

RESPONSE OF WHEAT (*Triticum* spp.) AND BARLEY (*Hordeum vulgare*) TO *Fusarium poae*

RESPUESTA DEL TRIGO (*Triticum* spp.) Y LA CEBADA (*Hordeum vulgare*) A *Fusarium poae*

Sebastián A. Stenglein*, M. Inés Dinolfo, Fabricio Bongiorno, M. Virginia Moreno

Facultad de Agronomía de Azul, UNCPBA, República de Italia No. 780, Azul (7300), Argentina. (stenglein@faa.unicen.edu.ar).

ABSTRACT

Fusarium head blight is an important disease attacking wheat (*Triticum* spp.), barley (*Hordeum vulgare*) and other grains worldwide. Among the *Fusarium* species causing this disease, *Fusarium poae* is less often implicated, but is a fungus of increasingly recognized importance and it is associated with human and animal toxicoses. The aim of this study was to examine the responses of wheat and barley varieties to inoculation by different *F. poae* isolates, in order to observe contamination by this fungus in the grains. The analyses were performed during 2008, 2009, and 2010 under natural conditions at the Facultad de Agronomía de Azul-UNCPBA, province of Buenos Aires, Argentina. Statistical analyses were carried out and the identities of re-isolated isolates were tested by a primer-specific PCR reaction and by comparing DNA-ISSR amplifications. Differences among varieties in fungal symptoms were significant ($p \leq 0.05$) only in 2008. Although the number of re-isolated isolates in wheat was greater than the number of samples with observable symptoms, no significant correlations were found. However, there were correlations in barley and the linear regression analyses allow suggesting that for each grain with visual symptoms, two barley grains could contain the fungus. Thus it can be concluded that the real number of grains contaminated with *F. poae* is significantly higher than the number with observable disease symptoms, and therefore the real extent of contamination with *F. poae* is currently underestimated and should be considered for food risk analysis in the near future.

Key words: disease symptoms, *Fusarium poae*, grain contamination.

INTRODUCTION

In cereal grain production, *Fusarium* head blight (FHB) is one of the most important and insidious diseases. It has a severe impact through yield

RESUMEN

La fusariosis de la espiga es una enfermedad importante que ataca al trigo (*Triticum* spp.), la cebada (*Hordeum vulgare*) y otros granos en el mundo. Entre las especies de *Fusarium* que causan esta enfermedad, *Fusarium poae* es una de las menos frecuentes, pero es un hongo cuya importancia es cada vez más reconocida y se le asocia con la toxicosis en humanos y animales. El objetivo de este estudio fue examinar las respuestas de las variedades de trigo y cebada a la inoculación de diferentes aislamientos de *F. poae*, a fin de observar la contaminación producida por este hongo en los granos. Los análisis se realizaron durante 2008, 2009 y 2010 en condiciones naturales, en la Facultad de Agronomía de Azul-UNCPBA, provincia de Buenos Aires, Argentina. Se hicieron análisis estadísticos, y las identidades de los aislamientos re-aislados se probaron con reacciones de iniciadores específicos PCR y por comparación de amplificaciones de ADN-ISSR. Las diferencias entre variedades en los síntomas del hongo fueron significativas ($p \leq 0.05$) sólo en 2008. Aunque el número de aislamientos re-aislados en trigo fue mayor que el número de muestras con síntomas observables, las correlaciones no fueron significativas. Sin embargo, hubo correlaciones significativas en la cebada y los análisis de regresión lineal sugiriendo que por cada grano con síntomas visibles, dos granos de cebada podrían contener el hongo. Así puede concluirse que el número de granos contaminados con *F. poae* es significativamente mayor que el de aquellos con síntomas observables de la enfermedad y, por tanto, el alcance real de la contaminación con *F. poae* es subestimado y se debiera considerar para el análisis de riesgos alimentarios en un futuro próximo.

Palabras clave: síntomas de la enfermedad, *Fusarium poae*, contaminación del grano.

