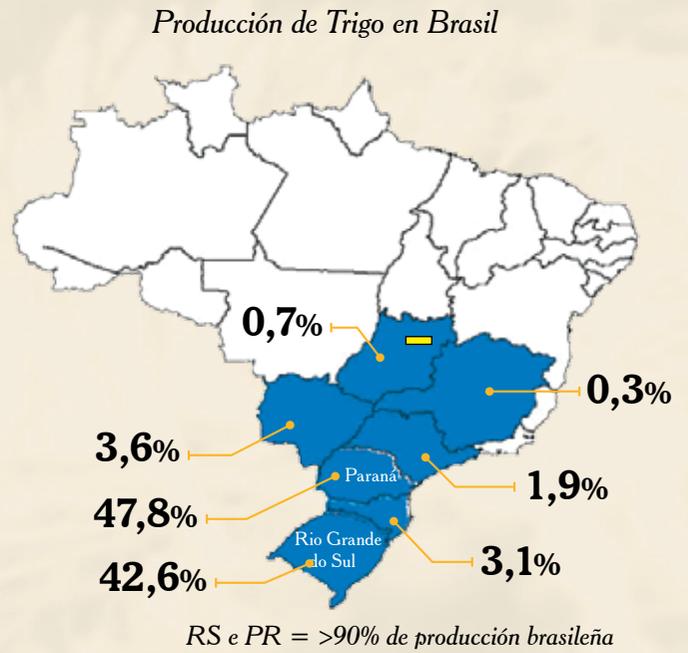
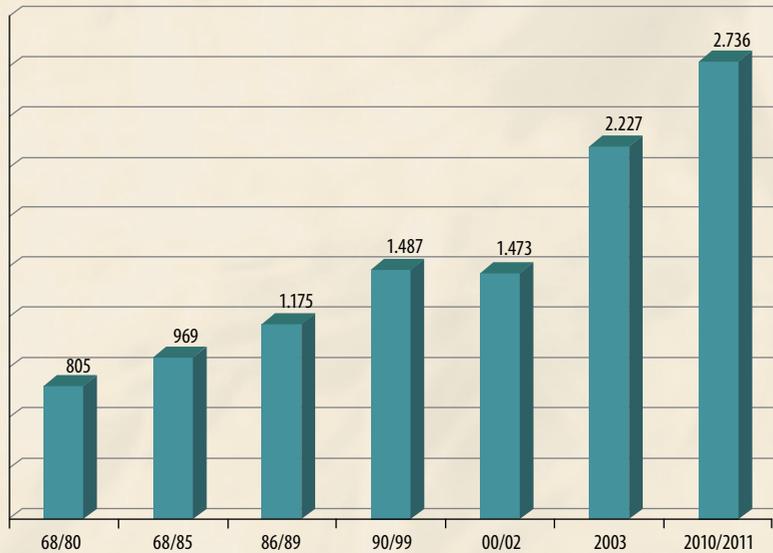


Fig.3 **Promedio de rendimiento de trigo en Brasil.**

*Rendimiento de trigo (kg/ha) - Brasil*



Cuadro 1. **Cultivares de trigo producidos por EMBRAPA.**

Sigla cultivar	Período de lançamento	Número de cultivares*
CNT	1975-1977	10
Trigo BR	1979-1991	43
Embrapa	1992-1996	11
BRS	1996-2013	48
<b>TOTAL*</b>		<b>112</b>

\*5 cultivares son duplo-haplóides

Cuadro 2. **Demandas del mercado Brasileiro en cuanto a la calidad de trigo y sus usos.**

<i>DEMANDAS DO MERCADO BRASILEIRO</i>		
USO	PERCENTAGEM	W
PANIFICAÇÃO (French-type)	46%	250
USO DOMÉSTICO	20%	180
MASSAS (PASTA)	14%	
BISCOITOS	8%	
PÃO INDUSTRIAL	5%	
OUTROS	7%	

Cuadro 3. **Tiempo necesario para la obtención de un nuevo cultivar de trigo**

Años	Convencional		Cultivo de anteras o Polinización Trigo x Maíz
	Con una generación por año	Con dos generaciones por año	
1 i,v	BC	BC	BC F1
2 i,v	F1	F2 F3 F4	NL
3 i,v	F2	F5	AP
4 i,v	F3	F6 F7 (NL)	EPI
5 i	F4	EPI	EPR
6 i	F5	EPR	ER
7 i	F6	ER	EVCU
8 i	F7 (NL)	EVCU	EVCU (NC)
9 i	EPI	EVCU (NC)	MULTIPLICACÃO LAVOURA
10 i	EPR	MULTIPLICACÃO	
11 i	ER	LAVOURA	
12 i	EVCU		
13 i	EVCU (NC)		
14 i	MULTIPLICACÃO		
15 i	LAVOURA		

I: Inverno (campo, Passo Fundo); v: verão (casa vegetação ou Brasília ou México); BC: Bloco de cruzamentos; NL: Nova linhagem; NC: Nova cultivar; AP: Avaliação Preliminar; EPI: Ensaio Preliminar Interno; EPR: Ensaio Preliminar em Rede; ER: ensaio Regional; EVCU: ensaio Valor de Cultivo e Uso.

## O MÉTODO SISTÊMICO

1. Uma nova metodologia, chamada de “Método Sistemico” foi estabelecida em 1978, visando acelerar o progresso genético em trigo, na Embrapa Trigo, paralelamente aos métodos convencionais de melhoramento de trigo.
2. O método procura a piramidização dos genes desejados. Combinações antagonistas são descartadas.
3. A aplicação de estresses artificiais e a inoculação de patógenos devem ser usados para a obtenção de soluções mais rápidas.
4. O método oferece sinergia com as diversas ferramentas genéticas disponíveis em uso ou que possam ser usadas. Por isso, as biotecnologias, como a seleção assistida, o uso de Proteínas de Alto Peso Molecular (HMWG), de duplo-haplóides ou de SSD podem ser usadas para melhorar e acelerar o método sistemico.
5. O método sistemico foi incrementado pela aplicação de estresses e seleção múltipla em F1's e F1s complexos (cruzamentos de F1/F1), em vez de começar a seleção em populações F2. Uma vez que uma planta F1 mostrou um caráter específico de interesse, foi utilizado em novas cruzamentos.
6. Nesta abordagem, a seleção é feita em um grande número de cruzamentos ou retrocruzamentos (4,000-5,000 cruzamentos ou combinações/ano), nas gerações segregantes iniciais (F1's).
7. Como um aspecto fundamental, a morfologia da planta foi melhorada para alta produtividade e capacidade de resistir a fortes ventos que ocorrem no clima úmido do sul do Brasil. O método sistemico foi incrementado pela aplicaçãoT

Fig. 4. **Uso del método sistemico de mejoramiento para seleccionar varias características de estrés usando mayor diversidad de la población.**

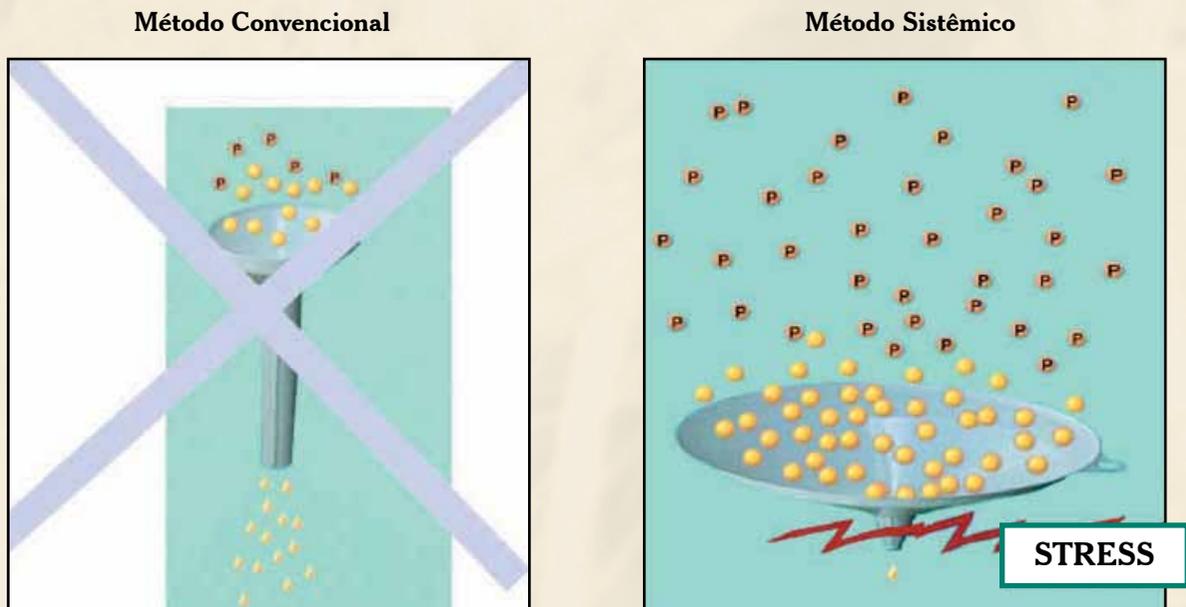


Fig. 5. **HAPLOIDIZAÇÃO = é a produção de plantas haplóides, *in vitro*, geralmente originadas de gametas, que acelera a obtenção da uniformidade genética, numa única geração**

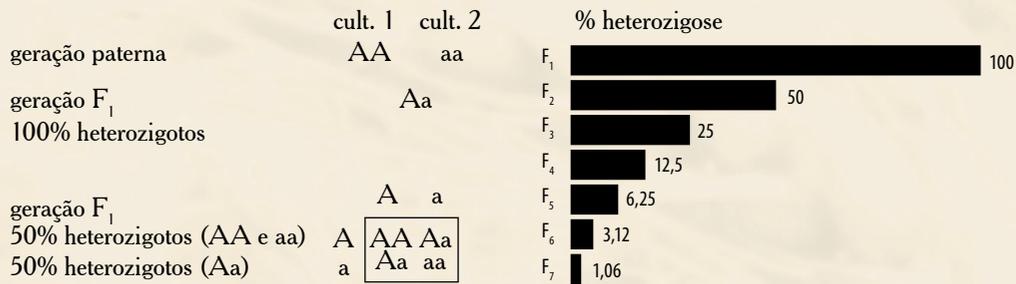


Fig. 3. Exemplicação da porcentagem de homozigose em plantas de trigo com sucessivas gerações. O cruzamento entre cultivares visa obter novas combinações genéticas que apresentem boas características. Como o trigo é um planta de autofecundação, seu sistema genético está adaptado 'a homozigose. O cruzamento produz heterozigose e são necessário sete gerações de autofecundação para que as novas combinações se tornem homozigotas. Exemplicando com apenas um par de genes, a figura mostra como a população heterozigota inicial pode voltar 'a homozigose.

Plantas obtidas via haploidização alcançam a homozigose numa única geração!

VENTAGENS = ganho de tempo, aumento na eficiência de seleção, economia de espaço nos campos experimentais e de custos, maior eficiência na obtenção de novas cultivares (eficiência no processo de renovação de cultivares).

PROBLEMA = geralmente, as plantas haplóides são obtidas a partir de células gametofíticas\*, sendo a maioria das plantas obtidas estéreis. Para se tornar DUPLO-HAPLÓIDE, se a duplicação não for espontânea, deverá ocorrer o tratamento com colchicina para a duplicação dos cromossomos.

Fig. 6. (a, b, c, d, e, f, g, h). **Cultivo de anteras (androgénesis) em trigo**

### 1- Cultivo de Anteras em trigo y cebada (Vía Androgénesis)

Processo de obtenção de plantas haplóides através do cultivo *in vitro* de anteras - grãos de pólen jovens

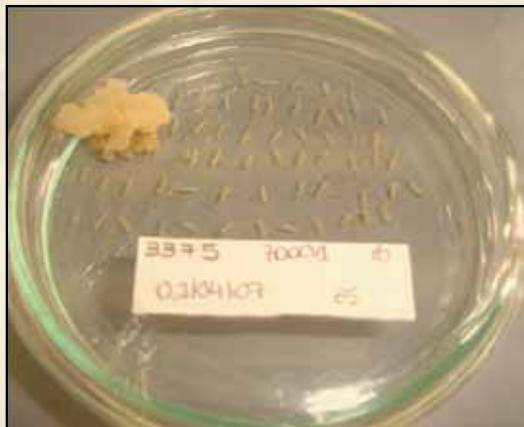




Fig. 7. (a, b). Evaluación de las líneas doble haploides en el campo



## DE 1980 A 1993, A CULTURA DE ANTERAS FOI REALIZADA EM 1.295 GENOTIPOS:

- 46% produziram estruturas embrionárias;
- 17% regeneraram = 1.182 linhas de duplo-haplóides;
- 14% destas duplicaram espontaneamente
- 152 linhas foram selecionadas para estudos preliminares;
- 8 foram incluídas em ensaios regional;
- 3 foram incluídas ensaios oficiais sul-brasileiras;
- 1 cultivar

## PRINCIPALES ETAPAS GIMNOGÊNESE EM TRIGO

- Emasculação das anteras do trigo;
- Polinização com milho, cujo genoma é eliminado nas primeiras divisões embrionárias;
- Injeção de 2, 4-D;
- Resgate e o cultivo *in vitro* dos embriões imaturos, entre 11 e 14 dias;
- Regeneração das plantas - tratamento colchicina

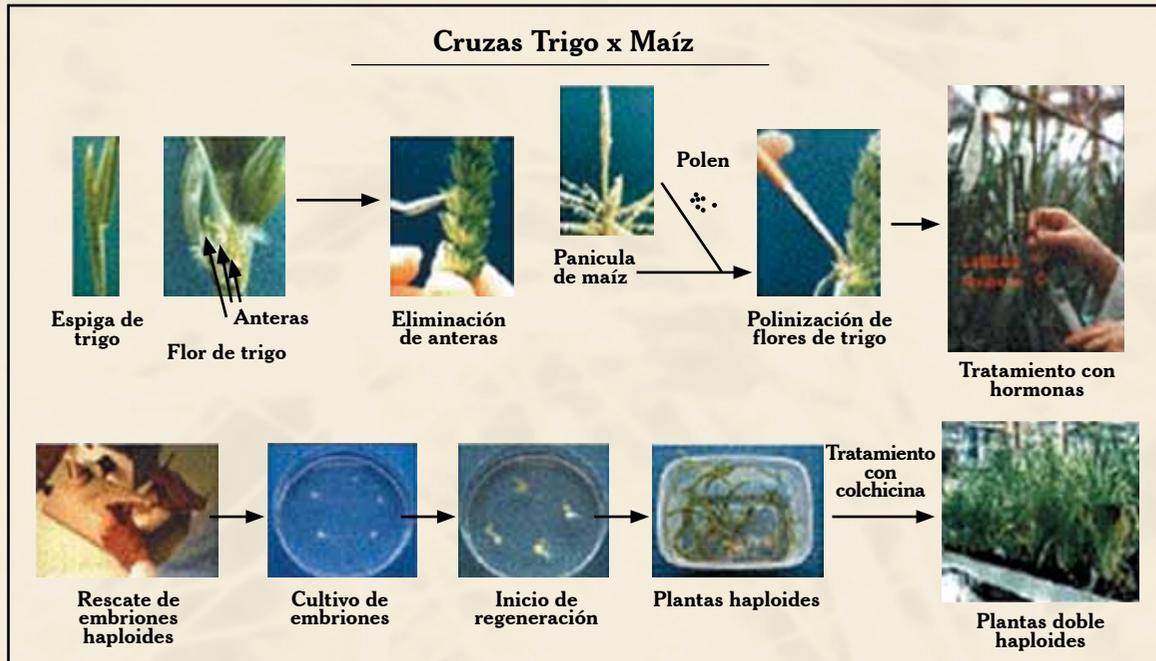
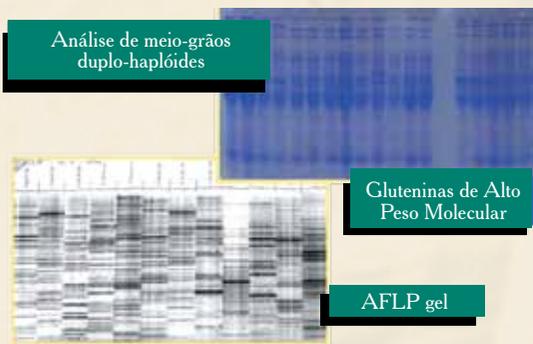
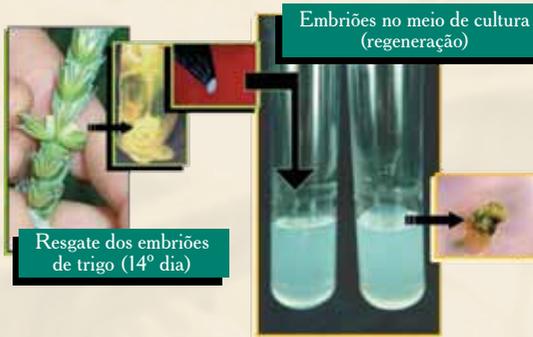


Fig. 8. **El proceso de gimnogenesis, cruza entre trigo y maíz para desarrollo de doble haploides (las etapas del proceso, de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo).**





Demais etapas do processo da Gimnogênese se assemelham com as etapas finais do processo obtido via Androgênese:

- Plantio para multiplicação em telados;
- Plantio para avaliações em campos experimentais;
- Seleção das novas linhagens de trigo.

#### Vantagens da Gimnogênese

Não é genotipo-dependente.

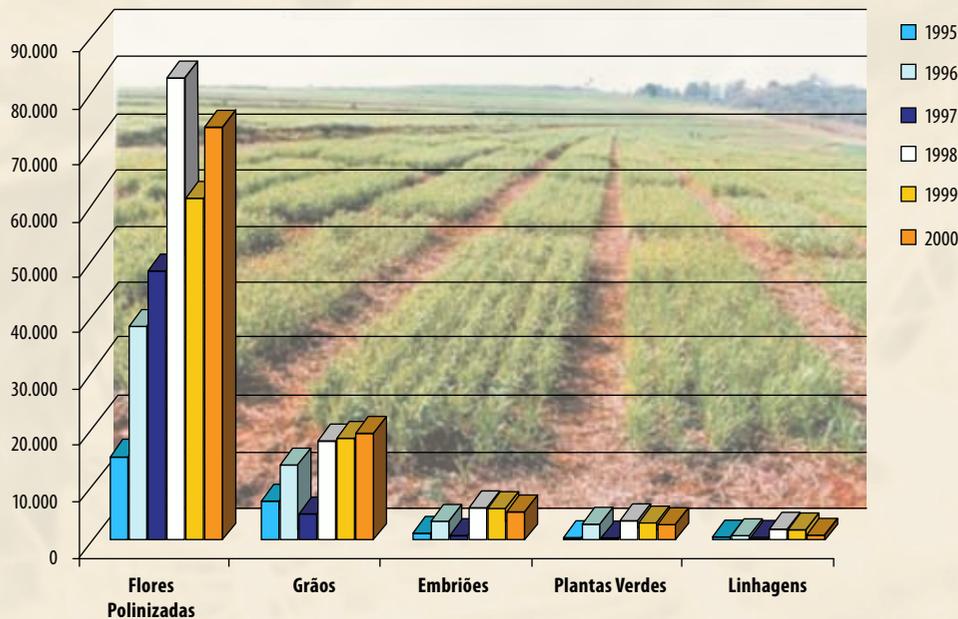
#### Desvantagens:

- Necessidade de se manter plantas de milho em locais apropriados (diferentes das condições usadas p/ trigo);
- Emasculação, polinização;
- Aplicação de 2,4 D
- Baixa porcentagem de duplicação espontânea (necessidade do uso de colchicina);
- Menor vigor das plantas (impacto da tentativa de introgridir um genoma estranho ao genoma do trigo).

Cuadro 4. Duplo-Haplóides produzidos vía gimnogênese de 1995 até 2000 na Embrapa Trigo

Período	Genótipos	Espigas Emasculadas	Flores Polinizadas	Grãos (G)	Embriões (E)	E / G %	Plantas Verdes (PV)	PV / E %	Linhagens DH
<b>1995</b>									
Verão	73	180	4.576	1.603	212	13,22	125	58,96	71
Inverno	172	353	10.491	5.755	1.212	21,06	432	35,64	272
<b>TOTAL</b>	<b>245</b>	<b>533</b>	<b>15.067</b>	<b>7.358</b>	<b>1.424</b>	<b>19,35</b>	<b>557</b>	<b>39,11</b>	<b>343</b>
<b>1996</b>									
Verão	176	461	11.795	1.950	280	14,23	139	49,64	0
Inverno	415	933	26.344	11.450	3.433	29,99	2.956	86,1	966
<b>TOTAL</b>	<b>591</b>	<b>1.394</b>	<b>38.139</b>	<b>13.370</b>	<b>3.713</b>	<b>27,68</b>	<b>3.095</b>	<b>83,35</b>	<b>966</b>
<b>1997</b>									
Verão	108	655	15.409	1.822	248	13,61	144	58,06	132
Inverno	507	1.336	32.785	3.218	767	23,83	427	55,67	360
<b>TOTAL</b>	<b>615</b>	<b>1.991</b>	<b>48.194</b>	<b>5.040</b>	<b>1.015</b>	<b>20,14</b>	<b>571</b>	<b>56,26</b>	<b>492</b>
<b>1998</b>									
Verão	182	1.068	25.700	1.622	290	17,88	105	36,21	93
Inverno	592	1.961	56.750	16.224	5.736	35,35	3.523	61,42	2.109
<b>TOTAL</b>	<b>774</b>	<b>3.029</b>	<b>82.450</b>	<b>17.846</b>	<b>6.026</b>	<b>33,77</b>	<b>3.628</b>	<b>60,2</b>	<b>2.202</b>
<b>1999</b>									
Verão	40	161	4.264	180	21	11,67	6	28,57	4
Inverno	590	1.954	56.710	17.957	6.198	34,51	3.307	53,35	2.300
<b>TOTAL</b>	<b>630</b>	<b>2.115</b>	<b>60.974</b>	<b>18.137</b>	<b>6.219</b>	<b>34,29</b>	<b>3.313</b>	<b>53,27</b>	<b>2.304</b>
<b>2000</b>									
Verão	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inverno	-	2.437	73.909	19.070	5.443	28,54	2.962	54,42	1.494
<b>TOTAL Gral</b>	<b>2.855</b>	<b>11.499</b>	<b>318.733</b>	<b>80.821</b>	<b>18.425,54</b>	<b>-</b>	<b>14.126</b>	<b>-</b>	<b>7.801</b>

Fig. 9. La tasa de éxito en el desarrollo de las líneas avanzadas usando gimnogénesis



## CULTURA DE MICRÓSPOROS ISOLADOS

(Isolated Microspore Culture - IMC)

- Método também baseado na **Androgénesis** = cultivo de células jovens de micrósporos em meio líquido.
- Alta concentração de células purificadas - livres de interferência materna (paredes da antera, conectivo, etc).
- Muito semelhante ao cultivo de anteras (usa-se a mesma célula para dar origem a nova planta)!

### Ventagens

- Trigo x milho = não necessita emasculador/polinizar.
- Não se aplica 2,4 D.
- Plantas com maior vigor e maior frequência de duplicação espontânea.

## CULTURA DE MICRÓSPOROS ISOLADOS

- Denominador comum = célula uninucleada (micrósporo).
- Ausência dos efeitos maternos (removidos das anteras).
- Ausência de tecidos que envolvem os micrósporos (tapete, filete, epiderme,...) Possuem pouco efeito morfogênico, mas podem ter efeito inibitório sobre as células-alvo.
- Competição por espaço e nutrientes.
- Ação dos diferentes componentes dos meios de cultura é direta sobre as células.
- Maior número de plantas verdes. Maior número de diplóides espontâneos. Menor efeito genotipo de pendente.
- \*Desnecessário manter plantas de milho e conseguir sincronização com as flores de trigo.
- \*Não há necessidade do uso de 2,4 D. Menor uso de colchicina.





A cultura de micrósporos ainda está em fase de desenvolvimento na Embrapa Trigo, tendo sido obtidos os primeiros resultados positivos com a produção de mais de 400 linhagens duplo-haplóides em 2012.

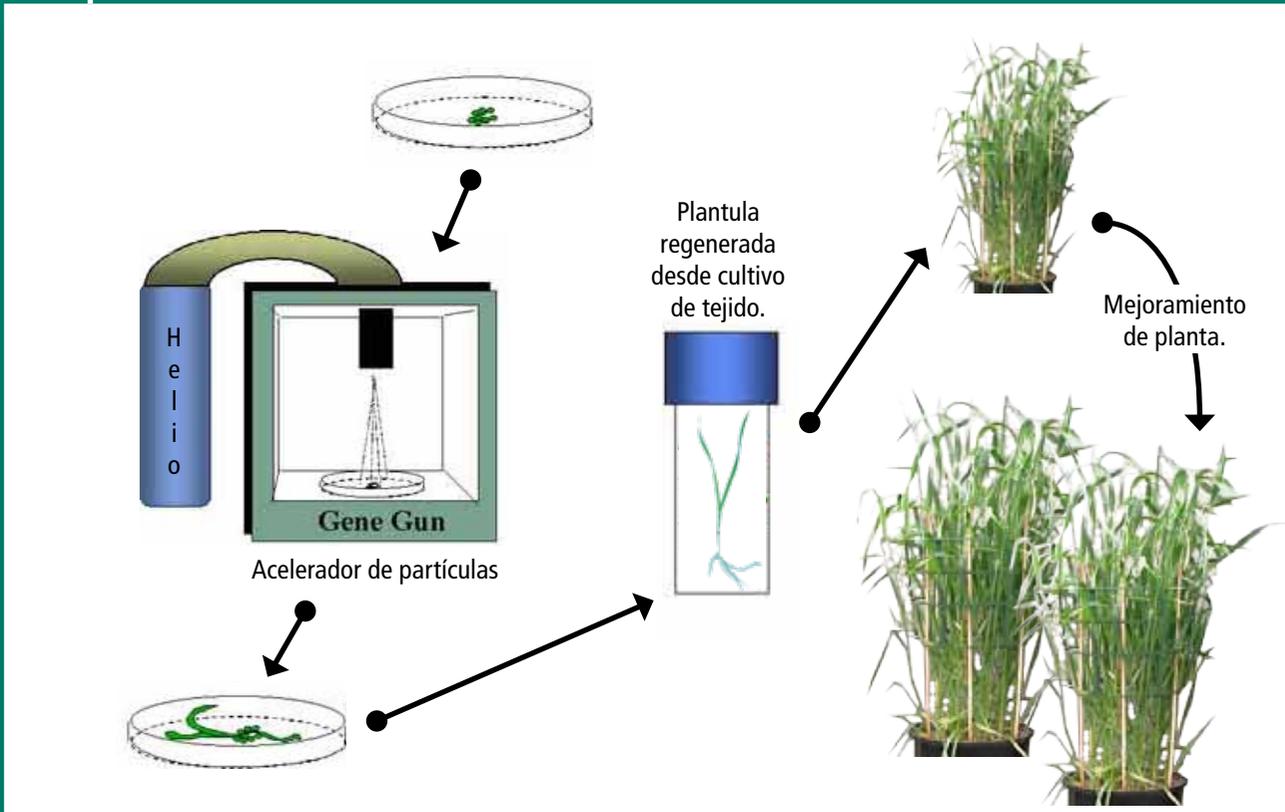
## CULTIVARES EMBRAPA OBTIDAS POR GIMNOGÊNESE (Cruzamento Intergenérico Trigo x Milho)

- BRS CANELA
- BRS TANGARÁ (retrocruzamento)
- BRS 254 (retrocruzamento)
- BRS 328
- BRS 331

### Lecciones aprendidas

1. Gimnogênese (trigo X milho) foi ajustada e foi eficiente para gerar linhas duplo-haplóides em condições brasileiras.
2. Houve um aumento da produção de novas linhas de duplo-haplóides durante os anos. O resultado incentivou os melhoristas a aumentar a utilização uso desta técnica.
3. Androgênese é mais dependente do genótipo do que a gimnogênese.
4. A pré-seleção e as condições de crescimento das plantas doadoras foram muito importantes para alcançar os resultados obtidos na Embrapa.
5. No ano de 2000, o número de novas linhas duplo-haplóides diminuiu, principalmente porque ocorreram alguns problemas com as câmaras de crescimento e com a aclimação das plântulas de trigo.
6. Haplodiploidização pode trazer fortes mudanças para os programas de melhoramento de trigo, especialmente em relação à seleção, ao tempo e à eficiência.
7. Pesquisadores e professores estão aumentando o uso de linhas duplo-haplóides em estudos genéticos e no desenvolvimento de marcadores moleculares.
8. A análise de gluteninas de alto peso molecular (HMWG) mostrou grande variabilidade e foi um método eficiente de pré-seleção do grão obtido de duplo-haplóides.
9. Para o trabalho futuro, a pré-seleção dos cruzamentos, das plantas doadoras e a seleção visual de grãos dos candidatos, para plantas doadoras de embrião, são considerados muito importantes na melhoria da eficiência da produção de duplo-haplóides “úteis” nos programas de melhoramento de trigo.
10. No futuro, o cultivo de micrósporos poderá ser muito importante na melhoria da eficiência da produção de duplo-haplóides “úteis” nos programas de melhoramento de trigo.

Proceso de transformación en trigo.



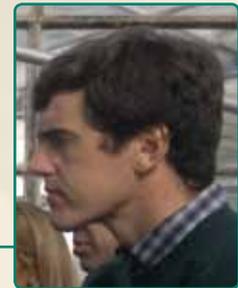
Multiplicación de plantas transformadas bajo condiciones controladas.



# Trigo transgénico y nuevas metodologías para introducir atributos de interés

**GERÓNIMO WATSON**

INDEAR/BIOCERES, Ocampo, Rosario, Santa Fe, Argentina,  
Contacto: [geronimo.watson@indear.com](mailto:geronimo.watson@indear.com)



## Resumen

Durante el 2013 se cumplieron 18 años de comercialización de cultivos transgénicos, y estos, hoy ocupan más de 170 millones de hectáreas a nivel mundial. Este significativo período de tiempo no solo demuestra el grado de adopción por parte de los productores agropecuarios sino también la seguridad de la tecnología. La contribución de los cultivos transgénicos está claramente demostrada tanto a nivel ambiental como en términos de seguridad alimentaria. Pero los cultivos transgénicos no son una panacea, son una importante herramienta que debe utilizarse con una serie de buenas prácticas agropecuarias del mismo modo que los cultivos convencionales. La primera generación de eventos transgénicos estuvo completamente dirigida a atributos cualitativos como la resistencia a herbicidas e insectos. La segunda generación de eventos, que hoy todavía no están en el mercado, apunta a atributos cuantitativos que por definición están determinados por numerosos genes, tienen distribución continua y una alta interacción con el ambiente. Algunos ejemplos son la tolerancia a frío, el aumento de rendimiento y la mejora de la calidad forrajera. Las posibilidades de la transgénesis actual no se reduce a intentar mejorar atributos cuantitativos sino que también permiten acumular eventos en determinados locus facilitando notablemente las tareas de mejoramiento. Es decir que hoy ya es posible acumular eventos en sitios específicos del genoma, lo que además, disminuye notablemente los costos de caracterización molecular. Desde hace varios años Bioceres está embarcada en el desarrollo de trigo transgénico para la tolerancia a estrés abiótico. Con varios años de ensayos

a campo y materiales convertidos en estado avanzado, el trigo HB4 puede convertirse en el primer trigo transgénico del mundo. Este desarrollo es posible gracias a la estrecha colaboración público-privada que se inició con el descubrimiento del gen HaHB4 en el laboratorio de la Dra. Raquel Chan del IAL-CONICET y se complementó con las etapas de desarrollo a cargo de Bioceres.

## Abstract

### Transgenic wheat and new methodologies to introduce desirable traits

*Genetically modified (GM) or transgenic crops have been commercialized for 18 years and they occupy more than 170 million hectares worldwide. This period of time has not only been significant to demonstrate the degree of their adoption by the farmers, but also to confirm the safety of this technology. The contribution of GM crops has clearly been demonstrated both, environmentally and in terms of food security. However, GM crops are not a panacea but an important tool to be used with a number of good agricultural practices, in the same manner as for the conventional crops. The first generation of transgenic events was fully aimed at qualitative attributes such as resistance to herbicides and or insects. The second generation of transgenic events which are not yet in the market include quantitative attributes determined by many genes and with a wide distribution and higher interaction with the environment. Examples of such attributes are: cold tolerance, increased yield and improved grain or forage quality. The current transgenesis is not limited to improving the quantitative characters, but also allows the various events to be accumulated at a certain locus, thereby facilitating the crop improvement programs. In other words, it is possible at present to accumulate events at specific sites of the genome, which also reduces the costs of molecular characterization significantly. Several years ago, BIOCERES embarked on the development of transgenic wheat for tolerance to abiotic stresses. Several years of field trials conducted with the advanced lines carrying HB4 may allow it to become the world's first transgenic wheat. This development has been possible through a close public/private collaboration that began with the discovery of HaHb 4 gene by Dr. Raquel Chan of IAL-CONICET and supplemented by BIOCERES at different stages of development.*

Transgénesis puede ser una herramienta para lograr resistencia a la helada en estado reproductivo.

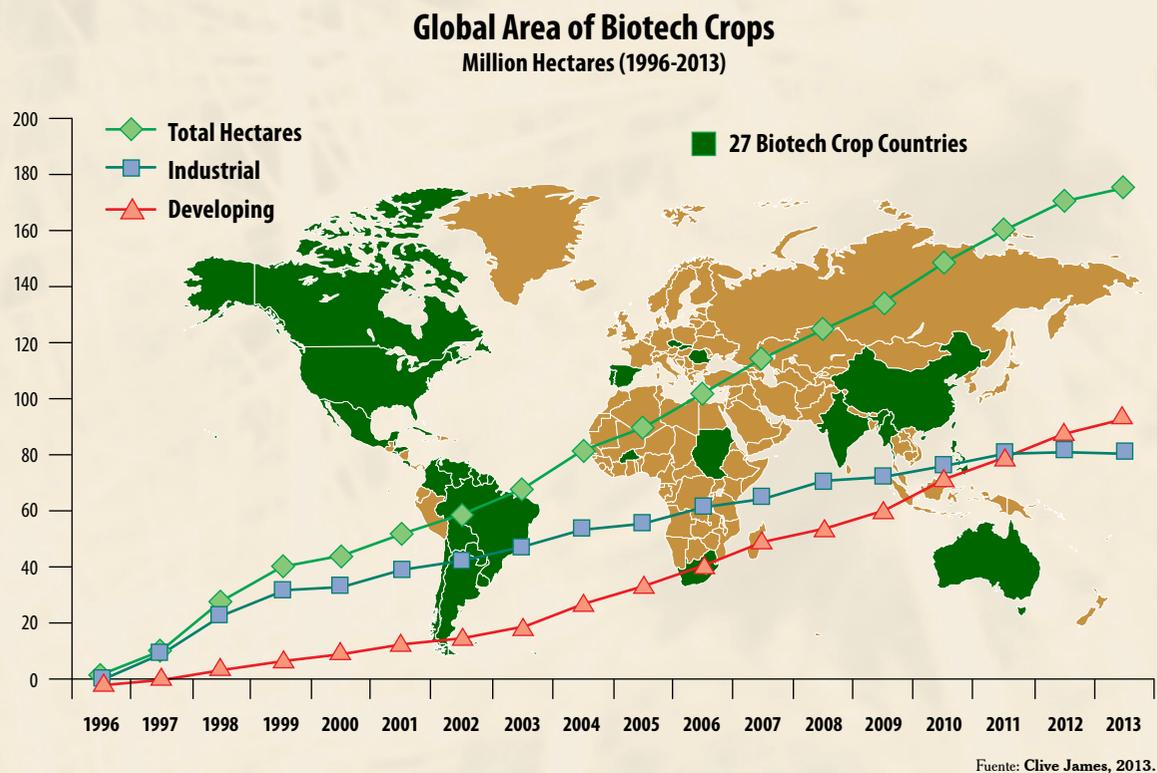


## INTRODUCCIÓN

Brevemente se tratará de reflejar dos visiones que son el ayer y el mañana de la transgénesis, concentrando principalmente sobre qué se está haciendo en aquellos denominados como transgénicos de segunda generación.

Los transgénicos de primera generación en soja, maíz y otros cultivos son aquellos que expresan caracteres cualitativos, como resistencias a herbicidas e insectos, han sido muy exitosos a nivel mundial (Fig. 1). Estos ya superaron las 175 millones de hectáreas sembradas anualmente. Desde hace dos años, los países en vías de desarrollo siembran más superficies de cultivos transgénicos que los países desarrollados. En base a datos presentados en esta gráfica, en los últimos 10 años, se ha consumido varios trillones de raciones de alimentos, elaborados a partir de cultivos transgénicos y a la fecha no existe ningún caso de daño corroborado a la salud humana. Por supuesto, ningún trigo transgénico fue desregulado durante este periodo en el mundo.

Fig. 1. **Adopción mundial de los cultivos transgénicos.**



Es la visión hacia el pasado de los transgénicos, totalmente validados desde el punto de vista tecnológico de la adopción y de la inocuidad. No quiere decir que los transgénicos en general sean seguros, sino que los que fueron desregulados si son seguros y que el sistema regulatorio ha funcionado como queda claramente demostrado.

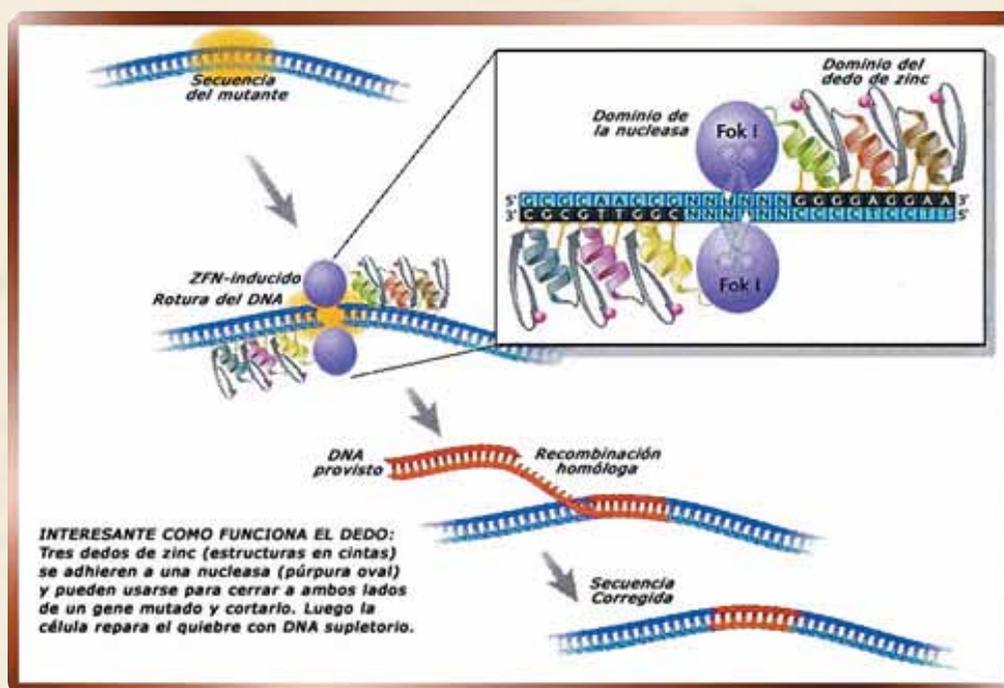
Lo segundo, es mirar hacia el mañana de la transgénesis, por lo menos desde un punto de vista personal, que son las tecnologías emergentes y las posibilidades que nos van a dar.

## LA VISIÓN FUTURA DE LA TRANSGÉNESIS

Hoy la mayor parte del proceso de la transgénesis o de la inversión en tiempo está en lo que se denomina la selección de los eventos. Cualquier evento o tecnología que se pretenda desarrollar, arranca con un número de eventos que puede variar entre 50 a 500 o más por construcción, por un proceso muy parecido al mejoramiento convencional; se termina seleccionando un evento y el evento es lo que finalmente se termina desregulando.

Actualmente existe la tecnología disponible para poder hacer esto de una manera mucho más dirigida, utilizando, por ejemplo, nucleasas con dedos de cinc (ZFN) (Fig. 2), los TALENs o GRONs. Sin entrar en detalles técnicos, lo que se puede hacer es dirigir e insertar un transgén en algún lugar ya caracterizado de genoma de cualquier especie. Esto incluso esta puesto a punto en trigo y por supuesto en muchas otras especies. No existe ningún evento desregulado con ese tipo de tecnologías, pero seguramente en la próxima década la mayoría de los eventos desregulados serán logrados a partir de utilizar este tipo de tecnologías.

Fig. 2. **Utilización de los dedos de cinc para introducir ADN de interés en sitio específico (diagramación)**



Fuente: <http://www.creces.cl/new/index.asp?imat=%20%3E%2061&tc=3&nc=5&art=2003>

Desde el punto de vista del mejoramiento, lo más interesante es conocer el valor de esta tecnología. Algo de esto ya está pasando en el maíz, donde se está trabajando, hasta el momento, con 4 transgenes. Esto ya empieza a generar ciertas complicaciones desde el punto de vista del mejoramiento porque llevar 4 diferentes transgenes, que llevan 4 diferentes locus, necesitan más tiempo para ser estabilizados. Con esta tecnología, una vez que se identifica un locus adecuado para la expresión de ese tipo de transgén, se puede insertar en ese mismo locus en los demás transgenes y generar una herencia mendeliana a partir de muchos genes.

Esto tiene mucho valor, no solo desde el punto de vista del mejoramiento y de la facilidad para desarrollar variedades a partir de tener todos los genes de interés en un mismo lugar, sino también desde el punto de vista de la caracterización molecular. Es esta la parte que encarece la tecnología y lleva más tiempo para la desregulación. Cuando se inicia de un evento que ya está caracterizado claramente, se conoce el ambiente genómico alrededor de este evento y después se inserta nuevos eventos en la misma región, se facilita mucho el proceso de desregulación.

## DESARROLLO DE LOS TRANSGÉNICOS DE SEGUNDA GENERACIÓN

Los transgénicos de la segunda generación son aquellos que apuntan a mejorar características cuantitativas, probablemente más difíciles de abordar tanto desde el punto de vista de la transgénesis como del mejoramiento convencional. Estas características incluyen rendimiento, tolerancias a estrés bióticos o abióticos, por ejemplo, la sequía.

Lograr altos rendimientos en condiciones de sequía es un desafío. Es muy importante tener en cuenta el problema y describir el escenario, porque sequía puede decir muchas cosas. Claramente las fotos de la Fig. 3 pueden ser tres escenarios de sequía; una que se puede determinar en un desierto o la que sufre un productor agropecuario en un lote que puede revertirse después de una lluvia, o lo que para un biólogo molecular puede ser una condición en una maceta, que es aquella condición donde su planta transgénica sobrevive y la planta control muere.

Fig. 3. **Tres escenarios de sequía.**

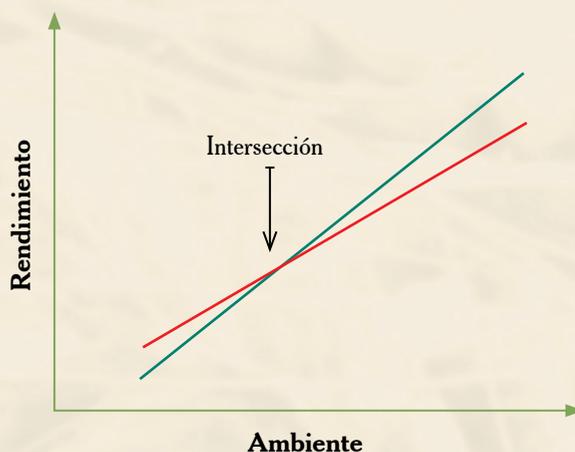


Fuente: Blum 2011, Tardieu 2012

Por eso es muy importante definir el escenario, ya que cualquier cosa puede tener un efecto negativo, positivo o neutro de acuerdo al panorama del que estemos hablando. Así por ejemplo, una característica de re-movilización de nutrientes que es rápido o en esencia es acelerado, puede ser lo adecuado para un escenario de sequía terminal, pero seguramente no es adecuado en un escenario de producción donde sequías anteriores pueden revertir esa situación. Y esto en realidad, es un juego contra la evolución de las plantas que de alguna manera favorecen la generación de descendencia y no la maximización de la producción. Lo que se está tratando de hacer es cambiar de una estrategia más conservadora que ha generado la evolución, por una estrategia de riesgo apostando a que las condiciones de sequía se pueden llegar a revertir y lograr mayores rendimientos.

Cualquier mejorador lo conoce y es válido para todas las especies. Se eligen o se evalúan un amplio rango de materiales y hay un punto, una intersección donde hay materiales que son buenos en ambientes malos pero no necesariamente en ambientes buenos y vice versa (Fig. 4). Por ejemplo la línea roja es un material que funciona bien en un ambiente de sequía pero tiene una penalidad en ambiente óptimo al contrario de la línea negra, tiene un peor rendimiento en condiciones de sequía y un desarrollo mejor en condiciones óptimas.

Fig. 4. **Tolerancia a sequía vs. Potencial de rendimiento.**



Lo que se hace con la transgénesis, por lo menos en el caso de BIOCERES, es generar plantas que funcionen en ambientes de sequía y que después en un ambiente de condiciones óptimas no tengan una penalidad en el rendimiento. Lo que se está buscando es disminuir o bajar el punto de intersección lo más abajo posible para que la planta pueda tener una ventaja en condiciones de sequía eventual, pero que no tenga ninguna penalidad en ambientes de alto rendimiento.

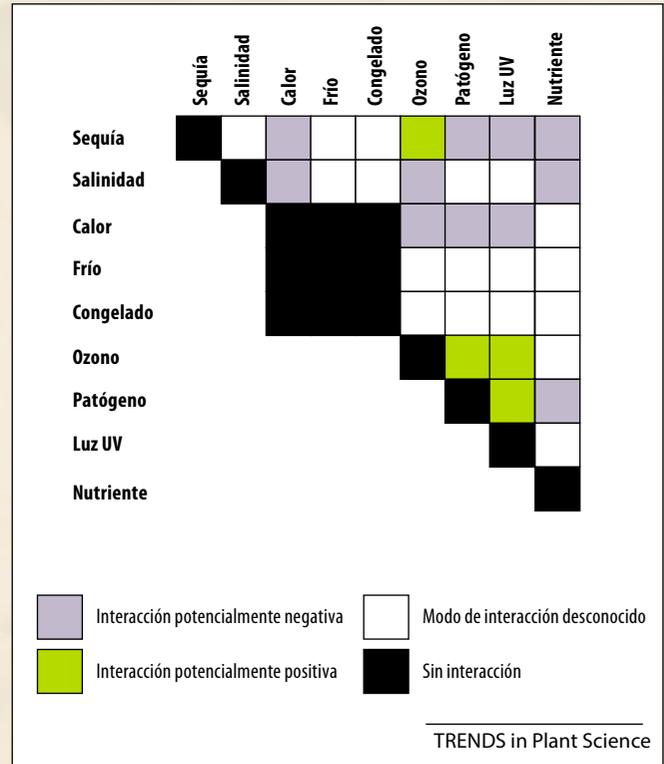
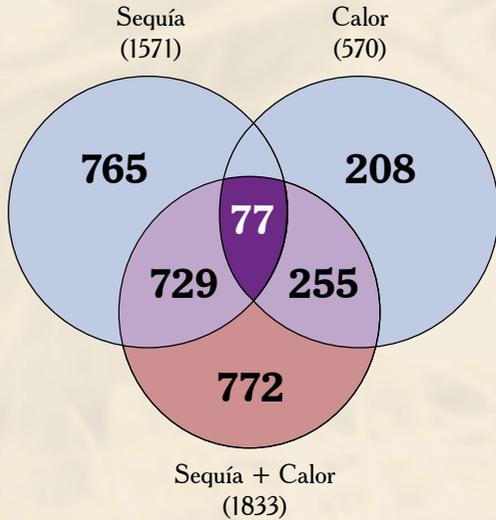
El punto de intersección para la mayoría de los cereales es entre los 2.000 o 3.000 kilos por hectárea y es más o menos lo mismo para la soja. Probablemente el nivel de mejoramiento del maíz sea el más avanzado en todas las especies vegetales utilizando los QTLs para mejorar la tolerancia a sequía. Actualmente hay productos ya comerciales en los EEUU, pero no en la Argentina, en los que se ha podido disminuir o bajar ese punto de intersección, logrando aumentos de rendimientos en condiciones de sequía sin perjudicar el rendimiento en ambientes óptimos.

Una de las tecnologías es la Agrisure Artesian de Syngenta y otra AQUAmax de Pioneer, donde las ventajas de rendimiento en ambientes limitantes pueden ser del 10% a 12%, pero que en ambientes favorables no hay ventaja o hay una ventaja muy mínima de calidad. Sin embargo, estas tienen muchas dificultades, razón por la cual estas tecnologías no están muy extendidas. Se sabe que estas respuestas no ocurren de manera aislada y que interactúan entre sí, es más, muchas de ellas ya están muy bien caracterizadas; por ejemplo, hay una interacción negativa entre sequía y calor, o entre sequía y alguna deficiencia de nutrientes, etc.

Para una mejor explicación, se puede visualizar la Fig.5, donde se puede apreciar que de los 1833 genes, transcriptos que expresan en una condición de sequía y salinidad, menos de la mitad (772) se expresan única y exclusivamente cuando están los dos juntos y solamente 77 son compartidos por los tres estrés. Esto demuestra la dificultad de hacer selección cuando diferentes estrés se manifiestan en forma simultánea. Uno puede seleccionar una cosa en un año de sequía, pero en el año siguiente de sequía y calor se va a seleccionar otra cosa totalmente diferente.

Fig. 5. **Interacción de estreses en el ambiente de selección.**

(a) **Factores de Transcripción**



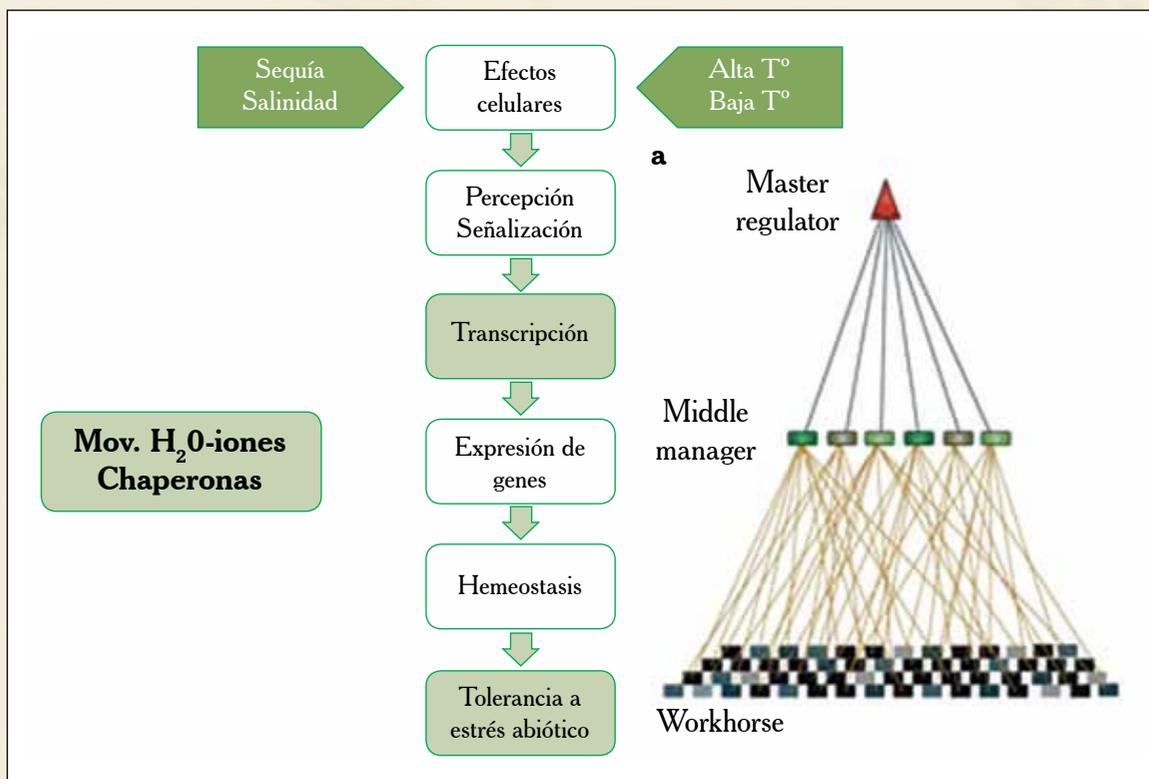
Mittler 2006

Por esta razón y buscando las diferentes alternativas para poder abordar esta problemática surge la posibilidad de utilizar factores de transcripción. En el dogma central de la biología vemos que el ADN se transcribe a ARN y este se traduce a proteínas. Son las proteínas que interactúan directamente con el ADN, funcionando de alguna manera como un interruptor maestro arriba de todo, que a través de agentes intermedios puede desencadenar la expresión o la represión de muchos genes.