INTRODUCCIÓN

En la producción de granos de cereales, la fusariosis de la espiga (FHB) es una de las enfermedades más importantes y perniciosas. Tiene un impacto fuerte porque reduce el rendimiento y

* Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: October, 2011. Approved: February, 2012.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 46: 299-306. 2012.

reductions and the mycotoxin contamination that it causes. Increasing worldwide concern about food safety has enhanced interest in *Fusarium* infections and mycotoxin production in food products. *Fusarium graminearum* is the predominant FHB mycotoxin-producing agent worldwide, although *F. culmorum*, *F. avenaceum* and *F. poae* are commonly isolated from cereal grains. In recent years, some changes were found in the predominance of the various *Fusarium* species. For example, *F. poae* prevails in Argentina, Hungary, Ireland, Italy and the UK, in cereal (Xu *et al.*, 2005; González *et al.*, 2008). However, the predominance and distribution, or both, of *Fusarium* species depend on climatic factors. Thus, *F. graminearum* is associated with warmer/humid conditions, *F. poae* with relatively drier and warmer conditions, and both *F. culmorum* and *F. avenaceum* with niches of cooler/wet/humid conditions (Xu *et al.*, 2008).

Among the mycotoxins produced by *Fusarium* species, trichothecenes are considered the most important, since they are potent inhibitors of eukaryotic protein synthesis (Bennet and Klich, 2003), and can cause a wide range of adverse effects in animals and humans through ingestion of food and feed prepared from contaminated cereal grains (D'Mello *et al.*, 1999). *Fusarium poae* is a relatively weak pathogen compared with *F. graminearum* and *F. culmorum*, but it can produce a large number of mycotoxins, such as trichothecenes of type A (T-2, HT-2, diacetoxyscirpenol, monoacetoxyscirpenol, scirpentriol) and B (nivalenol, fusarenone-X), beauvericin and enniatins (Vogelgsang *et al.*, 2008; Stenglein, 2009).

The strategies used to prevent *Fusarium* colonization and mycotoxin contamination in cereal grains caused by *Fusarium* species include crop rotation, optimized tillage and straw management, and the use of varieties with low susceptibility (Edwards, 2004). The aim of this study was to examine the responses of wheat and barley varieties to inoculation by different *F. poae* isolates, in order to observe the contamination of grains infected by the fungus.

MATERIALS AND METHODS

The study was carried out at the Facultad de Agronomía de Azul-UNCPSA (36° 41' S, 59° 48' W; 132 m altitude), province of Buenos Aires, Argentina.

causa contaminación por micotoxinas. La creciente preocupación mundial sobre la seguridad alimentaria despierta más interés en las infecciones causadas por *Fusarium* y la producción de micotoxinas en los alimentos. *Fusarium graminearum* es el agente productor de micotoxinas predominante de la FHB en el mundo, aunque *F. culmorum*, *F. avenaceum* y *F. poae* se aíslan comúnmente de granos de cereales. En los últimos años, se detectaron cambios en el predominio de varias especies de *Fusarium*. Por ejemplo, *F. poae* predomina en Argentina, Hungría, Irlanda, Italia y el Reino Unido, en cereales (Xu *et al.*, 2005; González *et al.*, 2008). Sin embargo, el predominio o distribución de las especies de *Fusarium* dependen de factores climáticos. Así, *F. graminearum* se relaciona con condiciones más cálidas/húmedas, *F. poae* con condiciones relativamente más secas y cálidas, y *F. culmorum* y *F. avenaceum* con nichos de condiciones más frías/muy húmedas/húmedas (Xu *et al.*, 2008).

Entre las micotoxinas producidas por las especies de *Fusarium*, los tricotecenos se consideran los más importantes por ser potentes inhibidores de la síntesis de proteínas en eucariotas (Bennet y Klich, 2003), y pueden causar una gama amplia de efectos adversos en animales y humanos al consumir alimentos y piensos preparados con granos de cereales contaminados (D'Mello *et al.*, 1999). *Fusarium poae* es un patógeno relativamente débil comparado con *F. graminearum* y *F. culmorum*, pero puede producir un gran número de micotoxinas, como tricotecenos del tipo A (T-2, HT-2, diacetoxiscirpenol, monoacetoxiscirpenol, scirpentriol) y B (nivalenol, fusarenona-X), beauvericina y eniatinas (Vogelgsang *et al.*, 2008; Stenglein, 2009).

Las estrategias usadas para prevenir la colonización por *Fusarium* y la contaminación por micotoxinas en los granos de cereales causada por especies de *Fusarium* son: rotación de cultivos, labranza optimizada y manejo del rastrojo, y el uso de variedades de baja susceptibilidad (Edwards, 2004). El objetivo de este estudio fue examinar las respuestas de variedades de trigo y cebada a la inoculación de diferentes aislamientos de *F. poae*, para observar la contaminación de los granos infectados por el hongo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en la Facultad de Agronomía de Azul-UNCPSA (36° 41' S, 59° 48' O; 132 m de altitud), provincia de Buenos Aires, Argentina.

Four monosporic *F. poae* isolates obtained from wheat (TSS1a, TSa1a, T-MICA-01 and T-MICA-08) and one obtained from barley grains (Hsu1a) were used individually (Dinolfo *et al.*, 2010). Fungal inoculum was produced by placing individual agar plugs with mycelium and conidia onto potato dextrose agar (PDA, Britania®) in petri dishes (90×20 mm) and incubating for 7 d at 25±2 °C under 12 h light/dark. Conidia harvested were taken by flooding the plates with 5 mL of sterilized distilled water (SDW) and dislodging the conidia with a bent glass rod. The resulting suspension was filtered through cheesecloth and the conidial suspension was adjusted to 1×10⁵ conidia mL⁻¹ using a haemocytometer (Neubauer) and a binocular microscope. Tween® 20 (0.05 %) was added as surfactant.

Four wheat cultivars were used: Apogee [(with susceptibility to FHB and *F. poae*, Mackintosh *et al.* (2006); Vogelgsang *et al.* (2008)]; Klein Chajá (bread wheat); Buck Biguá (bread wheat); Chagual (durum wheat), and two barley varieties, Stander (6-row and susceptible to FHB, Urrea *et al.*, 2005); Quilmes Scarlett (2-row). Seeds were surface-sterilized by immersing them 3 min in 50 % ethanol, 3 min in sodium hypochlorite (commercial 55 g Cl L⁻¹), and by washing them three times with SDW. Three seeds were sown in pots (3 L) filled with soil (mixture of farm soil, organic soil and sand, 2:1:1) and after emergence, seedlings were selected based on size uniformity, leaving one seedling per pot. Eighteen replicates (pots) of each variety were used in a completely randomized design.

Plants were grown in the absence of any nutritional, pest or water stress, except that no fungicides were applied. The experiment was performed during each of three consecutive years (2008, 2009, and 2010) under natural conditions. The sowing dates for the different varieties and species were adjusted according to growth progress observed in plants grown in 2007, to ensure that all varieties were at similar growth stages at the same time.

Wheat heads were inoculated at mid-anthesis (Vogelgsang *et al.*, 2008) and barley when >50 % of the plants had reached anthesis (Buerstmayr *et al.*, 2004). Conidial suspensions of each fungal isolate were applied to separate plants, until run off, using a gravity spray gun. Five heads of each plant variety randomly selected per isolate were inoculated. Sterilized distilled water with Tween® 20 was used to inoculate two heads per plant variety to serve as control treatment. Visual disease assessment was conducted at 20 d post inoculation by counting the number of symptomatic grains (lesions or bleaching of grains or glumes with a dark margin) from each inoculated head.

Temperature and RH data (from inoculation to the time of visual disease assessment) were obtained from the Boletín Agrometeorológico del Centro-Sur de la Provincia de Buenos Aires (2008, 2009, 2010), located 50 m from the experimental site.