Varios factores de transcripción, afectan cientos y a veces hasta miles de genes. Esto es importante resaltar porque de esta manera y a través de la inserción de un solo gen, uno puede abordar características cuantitativas. Por otra parte, la inserción de un gen que simplemente genere una proteína pero no interactúe con otros genes, difícilmente se pueden abordar características cuantitativas. Este ejemplo es bastante simplificado porque están también las redes regulatorias que son más complicadas.

Se sabe que la salinidad, la sequía, las altas o las bajas temperaturas desencadenan efectos celulares que son percibidos, señalizados y finalmente resultan en una determinada expresión de genes (Fig. 6). Estos genes pueden estar relacionados, con elementos como agua o iones, como también puede ser la marchitez o el arrollamiento de las hojas; moléculas chaperonas que pueden hacer que una vez revertido el estado hídrico de las células, puedan volver a ser funcionales con la descodificación o compactación.

Fig. 6. Cadena de mandos para la expresión de características cuantitativas.

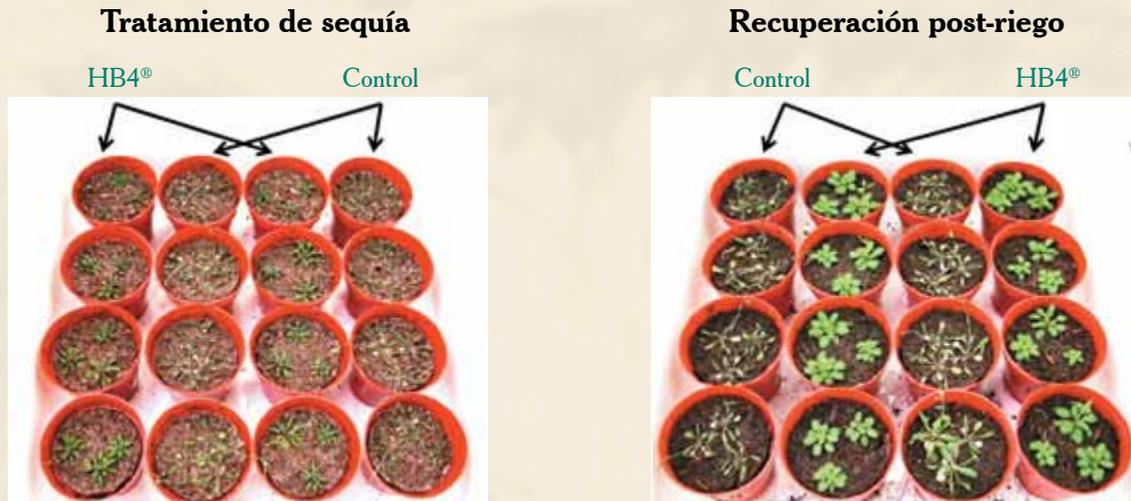


Estos son efectos finales y estos fueron el blanco del primer intento de lograr a través de la transgénesis tolerancia a estrés, a estrés abiótico. Algunos de estos fueron utilizados con éxito en los EEUU; hay un maíz transgénico que utiliza el gen *cspB* que codifica para una proteína “Chaperona de ARN” moléculas presentes en la naturaleza. El éxito de esta tecnología está aún por verse, pero los intentos de aumentar protectores o des-toxicidad también para bajar el stress oxidativo están en las pruebas. Si estos genes tienen éxito, las células vuelven a adaptarse y van a ser tolerantes al estrés abiótico. La gran ventaja de usar factores de transcripción es que uno simultáneamente puede estar tocando todas las vías.

## TECNOLOGÍA HB4, TOLERANCIA A SEQUÍA

La tecnología Hb4 fue identificada por el grupo de la Dra. Raquel Chan de la Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina. Es un factor de transcripción del girasol cuya acción es regulada positivamente por estrés hídrico, salino y la presencia de las hormonas ABA, etileno y ácido jasmónico. La expresión ectópica de este gen bajo el control de un promotor constitutivo fuerte en plantas de *Arabidopsis*, genera líneas notoriamente más tolerantes a condiciones de sequía y/o salinidad. En las pruebas de concepto se vio un claro contraste entre un tratamiento de sequía bastante terminal y otro, donde luego se riegan las plantas y se espera la recuperación. En la Fig. 7 se puede apreciar las diferencias en comportamiento de las plantas normales con aquellos que contienen Hb4.

Fig. 7. **Prueba de concepto de la eficacia del gen Hb4**



Indagando un poco en la acción de este factor de transcripción y los principales mecanismos de la tolerancia, se concluye que tienen que ver con la insensibilidad al etileno. El etileno es una hormona relacionada con la senescencia. Hay unos experimentos muy sencillos que pueden determinar si la planta transgénica es sensible al etileno o no. Por otra parte, hay triple respuesta de las dicotiledóneas al etileno, que es acortar el hipocótilo y no permitir la apertura del gancho. Cuando se trata con etileno o con un precursor como ACC (Acido 1 ciclopropano 1 carboxílico), esto se ve claramente en las plantas control mientras que, las plantas transgénicas, tienen una germinación normal o sea no son afectadas (Fig. 8). Pasa lo mismo si se trata con etileno directamente sobre las plantas se genera la senescencia acelerada de los cotiledones de las plantas control antes que los cotiledones de las plantas Hb4; o sea en unos días esos cotiledones de la planta senescen y se caen de la misma manera que en la planta control.

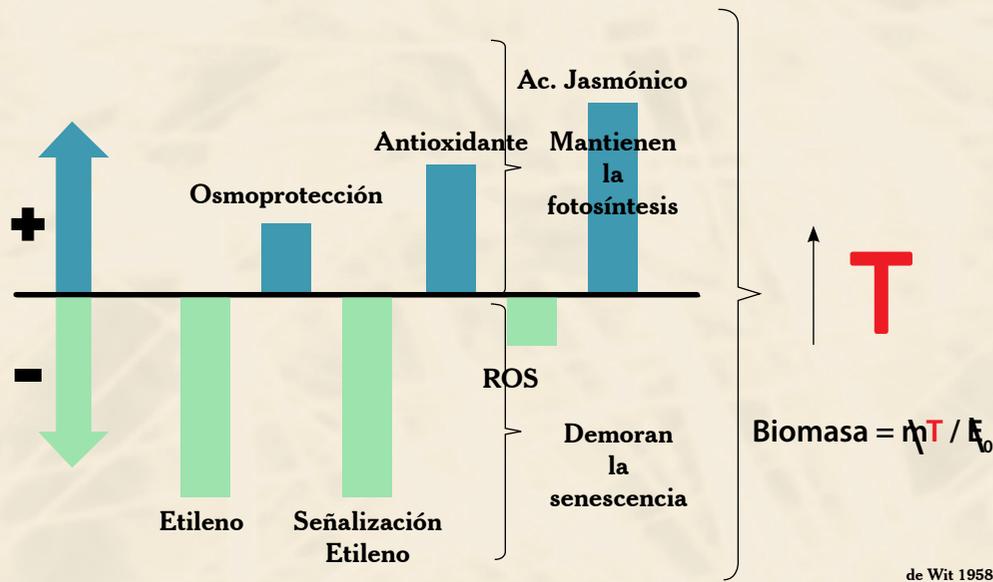
Otro mecanismo es el incremento de la expresión de genes relacionados, por ejemplo, con la Aldehído deshidrogenasa (ALDH), que ésta a su vez, está relacionada con el ajuste osmótico en las plantas control o con el vector vacío, comparadas con Hb4 se expresan mucho más, o como puede ser la súper oxidoreductasa, un antioxidante muy poderoso. También se utiliza mucho la expresión, y hay reducción de especies reactivas de oxígeno.

Fig. 8. **El modo de acción del Hb4 (insensibilidad al etileno)**



En la Fig. 8. se puede apreciar como el tratamiento de etileno o de oscuridad induce a la expresión del gen de Hb4. Como consecuencia de esta, se reprime la expresión de proteínas del fotosistema b, o de la rubiscoactivasa. Lo que pasa es que la planta tiene cierta redundancia de las proteínas de fotosíntesis y las propias proteínas, la propia fotosíntesis, es la que genera las especies reactivas de oxígeno en condiciones de sequía. Prácticamente la planta se está suicidando cuando está sintetizando; lo que hace esto es disminuir al mínimo la maquinaria de fotosíntesis, sin afectar la tasa fotosintética. Aparentemente por la evolución hay una redundancia y esto permitiría o disminuiría la generación de especies reactivas al oxígeno. En resumen, Hb4 toca aproximadamente 800 a 815 genes y una sola proteína interactúa o reprime a 800 a 815 genes (Fig. 9).

Fig. 9. **Modo de acción del Hb4 para tolerancia a la sequía.**

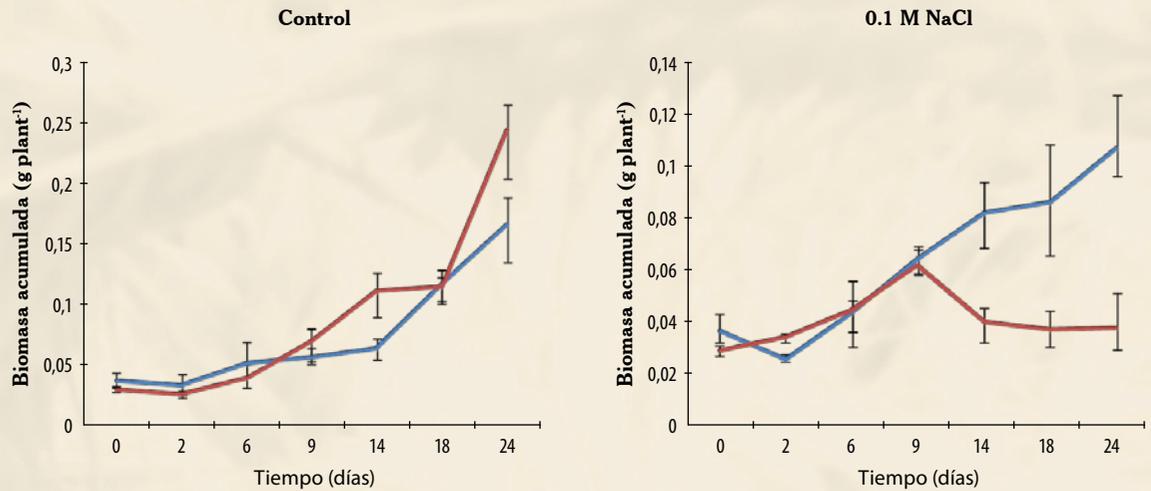


Se puede apreciar en la Fig. 9 que de alguna manera la generación de osmo-protectores y antioxidantes se aumenta, junto al ácido jasmónico que es otra hormona relacionada con la fotosíntesis. Se reprime la síntesis de etileno, tanto la síntesis como las vías de señalización, y hay una menor generación de especies reactivas al oxígeno. De manera totalmente conceptual, las barras azules ayudan a mantener la fotosíntesis en condiciones de estrés y las barras verdes demoran la senescencia. En conjunto lo que se logra es transpirar más; mayor transpiración representa mayor rendimiento, a no ser que podamos cambiar la planta de un C3 a C4, porque ahí cambiaría el “m”, que es la eficiencia. En este caso, si no se puede cambiar la eficiencia porque no es posible, la única manera de aumentar el rendimiento es vía aumento de la transpiración.

## DESARROLLO DEL TRIGO HB4

Los datos logrados en la generación del trigo Hb4 serán discutidos de manera secuencial. Además del trigo, BIOCERES también tiene esta tecnología bastante avanzada en otros cultivos como soja, maíz y alfalfa. De manera cronológica, primero algunos experimentos fueron realizados en condiciones controladas de invernáculo o cámara de cultivo y después algunos datos de ensayos a campo.

Fig. 10. Exposición de las plantas Hb4 a condiciones de salinidad.



En un experimento de salinidad en condiciones de control, las plántulas fueron sometidas a riego con agua de la canilla y con una solución de 0,1 moles de cloruro de sodio (suelo considerado salino). Los resultados presentados en la Fig. 10 muestran que bajo condición de control no hay mucha diferencia en la tasa de acumulación de biomasa en el tratamiento con agua, pero cuando se pone estas plantas en una solución de 0,1 moles de cloruro de sodio la planta transgénica (línea azul) sigue creciendo y la planta no transgénica no crece más. Se puede observar que el eje Y de la segunda grafica es la mitad del control, con lo cual la planta no siente la salinidad sino que simplemente tiene un límite inferior.

Fig. 11. Exposición de las plantas Hb4 a condiciones de sequía controlada.



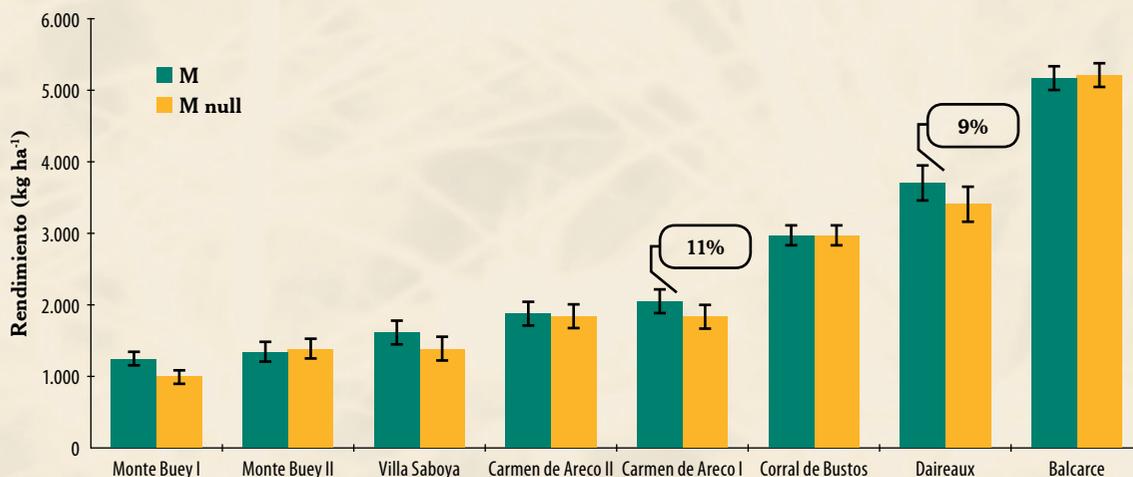
En otros experimentos controlados las plantas fueron regadas con una cantidad mínima de agua, como medio litro de agua cada 3 días y al cabo de un tiempo se empiezan a generar diferencias notables entre el evento transgénico y el control no transformado (Fig. 11).

Los resultados de esta tecnología a nivel de campo son aún más interesantes, porque es totalmente diferente el ambiente que se puede generar en el campo por las interacciones con diferentes estrés abióticos de manera simultánea, como simplemente por la condición de lo que es una maceta y lo que es el suelo.

Los resultados de ensayos del año 2012 se muestran en la Fig. 12. Los resultados observados en 2012 son consistentes con las evaluaciones a campo desde el 2009; es decir que hay menores diferencias de rendimiento a medida que aumenta el rendimiento. Las diferencias en rendimientos mayores en ambientes peores, no se ve en todos los ensayos. A veces las diferencias no son significativas. La posible explicación para esta anomalía es que no siempre la limitante del rendimiento es hídrica, puede ser otra condición. Estos ensayos se hacen directamente en campos de productores, sin riego. Se hace un ensayo, como si fuese ensayo de variedades y estos son los resultados. Después de varios años de prueba a nivel de campo, el evento seleccionado "m", (línea verde clara) es superior en casi todos los lugares. Otro aspecto muy importante es que en rangos de altos rendimientos, no se ve una penalidad. Estos resultados son consistentes aun en localidades de muy altos rendimientos, en el sur de Buenos Aires, donde los rendimientos son superiores a 10 toneladas/hectárea. Es un aspecto muy importante que no haya penalidades en ambientes óptimos en el desarrollo de las tecnologías para tolerancia a sequías.

En la serie de datos entre 2009 y 2012, en ambientes de rendimientos promedios de 2 toneladas la superioridad del Hb4 está alrededor de 15% y en ambientes de 2 a 3 toneladas el beneficio promedio está cerca del 10%. En ambientes de potencial medio, entre 3 y 6 ton/ha., la superioridad del Hb4 es entre 3 a 4%, pero lo interesante es que en ambientes muy productivos no hay ninguna penalidad.

Fig. 12. Comparación de rendimiento del evento M (Hb4) y M null en varias localidades, 2012.



Ahora la pregunta es sobre las perspectivas comerciales o el tiempo necesario para que tecnologías como de estrés abiótico u otras de genética cuantitativa lleguen al mercado. Todos saben que para desarrollar una variedad hoy se tardan 10 a 13 años. Para hacer una variedad transgénica es este periodo más los años que hacen falta para desarrollar el transgénico. Razón por la cual, la industria hoy ha tomado solamente los cultivos extensivos importantes o sea soja y maíz. El periodo promedio entre el descubrimiento y el lanzamiento comercial de eventos es de 13 años. Una cuestión preocupante es que hasta el 2002, se demoraban en casi 4 años, para asuntos regulatorios y registros. Hoy ese número está llegando a 6 años, o sea, va aumentando. Otro aspecto importante es el costo del desarrollo de un transgénico. Según McDougall, 2011, (www.croplife.org) quien publicó su estudio en base a encuestas, describió que se gastan 136 millones de dólares en promedio entre el descubrimiento y la desregulación.

Esto de alguna manera resume el porqué de las causas; de porqué se tarda tanto tiempo y por qué no hay tantos productos en el mercado, ya que muchas veces ese es el argumento para decir porque no funciona. Pero no significa que no funcione, sino que la barra para llegar es bastante alta.

Es importante reiterar que es posible abordar características cuantitativas con tecnología por transgénesis. En el año 2012, se liberó en EEUU un evento en maíz, una proteína de *Bacillus subtilis*, que en 2000 comparaciones dio una ganancia media de 300 kg/ha. Su lanzamiento fue restringido al oeste Americano, zona bastante marginal, y ahora hay que esperar que los productores lo acepten y adopten.

El único otro ejemplo que existe hoy es de Caña de Azúcar, que se liberó en 2013, en Indonesia. Es una colina deshidrogenasa de *Escherichia coli*, que aumenta la acumulación de un osmoprotector y está a nivel comercial. Sin embargo, es una desregulación muy local. En el caso del Hb4, aún falta un tiempo, hay muchas preguntas pero se está avanzando en trigo y en soja. Estamos más avanzados en estos cultivos para entregar los dosiers para la desregulación a nivel Argentina a fin de este año y a principios del año que viene para soja en EEUU, y después en varios territorios.

El Maíz está un poco más atrasado y no hay un evento seleccionado. Partimos de casi 100 eventos y hoy tenemos un grupo que lo seguimos ensayando de 4 a 5 y en Alfalfa, recién llegamos al campo este año.

## Preguntas

### Pregunta

*Muy buena la presentación Gerónimo. ¿Esto de los números que tocaste al final, que implica desregular un evento de transformación; el evento en si tiene que ver con el fondo genético al cual se lo agregas o es independiente al fondo genético o sea el cultivar al cual agregar esta característica?.*

**Gerónimo Watson.** Lo que se desregula es el evento, un evento en particular, después se lo puede poner en la cantidad genética que se quiera y ya se tiene que pagar una sola vez.

### Pregunta

*¿Y la evaluación de los distintos ambientes con que fondo genético trabajaron?*

**Gerónimo Watson.** Es con el fondo genético del material original de transformación, que normalmente tiene muchas desventajas en el aspecto agronómico, porque el beneficio que tiene es que es fácil de manejar *in vitro* y no se seleccionan por su cualidad agronómica.

Todos los ensayos que tenemos, o la mayoría, son en ese fondo genético. La siguiente pregunta es cómo se responde cuando es seleccionado en los diversos genotipos y eso hay que responderlo.

### Pregunta

*Pero ese fondo genético no es un cultivar adaptado*

**Gerónimo Watson.** En Argentina hay cultivares que tienen esa sangre en su pedigrí, así que no diría que no es adaptado pero probablemente no sea la mejor variedad y eso puede tener limitaciones.

### Pregunta

*Me refiero a que me llamo la atención de que anduvo muy bien en el sur y no anduvo tan bien en el norte, o sea me da la sensación de verlo a medias.*

**Gerónimo Watson.** Sí, pero eso fue del año pasado. Hay muchos datos adicionales, pero si es una variedad que tiene requisitos de frío que anda mejor en el sur.

Resistencia al brotado es un aspecto clave para la calidad en los años húmedos.



# Germinação pré-colheita em trigo (*Triticum aestivum* L.)

**LAURO AKIO OKUYAMA**

Instituto Agrônômico do Paraná-IAPAR, Caixa Postal 481, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 375, CEP 86047-902,  
Londrina, Paraná, Brasil,  
Email: [lauro.okuyama@iapar.br](mailto:lauro.okuyama@iapar.br)



## Resumo

A ocorrência de chuvas na pré-colheita ocasiona a germinação de grãos na espiga, que é um sério problema em várias regiões produtoras de trigo no mundo. As lavouras de trigo germinado têm acentuadas perdas de produção, diminuição do peso do hectolitro e de qualidade dos grãos. O presente trabalho de revisão teve como objetivo em abordar alguns aspectos relacionados a fatores relacionados a germinação pré-colheita, métodos de avaliação, fontes de resistência, classificação de cultivares e seleção assistida por marcadores moleculares. Muitos fatores estão relacionados a germinação pré-colheita, sendo a principal a dormência. O método de avaliação sob condições de nebulização, em espigas intactas, é simples e eficaz para avaliação de germinação pré-colheita. Existe uma variabilidade genética muito grande em termos de tolerância à germinação pré-colheita. As cultivares Frontana, Ônix, TBIO Itaipu, Safira, BRS 177, BRS 248 e IAPAR 53 são consideradas como as de maior tolerância à germinação pré-colheita. O conhecimento da classificação das cultivares de trigo quanto à germinação pré-colheita é fundamental para que os agricultores possam optar por cultivares mais indicadas, escolher a melhor época de semeadura e programar a operação de colheita. O uso de marcadores moleculares como atividade de rotina pelos programas de melhoramento genético ainda é muito restrito, sendo ainda de uso local. Apesar de avanços para elevar a produtividade, qualidade, tolerância a fatores bióticos e abióticos, muito ainda pode ser feito em relação a germinação pré-colheita. Para tanto, a escolha dos genitores com maior dor-

mência e menor atividade da enzima  $\alpha$ -amilase e dos tipos de cruzamentos a serem aplicados são fundamentais para a obtenção de materiais genéticos com características desejáveis.

Palavras-chave: dormência, métodos de seleção, cultivares tolerantes, marcadores moleculares.

## Abstract

### Pre-harvest sprouting in wheat

*The pre-harvest sprouting or germination of grains in the spike is caused by the occurrence of precipitation during the pre-harvest period and represents a serious problem for several wheat producing countries in the world. The pre harvest sprouted fields suffer sharp production losses, reduced grain weight and grain quality. The present review is aimed at addressing some aspects related to the factors of pre-harvest sprouting, assessment methods, sources of resistance, classification of cultivars and the utilization of molecule markers for selection. Among many factors effecting pre harvest sprouting, the major contribution comes from seed dormancy. The artificial evaluation of whole spikes under nebulization is simple and effective method to determine resistance to pre-harvest sprouting. There is a large genetic variability present for tolerance to this character. Cultivars such as Frontana, Onix, Tbio Itaipú, Safira, BRS177, BRS248 and IAPAR53 are considered to be most tolerant genotypes. A proper knowledge of the reaction of wheat cultivars to pre-harvest sprouting is critical for farmers to choose most suitable cultivars, adequate planting date and schedule harvesting operation. The use of molecular markers as a routine procedure in the breeding programs is still very restricted to a few characters. Despite advances to increase productivity, quality, tolerance to biotic and abiotic stresses, much needs to be done in relation of pre-harvest sprouting. Therefore, the choice of parents with higher dormancy and decreased  $\alpha$ -amylase enzyme activity needs to be considered in the genetic material before a crossing program with desirable characters can be developed.*

El Falling Number (Índice de caída) es una prueba indirecta para evaluar la resistencia de un trigo al brotado.



## INTRODUCCIÓN

Vários fatores estão relacionados a tolerância à germinação pré-colheita. Entre esses: dormência das sementes, resistência genética, cor do grão, estrutura e morfologia da espiga,  $\alpha$ -amilase e fatores ambientais.

### Dormência das sementes

A dormência é um dos principais fatores relacionados à germinação pré-colheita (Mares *et al.*, 2005; Kottarachchi *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2013). Os hormônios vegetais são os reguladores centrais da dormência e da germinação. O ácido abscísico (ABA) promove a dormência e reprime a germinação das sementes, enquanto, que o ácido giberélico (GA), antagonicamente, desencadeia a germinação das sementes (Kucera *et al.*, 2005). A atividade hormonal do ácido giberélico (GA) aumenta quando o grão é embebido e induz a síntese e secreção de amilases. Devido ao aumento da atividade da amilase, as reservas de carboidratos são hidrolisadas, translocadas e utilizadas pelo embrião em crescimento (Derera, 1989).

### Resistencia Genética

Vários genes têm sido identificados como relacionados a germinação pré-colheita (Bailey *et al.*, 1999; Flintham, 2000; Yang *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2012). A falta de dormência adequada das sementes é a principal causa da ocorrência de germinação pré-colheita no campo, sendo esta governada por múltiplos genes e altamente herdáveis (Li *et al.*, 2004). Genes AGO802 e AGO804, localizados nos cromossomos 3S e 1s, relacionados a dormência (Singh *et al.*, 2013).

### Cor do grão

A associação entre a cor vermelha da semente e a dormência tem sido relatada, sendo que estas apresentam menor germinação na espiga (Freed *et al.*, 1976; Nielsen *et al.*, 1984; DePauw & McCaig, 1987; McCaig & DePauw, 1992). Esta associação pode ser devida a estreita ligação entre genes que condicionam a cor da semente e aqueles que controlam a dormência ou genes de ação pleiotrópica (Freed *et al.*, 1976). O RL4137 possui dois ou mais genes que controlam a dormência da semente, um associado com cor de semente e outros independentes de cor de semente (DePauw & McCaig, 1983). A semente vermelha é sempre dominante em relação à branca, sendo a cor de grão codificada por três genes independentes (Freed *et al.*, 1976). A cor vermelha da semente no entanto, não assegura tolerância à germinação na espiga (Gordon, 1979; De Pauw & McCaig, 1987).

### Estrutura e morfologia da espiga

A estrutura de proteção dos grãos na espiga, características físicas e fatores químicos dos mesmos, contribuem para a diferenciação dos genótipos quanto à germinação na espiga. Assim, o processo de germinação pode ser afetado pela gluma que contém inibidores (Derera *et al.*, 1977), pela limitação de passagem de água aos grãos (King & Chandin, 1983), pela presença de ácido abscísico (King, 1993) e pela presença de inibidores no pericarpo e endosperma (Belderok, 1976).

### $\alpha$ -amilase

A enzima  $\alpha$ -amilase, sintetizada na camada de aleurona e escutelo, promove a decomposição do amido em açúcares disponíveis para germinação (Lunn *et al.*, 2002). A germinação de grãos na espiga, sob condições de umidade no período antecedente à colheita, resulta em altos níveis de  $\alpha$ -amilase que são prejudiciais à qualidade de grão (Xiu-Jin *et al.*, 1997). Esta enzima degrada o amido pela hidrólise da ligação  $\alpha$ -1,4 glicosídica, produzindo dextrinas e pequenas quantidades de maltose e glicose. A maltose e dextrinas são depois degradadas pelas glucosidases,  $\alpha$ -amilases e fosforilase para glicose e glicose-6-fosfato. O produto da reação fornece substratos e fonte de energia para o embrião durante a germinação.

A atividade da  $\alpha$ -amilase, que representa expressão bioquímica da germinação de grãos na espiga, pode ser quantificada por meio do valor do número de queda (Finney, 1985). Uma farinha de valor comercial requer um número de queda entre: 200 e 300 segundos (Moss *et al.*, 1972) ou 240 e 270 segundos (Mares, 1987). Linhagens tolerantes à germinação na espiga podem atingir valores entre 350 e 500 segundos (Mares, 1987).

## Fatores ambientais

Os danos de germinação pré-colheita estão altamente relacionados a fatores ambientais, como temperatura, umidade, nebulosidade e radiação. A maturação de grãos sob condições de baixa temperatura condiciona maior nível de dormência do que grãos sob condições de alta temperatura. (Reddy *et al.*, 1985). Resultado similar foi observado por Mares (1993) que verificou maior dormência em cultivares expostas a regime de temperatura de 26,5°C/8,5 °C em relação a aquelas expostas a 35,6°C/17,5°C.

## MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE GERMINAÇÃO DE GRÃOS

Vários métodos têm sido utilizados para avaliação da germinação, entre esses:

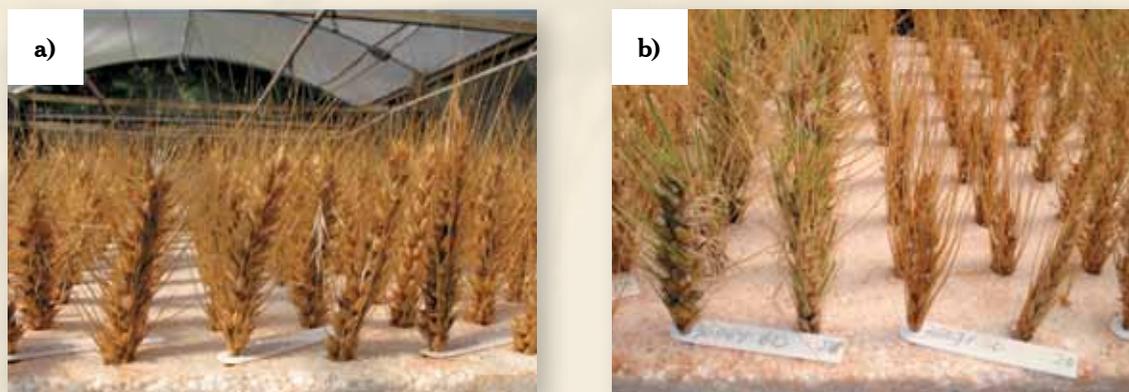
- a) No campo, após um período de chuva;
- b) No laboratório, utilizando placas de Petri;
- c) No laboratório, imersão de espigas em água. Após, as espigas são devidamente acondicionadas em papel toalha e mantidas em câmara de germinação;
- d) No telado, por meio de nebulização. As espigas são expostas a precipitação artificial até o início da germinação (Figs 1-2).

Todos esses métodos têm sido relatados como possíveis de uso para seleção de genótipos tolerantes a germinação pré-colheita. Desses, o método de nebulização no telado é o que possibilita maior similaridade às condições de campo.

Fig. 1. **Avaliação de germinação pré-colheita em telado - nebulização.**



Fig. 2. **Avaliação de germinação pré-colheita em telado com nebulização, a) 2 dias y b) 4 dias.**



## AVALIAÇÃO DE GRÃOS GERMINADOS

Vários métodos possibilitam a avaliação de grãos germinados. Entre esses: visual, peso do hectolitro, percentagem de grãos germinados e número de queda (Falling Number).

### Avaliação visual de grãos

É a forma mais simples para verificar grãos germinados. O método possibilita avaliações rápidas do nível de tolerância dos genótipos (Fig. 3).

Fig. 3. **Avaliação de grãos germinados.**



### Percentagem de grãos germinados

Possibilita uma melhor classificação dos genótipos quanto a tolerância à germinação pré-colheita. Os genótipos com menor percentagem de grãos germinados apresentam maiores valores do número de queda Fig. 4.

Fig. 4. **Avaliação de percentagem de grãos germinados.**

## Peso do hectolitro

O peso hectolitro é uma análise física do grão. É a massa (peso) de 100 litros de trigo expressa em kg/hl. Um alto valor de peso do hectolitro nem sempre representa menor percentagem de grãos germinados e características reológicas adequadas.

Segundo MAPA (2010), os requisitos do peso do hectolitro por tipos são os que seguem:

Tipos	Peso do Hectolitro (kg/hl) Valor mínimo
1	78
2	75
3	72
Fora de tipo	Menor que 72

## Número de queda ou “Falling Number”

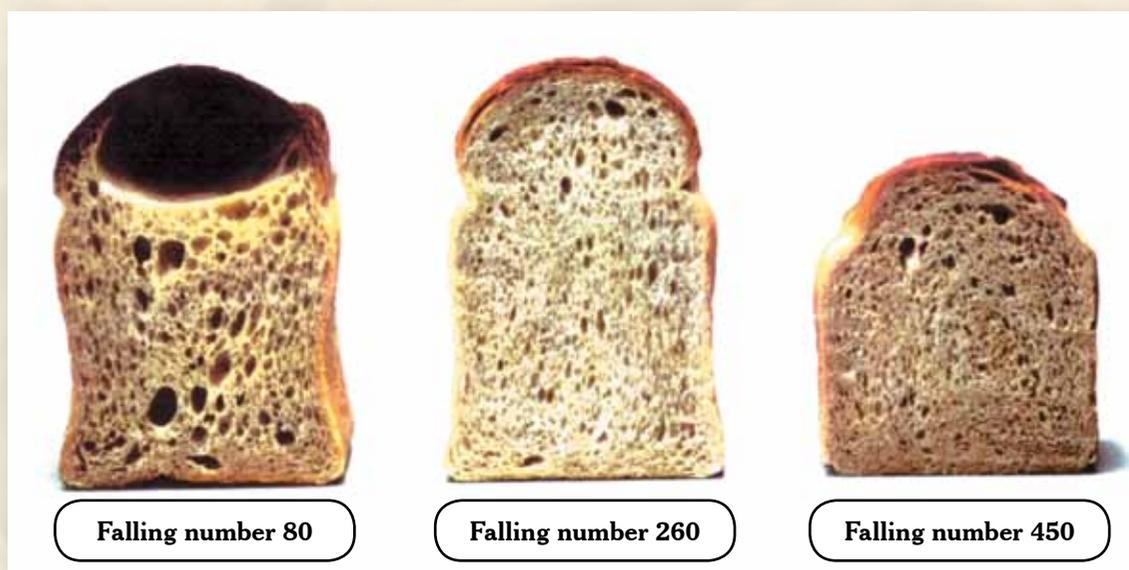
O número de queda é um método padrão que os moinhos e as indústrias de alimentos utilizam para quantificar os danos da germinação pré-colheita. Esta análise mede indiretamente a atividade da enzima  $\alpha$ -amilase que representa expressão bioquímica da germinação de grãos na espiga (Finney, 1985), e afecta ao aspecto do pão (Fig. 5).

A classificação do trigo no Brasil, está baseada na qualidade segundo a força do glúten, estabilidade, número de queda, percentagem máxima de matéria estranhas e impurezas e percentagem máximo de defeitos (MAPA, 2010). No Quadro 1 é apresentado o valor mínimo do número de queda, expresso em segundos, para as diferentes classes do trigo do Grupo II.

Quadro 1. **Classes do trigo do Grupo II destinado à moagem e a outras finalidades.**

Classes	Força do Glúten <sup>1</sup> (Valor mínimo expresso em $10^{-4}$ J)	Estabilidade <sup>2</sup> (Tempo expresso em minutos)	Número de Queda <sup>3</sup> (Valor mínimo expresso em segundos)
Melhorador	300	14	250
Pão	220	10	220
Doméstico	160	6	220
Básico	100	3	200
Outros Usos	Qualquer	Qualquer	Qualquer

Fig. 5. **Aspecto do pão em função do Número de Queda (Falling Number).**



Fonte: [http://www.cnpt.embrapa.br/eventos/2010/Forum\\_trigo\\_2010/Luiz\\_Carlos\\_Caetano-ABITRIGO.pdf](http://www.cnpt.embrapa.br/eventos/2010/Forum_trigo_2010/Luiz_Carlos_Caetano-ABITRIGO.pdf)

1. **Força do Glúten (W):** É a energia que se gasta para expandir a massa (farinha + água) até a ruptura, e é medida em Joules (J). Na farinha de trigo, o glúten forma uma rede que retém os gases produzidos na fermentação e sustenta o crescimento da massa.
2. **Estabilidade:** É o tempo, em minutos, que uma massa mantém estável suas características viscoelásticas (força da massa) resistindo ao processo de amassamento.
3. **Número de Queda ou “Falling Number”:** É a medida indireta da atividade da enzima  $\alpha$ -amilase que possibilita o conhecimento do grau de germinação de grãos de trigo.

## FONTES DE RESISTÊNCIA

O nível de tolerância a germinação pré-colheita, entre as cultivares de trigo indicados aos agricultores, ainda é muito baixo. No Quadro 2 são listados alguns trabalhos realizados no Brasil onde são relacionados as cultivares avaliadas e as que apresentaram melhor desempenho para a germinação pré-colheita. De um modo geral, apresentaram as melhores características de tolerância à germinação pré-colheita as seguintes cultivares: Frontana, Ônix, TBIO Itaipu, Safira, BRS 177, BRS 248 e IAPAR 53.

Em termos internacionais, muitos genótipos são citados como tolerantes à germinação na espiga, entre esses: a) cultivares trigo branco Clark's Cream (Morris & Paulsen, 1989); Kenya 321.BT.1.B.1 e Peck (DePauw *et al.*, 1992); Tom Thumb (Bhatt *et al.*, 1977); Kite (Mares, 1987); Snowbird, AC Karma, AC Vista (SINGH *et al.*, 2013) e b) trigo vermelho: Takahe (McEwan, 1976); RL4137, Chris, Frontana, Exchange e Sommerweizen 8793 (Czarnecki, 1987); RL4137 (DePauw *et al.*, 2009); resistentes: RL4137 e Domain; tolerante: Thatcher (SINGH *et al.*, 2013).

Os programas de melhoramento genético no Brasil vêm contribuindo de modo eficaz para elevar a produtividade, qualidade, tolerância a fatores bióticos e abióticos. Apesar de avanços, muito ainda pode ser feito em relação a germinação pré-colheita. Para tanto, a escolha dos genitores com maior dormência e menor atividade da enzima  $\alpha$ -amilase e dos tipos de cruzamentos a serem aplicados são fundamentais para a obtenção de materiais genéticos com características desejáveis.

## TOLERÂNCIA A GERMINAÇÃO PRÉ-COLHEITA DE CULTIVARES DE TRIGO, SEGUNDO OS OBTENTORES

O conhecimento da classificação das cultivares de trigo quanto à germinação pré-colheita é fundamental para que os agricultores possam optar por cultivares mais indicadas, escolher a melhor época de semeadura e programar a operação de colheita.

Nos Quadros 3 e 4 são apresentadas a genealogia e a classificação das cultivares de trigo, segundo os obtentores, quanto a tolerância à germinação pré-colheita, da classe comercial melhorador e pão, respectivamente. Dados estes, adaptados do RCBPTT (2013).

Quadro 2. **Cultivares de trigo com maior tolerância à germinação pré-colheita, segundo várias fontes.**

Cultivares	Maior tolerância à germinação pré-colheita	Fonte
Atle, Bezostaja 1, BH 1146, Bongo, Cama, Frocor (Test.), Frontana (Test.), Jufy I, Kenya 321, Kleiber, Kolibri, Manella, Mironovskaja 808, NP 6*/RL 4137, Park CT 427, RL 4137, Thatcher, Trapeano (Test.), WW 5837 e WW 9941.	Frocor, Frontana, Jaral, Klein Fortin, Jufy I, NP*6/RL 4137 e RL 4137	Linhares, 1979
BR 18, BR 23, BRS 119, CEP 24, CEP 27, EMBRAPA 16, EMBRAPA 40, Frontana, RS-Fênix, FEPAGRO RS 15, Rubi	Frontana, FEPAGRO RS 15, RS 1-Fênix, CEP 27	Tonon, 2001
Alcover, Avante, Biesek, BR 18-Terena, BR 35, BR23, BRS 120, BRS 177, BRS 192, BRS 193, BRS 208, BRS 49, CD 101, CD 102, CD 103, CD 104, CD 105, CD 106, CEP 24, IAPAR 17-Caeté, IAPAR 28-Igapó, IAPAR 29-Cacatú, IAPAR 53, IAPAR 78, IAPAR 60, ICA 1 - Vitória, ICA 2 - Palhada, IPR 84, IPR 85, Manitoba 97, OCEPAR 16, OCEPAR 21, OCEPAR 22, Ônix, OR 1, Rubi, Taurum, UTF 101.	BR 35, BRS 193, CD 102, ICA 2-Palhada, IPR 85, OCEPAR 22, Ônix, Rubi,	Okuyama <i>et al.</i> 2002.
BR 18-Terena, BR 23, BRS 120, BRS 177, BRS 192, BRS 208, BRS 209, BRS 49, Frontana, IAPAR 17-Caeté, IAPAR 28-Igapó, IAPAR 29-Cacatú, IAPAR 53, IAPAR 60, IAPAR 78, IPR 84, IPR 85, IPR 87, IPR 90.	BRS 177 e Frontana	Okuyama <i>et al.</i> 2003
Alcover, BR 18, BRS 177, BRS 208, BRS 210, BRS 220, BRS 229, BRS 248, BRS 249, CD 103, CD 104, CD 105, CD 106, CD 107, CD 108, CD 110, CD 111, CD 112, CD 113, CD 114, CD 115, CD 116. Frontana, IAPAR 78, IPR 110, IPR 118, IPR 128, IPR 129, IPR 84, IPR 85, IPR 87, OCEPAR 16, OCEPAR 18, Ônix, PAMPEANO, Rubi, Safira, Supera, Taurum, Vanguarda.	BRS 248, CD 114, CD 110, BRS 229, BRS 177, Safira, Ônix Frontana, IPR 84,	Okuyama <i>et al.</i> 2007
BRS 177; BRS 208; BRS 210; CD 104; CD 105; CD 108; Frontana; IAPAR 53; IPR 85; OCEPAR 18, ÔNIX; BRS 18-Terena.	Frontana, IAPAR 53, ÔNIX, CD 108 e IPR 85	Franco <i>et al.</i> 2009
BR 18, BRS 177, BRS 208, BRS 210, BRS 220, BRS 229, BRS 248, BRS 249, BRS Guamirim, BRS Louro, BRS Pardela, BRS Tangará, CD 104, CD 116, Frontana, IAPAR 53, IPR 110, IPR 84, OR 1, Safira.	BRS 177, BRS 248, BRS Tangará, IPR 84, Safira e Frontana	Prando <i>et al.</i> 2009
Abalone, BRS 208, BRS 296, BRS 327, BRS Guamirim, Campeiro, CD 114, CD 117, CD 119, CD 120, CD 121, CD 122, CD 123, Fundacep 300, Fundacep 51, Fundacep 52, Fundacep Bravo, Fundacep Campo Real, Fundacep Cristalino, Fundacep Horizonte, Fundacep Nova Era, Fundacep Raízes, Marfim, Mirante, Pampeano, Quartzo, Safira, Supera, TBIO Pioneiro e Vanguarda	BRS 296, Fundacep Bravo, Fundacep Campo Real, Fundacep Horizonte, Quartzo, Safira, TBIO Pioneiro e Vaqueano.	Pires <i>et al.</i> 2011
BRS 208, BRS 327, BRS Guabiju, BRS Guamirim, BRS Pardela, BRS Tangará, BRS Umbu, Campeiro, CD 105, CD 115, CD 117, CD 120, CD 121, CD 122, CD 123, Fund. Cristalino, Fund. Raízes, IPR 144, Itaipu, Ivaí, Marfim, Pioneiro, Quartzo, Safira.	BRS 327, BRS Tangará, BRS Umbu, Campeiro, CD 117, Itaipu, Ivaí, Pioneiro, Quartzo, Safira.	Almeida & Okuyama, 2011
TBIO TIBAGI, TBIO IVAÍ, TBIO PIONEIRO, TBIO ITAIPU, QUARTZO, MIRANTE, MARFIM, VALENTE, SUPERA, FRONTANA, RAÍZES, HORIZONTE, CRISTALINO, CAMPO REAL, BRAVO, GUAMIRIM, BRS 248, BRS 194, BRS 220, BIO 08228, BIO 08545, BIO 07367, BIO 07264, ORL 060742, ORL 060764, ORL 060922, CEP 01-167, CEP 05-128, CEP 07-136, CEP 06-219, CEP 06-167, CEP 05-6 e CEP 07-31.	TBIO Itaipu, BIO 08228, Raízes, Horizonte, BRS 194, TBIO Pioneiro, BIO 07367, Raízes, Guamirim e Frontana	Nörnberg, 2012
Abalone, BR 18, BRS 220, BRS Gaivota, BRS Gralha Azul, BRS Guabiju, BRS Guamirim, BRS Pardela, BRS Tangará, Campeiro, CD 104, CD 105, CD 108, CD 114, CD 116, CD 117, CD 118, CD 119, CD 120, CD 121, CD 122, CD 123, CD 124, CD 150, CD 151, CD 154, Frontana, Fund. Cristalino, Fund. Raízes, IAPAR 53, IPR 128, IPR 130, IPR 136, IPR 144, IPR 85, IPR Catuara TM, Marfim, Mirante, OCEPAR 16, Ônix, OR 1, Quartzo, Safira, Supera, TBIO Bandeirante, TBIO Iguaçú, TBIO Itaipu, TBIO Pioneiro, TBIO Seletto, TBIO Tibagi.	Ônix, Frontana, Safira, TBIO Iguaçú, Quartzo, TBIO Itaipu, CD 114, IAPAR 53, IPR Catuara TM e CD 117	Okuyama <i>et al.</i> 2013

Quadro 3. **Classificação de germinação pré-colheita em cultivares de trigo, da classe comercial melhorador, segundo os obtentores, 2013.**

Cultivar	Cruzamento	Obtendor	Ano de lançamento	Classe comercial	Germinação <sup>1</sup> (segundo os obtentores)
IAC 385-Mojave	TRAPI#1/YACO//BAVIACORA 82	IAC	2012	Melhorador	R
Jadeíte 11	Campo Real/Vanguarda // Ônix	OR Sementes	2012	Melhorador	R
IAC 380-Saira	RL6010/5*inia66//IAC 24/IAC 287	IAC	2009	Melhorador	R
BRS Gralha Azul	BRS 209//Camboatá/LR 37	Embrapa	2012	Melhorador	MR/R
TBIO Mestre	IBIO0810/CRONOX//ORL00255	Biotrigo	2012	Melhorador	MR
CD 1252	IPR 85/ORL 95282	Coodetec	2012	Melhorador	MR
BRS 254	EMBRAPA 22*3/ANA 75	Embrapa	2005	Melhorador	MR
IPR 85	IAPAR30/BR18	IAPAR	1999	Melhorador	MR
Embrapa 42	LAP 689/MS 7936	Embrapa	1995	Melhorador	MR
Embrapa 22	VEE"S"/3/KLTO"S"/PAT 19//MO/JUP	Embrapa	1993	Melhorador	MR
IAC 24-Tucuruí	IAS 51/4/SON 64/YAQUI 50E/GB/2*CIANO	IAC	1982	Melhorador	MR
IPR Catuara TM	LD 975/IPR 85	IAPAR	2012	Melhorador	MR/MS
CD 150	CD 104/CD 108	Coodetec	2009	Melhorador	MR/MS
IPR 136	TAW/SARA//BAU/3/ND 674*2/IAPAR 29	IAPAR	2007	Melhorador	MR/MS
CD 111	EMBRAPA 27/OCEPAR 18//ANAHUAC 75	Coodetec	2003	Melhorador	MR/MS
CD 151	BRS 120/ORL 95282	Coodetec	2012	Melhorador	MS
BRS Parrudo	WT89109/TB0001	Embrapa	2012	Melhorador	MS
CD 118	VEERY/KOEL//SIREN/3/ARIVECHI M 92	Coodetec	2008	Melhorador	MS
CD 116	MILAN/MUNIA	Coodetec	2006	Melhorador	MS
CD 104	PFAU "S"/IAPAR 17	Coodetec	1999	Melhorador	MS
T. Bandeirantes	IBIO 00718/CRONOX/ALCOVER	Biotrigo	2012	Melhorador	S
BRS Pardela	BR 18/PF 9099	Embrapa	2007	Melhorador	S
F. Cristalino	BR 35/CEP 9291/4/BR 32/3/CNO 79/PF 70354/MUS"S"	Fundacep	2006	Melhorador	S
BRS 328	Klein H 3394 s 3110/PF 990744	Embrapa	2012	Pão/Melhorador	MR/R
BRS Tangará	BR 23*2/PF 940382	Embrapa	2007	Pão/Melhorador	MR
Ametista	PF 950351/Abalone//Ônix	OR Sementes	2011	Pão/Melhorador	MR/MS
BRS Albatroz	PF 940301/PF 940395	Embrapa	2011	Pão/Melhorador	MS/S

R: resistente; MR: moderadamente resistente; MS: moderadamente suscetível; S: suscetível.

Fonte: Adaptado de RCBPTT, 2013.

Quadro 4. Classificação de germinação pré-colheita em cultivares de trigo, da classe comercial pão, segundo os obtentores, 2013.

Cultivar	Cruzamento	Obtendor	Ano de lançamento	Classe comercial	Germinação (segundo os obtentores)
IAC 381-Kuara	CMH75.A.66/SERI/3/BH1146//AA"S"/WIN"S"	IAC	2009	Pão	R
IAC 375-Parintins	MRN/BUC"S"/BLO"S"/PSN"S"/3/BUC/PVN	IAC	2003	Pão	R
TBIO Alvorada	Vaqueano/Abalone	Biotrigo	2012	Pão	R/MR
TBIO Sinuelo	Quartzo/3/Fundacep30/Ônix//Pampeano/4/Quartzo	Biotrigo	2012	Pão	R/MR
CD 1550	ÔNIX/CDFAPA 2001129	Coodetec	2012	Pão	R/MR
Quartzo	ÔNIX/AVANTE	OR/Biotrigo	2007	Pão	R/MR
Ônix	CEP-24/RUBI 'S'	OR/Biotrigo	2002	Pão	R/MR
TBIO Iguaçú	Quartzo/Safira	Biotrigo	2012	Pão	MR
CD 124	ORL 95282/CD 2019	Coodetec	2012	Pão	MR
TBIO Pioneiro 2010	Cronox/Vaqueano	Biotrigo	2010	Pão	MR
CD 123	BRS 177/CD 108	Coodetec	2010	Pão	MR
BRS 327	CEP 24/BRS 194	Embrapa	2010	Pão	MR
BRS Guamirim	EMB 27/BUCK NANDU//PF 93159	Embrapa	2005	Pão	MR
MGS Brilhante	PF 8640/BR 24	Epamig	2005	Pão	MR
BRS Tarumã	CENTURY/BR 35	Embrapa	2004	Pão	MR
Safira	PF9099/OR-1//GRANITO	OR/Biotrigo	2004	Pão	MR
IAC 370-Armageddon	BB/NAC//VEE/3/BJY/COC	IAC	1999	Pão	MR
TBIO Seletto	ORL 04300/ÔNIX	Biotrigo	2012	Pão	MR/MS
TBIO Ivaí	ORL 97061/CD 104	Biotrigo	2010	Pão	MR/MS
TBIO Tibagi	Supera/Ônix	Biotrigo	2010	Pão	MR/MS
CD 122	IPR 85/WT 96168	Coodetec	2010	Pão	MR/MS
Fundacep Bravo	Rubi/Fundacep 37	Fundacep	2010	Pão	MR/MS
CD 117	PF 87373/OC 938	Coodetec	2007	Pão	MR/MS
Marfim	ORL 94101/2*ORL 95688	OR/Biotrigo	2007	Pão	MR/MS
Fundacep Raízes	EMB 27/CEP 24/3/BUC"S"/FCT"S"/PF 85229	Fundacep	2006	Pão	MR/MS
Abalone	ORL93299/3/ORL92 171//EMB16/2*OR1/4/RUBI	OR/Biotrigo	2006	Pão	MR/MS
CD 108	TAM200/TURACO	Coodetec	2003	Pão	MR/MS
FPS Nitron	ORL 94300/ÔNIX	F. Pró sementes	2011	Pão	MR/MS
TEC Veloce	ORL 91256/FUNDACEP 29//BRS 177	CCGL TEC	2012	Pão	MS
CD 154	CD 104/CDI 200104	Coodetec	2012	Pão	MS
Fundacep Horizonte	BRS 119/CEP 97184	Fundacep	2009	Pão	MS
IPR 144	SERI*3/BUC/5/BOW/3/CAR 853/COC//VEE/4/OC 22	IAPAR	2009	Pão	MS
Mirante	Ônix/Taurum/Ônix	OR/Biotrigo	2008	Pão	MS
IPR 130	RAYON//VEE#6/TRAP#1	IAPAR	2007	Pão	MS
IPR 128	VEE/LIRA//BOW/3/BCN/4/KAUZ	IAPAR	2006	Pão	MS
BRS 264	BUCK BUCK/CHIROCA//TUI	Embrapa	2005	Pão	MS
CD 114	PF 89232/OC 938	Coodetec	2004	Pão	MS
Supera	PF-9099/OR-1	OR/Biotrigo	2004	Pão	MS
BRS Guabiju	PF 86743/BR 23	Embrapa	2003	Pão	MS

UFVT 1-Pioneiro	VEERY 5/NACOSARI	UFV	2003	Pão	MS
BRS 208	CPAC89118/3/BR23//CEP19/PF85490	Embrapa	2001	Pão	MS
MGS1 Aliança	PF 858/OCEPAR 11	Epamig	1999	Pão	MS
TEC Vigore	FUNDACEP Cristalino/Pampeano	CCGL TEC	2012	Pão	S
Valente	BR 18/Alcover	OR/Biotrigo	2004	Pão	S
BRS 220	EMBRAPA 16/TB 108	Embrapa	2003	Pão	S
BRS 207	SERI 82/PF 813	Embrapa	1999	Pão	S
BR 18-Terena	SEL. ALONDRA	Embrapa	1986	Pão	S
TEC Frontale	ORL 95688/Embrapa 16	CCGL TEC	2012	Pão	SI
Berilo	ORL 99192/ORL 00241	OR Sementes	2011	Pão	SI
Topázio	Pampeano 'S'/Abalone	OR Sementes	2011	Pão	SI
Turqueza	Pampeano/ORL 98231//Cronox	OR Sementes	2011	Pão	SI

R: resistente; MR: moderadamente resistente; MS: moderadamente suscetível; S: suscetível.

Fonte: Adaptado de RCBPTT, 2013.

## SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES

Os marcadores moleculares vêm ganhando importância para seleção de características desejáveis. Esta ferramenta auxiliar apresenta a vantagens em relação a seleção fenotípica de não ser afetada pelo ambiente e de possibilitar a redução de tempo para avaliações e de área experimental.

Vários marcadores moleculares foram identificados como relacionados à dormência e/ou germinação pré-colheita. Alguns destes são apresentados no Quadro 5. O uso de marcadores moleculares como atividade de rotina pelos programas de melhoramento genético ainda é muito restrito, sendo ainda de uso local (Pu Li *et al.*, 2010; He Xiao *et al.*, 2012), Liu *et al.*, 2013).

Quadro 5. Cromossomo e marcadores associados à dormência e germinação pré-colheita.

Caracteres	Cromossomo	Marcador	Referência
Dormência do grão	3B	Xwocs207	Kottearachchi <i>et al.</i> 2008
Germinação pré-colheita	3AS	QPhs.pseru-3AS,	Liu <i>et al.</i> 2008
Germinação pré-colheita	3DL	QPhs.dpiv-3D.1, QPhs.dpiv-3D.2	Imtiaz <i>et al.</i> 2008
Germinação pré-colheita	4AL, 3B	Gpw2279 barc170	Christopher <i>et al.</i> 2008
Germinação pré-colheita	3B e 4A	Vp-1B3, DuPw004	Singh <i>et al.</i> 2010
Genes de pigmento roxo	2AS, 3AL	Xgwm47, Xgwm155.	Pu Li <i>et al.</i> 2010
Germinação pré-colheita	1BS, 2BS, 2BL, 2DS, 4AL, 6DL, 7BS e 7DS.	WPt-666564, wPt-8283, wPt-6003, cfd37 e wPt-663918.	Kulwal <i>et al.</i> 2012
Germinação pré-colheita	1B, 2A, 2B, 3D, 5B, 5D	gwm413, gwm558, gwm16, cfd152, cfd2, wmc274, wmc233	Jaiswal <i>et al.</i> 2012
Germinação pré-colheita e enchiamento de grãos	3A	Xbarc57, Xbarc294, Xbarc310 and Xbarc321	He Xiao <i>et al.</i> 2012
Dormência	3A	Qphs.pseru-3AS	Liu <i>et al.</i> 2013
Dormência	3S e 1S	ARGONAUTE4_9 (gene)	Sing <i>et al.</i> , 2013

# Referências

- ALMEIDA, J. L. & OKUYAMA, L. A. Avaliação de Germinação na Espiga em Trigos Cultivados na Região Centro Sul do Paraná em Condições de Nebulização. In: **V Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale**, 25 a 28 de julho de 2011, Dourados, MS.
- BAILEY, P.C.; MCKIBBIN, R.S.; LENTON, J.R.; HOLDSWORTH, M.J.; FLINTHAM, J.E.; GALE, M.D. Genetic map locations for orthologous Vp1 genes in wheat and rice. **Theoretical and Applied Genetics**, 98:281-284, 1999.
- BELDEROK, B. Physiological-biochemical aspects of dormancy in wheat. **Cereal Research Communications**, 4(2):133-137, 1976.
- BHATT, G. M.; DERERA, N. F.; MCMASTER, G. J. Utilization of Tom Thumb source of pre-harvest sprouting tolerance in a wheat breeding programme. **Euphytica**, 26(3):565-572, 1977.
- CHRISTOPHER, M. J.; JENNINGS R.; BANKS P.M. Validation of QTL for resistance to pre harvest sprouting. In: International Wheat Genetics Symposium, Proceedings, 11, 2008, v. 3, p. 679-681.
- CZARNECKI, E. Breeding and selection for pre-harvest sprouting resistance in red wheats. In: Symposium on Pre-harvest Sprouting in Cereals, 3, 1987, Vancouver, B.C., Canada. Proc... Westview Press, Boulder, Colorado. p. 45-53.
- De PAUW, R. M.; McCAIG, T. N. Recombining dormancy and white seed color in a spring wheat cross. **Canadian Journal of Plant Science**, 63(3):581-589, 1983.
- De PAUW, R. M.; McCAIG, T. N. Recovery of sprouting resistance from red-kernelled wheats in white-kernelled segregates. In: Symposium on Pre-Harvest Sprouting in Cereals, 3, 1987, Vancouver, Proc... Boulder, Colorado: Westview Press, p. 54-63.
- DePAUW, R. M. ; McCAIG, T. N. ; CLARKE, J. M.; McLEOD, J. G.; KNOX, R. E.; FERNANDEZ, M. R. Registration of sprouting tolerant white-kernelled wheat germplasm SC8019R1 and SC8021V2. **Crop Science**, 32(3):838, 1992.
- DePAUW, R.M.; CLARKE, F.R.; FOFANA, B.; KNOX, R.; HUMPHREYS, G.; CLOUTIER, S. RL4137 contributes preharvest sprouting resistance to Canadian wheats. **Euphytica**, 168:347-363, 2009.
- DERERA, N. F.; BHATT, G. M.; MCMASTER, G. J. On the problem of pre-harvest sprouting of wheat. **Euphytica**, 26(2):299-308, 1977.
- DERERA, N.F. The effects of pre-harvest rain. In: Preharvest field sprouting in cereals. Ed. CRC Press, 1989, p.1-14.
- FINNEY, P. L. Effect of wheat variety on the relationship between falling numbers and alpha-amylase activity. **Cereal Chemistry**, 62(4):258-262, 1985.
- FLINTHAM, J.E. Different genetic components control coat-imposed and embryo-imposed dormancy in wheat. **Seed Science Research**, 10:43-50, 2000.
- FRANCO, F.A.; PINTO, R.J.B.; SCAPIM, C.A.; SCHUSTER, I.; PREDEBON, C.T.; RARCHIOROL, V. S. Tolerância à germinação na espiga em cultivares de trigo colhido na maturação fisiológica. **Ciência Rural**, 39(9): 2396-2401, 2009.
- FREED, R. D.; EVERSON, E. H.; RINGLUND, K.; GULLORD, M. Seed coat color in wheat and the relationship to seed dormancy at maturity. **Cereal Research Communications**, 4(2):147-149, 1976.
- GORDON, I. L. Selection against sprouting damage in wheat. III Dormancy, germinative alpha-amylase, grain redness and flavanols. **Australian Journal of Agriculture Research**, 30(3):387-402, 1979.
- He XIAO, S.; PING ZHANG, H.; XIA YOU, G.; YING ZHANG, X.; SHENG Y. C. Integration of marker-assisted selection for resistance to pre-harvest sprouting with selection for grain-filling rate in breeding of white-kernelled wheat for the Chinese environment. **Euphytica**, 188:85-89, 2012.
- IMTIAZ, M.; OGBONNAYA, F.C.; OMAN, J.; VAN GINKEL, M. Characterization of quantitative trait loci controlling genetic variation for preharvest sprouting in synthetic backcross-derived wheat lines. **Genetics** 178: 1725–1736, 2008.
- JAISSWAL, V.; MIR, R. R.; Man Mohan, A.; BALYAN, H. S.; GUPTA, P.K. Association mapping for pre-harvest sprouting tolerance in common wheat (*Triticum aestivum* L.). **Euphytica**, 188:89-102, 2012.
- KING, R. W.; CHANDIM, H. Ear wetting and pre-harvest sprouting of wheat. In:
- KRUGER, J.E. & LaBERGE, D. E. (eds). International symposium on pre-harvesting, 3, 1983, Manitoba, Canada, p.36-42.
- KING, W. K. 1993. Manipulation of grain dormancy in wheat. **Journal of Experimental Botany**, 44(263):1059-1066, 1993.
- KOTTEARACHCHI, N.S., TAKAO, S.; KATO, K.; MIURA, H. Mapping of a QTL in Chromosome 3B for Grain Dormancy in White-Grained Wheat Population. **Journal of Food and Agriculture**, 1(2):1-10, 2008.
- KUCERA, B.; COHN M. A.; LEUBNER-METZGER, G. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. **Seed Science Research**, 15:281–307, 2005.
- KULWAL P.; ISHIKAWA G.; BENSCHER D.; FENG Z.; YU LX.; JADHAV A.; MEHETRE S.; SORRELLS, M.E. Associa-

tion mapping for pre-harvest sprouting resistance in white winter wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, 125:793-805, 2012.

LI, C.; NI, P.; FRANCKI, M.; HUNTER, A.; ZHANG, Y.; SCHIBECI, D.; LI, H.; TARR, A.; WANG, J.; CAKIR, M.; YU, J.; BELLGARD, M.; LANCE, R.; APPELS, R. Genes controlling seed dormancy and pre-harvest sprouting in a rice-wheat-barley comparison. **Functional e Integrative Genomics**, 4:84-93, 2004.

LINHARES, A. G. Germinação da semente na espiga em trigo. **Revista Brasileira de Sementes**, 1(3):25-28, 1979.

LIU, S.; SEHGAL, S.K.; LI, J.; LIN, M.; TRICK, H.N.; YU, J.; GILL, B.S.; BAI, G. Cloning and characterization of a critical regulator for preharvest sprouting in wheat. **Genetics**, 195:263-273, 2013.

LUNN, G.D.; KETTLEWEL, P.S.; MAJOR, B.J.; SCOTT, R.K. Variation in dormancy duration of the U.K. wheat cultivar Hornet due to environmental conditions during grain development. **Euphytica** 126(1):89-97, 2002.

MAPA-Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 38, de 30 de novembro de 2010.

MARES, D.J. Pre-harvest sprouting in wheat. I. Influence of cultivar, rainfall and temperature during grain ripening. **Australian Journal of Agricultural Research**, 44: 1259-1272, 1993.

MARES, D.; MRVA, K.; CHEONG, J.; WILLIAMS, K.; WATSON, B.; STORLIE, E.; SUTHERLAND, M.; ZOU, Y. A QTL located on chromosome 4A associated with dormancy in white- and red-grained wheats of diverse origin. **Theoretical and Applied Genetics**, 111:1357-1364, 2005.

MARES, D. J. Pre-harvest sprouting tolerance in white grained wheat. In: Pre-harvest Sprouting in Cereals, 3, Vancouver, B.C., Canada. Symp... Boulder: Westview Press, p. 64-73, 1987.

McCAIG, T. N. & DePAUW, R. M. Breeding for preharvest sprouting tolerance in white seed coat spring wheat. **Crop Science**, 32(1):19-23, 1992.

McEWAN, J. M. Breeding for resistance to pre-harvest sprouting in New Zealand wheats. **Cereal Research Communications**, 4(2):97-100, 1976.

MORRIS, C. F. & PAULSEN, G. M. Registration of five preharvest sprouting-resistant hard white winter wheat germplasm lines. **Crop Science**, 29(1):246-47, 1989.

MOSS, H. J.; DERERA, N. F.; BALAAM, L. N. Effect of pre-harvest rain on germination in the ear and  $\alpha$ -amylase activity of Australian wheat. **Australian Journal of Agricultural Research**, 23:769-77, 1972.

NIELSEN, M. T.; McCRATE, A. J.; HEYNE, E. G.; PAULSEN, G. M. Effect of weather variables during maturation on preharvest sprouting of hard white winter wheat. **Crop Science**, 24(4):779-782, 1984.

NÖRNBERG, R. Caracterização e predição de genitores visando à tolerância a germinação na pré-colheita em trigo (*Triticum aestivum* L.), 132p. Dissertação (Mestrado em Fitomelhoramento). Programa de Pós- Graduação em Agronomia. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2012.

NYACHIRO, J.M.; CLARKE, F.R.; DEPAUW, R.M.; KNOX, R.E.; ARMSTRONG, K.C. Temperature effects on seed germination and expression of seed dormancy in wheat. **Euphytica** 126:123-127, 2002.

OKUYAMA, L. A.; RIEDE, C. R.; CAMPOS, L.A.C.; SCHOLZ, M.B.S.; FERRO, M.S. Avaliação de cultivares de trigo quanto à germinação induzida na espiga. In: XVII Reunião da Comissão Centro-Sul Brasileira de Pesquisa de Trigo, 17, 2002, Cascavel. **Resumos e Atas**. Cascavel, Coodetec, 2002, p. 37.

OKUYAMA, L. A.; RIEDE, C. R.; CAMPOS, L. A. C.; SCHOLZ, M. B. S. Avaliação de cultivares de trigo quanto à germinação na espiga. In: Reunião da Comissão Centro-Sul Brasileira de Pesquisa de Trigo, 18, 2003, Guarapuava. **Palestras, Resumos e Atas**. Guarapuava, Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária, 2003. p.191-193.

OKUYAMA, L. A.; RIEDE, C. R.; CAMPOS, L. A. C. Avaliação de cultivares de trigo quanto à germinação pré-colheita. In: I Reunião da comissão brasileira de pesquisa de trigo e triticales e VII seminário técnico de trigo, Londrina, 2007. **Ata, resumos e palestras**. Londrina: Embrapa Soja:Fundação Meridional:IAPAR, 2007. p. 255-258. (Embrapa Soja. Documentos, n.293).

OKUYAMA, L. A.; SCHOLZ, M.B.S.; LOPES, L. H.; ROSA, K. P. Germinação pré-colheita em cultivares de trigo submetidas à nebulização. In: VII Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticales, 27 a 30 de agosto de 2013, Londrina, Paraná.

PRANDO, A. M.; FRONZA, V.; BASSOI, M. C. Germinação pré-colheita de cultivares de trigo Com simulação de chuva em casa de vegetação. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE, 3, 2009, Veranópolis. **Ata e resumos...** Veranópolis: Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticales: FEPAGRO: ASAV; Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2009.

PIRES, J.L.F.; GARRAFA, M.; CAIERÃO, E.; *et al.* Avaliação da germinação pré-colheita em cultivares de trigo em Três de Maio, RS, safra 2010. In: V Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticales, 25 a 28 de julho de 2011, Dourados, MS.

PU LI, X.; SU-QUE LAN, S.; YE-LUN ZHANG, Y. Identification of molecular markers linked to the genes for purple grain color in wheat (*Triticum aestivum*). **Genetic Resources and Crop Evolution**, 57:1007-1012, 2010.

REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE - RCBPTT. Informações técnicas

para trigo e triticale -safra 2013. Londrina, PR, Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), 2013, 220p.

REDDY, L.V.; REDDY, L.V.; METZGER, R.J.; CHING, T.M. Effect of temperature on seed dormancy of wheat. **Crop Science**, 25:455-458, 1985.

SINGH, M.; SINGH, S.; RANDHAWA, H.; SINGH, J. Polymorphic Homoeolog of Key Gene of RdDM Pathway, ARGONAUTE4\_9 class Is Associated with Pre-Harvest Sprouting in Wheat (*Triticum aestivum* L.). PLoS ONE 8(10): e77009, 2013. Disponível em: <http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0077009&representation=PDF>

SINGH, R.; SINGH, G.; MALIK, R.; KUMAR, R.; TIWARI, R.; SINGH, S.S. Evaluating molecular markers associated with preharvest sprouting resistance in wheat. **Annual Wheat Newsletter**, 56:67-69, 2010.

SUN, Y. W.; JONES, H. D.; YANG, Y.; *et al.* Haplotype analysis of Viviparous-1 gene in CIMMYT elite bread wheat germplasm. **Euphytica**, 186:25-43, 2012.

TONON, V. D. Genética da resistência à germinação na espiga em trigo. 66 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). UFRGS, Porto Alegre, 2001.

XIU-JIN, L.; DENG-CAI, L.; ZHI-RONG, W. Inheritance in synthetic hexaploid wheat 'RSP' of sprouting tolerance derived from *Aegilops tauchii* Cosson. **Euphytica**, 95(3):321-323, 1997.

YANG, Y.; MA, Y. Z.; XU, Z. S.; CHEN, X. M.; HE, Z. H.; YU, Z.; WILKINSON, M.; JONES, H. D.; SHEWRY, P. R.; XIA, L. Q. Isolation and characterization of Viviparous-1 genes in wheat cultivars with distinct ABA sensitivity and pre-harvest sprouting tolerance. **Journal of Experimental Botany**, 58:2863-2871, 2007.

## Preguntas o Comentarios

### Dr. Man Mohan Kohli

Lauro, creo que cuatro días del mojado de las espigas es muy largo y pone mucha presión sobre la selección y por supuesto hay más descarte. Estimo que dos días permiten mejor separación, donde posiblemente ciertos genotipos o ciertos genes aditivos menores, pueden estar expresando. El momento que germina una espiga, uno descarta sin pensar que posiblemente pueden existir granos ahí, que sean genéticamente diferentes a los que germinaron. No estamos trabajando con variedades homocigotas, no es un doble haploide y segregación puede seguir hasta varias generaciones.

En una cruce de Frontana o Safira o de Onix, no sabemos hasta cuándo va a seguir la segregación. Entonces creo que puede ser útil separar los granos no germinados dentro de la espiga germinada. Estos granos pueden ser utilizados en el siguiente ciclo para ver si hay diferencia, si hay mejoría lenta o no.

Lo que está pasando en el brotado es muy parecido con el caso del Fusarium o Piricularia donde el progreso es lento porque no estamos trabajando con líneas completamente homocigotas. Estoy de acuerdo con el comentario del Dr. Scheeren esta mañana que para estos caracteres los marcadores no funcionan bien. El marcador molecular puede identificar un gen en particular, un genotipo en un ambiente uniforme. Fuera de este ambiente, como en el caso de Brasil, esto puede ser un problema de interacción o aparentemente no estás trabajando con un solo gen. El Dr. Bassoi, quien estudio el brotado para su doctorado, opina que hoy los marcadores no funcionan para este carácter, pero espero que algún día vayan a funcionar.

Por esta razón, pienso que no vamos a encontrar un gen aislado que otorgue la resistencia al brotado, ni Frontana tiene eso. En otras palabras, debemos seguir perfeccionando la metodología de selección que nos permita identificar los mejores genotipos y seguir combinándolas para piramidar los genes positivos.

# Análisis de resistencia genética a la roya de hoja del trigo

**RUTH SCHOLZ**

Programa Nacional de Trigo, IPTA  
Ruta 6, Km 17.5, Capitan Miranda, Paraguay  
Email: [ruti\\_scholz@hotmail.com](mailto:ruti_scholz@hotmail.com)



## Resumen

La roya de la hoja del trigo, causada por *Puccinia triticina*, es una de las enfermedades más importantes en el Cono Sur de América y particularmente en Paraguay. En epidemias severas se han estimado pérdidas de rendimiento de grano superiores al 50%. La población del patógeno es muy dinámica, lo que lleva a la resistencia transitoria en los cultivares comerciales y a los cambios raciales en el patógeno. La mejor estrategia para la estabilización de la población del patógeno y la resistencia se considera que es el uso de resistencia de la planta adulta conferida por genes aditivos menores incluyendo *Lr34*, *Lr46* y *Lr68*. El concepto de resistencia genética no implica necesariamente que un cultivar tenga cero o nula enfermedad (inmunidad). Según el criterio genético utilizado existen distintos tipos de resistencia que puede estar basada en genes de efecto mayor o en genes de efecto menor; y puede ser de tipo “raza específica” o “raza no específica”. En un mismo pato-sistema muchas veces operan distintos mecanismos de resistencia; es necesario conocerlos para la adecuada instrumentación de las estrategias de control genético.

La resistencia del trigo a la roya de la hoja está limitada por factores genéticos, tanto del hospedante como el patógeno que actúa en una relación gen por gen, lo que implica que por cada gen de resistencia en un cultivar, existe un gen de avirulencia en las poblaciones del patógeno.

Los objetivos de este trabajo fueron identificar las razas de *P. triticina* presentes en Paraguay y caracterizar la resistencia a roya de la hoja de trigo en líneas y variedades de Paraguay, intentando postular genes de resistencia en base a las razas utilizadas. Se estudiaron un total de 25 muestras

de roya de la hoja recolectadas de los campos experimentales del IPTA (CICM e Yjhovy), donde se realizaron dos aislamientos monopostulares. Cada aislamiento se incrementó en el cultivar Little Club (susceptible universal) y luego se inoculó sobre un set diferencial de líneas *Lr* cercanamente isogénicas derivadas de Thatcher 1, 2a, 2c, 3, 9, 16, 24, 26, 3ka, 11, 17, 30, 10, 20 en el estado de primer hoja expandida. Doce días posterior a la inoculación se evaluaron los tipos de infección (TI) de acuerdo con la escala TI 0-4. Se designaron signos + y - para indicar el tamaño más grande y más pequeño de los uredinios, respectivamente. La designación de cada raza se realizó en base a la metodología de Long y Kolmer (1989). Para la postulación de genes de resistencia a roya de la hoja se evaluaron en el estado de plántula, 128 genotipos de trigo originados por el programa de mejoramiento genético de trigo de IPTA (Paraguay), además de Thatcher como testigo susceptible universal y el set de diferenciales antes mencionado que se inocularon con 19 razas seleccionadas por su virulencia o avirulencia en genes de interés. Se evaluaron según la escala antes descrita. Para determinar qué genes de resistencia (*Lr*) estaban presentes, los patrones de TI de los genotipos en estudio se compararon con los TI producidos en las líneas isogénicas de Thatcher. A su vez, los genotipos de trigo se evaluaron a campo junto a testigos susceptibles en la Estación Experimental de INIA- La Estanzuela (Colonia) y en Young (Río Negro). Los ensayos se sembraron a mediados de julio en 2011 y 2012, en parcelas de un surco de 1 m de cada material en bloques incompletos al azar con dos repeticiones. La severidad (%) de roya de la hoja se determinó según la escala modificada de Cobb. El coeficiente de infección se calculó (CI) definido como severidad tipo de reacción. Se caracterizó en campo a los materiales paraguayos por tipo de reacción y por porcentaje de severidad de roya de la hoja, se calculó el CI, y posterior a ello se calculó el área debajo de la curva de progreso de la roya de hoja (AUDPC) en base al CI. Se realizó análisis estadístico para obtener las medias ajustadas. Para la caracterización del gen *Lr34*, que confiere resistencia en planta adulta, se utilizó el marcador molecular *csLV34*. En este caso, se procedió a la extracción de ADN con el método de CTAB, se evaluó a cantidad y calidad de ADN con nanodrop, y luego de la reacción de PCR se determinó presencia/ausencia del alelo marcador mediante electroforesis de agarosa al 1%. A partir de las muestras colectadas en 2011 se identificaron 10 razas (MFP-20, MFP, MDT-10,20, TDT-10, TDT-10,20, TFT-10,20, MDP, MFT-10,20, MFP-10,20, MDP-20) tanto para la zona Sur como la zona Norte. En el estudio de los genotipos inoculados con 19 razas en plántula se pudieron postular los siguientes genes en los materiales de Paraguay: *Lr1,2,3,9,10,11,16,17,23,24,26,27+31,30*. Se observó que los materiales evaluados presentaron menores severidades a roya de hoja que los testigos susceptibles, los valores de las medias de los materiales fueron menores a las medias de los testigos susceptibles. La presencia del gen *Lr34* se determinó en 39 genotipos, 78 no presentaron el alelo marcador mientras que 12 materiales fueron heterocigotos.

Este estudio permitió detectar variabilidad en las razas presentes en Paraguay, pudiendo a su vez variar entre años, momentos de muestreo y regiones. Se identificaron genotipos de trigo provenientes de Paraguay resistentes a todas las razas inoculadas y presentes naturalmente en el campo. Esto podría indicar la presencia de genes mayores que confieren resistencia a raza específica y que podría ser de corta duración. Por otra parte, en otro grupo de materiales se determinó resistencia en planta adulta en base a su susceptibilidad en el estado de plántula y al lento desarrollo de la roya de la hoja a campo. El conocimiento de la población del patógeno y la presencia de genes de resistencia en los programas de mejoramiento es de suma importancia para poder introducir resistencia de larga duración.

# Abstract

## Analysis of genetic resistance to leaf rust

The leaf rust of wheat, caused by **Puccinia triticina**, is one of the most important diseases in the Southern Cone of South America, particularly in Paraguay. The yield losses caused by the disease can be more than 50% in severe epidemic years. The pathogen population is highly dynamic, leading to transient resistance in commercial cultivars and racial changes in the pathogen. The best strategy for stabilizing the pathogen population and resistance is the use of adult plant resistance conferred by additive genes such as Lr34, Lr46 and Lr68. The concept of genetic resistance does not necessarily imply that a cultivar has zero or no disease (immunity). According to the genetic criteria, different types of resistance can be based on genes with major or minor effects and can be race specific or race non-specific. Given that many different resistance mechanisms can be operating in a patho-system at one time, it is necessary to identify them in order to develop adequate genetic control strategies. The resistance to leaf rust in wheat is limited by genetic factors, both in the host and in the pathogen, that act in a gene for a gene relationship. This implies that for each gene conferring resistance in a cultivar, there is an avirulence gene in the pathogen population. The objectives of this study were to identify the races of **Puccinia triticina** present in Paraguay and characterize the resistance to leaf rust in the varieties and wheat advanced lines while attempting to postulate the genes for resistance on the basis of the used races. A total of 25 leaf rust samples were collected from the experimental fields of IPTA (CICM and Yjhovy) and two monosporic isolations were performed on each collection. Each isolate was increased on the cultivar Little Club (universally susceptible) and inoculated in the first leaf stage on to a differential set of near isogenic lines derived from Thatcher, Lr1, 2a, 2c, 3, 9, 16, 24, 26, 3ka, 11, 17, 30, 10 and 20. Infection Types (Ti) on a scale of 0 to 4, were evaluated 12 days after the inoculation. Depending on the large or small size of the uredia, "+" and "-" signs were assigned respectively. The designation of each race was determined utilizing the Long and Kolmer, 1989 methodology. A total of 128 wheat genotypes from the wheat breeding program were utilized to postulate leaf rust resistant genes in the seedling stage. In addition, the cultivar Thatcher was used as susceptible check and the set of differential lines mentioned earlier were inoculated with 19 selected races based on their genes of interest for virulence or avirulence. To determine the presence of genes for resistance in the advanced lines, their infection type patterns were compared with those produced on the Thatcher near isolines. All the genotypes were also tested under field conditions with susceptible checks at the INIA experimental stations in La Estanzuela (Colonia) and in Young (Río Negro), Uruguay. The field trials were seeded in the middle of July of 2011 and 2012. The leaf rust severity (%) was determined according to the modified Cobb scale. The infection coefficient (CI) was calculated by severity  $\times$  Infection Type. On the basis of CI, the area under the disease progress curve (AUDPC) was calculated and statistically analyzed to obtain adjusted means. To characterize the Lr34 gene, conferring adult plant resistance, the molecular marker csLV34 was utilized. In this case, DNA was extracted utilizing the CTAB method and its quantity and quality were evaluated using a nanodrop. After the PCR reaction, the presence/absence of the marker allele was determined by electrophoresis in 1% agarose film. From the samples collected in 2011, 10 races (MFP-20, MFP, MDT-10, 20, TDT-10, TDT-10,20, TFT-10,20, MDP, MFT-10,20, MFP-10,20, MDP-20) were identified, both for the South and the North of the country. In the study where genotypes were inoculated with 19 races, it was possible to postulate the presence of the following rust genes in the Paraguayan materials: Lr1, 2, 3, 9, 10, 11, 16, 17, 23, 24, 26, 27+31 and 30. It was observed that the materials carrying these genes showed lower severity as compared to the susceptible check. The presence of Lr 34 gene was determined in 39 genotypes while another 12 genotypes were heterozygous for its presence and the remaining 78 did not show the presence of the marker allele. This study permitted to detect the variability in the leaf rust pathogen population prevalent in Paraguay which may also vary from year to year, sampling time and the regions. Wheat genotypes resistant to all Paraguayan races, naturally present or collected from the field were identified. It may indicate the presence of major genes in the germplasm which confers specific but short lived resistance. However, another group of materials was identified to have adult plant resistance based on their susceptibility in the seedling stage and the slow development of leaf rust in the field. This knowledge of the pathogen population and the presence of multiple genes for resistance in the wheat breeding programs is critical to introduce long term resistance.



## INTRODUCCIÓN

La Roya de la hoja del trigo (*Triticum aestivum* L.), causada por el hongo *Puccinia Triticina* (Eriks), es una de las enfermedades foliares de trigo más diseminadas en todo el mundo y se encuentra en todas las regiones productoras de trigo. Al contrario de otras royas, se presenta todos los años causando epidemias importantes en el Cono Sur de América Latina. En Uruguay un alto porcentaje del área sembrada es ocupada por materiales de comportamiento intermedio a susceptible (Germán *et al.*, 2009), lo que está asociado a la alta importancia de la enfermedad.

En Paraguay siembran cerca de 500.000 ha de trigo (Capeco, 2014) y toda la superficie está bajo el control químico con fungicidas (Kohli *et al.*, 2011), por la alta incidencia de enfermedades foliares y patógenos que afectan la espigas. En todas las regiones trigueras de Paraguay se dan condiciones óptimas para la aparición y desarrollo de epidemias de la roya de la hoja. Esta es la enfermedad de mayor importancia económica en el cultivo de trigo por el costo que significa para los agricultores.

La principal medida de control de esta enfermedad es la utilización de variedades resistentes o tolerantes. A pesar de la utilización de la resistencia genética es necesario realizar una o dos aplicaciones para el control de la enfermedad en cultivares moderadamente resistentes, mientras que en variedades susceptibles como CD104 se realizan tres a cuatro aplicaciones de fungicidas basados en mezclas de triazoles y estrobilurinas, dependiendo del año y las condiciones climáticas (Kohli *et al.*, 2011). Esta situación se ve agravada ya que los cultivares que ocupan mayor área de siembra generalmente han tenido una corta duración de la resistencia debido a la aparición de nuevas razas virulentas del patógeno. Debido a este fenómeno, es necesario conocer las razas que componen la población del patógeno, de tal forma de integrar este conocimiento al desarrollo de cultivares resistentes. Esto permitiría identificar fuentes de resistencia efectivas a todas las razas presentes, así como caracterizar con mayor profundidad el comportamiento de cultivares comercialmente utilizados.

La información disponible de las razas de *Puccinia triticina* presentes en Paraguay es limitada y se desconoce el tipo y base genética de resistencia a roya de la hoja de los cultivares y líneas avanzadas liberadas por el Programa de Investigación de Trigo (PIT), lo que dificulta la incorporación de resistencia efectiva no redundante y ampliar la diversidad genética en las nuevas líneas del programa de mejoramiento genético del PIT. Para tener información sobre estos aspectos que incrementan la eficiencia del mejoramiento por resistencia, se plantea como objetivo de este trabajo identificar razas de *Puccinia triticina* presentes en Uruguay y caracterizar la resistencia a roya de la hoja de trigo expresada por líneas y cultivares seleccionados por el Programa de Investigación de Trigo (PIT) de Paraguay.

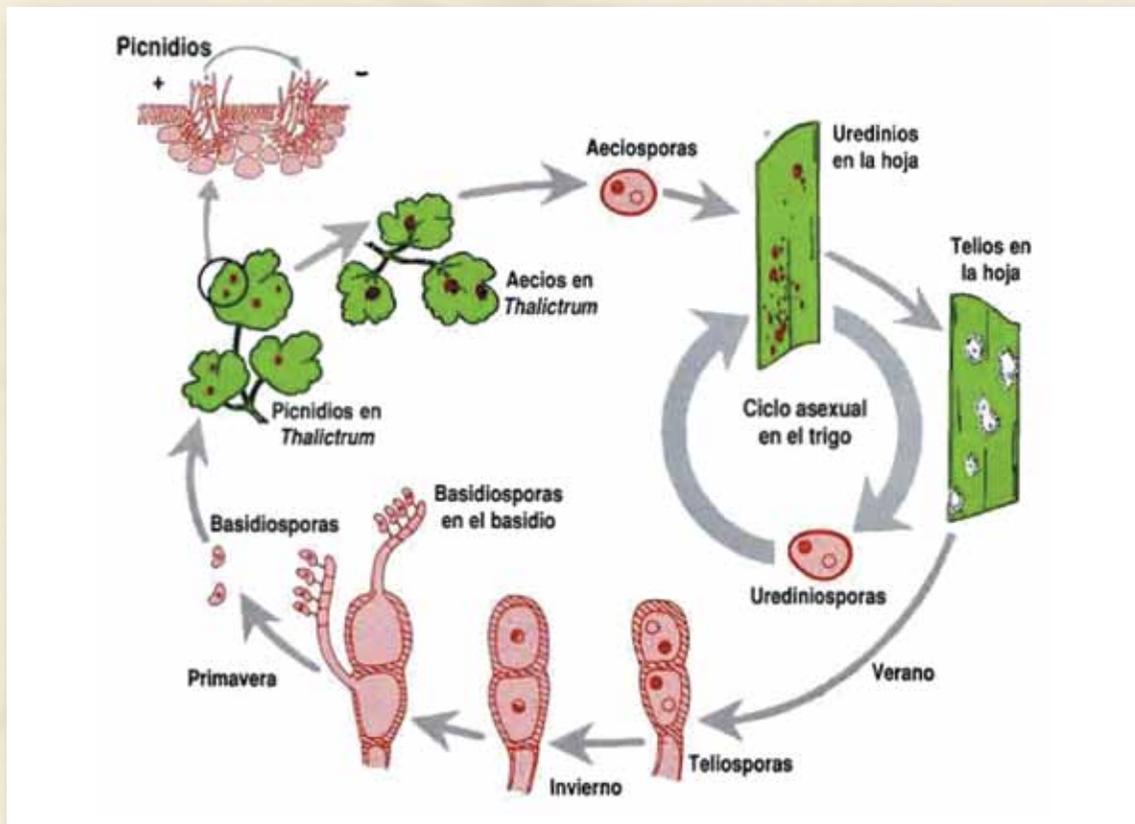
## LA ROYA DE LA HOJA

La roya de la hoja del trigo, causada por *Puccinia triticina*, es una de las enfermedades más importantes en el Paraguay y en el Cono Sur de Sudamérica (Viedma 2008, Germán *et al.*, 2007). Las pérdidas debidas a esta enfermedad reportadas en Argentina pueden alcanzar hasta un 30 % del rendimiento y 20 % del peso de mil granos, y en Brasil y Uruguay pueden ser mayores al 50% dependiendo del grado de resistencia del cultivar (Annone 2006, Galich *et al.*, 1998).

En Paraguay, las epidemias generalmente son más severas en Alto Paraná Norte y Canindéyú, donde la siembra es más temprana (Viedma, 2008). El control químico en cultivares susceptibles es fundamental para controlar la enfermedad, recomendándose iniciar las aplicaciones de fungicidas cuando se observan las primeras pústulas en el cultivo. Sin embargo, la principal estrategia destinada al manejo de esta enfermedad es a través de la resistencia genética (Kohli, 2003), que previene el desarrollo de la enfermedad sin costo adicional para los productores. Esta resistencia implica un valor agregado al germoplasma de características de adaptación, calidad y alto rendimiento (Kohli, 2003).

## CICLO BIOLÓGICO

Fig. 1. Ciclo biológico de *Puccinia triticina* y ciclo de la roya de la hoja del trigo.



Fonte: Roelfs et al., 1992.

En la Fig. 1 se observa el ciclo biológico de *P. triticina* y el ciclo de la roya de la hoja del trigo. El momento de cada fenómeno y la frecuencia de algunos de éstos (el ciclo sexual, el ciclo de cultivo del trigo y el “puente verde”) pueden variar según las zonas y regiones del mundo (Roelfs *et al.*, 1992).

En Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay el patógeno sobrevive entre los períodos de cultivo del trigo en un “puente verde” constituido por plantas de trigo voluntario, o sobre huéspedes alternativos (*Triticale*, *Agropyrum repens*, y *T. (Aegilops) cylindrica* L). El inóculo en forma de urediniosporas puede ser arrastrado por los vientos de una región a otra (Agrios 2005, Roelfs *et al.*, 1992).

El hongo puede sobrevivir como micelio incipiente por un mes o más cuando las temperaturas se acercan o son inferiores al punto de congelación. Se alcanza la esporulación máxima unos cuatro días después de la esporulación inicial con temperaturas favorables de aproximadamente 20°C. Un uredinio puede originar unas 3.000 esporas por día y si bien la cantidad puede variar mucho, esta producción puede continuar durante tres semanas o más si la hoja de trigo sigue viva durante ese tiempo. Estas esporas pueden ser transportadas a nuevos tejidos susceptibles produciendo varios ciclos secundarios de infección durante el mismo ciclo del cultivo si las condiciones son favorables para el patógeno, por lo tanto la roya de la hoja es una enfermedad policíclica (Germán 2007, Roelfs *et al.*, 1992).

## EPIDEMIOLOGÍA

Hay varias zonas en el mundo donde la roya de la hoja puede provocar grandes pérdidas, mientras que en otras regiones el clima es poco adecuado y se producen epifitias graves sólo cuando las condiciones ambientales son extremadamente favorables y se cultivan variedades muy susceptibles (Roelfs *et al.*, 1992, Samborski 1960, Samborski y Peterson, 1985).

En el Cono Sur (Argentina, Brasil, Uruguay, Paraguay y Chile), se han determinado dos zonas epidemiológicas (donde la enfermedad se incrementa y se propaga) (Roelfs *et al.*, 1992), separadas por la cordillera de los Andes (German *et al.*, 2007) Fig. 2. La siembra en un área extensa de trigo con cultivares susceptibles o moderadamente susceptibles permite que el patógeno que sobreviva en verano a través de grandes áreas y resulta en la aparición temprana de las epidemias (Germán *et al.*, 2007). La población del patógeno es muy dinámica, lo que lleva a una corta duración de la resistencia de los cultivares comerciales.

Fig. 2. Zonas epidemiológicas del cono sur.



Fonte: Germán, mod. 2013.

En general las condiciones ambientales de América del Sur favorecen la aparición de altas infecciones de esta enfermedad año tras año. La mayoría de las epifitias graves se presentan cuando los uredinios sobreviven al invierno en cierto nivel de umbral en el trigo, o cuando el trigo sembrado en primavera recibe tempranamente el inóculo exógeno (Roelfs *et al.*, 1992). Posteriormente la enfermedad se disemina en otras áreas donde el cultivo es sembrado en épocas normales recomendadas para las zonas trigueras de Brasil (Mehta, 1993).

## VARIABILIDAD DEL PATÓGENO

La población de *Puccinia triticina* es altamente variable entre años y cultivar. Las mutaciones son el mecanismo más importante de variación del patógeno. La variabilidad de la población de *P. triticina* determina que los cultivares sean remplazados frecuentemente (German *et al.*, 2011). Generalmente las nuevas razas virulentas causan reacción susceptible, sobre cultivares inicialmente resistentes, causando altos niveles de infección y daño, resultando el cambio de comportamiento de los cultivares (Germán *et al.*, 2011).

Las razas que afectan a un cultivar se incrementan según su área sembrada y decrecen en frecuencia cuando el mismo se deja sembrar o disminuye el área de siembra (Germán *et al.*, 2011). Las distintas razas han afectado a distintos materiales pudiendo identificar más de 100 razas desde el año 1991 (Germán *et al.*, 2009).

Es importante monitorear los cultivos aun cuando se utilicen variedades resistentes, ya que la mayor probabilidad de encontrar nuevas razas es las áreas extensas, que en experimentos (Germán *et al.*, 2011).

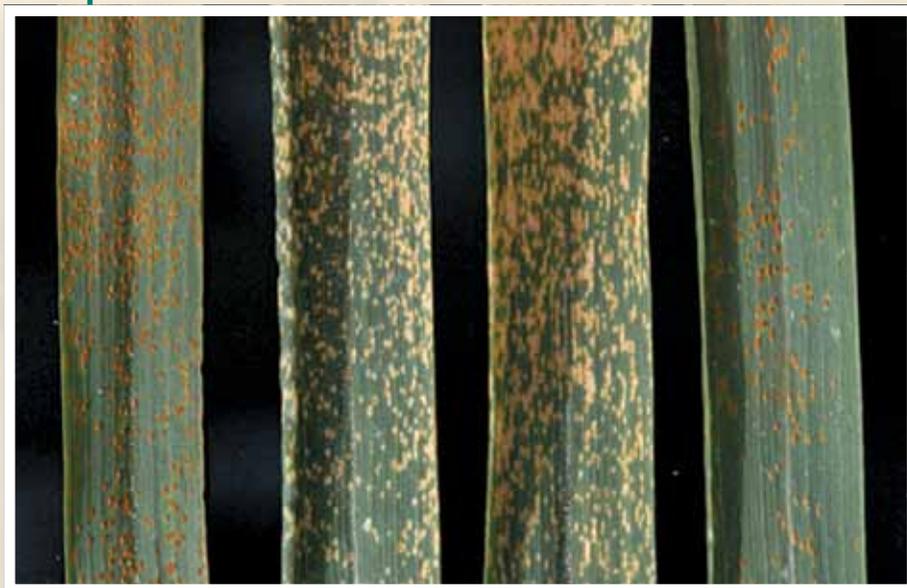
## MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA VARIACIÓN EN EL PATÓGENO

### Identificación de razas

Las poblaciones de roya de la hoja del trigo pueden subdividirse por reacciones de cepas genéticamente diferentes de trigo frente a aislamientos puros del parásito. Esta especialización fisiológica en royas del trigo fue reportado por primera vez por Jackson y Mains (1921), quienes diferenciaron 12 razas fisiológicas en 11 cultivares diferenciales. Tres de estas diferenciales fueron descartados posteriormente (Johnston y Mains, 1932), pero las restantes se convirtieron en un set aceptado internacionalmente.

Para identificar las diferentes razas de la población de *Puccinia triticina* se colectan muestras de distintos puntos de las zonas trigueras y de distintos cultivares. Se realizan aislamientos monopostulares y se inocula el Set diferencial utilizado actualmente: líneas cercanamente isogénicas de Thatcher cada una de ellas con un gen de resistencia. De acuerdo a la avirulencia/virulencia de cada aislamiento sobre las líneas del set se asigna un código de tres letras que se utiliza en Norteamérica (Long y Kolmer 1989) Cuadro 1, indicando también su virulencia sobre diferenciales adicionales *Lr10* y *Lr20*. Se estima por último la frecuencia de los aislamientos de cada raza en relación número total de aislamientos.

Inoculaciones artificiales ayudan a evaluar resistencia de distintas variedades en estado de plántula.



Cuadro 1. Código de asignación de letras, propuesto por Long y Kolmer 1989.

Tipo de infección <sup>b</sup> producidos sobre líneas <i>Lr</i> cercanamente isogénicas				
huésped 1	1	2a	2c	3a
huésped 2	9	16	24	26
huésped 3	3ka	11	17	30
Código Pt				
B	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo
C	Bajo	Bajo	Bajo	Alto
D	Bajo	Bajo	Alto	Bajo
F	Bajo	Bajo	Alto	Alto
G	Bajo	Alto	Bajo	Bajo
H	Bajo	Alto	Bajo	Alto
J	Bajo	Alto	Alto	Bajo
K	Bajo	Alto	Alto	Alto
L	Alto	Bajo	Bajo	Bajo
M	Alto	Bajo	Bajo	Alto
N	Alto	Bajo	Alto	Bajo
P	Alto	Bajo	Alto	Alto
Q	Alto	Alto	Bajo	Bajo
R	Alto	Alto	Bajo	Alto
S	Alto	Alto	Alto	Alto
T	Alto	Alto	Alto	Alto

<sup>a</sup>Pt El Código consiste en la designación del set I seguido por el de 2 etc. por ejemplo, la raza MGB: set 1(M)virulento to Lr1, 3a; set 2 (G) - virulento to Lr16; set 3 (B) - avirulent.

Tipo<sup>b</sup> de infección bajo (avirulento patógeno); tipo de infección alto (virulento patógeno).

## Interacción huésped – patógeno

La interacción huésped-patógeno, está dada por la capacidad de la planta de desarrollar estrategias de defensa. Cuando una espora de roya es depositada sobre la hoja del trigo, ésta tratará de penetrar a la epidermis de la hoja, el trigo rápidamente desarrolla una papila en el sitio de penetración, entonces el intento de infección falla. (Nicks y Lindhout, 2004). Esto significa que la infección del tejido de la planta depende de los genes presentes en esa planta. La interacción genética entre planta patógeno fue descrita mediante el modelo propuesto por Flor, 1956 “para cada de gen que condiciona la virulencia en el hospedante existe un gen específico que condiciona la patogenicidad”, un gen de resistencia solo es efectivo si el patógeno que infecta posee el correspondiente gen de avirulencia (Flor, 1956).

Sin embargo para algunos pares de genes correspondientes la interacción difiere a la clásica relación 1:1 (Huerta *et al.*, 2004, Kolmer 1996).

## Resistencia genética en el huésped

La resistencia genética es la capacidad del hospedante de enlentecer el desarrollo de un patógeno y se mide a través de la reducción de síntomas en relación a un material susceptible (Pereyra y Altier 2011, Daly 1983). Cuanto mayor es la uniformidad genética del huésped mayor es la probabilidad de la aparición de epidemias. Según el criterio utilizado (genético, interacción hospedante-patógeno, epidemiológico), se habla de distintos tipos de resistencia. La resistencia puede estar basada en genes de efecto mayor o en genes de efecto menor; la resistencia puede ser de tipo “raza específica” o “raza no específica” según la existencia o no de interacción diferencial entre cultivar y raza; la resistencia puede expresarse por una reacción de hipersensibilidad en el hospedante o manifestarse como resistencia dilatoria (Pereyra y Altier 2011, Niks *et al.*, 2011).

En el caso de resistencia genética a roya de la hoja operan distintos mecanismos de resistencia. La resistencia a la roya considerada desde el punto de vista genético puede ser de tipo monogénica está determinada por un solo gen de efecto mayor, claramente distinguible. Cuando la resistencia es poligénica está determinada por varios genes y éstos no tienen un efecto lo suficientemente grande para ser identificados y localizados y su efecto se expresa al combinarse como un todo (Roelf *et al.*, 1992)

La mayoría de los genes identificados que confieren resistencia a roya de la hoja son expresados en el estado de plántula, y otros son expresados en planta adulta (Kolmer, 1996).

Se ha estudiado la base de la resistencia de algunos materiales que han sido utilizados directamente o en cruzamientos por el PIT de Paraguay.

## MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA RESISTENCIA EN EL HUÉSPED

### Postulación de genes

Varios autores han utilizado la postulación de genes para indicar la presencia o ausencia de genes de resistencia en plántula a la roya de la hoja en el cultivo de trigo (Germán, 1996; Kolmer, 1996). La teoría de Flor de gen por gen (1955) señala que para cada gen que condiciona resistencia a la enfermedad en el huésped existe un gen específico en el patógeno que condiciona la avirulencia. La postulación de genes está basada en la comparación de los tipos de infección producidos en las líneas con resistencia desconocida y líneas con genes conocidos, utilizando aislados de roya de la hoja los cuales difieren en virulencia (Germán, 1996). Para la roya de la hoja es muy ventajoso contar con set completo de líneas isogénicas cercanas derivadas de Thatcher donde cada uno posee un gen conocido estén disponibles (Germán, 1996).

La postulación de genes provee evidencia pero no pruebas completas de identidad de genes de resistencia en el cultivo de trigo. (Roelfs *et al.*, 1992; Germán, 1996). La identidad de los genes de las plantas adultas generalmente no está óptimamente expresada en el estadio de plántula.

Es un método conveniente para identificar resistencia en plántulas conferida por uno o dos genes, dado que los resultados pueden ser obtenidos en una cuatro semanas y pueden ser analizados un largo número de líneas (Germán; 1996; Kolmer, 1996)

### Postulación en base a marcadores moleculares

Un marcador genético o marcador molecular es un segmento de ADN con una ubicación física identificable (locus) en un cromosoma y cuya herencia genética se puede rastrear (Nuez, F. y Carrillo, J.M., 2000). Un marcador puede ser un gen, o puede ser alguna sección del ADN sin función conocida. Dado que los segmentos del ADN que se encuentran contiguos en un cromosoma tienden a heredarse juntos, los marcadores se utilizan a menudo como formas indirectas de rastrear el patrón hereditario de un gen que todavía no ha sido identi-

cado, pero cuya ubicación aproximada se conoce (Nuez, F. y Carrillo, J.M., 2000). Los marcadores se usan para el mapeo genético como el primer paso para encontrar la posición e identidad de un gen (Nuez, F. y Carrillo, J.M., 2000).

Los marcadores moleculares han sido utilizados ampliamente por varios investigadores para identificar genes presentes en un material y para introducir genes de resistencia en cultivares de trigo a través de selección asistida (Germán, 1996).

Cabe destacar que *Lr34* ha continuado condicionando un efectivo nivel de resistencia a pesar de estar presente en cultivares que han sido desarrollados por un largo periodo de tiempo en muchas áreas de desarrollo de cultivos alrededor del mundo. No hay una explicación clara sobre la longevidad de la efectividad del *Lr34*. Por ejemplo, el hongo de la roya de la hoja del trigo está presente durante todo el año en las zonas de cultivo de trigo en Sudamérica. Trigos con *Lr34* están manteniendo niveles efectivos de resistencia en esta región a pesar de la gran cantidad de generación uredinial anual que debe dar amplia oportunidad para que los aislados con virulencia a este gen aumenten dentro de la población de *P. triticina*.