Cuatro aislamientos monospóricos de *F. poae*, obtenidos de granos de trigo (TSS1a, TSa1a, T-MICA-01 y T-MICA-08) y uno obtenido de granos de cebada (Hsu1a) se usaron individualmente (Dinolfo *et al.*, 2010). Se produjo el inóculo fúngico colocando porciones individuales de agar con micelio y conidios, en placas petri (90×20 mm) con medio agar papa dextrosa (PDA, Britania®), e incubadas 7 d a 25±2 °C y 12 h de luz/oscuridad. Se tomaron los conidios colocando 5 mL de agua destilada esterilizada (SDW) en las placas y se desalojaron con una varilla de vidrio curvado. La suspensión obtenida se filtró a través de una gaza y la suspensión de conidios se ajustó a 1×10⁵ conidios mL⁻¹ usando un hematocitómetro (Neubauer) y un microscopio binocular. Se agregó Tween® 20 (0.05 %) como surfactante.

Se usaron cuatro cultivares de trigo: Apogee, susceptible a FHB y *F. poae*, (Mackintosh *et al.* 2006; Vogelgsang *et al.* 2008); Klein Chajá (trigo para panificación); Buck Biguá (trigo para panificación), Chagual (trigo duro), y dos variedades de cebada, Stander (de 6 hileras y susceptible a FHB, Urrea *et al.*, 2005); Quilmes Scarlett (2 hileras). Las semillas fueron esterilizadas superficialmente sumergiéndolas 3 min en 50 % de etanol, 3 min en hipoclorito de sodio (55 g comercial Cl L⁻¹), y lavándolas tres veces con SDW. Se sembraron tres semillas en macetas (3 L) llenas de tierra (mezcla de suelo agrícola, suelo orgánico y arena, 2:1:1) y después de emerger se seleccionaron las plántulas por su uniformidad de tamaño, dejando una por maceta. Se usaron 18 réplicas (macetas) de cada variedad en un diseño completamente al azar.

Las plantas fueron cultivadas sin estrés nutricional, por plagas o falta de agua, excepto que no se aplicaron fungicidas. El experimento se realizó en cada uno de los tres años consecutivos (2008, 2009 y 2010) en condiciones naturales. Las fechas de siembra para las diferentes variedades y especies se ajustaron de acuerdo al avance del crecimiento de las plantas cultivadas en 2007, para asegurar que todas las variedades se encontraran en etapas de crecimiento similares a la vez.

Las espigas de trigo se inocularon a mitad de la antesis (Vogelgsang *et al.*, 2008) y la cebada cuando > 50 % de las plantas había llegado a la antesis (Buerstmayr *et al.*, 2004). Las suspensiones de conidios de cada aislamiento fúngico se aplicaron a las plantas por separado, hasta la escorrentía, usando una pistola de pulverización por gravedad. Se inocularon cinco espigas de cada variedad de planta seleccionadas al azar por aislamiento. Se usó agua destilada esterilizada con Tween® 20 para inocular dos espigas por variedad de planta que sirvieran como tratamiento testigo. La evaluación visual de la enfermedad se realizó 20 d después de la inoculación, contando el número de granos con síntomas (lesiones o decoloración de los granos o las glumas, con un margen oscuro) de cada espiga inoculada.

The five heads of each variety per inoculated isolate and the controls were individually threshed and grains were collected. All grains (with and without symptoms) were transferred to petri dishes containing PDA with 250 mg chloramphenicol L⁻¹ and incubated 7 d at 25 ± 2 °C under 12 h light/dark. Fungal isolates were then taken from the incubated grains.

To be sure that the re-isolated isolates obtained were the same as the ones originally inoculated, the DNA of all isolates was extracted using a cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method according to Stenglein and Balatti (2006), amplified by a species specific-*F. poae* PCR reaction using primers Fp82F 5'-ACGACGAAGGTGGTTATG-3' and Fp82R 5'-GAAGAGCCTGTTTGCTTG-3' (Parry and Nicholson 1996), and compared in five ISSR primer amplifications, CTC(GT)8, (GAG)5CAG, CAC5, CT(GA)8, and (GCC)5, with the DNA of the original isolates used for inoculations (Dinolfo *et al.*, 2010). Each ISSR reaction was performed at least twice, running eight DNA samples plus the DNA ladder and a negative control in one gel, simultaneously. Products from PCR reactions were examined by electrophoresis in 1.5 % (w v⁻¹) agarose gels containing GelRedTM (Biotium, Hayward, USA). Fragments were visualised under UV light. The size of the DNA fragments were estimated by comparing the DNA bands with a 1 kb and 100 bp DNA ladder (Genbiotech S.R.L., Buenos Aires, Argentina).