La selección de cual marcador molecular utilizar depende del objetivo del estudio, de las facilidades disponibles en el laboratorio, del costo, y de su poder de discriminación (Germán, 1996)

## Objetivos del trabajo

- Identificación de razas de *Puccinia triticina* en muestras recolectadas de Paraguay
- Caracterizar la resistencia a roya de la hoja de trigo en líneas y cultivares de Paraguay.

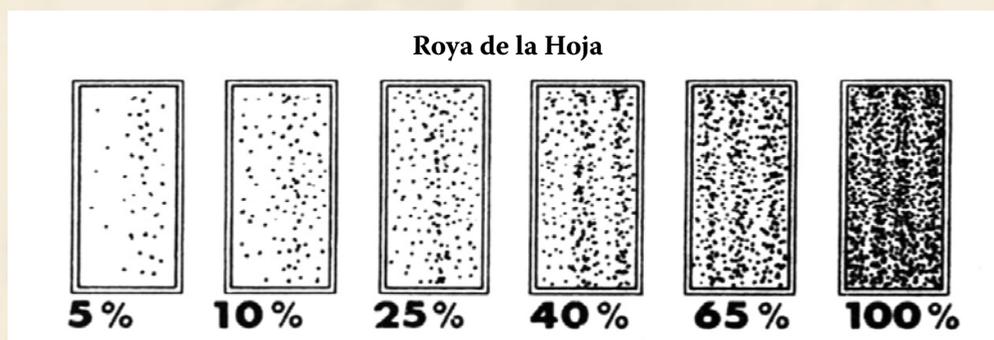
## Materiales y métodos

### 1. Genotipos

Ciento veintiocho genotipos de trigo harinero, obtenidos por el Programa de mejoramiento de Trigo, (PIT) y del Centro de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) se evaluaron bajos condiciones de campo durante el otoño-invierno de 2012 en la estación del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria La Estanzuela, (INIA), y en la localidad de Young departamento de Río Negro, Uruguay.

Estos genotipos se sembraron a mediados de junio 2012 en la estación experimental de INIA y principios julio 2012 en la parcelas de un 2 surcos de 1 m de cada material en bloques incompletos al azar por dos repeticiones y se utilizaron testigos susceptibles Thatcher, Thatcher *Lr34*, Avocet y Avocet *Yr18, Lr34*. En los bordes del ensayo se sembró una mezcla de diferentes materiales de trigo susceptible, esto aseguró la presencia de fuente de inóculo de roya durante el experimento.

Se realizaron cuatro evaluaciones o en la Estación de INIA, y tres evaluaciones en Young, cada ocho-15 días en función a las condiciones climáticas favorables desde el estado de encañazón. La severidad de la roya de la hoja se determinó según la escala de Cobb modificada con niveles de 1 a 100 % de severidad (Peterson *et al.*, 1948).



La reacción de las hojas bandera con uredinios pequeños rodeados por necrosis y se clasificó como resistentes (R), con uredinios moderados rodeados por necrosis como moderadamente resistente (MR), con uredinios grandes rodeados por clorosis como moderadamente susceptible (MS), con uredinios grandes sin necrosis o clorosis fueron calificados como susceptibles (S), y las hojas con una mezcla de reacciones resistentes y susceptible como mixtas (M) (Germán y Kolmer, 2012). Cuando se dieron mezclas de dos reacciones, la más frecuente se utilizó en primer lugar. Se calculó el coeficiente de infección (CI) definido como severidad por reacción, donde R= 0.2, MR=0.4, MRMS o M=0.6, MS=0.8 y S=1. Posterior a ello realizó el cálculo de AUDPC del Coeficiente de Infección el área bajo la curva de la enfermedad utilizando la fórmula  $AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} [(t_{i+1} - t_i)(y_i + y_{i+1})/2]$  y se realizó el análisis de varianza ANOVA utilizando el Modelo lineal Mixto y se compararon las medias de los materiales utilizando MDS.

## 2. Razas de roya de la hoja

Se seleccionaron 21 razas de *P. triticina* del banco de razas del laboratorio de royas de INIA La Estanzuela en base a su prevalencia y distinta combinación de avirulencia/virulencia, que fue confirmada en base a los genes *Lr1, 2a, 2c, 3, 9, 16, 24, 26, 3ka, 11, 17, 30, 110, 14a, 14b, 20, 21, 23, 27+31, 19, 3bg, 18, 25, 28, 41, 42, 2b, 29, 32, 33, 36, 37, 38, 44, 47, 51* y *B* (Long y Kolmer *et al.*, 2008), Cuadro 2.

Cuadro 2. **Fórmula de avirulencia/virulencia de las 21 razas seleccionadas\***.

N°	Razas	Gen <i>Lr</i>													
		<i>1</i>	<i>2a</i>	<i>2c</i>	<i>3</i>	<i>9</i>	<i>16</i>	<i>24</i>	<i>26</i>	<i>3ka</i>	<i>11</i>	<i>17</i>	<i>30</i>	<i>10</i>	<i>20</i>
1	CHT	B	B	B	A	B	A	B	A	A	A	A	A	B	B
2	MCD-10,20	A	B	B	A	B	B	B	A	B	B	A	B	A	A
3	MCP-10	A	B	B	A	B	B	B	A	A	B	A	A	A	B
4	MCR-10	A	B	B	A	B	B	B	A	A	A	B	A	A	B
5	MDT	A	B	B	A	B	B	B	A	A	A	A	A	B	B
6	MFP-10,20	A	B	B	A	B	B	A	A	A	B	A	A	A	A
7	MFP-20	A	B	B	A	B	B	A	A	A	B	A	A	B	A
8	MFR	A	B	B	A	B	B	A	A	A	A	B	A	B	B
9	MFT-10,20	A	B	B	A	B	B	A	A	A	A	A	A	A	A
10	MHP-10	A	B	B	A	B	A	B	A	A	B	A	A	A	B
11	MMD-10,20	A	B	B	A	A	B	B	A	B	B	B	A	A	A
12	SPG-10	A	A	A	B	A	B	A	A	B	A	B	B	A	B
13	TDT-10,20	A	A	A	A	B	B	B	A	A	A	A	A	A	A
14	BBB-10,20	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
15	KDG-10,20	B	A	A	A	B	B	B	A	B	A	B	B	A	A
16	LPG-10	A	B	B	B	A	B	A	A	B	A	B	B	A	B
17	DBB-10,20	B	B	B	A	B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
18	MCD-10	A	B	B	A	B	B	B	A	B	B	A	B	A	B
19	MCP-10	A	B	B	A	B	B	B	A	A	B	A	A	A	B
20	MCT-10	A	B	B	A	B	B	B	A	A	A	A	A	A	B
21	MKD	A	B	B	A	B	A	A	A	B	B	A	B	B	B

\*La reacción A= Alta o susceptible y B=Baja o resistente

Las esporas de las razas utilizadas se conservaron en tubos de vidrio al vacío en una heladera a 5 °C., previa a la utilización se les asignó un tratamiento de hidratación a temperatura ambiente, para el incremento de las razas se sembró 15 semillas del material (“Little Club”) en una maceta de 10 cm de diámetro con una mezcla de relación 1:1:1:1 de tierra, vermiculita, sustrato y arena. Al momento de la emergencia cada maceta fue tratada con 20 cm<sup>3</sup> de hidrácida maleíca con el fin de reducir el desarrollo de la planta e intensificar la producción de esporas. Las plántulas fueron inoculadas cuando la primer hoja totalmente expandida (aproximadamente a los 7 días post-siembrá), con esporas secas, mediante el método de espolvoreo, directamente sobre la hoja utilizando una espátula de metal (Roelfs *et al.*, 1992), posterior a ello, fueron sometidas a una cámara húmeda durante 14 a 16 horas, en condiciones de oscuridad y temperaturas de 15 a 25 °C, luego fueron llevadas a un invernáculo donde cada maceta fue aislada en una jaula de plástico con un sistema ventilación, el cual impide la contaminación con esporas exógenas u otros microorganismos.

A los 7 días se seleccionaron y se cortaron las plántulas dejando una sola pústula. De ese único uredinio se extrajo las esporas a los 12 días posteriores del corte con un extractor especial, luego con una cápsula fueron capturadas las esporas, se le agregó un aceite liviano y es inoculó el set diferencial previamente sembrado que está compuesto de las líneas isogénicas de “Thatcher”, cada una con un gen de resistencia diferente de resistencia *Lr 1, 2a, 2c, 3, 9, 16, 24, 26, 3ka, 11, 17, 30, 10, 20* (set diferencial) en el estado de primer hoja expandida.

El Inóculo fue incrementado en un material llamado “Little club”, susceptible universal una vez que se obtenía la raza pura ésta se inoculó con Twin 20, se dejó evaporar y luego se introdujo a una cámara con 100% de humedad por 16 horas, posterior a ello se trasladó al invernadero con temperatura y humedad controlada y se colocó en una jaula de la misma manera que para la obtención de razas (Roelfs, *et al.*, 1992; Kolmer, 1992, Germán, 1996)

### 3. Postulación de genes expresados al estado de plántula

Para la postulación de genes de resistencia a roya de la hoja se evaluaron al estado de plántula los genotipos de trigo originados por el Programa de mejoramiento de trigo de Paraguay, incluyendo a Thatcher como testigo susceptible, el set de diferenciales utilizado para la identificación de razas más 14 genotipos cada uno de los cuales posee un gen de resistencia., a los 12 días luego de la inoculación se evaluaron los tipos de infección (TI) de acuerdo con la escala descrita por Stakman *et al.*, 1962 : TI 0 = respuesta inmune, sin uredinios o necrosis; TI fleck = lesiones necróticas sin esporulación; TI 1 = pequeños uredinios rodeados por necrosis; TI2 = pequeños uredinios rodeados por clorosis, TI 3 = uredinios moderados sin clorosis o necrosis; TI 4 = uredinios grandes sin clorosis o necrosis. Se utilizó + y - para indicar el tamaño más grande y más pequeño de los uredinios que el TI clásico, respectivamente. Para determinar qué genes de resistencia (*Lr*) están presentes, los patrones de TI de los genotipos en estudio se compararon con los TI producidos en las líneas portadoras de genes únicos de resistencia a roya de la hoja (German y Kolmer 2012).

### 4. Caracterización Genotípica con marcadores moleculares *Lr34*.

Para la identificación de la presencia del gen *Lr34* en APR (Resistencia en Planta Adulta) fueron utilizados los marcadores: *csLV34* para el *Lr34* (Lagudah *et al.*, 2006). La extracción de ADN y la amplificación por PCR de las líneas de ADN de trigo junto con la determinación de los alelos marcadores asociados con genes TAE en la electroforesis en gel fueron realizados con los métodos CTAB y siguiendo los protocolos de CIMMYT respectivamente (CIMMYT, 2005).

Para cada uno de los genes de APR, la amplificación por PCR el ADN de Parula, el cual se utilizó como control para los tamaños esperados del alelo marcador.

## 5. Identificación de razas

Se estudiaron al menos 25 muestras colectadas durante la zafra 2012. Se sembraron 15 semillas del material (Little Club). Al producirse la emergencia cada maceta se trató con 20 cm<sup>3</sup> de hidrácida maleíca con el fin de reducir el desarrollo de la planta en intensificar la producción de esporas. A los 7 días, con 1er hoja en desarrollo, las plántulas fueron inoculadas con espóra proveniente de una muestra, utilizando una espátula (Roelfs *et al.* 1992; Germán y Kolmer 2012) Luego las plántulas se mantuvieron en cámara húmeda durante 14 a 16 hs. en condiciones de oscuridad. Seguidamente las macetas se trasladaron al invernáculo (German y Kolmer 2012). Una vez observados los puntos de infección se cortaron las plántulas de cada maceta dejando dos plántulas con una sola pústula cada una, con el objetivo de evitar contaminación. De cada pústula se succionaron esporas con un microsuctor, analizando dos aislamientos monopustulares por muestra.

Por cada aislamiento monopustular se sembró un set diferencial integrado por las líneas isogénicas de Thatcher, cada una de las cuales posee uno de los genes de resistencia *Lr 1, 2a, 2c, 3, 9, 16, 24, 26, 3ka, 11, 17, 30* descrito por Long y Kolmer (1989) y dos diferenciales adicionales (*Lr10, 20*)

## Resultados

### 1. Genes postulados en los 128 genotipos

En el estudio de los genotipos inoculados con 21 razas en plántula se pudieron postular los siguientes genes en los materiales de Paraguay: *Lr1,2,3,9,10,11,16,17,23,24,26,27+31,30* (Cuadro 3). Se observó que los materiales evaluados presentaron menores severidades a roya de hoja que los testigos susceptibles, los valores de las medias de los materiales fueron menores a las medias de los testigos susceptibles.

Cuadro 3. **Genes postulados en los diferentes materiales utilizados y su reacción en campo.**

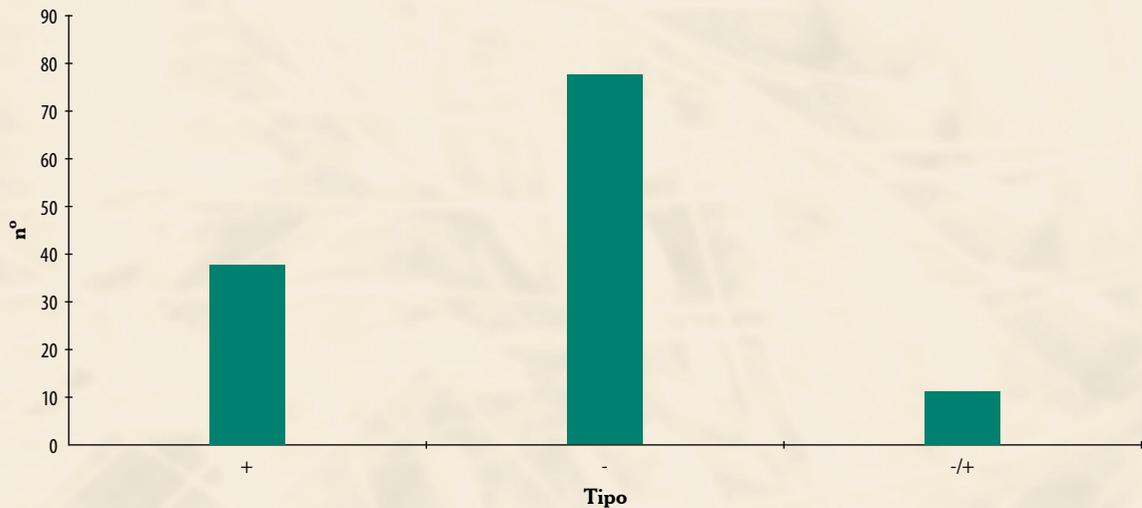
Cruza	por A/V y TI	Reacción a campo
PRL/VEE#6//CLMS/3/ITAPÚA 55	<i>Lr1,26, 27+31+3bg</i>	R
C 91181/ORL 980204	<i>Lr1,9,24,10,11,23,26</i>	R
WBLL1*2/TUKURU	+	R
PRINIA/STAR// P SUPERIOR/CRDN	<i>Lr3o3bg,26,3ka,30Lr11,23</i>	R
ITAPÚA 45/CORDILLERA 4	<i>Lr1,2a,b o c10,11,23,26,+Lr23,</i>	R
MILAN/KAUZ//PASTOR/3/PASTOR	<i>Lr3 o 3ka,10,11,23,30,27+31</i>	R
ND643/2*WBLL1	<i>Lr23,26+</i>	R
WBLL1*2/TUKURU	+	R
CEP 99173/PEWITI	<i>Lr3,10,+</i>	R
ITAPÚA 40/CARCOVE//JUP*5/AMIGO	<i>Lr1,24,10Lr11,23,26</i>	R
MILAN/KAUZ//PASTOR/3/PASTOR	<i>Lr3a,3ka,10,11,17,26,27+31,+Lr23,30,</i>	MR
ND643/2*WBLL1	<i>Lr 26,3ka,30+</i>	MR
ITAPÚA 45/CORDILLERA 4	<i>Lr10,24Lr 11,23</i>	MR
ITAPÚA 40/CARCOVE//JUP*5/AMIGO	<i>Lr1,2a,b o c10,11,26,+</i>	MR
IAN 10/CANINDÉ 3	<i>Lr1,3a,3ka o3bg,10 24,26,11,17,Lr30,23,</i>	MR
KAMBARA2/4/BABAX/LR42//BABAX/3/BABAX/LR42	<i>Lr27+31+</i>	MR
SUZ6/OPATA	+	MR
PRL/VER#6//CLMS/3/ORL 99393	<i>Lr1,3a,3ka,20,24,26,17,27+31Lr3ka, 23,30</i>	MR
Itapúa 45/Itapúa 40	<i>Lr3(a,ka o bg),26,30,+</i>	MR
CEP 99173/PEWITI	<i>Lr3,24,11,10,23 +</i>	MR
CD-112/ITAPÚA 50	<i>Lr,26,23,27+31Lr30</i>	MR

KAMBARA2//MILAN/AMSEL	+	MR
PRL/SARA//TSI/VEE#5/3/FINSI	Lr27+31	MRMS
ITAPÚA 45/CORDILLERA 4	Lr1,24,10,11,23,26	MRMS
WBL4//BABAX.1B.1B*2/PRL/3/PASTOR	Lr3,10, 27+31	MRMS
EMBRAPA 120/WEEBILL2	Lr3a,Lr11,23	MRMS
WBL1*2/BRAMBLING	+	MRMS
Itapúa 45/Canindé 1	Lr1,(3a o bg),26,17,10 +	MRMS
TNMU/6/CEP80111/CEP8165/5M/7/WBL1*2/ TUKURU	Lr1,23,26+	MRMS
KAUZ*2//K134(60)/VEE/3/ATTILA/4/MILAN/KAUZ	Lr26+	MRMS
Canindé 11	Lr26,27+31	MRMS
TNMU/CBRD//MILAN/SHA7	Lr 3ka,10,16,26,27+31,Lr30	MRMS
ITAPÚA 40/KURUKU	Lr23+	MRMS
CD108/3/SRMA/TUI//BABAX	Lr23+	MRMS
IAN 10/CANINDÉ 3	Lr3,10,27+31	MRMS
WBL4/KASO2//PASTOR	Lr23+	MRMS
EMB16/CBRD//CBRD	+	MRMS
KAUZ*2//K134(60)/VEE/3/ATTILA/4/MILAN/KAUZ	Lr3bg+	MRMS
BABAX/PASTOR/3/KAUZ*2/YACO//KAUZ	+	MS
CS/TH.SC//3*PVN/3/MIRLO/BUC/4/MILAN/5/TILHI	Lr10+	MS
Parula/IAN 10	Lr10,23,26,	MS
PARULA/CD 104	Lr26+	MS
Parula/IAN 10	Lr23+	MS
ITAPÚA 40/KURUKU	+	MS
WBL2//MILAN/AMSEL	+	MS
Itapúa 70	Lr23+	MS
ITAPÚA 40/KURUKU	Lr3bg,23,26,27+31+	MS
IAN 10/ITAPÚA 70	Lr10,26,30,+	MS
TNMU/6/CEP80111/CEP8165/5M/7/IAPAR 85	+	MS
SITE/FINSI	Lr26, 3bg	MS
Itapúa 45//TUI/RL 4137	Lr3,11,23,27+31Lr11	MS
Itapúa 40/CEP 36	Lr16,26+	MS
WBL4/5/BABAX.1B.1B*2/PRL/3/PASTOR/4/OC 946/ PF906	+	MS
WBL2/BR18	Lr26,27+31	MS
CD 150	+	MS
GUS/3/PRL/SARA//TSI/VEE#5/4/FRET2	Lr1,3a,3bg,10,16,26,27+31	MS
GUS/3/PRL/SARA//TSI/VEE#5/4/FRET2	+	MS
ITAPÚA 40/KURUKU	+	MS
CD114//WBL1*2/TUKURU	Lr26+	MS
ITAPÚA 40	+	MS
ITAPÚA 40/KURUKU	+	MS
PRINIA/STAR//MILAN/MUNIA	+	MS
ITAPÚA 40//RL 6000=Thatcher*7/Webster=Lr2a	Lr23+	MS
IAN 10/ITAPÚA 70	Lr26,+	MS

## 2. Postulación de la presencia de *Lr34* en base a un marcador molecular

La presencia del gen *Lr34* se determinó en 39 genotipos, 78 no presentaron el alelo marcador mientras que 12 materiales fueron heterocigotos. Fig. 3.

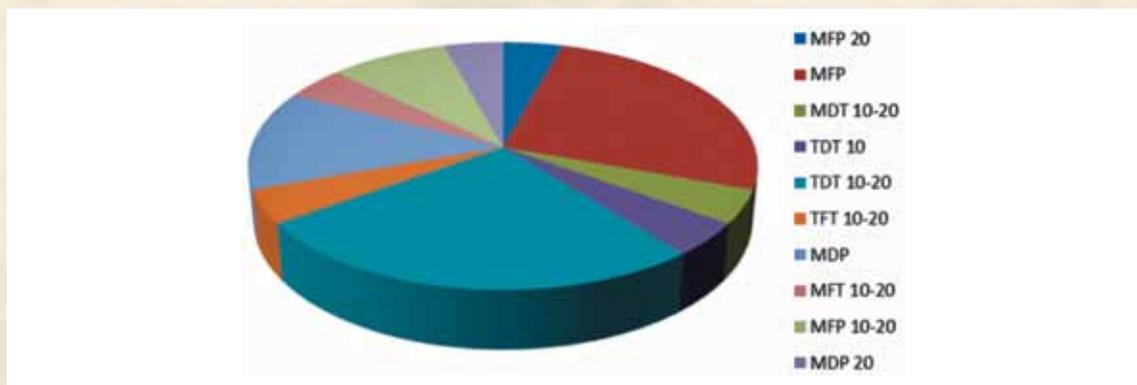
Fig. 3. Presencia de gen *Lr34* en los materiales de trigo.



## 3. Identificación de razas de *Puccinia triticina* en muestras recolectadas de Paraguay

Del total de las 20 muestras analizadas se realizaron 50 aislamientos y se identificaron 10 razas (MFP-20, MFP, MDT-10,20, TDT-10, TDT-10,20, TFT-10,20, MDP, MFT-10,20, MFP-10,20, MDP-20) Fig. 4.

Fig. 4. Razas identificadas en muestras recolectadas de Paraguay.



Los resultados reportados en este trabajo confirman la amplia variabilidad en el germoplasma nacional en cuanto a su resistencia a la roya de hoja y las razas del patógeno presentes en el país. Los resultados presentados en el Cuadro 3 son amplio testimonio que la resistencia a la roya de la hoja, siendo manejada por el programa de mejoramiento, está basada en una combinación de genes diferentes que garantizan su eficacia ante los constantes cambios del patógeno. Sin embargo, en la mayoría de los casos, estas combinaciones son basadas en los genes cualitativos en estado de plántula que no necesariamente pueden perdurar en el campo. Por otra parte, la presencia del *Lr 34*, en casi 30% de los materiales, es muy positiva para asegurar cierto nivel de resistencia

en el campo y no estar completamente expuestos a los cambios raciales que pueden ocurrir. Aun así, será de gran interés para el programa incrementar la introducción de resistencia en estado de planta adulta junto con las bases ya presentes. La liberación comercial de las variedades como Canindé 12 y Canindé 13, poseedoras de la resistencia en estado de planta adulta es el primer paso para estabilizar la población de este patógeno en el país. Se espera que los estudios futuros sobre la variabilidad del hongo en distintas partes del país nos ayuden a seguir identificando mejores variedades resistentes para impulsar su uso entre los productores para un mejor manejo de control integrado y no solo abaratar el costo de producción sino también mejorar el medio ambiente.

## Bibliografía

- Agrios, G.N. 1995. Fitopatología 2da edición. Pp12-13, 470-493.
- Barcellos A. 2002. Postulación de genes (Lr) Resistencia a la roya en las variedades Brasileñas de Trigo. Fitopatología Bras. Vol. 27 N° 5.
- CAPECO 2014.. Área de siembra, Producción y Rendimiento de Trigo en Paraguay. Disponible en [www.capeco.org.py](http://www.capeco.org.py)
- Flor, H.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. Annu. Rev Phytopathol. 9:275-296.
- Flor, H.H. 1956. The complementary genetic systems in flax and flax rust. Adv. Genet. 8: 29-54.
- Germán, S.1996. Genetic of Leaf Rust Resistance of selected Uruguayan Wheat Cultivars Pp135.
- Germán, S; Barcellos, A; Chaves, M; Kohli, M; Campos, P y Viedma, L. 2007a. The situation of common Wheat rusts in the Southern Cone of America and perspectives for control. Australian Journal of Agricultural Research 58: 620-630.
- Germán, S.; Chaves, M.; Campos, P.; Viedma, L. y Madariaga, R. 2009a. Are rust pathogens under control in the Southern Cone of South America. In: McIntosh, R.A. History and status of the wheat rusts. In: March 2009. Cd. Obregon, México: BGRI Pp 65-73.
- Germán, S.; Verges, R.; Von Zitzewitz, J.; Díaz, M. y Vázquez, D. 2009. Mejoramiento genético por Resistencia durable a roya de la hoja. In: Mesa Nacional de Trigo. Décimo Primera Jornada de Rendimiento y Calidad de Trigo, 2009 Dolores Mesa Nacional de Trigo. Sp.
- Germán, S. E. and Kolmer J.A. 2012. Leaf Rust Resistance in Selected Uruguayan Common Wheat Cultivars with Early Maturity. Crop Sci. 52:601-608 doi: 10.2135/cropsci2011.06.0335.
- Huerta J.; Singh R.P.; Villaseñor H.E.; Rangel E.E. y Leyva S.G. 2003. Postulación de genes de resistencia a la roya de la hoja (Puccinia triticina Ericks.) en Plántula y Planta Adulta en genotipos Elite de Trigo harinero (Triticum aestivum L.). Revista Mexicana de Fitopatología pp. 239-247.
- Kolmer, J.A. 1997. Especialización fisiológica de Puccinia triticina, en Canadá en 1997.
- Kohli, M. y Reis, E. 1994. Estrategias en el control de enfermedades de Trigo: In Trucco, V. (ed.). Estrategias para una producción sustentable. III Congreso Nacional de Siembra Directa; Villa Giardino, Córdoba (Argentina); 31 de agosto -2 de setiembre 1994. 174-192p.
- Kohli, M. 2003. Resistencia genética a enfermedades de trigo en el Cono Sur. Panorama pasado, Actual, y futuro de la roya de la hoja. 16p.
- Kohli, M. 2009. Análisis de los Avances en el Mejoramiento de Trigo durante 2003-2007 y Prioridades futuras. 3p.
- Kohli, M.M.; de Viedma, L. y Cubilla, L. E. 2010. Manual del Productor, Guía para la Producción de Trigo MAG/DIA/CRIA/CAPECO.40 Páginas: 19 x 27 cm.
- Kohli, M.M., R. Pedretti and L. de Viedma. 2011. History of Wheat Breeding in Paraguay. Chapter 19. In: Bonjean, A.P., W.J. Angus and M. van Ginkel (eds.) The World Wheat Book. Vol. 2. History of Wheat Breeding. Pp 467-500. Lavosier Publishing. 2011. ISBN 978-7430-1102-4
- Mehta, Y.R. 1993. Manejo Integrado de Enfermedades del Trigo. P 126-135.
- Pereyra, S. y Altier, N. 2010. Desarrollo de epidemias en cultivos: Análisis de sus componentes para un manejo integrado.
- Roelfs, A.P.; Singh, R.P. and Saari, E.E. 1992. Las royas del trigo: Conceptos y métodos para el manejo de esas enfermedades. México. D. E.: CIMMYT.81PP.
- Viedma, L. 2008. Royas de la hoja en trigo. Visto el miércoles 05/06/ 2013. <http://archivo.abc.com.py/suplementos/rural/articulos.php?pid=438546>
- Wiese MV. 1987. Compendium of wheat diseases. Second edition. APS Press. USA. 112p. Zoldana S.

# Preguntas o Comentarios

---

## Dr. Man Mohan Kohli

Tengo una consulta, no vi el porcentaje de las muestras que pertenecieron a que razas ni la frecuencia de razas prevalentes en el país.

## Ruth Scholtz

No puse el análisis en la presentación pero si lo analicé. Como había materiales en donde me salían 2 razas, es un poco complejo de presentar, pero sí se tienen todos los datos.

## Dr. Kohli

Se puede saber cuál fue la principal raza observada?

## Ruth Scholtz

La TDT, que estuvo presente en casi todas las muestras.

## Dr. Kohli

La otra pregunta que me surge mirando los datos de la postulación: tienes identificadas las combinaciones de 27+31 y 1+3, que son principales. Los tres genes son susceptibles, entonces de donde viene la resistencia que observamos?

## Ruth Scholtz

Tendríamos que realizar otros estudios, utilizar marcadores moleculares, ver otros tipos de análisis.

## Pregunta

*¿Son buenos, en cuanto a características agronómicas, los materiales que encontraste moderadamente resistentes?*

**Ruth Scholtz.** En general todos los materiales fueron mejores con características de potencial de rendimiento para Paraguay. Estos fueron llevados a Uruguay para hacer los estudios.

## Pregunta

*Y eso lo vas a hacer aquí en Paraguay para ver si se manifiesta la misma reacción o el efecto ambiente es diferente.*

**Ruth Scholtz.** Los trabajos en realidad se hicieron en invernáculos. Ahora en los de campo, si podría haber alguna diferencia. Es posible que Uruguay tenga una raza más o menos virulenta que nosotros o distinta, entonces ahí sí podría variar. La idea es seguir con el trabajo aquí.

### Marcelo Huelguera

*¿Encontraste algunas plantas en los cuales no tenía Lr34 y tenían resistencia durable; como las determinaste fenotípicamente?*

### Ruth Scholtz

Por las lecturas en las evaluaciones de campo. Se calculó el coeficiente de infección y de ahí caracterizamos que podría tener resistencia en planta adulta, pero habría que hacer estudios de genes menores que pudieron estar conteniendo resistencia. Hay 4 genes menores con los que debíamos empezar a trabajar.

### Gerónimo Watson

Una consulta para sacarme la curiosidad nada más, en el gen que mostrabas del Lr34, son marcadores co-dominantes y tenías 2 bandas es porque tienes heterocigosis.

### Ruth scholtz

Si había heterocigosis por que el marcador csLV no es un marcador perfecto. Está a 0.4 centimorgan del gen y se tienen marcadores perfectos solo que no pudimos ajustar. Es una cuestión de fondos y tiempo; pero si se quiere seguir trabajando con eso para evitar heterocigosis.

*El Equipo del Proyecto trigo en Capitán Miranda, Itapúa.*





# Avances en la investigación de la fusariosis de la espiga en Paraguay

**ANDREA ALEJANDRA ARRÚA**

Email: [aaarrua@gmail.com](mailto:aaarrua@gmail.com)



## Resumen

Dentro de la economía del agro, el Trigo se ha situado como el cultivo clave para los meses de invierno, que aporta millones de dólares anuales al patrimonio nacional. En el campo y como parte del sistema de rotación, el trigo contribuye con una gran cantidad de rastrojos de excelente calidad para cubrir el suelo, lo que ayudó a instalar el sistema de siembra directa en el país. Uno de los patógenos más importantes asociados a este cultivo es el *Fusarium*. Este hongo es capaz de sobrevivir en restos de cultivos de otros cereales, otras especies de gramíneas y malezas. Son responsables de marchitamientos, podredumbres de la raíz y canchales en una amplia variedad de plantas. Provocan grandes pérdidas económicas en la agricultura y en la industria de procesamiento y transformación en alimentos. Además, algunas de las especies de este género son capaces de producir metabolitos secundarios conocidos con el nombre de **micotoxinas**, que causan enfermedades severas agudas y crónicas en animales y humanos al ingerir productos contaminados por ellas. La Fusariosis de la espiga es una enfermedad importante en Paraguay. Afecta la producción del grano, su calidad y el daño más significativo es la presencia de micotoxinas. En el país, la presencia de la enfermedad se ha incrementado en los últimos años debido principalmente a cambios en los sistemas de producción. Es por esas razones, tanto sanitarias como económicas, que se planteó el estudio de las especies de *Fusarium* presentes en Trigo, princi-

palmente aquellas potencialmente productoras de micotoxinas, así como la selección de material vegetal tolerante a la infección del hongo y acumulación de Deoxinivalenol. En ese sentido se vienen realizando estudios en diferentes áreas que incluyen estudios de las características del patógeno, de la planta y mecanismos de interacción hospedero-patógeno en el patosistema Trigo-*Fusarium graminearum*.

## Abstract

### Progress in the research on Fusarium Head Blight of wheat in Paraguay

*Wheat has established itself as an important crop for the winter months in the national economy, which provides millions of dollars annually to the national treasury. As a part of the rotation system, wheat crop contributes large amounts of high quality residue to cover the soil and help install the conservation tillage system practiced in Paraguay. Fusarium Head Blight is one of the most important pathogens associated with the wheat crop. This fungus is capable of surviving on the crop residues of wheat, other cereals and species of grasses and weeds. It is responsible for the leaf blight, root rot and head infection on a wide variety of plants. The fungus provokes large economic losses in agriculture as well as in food and feed processing industries. Moreover, some species of this genus are capable of producing secondary metabolites known as mycotoxins, which can cause acute or chronic diseases in humans and animals by ingesting contaminated products. In Paraguay, the Fusarium Head Blight is a major wheat disease affecting grain production, quality and most importantly the presence of mycotoxins. The disease seems to have increased over the last few years primarily due to the changes in the production system. For these reasons, a study was undertaken to identify Fusarium species present in the wheat crop and especially those potentially producing mycotoxins. An additional objective was to identify germplasm resistant to the fungal infection and accumulation of Deoxynivalenol toxin. The results of these studies on the characterization of the pathogen and its interactions within Wheat/*Fusarium graminearum* pathosystem are reported here.*

Distintas especies de *Fusarium* presentes en una muestra de campo.



## INTRODUCCIÓN

Dentro de la economía del agro, el trigo se ha situado como el cultivo clave para los meses de invierno ya que aporta millones de dólares anuales a la economía nacional. En el campo y como parte del sistema de rotación de cultivos, el trigo contribuye con una gran cantidad de rastrojos de excelente calidad para cubrir el suelo, lo que ayudó a instalar el sistema de siembra directa en nuestro país.

Uno de los patógenos más importantes asociados a este cultivo es *Fusarium sp.* Este hongo es capaz de sobrevivir en restos de cultivo de trigo y otros cereales como maíz, cebada, sorgo, etc. Así como en otras especies de gramíneas y malezas. El incremento de la utilización de prácticas de laboreo conservacionistas ha sido reportado como una de las principales causas de epidemias de **Fusariosis de la espiga** en países como EEUU y Canadá. En Sudamérica han sido mencionados datos similares.

Para el desarrollo de la enfermedad se deben dar ciertas condiciones ambientales, que en nuestro país ocurren durante el invierno: lámina de agua sobre las espigas, temperatura de 18 a 30°C. La infección ocurre por las anteras al momento de la floración. Si las condiciones son propicias pueden ocurrir epifitias.

## LA FUSARIOSIS DE LA ESPIGA DEL TRIGO

Los síntomas principales son: blanqueamiento de las espigas y espiguillas, color rosa de las espigas, y a medida que avanza la infección la aparición de puntos negros que corresponden a los cuerpos de fructificación del hongo; aborto de flores, granos chuzos, chupados y de bajo peso y granos blancos a gris claro, principalmente.

Las especies de *Fusarium* constituyen un grupo cosmopolita, hemibiotrófico y polífago 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.

Otro problema asociado a estas especies es la producción de metabolitos secundarios tóxicos, llamados micotoxinas, que producen síndromes llamados micotoxicosis en humanos y animales al ingerir productos contaminados por ellas.

Las principales especies reportadas como productoras de Fusariosis de la Espiga, tanto del complejo *Fusarium graminearum* como especies asociadas se resumen en la Tabla 1.

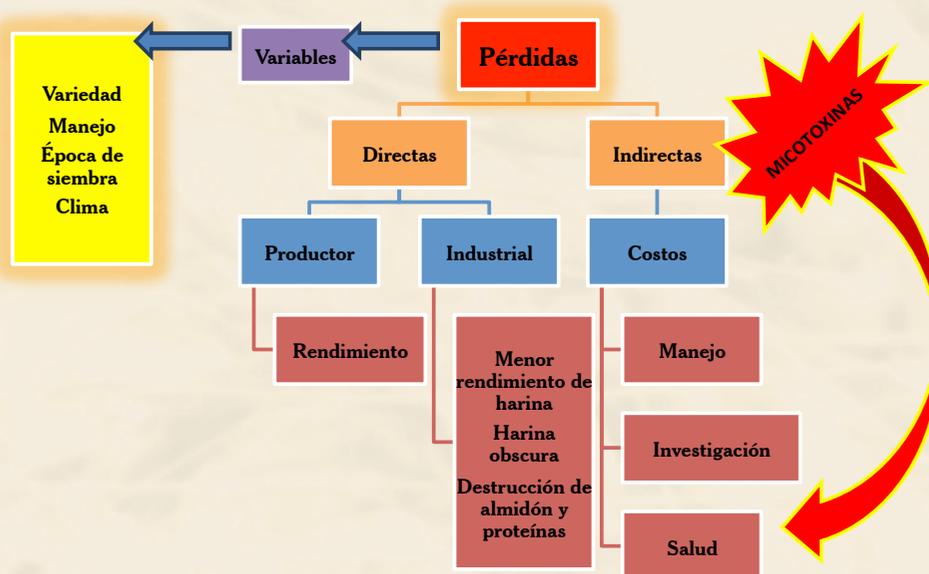
Tabla 1. **Especies de *Fusarium* reportadas como asociadas a la Fusariosis de la Espiga de Trigo.**

Enfermedad	Especie
Fusariosis de la Espiga	<i>F. graminearum</i> , <i>F. gerlachii</i> , <i>F. louisianense</i> , <i>F. asiaticum</i> , <i>F. ussurianum</i> , <i>F. nepalense</i> , <i>F. mesoamericanum</i> , <i>F. austroamericanum</i> , <i>F. vorosii</i> , <i>F. acaciae mearsii</i> , <i>F. boothii</i> , <i>F. cortaderiae</i> , <i>F. brasiliicum</i> y <i>F. meridionale</i> (Sarver et al., 2011). <i>F. culmorum</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>F. poae</i>

## IMPACTO DE LA FUSARIOSIS DE LA ESPIGA SOBRE LA CADENA PRODUCTIVA DEL TRIGO

El impacto de la enfermedad se da en distintos ámbitos; sobre la producción, salud e industria y esta resumida en la Fig. 1.

Fig. 1. **Impacto de la Fusariosis de la Espiga del Trigo en la cadena productiva del trigo.**



Las pérdidas están en función a la variedad que se siembra, que puede ser susceptible o tolerante, el tipo de manejo del cultivo (siembra convencional o directa), la época de siembra; estudios han demostrado que es de fundamental y que diferencias en días de siembra pueden determinar que una variedad se infecte o no con el patógeno y el grado de incidencia y o severidad de la misma; el clima de la región en que se realice el cultivo también es un factor preponderante, como ya se ha mencionado anteriormente.

Las pérdidas pueden: ser directas, al productor, por disminución en el rendimiento del cultivo y la calidad de los granos; a la industria, debido a un menor rendimiento en la calidad de la harina de los granos, harina oscura y destrucción de almidones y proteínas.

En cuanto a las pérdidas indirectas se dan por el aumento de costos de manejo de cultivo, entre estos el aumento del uso de productos fitosanitarios para el control de hongo, malezas, etc; costos en investigación, que muchas veces pasan desapercibidos, ya sea para el desarrollo de nuevas variedades que sean resistentes a *Fusarium* o a la acumulación de micotoxinas; desarrollo de nuevos productos fitosanitarios o investigación sobre nuevos sistemas de manejo, entre otros; costos en salud, por intoxicación y muerte de animales, o en casos extremos de seres humanos al ingerir alimentos contaminados.

## LAS MEDIDAS DE CONTROL

Las medidas de control de la enfermedad son variadas; el control cultural incluye: control de la época de siembra, manejo de las dosis de fertilización, control de malezas, principalmente aquellas que se han comprobado como hospederas de *Fusarium sp.* y el manejo del riego.

En cuanto al control químico: uso de fungicidas específicos para el patógeno. El control químico es recomendable especialmente al momento de la floración, cuando la mayor parte de las espigas se encuentran fuera del embuche. Sería sumamente útil el desarrollo de sistemas de alerta y predicción que indiquen a los productores el momento exacto de aplicación de productos para bajar las infecciones de *Fusarium* y acumulación de DON.

En cuanto al control biológico, el mismo presenta la ventaja de que hasta la fecha no hay patógenos resistentes a los bioproductos. Durante el desarrollo de este proyecto se han aislado cepas de *Bacillus* que han resultado efectivas para el control de *Fusarium graminearum in vitro*.

El control genético se menciona como el más eficiente, pero en el caso de la Fusariosis de la espiga es sumamente complejo y se da a diferentes niveles. Por citar solo algunos: Resistencia I, a la infección; resistencia II, a la dispersión dentro de la espiga; resistencia III a la acumulación de la micotoxina. Se han determinado materiales con características interesantes en China, Brasil, México, Austria y EEUU principalmente.

El control post cosecha incluye principalmente: no mezclar variedades durante la cosecha y realizar en los silos una discriminación por calidades en base al contenido de DON de los granos.

## LAS TOXINAS Y SUS CONSECUENCIAS

Las especies de *Fusarium* son productoras de Tricotecenos, Zearelanona, Moniliformina, Fumonisin, Deoxinivalenol, entre otras micotoxinas (Tabla 2). El principal metabolito tóxico asociado a especies del complejo *Fusarium graminearum*, es el Deoxinivalenol (DON).

Una característica importante del género es que una misma micotoxina puede ser producida por diferentes especies, y que una misma especie puede producir diferentes micotoxinas, por lo cual, en un mismo sustrato se pueden encontrar varias micotoxinas presentes a la vez.

La identificación de especies del género es compleja ya que no existe un sistema taxonómico unificado, de modo que existen autores que reconocen treinta especies y otros más de sesenta. 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. Finalmente algunas especies pierden su identidad en cultivos de laboratorio, por lo que rápidamente se imposibilita su identificación.

Las toxinas producidas por *Fusarium sp.* tienen diferentes efectos en el humano y en animales. Las fumonisin (FUM), se asocian al cáncer de esófago y de hígado en humanos, además defectos neuronales e intoxicación aguda. En animales pueden dar lugar a leucoencefalomalacia equina y edema pulmonar porcino. Se ha demostrado que la zearelanona (ZEA) puede estimular el crecimiento de carcinomas mamarios en humanos.

Tabla 2. Principales micotoxinas producidas por especies de *Fusarium*.

Especie	DON	T-2	HT-2	ZEA	MON	FUM
<i>F. acuminatum</i>	-	+	+	-	+	-
<i>F. anthophilum</i>	-	-	-	-	-	+
<i>F. avenaceum</i>	-	-	-	-	+	-
<i>F. crookellense</i>	-	-	-	+	-	-
<i>F. culmorum</i>	+	-	-	+	-	-
<i>F. chlamyosporum</i>	-	-	-	-	+	-
<i>F. dlamini</i>	-	-	-	-	-	+
<i>F. equiseti</i>	-	+	-	+	-	-
<i>F. graminearum</i>	+	-	+	+	-	-
<i>F. napiforme</i>	-	-	-	-	-	+
<i>F. nygamai</i>	-	-	-	-	-	+
<i>F. oxysporum</i>	-	+	-	-	+	-
<i>F. poae</i>	-	+	+	-	-	-
<i>F. proliferatum</i>	-	-	-	-	+	+
<i>F. sambucinum</i>	-	+	-	+	-	-
<i>F. semitectum</i>	-	+	-	+	-	-
<i>F. sporotrichoides</i>	+	+	+	+	-	-
<i>F. subglutinans</i>	-	-	-	-	+	-
<i>F. verticilloides</i>	-	-	-	+	+	+

El deoxinivalenol (DON), produce exclusivamente toxicidad aguda y no se acumula en el organismo. Produce vómitos, anorexia, pérdida de peso y diarreas, en concentraciones altas necrosis del tracto gastrointestinal, médula ósea y tejidos linfoides. Al parecer estos metabolitos actuarían disminuyendo la síntesis proteica de la planta y podrían suprimir o retrasar la respuesta de defensa al ataque fúngico. Las toxinas T-2 y HT-2 inhiben la síntesis de proteínas y se unen a los ribosomas, inhiben la síntesis de RNA y DNA, tienen efecto tóxico sobre la membrana celular, inducen apoptosis en tejidos linfáticos y hematopoyéticos.

La moniliformina actúa sobre el metabolismo de los glúcidos y en humanos se la ha relacionado con la enfermedad de Keshan. Otras toxinas producidas por *Fusarium* son las eniانتinas, de toxicidad leve a moderada, y que producen aumento de la permeabilidad de las membranas a los iones, aunque aún no se las ha asociado con ninguna trascendente. La Fusaproliferina es tóxica para los linfocitos B en humanos y teratogénica en embriones de pollo. Además se han determinado otras toxinas como el butenilido, la equitesina y la fusarina C, con diversos efectos asociados a humanos y animales aunque estos resultados aún no han podido ser comprobados.

## LAS ESPECIES DE FUSARIUM EN EL PARAGUAY EN LA ACTUALIDAD

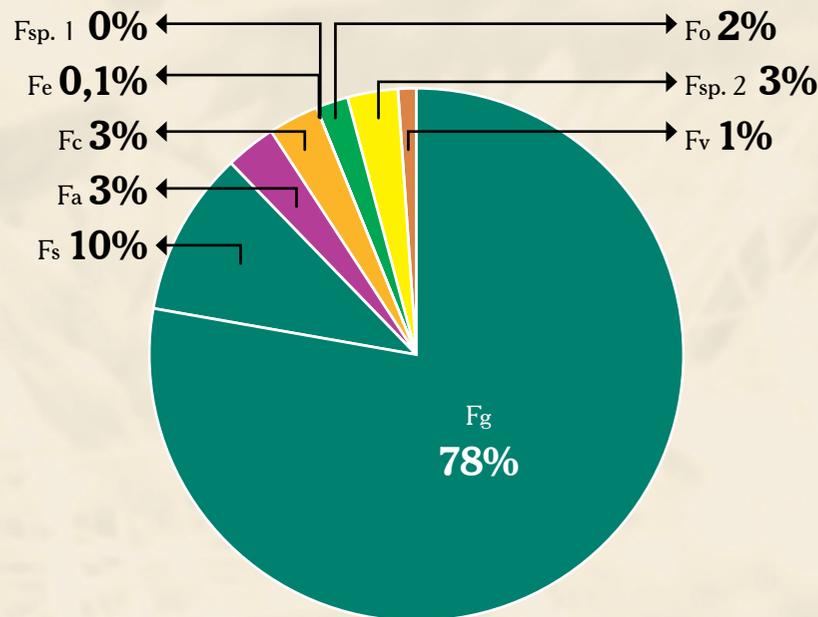
Las especies de *Fusarium sp.* reportadas en nuestro país son *Fusarium graminearum*, *F. semitectum*, *F. avenaceum*, *F. equiseti* y *F. culmorum*, siendo la especie predominante *F. graminearum* con una frecuencia de 90%. Quintana, en un trabajo realizado en 1998, concluyó que DON es la micotoxina de mayor relevancia en el cultivo del trigo en Paraguay. En las muestras analizadas, ellos encontraron concentraciones de DON que variaron de 0.247 a 10.13 ppm.

Con el objetivo de reestudiar las especies de *Fusarium*, principalmente aquellas potencialmente productoras de micotoxinas se desarrolló el proyecto titulado “Especies de *Fusarium* y micotoxinas asociadas al cultivo de Trigo en la Región Oriental del Paraguay”.

El trabajo se inició en el año 2012 con el apoyo financiero de INBIO, Instituto Nacional de Biotecnología, el CEMIT - UNA, Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas de la Universidad Nacional de Asunción, el apoyo por medio de colaboración de profesionales altamente calificados y logística de CAPECO, Cámara Paraguaya de Exportadores y Comercializadores de Cereales y Oleaginosas, el IPTA, Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria, FACEN - UNA, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y la FCA, UNA, Facultad de Ciencias Agrarias.

En base a las muestras de la enfermedad recolectadas en Itapúa y Canindeyú entre 2012 y 2013, se logró establecer un sistema de diagnóstico de hongos fitopatógenos y micotoxinas producidas en base al uso de técnicas microbiológicas, inmunológicas y moleculares.

De manera preliminar se confirmaron las especies asociadas a la Fusariosis de la Espiga y producción de Deoxinivalenol y reportadas anteriormente por Lidia Quintana de Viedma. Además, se ha detectado la presencia de dos especies adicionales: *Fusarium verticilloides* y *Fusarium oxysporum*. Como resultado, hoy se cuenta con un cepario de más de 400 aislados puros de *Fusarium* de diferentes especies a los que investigadores y estudiantes pueden acceder Fig. 2.

Fig. 2. **Distribución de las especies de *Fusarium* de trigo en Paraguay, 2012-13.**

Las nuevas líneas de trabajo con diferentes enfoques asociados al Complejo *Fusarium graminearum* y Deoxinivalenol han permitido el desarrollo de tres tesis de la Maestría en Ciencias en Biotecnología del CEMIT-UNA; una de ellas enfocada a la búsqueda de material resistente a la infección a *Fusarium*, la segunda en función a la búsqueda de plantas resistentes a la acumulación de tricotecenos y la tercera en base a la exploración de mecanismos de defensa naturales de las plantas ante el ataque de *Fusarium*.

Paralelamente se realizó la capacitación y entrenamiento de 13 estudiantes de grado de las carreras de Biología y Biotecnología de FACEN-UNA en diferentes áreas que incluyen: micología, fitopatología, biología molecular, mejora genética vegetal. Además, este trabajo permite realizar clases prácticas para estudiantes de la Licenciatura en Biotecnología de FACEN-UNA y la Maestría en Fito sanidad de la FCA-UNA.

## RESULTADOS LOGRADOS

Como se ha mencionado anteriormente, en el marco del mencionado proyecto, además de obtener información sobre las especies presentes en trigo con Fusariosis de la Espiga en el Paraguay, se realizaron además ensayos *in vitro*, en invernadero y a campo con líneas avanzadas del Programa de Trigo del IPTA; buscando a diferentes niveles mecanismos de resistencia a la Fusariosis de la Espiga y la acumulación de Deoxinivalenol.

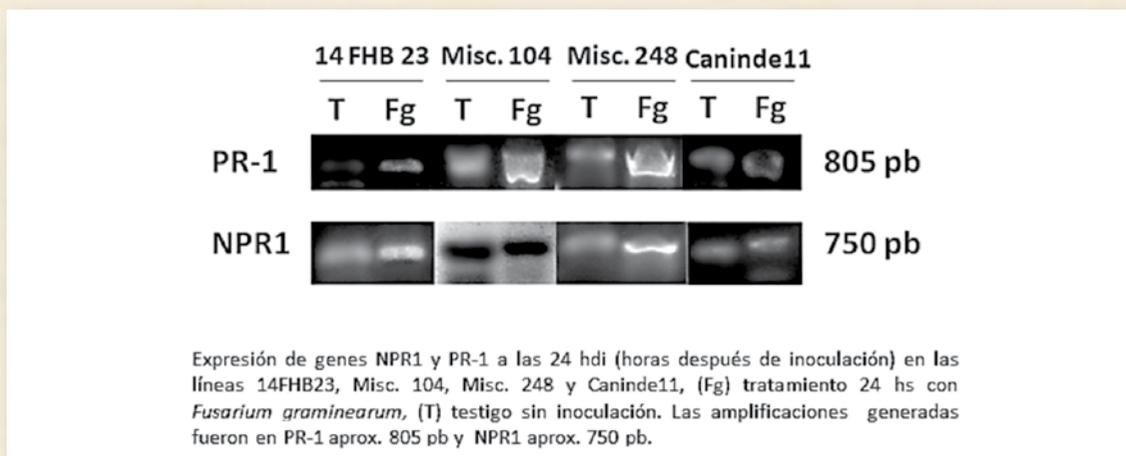
En laboratorio las cepas de *Fusarium* tanto del norte como del sur de la Región Oriental fueron caracterizadas *in vitro* por su crecimiento, producción de conidios, capacidad de producir toxinas bajo diferentes condiciones de actividad del agua, temperatura y pH. Esto permitió la identificación y re confirmación de la identidad de más de 400 aislados de diferentes especies de *Fusarium*. Además, se ha realizado la caracterización molecular de los aislados por PCR y actualmente las cepas de las diferentes especies de *Fusarium* obtenidas se encuentran en proceso de secuenciamiento para la confirmación de su identidad y comparación con registros de bases de datos.

En el invernadero se estudió la respuesta de defensa temprana en el patosistema trigo-Complejo *Fusarium graminearum* en diferentes periodos de tiempo: al momento de la infección y a las 4, 8, 12, 24 horas posteriores a la infección. Se han analizado enzimas de las vías del ácido jasmónico, ácido salicílico y etileno, Fig. 3.

Se ha podido determinar de manera preliminar que ante la presencia de hongos del Complejo *Fusarium graminearum* se enciende la vía del ácido salicílico. Este dato es de alto valor para el manejo del cultivo, puesto

que en la actualidad existen productos fungicidas diseñados para estimular este tipo de respuestas en las plantas y en caso de ser efectivos podrían incluirse en el sistema de manejo integrado de la enfermedad y disminuir la incidencia, severidad y las pérdidas.

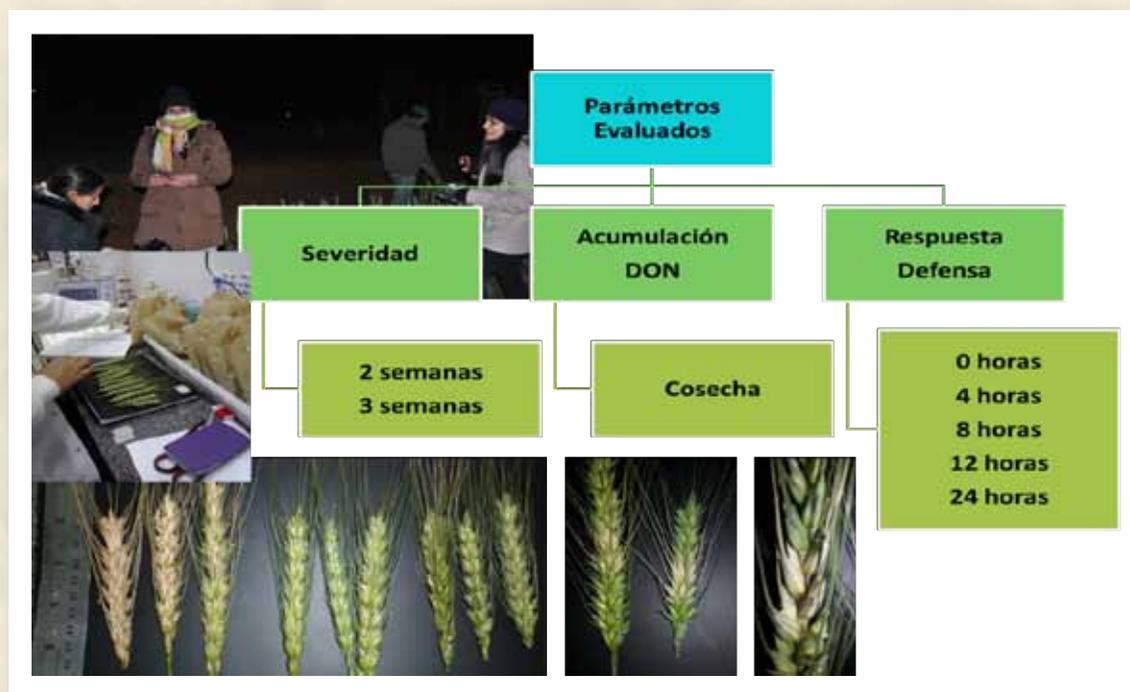
Fig. 3. **Expresión de los genes NPR1 y PR1 asociados al ácido salicílico en respuesta de defensa.**



En cuanto a los ensayos a campo se realizaron dos experimentos principales. Un ensayo con 25 líneas, categorizadas según su incidencia *in vitro* de *Fusarium graminearum* por infección natural a campo durante el año 2012 en: resistentes, tolerantes, moderadamente susceptibles, susceptibles y altamente susceptibles. En dicho ensayo se realizaron infecciones forzadas por los métodos de aspersión e inyección con un pool de 4 cepas de hongos del complejo *Fusarium graminearum* para la selección de material resistente a la Fusariosis de la espiga y acumulación de Deoxinivalenol. Se realizaron además muestreos por horas para estudiar la respuesta de defensa temprana de las líneas de trigo estudiadas a hongos del Complejo *Fusarium graminearum* mediante la observación de enzimas y proteínas de las vías del ácido jasmónico, ácido salicílico y etileno Fig. 4.

Paralelamente se realizó un segundo ensayo con 40 variedades caracterizadas *in vitro* como resistentes a la Fusariosis de la Espiga. En dicho ensayo se realizaron infecciones forzadas por el método de aspersión con un pool de 4 cepas del Complejo *Fusarium graminearum* por el método de aspersión para la búsqueda de material resistente a la acumulación de Deoxinivalenol. Actualmente nos encontramos en la etapa de análisis de resultados, pero en base a lo observado a campo, de manera preliminar se pudo determinar que las líneas analizadas se pueden clasificar en 3 grupos principales: resistentes a la infección, resistentes a la dispersión del patógeno en la espiga y tolerantes a la acumulación de Deoxinivalenol.

Fig. 4. Trabajo de campo y los parámetros de infección y toxina evaluados.



Las posibilidades y oportunidades son amplias y se abre una ventana para el estudio de diferentes aspectos que involucran a esta enfermedad: estudio de mecanismos de defensa de las plantas al ataque del patógeno; análisis cuantitativo de los factores de respuesta, estudios sobre proteínas relacionadas a los mecanismos de defensa, estudios sobre cepas atoxigénicas; desarrollo de plantas con genes silenciados o sobre expresados y hongos con genes silenciados; desarrollo de sistemas de alerta para productores entre otros.

Hasta la fecha, por medio del proyecto, se han presentado 27 trabajos científicos que incluyen: presentaciones de posters en congresos nacionales e internacionales, ponencias orales en congresos nacionales e internacionales, publicaciones en revistas científicas indexadas, además de las charlas de capacitación para identificación de hongos y determinación de DON.

Actualmente se tienen resultados prometedores puesto que se ha observado un interesante comportamiento de líneas de trigo en cuanto a la acumulación de DON y factores asociados a la respuesta de defensa de plantas de trigo al ataque de hongos del Complejo *Fusarium graminearum*. Muchos de estos trabajos están resumidos en los posters presentados en este seminario.



# Bibliografía

Cabañes, F.; Abarca, L.; Bragulat, R.; Castellá, G. 2007. Especies productoras de micotoxinas. En: Micotoxinas en Alimentos. Ed. José Miguel Soriano. Díaz de Santos. Madrid, España. 396 p.

CAPECO. 2012. Proyecto Fortalecimiento de la Investigación y Difusión del Cultivo de Trigo en Paraguay. Disponible en: [www.capeco.org.py](http://www.capeco.org.py)

Gilchrist, L.; Fuentes, G.; Martínez, C.; López, R.; Duveiller, E.; Singh, R.; García, I. 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. CIMMYT. México. 75 p.

Gómez, D. 2008. Caracterización de cepas toxigénicas del género *Fusarium* mediante técnicas de biología molecular. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.

INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. 2002. Seminario discusión técnica: Fusariosis de la espiga del trigo y la cebada. INIA. Colonia, Uruguay. 27 p.

Kuleshova, L., J. Shaw and A. Trouson. 2001. Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. *Cryobiology*, 43:21-31.

Leslie, J.; Summerell, B. 2002. *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell. USA. 399 p.

Lidner, G. and R. Wrigth. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*. 20:407-416.

Marín, P. 2010. Análisis de factores ecofisiológicos que influyen en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de toxinas en las especies de *Fusarium*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España. 233 p.

Quintana, L. 2004. Toxinas de *Fusarium* en semilla de trigo en el Paraguay. CRIA, Memorias de Jornadas Técnicas. MAG, CRIA. Itapúa, Paraguay. pp. 102-103

Quintana, L.; Morel, W. 2004. Especies de *Fusarium* que afectan a semillas de trigo en Paraguay. CRIA, Memorias de Jornadas Técnicas. MAG, CRIA. Itapúa, Paraguay. pp. 99-101.

# Preguntas o Comentarios

## Marcelo Helguera

*Muy buena la presentación, como fue que eligieron los cultivares para hacer el estudio de expresión de genes*

## Andrea Arrúa

Lo que estamos haciendo es ver la severidad y la acumulación de la toxina. Estamos terminando el tema de la cuantificación de la toxina para la selección de la expresión. Esperamos identificar algunos materiales no tan severos, o donde no se vea el efecto de la enfermedad pero que tenga la toxina o donde haya la presencia o el efecto de la enfermedad. Vamos a comparar el mejor y el peor para ver la diferencia.

## Marcelo Helguera

*Mi sugerencia sería que simultáneamente a este análisis si encuentran materiales que son contrastantes que empiecen a hacer poblaciones de RILS para mapear. Eso lleva tiempo y se puede hacer simultáneamente. Los costos para hacer población de mapeo van a bajar y yo creo que en 4 años van a poder mapear lo que empiecen a ver acá.*

## Sofía Chulze

*Una cosa que me interesó es que dice que encuentra cepas atoxigénicas.*

## Andrea Arrúa

Encontramos una cepa que no amplifica para ninguna de las bandas.

### Sofia Chultze

*Tengan cuidado con el uso de PCR. Nosotros utilizamos varias técnicas de PCR porque a veces no son para detectar los genes de la vía, no son suficientemente confiables y no está estandarizado que siempre el PCR sea infalible. Entonces siempre hay que tratar de combinar las dos cosas el genotipo y el quimiotipo. Porque nosotros tenemos cepas que son atoxicogénicas pero están noqueadas en el gen *gn5*; no son naturales. Sería genial encontrar cepas atoxicogénicas naturales porque es una estrategia que nosotros estamos usando para otros controles de hongos toxicogénicos. Ese es el sueño que todos tenemos de encontrar algo natural.*

*Así que tienen que estar muy seguros y buscar eso porque capaz que están en la naturaleza. Ese es un dato muy importante desde el punto de vista del control de la parte de toxinas.*

### Andrea Arrúa

Fue una casualidad porque tenemos muchas personas trabajando en el laboratorio, entre ellos estudiantes. Entonces eso lo encontramos y por el momento dejamos a un costado para ver más adelante.

### Sofia Chultze

*Hay que usar una combinación de varias cosas para asegurarse de que está funcionando el sistema y que no está el gen y está muy lindo todo lo que están haciendo, van a obtener cosas muy lindas en un corto plazo.*

### Pregunta

*Tienen planeado usar estos inductores de aplicado foliar para la formación de metaglucanasa por ejemplo.*

**Respuesta.** Es una posibilidad, en este momento estamos viendo si de manera natural eso está presente en la planta y se puede sobreexpresar de alguna manera. Una vez que sepamos cual es la vía que tenemos que sobreexpresar, es una posibilidad interesante. Podría ser un *Bacillus*, por ejemplo.

### Pregunta

*Hay productos, por ejemplo, como el ácido solar metil que es un análogo del ácido acetil salicílico; uno aplica y estimula que la planta forme quitinasa y beta glucanasa y tiene efectos inclusive sobre bacterias*

**Respuesta.** Si pero en este momento, por ejemplo, tenemos que estar seguros cual es la vía que tenemos que sobreexpresar y después vamos a ir sobre el producto. Les mencionaba *Bacillus* porque puede también activar, diferentes vías y nosotros casualmente encontramos algunos *Bacillus* que salieron del trigo y que controlan fusarium. Entonces podríamos decir que es un producto como derivado de nuestro trabajo, pero si es interesante. Por ahora les puedo decir que el ácido salicílico se enciende la vía, pero hasta ahí. No puedo asegurarles nada, pero es una posibilidad.

### Pregunta

*Una pregunta aclaratoria, el trabajo se hace principalmente con clamineron? Porque Fg es la que aparece con mayor frecuencia.*

**Respuesta.** En este trabajo el 78% fue *Fusarium graminearum*, pero como les mostré que es un complejo. Hoy por los trabajos de microbiología se puede decir que es *Fusarium graminearum*, pero dentro de 15 días cuando nos llegue la secuencia, a lo mejor puede ser más complejo; porque

a nivel microbiológico el *F. graminearum* es igual *F. semitectum*. Por eso decidimos llamarle complejo *Fusarium graminearum*.

### Dr. Kohli

*Una pregunta para Sofia: en tu experiencia has encontrado cepas que no produzcan DON?*

### Sofia Chulze

No, naturales no. Hasta ahora estamos buscando año tras año, lo estudiamos porque a nosotros nos interesa la variación de las poblaciones. Hace 10 años que venimos estudiando las poblaciones porque estamos tratando de aplicar la estrategia alternativa de control. Entonces estamos buscando resistencia a anti fúngicos. Las cepas naturales, los chinos lo tienen y creo que en nuestras poblaciones van a aparecer. No encontramos estas cepas en un proyecto conjunto con Uruguay, Chile y Brasil, de la zona de Rio Grande do Sul. Lo que si encontramos fueron otras poblaciones, no *Fusarium graminearum* *sensu stricto*, eso nos llamó la atención, que sea en Brasil. Ahora lo estamos encontrando en Argentina en soja, que es interesante por las rotaciones de los cultivos. Por eso estamos estudiando el complejo *Fusarium graminearum* en maíz, trigo y soja, por las rotaciones para ver su movimiento.

Estuvimos haciendo todo un estudio de las malezas que son una fuente extraordinaria de inóculo. Todo el complejo del *Fusarium* en malezas, estamos estudiando desde el punto de vista del control. Estamos desarrollando productos que puedan ser utilizados sobre rastrojos por avance de la siembra directa que es muy buena. Es decir son tecnologías que tomar, pero tenemos que buscar estrategias para reducir el problema que nos pueda acarrear. Desde el punto de vista inóculo de la siembra directa, hay que trabajar integrado con un montón de cosas y es la única manera de solucionar un problema que es complejo, es juntar todas las partes.

Yo ahora estoy viendo la parte de interacción de patógenos, con cepas noqueadas, para ver la parte de las toxinas en soja, porque no está estudiado. En trigo sabemos que el DON es un factor de virulencia. Es más, sabemos que el Nivalenol es un factor de avirulencia. En soja no sabemos, por eso estamos trabajando con cepas noqueadas para ver la interacción huésped patógeno.

### Man Mohan Kohli

*Te hice esa pregunta porque hace tiempo estuvimos estudiando el linaje de las cepas y se observó que dentro del Fusarium, principalmente de Uruguay, Argentina y sur de Brasil, no había tanta diferencia. Con Andrea quisimos hacer este trabajo porque las zonas que hasta ahora hemos estudiado fueron principalmente frías o zonas templadas. No hemos estudiado todavía fusarium en la zona caliente. Que lo que puede pasar en la zona caliente? No tengo ni la mínima idea.*

*Por eso te hice la consulta, si tú has encontrado algo? Si no, creo que esta oportunidad de las cepas del norte de Paraguay, que además están adaptadas a Mato Grosso do Sul en Brasil, pueden tener una toxicología totalmente diferente a lo que estamos acostumbrados. Esto me da confianza para seguir apoyando este trabajo ya que estamos incursionando en nuevas regiones que pueden ser totalmente diferentes. No es el problema de Fusarium que puede bajar el rendimiento en 10% o 20% máximo, sino con 5% de infección podemos tener 5 ppm de DON que cambia totalmente el panorama.*

### Andrea

Eso es lo que vimos el año pasado con fusariosis que tuvimos grandes impactos en calidad e inocuidad del producto.

### Dr. Kohli

*Precisamente, nuestro siguiente expositor, una amiga, Dra. Sofia Chulze es quien va a hablar sobre la inocuidad asociada al Fusarium. Gracias Andrea por el excelente trabajo*

# Fusariosis de la espiga de trigo y micotoxinas: impacto en la seguridad e inocuidad alimentaria

**SOFIA N. CHULZE**

Departamento de Microbiología e Inmunología. Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto. (5800) Río Cuarto-Córdoba. Argentina  
E-mail: [schulze@exa.unrc.edu.ar](mailto:schulze@exa.unrc.edu.ar)



## Resumen

El trigo (*Triticum aestivum*, *T. turgidum*) es uno de los principales cereales relevantes para la alimentación humana, junto con el maíz y el arroz. A nivel mundial más del 60 % de la producción de trigo y arroz se destina a la alimentación humana. Las micotoxinas, metabolitos secundarios producidos por diferentes especies fúngicas son contaminantes naturales que afectan el 25% de las cosechas a nivel mundial. Los cereales son los más afectados y considerando que ellos son la base de los alimentos de una proporción importante de la población a nivel mundial, la contaminación con micotoxinas representa un importante riesgo para la salud. La atención a nivel mundial tanto a nivel científico como económico sobre las micotoxinas se debe a las pérdidas económicas asociadas con los impactos negativos sobre la salud humana, la productividad animal y el comercio internacional.

Las especies del género *Fusarium* son importantes fitopatógenos y productoras de micotoxinas entre ellas los tricotecenos, zearalenona, moniliformina, beauvericina y eniatinas. Las especies incluidas en el *Fusarium graminearum* complejo (FGSC) y las especies relacionadas *Fusarium cerealis* y *Fusarium culmorum* pueden causar fusariosis de la espiga en trigo, cebada y otros granos pequeños a nivel mundial. Dichas especies son relevantes porque producen tricotecenos. Los tricotecenos son una familia de sesquiterpenos los cuales son divididos en 2 grupos principales, tipo A y tipo B, los tipos A están representados por las toxinas T2 y HT2 y el tipo B por deoxinivalenol

y nivalenol. El deoxinivalenol es uno de los contaminantes más frecuentes de los cereales. Las intoxicaciones agudas con dicha micotoxina se relacionan en humanos con dolores abdominales, vómitos, diarrea, náuseas, dolor de cabeza. Los efectos inmunomodulatorios de los tricotecenos también son relevantes. La dosis máxima tolerable de consumo se ha establecido en 1 µg/Kg de peso corporal por día para deoxinivalenol y sus derivados acetilados 3-ADON y 15-ADON. En varios países se han fijado reglamentaciones de los niveles máximos permitidos de deoxinivalenol tanto en trigo como en los productos derivados.

Los escenarios a nivel mundial en relación a la producción de trigo son variables, el cambio climático es un factor a considerar en relación al posible impacto sobre la biodiversidad de las especies toxicogénicas y a la contaminación del trigo con micotoxinas. Se están utilizando diferentes estrategias para reducir el problema: siembra de cultivares menos susceptibles, rotación de los cultivos, control químico y biológico, y sistemas de predicción. Pero aún los desafíos continúan y es de esperar que se pueda avanzar en la incorporación de resistencia en materiales con buenas características agronómicas, monitoreo de los cambios en la biología de los patógenos, desarrollo de nuevos productos de control tanto químico como biológico.

## Abstract

### Fusarium head blight of wheat and impact of mycotoxins on food safety and innocuity

*Wheat is one of the major cereal crops for human consumption, along with maize and rice. Globally, more than 60% of the production of wheat and rice is used for human consumption. Mycotoxins or secondary metabolites produced by different fungal species are natural contaminants that affect almost 25% of the food production worldwide. Cereals are the most affected crops and considering their importance to a significant proportion of the population, mycotoxin contamination represents a major health risk. The global attention on mycotoxins, both at scientific and economic level is driven by economic losses associated with them and their negative impacts on human health, animal productivity and international trade. Fusarium species are important plant pathogens producing mycotoxins which include trichothecenes, zearalenone, moniliformin, beauvericin and enniatins. Species in the Fusarium graminearum complex (FGSC) and related species such as F. culmorum and F. cerealis can cause Fusarium head blight in wheat, barley and other small grains. These species are important because they produce trichothecenes. Trichothecenes are a family of sesquiterpenes which are divided into two main groups, Type A and Type B. The Type A is represented by T2 and HT2 toxins, while Type B includes Dioxynivalenol (DON) and Nivalenol (NIV). DON is one of the most common contaminants of cereals. Acute poisoning with this mycotoxin in humans is associated with abdominal pain, nausea, vomiting, diarrhea and headache. The immunomodulatory effects of trichothecenes are also relevant to consider. The maximum consumption dose is set at 1 microgram per kilo body weight per day for DON, and its acetylated derivatives 3/ADON and 15/ADON. Several countries have set regulations for the maximum permitted levels of DON in wheat and its derivatives. Climate change is a factor to consider in relation to variable wheat production globally and its possible impact on the biodiversity of toxigenic species and mycotoxin contamination of wheat. Different strategies to reduce this toxin production and contamination such as seeding of less susceptible cultivars, crop rotation, chemical and biological control, and forecasting systems are being put in place. Yet, several challenges remain and it is hoped that the progress can be made in incorporating resistance into germplasm with good agronomic traits. Monitoring changes in the biology of the pathogens and development of new products both chemical and biological for an efficient control is an essential part of this strategy.*

## LA FUSARIOSIS DEL TRIGO Y SUS TOXINAS

El trigo es un importante cereal en el mundo cuya producción de casi 700 millones de toneladas representa una tercera parte de la producción cerealera y contribuye con casi 20% de proteínas y energía para la población. Considerando el aumento de la población en el futuro, existe una demanda importante para este cereal hacia el 2050.

La fusariosis de la espiga es un problema mundial en condiciones húmedas y semi húmedas. Algunos ejemplos de las diferentes epifitias que se ha tenido especialmente en el cono sur de las Américas (Argentina, Brasil y Uruguay), son presentados en el Cuadro 1. En Argentina, en el 2012, el efecto del fenómeno “El Niño” causó problemas tan graves de la epidemia que no ocurría desde hace 5 o 6 años.

Cuadro 1. **Años de epifitias de Fusariosis de la Espiga en el Cono Sur.**

**Argentina:**

1927, 1945, 1950, 1963, 1967, 1977, 1978, 1985, 1993, 1997, 2001, 2003 and 2007, 2012..

**Brasil:**

1939, 1957, 1958, 1975, 1982, 1983, 1998, 1990, 1992, 1993, 1997, 1998, 2000, 2001, 2002.

**Uruguay:**

1981, 1984, 1985, 1990, 1993, 1996, 2000, 2001, 2002.

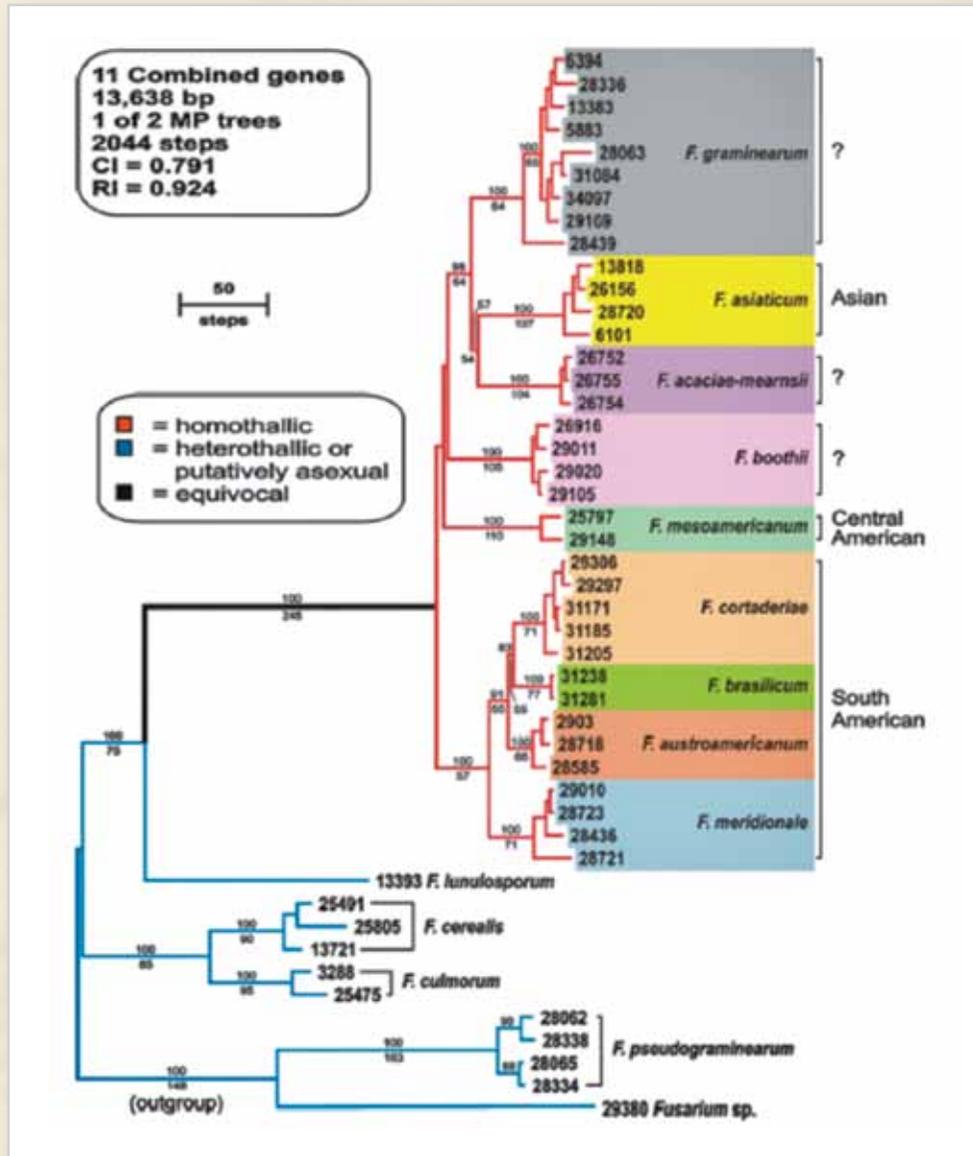
El patógeno, *Fusarium graminearum*, como una única especie ya no existe. Hoy gracias a los avances de la biología molecular, se sabe que *Fusarium graminearum* es un complejo de especies. Es decir, ahora se puede secuenciar y evaluar diferentes genes para poder definir el complejo del *Fusarium graminearum*. Actualmente están definidas aproximadamente 15 especies filogenéticas dentro del complejo *Fusarium graminearum*.

Se conoce entonces, un clado (rama) americano, un clado de América central, un clado Asiático (Fig. 1). El *Fusarium graminearum* que sería el linaje 7, es el *Fusarium graminearum sensu stricto*, que está distribuido especialmente en Sudamérica. A través de los años otras especies han sido descritas dentro del complejo *Fusarium graminearum*.

El complejo *Fusarium graminearum* que se encuentra en Argentina, incluye al menos 15 especies filogenéticas. Los estudios sobre el patógeno en el país han determinado que en trigo el principal patógeno es *Fusarium graminearum sensu stricto*, es decir, filogenéticamente sería el linaje 7 dentro del complejo *Fusarium graminearum*.

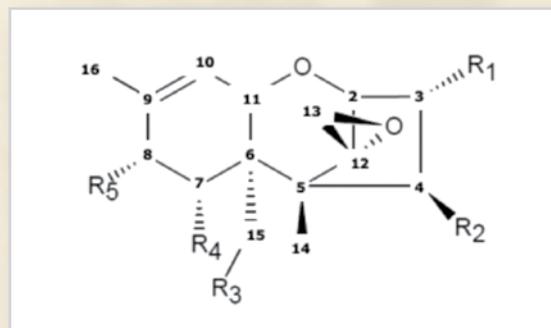
La fusariosis de la espiga produce pérdidas económicas en rendimientos. Sin embargo, su mayor impacto se da porque producen tricotecenos. Su estructura química esta presentada en la Fig.2 y el Cuadro 2. Estos sesquiterpenos tienen un anillo epóxido que les confiere la toxicidad; en el carbono 8 poseen un grupo ceto y en el carbono 7 pueden estar o no hidroxilados; esto da la pauta que existen dos tipos de tricotecenos: los Tipo A que incluyen la toxina T-2 y HT-2; y, el Tipo B incluye deoxinivalenol y los derivados acetilados. Hasta ahora se tuvo más conocimiento sobre los tipos que incluyen deoxinivalenol y los derivados acetilados. Pero actualmente van tomando importancia los tipos T-2 y HT-2, ya que son toxinas relevantes desde el punto de vista de la toxicidad en distintos sistemas biológicos.

Los del Tipo A, fueron menos estudiados porque la metodología analítica para evaluar esas toxinas son más complicadas que para estudiar los tricotecenos del Tipo B. Actualmente se está trabajando mucho para tener más información sobre los tricotecenos del Tipo A por su implicancia en la inocuidad alimentaria.

Fig. 1. Agrupamiento de las especies de *Fusarium* y su distribución regional.

Fuente: O'Donnell et al., 2004

Fig. 2. Estructura química de los principales tricotecenos



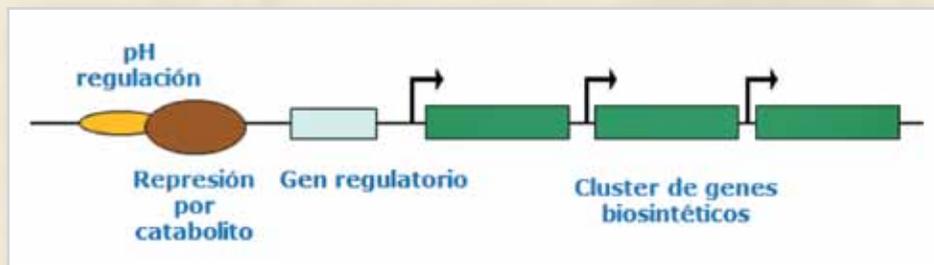
Cuadro. 2. Estructura química de los principales tricotecenos.

TRICOTECENO	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
<b>Tipo A</b>					
Toxina T-2	OH	OAc	OAc	H	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Toxina HT-2	OH	OH	OAc	H	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Diacetociscirpenol	OH	OAc	OAc	H	H
Neosolaniol	OH	OAc	OAc	H	OH
<b>Tipo B</b>					
Deoxinivalenol(DON)	OH	H	OH	OH	O
3-acetil DON	OAc	H	OH	OH	O
15-acetil DON	OH	H	OAc	OH	O
Nivalenol	OH	OH	OH	OH	O
Fusarenona X	OH	OAc	OH	OH	O

Fuente: Foroud y Eudes (2009)

Los hongos forman estas micotoxinas como un metabolito secundario. Los genes que codifican para formar las micotoxinas están agrupados en clúster, que son grupo de genes. Eso es importante debido a que existen genes regulatorios que regulan la expresión de los genes que están dentro del clúster (Fig. 3). También existen factores importantes como la disponibilidad de agua, el PH, la temperatura, el tipo de matriz o sustrato que tienen efecto regulando la expresión de estos genes que están en el clúster. Estos factores regulatorios son importantes, para lograr entender porqué a veces se tiene expresión y hay formación de toxinas y otras no.

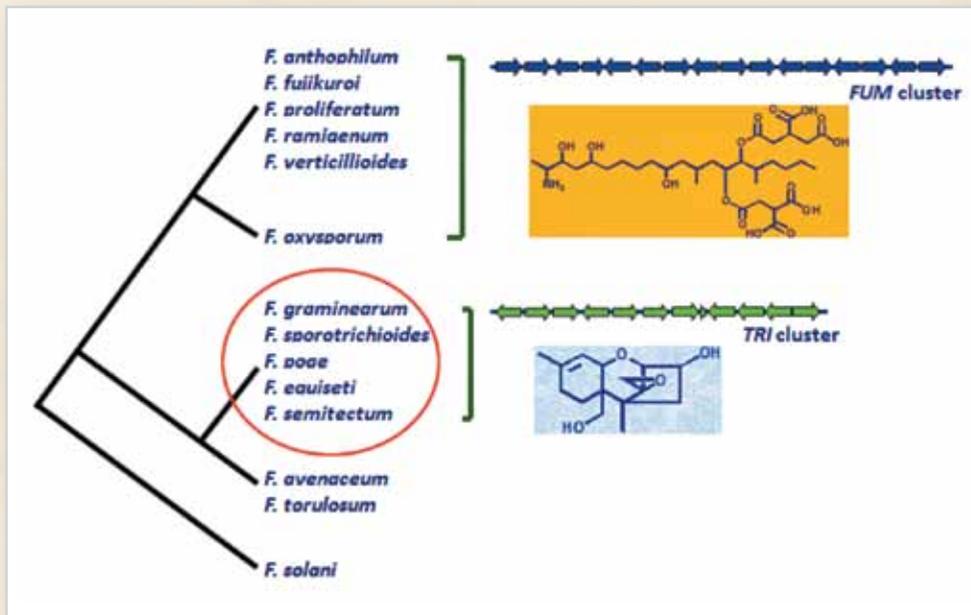
Fig. 3. Activación de los genes biosintéticos.



## FORMACIÓN DE TOXINAS

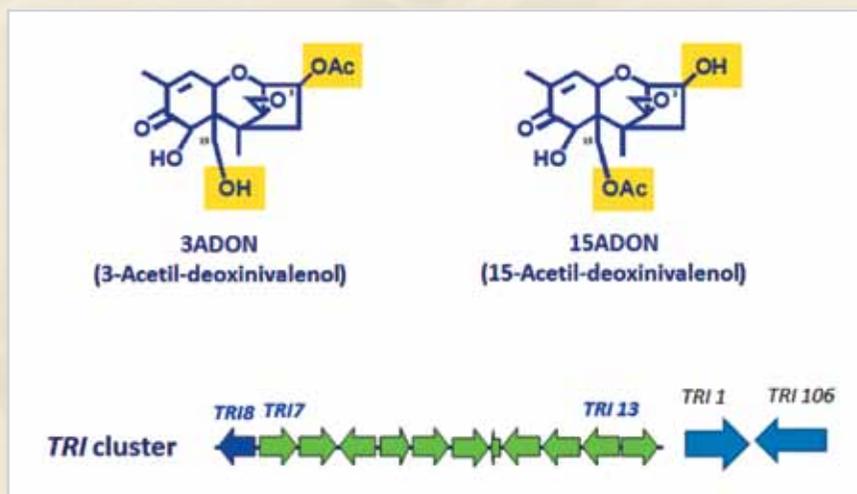
¿Cuáles son las bases genéticas para que las diferentes micotoxinas se formen? Es decir, ¿Por qué *Fusarium* forma una u otra toxina? Fig. 4. ¿Por qué forma tricotecenos del Tipo A o tricotecenos del Tipo B? Eso está genéticamente regulado, es decir, están los genes que producen tricotecenos ya sea Grupo A o Grupo B, dentro del complejo *Fusarium graminearum*. Este clúster de genes está regulado de manera distinta en estas especies para que cada una de ellas produzca diferentes tipos de toxina.

Fig. 4. **Los linajes de *Fusarium* productores de tricotecenos y las fumonisinas.**



¿Cuál es la base genética para que el hongo produzca 3-acetil DON o 15-acetil DON? Eso está regulado dentro del clúster donde se encuentra un corazón común que incluye 12 genes. Se encuentran el *Tri 2* hasta el *Tri 13* que regulan la expresión para que se formen los tricotecenos del Grupo B, Fig. 5. Por ejemplo en las cepas que tienen locus funcional el *Tri 7* y el *Tri 13*, la cepa no produce nivalenol. Las cepas que tienen bloqueado el *Tri 8*, hay problemas en la expresión para que se forme el 3-acetil DON o el 15-acetil DON. En otro locus se encuentran otros dos genes el *Tri 1* y el *Tri 106*, que también regulan la expresión para que se formen los tricotecenos del Grupo A.

Fig. 5. **TRI 8: Base genética para la producción de 3ADON vs 15ADON**



El *Tri 8* acetila en la posición 3 (ver Fig.5) para que se forme el 3-acetil DON y tiene un gen homólogo que acetila en la posición 15 para que se forme. Es decir, hay dos genes homólogos que cumplen esa función, para que se forme uno u otro tricoteceno. En resumen, el gen *Tri 1* regula la oxigenación del carbono 7 y 8, obteniendo así los tricotecenos del grupo Tipo A o Tipo B. Dependiendo de la actividad del *Tri 7* o el *Tri 13*, se obtiene DON o nivalenol y la funcionalidad del *Tri 8* decide, que se produzca el 3-acetil DON o el 15 acetil DON.

Se sabe que los tricotecenos afectan a la población tanto humana como animal. Después de la segunda guerra mundial, los tricotecenos causaron impacto serio por ocasionar la leucopenia tóxica alimentaria en Rusia. En la Fig. 6. Se muestra la foto original después de la guerra, donde se observa a mujeres recogiendo trigo. El cereal estaba bajo la nieve y lo consumieron; eso les produjo intoxicación, leucopenia tóxica alimentaria, y desde allí se sabe que eso se debe a la toxina T-2 y HT-2.

Fig. 6. **Micotoxinas asociadas con toxicosis crónicas y fatales para humanos y animales. Leucopenia tóxica alimentaria en Rusia y Asia Central.**



A nivel molecular, la síntesis de proteína de los tricotecenos tiene impacto en los efectos biológicos sobre el humano y los animales pero también efectos sobre la planta, es decir altera la expresión de proteína.

El efecto de estas toxinas va a depender de la dosis y de la duración de exposición. Es así, que se pueden tener efectos bastante diversos, es decir a baja dosis de corto tiempo estas toxinas producen anorexia, reducción o ganancia en peso. Pero a altas dosis y por largo tiempo de exposición ocasionará inmunosupresión por apoptosis a nivel de los leucocitos y daño de tejido. Muchas veces el problema de las micotoxinas no es una exposición aguda, es decir, el individuo o los animales no están expuestos a altas dosis de la toxina; pero a veces bajas dosis también causan problema porque produce lo que se denomina enfermedades secundarias debido a micotoxinas: reducción de la respuesta inmune tanto humoral como celular. Los animales o los individuos expuestos a otras enfermedades por parásitos o una mala respuesta a la vacunación, por ejemplo, pueden tener pérdidas secundarias debido a micotoxinas. La ingestión de los alimentos contaminados, también es grave desde el punto de vista de inocuidad y seguridad alimentaria.

El blanco de los tricotecenos es el sistema gastrointestinal, por lo tanto, si se presenta una intoxicación aguda los tricotecenos producirán anorexia, náuseas y vomito. Cuando es la exposición crónica, y esto es lo grave, ocasiona supresión de crecimiento, pérdida de peso, etc.

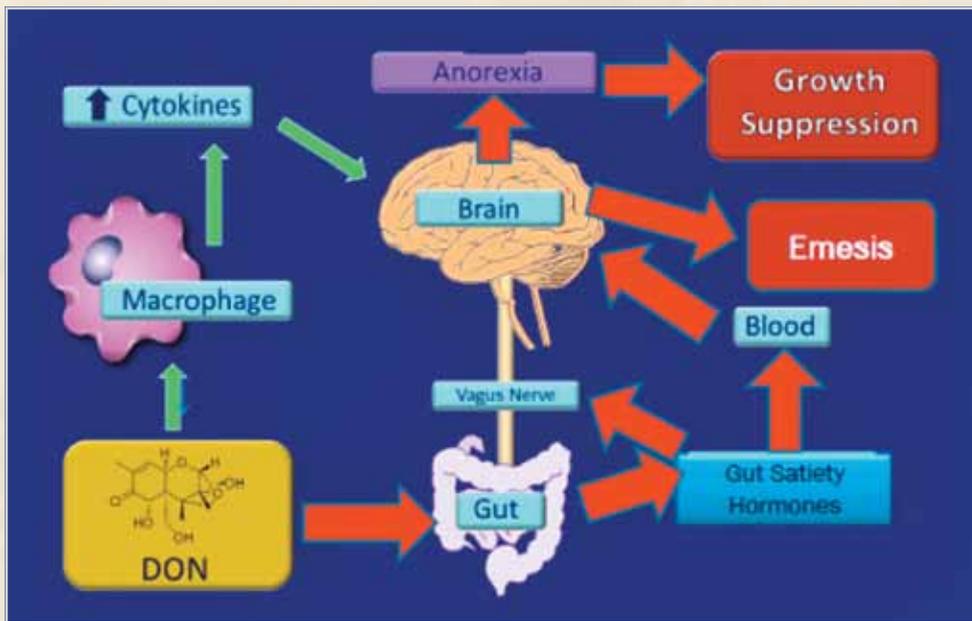
Para conocer este efecto de los tricotecenos hubo que buscar modelos elementales. Hoy día se ha conseguido desarrollar dos modelos experimentales: en anorexia se trabaja con el ratón y la emesis se trabaja con el visón, como animales de experimentación. En estos sistemas experimentales se ha podido medir la potencialidad toxicológica de los diferentes tricotecenos.

Actualmente se sabe que la anorexia es reversible cuando se consume tricoteceno a razón de 2,5 mg por kilo de peso corporal. Esta se expresa rápidamente, dejando el animal de consumir alimento, pero es reversible. Si se le deja de proveer alimento contaminado al animal, este recupera el consumo de alimento. Dicho de otro modo, el animal consume alimento contaminado y presenta anorexia, pero si deja de consumir alimento contaminado, deja de tener síntomas de anorexia recuperando el apetito.

## ¿CÓMO SE EXPLICAN LOS EFECTOS DE TOXICIDAD?

Eso se explica porque la toxina, por medio de la producción de citoquina, altera la respuesta del cerebro para que se produzca la anorexia, y a su vez, supresión del crecimiento (Fig. 7). Actualmente se sabe que las hormonas de la saciedad también estarían ejerciendo, por el sistema nervioso, efectos sobre el cerebro para que se produzca la anorexia y ocurra supresión de crecimiento.

Fig. 7. **Diagramación de la inducción de anorexia o emesis causados por la ingesta de alimentos contaminados con DON.**



Resumiendo, la anorexia y la emesis son temporarias y reversibles. La toxicidad del DON es mayor que los derivados acetilados 15-acetil DON o 3-acetil DON. Por su parte, las hormonas de la saciedad también estarían relacionadas con la anorexia y emesis, y el riesgo dependerá de la población a la que está expuesta esta toxina. Es importante aclarar que se ha avanzado en los conocimientos sobre la toxicidad de los tricotecenos, especialmente del DON y los derivados acetilados, y esto debe ser tenido en cuenta por los países al discutir sobre las regulaciones.

En el presente se tiene conocimiento que los derivados acetilados son convertidos en el organismo *in vivo* a DON. Anteriormente la dosis permitida de consumo de DON era solo 1 µg/kilo de peso corporal/día; hasta hoy se mantiene esta dosis, como dosis tolerable y admisible. Pero actualmente, desde el punto de vista de la toxicidad, se tiene en cuenta no solo el DON, sino se debe sumar el 3 acetil DON y el 15 acetil DON, porque se sabe que las 3 toxinas están contribuyendo a la toxicidad de los tricotecenos. Entre los animales, el cerdo es el más sensible, produciendo reducido consumo de alimento, reducción del crecimiento y vómito.

Existen otro grupo de tricotecenos que están menos estudiados, los del Grupo A, que son producidas por *Fusarium sporotrichioides*, *F. poae* y *F. langsethiae*.

*Fusarium poae* y *F. langsethiae*, están descriptos como especies de climas fríos, pero se debe tener en cuenta que la biodiversidad de las especies, y especialmente de *Fusarium*, está cambiando. El año pasado los investigadores franceses hallaron *F. langsethiae* en sus trigales. Por lo tanto, hay que estar alertas ya que se demuestra que con el cambio climático, cambia también la biodiversidad de las especies. Para tener seguridad se debe conocer cada región, monitorearla para diseñar mapas de riesgos de toxicidad conociendo cuáles toxinas pueden ser riesgosas para la población de un determinado lugar.

Varias especies del Grupo A producen la toxina T-2, que inhibe la síntesis de proteínas e induce fragmentación del ADN. Es característica de apoptosis la producción de síntomas a nivel de las mucosas como también, pérdida de peso, rechazo del alimento, dermatitis, diarrea, hemorragias y necrosis del epitelio del estómago e intestino, disminución de las células linfoides en timo, médula ósea, testículos o ovarios.

Actualmente, gracias a los estudios toxicológicos, se tienen dosis tolerables para cada una de las toxinas: DON es 1 µg/kg de peso corporal/día; mientras que los niveles provisionales para NIV son 0,7 µg, y para T-2 y HT-2, son muy bajos, 0.06 µg/kg de peso/dio. Es decir, estas toxinas son altamente tóxicas.

## MICOTOXINAS COMO CONTAMINANTES

El mayor problema radica en que la contaminación en una materia prima es heterogénea. La industria tiene buen conocimiento de este tema ya que acarrea limitaciones al momento de vender o exportar, debido a que para ello se debe conocer cuánto de contaminación con micotoxina está presente. Aun con laboratorios de última generación, esta heterogeneidad causa obstáculos al analizar la materia prima. Es ahí donde el muestreo toma un papel fundamental, para no incurrir en resultados incorrectos.

Por lo tanto, se hace muy difícil medir la exposición de la población, tanto humana como animal, a las micotoxinas. Actualmente, para medir la exposición de la población se trabaja con biomarcadores de exposición.

Los biomarcadores consisten en identificar las toxinas en orina, sangre, leche de la población tanto humana como animal. Esto es útil, por un lado, para medir cuanto exactamente de toxina está consumiendo la población; y, por otro, para conocer si las medidas de intervención son o no efectivas, cuando se aplican para reducir el problema.

Se necesitan biomarcadores porque la población es heterogénea. La contaminación por micotoxinas es diferente en las distintas poblaciones y lugares del mundo y las dietas. Cada población está expuesta de un modo diferente, dependiendo del tipo de micotoxina, la cantidad consumida de alimento en cada dieta y también en la variación por la toxicocinética y toxicodinámicas de las distintas micotoxinas en el organismo. En otras palabras, depende del tipo de micotoxinas que unas se absorben más que otras en el cuerpo.

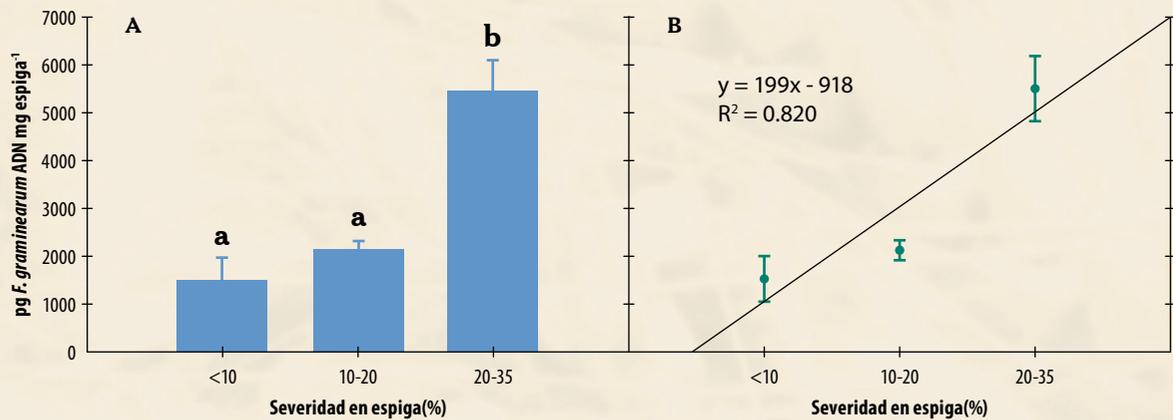
Entonces se utilizan biomarcadores de exposición y biomarcadores biológicos para saber que sucede con la micotoxina. En el caso de tricotecenos y zearalenona se ha desarrollado un método que mide el derivado de glucuronido en la orina. La orina es un método no invasivo, es fácil de obtener de los individuos y de manejar.

En un estudio realizado en Inglaterra, se pudo establecer la relación directa entre consumo de pan y contenido de deoxinivalenol en orina. Se realizó un análisis de orina de un grupo de individuos, posterior a eso se realizó la intervención dejando de consumir pan durante una semana para reanalizar la orina. Se concluyó que la población estaba expuesta a la micotoxinas. Pero el individuo no está expuesto a un solo tipo de micotoxina, sino que las materias primas o los productos obtenidos de las diferentes materias primas pueden contener más de una micotoxina. Se debe entonces desarrollar una metodología analítica para medir más de una micotoxina en los fíos biológicos. Ese ha sido el gran desafío y se ha logrado el año pasado.

Se trata de buscar métodos rápidos que permitan cuantificar la cantidad de *Fusarium* con la infección que se observa en las espigas, y se encontró una correlación por PCR en tiempo real en cuanto a cantidad de *Fu-*

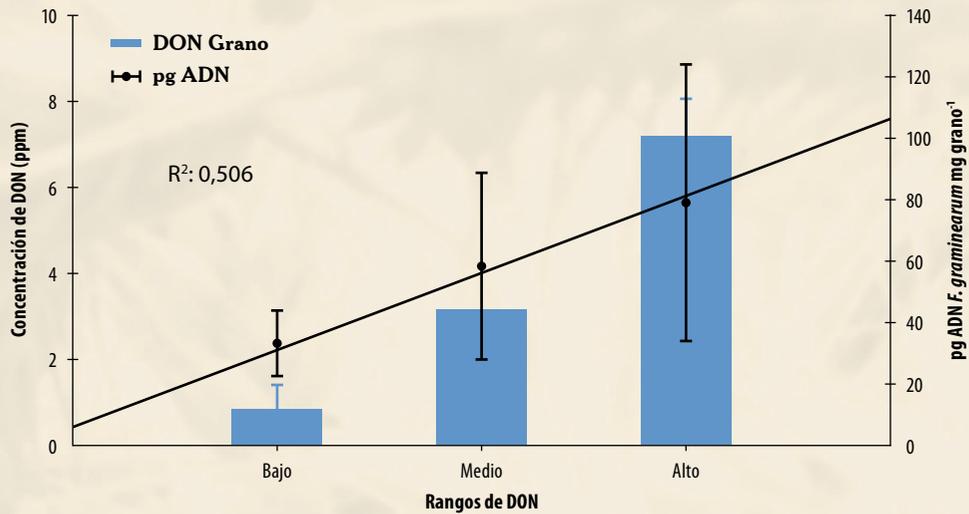
*sarium* (mg de ADN de *Fusarium*), de acuerdo a severidad de la espiga. Anteriormente esto no tenía un método rápido para poder detectar (Fig. 8).

Fig. 8. **Correlación entre la severidad de fusariosis en espiga y ADN de *F. graminearum* por PCR.**



En un año de severa epidemia, se pudo observar variable contaminación con deoxinivalenol llegando hasta los valores muy altos de 8 ppm. También se pudo observar la correlación entre cantidad de *Fusarium* (ADN de *Fusarium*) y cantidad de toxina (Fig. 9). En este caso el análisis de la cantidad de ADN de *Fusarium* puede indicar niveles bajos, medios y altos de toxinas. Una comparación entre los años 2011 y 2012 mostró el impacto de la fusariosis sobre los parámetros de calidad; una merma de 24% peso en mil granos y de 4% en el peso hectolitrito.

Fig. 9. **Relación entre la presencia del DON y ADN del *F. graminearum* en grano.**



En el 2012, las severas infecciones de fusariosis afectaron la calidad de la harina en los alveogramas y farinogramas de manera variable en distintas regiones trigueras de Argentina. Es importante conocer la calidad de la materia prima, porque la toxina se va ir distribuyendo en las distintas fracciones (en forma diferencial) en el molino. La mayor parte de la toxina queda en el salvado, pero la baja o alta contaminación de la harina depende del nivel inicial ya que es más o menos un 20% del valor en el grano para deoxinivalenol, y 5% para las toxinas T-2 y HT-2, (Cuadro 3).