A factorial experiment with 30 treatments (five different isolates X six different plant varieties) in a completely random design was used. An analysis of variance of the number of infected (visible symptoms) grains/total grains per head, was performed for each year in order to determine differences between varieties and isolates, and their interaction. Percentage data were arcsin (square root) transformed.

A Chi-square test was carried out to test independence between plant varieties and *F. poae* isolates re-isolated from grains. A correlation and linear regression analyses were performed to test the relationship between the number of grains with visible symptoms (x) and the number of grains from which isolates could be re-isolated (y) with and without symptoms. All statistical analyses were performed using INFOSTAT version 2006 (Infostat group, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

RESULTS AND DISCUSSION

No symptoms were observed on control head cultivars. The five isolates differed in the rate of *F. poae* symptoms developments on the six plant genotypes (Table 1). Apogee was the most susceptible wheat variety to all *F. poae* isolates tested, whereas the barley variety Stander was more susceptible to

Los datos de temperatura y HR (desde la inoculación hasta la evaluación visual de la enfermedad) se obtuvieron del Boletín Agrometeorológico del Centro-Sur de la Provincia de Buenos Aires (2008, 2009, 2010), situado a 50 m del sitio experimental.

Las cinco espigas de cada variedad por aislamiento inoculado y los testigos fueron desgranados y recolectados individualmente. Todos los granos (con y sin síntomas) fueron trasladados a placas de petri que contenían PDA con 250 mg de cloranfenicol L⁻¹ e incubados 7 d a 25 ± 2 °C por 12 h de luz/oscuridad. Después los aislamientos del hongo fueron tomados de los granos incubados.

Para asegurar que los aislamientos re-aislados fueron los mismos originalmente inoculados, se extrajo el ADN de todos los aislamientos usando un método de bromuro cetiltrimetilammonio (CTAB), según Stenglein y Balatti (2006), se amplificaron con una reacción de PCR especie-específica para *F. poae* usando los iniciadores Fp82F 5'-ACGACGAAGGTGGTTATG-3' y Fp82R 5'-GAAGAGCCTGTTTGCTTG-3' (Parry y Nicholson 1996), y se compararon las amplificaciones usando cinco iniciadores ISSR, CTC(GT)8, (GAG)5CAG, CAC5, CT(GA)8, y (GCC)5, con el ADN de los aislamientos originales usados en las inoculaciones (Dinolfo *et al.*, 2010). Cada reacción de ISSR se realizó al menos dos veces, corriendo ocho muestras de ADN, más el marcador estándar de ADN y un testigo negativo en un mismo gel, simultáneamente. Los productos de las reacciones PCR se examinaron por electroforesis en 1.5 % (w v⁻¹) de geles de agarosa conteniendo GelRedTM (Biotium, Hayward, EE.UU.). Los fragmentos fueron observados con luz ultravioleta. El tamaño de los fragmentos de ADN se calculó comparando las bandas de ADN con un marcador estándar de ADN de 1 kb y 100 pb (Genbiotech S.R.L., Buenos Aires, Argentina).

Se usó un experimento factorial con 30 tratamientos (cinco aislamientos diferentes X seis diferentes variedades de plantas), en un diseño completamente al azar. Se realizó un análisis de varianza del número de granos/total de granos por espiga infectados (síntomas visibles), en cada año, para determinar diferencias entre variedades y aislamientos, y su interacción. Los datos porcentuales se transformaron con arcoseno (raíz cuadrada).