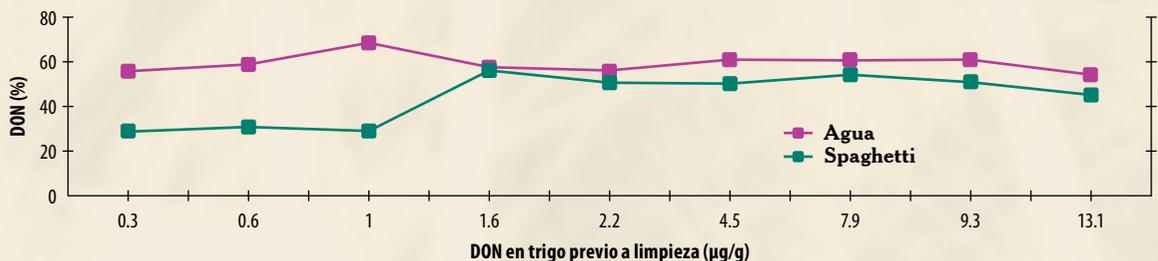
Cuadro 3. **Distribución del DON en distintas fracciones de la molienda.**

	Muestra 1	Muestra 2
Grano previo a la limpieza	0.91	7.32
Grano limpio	0.53	1.88
Descarte de limpieza	2.1	15.1
Salvado	1.88	4.45
Sémola	0.78	4.38
Harina	0.28	1.47

Fuente: Haidukowski et al, 2006

Otra cosa importante, especialmente en trigo duro, es realizar la proporción entre la cantidad de toxina presente en el trigo y cuánto queda en la pasta, y cuánto queda en la separación entre la toxina presente en la pasta y en el agua de cocción.

Fig. 10. **Distribución de DON (%) en spaghetti vs. agua de cocción.**



Para los niveles de toxinas 0,3 a 1 µg/g de DON en el grano del trigo fideero, la relación es de 1: 5, lo que me queda en el agua de cocción de pasta. Sin embargo, en las concentraciones mayores de toxina la relación es 1:4.

Otro aspecto que se ha discutido bastante corresponde a qué sucede con los tricotecnos en el proceso de panificación. En Argentina los trabajos mostraron una reducción, ya sea en la fermentación o en la cocción de los niveles de deoxinivalenol en la panificación. En otros países los resultados son contradictorios. Lo que sí se sabe es que existe contaminación con deoxinivalenol, hay diferente calidad de pan. En resumen, el deoxinivalenol altera la calidad del pan y eso es importante.

La retención de los niveles de toxina en el trigo en el campo a la pasta cocinada en el plato puede estimarse en un ~20% para DON y ~5% para las toxinas T-2 y HT-2. La importante reducción de los niveles de DON, y de las toxinas T-2 and HT-2 debido a la molienda y a la cocción de la pasta reduce el riesgo del consumidor a la exposición de dichas micotoxinas. Este dato es importante para aplicar estrategias en diferentes niveles de la cadena alimentaria para reducir el problema. Esto incluye la búsqueda de variedades resistentes, manejo adecuado, control químico o biológico y utilización de sistemas de predicción para tratar de determinar riesgos hasta la post cosecha, como los sistemas de gestión de calidad total, aplicando análisis de peligro y puntos críticos de control.

## SISTEMA DE ALERTAS Y PREDICCIÓN DEL DON

El DON CAST, es un sistema de predicción que fue desarrollado por investigadores canadienses que se ha validado en Uruguay, Francia y Canadá. Es un sistema simple basado en condiciones de temperatura y humedad en la época de espigazón. Actualmente se está utilizando y da muy buenos resultados. Este sistema está disponible en la web, se vende y se puede usar. En Argentina, el Dr. Moschini ha desarrollado otro sistema de predicción para la fusariosis de la espiga, también basado en mediciones de temperatura y mojado en la época de espigazón que funciona muy bien, y ahora está adaptado para los niveles de deoxinivalenol.

Un proyecto nacional de micotoxinas fue desarrollado en Argentina, especialmente en trigo y maíz, para afinar estos sistemas de predicción, no solamente para enfermedades, sino para deoxinivalenol en trigo y fumonisinas en maíz. También se está trabajando con un consorcio europeo, para desarrollar otro sistema de predicción en trigo, teniendo en cuenta no solo las condiciones climáticas, sino la epidemiología del patógeno, considerando las condiciones de crecimiento del patógeno en la interacción patógeno-trigo.

## RESISTENCIA, BIODIVERSIDAD PATOGENICA Y MEDIDAS DE CONTROL

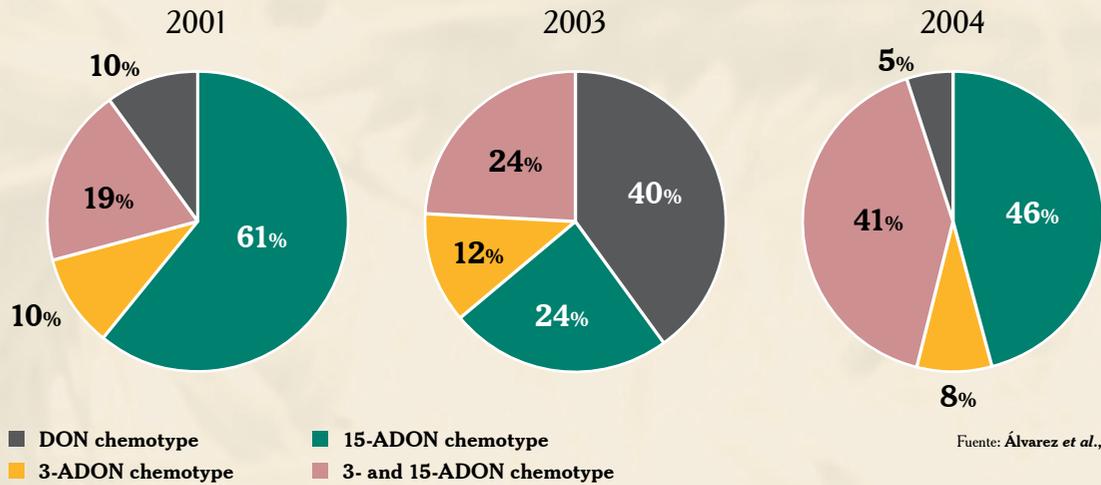
Los dos aspectos a tener en cuenta relación a la resistencia son: seleccionar variedades resistentes a la infección con especies toxicogénicas y variedades menos susceptibles a la acumulación de micotoxinas.

En el laboratorio lo que interesa es conocer la biodiversidad del patógeno y las variaciones genéticas de las poblaciones, ya que se considera una estrategia válida para tratar de buscar e implementar medidas de control.

A través de los años de estudio sobre la biodiversidad del patógeno con marcadores neutros como un grupo de compatibilidad vegetativa VCGs, como también, marcadores moleculares AFLPs; se determinó que *Fusarium graminearum sensu stricto* es el principal patógeno en Argentina. También se determinó los genotipos y quimiotipos en cuanto a la producción de toxina.

Se estudiaron los genotipos mediante PCR para conocer el tipo de toxina que se produce y se encontraron genotipos DON/NIV cuyo quimiotipo es productor de DON (Fig.11), y lo mismo sucede en Asia; sin embargo, en Europa ocurre lo opuesto, los quimiotipos de los genotipos DON/NIV son nivalenol. Se puede decir que en Argentina las cepas son de alta calidad genética y existen pocos clones.

Fig. 11. Cambios en quimiotipos de *Fusarium graminearum sensu stricto* en Argentina.



Es importante estudiar los quimiotipos a través de los años ya que pueden variar, y esto es importante debido a que en el trigo, las toxinas están relacionadas a la agresividad. Por ejemplo, en E.E.U.U., está aumentando el quimiotipo 3-acetil DON, más agresiva que las que producen 15-acetil DON.

El biocontrol es otro aspecto a estudiar, no para reemplazar el control químico, sino como estrategia válida en el manejo integrado. Actualmente el biocontrol está aportando entre el 3 y 5% de control. A través de los años se ha ido seleccionando cepas que irán a ser utilizadas en estrategias de biocontrol, se ha trabajado en el bioformulado de bioplaguicidas y en su evaluación tanto *in vitro* en invernáculo, como a campo.

Las cepas que se mejoraron fueron del *Bacillus subtilis* RC 218 y el *Brevibacillus* sp. RC 263, que han mostrado buena capacidad de control, tanto para el crecimiento del *Fusarium* como para la acumulación de toxinas, en invernáculo como a campo. Se ha observado que estos biocontroladores propuestos están reduciendo la severidad de la enfermedad en hasta un 4%.

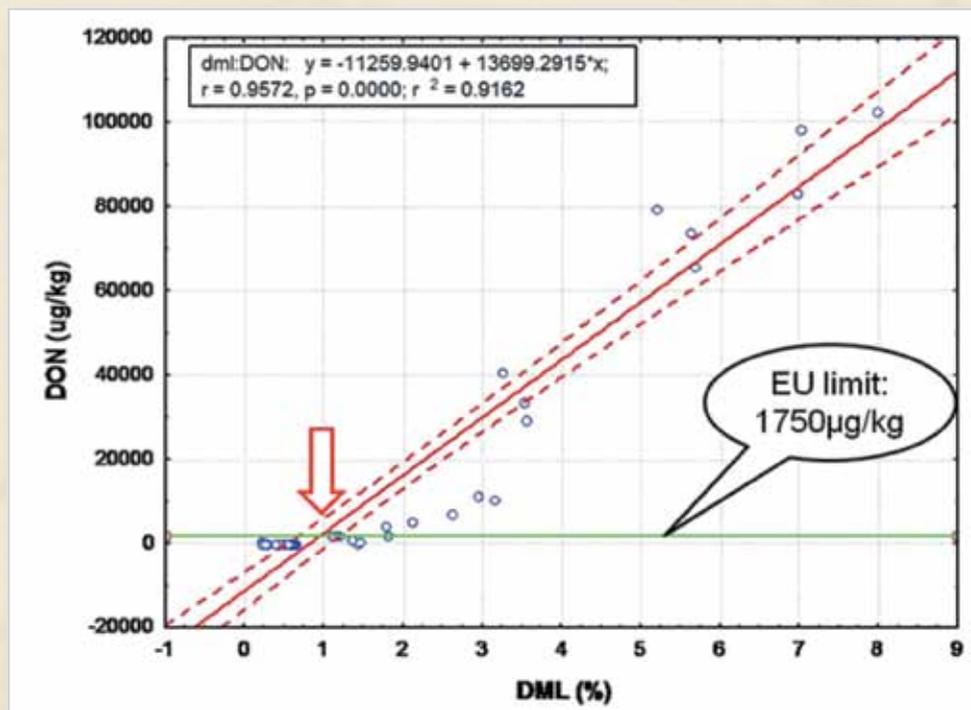
Otro proceso de control preventivo es establecer un manejo de calidad total (Fig. 12). Este se basa en establecer a través de la cadena de producción distintos puntos de control o puntos críticos de control, que generalmente se fundan en mantener control de temperatura, humedad y también en la selección o diversificación de la producción para no incurrir en la mezcla de granos sanos con granos dañados.

Fig. 12. Puntos clave de control en la cadena alimentaria de cereales (CCPs).



Un criterio que se debe tener en cuenta es la humedad del trigo para almacenar en diferentes sustratos. En el caso del trigo se sabe que una humedad de 14,5%, permite almacenar el grano sin sufrir deterioración por hongos. Otro aspecto a cuidar es la respiración del trigo contaminado en un almacén. Se sabe que cuando un trigo está contaminado con hongos, tanto el trigo como el hongo respiran resultando en la pérdida de materia seca. Se ha determinado que con un 1% de pérdida de materia seca, los niveles de deoxinivalenol superan los límites que requiere la comunidad económica europea que es de 1750 microgramos por kilo, (Fig. 13).

Fig. 13. **Relación entre la pérdida de material seca y producción de DON en trigo almacenado y colonizado por *Fusarium graminearum*.**



Fuente: Mylona *et al.*, 2012

Este índice de pérdida de materia seca es un buen índice para la industria para estar alerta rápidamente. Se enfatiza nuevamente que la disponibilidad de agua en el grano y la temperatura son factores claves que inciden directamente en la respiración del trigo almacenado. Una mayor respiración incide en mayor daño al trigo almacenado. *Fusarium* y *Alternaria* son los hongos de deterioro que crecen a  $5^\circ\text{C}$ .

#### Las medidas de control en el caso del almacenamiento son:

- Limpieza de los granos post-cosecha.
- Determinación de la humedad en forma regular y precisa.
- Retraso en el secado a 14,5-15% puede representar un riesgo para aumentar los problemas de contaminación con DON post-cosecha.
- Uso correcto de las condiciones en el silo (velocidad de los ventiladores) puede reducir la contaminación de los granos con otros dañados por *Fusarium*, granos y desechos.
- Cosecha y almacenamiento de los granos dañados, los cuales pueden tener niveles más altos de DON, en forma separada.

- Condiciones de almacenamiento apropiadas en todos los estadios en términos de control de humedad y temperatura.
- Higiene para prevenir la contaminación con insectos.

El uso correcto de las condiciones del silo permitirá mantener el grano en buenas condiciones. Brasil ha adoptado reglamentaciones de nivel DON que son tolerables en los alimentos, especialmente en trigo y elementos derivados del trigo, en bases científicas (Cuadro 4). Se debe tener en cuenta la salud del consumidor, las implicancias económicas que eso tiene desde el punto de vista del consumo interno y de la exportación de un país, y también se deben aplicar reglamentaciones que pueden desarrollarse y cumplirse.

Cuadro 4. **Reglamentaciones de nivel DON adoptados por Brasil.**

ALIMENTO	LMP ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Arroz y derivados	750
Alimento a base de cereales para alimentación infantil	200
ENERO 2012	
Trigo integral, harina de trigo integral, salvado de trigo, salvado de arroz, grano de cebada	2000
Harina de trigo, masas, crackers, biscochos de agua con sal, productos de panificación, cereales y productos de cereales excepto trigo e incluida cebada malteada	1750
ENERO 2014	
Trigo y maíz en grano para posterior procesamiento	3000
Trigo integral, harina de trigo, salvado de trigo y arroz, productos de panificación, cereales y productos d cereales excepto trigo	1500
Harina de trigo, masas, crackers, biscochos de agua con sal, productos de panificación, cereales y productos d cereales excepto trigo e incluida cebada malteada	1250
ENERO 2016	
Trigo integral, harina de trigo, salvado de trigo y arroz, productos de panificación, cereales y productos d cereales excepto trigo	1000
Harina de trigo, masas, crackers, biscochos de agua con sal, productos de panificación, cereales y productos d cereales excepto trigo e incluida cebada malteada	750

El punto destacable es que estas reglamentaciones son puestas gradualmente, con reglas a cumplir en el 2012, 2014 y 2016. Brasil tiene problemas de contaminación con *Fusarium* en trigo y deoxinivalenol mucho más frecuente que Argentina; tienen epidemias cada dos años por cuestiones climáticas. Por eso son conscientes que deben dar tiempo a sus molinos, a las empresas para que adapten las situaciones y puedan controlar, o busquen estrategias, para reducir la contaminación. Están trabajando activamente en ello porque deben cumplir las reglamentaciones.

Los límites de la Comunidad Económica Europea, a veces nos cuestan llegar a cumplir, pero a ellos también les cuesta. Es por esta razón que se está trabajando con un consorcio internacional en biocontrol. Para el 2016, Europa tiene que reducir a la mitad la cantidad de productos químicos que utiliza en el trigo y otros cultivos. Por lo tanto el control biológico podría ser una buena alternativa en un manejo integrado, que ayude a reducir la utilización de plaguicidas químicos. El interés de desarrollar biocontroladores se debe a este límite y a América le conviene porque produciría en un ambiente más amigable y reduciría al mismo tiempo la cantidad de químicos que está aportando a la población.

# Preguntas y respuestas

## Cuáles son las fuentes de tolerancia o de resistencia?

**Respuesta:** Hemos estudiado una población de doble haploides (Milan/Catbird) y encontramos tres grupos, unos que emanaban mucha cantidad de toxina con mucha toxicidad otros intermedios y otros bajos. Este año estamos evaluando, analizando un montón de líneas, del programa de mejoramiento de trigo del INTA. Hemos hecho varias evaluaciones de la red de ensayos de cultivos de forma normal.

## Ustedes probaron alguna vez mutar las cepas de *Fusarium* para ver si por esa estrategia se puede encontrar mutantes que no produzcan deoxinivalenol?

**Respuesta:** Si es un protocolo largo pero solo las cepas que nosotros tenemos son noqueadas en el *Tri5* y cepas marcadas con el verde fluorescente. Ocurre que las poblaciones que tenemos en soja son algunas parecidas en trigo y queremos ver si en soja las toxinas tienen un factor de agresividad o virulencia. Por eso tenemos cepas noqueadas en *Tri5* y cepas marcadas con fluorescente de proteínas para ver la entrada a la soja y demás. Se ha publicado un trabajo donde hemos evaluado los síntomas de podredumbre de raíz en vaina. Por eso estamos trabajando con esas cepas. Es por ello que pregunté hace rato si encontraron alguna cepa que no sea productora natural. Hay que buscar porque existen, las que nosotros tenemos son artificialmente noqueadas. Como las toxinas son factores de virulencia agresiva, no hay interés en eliminar o que no produzca, para ver cómo reacciona la interacción planta patógeno.

• *Dr. Kohli*

## Que pasaría si en un ambiente controlado usan las cepas noqueadas con la población natural

**Respuesta:** Si se colocan las dos juntas, estas cepas se auto-fertilizan. Como estamos manejando con el control biológico, mucha gente dice que estamos utilizando organismos modificados genéticamente. A nuestro criterio, lo que largamos al campo no es modificado genéticamente. Son cepas naturales que de alguna manera controlan. En maní, por ejemplo, usamos cepas naturales que son atoxicogénicas. Lo estamos usando en uvas para controlar toxinas, en verduras. En trigo estamos usando *Bacillus* que están por patentar y los que fueron seleccionados producen lipopeptidos activos, son los que tienen la actividad biológica. Estamos trabajando bastante en esto porque es una estrategia que nos puede ayudar.

También estamos observando respuestas con los biocontroladores. Estamos estudiando las respuestas de las hormonas, especialmente para ver si utilizando los biocontroladores, aumenta la respuesta de la planta en relación a la respuesta sistémica inducida.

No trabajamos con mutantes para el control biológico, solo con cepas naturales que tienen biocontrol. La mutación debe ser bien dirigida para generar cepas atoxicogénicas; es noquear específicamente ese gen *Tri5*, que es el primero de la biocinética que no funciona, no funcionan los otros del clúster.

**La cepa noqueada que no produce deoxinivalenol, tiene la misma virulencia que la cepa no noqueada.**

**Respuesta:** No

**Entonces si uno coloca las dos juntas, la que produce deoxinivalenol va a arrasar con la otra.**

**Respuesta:** Claro pero puede haber intercambio genético. Por ahora lo que tenemos como cepa noqueada no es para ponerla como biocontrol, sino para estudiar factores de virulencia. Otra cosa que estamos encontrando también es meridionales, pero en soja en Brasil. Por ejemplo, lo encontramos en trigo y nosotros en Argentina lo encontramos en soja, que también es interesante por la rotación.

**Con respecto al tema de la toxicidad, quizás ya sean distintos los genes de toxicidad y de virulencia, lo interesante sería encontrar un patógeno que sea virulento y no tenga toxicidad.**

**Respuesta:** Está demostrando que en realidad la toxina es un factor de virulencia.

• *Dr. Kohli*

**¿Porque el hongo mata primero para poder esporular o colonizar?**

**Sofia Chulze:** Por eso la resistencia que se disemina Tipo 2, porque produce la toxina y se disemina.

*Un pequeño porcentaje de granos con fusariosis (izquierda) son suficientes para contaminar a los granos sanos (derecha).*





# Caracterización de los trigos paraguayos por proteínas de reserva, translocación 1BL/1RS y su relación con la calidad

**LOURDES CARDOZO TÉLLEZ<sup>1</sup>, GRACIELA CABRERA<sup>1</sup>, GUSTAVO BENÍTEZ<sup>2</sup>,  
BERNA GIMÉNEZ, NATHALIA ZARACHO<sup>1</sup>; MAN MOHAN KOHLI<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Centro de Investigación Hernando Bertoni-Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria (IPTA) <sup>2</sup>Cooperativa Colonias Unidas

<sup>3</sup>Cámara Paraguaya de Exportadores de Cereales y Oleaginosas (CAPECO)

Contacto: [lucardozo@gmail.com](mailto:lucardozo@gmail.com)

## Resumen



La correlación entre los diferentes alelos que codifican para proteínas de reserva, la translocación 1BL.1RS y la calidad panadera del trigo ha sido establecida por varios estudios. Por tanto, la caracterización de las variedades y líneas avanzadas nacionales por proteínas de alto peso molecular e identificación de presencia de la translocación 1BL.1RS permite conocer, en parte, el potencial genético relacionado a las propiedades reológicas. La presencia de la translocación 1BL.1RS fue identificada mediante electroforesis ácida en geles de poliacrilamida (A-PAGE) y se caracterizó la composición de gluteninas de alto peso molecular mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Estos análisis fueron realizados en 6 variedades actuales (Itapúa 70, Itapúa 75, Canindé 1, Canindé 3, Canindé 11 y Canindé 13) de trigo pan y 52 líneas avanzadas del Programa de Mejoramiento Genético de Trigo. También se incluyen datos obtenidos anteriormente para variedades correspondientes a los años 1980s (Cordillera3, IAN8 e IAN9) y 1990s (Itapúa 40, Itapúa 45, Itapúa 50, Itapúa 55, Itapúa 60 e Itapúa 65), con fines comparativos. Todas las variedades de los años '80s y '90s presentaban la translocación 1BL.1RS, mientras que un 33% de las variedades actuales y 67% de las líneas avanzadas no la presentan. El análisis de gluteninas de alto peso molecular reveló la presencia de 8 alelos, 2 correspondientes al locus *Glu-A1* (1 y 2\*), 4 al locus *Glu-B1* (7+8, 7+9, 13+16, 17+18) y 2 al locus *Glu-D1* (5+10 y 2+12). Las variedades actuales presentaron un aumento en la presencia de la subunidad 5+10 para el locus *Glu-D1*, en comparación con las variedades de los años '80s y '90s. Estos resultados condicen

con los criterios de selección utilizados; el potencial de rendimiento fue el criterio principal para la selección de variedades en los años '80s y '90s y la inclusión de las características de calidad industrial como factor de selección en los años posteriores. Aun cuando estos resultados sirven para orientar al programa de mejoramiento genético de trigo en grandes rasgos, no explican por completo la calidad de varios de materiales avanzados estudiados. En este sentido la incorporación de nuevas tecnologías de selección asistida por marcadores proteicos debe ser más explorada para su utilización como herramienta de apoyo al mejoramiento convencional.

## Abstract

### Characterization of storage proteins and 1BL.1RS translocation in Paraguayan wheats in relation with industrial quality traits

*The correlation between different alleles encoding storage proteins, the 1BL.1RS translocation and baking quality of wheat has been studied by several authors. Therefore, the characterization of local wheat varieties and advanced lines for high molecular weight proteins and presence or absence of 1BL.1BR translocation was considered useful to provide information regarding the genetic potential of their rheological properties. The presence of the translocation 1BL.1RS was identified by acidic polyacrylamide gel electrophoresis (A-PAGE) and the composition of high molecular weight glutenins was characterized by polyacrylamide gel electrophoresis with sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE). These analyses were performed on six current bread wheat varieties (Itapúa 70, Itapúa 75, Canindé 1, Canindé 3, Canindé 11 and Canindé 13) and 52 advanced lines of the Wheat Breeding Program. The data obtained previously for varieties corresponding to the 1980s (Cordillera3, IAN8 and IAN9) and 1990s (Itapúa 40, Itapúa 45, Itapúa 50, Itapúa 55, Itapúa 60 and Itapúa 65) are also included for comparison. All varieties of the '80s and '90s had translocation 1BL.1RS, while 33% of current varieties and 67% of the advanced lines are lacking it. The analysis of high molecular weight glutenins revealed the presence of 8 alleles, 2 corresponding to the locus Glu-A1 (1 and 2\*), 4 at locus Glu-B1 (7 +8, 7+9, 13+16 and 17+18) and 2 at locus Glu-D1 (5 +10 and 2+12). Current varieties showed a significant increase in the presence of the subunit 5+10 for locus Glu-D1, compared to the varieties of the years '80s and '90s. These results are in agreement with the selection criteria used; yield potential was the main criterion for the selection of varieties in the late '80s and '90s and the inclusion of industrial quality featured as a selection factor in the subsequent years. Although these results can be used to guide the wheat breeding program broadly, they do not fully explain the quality of several advanced materials under study. Thus the incorporation of these technologies for protein markers assisted selection should be further explored in order for them to serve as a tool to support conventional breeding methodology.*

## INTRODUCCIÓN

La harina de trigo está compuesta por: almidón (70-75%), proteínas (10-12%), polisacáridos que no son del almidón, particularmente arabinosilanos (2-3%) y lípidos (2%) (De la Vega, 2009). En la fracción que corresponde a proteínas, el 80% del total está constituido por proteínas de reserva (40% de gliadinas, 10% de gluteninas de alto peso molecular y 30% de gluteninas de bajo peso molecular), 12% por albúminas y 8% por globulinas (Wen *et al.*, 2012; Van den Broeck *et al.*, 2009).

Las gluteninas y gliadinas conforman el grupo de prolaminas del trigo, siendo las primeras poliméricas y las últimas monoméricas. Estas son las proteínas que constituyen el gluten, y forman una red en la masa confiriendo a la harina sus características panaderas: capacidad de absorción de agua, cohesividad, viscosidad y elasticidad (Shewry y Halford, 2002; Wieser, 2007). En cuanto a sus funciones en la masa, las gliadinas hidratadas tienen poca elasticidad y son menos cohesivas que las gluteninas, contribuyendo principalmente a la viscosidad y extensibilidad de la masa; en tanto, que las gluteninas hidratadas son cohesivas y elásticas y son las que definen la fuerza y elasticidad de la masa (Wieser, 2007).

Las subunidades de gluteninas pueden dividirse en dos grupos de acuerdo al tamaño: las de alto peso molecular (80-120kDa) y las de bajo peso molecular (30-50 kDa) (Payne *et al.*, 1979). Cuando se mezcla la harina con agua para formar la masa, las proteínas forman una red continua que permite que la masa se expanda durante la fermentación. Esta red es el resultado de la interacción de las subunidades de gluteninas que se unen entre sí mediante los puentes disulfuro que se forman entre las cadenas. Otros estudios indican que los puentes de hidrógeno inter-cadena, formados entre los residuos de glutamina presentes en los dominios repetitivos son también importantes para conferir elasticidad (Belton, 1999; Shewry y Halford, 2002).

## CONTROL GENÉTICO DE LAS GLUTENINAS DE ALTO PESO MOLECULAR

El trigo pan es hexaploide y tiene 3 genomas (A, B y D) derivados de las especies silvestres relacionadas. Los loci que codifican para las subunidades de gluteninas de alto peso molecular están presentes en los brazos largos de los cromosomas del grupo 1 (1A, 1B y 1D). En cada uno hay dos genes que codifican para una subunidad de mayor tamaño (tipo-x) y una de menor tamaño (tipo-y). Por tanto, todos los cultivares de trigo pan tienen 6 genes que codifican para las subunidades de gluteninas de alto peso molecular. Sin embargo, el silenciamiento de genes específicos puede hacer que solo estén presentes de 3 a 5 subunidades (Shewry *et al.*, 2000).

Las diferencias en calidad panadera entre las harinas provenientes de diferentes variedades de trigo están relacionadas a las diferencias que hay en la estructura del gluten de cada una. Estas a su vez, dependen de las proteínas presentes en la harina. Los efectos cualitativos pueden estar relacionados a las diferencias en las cantidades de subunidades producidas por los diferentes alelos o por la diferencia en la estructura, lo que puede afectar su habilidad para formar polímeros con otras subunidades (Shewry *et al.*, 2000).

La variación alélica de gluteninas de alto peso molecular puede ser evidenciada por SDS-PAGE. Esta técnica permite conocer los perfiles de composición de subunidades de gluteninas de alto peso molecular presentes en las diferentes líneas avanzadas del programa de mejoramiento genético.

### Translocación 1BL/1RS

La translocación 1BL/1RS consiste en el reemplazo del brazo corto del cromosoma 1B del trigo por el brazo corto 1R del centeno. Esta translocación fue sumamente utilizada en los programas de mejoramiento genético de todo el mundo ya que confería resistencia a algunos patógenos como: *Puccinia recondita*, *Puccinia graminis*, *Blumeria graminis*, entre otros (Zeller y Hsam, 1983). También se ha asociado a esta translocación

con mejoras en el rendimiento y adaptación al medio ambiente (Rajaram y Braun, 2008). Sin embargo, en lo que respecta a calidad se ha asociado la presencia de la misma con una reducción en la calidad de la masa, ya que produce masas pegajosas y reduce el volumen de pan (Peña *et al.*, 1990). Algunos autores consideran que la pérdida de calidad se debe a la presencia de secalinas, que están codificadas por genes que se encuentran en el brazo 1R (Dhaliwal *et al.*, 1990; Clarke *et al.*, 1996), mientras otros atribuyen la baja calidad industrial a la pérdida del brazo corto 1B (Burnett *et al.*, 1995; Wieser *et al.*, 2000; Samy *et al.*, 2008).

La presencia de las secalinas relacionadas a la translocación 1BL/1RS puede ser evidenciada mediante A-PAGE.

## Parámetros de Calidad

La masa de harina de trigo se comporta como un fluido viscoelástico, esta propiedad hace que la masa sea elástica y extensible. Los resultados obtenidos de los ensayos reológicos permiten clasificar la harina para un uso particular (elaboración de panes, pastas o galletas).

El alveógrafo de Chopin permite medir la calidad del gluten, ya que simula el comportamiento de la masa y su retención de gases durante la fermentación. Específicamente se puede medir el trabajo de deformación ( $w$ ), también conocido como fuerza panadera. Este es uno de los parámetros más importantes dado que permite clasificar a los trigos, de acuerdo a su uso industrial, en: duros, semiduros y blandos. Los trigos de gran fuerza ( $w > 280$ ) son aptos para producir harinas especiales, para panificados que contienen gran cantidad de ingredientes.

El test de sedimentación en SDS permite medir el valor de sedimentación de una suspensión de harina en un solvente a base de ácido láctico y SDS, mostrando las propiedades de hidratación y grado de expansión de las proteínas especialmente su fracción de gluteninas, las cuales se relaciona con la fuerza y extensibilidad del gluten. El valor de la sedimentación es altamente influenciado por la cantidad y calidad del gluten. Los valores altos se asocian con un gluten más fuerte (Ram, 2009).

## Metodología

- **Material biológico:** se utilizaron granos de 6 variedades actuales (Itapúa 70, Itapúa 75, Caninde 1, Caninde 3, Caninde 11 y Caninde 13) y 49 líneas avanzadas trigo pan (*Triticum aestivum* L.), provenientes del Programa de Mejoramiento Genético de Trigo del IPTA.

También se incluyen datos obtenidos anteriormente para variedades correspondientes a los años 1980s (Cordillera3, IAN8 e IAN9) y 1990s (Itapúa 40, Itapúa 45, Itapúa 50, Itapúa 55, Itapúa 60 e Itapúa 65), con fines comparativos.

- **Caracterización de gluteninas de alto peso molecular**

**Extracción de proteínas:** se adicionó una solución acuosa de dimetilformamida 1.5M en proporción 5:1 ( $\mu\text{L}:\text{mg}$ ) a la harina. Luego de mezclar con vortex se centrifugó (14000rpm). Al pellet se adicionó una solución de lavado (Tris-HCl 0.08M, 1%SDS) por 30min. Se centrifugó (14000 rpm) por 8 min. Se resuspendió el pellet en una solución con 0.08M Tris-HCl, DTT 1%, SDS 1%. Se centrifugó a 14000 rpm 13min y recuperó el sobrenadante.

**Electroforesis:** separación mediante electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% ( $T=10\%$ ) con una concentración de 1,28% de cross-linker ( $C=1,28\%$ ) con corriente constante de 55mA. Tinción con Coomassie blue (1%) en 7% (v/v) ácido acético y 40% metanol. Luego baño con 5% (v/v) metanol en 7%(v/v) ácido acético.

- **Translocación 1BL/1RS**

**Extracción de proteínas:** a partir de 50 mg de harina se extrajeron proteínas de reserva con una solución acuosa de dimetilformamida 1.5M.

**Electroforesis:** Las gliadinas y secalinas fueron separadas mediante electroforesis ácida (A-PAGE) en

acrilamida al 6% (C: 0,3%) con corriente constante de 25mA, de acuerdo a Khan *et al.* (1985). Se tiñeron los geles con azul de Coomassie Biorad® Bio-safe de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

- **Mediciones de Fuerza del gluten (W) y Prueba de sedimentación (SDS)**

Las mediciones de W y sedimentación en SDS presentadas corresponden a los análisis realizados en el año 2012.

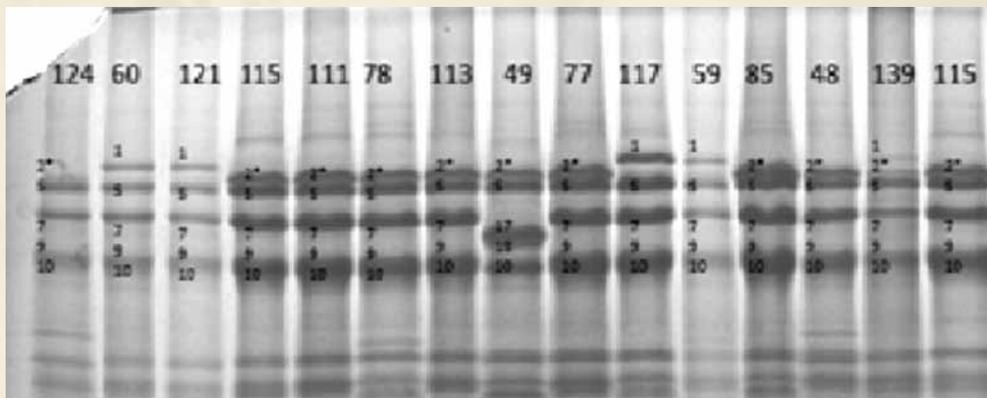
- **Análisis de datos**

Los gráficos presentados fueron realizados con Microsoft Excel® y el programa estadístico R versión 3.0.

- **Resultados y Discusión**

En la Foto 1 se puede observar la parte del gel de SDS-PAGE que contiene la fracción que corresponde a las gluteninas de alto peso molecular. Todas las variedades y líneas avanzadas incluidas en este análisis presentan 5 subunidades de gluteninas de alto peso molecular. Las variedades de trigo que tienen 5 subunidades de gluteninas de alto peso molecular generalmente tienen mayor fuerza de gluten que las que poseen 3 o 4 componentes Peña (2002).

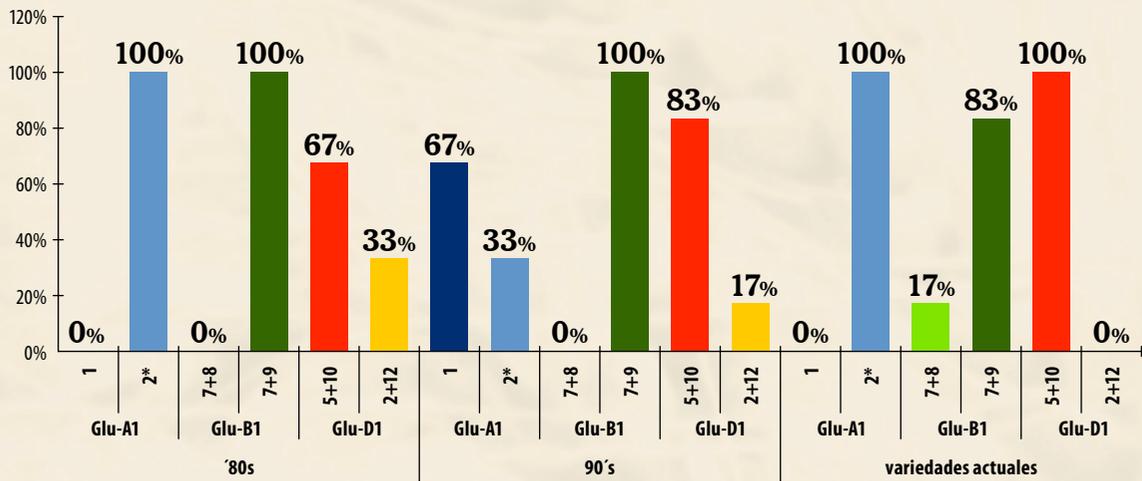
Foto 1. **Subunidades de gluteninas de alto peso molecular separadas mediante SDS-PAGE**



- **Varietades desarrolladas en Paraguay**

En el gráfico 1 se puede observar los porcentajes en que se presentan cada uno de los alelos para las variedades desarrolladas en los años 80's, 90's y las variedades actuales. En lo que respecta a *Glu-A1* se puede observar la presencia de los alelos 1Ax2\* en todas las variedades de los años '80s y en las variedades actuales y en un 33% en las de los años '90s (estando también presente en estas el alelo 1Ax1). Según estudios que relacionan la presencia de los diferentes alelos con la calidad industrial, no hay diferencias en cuanto a fuerza o extensibilidad aportada por los alelos 1Ax1 o 1Ax2\*. Siendo ambos superiores que el nulo (Cauvain, 2012).

Gráfico 1. **Presencia de alelos de gluteninas de alto peso molecular para cada locus. Se presentan las proporciones para cada locus, correspondientes a las variedades de los años '80s, '90s y variedades actuales.**



Para el locus *Glu-B1* todas las variedades de los '80s y '90s tenían 1Bx7 y 1By9. Mientras que en las variedades actuales un 17% tiene 1Bx7 y 1By8. Según la tabla de puntuación (Q-score) de Payne *et al.* (1987) 7+8 contribuye en mayor medida a la calidad que 7+9, aumentando el puntaje asociado a la calidad. Aunque según otros autores, ambos alelos contribuyen de igual manera tanto a la fuerza como a la extensibilidad (Peña, 2003). Las variedades presentaron un aumento en la presencia de las subunidades 5+10 para el locus *Glu-D1* en comparación con las variedades de los años '80s y '90s, estando presente en todas las variedades actuales. Se ha demostrado que las subunidades 5+10 están asociadas con la producción de polímeros de gluteninas de mayor tamaño y en mayores cantidades, en comparación con 2+12. Además, existe un residuo de cisteína extra en la subunidad 5 comparada a la subunidad 2, lo que le permite formar más puentes disulfuros (Shewry y Tatham, 2000).

La presencia de la translocación 1BL/1RS se identificó mediante la técnica de A-PAGE (Foto 2). Todas las variedades desarrolladas durante los años '80s y '90s presentaban dicha translocación, mientras que solo un 67% de las variedades actuales la presenta (Gráfico 2).

Estos resultados conciden con los criterios de selección utilizados en el Programa de Mejoramiento Genético durante estas décadas. El potencial de rendimiento fue el criterio principal para la selección de variedades en los años '80s y '90s. La inclusión de las características de calidad industrial como uno de los factores de selección fue incluida en los años posteriores. Esto, resultó en: a) una reducción de la presencia de la translocación 1BL/1RS, ya que la misma está asociada a una reducción de la calidad industrial (Peña *et al.*, 1990; Burnett *et al.*, 1995; Wieser *et al.*, 2000; Samy *et al.*, 2008); y b) un aumento de la frecuencia de los alelos asociados a mayor calidad industrial (como 7+8 y 5+10).

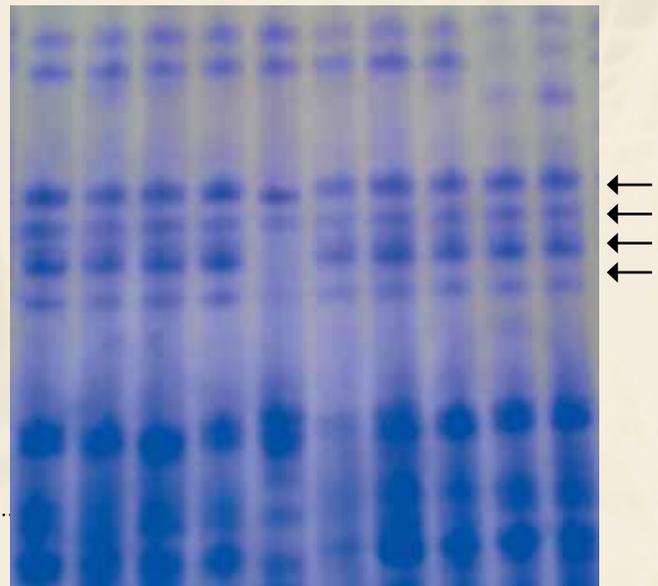
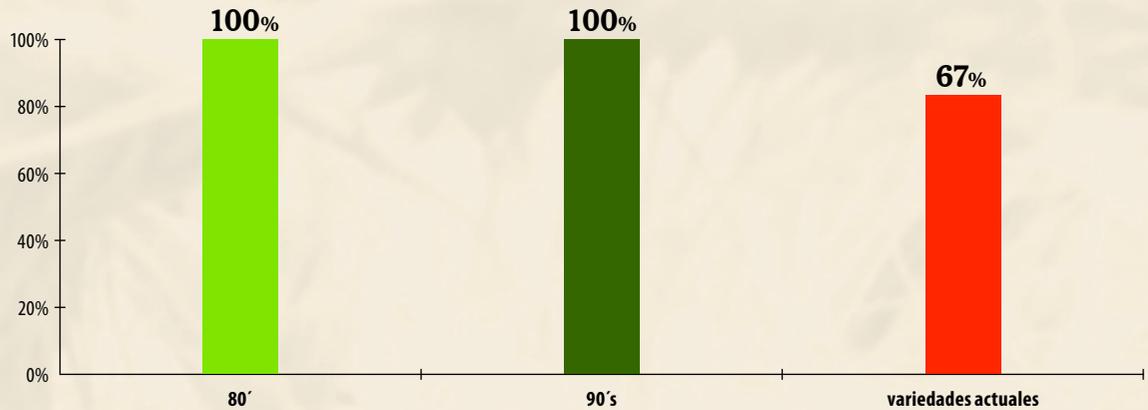


Foto 2. **Identificación de la presencia de la translocación 1BL/1RS mediante A-PAGE. Las flechas indican las secalinas.**

Gráfico 2. Frecuencia de la translocación 1BL/1RS en las variedades desarrolladas en Paraguay.



• Líneas avanzadas del Programa de Mejoramiento Genético

También se realizaron los análisis de gluteninas de alto peso molecular e identificación de la presencia de la translocación 1BL/1RS en algunas líneas avanzadas del Programa de Mejoramiento Genético.

En el gráfico 3 se presentan los resultados de sedimentación en SDS para las 49 líneas avanzadas que fueron analizadas. Las mismas están agrupadas de acuerdo a su perfil de gluteninas de alto peso molecular e identificación de la presencia de la translocación 1BL/1RS. Los primeros 10 materiales tienen el mismo perfil de gluteninas de alto peso molecular, sin embargo los primeros 7 presentan la translocación 1BL/1RS los 3 siguientes no la presentan. El valor promedio de sedimentación en SDS de los materiales con la translocación es en general menor al de los materiales que no la presentan (y tienen el mismo perfil de gluteninas de alto peso molecular), aunque se debe tener en cuenta que cada material tiene un fondo genético diferente y hay pocos datos en algunos grupos. El mismo patrón se observa en los materiales con perfil: 1Ax2\*/1Bx7, 1By9/1Dx5,1Dy10. Esta tendencia de disminución de los valores de sedimentación en SDS debido a la translocación, coinciden con los resultados obtenidos por diferentes autores (Zarco-Hernandez *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2012).

Gráfico 3. Valores de sedimentación en SDS y perfiles de gluteninas de alto peso molecular /secalinas para las 49 líneas avanzadas en estudio. Las líneas horizontales representan la media del grupo.

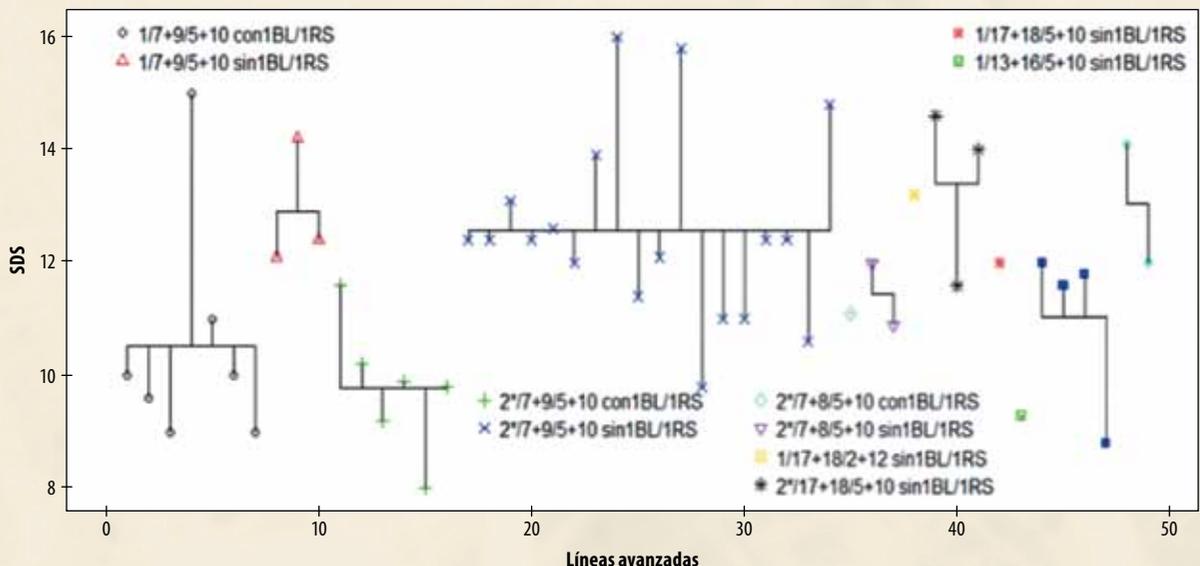
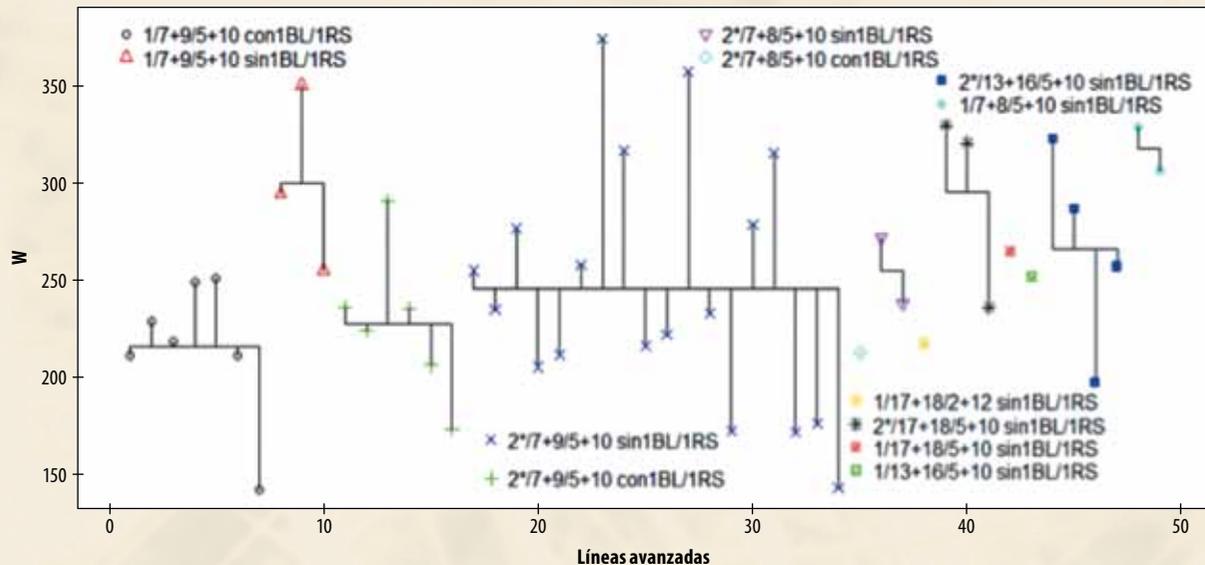


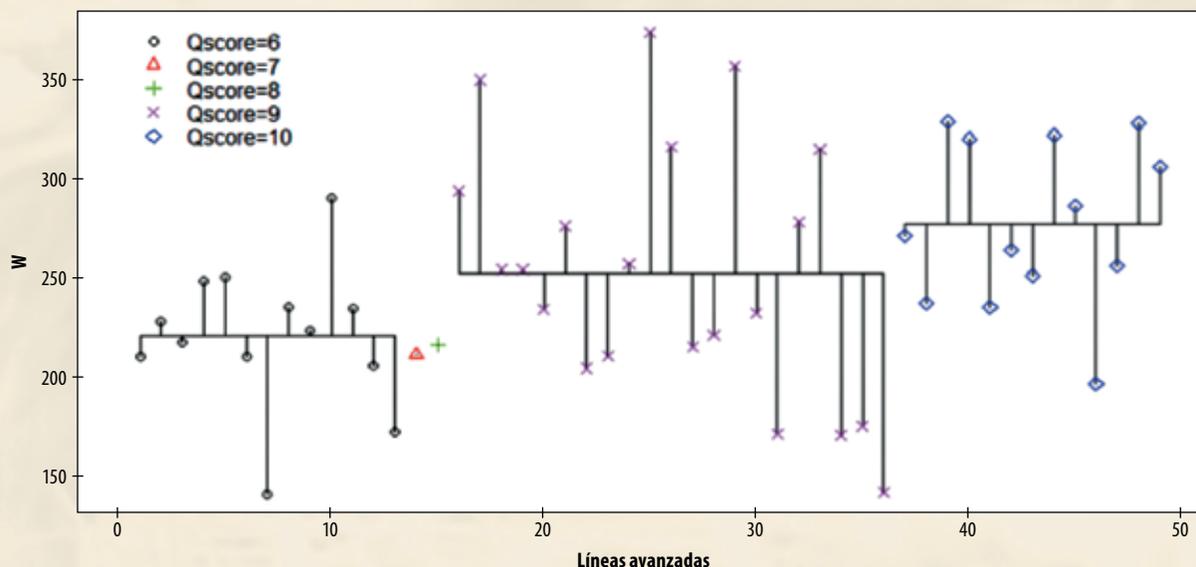
Gráfico 4. Valores de W (fuerza panadera) y perfiles de gluteninas de alto peso molecular /secalinas para las 49 líneas avanzadas en estudio. Las líneas horizontales representan la media del grupo.



Otro de los parámetros de calidad estudiados en las líneas avanzadas, fue el valor de W que representa la fuerza panadera (Gráfico 4).

Si bien algunos perfiles presentan una media un poco más elevada, la poca cantidad de datos en algunos grupos hace que no sea posible una comparación estadística de significancia. En el gráfico 5 se presentan los valores de W agrupados según el puntaje de calidad (Q-score) asignado de acuerdo a su perfil de gluteninas de alto peso molecular (con la corrección correspondiente a la translocación 1BL.1RS). Si bien en general se ve que los valores de W aumentan en forma proporcional al puntaje (Qscore), hay mucha dispersión de datos dentro de los grupos, es decir, mismo que algunas líneas avanzadas tengan un puntaje alto, su W es bajo. En el estudio realizado por Metakovski (1990) en trigos de Australia, se encontró que las gluteninas de bajo peso molecular tenían una mayor correlación con la calidad, solo una pequeña proporción de la variación que había en calidad se podía explicar por la composición de gluteninas de alto peso molecular, a diferencia de otros estudios en los que las gluteninas de alto peso molecular tenían una alta correlación con la calidad (Payne, 1987). Los efectos en la calidad de las gluteninas de alto peso molecular y las de bajo peso molecular son aditivos (Gupta, 1989). Por tanto, para afinar las predicciones de calidad en base al perfil de proteínas de reserva, sería interesante conocer la composición de gluteninas de alto y bajo peso molecular.

Gráfico 5. Valores de W (fuerza panadera) y puntajes de calidad (Q-score) para las 49 líneas avanzadas en estudio. Las líneas horizontales representan la media del grupo.



## CONCLUSIÓN

Aun cuando estos resultados sirven para orientar al programa de mejoramiento genético de trigo en grandes rasgos, no explican por completo la variación en calidad de los materiales avanzados estudiados. En este sentido, los estudios de otras proteínas de reserva (gluteninas de bajo peso molecular y gliadinas) servirían para afinar mejor las predicciones en cuanto a calidad.

## Bibliografía

- Belton PS.1999. On the elasticity of wheat gluten. *Journal of Cereal Science*29,103–107
- Burnett, C.J.; Lorenz, K.J.; Carver, B.F. (1995). Effects of the 1B/1R translocation in wheat on composition and properties of grain and flour. *Euphytica* Vol 86. Pp 159-166.
- Cauvain, S.P. 2012. *Breadmaking: improving quality*. Elsevier. 832pp
- Clarke, B.C.; Mukai, Y.; Appels, R. (1996). The Sec-1 locus on the short arm of chromosome 1R of rye (*Secale cereale*). *Chromosoma* Vol.105. pp 269-275.
- Dhaliwal, A.S.; MacRitchie, F. (1990). Contributions of protein fractions to dough handling properties of wheat-rye translocation cultivars. *Journal of Cereal Science*. Vol. 12 pp 113-122.
- De la Vega, G. 2009. Proteínas de la harina de trigo: clasificación y propiedades funcionales. *Temas de Ciencia y Tecnología* 13: 27-32
- Gupta, R.B.; Singh, N.K.; Shepherd, K.W. 1989. The cumulative effect of allelic variation in LMW and HMW glutenin subunits on dough properties in the progeny of two bread wheats. *Theoretical and Applied Genetics*. 77, 57-64.
- Khan, K.; Hamada, A.S.; Patek, J. (1985). Polyacrylamide gel electrophoresis for wheat variety identification: effect of variables on gel properties. *Cereal Chem*. Vol 62 pp 310-313
- Metakovsky, E.V.; Wrigley, C.W.; Bekes, F.; Gupta, R.B. 1990. Gluten polypeptides as useful genetic markers on dough quality in Australian wheats. *Aust.J.Res*. 41: 289-306.

Payne P.I. 1987. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality. *Annual Review of Plant Physiology* 38, 141–153.

Payne, P.; Corfield, K.; Blackman, J. 1979. Identification of a high-molecular weight subunit of glutenin whose presence correlates with bread-making quality in wheats of related pedigree. *Theoretical and Applied Genetic*. 55: 153-159

Peña, R.J. 2002. Wheat for bread and other foods. In: Curtis, B.C.; Rajaram, S.; Gómez Macpherson, H. *Bread wheat: improvement and production*. AO Plant Production and Protection Series. FAO corporate document repository. N° 30.

Peña, 2003. Contribución de las gluteninas (alto y bajo peso molecular) y las gliadinas al mejoramiento de la calidad de trigo. In: Kohli, M.M.; Díaz, M.; Castro, M. (eds). *Estrategias y metodologías utilizadas en el mejoramiento de trigo: un enfoque multidisciplinario*. Seminario internacional, La Estanzuela, Uruguay. CIMMYT-INIA. 151-162

Peña, R. J.; Amaya, A.; Rajaram, S. and Mujeeb-kazi, A. 1990. Variation in quality characteristics associated with some spring 1B/1R translocation wheats. *J. Cereal Sci.* 12:105-112.

Rajaram, S. R. and Braun, H. J. 2008. Wheat yield potential. In: Reynolds, M. P.; Pietragalla, J. and Braun, H. J. (eds.). *International Symposium on Wheat Yield Potential: Challenges to International Wheat Breeding*. CIMMYT. **México, D. F. 103-107 pp.**

Ram, S. 2009. *Cereals: processing and nutritional quality*. New India Publishing. 314p

Shewry, P.R., Halford, N.G., 2002. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J. Exp. Bot.* 53, 947–958.

Shewry, P.R., Popineau, Y., Lafandra, D., Belton, P., 2000. Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the EU-ROWHEAT project. *Trends Food Sci. Technol.* 11, 433–441.

Wieser, H., 2007. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol.* 24, 115–119.

Zhao, C., Cui, F., Wang, X., Shan, S., Li, X., Bao, Y., Wang, H., 2012. Effects of 1BL/1RS translocation in wheat on agronomic performance and quality characteristics. *Field Crops Res.* 127, 79–84. doi:10.1016/j.fcr.2011.11.008



*Vista de los participantes del Seminario.*



## ANEXOS

# Posters del Quinto Seminario Nacional del Trigo

## 1. IDENTIFICACIÓN DE COLEÓPEROS COCCINELIDOS PRESENTES EN PARCELAS DE TRIGO

Karina Solís<sup>1\*</sup>, Juliana Moura Mendes Arrúa<sup>2</sup>, Cinthia Carolina Cazal Martínez<sup>3</sup>, Christian Eduardo Dujak Riquelme<sup>3</sup>, Lourdes Romero Méndez<sup>3</sup>, Pablo David Arrúa Alvarenga<sup>1</sup>, Sara Victoria Núñez<sup>1</sup>, Lourdes Martínez<sup>1</sup>, Rosa Oviedo de Cristaldo<sup>4</sup>, Danilo Fernández Ríos<sup>5</sup>, Man Mohan Kohli<sup>6</sup> y Andrea Alejandra Arrúa<sup>2\*\*</sup>

\*karininsolis@hotmail.com; \*\*aarrua@gmail.com

<sup>(1)</sup> Iniciación Científica – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(2)</sup> Docente Investigador – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(3)</sup> Alumno – Maestría en Ciencias en Biotecnología – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(4)</sup> Docente a Tiempo Completo y Dedicación Exclusiva – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(5)</sup> Docente Investigador – FACEN-UNA

<sup>(6)</sup> Asesor Científico – CAPECO-INBIO

### Introducción

Los **Coccinellidae** son una familia diversa y conocida de insectos perteneciente al orden Coleóptera. Se estima que en Paraguay existen aproximadamente unas 45 especies. Estos organismos tienen una gran importancia económica y ecológica, especialmente dentro del agro ecosistema, ya que han sido reportados, tanto en etapa larval como en adultos, como eficientes depredadores de artrópodos herbívoros por lo que son utilizados como controladores biológicos de plagas agrícolas, por ejemplo, los pulgones. Los pulgones, pertenecientes a la familia **Aphididae**, del Orden de los **Homópteros**, atacan a los cultivos prácticamente durante todo el año, pero, los mayores daños a los cultivos los producen a inicios de la primavera cuando las temperaturas son más elevadas.

### Objetivos

Determinar los géneros de Coccinelidos presentes en parcelas de trigo atacadas por pulgones del Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNA durante el año 2013.

## Metodología

El experimento se llevó a cabo en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción, en el Campus Universitario, en San Lorenzo. Se evaluaron 10 parcelas experimentales de 1.5 m<sup>2</sup> durante el periodo agrícola 2013.

Los insectos fueron capturados con ayuda de una red entomológica y trasladados de manera adecuada al Laboratorio de Biotecnología del CEMIT-DGICT-UNA, donde fueron identificados por medio del sistema de morfo especies utilizando el patrón de colores y mediante el uso de la base de datos [www.coccinellidae.com](http://www.coccinellidae.com). Se calculó la abundancia de los individuos presentes en las parcelas.

## Resultados y Discusión

Tabla 1. **Abundancia de Coccinélidos por parcela, San Lorenzo, 2013.**

Género	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	TOTAL
Hippodamia sp.	5	8	9	20	11	20	16	6	13	6	114
Eriopsis sp.	2	2	2	11	6	12	5	2	10	3	55
Harmonia sp.	0	0	0	0	0	0	0	5	3	0	8
Cycloneda sp.	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	5
Coleomegilla sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Desconocido	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Total	7	11	11	31	17	34	24	13	26	9	184



Imagen 1. *Eriopsis sp.* Imagen 2. *Hippodamia sp.* Imagen 3. *Coleomegilla sp.* Imagen 4. *Harmonia sp.* Imagen 5. *Cycloneda sp.*

*Hippodamia sp.* Y *Eriopsis sp.* fueron los géneros más abundantes. En las parcelas experimentales se observaron además de la presencia de los géneros ya citados en estado adulto, una gran cantidad de larvas y pupas de los **Coccinélidos** identificados.

La presencia de estos organismos podría deberse a factores diversos, como: la alta disponibilidad de alimentos, época reproductiva, condiciones de manejo del cultivo entre otras. Es importante destaca que todos los géneros identificados han sido reportados como predadores activos de pulgones.

La identificación de Coccinélidos en parcelas experimentales de trigo es importante ya que podrían ser potencialmente utilizados como controladores biológicos de pulgones. Es importante el uso de productos insecticidas amigables con estos organismos y la implementación de prácticas de manejo que permitan conservar su diversidad biológica dentro de los agroecosistemas

## Agradecimientos

Al INBIO, CAPECO, IPTA, FCA UNA, por su colaboración para la realización de este trabajo.

## Referencias bibliográficas

- Gonzales, 2010. Coccinellidae. Sitio Web: [www.coccinellidae.com](http://www.coccinellidae.com). Consultado: 2 de noviembre de 2013. Disponible en: [www.coccinellidae.com](http://www.coccinellidae.com)
- Suarez, A. 2002. Insectos que afectan al cultivo de trigo: Descripción, bioecología, daño y control. INTA EEA Anguil. Actualización Técnica del Cultivo de Trigo, p 87-96.
- Zúñiga, E. 1967. Lista preliminar de áfidos que atacan cultivos en Chile, sus huéspedes y enemigos naturales. Agricultura Técnica 27:165-177.
- Zúñiga, E. 1985. Ochenta años de control biológico en Chile. Revisión histórica y evaluación de los proyectos desarrollados (1902-1983). Agricultura Técnica 45: 1975-1983.
- Zúñiga, E., Van Den Bosch, R., Pnea, J., Gruber, F. 1986. Control biológico de los áfidos (Hom.: Aphididae) de los cereales en Chile II. Obtención, introducción y cuarentena de predadores y parasitoides. Agricultura Técnica 46: 479-487.
- Zabala, J., Iturralde, J., Saloña, M. 2003. Etnoentomología de a Vaquita de San Antón o Mariquita (*Coccinella septem-punctata*) en el país Vasco (Coleoptera: Coccinellidae). Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa.

# 2. INCIDENCIA DE *Fusarium graminearum* Y DETERMINACIÓN DE DEOXINIVALENOL EN LÍNEAS DE TRIGO CANDIDATAS A RESISTENCIA A LA FUSARIOSIS DE LA ESPIGA

Sara Victoria Nuñez<sup>1</sup>, Juliana Moura Mendes Arrúa<sup>2</sup>, Cinthia Carolina Casal Martínez<sup>3</sup>, Christian Eduardo Dujak Riquelme<sup>3</sup>, Lourdes Romero Méndez<sup>3</sup>, Lourdes Martínez<sup>1</sup>, Pablo David Arrúa Alvarenga<sup>1</sup>, Rosa Oviedo de Cristaldo<sup>4</sup>, Danilo Fernández Ríos<sup>5</sup>, Man Mohan Kohli<sup>6</sup> y Andrea Alejandra Arrúa<sup>2\*</sup>

\*\*[aaarrua@gmail.com](mailto:aaarrua@gmail.com)

<sup>(1)</sup> Iniciación Científica – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(2)</sup> Docente Investigador – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(3)</sup> Alumno – Maestría en Ciencias en Biotecnología – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(4)</sup> Docente a Tiempo Completo y Dedicación Exclusiva – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(5)</sup> Docente Investigador – FACEN-UNA

<sup>(6)</sup> Asesor Científico – CAPECO-INBIO

## Introducción

En Paraguay, el trigo es actualmente el principal cultivo en los meses de invierno, que cubre las demandas del mercado nacional y aporta divisas como producto de exportación. Además 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. Una importante enfermedad asociada a este producto es la Fusariosis de la Espiga, causada por hongos del Complejo *Fusarium graminearum* y que tiene como consecuencia la acumulación de micotoxinas, metabolitos secundarios tóxicos para los seres humanos y los animales que ingieran alimentos contaminados. La identificación de especies es compleja y no existe un sistema taxonómico unificado. En Paraguay, las especies de *Fusarium sp.* reportadas en nuestro Paraguay son: *Fusarium graminearum*, *F. semitectum*, *F. avenaceum*, *F. equiseti* y *F. culmorum*, siendo la especie predominante *F. graminearum* con una frecuencia de 90%. Trabajos previos indican que DON 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. Para iniciar un programa de mejoramiento genético que permita encontrar fuentes de resistencia a *Fusarium* y al Deoxinivalenol es importante identificar en las variedades nacionales, aquellas que tengan potencial para este objetivo.

## Objetivo

Determinar la presencia de DON en relación con la incidencia de *Fusarium graminearum* en semilla en infección natural.

## Metodología

Se estudiaron semillas de trigo de la zafra agrícola 2013 provenientes del Centro Regional de Investigación de Capitán Miranda, Itapúa, dependiente del IPTA. Las mismas fueron etiquetadas y transportadas en condiciones adecuadas al Laboratorio de Biotecnología del CEMIT-DGICT-UNA, donde fueron analizadas. Las semillas fueron sembradas en Placas Petri de 9 cm de diámetro e incubadas a 22°C por 5 días. Posteriormente todas las colonias fueron revisadas y aquellas pertenecientes al género *Fusarium* fueron purificadas y se realizaron cultivos monoconidiales por medio de diluciones seriadas. Los organismos puros fueron identificados por medio del uso de claves taxonómicas. Para la cuantificación del Deoxinivalenol fue utilizado el Equipo Vertu Lateral Flow Reader de VICAM® y las cintas cuantificadoras Don-V. Límite de detección de 0,11 a 5 ppm. Posteriormente se realizó el análisis estadístico con ayuda del paquete estadístico Graphpad Prism 6. Se realizó la categorización de las líneas teniendo en cuenta los resultados obtenidos.

## Resultados y Discusión

El 77% de los aislados correspondió a *Fusarium graminearum*. En el 77,5% de las muestras estudiadas se detectó la presencia de *Fusarium graminearum* en niveles variables de 2 a 56,7%; los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Quintana y Morel, 2004 y también coinciden con lo mencionado por otros autores a nivel regional. A pesar de que las líneas eran consideradas resistentes la cantidad de toxina de 0.02 a 3.81 ppm, coincidiendo con, Quintana, 2004; Quintana y Morel, 2004. Las condiciones ambientales del 2012 fueron atípicas con respecto a años anteriores debido a la gran cantidad de heladas ocurridas.

## Agradecimientos

Al INBIO, CAPECO, IPTA, FCA UNA, por su colaboración para la realización de este trabajo.

## Referencias bibliográficas

- García R D., Vechiato M.H., Menten J.O.M., Lima M.I.P.M. Influência De *Fusarium graminearum* Na Germinação De Genótipos De Trigo (*Triticum aestivum* L.). Arquivos do Instituto de Biologia, São Paulo, v.74, n.2, p.157-162, 2007.
- Leslie, J., Summerell, B. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell. USA. 399 p. 2006.
- Quintana, L.; Morel, W. Especies de *Fusarium* que afectan a semillas de trigo en Paraguay. CRIA, Memorias de Jornadas Técnicas. MAG, CRIA. Itapúa, Paraguay. p. 99-101, 2004.
- Marasas, W.F.O., Burgess, L.W., Anelich R.Y., Lamprecht S.C., Van Schalkwyk, D.J. Survey of *Fusarium* species associated with plant debris in South African soils. S. Afr. J. Bot. 54, 63-71. 1988.
- Quintana, L. 2004. Toxinas de *Fusarium* en semilla de trigo en el Paraguay. CRIA, Memorias de Jornadas Técnicas. MAG, CRIA. Itapúa, Paraguay. pp. 102-103
- Quintana, L.; Morel, W. 2004. Especies de *Fusarium* que afectan a semillas de trigo en Paraguay. CRIA, Memorias de Jornadas Técnicas. MAG, CRIA. Itapúa, Paraguay. pp. 99-101

# 3. INCIDENCIA DE *Fusarium* sp. EN LÍNEAS DE TRIGO DEL NORTE DE LA REGIÓN ORIENTAL DEL PARAGUAY

Sebastián Pedro Zacarias<sup>1</sup>, Juliana Moura Mendes Arrúa<sup>2</sup>, Cinthia Carolina Cazal Martínez<sup>3</sup>, Christian Eduardo Dujak Riquelme<sup>3</sup>, Lourdes Romero Méndez<sup>3</sup>, Pablo David Arrúa Alvarenga<sup>1</sup>, Lourdes Martínez<sup>1</sup>, Karina Solís<sup>1</sup>, Sara Victoria Núñez<sup>1</sup>, Rosa Oviedo de Cristaldo<sup>4</sup>, Danilo Fernández Ríos<sup>5</sup>, Man Mohan Kohli<sup>6</sup> y Andrea Alejandra Arrúa<sup>2\*\*</sup>

\*\*aarrua@gmail.com

<sup>(1)</sup> Iniciación Científica – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(2)</sup> Docente Investigador – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(3)</sup> Alumno – Maestría en Ciencias en Biotecnología – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(4)</sup> Docente a Tiempo Completo y Dedicación Exclusiva – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(5)</sup> Docente Investigador – FACEN-UNA

<sup>(6)</sup> Asesor Científico – CAPECO-INBIO

## Introducción

La Fusariosis de la Espiga del Trigo, producida por hongos del **Complejo *Fusarium graminearum***, es una de las enfermedades más importantes del cultivo de trigo en la actualidad. Su distribución es mundial, afecta a todas las regiones del mundo donde el trigo es cultivado. Este patógeno produce no solo pérdidas directas debido a la disminución del rendimiento y la calidad. Su consecuencia más importante es la síntesis de micotoxinas, metabolitos secundarios tóxicos para el ser humano y los animales, que ingieren alimentos contaminados. Los *Fusarium* producen más de 40 micotoxinas del grupo de los Tricotecenos. La identificación de especies es compleja y se basa en la observación de características macro y microscópicas de las colonias. En Paraguay se ha determinado que la especie más importante es *Fusarium graminearum* y que la micotoxina más relevante es el Deoxinivalenol.

## Objetivo

Determinar la incidencia de *Fusarium* sp. en muestras del norte de la Región Oriental de Paraguay.

## Metodología

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del CEMIT-DGICT-UNA. Se analizaron muestras de semilla de trigo de la zafra agrícola 2013-14, colectadas en la zona norte de la Región Oriental del Paraguay del Campo Experimental Yhovoy, dependiente del IPTA, del Departamento de Canindeyú.

Las semillas fueron desinfectadas mediante lavado en hipoclorito de sodio al 3%, posteriormente alcohol al 70% y enjuagadas en agua destilada estéril. Una vez secas, fueron sembradas en placas de Petri de 9 cm de diámetro con agar verde de malaquita, e incubadas por 5 días a 25°C. Una vez obtenidas las colonias las mismas fueron identificadas por medio del uso de claves taxonómicas.

## Resultados y Discusión

Imagen 1. **Incidencia de *Fusarium* sp. en semilla de trigo del Norte de la Región Oriental.**



El porcentaje de incidencia en las muestras analizadas fue variable y con rangos de entre 86.6 a 100%. Según los datos obtenidos, el 100% de las semillas estudiadas presentó incidencias superiores al 50% de *Fusarium* *sp.*, por tanto se destaca que este patógeno es importante en trigo en el norte de la Región Oriental y que sería importante buscar fuentes de resistencia a este hongo en variedades nacionales.

## Agradecimientos

Al INBIO, CAPECO, IPTA, FCA UNA, por su colaboración para la realización de este trabajo.

## Referencias bibliográficas

- \_ Leslie, J., Summerell, B. 2008. The Fusarium Laboratory Manual. John Wiley & Sons. 403 p.
- \_ Marasas, W., Burgess, L., Anelich R., Lamprecht, S., van Schalkyk, D. 1986. Survey of Fusarium species associated with plant debris in South African soils. S. Afr. J. Bot. 54: 63-71
- \_ Kohli, M. 1987. Taller sobre la Fusariosis de la Espiga en el Cono Sur. CIMMYT. 6P.

## **El complejo de fusariosis en el campo constituye de varias especies.**



# 4. SELECCIÓN DE LINEAS DE TRIGO TOLERANTES A LA ACUMULACIÓN DE DEOXINIVALENOL

Lourdes Romero<sup>3</sup>, Juliana Moura Mendes Arrúa<sup>2</sup>, Cinthia Carolina Cazal Martínez<sup>3</sup>, Christian Eduardo Dujak Riquelme<sup>3</sup>, Lourdes Martínez<sup>1</sup>, Sara Victoria Nuñez<sup>1</sup>, Pablo David Arrúa Alvarenga<sup>1</sup>, Rosa Oviedo de Cristaldo<sup>4</sup>, Danilo Fernández Ríos<sup>5</sup>, Man Mohan Kohli<sup>6</sup>, Líder Ayala Aguilera<sup>7</sup> y Andrea Alejandra Arrúa<sup>2\*</sup>

\*\*aarrua@gmail.com

<sup>(1)</sup> Iniciación Científica – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(2)</sup> Docente Investigador – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(3)</sup> Alumno – Maestría en Ciencias en Biotecnología – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(4)</sup> Docente a Tiempo Completo y Dedicación Exclusiva – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(5)</sup> Docente Investigador – FACEN-UNA

<sup>(6)</sup> Asesor Científico – CAPECO-INBIO

<sup>(7)</sup> Docente Investigador – FCA-UNA

## Introducción

El trigo es el alimento básico en muchas regiones del mundo. Durante su cultivo se ve expuesto al ataque de diversos patógenos, entre ellos *Fusarium graminearum*, responsable del golpe blanco o Fusariosis de la Espiga. Estos hongos producen unas sustancias llamadas micotoxinas, metabolitos secundarios tóxicos que pueden causar en el ser humano y los animales que ingieren los alimentos contaminados, síndromes llamados micotoxicosis. Se han reportado más de 40 micotoxinas producidas por *Fusarium*, siendo las principales los tricotecenos. En Paraguay se ha reportado la presencia de Deoxinivalenol en niveles variables de 0,247 a 10,13 ppm. La Food and Drug Administration, FDA, de los EEUU fija como límites máximos de DON en alimentos para consumo humano 1 ppm y consumo animal 5 ppm. La resistencia a *Fusarium* se da a diferentes niveles, y uno de ellos es a la acumulación de Deoxinivalenol. Para iniciar un programa de mejoramiento genético, es necesario seleccionar entre los materiales nacionales aquellos que presenten características de resistencia o tolerancia a la acumulación de Deoxinivalenol.

## Objetivo

Evaluar la acumulación de DON en líneas de trigo pre seleccionadas como tolerantes a la Fusariosis de la Espiga.

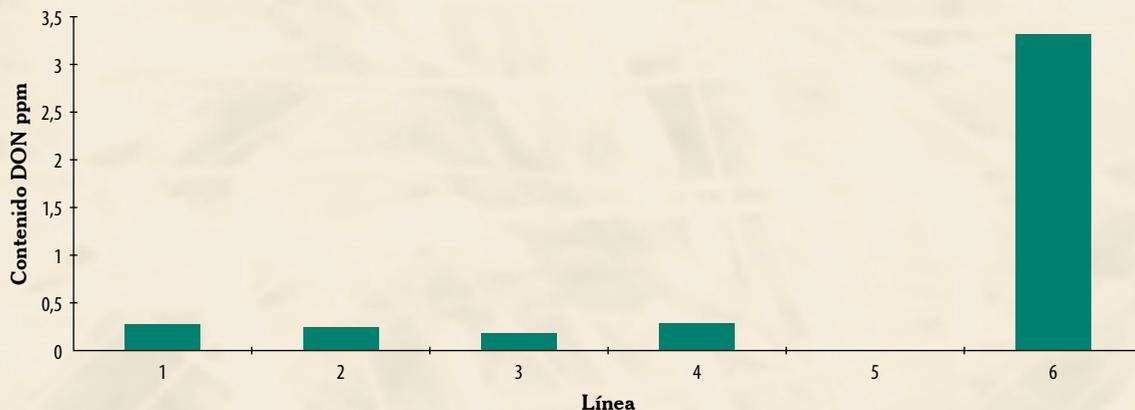
## Metodología

Se estudiaron semillas de trigo de la zafra agrícola 2013 provenientes del Centro Regional de Investigación de Capitán Miranda, Itapúa, dependiente del IPTA y previamente categorizadas como tolerantes a la fusariosis de la espiga. Las mismas fueron etiquetadas y transportadas en condiciones adecuadas al Laboratorio de Biotecnología del CEMIT-DGICT-UNA, donde fueron analizadas. Las semillas fueron sembradas a campo en parcelas de 1,5 m<sup>2</sup>, tres repeticiones por línea e inoculadas por aspersión al momento de la floración con una concentración de 1.10<sup>6</sup> conidios de 4 cepas de *Fusarium graminearum* de la colección del Laboratorio de Biotecnología y previamente caracterizadas como productoras de DON. La severidad de la enfermedad se midió por medio de una escala 3 semanas posteriores a la infección. Para la cuantificación del Deoxinivalenol fue utilizado el Equipo Vertu Lateral Flow Reader de VICAM© y las cintas cuantificadoras Don-V. Límite de detección de 0,11 a 5 ppm. Posteriormente se realizó el análisis estadístico con ayuda del paquete estadístico Graphad Prism 6. Se estudió la relación entre la severidad de la enfermedad y la acumulación de DON. Se realizó la categorización de las líneas teniendo en cuenta los resultados obtenidos.

## Resultados y Discusión

En las muestras analizadas la concentración de DON varió de 0,03 ppm a 3,1 ppm. De acuerdo a los resultados obtenidos, el 20% de las líneas estudiadas presentó valores superiores a 0,5 ppm según las categorías establecidas. No pudo demostrarse la existencia de correlación entre los valores de severidad de la fusariosis de la espiga y la acumulación de DON en líneas previamente categorizadas como tolerantes a *Fusarium* a un nivel de significancia de  $P < 0,05$ . El valor obtenido fue de 0,08, no significativo para las condiciones del experimento.

Fig. 1. Acumulación de DON en líneas estudiadas, San Lorenzo 2013.



A pesar de que las líneas estaban previamente categorizadas como tolerantes a la Fusariosis de la espiga, los niveles de DON en las mismas fueron variables. La producción de micotoxinas es un fenómeno complejo y dependiente de factores como la genética del hongo, condiciones ambientales y genética de la planta huésped. En la línea 5 no se determinó la presencia de DON, por lo cual se puede observar que dentro de los materiales nacionales existen potenciales fuentes de resistencia a la acumulación de esta micotoxina.

## Agradecimientos

Al INBIO, CAPECO, IPTA, FCA UNA, por su colaboración para la realización de este trabajo.

## Referencias bibliográficas

- Quintana, L., Morel, W. Especies de *Fusarium* que afectan a semillas de trigo en Paraguay. CRIA, **Memorias de Jornadas Técnicas**. MAG, CRIA. Itapúa, Paraguay. p. 99-101, 2004.
- Marasas, W.F.O., Burguess, L.W., Anelich R.Y., Lamprecht S.C., Van Schalkwyk, D.J. Survey of *Fusarium* species associated with plant debris in South African soils. *S. Afr. J. Bot.* 54, 63-71. 1988.
- Quintana, L. 2004. Toxinas de *Fusarium* en semilla de trigo en el Paraguay. CRIA, **Memorias de Jornadas Técnicas**. MAG, CRIA. Itapúa, Paraguay. pp. 102-103
- Quintana, L.; Morel, W. 2004. Especies de *Fusarium* que afectan a semillas de trigo en Paraguay. CRIA, **Memorias de Jornadas Técnicas**. MAG, CRIA. Itapúa, Paraguay. pp. 99-101.

# 5. EXPRESIÓN DE LOS GENES NPR1 Y PR1 ASOCIADOS AL ÁCIDO SALICÍLICO EN LA RESPUESTA DE DEFENSA DEL PATOSISTEMA TRIGO – COMPLEJO *Fusarium graminearum*

Christian Eduardo Dujak Riquelme<sup>3\*</sup>, Juliana Moura Mendes Arrúa<sup>2</sup>, Cinthia Carolina Cazal Martínez<sup>3</sup>, Lourdes Romero<sup>3</sup>, Lourdes Martínez<sup>1</sup>, Sara Victoria Nuñez<sup>1</sup>, Pablo David Arrúa Alvarenga<sup>1</sup>, Rosa Oviedo de Cristaldo<sup>4</sup>, Danilo Fernández Ríos<sup>5</sup>, Man Mohan Kohli<sup>6</sup> y Andrea Alejandra Arrúa<sup>2\*\*</sup>

\*[cdujak@hotmail.com](mailto:cdujak@hotmail.com), \*\*[aaarrua@gmail.com](mailto:aaarrua@gmail.com)

<sup>(1)</sup> Iniciación Científica – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(2)</sup> Docente Investigador – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(3)</sup> Alumno – Maestría en Ciencias en Biotecnología – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(4)</sup> Docente a Tiempo Completo y Dedicación Exclusiva – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(5)</sup> Docente Investigador – FACEN-UNA

<sup>(6)</sup> Asesor Científico – CAPECO-INBIO

## Introducción

Las especies del Complejo *Fusarium graminearum*, son responsables de la Fusariosis de la Espiga o golpe blanco. A consecuencia de la misma se producen grandes pérdidas para los productores en calidad y rendimiento. La consecuencia más relevante de la presencia de *Fusarium* es la acumulación de micotoxinas en los granos que tienen impacto negativo en la salud de animales y humanos. Las herramientas moleculares son un poderoso elemento para develar los mecanismos de interacción entre los patógenos y sus hospederos y en los últimos años se ha logrado un gran avance en lo que refiere a la genómica, metabolómica y proteómica de estas interacciones. El mecanismo de respuesta de defensa desencadena una cascada de señalizaciones en el momento de la interacción y este desarrollo confiere al hospedero características que lo clasifican como susceptible o resistente.

## Objetivo

Evaluar la respuesta de defensa de los genes NPR1 y PR1 en el patosistema Trigo- Complejo *Fusarium graminearum*.

## Metodología

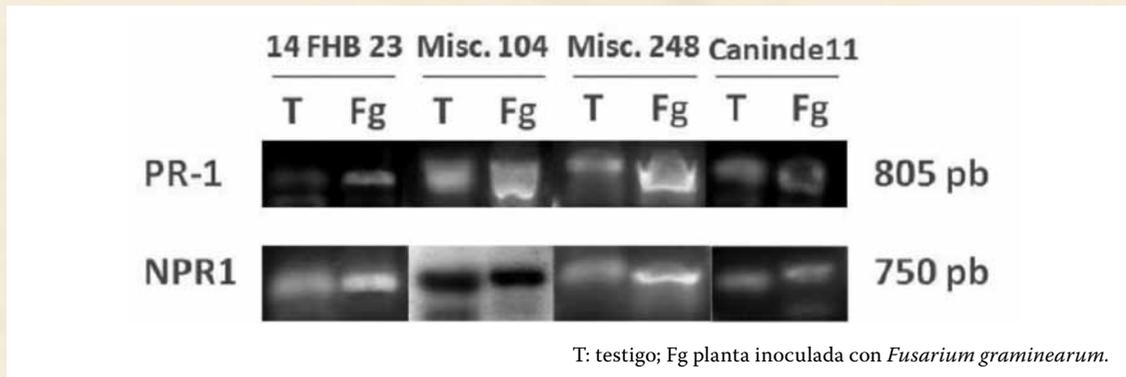
El Experimento se llevó a cabo en el Invernadero y el Laboratorio del CEMIT-DGICT-UNA, durante el periodo agrícola 2013. Se realizó la infección forzada de cuatro líneas avanzadas del Programa de Investigación en Trigo, con una cepa *Fusarium graminearum* C117, perteneciente a la colección del Laboratorio de Biotecnología, del CEMIT-DGICT-UNA a una concentración de  $1.10^6$  conidias, al momento de la floración.

A las 24 horas posteriores a la infección forzada se colectaron las espigas que fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se realizó la extracción de RNA y síntesis de cDNA mediante el uso de Kits de Life Technologies. Posteriormente se realizó la PCR de punto final.

Para la verificación de la presencia o ausencia de respuesta se realizó un gel de agarosa al 2%, que se dejó correr por 1 hora a 90 voltios.

## Resultados y Discusión

Fig. 1. **Expresión de genes NPR1 y PR1 luego de 24 horas posteriores a la inoculación en las muestras estudiadas.**



Las líneas de trigo evaluadas a las 24 horas después de la inoculación, los genes NPR1 y PR1 se expresan como respuesta de defensa en el patosistema trigo- *Fusarium graminearum*. En estudios anteriores la expresión del (At NPR1), análogo al gen *Arabidopsis* NPR1, el cual codifica al regulador de la señalización de ácido salicílico (SA) y que han demostrado que reduce la severidad de la fusariosis de la espiga (FHB) causada por *Fusarium graminearum*. Además han correlacionado que el incremento del SA con una elevada expresión del gen patogénesis related 1 (PR1) en las espigas infectadas, y generando así resistencia a la FHB.

Este es el primer estudio de este tipo en Paraguay. Es interesante seguir estudiando este tipo de mecanismos en trigo, sobre todo priorizando las variedades nacionales para estimularlos y aumentar la resistencia a la FHB.

## Referencias bibliográficas

- \_ Bai, G., Shaner G. 2004. Management and resistance in wheat and barley head blight. Annual review of phytopathology 42: 135-161
- \_ Gosman, N., Chandler, E., Thomsett, M., Draeger, R., Nicholson, P. 2005. Analysis of the relationship between parameters of resistance to Fusarium head blight and *in vitro* tolerance to deoxynivalenol of the winter wheat cultivar WEK0609. European Journal of plant pathology 111(1):57-66
- \_ Leslie, J., Summerell, B. 2008. The Fusarium Laboratory Manual. John Wiley & Sons. 403 p.
- \_ Kohli, M. 1987. Taller sobre la Fusariosis de la Espiga en el Cono Sur. CIMMYT. 6P.
- \_ Makandar R. *et al.* 2012. Salicylic acid regulates basal resistance to Fusarium head blight in wheat. Vol 25 Nro. 3. The American Phytopathological Society Pp 431-439.
- \_ Walter S., Nicholson, P. Doohan, F. 2010. Action and Reaction of the host and pathogen during Fusarium head blight disease. New Phytologist 185(1): 54-66



# 6. PRESENCIA DE DEOXINIVALENOL EN TRIGO ZAFRA 2013

Pablo David Arrúa Alvarenga<sup>1\*</sup>, Juliana Moura Mendes Arrúa<sup>2</sup>, Cinthia Carolina Cazal Martínez<sup>3</sup>, Christian Eduardo Dujak Riquelme<sup>3</sup>, Lourdes Romero Méndez<sup>3</sup>, Karina Solís<sup>1</sup>, Sara Victoria Núñez<sup>1</sup>, Rosa Oviedo de Cristaldo<sup>4</sup>, Danilo Fernández Ríos<sup>5</sup>, Man Mohan Kohli<sup>6</sup> y Andrea Alejandra Arrúa<sup>2\*\*</sup>

\*agroilex@gmail.com; \*\*aarrua@gmail.com

<sup>(1)</sup> Iniciación Científica – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(2)</sup> Docente Investigador – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(3)</sup> Alumno – Maestría en Ciencias en Biotecnología – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(4)</sup> Docente a Tiempo Completo y Dedicación Exclusiva – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(5)</sup> Docente Investigador –FACEN-UNA

<sup>(6)</sup> Asesor Científico – CAPECO-INBIO

## 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.

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. El principal metabolito tóxico asociado a especies del complejo *Fusarium graminearum* es el Deoxinivalenol. 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.

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.

## Objetivo

Determinar la presencia de Deoxinivalenol en semilla de trigo de la zafra 2013.

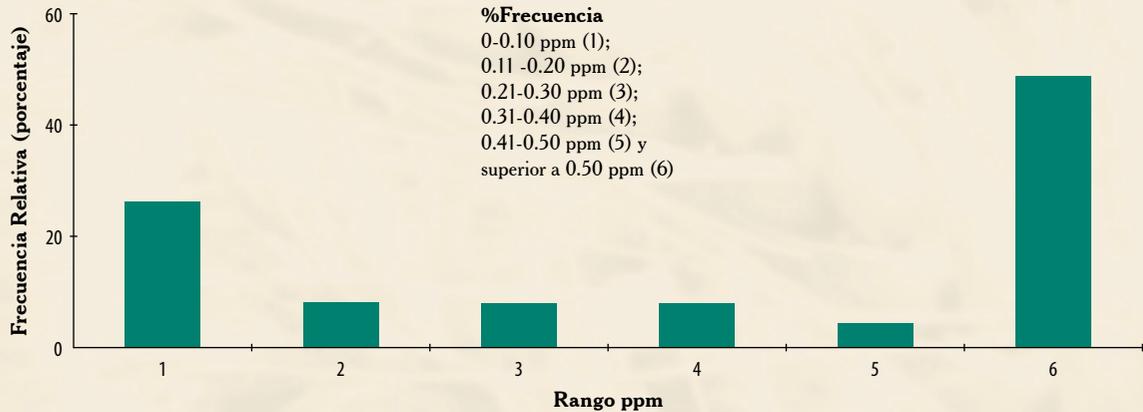
## Metodología

Se estudiaron semillas de trigo de la zafra agrícola 2013 provenientes del Centro Regional de Investigación de Capitán Miranda, Itapúa, dependiente del IPTA. Las mismas fueron etiquetadas y transportadas en condiciones adecuadas al Laboratorio de Biotecnología del CEMIT-DGICT-UNA, donde fueron analizadas. Para la cuantificación del Deoxinivalenol fue utilizado el Equipo Vertu Lateral Flow Reader de VICAM® y las cintas cuantificadoras Don-V. Límite de detección de 0,11 a 5 ppm. Posteriormente se realizó el análisis estadístico con ayuda del paquete estadístico Graphad Prism 6.

## Resultados y Discusión

En las muestras analizadas la concentración de DON varió de 0,03 a 31,4 ppm. Se realizó la categorización de las líneas teniendo en cuenta el contenido de DON.

Fig. 1. **Distribución de frecuencia de DON de muestras analizadas.**



La cantidad de toxina de 0.02 a 3.81 ppm, coincidiendo con, Quintana, 2004; Quintana y Morel, 2004. Las condiciones ambientales del 2012 fueron atípicas con respecto a años anteriores debido a la gran cantidad de heladas ocurridas.

## Agradecimientos

Al INBIO, CAPECO, IPTA, FCA UNA, por su colaboración para la realización de este trabajo.

## Referencias bibliográficas

- Marasas, W.F.O., Burgess, L.W., Anelich R.Y., Lamprecht S.C., Van Schalkwyk D.J. Survey of Fusarium species associated with plant debris in South African soils. S. Afr. J. Bot. 54, 63-71. 1988.
- Quintana, L. 2004. Toxinas de Fusarium en semilla de trigo en el Paraguay. CRIA, Memorias de Jornadas Técnicas. MAG, CRIA. Itapúa, Paraguay. pp. 102-103
- Quintana, L.; Morel, W. 2004. Especies de Fusarium que afectan a semillas de trigo en Paraguay. CRIA, Memorias de Jornadas Técnicas. MAG, CRIA. Itapúa, Paraguay. pp. 99-101.



Analizador del DON.

# 7. USO DE PCR PARA LA DETECCIÓN DE AISLADO DE *Fusarium graminearum* PRODUCTORES DE DEOXINIVALENOL

Juliana Moura Mendes Arrua<sup>2\*</sup>, Lourdes Belén Martínez Rojas<sup>1</sup>, Cinthia Carolina Cazal Martínez<sup>3</sup>, Cristhian Dujak<sup>3</sup>, Lourdes Romero Méndez<sup>3</sup>, Pablo David Arrúa Alvarenga<sup>1</sup>, Sara Victoria Nuñez<sup>1</sup>, Karina Solís<sup>1</sup>, Sebastián Pedro<sup>1</sup>, Andrea Alejandra Arrúa<sup>2\*</sup> \**aaarrua@gmail.com*

\**jmarrua@gmail.com*; \*\**aaarrua@gmail.com*

<sup>(1)</sup> Iniciación Científica – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(2)</sup> Docente Investigador – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(3)</sup> Alumno – Maestría en Ciencias en Biotecnología – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(4)</sup> Docente a Tiempo Completo y Dedicación Exclusiva – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(5)</sup> Docente Investigador – FACEN-UNA

<sup>(6)</sup> Asesor Científico – CAPECO-INBIO

## Introducción

*Fusarium* es un hongo polífago, hemibiotrófico y cosmopolita. La identificación de las diferentes especies es compleja y no existe un sistema taxonómico unificado. En trigo, produce la Fusariosis de la espiga, que afecta el rendimiento del cultivo, la calidad del grano y sus propiedades nutricionales.

La consecuencia más relevante de esta enfermedad y del patógeno, es la producción de micotoxinas, principalmente Deoxinivalenol (DON) y Nivalnol (NIV). En Paraguay las especies de *Fusarium* reportadas en semillas de trigo hasta la actualidad son *F. graminearum*, *F. semitectum*, *F. avenaceum*, *F. equiseti* y *F. culmorum*, siendo *Fusarium graminearum* la especie predominante con una frecuencia aproximada al 90% *Fusarium graminearum* es responsable por el desarrollo de la enfermedad Fusariosis de la espiga en trigo.

Los tricotecenos son potentes inhibidores de la síntesis proteica en mamíferos, al ser consumidos como contaminantes de alimentos promueven neurotoxicidad, nefrotoxicidad e inmunosupresión. La PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), es una poderosa herramienta que permite la identificación de aislados de *Fusarium* productores de tricotecenos. Ensayos de PCR han sido desarrollados para distinguir aislados productores de Deoxinivalenol, constituyendo el mismo objetivo de este trabajo.

## Objetivo

Caracterizar cepas de *Fusarium graminearum* productoras de tricotecenos por la técnica de PCR.

## Metodología

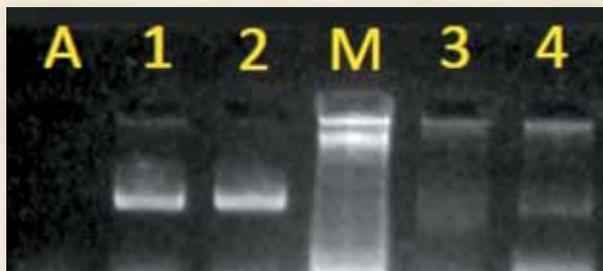
Los experimentos fueron realizados en el laboratorio de Biotecnología del Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas, Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica, Universidad Nacional de Asunción (CEMIT-DGICT-UNA).

Extracción de ADN: Se utilizaron cuatro cepas de la colección del laboratorio de Biotecnología, CEMIT – DGICT – UNA caracterizadas como *Fusarium graminearum*, según la clave Leslie y Summerell, 2006. Las cepas denominadas FG64, FG82, FG117 y FG130 fueron sembradas en agar Spezieller Nährstoffamer (SNA), a temperatura de 22°C durante 5 días, se obtuvo el micelio y entonces se procedió la extracción siguiendo el protocolo de CTAB modificado (Doyle; Doyle, 1987), para evaluar la calidad del ADN, se preparó un gel de agarosa a 1% y se observó en un Transiluminador UV.

Amplificación por PCR: Para determinar la capacidad de los aislados de producir tricotecenos se utilizó el cebador TrI5R/TrI5F. El producto de PCR fue observado en electroforesis en gel agarosa de alto peso molecular 1%, con buffer de carga TBE 1X y fotografiado bajo luz UV.

## Resultados y Discusión

Fig. 1. **Producto de PCR del cebador TRI5. Carril A, testigo (agua), carril 1, FG64, carril 2, FG82, carril M, marcador de peso molecular, carril 3, FG117 y carril 4, FG130.**



Al observar el producto de amplificación, se puede concluir que las cepas FG64, FG82 y FG130 son potencialmente productoras de Deoxinivalenol. En el caso de la cepa FG117 no se observó producto, por lo cual se podría concluir que la misma no es toxigénica. La PCR es una técnica rápida y altamente eficiente y específica para la detección de aislados potencialmente productores de Deoxinivalenol. Al mismo tiempo podría ser utilizada también como un método en el control de calidad de alimentos.

## Agradecimientos

Al INBIO, CAPECO, IPTA, FCA, UNA, por su colaboración para la realización de este trabajo.

## Referencias bibliográficas

- \_ Doyle, J., Doyle, J. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19:11-15
- \_ Leslie, J.; Summerell, B. **The Fusarium laboratory manual**. Blackwell. USA. 399 p. 2006.
- \_ Alexander, N., Proctor, R., McCormick, S. 2009. Genes, gene clusters and biosynthesis of trichotecenes and fumonisins in *Fusarium*. *Toxin Reviews* 28(2-3):198-215
- \_ Quintana, L.; Morel, W. Especies de *Fusarium* que afectan a semillas de trigo en Paraguay. CRIA, **Memorias de Jornadas Técnicas**. MAG, CRIA. Itapúa, Paraguay. p. 99-101, 2004.
- \_ Quintana, L. 2004. Toxinas de *Fusarium* en semilla de trigo en el Paraguay. CRIA, *Memorias de Jornadas Técnicas*. MAG, CRIA. Itapúa, Paraguay. pp. 102-103
- \_ Quintana, L.; Morel, W. 2004. Especies de *Fusarium* que afectan a semillas de trigo en Paraguay. CRIA, *Memorias de Jornadas Técnicas*. MAG, CRIA. Itapúa, Paraguay. pp. 99-101

# 8. EFECTO DEL pH SOBRE EL CRECIMIENTO *IN VITRO* DE *Fusarium graminearum*

Lourdes Belén Martínez Rojas<sup>1</sup>, Juliana Moura Mendes Arrua<sup>2\*</sup>, Cinthia Carolina Cazal Martínez<sup>3</sup>, Cristhian Dujak<sup>3</sup>, Lourdes Romero Méndez<sup>3</sup>, Pablo David Arrúa Alvarenga<sup>1</sup>, Sara Victoria Nuñez<sup>1</sup>, Karina Solís<sup>1</sup>, Sebastián Pedro<sup>1</sup>, Andrea Alejandra Arrúa<sup>2\*</sup> *aaarrua@gmail.com*

*\*jmmarrua@gmail.com; \*\*aaarrua@gmail.com*

<sup>(1)</sup> Iniciación Científica – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(2)</sup> Docente Investigador – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(3)</sup> Alumno – Maestría en Ciencias en Biotecnología – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(4)</sup> Docente a Tiempo Completo y Dedicación Exclusiva – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(5)</sup> Docente Investigador – FACEN-UNA

<sup>(6)</sup> Asesor Científico – CAPECO-INBIO

## Introducción

La fusariosis de la espiga es una de las enfermedades más serias en trigo; el causante es un hongo cosmopolita conocido como *Fusarium graminearum*. El pH es una de las propiedades químicas más importantes del suelo, ésta variable puede determinar el tipo de organismo que se desarrolle en él. . Pereira, 2007 señala; el pH es considerado de acuerdo con Jackson (1970) como una de las propiedades químicas más importantes del suelo, debido al significativo efecto que ejerce tanto sobre las características físicas, químicas y biológicas de éste, como también sobre el rendimiento de los cultivos. Esta variable puede determinar desde el punto de vista biológico el tipo de organismo que se desarrolle sobre un suelo, debido a su significativa influencia sobre la disponibilidad de nutrientes. Dentro de este contexto, el objetivo de este estudio es analizar bajo condiciones controladas de laboratorio el efecto del pH del medio de cultivo sobre el crecimiento *in vitro* de cuatro cepas de *Fusarium gaminearum*, aisladas de trigo.

## Materiales y Métodos

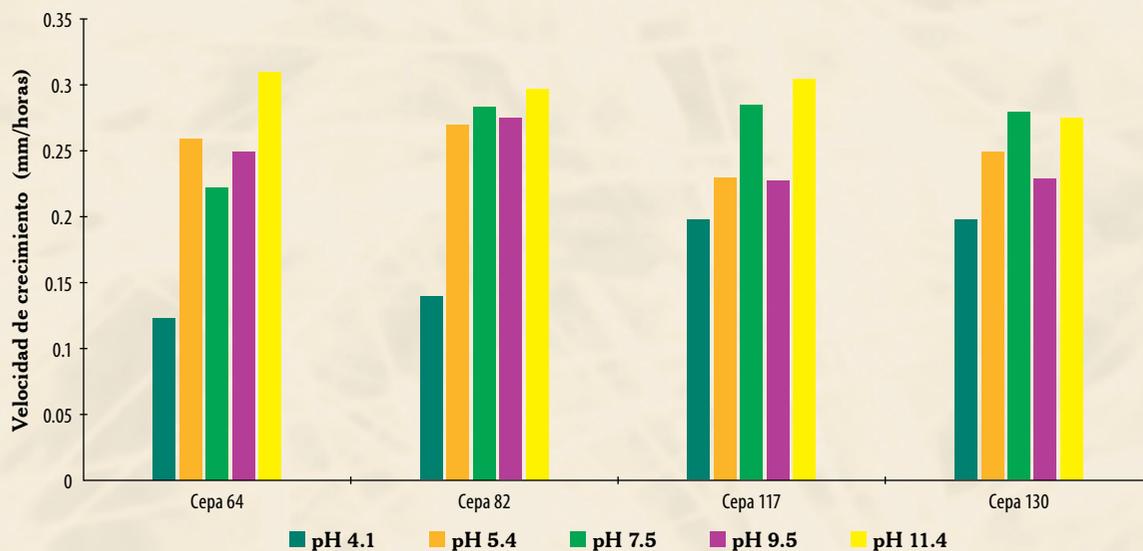
Las cepas utilizadas para la realización de este trabajo fueron (64, 82, 117, 130) todas provenientes de la colección del Laboratorio de Biotecnología del CEMIT-DGICT-UNA. En este ensayo se sembraron bocados de 5 mm de diámetro de las cuatro cepas del hongo que se encuentran conservados en medio SNA en placas de 57 cm de diámetro con medio PDA, con pH ajustado a 4,1, 5,4 (control), 7,5, 9,5, 11,4, utilizando HCl para la acidificación e Hidróxido de Sodio para la alcalinización. Se incubaron a una temperatura de 22 °C durante 7 días período en el cual se midió cada tres días el crecimiento radial de las colonias por el reverso de las placas con pie de metro digital. Los resultados obtenidos fueron evaluados a través de análisis de varianza.

## Resultados y Discusión

*Velocidad media de crecimiento.* Los resultados muestran que la variación de pH del medio tuvo efecto sobre la velocidad de crecimiento de las cuatro cepas (Fig. 1). Se observó que la cepa 64 presentó mayor variación entre las velocidades medias de crecimiento dependiendo del rango de pH estudiado. La máxima velocidad de crecimiento para esta cepa se encontró en los tratamientos a pH 5,4 y 11,4 (0,26 y 0,31 mm/horas, respectivamente). La cepa 82 fue la segunda cuya velocidad de crecimiento varió más dependiendo del pH del medio, logrando su máxima velocidad en el tratamiento a pH 11,4 (0,29 mm/horas). Se observó que la cepas 117 y 130 presentaron la menor variación en las velocidades de crecimiento, La cepa 117 alcanzó su mayor velocidad de crecimiento a pH 11,4 (0,30 mm/horas) al igual que las 2 cepas anteriores, y, la cepa 130 a pH 7,5 y 11,4, ambas a 0,27 mm/horas sin diferencias significativas. Se observó además que las cuatro cepas presentaron las velocidades de crecimiento más bajas fue en el tratamiento a pH 4,1.

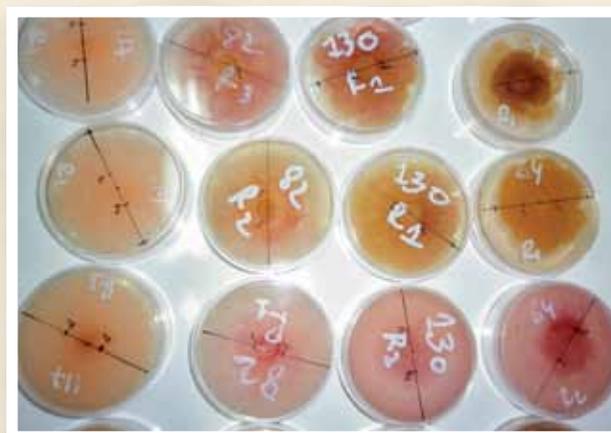
El crecimiento *in vitro* de las cuatro cepas de *Fusarium graminearum* respondió de forma significativa a los distintos valores de pH del medio de cultivo ensayados. En las cuatro cepas se observó que tienden a crecer mejor en condiciones de alcalinidad que de acidez, coincidiendo en pH óptimo de 11,4. Sin embargo, en general, todas las cepas presentaron un crecimiento satisfactorio a pH 5,4 y 7,1, lo que concuerda con, Marín, 2010 que indica; aunque los hongos toleran amplios rangos de pH, el óptimo para casi todas las especies contaminantes de vegetales es de aproximadamente 5,6. Además, la FAO señala que el Trigo crece mejor en suelo con pH de 5,5 y 7,5. Ello indica que considerar las condiciones de pH del cultivo o del ensilaje podría contribuir a reducir la propagación del fitopatógeno.

Fig. 1. **Crecimiento de Cepas de *Fusarium graminearum* en función al pH del medio.**



## Referencias bibliográficas

- Gómez, E. Caracterización de cepas toxigénicas del género *Fusarium* mediante técnicas de biología molecular. 2008. Pág 48.
- FAO. 2001. Factores Ambientales. Pag.120 (<http://www.fao.org/DOCREP/006/X8234S/X8234S00.HTM>)
- Pereira, G., Herrera, A., Machuca, A., Sánchez, M. Efecto del pH sobre el crecimiento *in vitro* de hongos ectomicorrízicos recolectados de plantaciones de *Pinus radiata*. Bosque, 2007, vol. 28, n° 3, p. 215-219.
- Jackson, M. 1970. Análisis químico de suelos. Barcelona, España. Omega. 662 p.
- Ortega, L., Kikot, G., Rojas, L., López, L., Astorteca, A., Aconada, T. Production, characterization, and identification using proteomic tools of a polygalacturonase from *Fusarium graminearum*. Journal of Basic Microbiology Supplement: Fungi, 2014, vol. 54, n° 1, p 170-177.



Crecimiento de Cepas de *Fusarium graminearum* en función al pH del medio.

# 9. CARACTERIZACIÓN DE QUIMOTIPOS DE *Fusarium graminearum* AISLADOS DE TRIGO

Juliana Moura Mendes Arrua<sup>2\*</sup>, Lourdes Belén Martínez Rojas<sup>1</sup>, Cinthia Carolina Casal Martínez<sup>3</sup>, Cristhian Dujak<sup>3</sup>, Lourdes Romero Méndez<sup>3</sup>, Pablo David Arrúa Alvarenga<sup>1</sup>, Sara Victoria Nuñez<sup>1</sup>, Karina Solís<sup>1</sup>, Sebastián Pedro<sup>1</sup>, Andrea Alejandra Arrúa<sup>2\*</sup> \*[aaarrua@gmail.com](mailto:aaarrua@gmail.com)

\*[jmmarrua@gmail.com](mailto:jmmarrua@gmail.com); \*\*[aaarrua@gmail.com](mailto:aaarrua@gmail.com)

<sup>(1)</sup> Iniciación Científica – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(2)</sup> Docente Investigador – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(3)</sup> Alumno – Maestría en Ciencias en Biotecnología – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(4)</sup> Docente a Tiempo Completo y Dedicación Exclusiva – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(5)</sup> Docente Investigador – FACEN-UNA

<sup>(6)</sup> Asesor Científico – CAPECO-INBIO

## Introducción

La Fusariosis de la espiga del trigo es una enfermedad importante a nivel mundial, causada por una o más especies del género *Fusarium*. Afecta la producción del grano, su calidad, rendimiento pero el daño más significativo es la presencia de micotoxinas producidas por el patógeno. Es una enfermedad devastadora en países como Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay, sobre todo luego de la implantación del sistema de siembra directa.

En Paraguay las especies de *Fusarium* reportadas en semillas de trigo hasta la actualidad son *F. graminearum*, *F. semitectum*, *F. avenaceum*, *F. equiseti* y *F. culmorum*, siendo *Fusarium graminearum* la especie predominante con una frecuencia aproximada al 90%. *Fusarium graminearum* es responsable por el desarrollo de la enfermedad Fusariosis de la espiga en trigo, además de causar pérdidas del rendimiento produce la micotoxina deoxinivalenol (DON), que es un tricoteceno también conocido como vomitoxina. Los tricotecenos son potentes inhibidores de la síntesis proteica en mamíferos, al ser consumidos como contaminantes de alimentos promueven neurotoxicidad, nefrotoxicidad e inmunosupresión.

Las cepas de *F. graminearum* suelen expresar uno de los tres conjuntos de tricotecenos ya sea: (i) nivale-nol y su acetilado derivados (NVI quimiotipo), (ii) el deoxinivalenol y 3-acetildeoxinivalenol (3-ADON quimio-tipo), o (iii) y deoxinivalenol 15-acetildeoxinivalenol (15-ADON quimiotipo). Los diferentes quimiotipos tienen distribución geográfica diferentes, debido a las diferencias toxicológicas que presentan los quimiotipos NIV o DON, es importante clasificar los diferentes genotipos. Ensayos de PCR han sido desarrollados para distinguir los genotipos productores de toxinas, constituyendo el mismo objetivo de este trabajo.

Los experimentos fueron realizados en el laboratorio de Biotecnología del Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas, Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica, Universidad Nacional de Asunción (CEMIT-DGICT-UNA).

## Objetivo

Normalizar la técnica de PCR para la caracterización de quimiotipo de *Fusarium graminearum* aislado de trigo

## Metodología

Extracción de ADN: Se utilizó una cepa que estaba conservada en el laboratorio de Biotecnología, CEMIT – DGICT – UNA caracterizada como *Fusarium graminearum*, según la clave Leslie y Summerell, 2006. La cepa denominada FG64 fue resembrada en agar Spezieller Nährstoffamer (SNA), a temperatura de 22°C durante 5 días, se obtuvo el micelio y entonces se procedió la extracción siguiendo el protocolo de CTAB mo-

dificado (Doyle; Doyle, 1987), para evaluar la calidad del ADN, se preparó un gel de agarosa a 1% y se observó en un Transiluminador UV.

Amplificación por PCR: Para clasificar el quimiotipo de *F.graminearum* se procedió para Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR), con los siguientes cebadores: Tri15R/Tri15F, 3NA/3CON, 3D15A/3D3A basado en el gen funcional Tri13, clasificándose en productores de Deoxinivalenol, de Nivalenol y 3 AcetilDON, respectivamente. El producto de PCR fue observado en electroforesis en gel agarosa de alto peso molecular 1%, con buffer de carga TBE 1X y fotografiado bajo luz UV.

## Resultados y Discusión

Fig. 1. **Producto de PCR de la cepa 64. Primers Tri5F/Tri5R para determinar productores de tricotecenos; Primers 3NA/3CON y 3D15A/3D3A usados para identificar genotipos Nivalenol y derivado acetilado deoxinivalenol.**



Se puede concluir que la cepa 64 presenta el quimiotipo 3 Acetil-deoxinivalenol, siendo 58,5 °C la temperatura ideal para la reacción de PCR. Además, la técnica de PCR puede ser utilizada como una alternativa para identificación de cepas de *F. graminearum* toxigénicas

## Agradecimientos

Al INBIO, CAPECO, IPTA, FCA, UNA, por su colaboración para la realización de este trabajo.

## Referencias bibliográficas

- Leslie, J.; Summerell, B. **The Fusarium laboratory manual**. Blackwell. USA. 399 p. 2006.
- Quintana, L.; Morel, W. Especies de Fusarium que afectan a semillas de trigo en Paraguay. CRIA, **Memorias de Jornadas Técnicas**. MAG, CRIA. Itapúa, Paraguay. p. 99-101, 2004.
- Quintana, L. 2004. Toxinas de Fusarium en semilla de trigo en el Paraguay. CRIA, Memorias de Jornadas Técnicas. MAG, CRIA. Itapúa, Paraguay. pp. 102-103
- Quintana, L.; Morel, W. 2004. Especies de Fusarium que afectan a semillas de trigo en Paraguay. CRIA, Memorias de Jornadas Técnicas. MAG, CRIA. Itapúa, Paraguay. pp. 99-101
- Woloshuk, C.P.; Shim, W-B. 2013. Aflatoxins, fumonisins, and trichothecenes: a convergence of knowledge. *FEMS microbiology reviews* 37(1): 94–109.
- Ward, T.J., Bielawski, J.P., Kistler, H.C., Sullivan, E., O'Donnell, K., 2002. Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic Fusarium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 9278–9283.
- Reynoso, M.M.; Ramirez, M.L.; Torres, A. M.; Chulze, S. M. 2011. Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* strains isolated from wheat in Argentina- *International Journal of Food Microbiology* 145, 444–448.

# 10. COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN PARA *Fusarium graminearum*

María José Ibarra<sup>1</sup>, Juliana Moura Mendes Arrua<sup>2\*</sup>, Cinthia Carolina Cazal Martínez<sup>3</sup>, Cristhian Dujak<sup>3</sup>, Lourdes Romero Méndez<sup>3</sup>, Pablo David Arrúa Alvarenga<sup>1</sup>, Lourdes Belén Martínez<sup>1</sup> Sara Victoria Nuñez<sup>1</sup>, Karina Solís<sup>1</sup>, Sebastián Pedro<sup>1</sup>, Andrea Alejandra Arrúa Alvarenga<sup>2\*</sup> [aaarrua@gmail.com](mailto:aaarrua@gmail.com)

[\\*jmmarrua@gmail.com](mailto:jmmarrua@gmail.com); [\\*\\*aaarrua@gmail.com](mailto:aaarrua@gmail.com)

<sup>(1)</sup> Iniciación Científica – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(2)</sup> Docente Investigador – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(3)</sup> Alumno – Maestría en Ciencias en Biotecnología – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(4)</sup> Docente a Tiempo Completo y Dedicación Exclusiva – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(5)</sup> Docente Investigador – FACEN-UNA

<sup>(6)</sup> Asesor Científico – CAPECO-INBIO

## Introducción

*Fusarium graminearum* es un hongo filamentoso causante de la Fusariosis de la Espiga del trigo, enfermedad que reduce el rendimiento y la calidad del grano. Otra consecuencia de este patógeno es la presencia de micotoxinas, metabolitos secundarios tóxicos producidos durante la fase de crecimiento y esporulación del hongo y que pueden ocasionar síndromes llamados micotoxicosis.

Los métodos moleculares son en la actualidad una poderosa herramienta con múltiples usos en fitopatología, mejoramiento genético vegetal y otras ciencias. Mucho se ha estudiado hasta la actualidad de la genética de *Fusarium* y como lograr plantas resistentes a la fusariosis de la espiga y la acumulación de micotoxinas, pero antes de iniciar estudios con marcadores moleculares, cebadores específicos, secuencias es necesario obtener ADN de buena calidad y en suficiente cantidad.

Por este motivo es prioritario determinar el método más eficiente para obtención de ADN de *Fusarium* y considerando esto se realizó el presente trabajo.

## Objetivo

Comparar diferentes métodos de procesamiento de muestras y técnicas de extracción de ADN de *Fusarium graminearum* aislado de trigo.

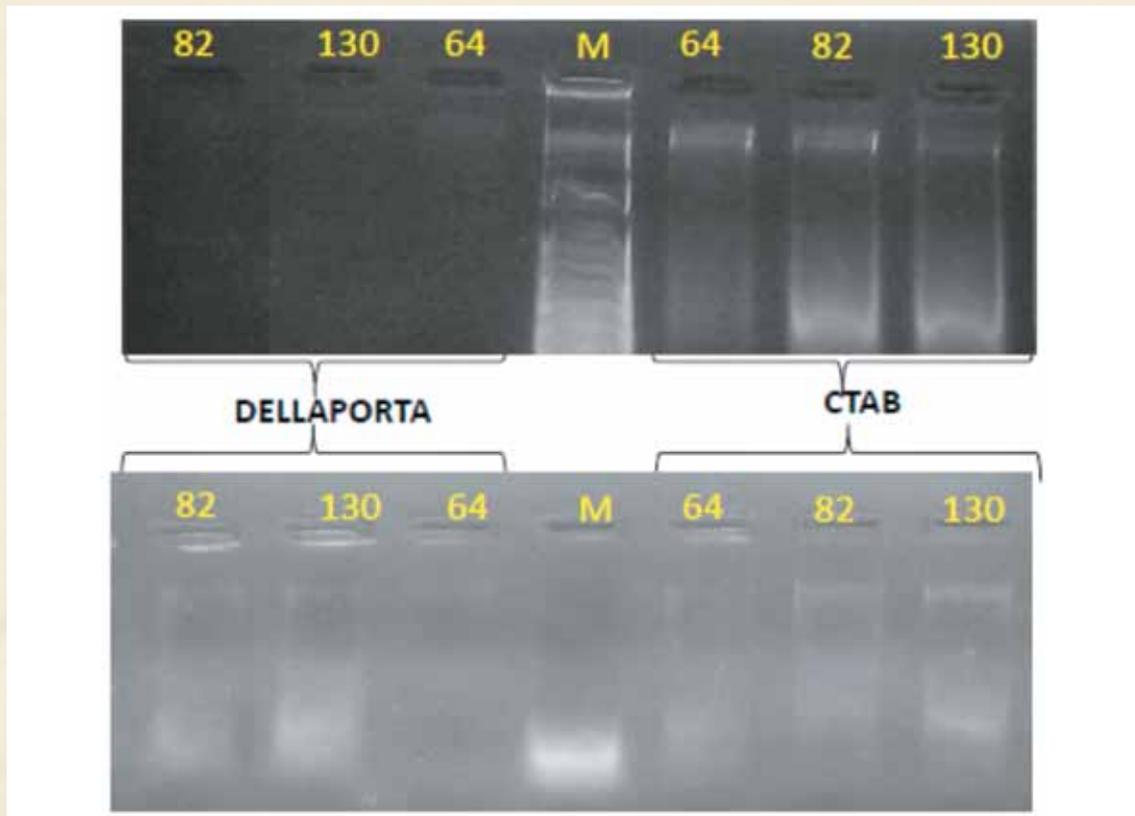
## Metodología

Extracción de ADN: Se utilizaron tres cepas de la colección del Laboratorio de Biotecnología del CEMIT-DGICT-UNA, FG64, FG82 y FG130 y previamente identificadas como *Fusarium graminearum*, según la clave Leslie y Summerell, 2006. Las cepas fueron resembradas en agar Spezieller Nährstoffamer (SNA), a temperatura de 22°C durante 5 días, se obtuvo el micelio y entonces se procedió la extracción siguiendo el protocolo de CTAB modificado (Doyle; Doyle, 1987) y (Dellaporta et. Al, 1983).

La lisis celular se realizó de dos maneras diferentes. A: mediante el uso de nitrógeno líquido y mortero de porcelana; B: precalentando las muestras en los buffers de extracción a 65°C y realizando la molienda con un micropistilo. Para evaluar la calidad del ADN, se preparó un gel de agarosa a 1% y se observó en un Transiluminador UV.

## Resultados y Discusión

Fig. 1. **En la fotografía superior se observa la calidad de ADN cuando las muestras fueron procesadas mediante el uso de mortero de porcelana y nitrógeno líquido. En la fotografía inferior se observan las muestras procesadas mediante calentamiento a 65°C y micropistilo.**



A pesar de que los métodos de extracción testados están diseñados y recomendados para procesamiento de muestras de tejido vegetal se comprobó que ambos son efectivos para la extracción de ADN de *Fusarium graminearum*. Cabe destacar que el método de Doyle y Doyle o CTAB es igualmente efectivo cuando las muestras son procesadas en frío o con calor para realizar la lisis celular.

Al procesar las muestras en calor, se ahorra en recursos económicos y tiempo, por tanto, el método de Doyle y Doyle es recomendable en calor cuando se posee un gran número de muestras para procesar.

## Agradecimientos

Al INBIO, CAPECO, IPTA, FCA, UNA, por su colaboración para la realización de este trabajo.

## Referencias bibliográficas

- \_ Doyle, J., Doyle, J. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19:11-15
- \_ Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks, 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1: 19-21.
- \_ Leslie, J.; Summerell, B. **The Fusarium laboratory manual**. Blackwell. USA. 399 p. 2006.
- \_ Alexander, N., Proctor, R., McCormick, S. 2009. Genes, gene clusters and biosynthesis of trichotecenes and fumonisins in *Fusarium*. *Toxin Reviews* 28(2-3):198-215

# 11. RESPUESTA DE DEFENSA 24 HDI EN EL PATOSISTEMA TRIGO – COMPLEJO *Fusarium graminearum*

Christian Eduardo Dujak<sup>3\*</sup> Riquelme<sup>3</sup>, Juliana Moura Mendes Arrúa<sup>2</sup>, Cinthia Carolina Cazal Martínez<sup>3</sup>, Lourdes Romero<sup>3</sup>, Lourdes Martínez<sup>1</sup>, Sara Victoria Nuñez<sup>1</sup> Pablo David Arrúa Alvarenga<sup>1</sup>, Rosa Oviedo de Cristaldo<sup>4</sup>, Danilo Fernández Ríos<sup>5</sup>, Man Mohan Kohli<sup>6</sup> Líder y Andrea Alejandra Arrúa<sup>2\*\*</sup>

\*cdujak@hotmail.com, \*\*aaarrua@gmail.com

<sup>(1)</sup> Iniciación Científica – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(2)</sup> Docente Investigador – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(3)</sup> Alumno – Maestría en Ciencias en Biotecnología – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(4)</sup> Docente a Tiempo Completo y Dedicación Exclusiva – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(5)</sup> Docente Investigador – FACEN-UNA

<sup>(6)</sup> Asesor Científico – CAPECO-INBIO

## Introducción

Varias proteínas relacionadas con la defensa han sido descritas en muchas especies de plantas tras la infección de los patógenos y están involucradas en el momento de la interacción entre el hospedero y el patógeno, dentro de ellas se mencionan elicitores, proteínas de patogenicidad, hormonas, entre otras sustancias, responsables de los mecanismos de activación o represión ya sea en la resistencia o susceptibilidad de las plantas frente a un enemigo.

Tras la clasificación de familias de proteínas PR, o proteínas de la patogénesis han sido identificadas durante el desarrollo de la fusariosis de la espiga del trigo y relacionadas a resistencia y susceptibilidad las proteínas PR-1, PR-2 (β-1,3-glucanasa), PR-3 (quitinasas), PR-5 (tipo Taumatina) que confieren resistencia cuando están sobre expresadas.

## Objetivo

Determinar la respuesta de defensa de genes relacionados a proteínas de patogenicidad en el patosistema trigo – *Fusarium graminearum*

## Metodología

El Experimento se llevó a cabo en el Invernadero y el Laboratorio del CEMIT-DGICT-UNA, durante el periodo agrícola 2013. Se realizó la infección forzada de cuatro líneas avanzadas del Programa de Investigación en Trigo, con una cepa *Fusarium graminearum* C117, perteneciente a la colección del Laboratorio de Biotecnología, del CEMIT-DGICT-UNA a una concentración de 1.10<sup>6</sup> conidias, al momento de la floración.

A las 24 horas posteriores a la infección forzada se colectaron las espigas que fueron almacenadas a -80°C. Se realizó la extracción de RNA y síntesis de cDNA mediante el uso de Kits de Life Technologies. Posteriormente se realizó la PCR de punto final.

Para la verificación de la presencia o ausencia de respuesta se realizó un gel de agarosa al 2%, que se dejó correr por 1 hora a 90 voltios.

## Resultados y Discusión

Tabla. 1. **Sumario del análisis de expresión de genes NPR-1, PR-1, PR-2 y PR-5 en diferentes líneas y variedades de trigo en el patosistema trigo-Fusarium graminearum 24 horas posteriores a la inoculación.**

Familia	SUMAI 3	MIS 104	FRONTANA	CANINDÉ 11
PR-1	+	+	+	+
PR-2	+	+	+	+
PR-5	+	+	+	+
NPR-1	+	+	+	+

Se han amplificado por PCR cebadores que reconocen genes que codifican proteínas de patogenicidad, demostrándose que en los materiales estudiados, 24 horas después de la inoculación se están transcripcionalmente activos, por tanto se puede concluir que existe una respuesta temprana a la presencia del patógeno.

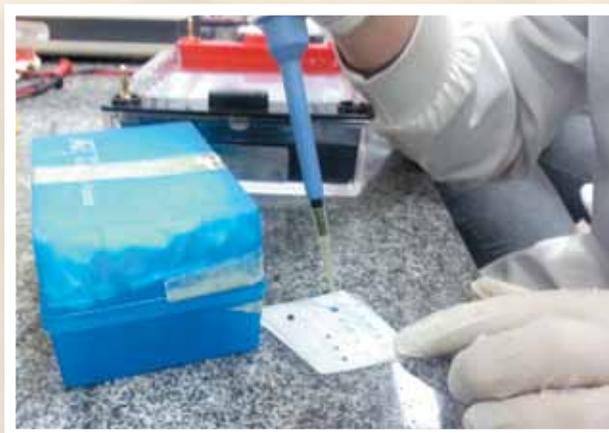
Se han identificado y caracterizado y reportado genes expresados diferencialmente en variedades resistentes y susceptibles formando parte del grupo de transcritos PR-2 y PR-5, en relación al factor “resistencia”.

## Agradecimientos

Al INBIO, CAPECO, IPTA, FCA, UNA, por su colaboración para la realización de este trabajo.

## Referencias bibliográficas

- \_ Bai, G., Shaner G. 2004. Management and resistance in wheat and barley head blight. Annual review of phytopathology 42: 135-161
- \_ Gosman, N., Chandler, E., Thomsett, M., Draeger, R., Nicholson, P. 2005. Analysis of the relationship between parameters of resistance to Fusarium head blight and *in vitro* tolerance to deoxynivalenol of the winter wheat cultivar WEK0609. European Journal of plant pathology 111(1):57-66
- \_ Leslie, J., Summerell, B. 2008. The Fusarium Laboratory Manual. John Wiley & Sons. 403 p.
- \_ Kohli, M. 1987. Taller sobre la Fusariosis de la Espiga en el Cono Sur. CIMMYT. 6P.
- \_ Makandar R. *et al.* 2012. Salicylic acid regulates basal resistance to Fusarium head blight in wheat. Vol 25 Nro. 3. The American Phytopathological Society Pp 431-439.
- \_ Walter S., Nicholson, P. Doohan, F. 2010. Action and Reaction of the host and pathogen during Fusarium head blight disease. New Phytologist 185(1): 54-66



*Análisis molecular de las especies causantes de la Fusariosis de la espiga en trigo en el Paraguay.*

# 12. EVALUACIÓN PREELIMINAR DE TRES MÉTODOS DE INFECCIÓN FORZADA DEL COMPLEJO *Fusarium graminearum* EN TRIGO VARIEDAD CANINDÉ 11

Cynthia Carolina Cazal Martínez<sup>3\*</sup> Riquelme<sup>3</sup>, Juliana Moura Mendes Arrúa<sup>2</sup>, Christian Eduardo Dujak Riquelme<sup>3</sup>, Lourdes Romero<sup>3</sup>, Lourdes Martínez<sup>1</sup>, Sara Victoria Nuñez<sup>1</sup> Pablo David Arrúa Alvarenga<sup>1</sup>, Rosa Oviedo de Cristaldo<sup>4</sup>, Danilo Fernández Ríos<sup>5</sup>, Man Mohan Kohli<sup>6</sup> Líder y Andrea Alejandra Arrúa<sup>2\*\*</sup>

\*cccazalm86@gmail.com, \*\*aaarrua@gmail.com

<sup>(1)</sup> Iniciación Científica – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(2)</sup> Docente Investigador – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(3)</sup> Alumno – Maestría en Ciencias en Biotecnología – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(4)</sup> Docente a Tiempo Completo y Dedicación Exclusiva – CEMIT-DGICT-UNA

<sup>(5)</sup> Docente Investigador – FACEN-UNA

<sup>(6)</sup> Asesor Científico – CAPECO-INBIO

## Introducción

La especie predominante que causa La fusariosis de la espiga en trigo, maíz y otros cereales se trata de *Fusarium graminearum* Schw. (teleomorfo *Gibberella zaeae* Schwein. Petch), si se presentan condiciones de climas cálidos y húmedos durante los estados fenológicos de pre-floración, floración e incluso parte del periodo de llenado de granos las pérdidas en términos de rendimiento y acumulación de micotoxinas podrían ser enormes (Sharan *et al.* 2004). Dicha enfermedad se encuentra muy difundida en el Cono Sur ya que las condiciones climáticas de las diversas regiones hace factible que más del 75 % de la superficie total sembrada con trigo pueda ser afectada por la enfermedad (Kohli, 1989).

La Fusariosis de la espiga, es una enfermedad que posee resistencia de tipo cuantitativo y altamente influenciada por factores ambientales (Bai y Shaner 2004). Existen 5 tipos de resistencia: la resistencia a la infección inicial o penetración (Tipo I) y la resistencia al avance del patógeno dentro de los tejidos de la espiga (Tipo II) fueron descritos por Schroeder y Christensen en 1963, quienes encontraron que ambos tipos de resistencia son independientes y varían entre cultivares (Parry *et al.* 1995). Tipo III- tolerancia a altas concentraciones de deoxynivalenol (DON), principal micotoxina producida por el patógeno; Tipo IV- resistencia a la infección del grano o tolerancia, Tipo V- capacidad de los tejidos para degradar DON (Mesterhazy 1995, Rudd *et al.* 2001).

La severidad de la enfermedad (% espiguillas infectadas) es el criterio más comúnmente utilizados para la evaluación de resistencia Tipo II, mientras que, el porcentaje de espigas infectadas (incidencia de la enfermedad) se utiliza a menudo para estimar el tipo de resistencia I (Miedaner, T *et al.* 2003).

Los cultivares y líneas avanzadas seleccionadas para la resistencia a *Fusarium Head Blight* demuestran bajo a moderado nivel de infección en años epidémicas tales como 2012, este nivel de resistencia combinada con las buenas prácticas agronómicas y control químico adecuado hacen posible cierto manejo de la enfermedad, no es suficiente para eliminar o reducir el nivel de producción de micotoxinas o contaminación en el grano cosechado (*Fusarium Head Blight in Latin America* 2013).

## Objetivo

Evaluar diferentes Métodos de Infección forzada del Complejo *Fusarium graminearum* en Trigo var. Caninde 11

## Metodología

El experimento fue realizado en el año agrícola 2012/2013, en el Campus experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias, en la Ciudad de San Lorenzo, Departamento Central. La siembra de la variedad Caninde 11 se llevó a cabo en la primera quincena del mes de Mayo, dicho material fue proporcionado por el Centro de Investigación Agrícola de Capitán Miranda (CRIA) del Instituto Paraguayo de Tecnología Agropecuaria (IPTA) pertenecientes a la zafra 2011/2012.

Los aislados de los hongos *Fusarium graminearum* utilizados para las infecciones forzadas fueron obtenidos a partir de muestras de granos de trigo colectadas de la zona de producción del Departamento de Itapúa dentro del marco del Proyecto Especies de *Fusarium* y micotoxinas asociadas al cultivo del trigo en zonas productoras de la región oriental del Paraguay.

Para la siembra se utilizó una parcela de 5 m<sup>2</sup> (5x1m), donde se colocaron 3 hileras del material Caninde 11, se inocularon 10 espigas por cada método con el *Pool* de cepas y otras 10 por cada método con Agua de modo a obtener el control de la infección. Se realizó una fertilización base de 250 kg por hectárea de la formulación (NPK 15-15-15) y a los 30 días después de la siembra otra fertilización de cobertura con Urea (NPK 46-00-00).

La concentración de conidias utilizadas fue de 6.10<sup>4</sup> conidias.ml<sup>-1</sup> cuantificados con un hematocitómetro (French y Hebert, 1980). Los estados fenológicos utilizados se registrarán por la escala BBCH utilizado por Bleiholder *et al.* (1989). El método de infección para tolerancia tipo I es el de aspersion y para tolerancia tipo II son la de inyección y algodón.

En el método de inyección se utilizó jeringas con 1 mL de la suspensión para cada espiga, se inyectaron a nivel medio de las mismas, en cuanto al método de algodón se utilizaron pedazos de algodón con 1mL de la suspensión colocadas a nivel medio de las espigas, para ambos métodos se busca superar la barrera mecánica que ejercen la palea y la lema, mientras que, para el método de aspersion se utilizaron pulverizadores de 500 mL, y la infección se llevará a cabo pulverizando con un toque las espigas en cuatro direcciones alrededor de la misma (Miedaner *et al.* 2003, USDA 2014).

La variable evaluada fue el porcentaje incidencia (%) que consiste en la relación entre en el número de espigas infectadas y el número de espigas inoculadas multiplicado por 100 observados a los 8 días después de la infección (DDI).

## Resultados y Discusión

Según los datos obtenidos se pudo observar que a los 8 días después de la infección todas las espigas infectadas presentaban síntomas de Fusariosis.

En la Fig. 1 se observan espigas infectadas por el método de Aspersion, y han presentado una infección evidente en varios puntos. La Fig. 2 corresponde a infecciones con el método de Inyección donde se ven síntomas en zonas puntuales de infección. La Fig. 3 se puede observar síntomas de la enfermedad en la zona donde se colocaron las piezas de algodón con las conidias que corresponden al método de Algodón (Miedaner, T *et al.* 2003); (MUSANTE, C *et al.* 2010); (USWBSI 2013).

Fig. 1. **Síntomas de espigas sometidas a infecciones forzadas, por el método de Asperción. San Lorenzo, 2013.**

---



Fig. 2. **Síntomas de espigas sometidas a infecciones forzadas, por el método de Inyección. San Lorenzo, 2013.**

---



Fig. 3. **Síntomas de espigas sometidas a infecciones forzadas, por el método de Algodón. San Lorenzo, 2013.**

---



El porcentaje de incidencia para los tres métodos fue del 100% por lo que se puede concluir que la variedad de trigo Caninde 11 bajo éstas condiciones no presento ningún tipo de tolerancia a la fusariosis de la espiga.

## Agradecimientos

Al INBIO, CAPECO, IPTA, FCA UNA, por su colaboración para la realización de este trabajo.

## Referencias bibliográficas

- Bai, G; Shaner, G. . 2004. Management and Resistance in Wheat and Barley to Fusarium Head Blight1 (En pmid: 15283663). Annual Review of Phytopathology 42(1): 135-161.
- Bleiholder, H; Boom, T van den; Stauss, R. . 1989. A uniform code for the growth stages of crops and weeds. Gesunde Pflanzen (Germany, F.R.) 1989.
- French, ER; Hebert, TT. . 1980. Métodos de investigación fitopatológica. s.l., Bib. Orton IICA / CATIE, 318 p.
- Fusarium Head Blight in Latin America. . 2013. Fusarium Head Blight in Latin America.
- Kohli, MM. . 1989. Taller Sobre la Fusariosis de la Espiga en America del Sur; Encarnacion, Paraguay; 7-11 Sep 1987. 1989.
- Mesterhazy, A. . 1995. Types and components of resistance to Fusarium head blight of wheat. Plant Breeding 114(5): 377-386.
- Miedaner, T; Moldovan, M; Ittu, M. . 2003. Comparison of Spray and Point Inoculation To Assess Resistance to Fusarium head Blight in a Multienvironment Wheat Trial. Phytopathology 93(9): 1068-1072.
- Miedaner, T; Moldovan, M; Ittu, M. . 2003. Comparison of spray and point inoculation to assess resistance to fusarium head blight in a multienvironment wheat trial (En pmid: 18944089). Phytopathology 93(9): 1068-1072.
- Parry, DW; Jenkinson, P; McLEOD, L. . 1995. Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals—a review. Plant Pathology 44(2): 207-238.
- Rudd, JC; Horsley, RD; McKendry, AL; Elias, EM. . 2001. Host plant resistance genes for Fusarium head blight. Crop Science 41(3): 620–627.
- Sharan, M.S.; Kumar, A.K.; Nagarajan, S. . 2004. Fusarium Head Blight (FHB) or Head Scab of Wheat. Proc. Indian Natl. Sci. Acad B70(3): 255-268.
- USDA (United States Department of Agriculture). . 2014. USDA ERS - Wheat Data. Economic Research Service. Consultado 4 jul. 2014. Disponible en <http://www.ers.usda.gov/data-products/wheat-data.aspx#25171>

*Protección de espigas inoculadas contra pájaros.*



# 13. ENFERMEDADES DE LA ESPIGA DEL TRIGO PRESENTES EN CAMPOS COMERCIALES DE SIEMBRA TEMPRANA EN ITAPÚA DURANTE EL 2013

Alice Chávez<sup>1</sup> y Man Mohan Kohli<sup>2</sup>

<sup>1</sup> CAPECO, Proyecto "Pyricularia en Trigo", USDA.

<sup>2</sup> CAPECO, Av. Brasilia 840, Asunción

\*alicerocio@hotmail.es

## Introducción

Desde hace algunos años, los agricultores del Itapúa, especialmente de la región de Fram, Col. La Paz y Cap. Miranda, están sembrando el trigo tempranamente (en marzo o abril) que se considera fuera de la época recomendada. El argumento del productor es que las siembras tempranas le permiten cosechar trigo en época seca y con buena calidad sin problemas asociados a las lluvias. Además una cosecha temprana le ayuda a sembrar el cultivo de soja inmediatamente y así evitar los veranos con sequía. Aunque esta estrategia les puede funcionar para trigo en aquellos años sin problemas de helada en los meses de junio o julio y para la soja cuando las lluvias primaverales son normales, pero es riesgosa no solo de punto de vista climático sino también por las enfermedades que pueden causar grandes pérdidas.

En los últimos años, las siembras tempranas del cultivo del trigo han sido afectadas seriamente por dos enfermedades de la espiga, que no solo comprometen la producción sino también la calidad de la cosecha. Estas enfermedades son la Fusariosis o Giberella, cuyo agente causal es el hongo *Fusarium graminearum*; y el Brusone o Piricularia causado por *Magnaporthe grisea*, cuyos síntomas son fácilmente confundidos.

Con el fin de establecer la identidad de las enfermedades que se encuentran afectando las espigas del cultivo del trigo actualmente, en los campos comerciales del departamento de Itapúa; espigas con síntomas de ambas enfermedades, fueron recolectadas para su diagnóstico en el Laboratorio de Patología de Hortalizas, del Centro de Investigación Hernando Bertoni.

De las muestras colectadas en Capitán Miranda, Itapúa, en la primera semana del mes de julio con el cultivo en la plena floración, el 80% de las espigas fueron identificadas con el ataque de *Magnaporthe grisea* o Piricularia, presentando una severidad entre 50 y 75%, Fig. 1, (Escala propuesta por Trindade *et al.*, 2006).

Fig. 1. **Escala visual de severidad de síntomas causados por *Magnaporthe grisea* o Piricularia. Trindade et al. (2006).**



0% 25% 50% 75% 100%

Estas espigas presentaron los síntomas caracterizados por el contraste de colores entre la parte inferior (verde) y superior (blanco) (Fig. 2 A), además de la lesión oscura en la zona del raquis que constituye del punto de infección (Fig. 2 B y C).

Fig. 2. **(A) Espiga de trigo presentando el síntoma característico del ataque de *Magnaporthe grisea*. (B) y (C) síntoma en el raquis.**



Los granos en la parte superior de la espiga son más pequeños y arrugados debido a la interrupción del paso de nutrientes, y en algunos casos presentan un crecimiento micelial grisáceo (Fig. 3). Estos granos al ser sembrados en medio de cultivo PDA (Agar de la dextrosa de papa), dieron origen a colonias de *Magnaporthe grisea*.

Fig. 3. **Granos de trigo formados en la zona afectada por *Magnaporthe grisea*.**



El hongo *Magnaporthe grisea* se caracteriza por presentar crecimiento de color grisáceo en medio de cultivo, y conidios en forma de pera (Fig. 4); el patógeno puede sobrevivir en forma de micelio o conidio en restos de cultivo, semillas y hospederos alternativos, la diseminación ocurre principalmente a través del viento.

Fig. 4. **Conidios de *Magnaporthe grisea*.**



Las condiciones ambientales que favorecen el desarrollo de la enfermedad son temperaturas de entre 24 a 28 °C, días nublados y precipitaciones, así como humedad relativa por encima del 90% y largos periodos de rocío. Estas condiciones fueron ampliamente observadas en los meses de junio y julio este año. Las pérdidas máximas son causadas cuando el hongo ataca al raquis en la base de la espiga, limitando así el desarrollo de los granos y matando la espiga por completo. Los análisis de la pérdida de producción y calidad serán realizadas durante la cosecha tomando varias muestras a lo largo y ancho de campo.

En el 20% de las muestras colectadas se observó la presencia de la Fusariosis de la Espiga causada por *Fusarium graminearum*. Los síntomas clásicos son un blanqueamiento de las espigas y espiguillas que puede afectar solo a una parte o a toda la espiga (Fig. 5). En otros casos, el hongo forma una masa de color rosado salmón sobre las flores, que más tarde en la madurez se observan como puntos oscuros sobre las espigas. La enfermedad es capaz de causar el aborto de las flores, y los granos afectados son chupados o vanos que normalmente se pierden en la cosecha.

Una vez producida la infección primaria, la enfermedad se propaga de una florecilla a otra mediante el desarrollo de micelio, a través de la estructura de la espiga. Las florecillas infectadas (especialmente las glumas exteriores) se oscurecen un poco y se tornan aceitosas.

Fig. 5. **Espigas de trigo con síntomas de ataque de *Fusarium graminearum*.**



Los granos de las espigas afectadas se presentaban cubiertos de micelio de color rosa pálido (Fig.6), que al ser observado en microscopio presentó los conidios característicos de *Fusarium* (Fig. 7).

Fig. 6. **Granos de trigo afectados por *Fusarium* spp.**



Fig. 7. **Conidios de *Fusarium* spp.**



El clima cálido, con temperaturas de entre 18 y 28 °C, y húmedo favorece la infección durante la floración que resulta en menor número de granos por espiga y pérdidas en el rendimiento. Además del daño directo a la producción del cultivo hay daños indirectos en la calidad especialmente relacionados con la pérdida de la fuerza del gluten (valor alveográfico o W) y la presencia de la micotoxina deoxynivalenol, DON, que es nocivo para la salud humana y animal

## Conclusión

Las espigas colectadas de los campos comerciales de Itapúa en la primera semana de julio, presentaron el ataque de *Magnaporthe grisea* en el 80% de las muestras y de *Fusarium graminearum* en el 20% restante. Esto demuestra que el principal problema en las siembras tempranas en esa zona de producción es causado por Piricularia o brusone, una enfermedad capaz de causar hasta 100% de pérdidas de producción lo que puede ser evitada con las siembras en época normal.

## Referencias bibliográficas

- Trindade, M daG; Siqueira, MMH; Silva, HL; Prabhu, AS. 2006. Danos causados por *Magnaporthe grisea* em trigo. Passo Fundo: Embrapa Trigo. Consultado 14 jul. 2013. Disponible en: [http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p\\_co202.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co202.htm)



Inoculación artificial de trigo con *Magnaporthe grisea* bajo condiciones controladas.

# 14. PATÓGENOS ASOCIADOS A LA PUNTA NEGRA DEL TRIGO DURANTE EL CICLO 2012

Alice Chávez<sup>1</sup> y Man Mohan Kohli<sup>2</sup>

<sup>1</sup> CAPECO, Proyecto "Pyricularia en Trigo", USDA.

<sup>2</sup> CAPECO, Av. Brasilia 840, Asunción

\*[alicerocio@hotmail.es](mailto:alicerocio@hotmail.es)

## Introducción

El problema conocido como punta negra del trigo se caracteriza por causar un oscurecimiento de la zona del embrión que en ocasiones puede extenderse hacia la hendidura dejando el grano completamente ennegrecido (García *et al.* 2012). Según Hanson y Christensen citados por Mellado *et al.* (1990), el problema generalmente es más severo en zonas donde se producen precipitaciones durante el periodo de maduración de la semilla. Este problema afecta el grano de la mayoría de las variedades de trigo; y según el CIMMYT, es causado por hongos de los géneros *Alternaria*, *Helminthosporium* y *Fusarium* (Kohli *et al.* 2012).

El objetivo de este trabajo fue identificar los patógenos asociados a la punta negra a nivel nacional en un año húmedo como fue el 2012.

## Materiales y Métodos

El ensayo se llevó a cabo en el Laboratorio de Patología de Hortalizas del Centro de Investigación Hernando Bertoni (CIHB), ubicado en la ciudad de Caacupé, Departamento de Cordillera, durante los meses de mayo y junio de 2013.

### Selección de granos de trigo con punta negra

Cuatro ensayos de trigo compuestos por 114 líneas avanzadas y variedades (REG-13, INT Y-13 y PTAY-13, con treinta materiales cada uno y PTBY-13 con 24 materiales) fueron utilizados para estudiar los patógenos asociados a la punta negra en los granos de trigo. Fueron seleccionados al azar 3 a 5 granos de cada material para sembrarlos en medio de cultivo PDA.

### Siembra de granos

Bajo cámara de flujo laminar, los granos con punta negra (Fig.1) fueron desinfectados siguiendo el protocolo establecido por French y Hebert (1980), y sembrados en placas de Petri con medio de cultivo PDA (Papa, Dextrosa, Agar); estas placas fueron incubadas a 25 °C. La primera identificación de las colonias se llevó a cabo seis días después de la siembra, y posteriormente cada siete días, hasta identificar totalmente las mismas.

Fig. 1. **Granos de trigo con punta negra.**

## Resultados y Discusión

Los estudios de cultivos de los granos con punta negra bajo condiciones controladas del laboratorio permitieron la identificación de 11 géneros de hongos. En orden de la frecuencia de infección ellos son *Curvularia* sp., *Alternaria* sp., *Helminthosporium* sp., *Fusarium* sp., *Magnaporthe* sp., *Drechslera* sp., *Nigrospora* sp., *Septoria* sp., *Cladosporium* sp., *Chaetomium* sp., y *Melanospora* sp.; estos dos últimos considerados saprófitos de restos vegetales en el suelo o en semillas (Hanlin 1990). Así también se observó la presencia de bacterias en algunos materiales de los ensayos REG13 y PTAY13 (Tabla 1).

Tabla 1. **Identificación de patógenos y grado de infección asociados a la punta negra en los granos de trigo. Ciclo 2012.**

Patógenos identificados	Porcentaje de infección en los granos			
	REG13	INTY13	PTAY13	PTBY13
<i>Curvularia</i> sp.	15,09	55,96	49,52	52,87
<i>Alternaria</i> sp.	39,62	25,68	15,23	12,64
<i>Helminthosporium</i> sp.	-	48,62	-	45,97
<i>Fusarium</i> spp.	7,54	2,75	5,71	6,89
<i>Pyricularia</i> sp.	-	0,91	2,85	1,14
<i>Drechslera</i> sp.	7,54	0,91	2,85	-
<i>Nigrospora</i> sp.	-	0,91	-	1,14
<i>Septoria</i> sp.	-	0,91	-	-
<i>Cladosporium</i> sp.	-	0,91	-	-
<i>Chaetomium</i> sp.	1,9	0,91	-	-
<i>Melanospora</i> sp.	1,88	-	1,90	-
Bacterias	3,77	-	1,9	-

De los géneros identificados, *Alternaria*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Helminthosporium* y *Magnaporthe* se consideran fitopatógenos de importancia para el trigo. El tercer hongo mencionado como causante de la punta negra, *Fusarium* sp., fue identificado en 14 materiales; con gran variabilidad en cuanto al color y textura de las colonias (Fig. 2). Debido a la importancia que este hongo representa para el trigo nacional, sus muestras fueron remitidas al Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT) de la Universidad Nacional de Asunción (UNA) para su identificación a nivel de especie. Las especies identificadas en las muestras fueron principalmente *Fusarium graminearum*, *F. avenaceum*, *F. semitectum* y *F. verticilloides*.

Fig. 2. Colonias de *Fusarium* sp. observadas en la punta negra de diferentes materiales.



## Conclusión

Los patógenos asociados a la punta negra, en un año húmedo como el 2012, fueron: *Curvularia* sp., *Alternaria* sp., *Helminthosporium* sp., *Fusarium* sp., *Magnaporthe* sp., *Drechslera* sp., *Nigrospora* sp., *Septoria* sp., *Cladosporium* sp., *Chaetomium* sp., *Melanospora* sp. y algunas bacterias.

Los patógenos *Curvularia*, *Alternaria*, *Helminthosporium* y *Fusarium* fueron identificados como los hongos más predominantes en la infección de punta negra en trigo en el Paraguay.

## Agradecimientos

A la Dra. Andrea Arrúa (CEMIT-UNA) por la identificación de especies de *Fusarium*.

## Referencias bibliográficas

- \_ French, ER; Hebert, TT. 1980. Métodos de investigación fitopatológica. San José, CR, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. 289 p.
- \_ García, C; Palmero, D; De Cara, M; Cruz, A; González, M. 2012. Microbiota asociada a la enfermedad punta negra del trigo duro. Efectos del riego, el abonado nitrogenado y la variedad cultivada en la incidencia de la enfermedad. (en línea). ITEA. 108 (3): 343-356. Consultado 6 jun. 2013. Disponible en: <http://www.aidaitea.org/aidaitea/files/itea/revistas/2012/1083/%2834356%29%20V1321%20ITEA%20108-3.pdf>
- \_ Kohli, M; Cabrera, G; Cubilla, L. 2012. Guía práctica para el manejo y la producción de Trigo. IPTA/CAPECO/INBIO. 52 p.
- \_ Hanlin, RT. 1990. Illustrated genera of Ascomycetes. APS Pres.
- \_ Mellado, M; France, A; Matus, I. 1990. Efecto de fungicidas sobre el problema Punta Negra en trigo de primavera (*Triticum aestivum* L.), sembrado en suelos regados de la zona centro sur de Chile. (en línea). Agri. Técn. (Chile). 50(1): 71-75. Consultado 6 jun. 2013. Disponible en: [http://www.chileanjar.cl/files/V50I1A11\\_es.pdf](http://www.chileanjar.cl/files/V50I1A11_es.pdf)

**ARTEMAC<sup>s.a.</sup>**

Tte. Vera 2856 e/ Cnel. Cabrera y Dr. Caballero  
Asunción, Paraguay  
Telefax: (021) 612 404 - 660 984 - 621 770/2

## Otras publicaciones apoyadas por CAPECO

1. **Avances y Resultados de la Investigación del Trigo en el Paraguay.**  
Compilado por Lidia de Viedma; Ricardo Pedretti; M. M. Kohli; Graciela Gómez. Asunción: MAG/DIA/CRIA, IICA, CAPECO, 2004. 124 p.
2. **CAPECO, Una trayectoria, una realidad.**  
25 Años de CAPECO. Asunción, 2005. 119 p.
3. **Resultados de Investigación: Roya de la Soja.**  
Acuerdo de Cooperación MAG/CAPECO/USDA. Paraguay, 2006. 49 p.
4. **Primer Seminario Nacional de Trigo. Del grano al Pan.**  
Eds. M. M. Kohli y L. E. Cubilla. 2007 CAPECO, Asunción, Paraguay. 120 p.
5. **Segundo Seminario Nacional de Trigo: Del Grano al Pan.**  
Eds. M. M. Kohli, L. E. Cubilla y Lidia de Viedma. 2009. CAPECO, Asunción, Paraguay. 140 p.
6. **Manual del Productor, Guía para la Producción de Trigo.**  
Eds. M. M. Kohli, Lidia de Viedma, L. E. Cubilla. MAG/DIA/CRIA/CAPECO. 40 p.
7. **Tercer Seminario Nacional de Trigo: Del Grano al Pan.**  
Eds. M. M. Kohli, L. E. Cubilla y Graciela Cabrera. 2010. CAPECO/INBIO, Asunción, Paraguay. 168 p.
8. **Guía Práctica para el Manejo y la Producción de Trigo.**  
Eds. M. M. Kohli, G. Cabrera, L. E. Cubilla. IPTA/CAPECO/INBIO. 52 p.
9. **Cuarto Seminario Nacional de Trigo: Del Grano al Pan.**  
Eds. M. M. Kohli, L. E. Cubilla y Graciela Cabrera. 2013. CAPECO/INBIO, Asunción, Paraguay. 182 p.
10. **Parámetros importantes para la calidad industrial del trigo.**  
Eds. Graciela Cabrera y M. M. Kohli. 2013. CAPECO/INBIO, Asunción, Paraguay. 8 p.
11. **Fusariosis de la espiga o Gibberella: Nueva cara de una vieja amenaza.**  
M. M. Kohli. 2013. CAPECO/INBIO, Asunción, Paraguay. 8 p.
12. **Las enfermedades de trigo y su manejo.**  
M. M. Kohli. 2013. CAPECO/INBIO, Asunción, Paraguay. 8 p.

## Otras publicaciones apoyadas por INBIO

1. ***Macrophomina phaseolina*, hongo causante de la pudrición carbonosa del tallo.**  
Facultad de Ciencias Agrarias (UNA) e Instituto de Biotecnología Agrícola. Orrego F, Aida L. (Editora) San Lorenzo, Paraguay, 2009. 107 p.
2. **Comportamiento de 13 cultivares de soja en siete épocas de siembra en la región sureste de Paraguay.**  
Morel Yurenka, Aníbal. 2009. Centro Regional de Investigación Agrícola (DIA-MAG) & INBIO. Boletín de Investigación, Capitán Miranda, Itapúa, Paraguay. 20 p.
3. **Aspectos biológicos de *Spodoptera eridania* (Lepidoptera, Noctuidae) criadas en diferentes tipos de dietas. Plaga del cultivo de Soja.**  
Gómez, Víctor A. Facultad de Ciencias Agrarias (UNA) & Instituto de Biotecnología Agrícola. Departamento de Protección Vegetal. San Lorenzo, Paraguay. 2009. 40 p.
4. **Nivel de Control de *Diloboderus* en Trigo, Canola, Maíz y Girasol.**  
Espinoza Morel, Nancy. Centro Regional de Investigación Agrícola, Cap. Miranda, Paraguay, IPTA/INBIO, 2010: 14 p.
5. **Identificación, detección y transmisión de la enfermedad del Ka'are del sésamo.**  
González Segnana, Luís Roberto; Ramírez de López, María B.; Watanabe Kitajima, Eliot. FCA-UNA/INBIO, San Lorenzo, Paraguay, 2011. 56 p.
6. **Epidemiología y control del virus del sésamo**  
González Segnana, Luís Roberto (*et al.*). FCA-UNA/INBIO, San Lorenzo, Paraguay, 2012.
7. ***Trichoderma* spp.: Hongo biocontrolador de fitopatógenos**  
Aida Lorenza Orrego Fuentes (Editora), INBIO-UNA-FCA. 2013. 129 p.
8. **12 pasos para una soja exitosa**  
Proyecto de Fortalecimiento de la Investigación de Soja, IPTA/INBIO. 2014. Poster.
9. **Biodiesel. Materias primas más viables. Resultados en canola, cramble, cártamo y nabo forrajero.**  
Asunción, Paraguay. FECOPROD/INBIO, 2013. p. 36, tablas, figura; 22 cm
10. **Biodiesel. Materias primas. Informe de resultados obtenidos en el centro de investigación de materias primas con potencialidad para la producción, desarrollo y control de calidad de biodiesel**  
Asunción, Paraguay. FECOPROD/INBIO, 2011. p. 50, tablas, figura; 22 cm
11. **Nematodos del cultivo de soja en Paraguay**  
Lidia Pedrozo; colaboradores Alfredo Guillén y Zully Trabucco.-Caacupe, Paraguay: MAG-DIA – IAN/INBIO, 2008. P. 32, tablas, figura; 20 cm



ISBN 978-99953-849-6-8