Se realizó una prueba de Ji-cuadrada para probar la independencia entre variedades de plantas y aislamientos re-aislados de *F. poae* de los granos. Se realizó un análisis de correlación y regresión lineal para probar la relación entre el número de granos con síntomas visibles (x) y el número de granos de los cuales los aislamientos se podrían reaislar (y) con y sin síntomas. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando INFOSTAT versión 2006 (Infostat group, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se observaron síntomas en las espigas de los cultivares testigo. Los cinco aislamientos de *F. poae*

all isolates, except to MICA-T-08, than Scarlett, for the three years (Table 1). In general, all varieties inoculated with the different *F. poae* isolates showed a low incidence of disease symptoms, ranging from 0.0 to 7.94 % (Table 1). These results agree with reports that *F. poae* is a weak pathogen for wheat and barley (Xue *et al.*, 2006; Vogelgsang *et al.*, 2008). However, data analyses showed in 2008 differences ($p=0.009$) between varieties in disease symptoms development. In that year, greater differences in relative humidity (average maximum RH, 81.9 %; average minimum RH, 33.2 %) and especially in temperature (average maximum T, 28.4 °C; average minimum T, 13.4 °C) were registered, as compared to 2009 (average maximum RH, 80.1 %; average minimum RH, 34.7 %; average maximum T, 21.8 °C; average minimum T, 6.6 °C), and 2010 (average maximum RH, 76.9 %; average minimum RH, 46.8 %; average maximum T, 22.5 °C; average minimum T, 8.6 °C).

Fusarium poae was associated with relatively warmer and drier conditions than other *Fusarium* species (Turner and Jennings, 1997; Xu *et al.*, 2008). Average RH was not different ($p>0.05$) between years; however, in 2008 there were higher temperatures which could explain the statistical significances for 2008 only, a result in agreement with reports from Turner and Jennings (1997) and Xu *et al.* (2008).

No isolates of *F. poae* were obtained from control grains. All re-isolated isolates correspond to *F. poae* (no other *Fusarium* species were isolated from inoculated grains) and we used the ISSR method to check that the re-isolated isolates corresponded to each *F. poae*

difirieron en el desarrollo de síntomas en los seis genotipos de plantas (Cuadro 1). Apogee fue la variedad de trigo más susceptible a todos los aislamientos de *F. poae*, mientras que la variedad de cebada Stander fue más susceptible a todos los aislamientos excepto a MICA-T-08, que Scarlett, en los tres años (Cuadro 1). En general, todas las variedades inoculadas con los diferentes aislamientos de *F. poae* mostraron una baja incidencia de síntomas de la enfermedad, desde 0.0 a 7.94 % (Cuadro 1). Estos resultados concuerdan con informes de que *F. poae* es un patógeno débil para el trigo y la cebada (Xue *et al.*, 2006; Vogelgsang *et al.*, 2008). Sin embargo, los análisis de datos mostraron en 2008 diferencias ($p=0.009$) entre las variedades en relación al desarrollo de síntomas de la enfermedad. Ese año se registraron mayores diferencias en humedad relativa (promedio máximo HR, 81.9 %; promedio mínimo HR, 33.2 %) y especialmente en temperatura (promedio máximo T, 28.4 °C, promedio mínimo T, 13.4 °C), comparado con 2009 (promedio máximo HR, 80.1 %; promedio mínimo HR, 34.7 %; promedio máximo T, 21.8 °C; promedio mínimo T, 6.6 °C), y 2010 (promedio máximo HR, 76.9 %; promedio mínimo HR, 46.8 %; promedio máximo T, 22.5 °C, promedio mínimo T, 8.6 °C).

Fusarium poae se asoció con condiciones relativamente más cálidas y secas que otras especies de *Fusarium* (Turner y Jennings, 1997; Xu *et al.*, 2008). El promedio de HR no fue diferente ($p>0.05$) entre años; sin embargo, en 2008 hubo temperaturas más altas, las cuales podrían explicar las diferencias estadísticamente significativas sólo para 2008, lo cual

Table 1. Effect of different *F. poae* isolates inoculated on plant varieties. Values (%) are the mean of the number of grains with visual symptoms of the three years (60 evaluated heads per isolate) analyzed plus the standard deviation (%).

Cuadro 1. Efecto de diferentes aislamientos de *F. poae* inoculados en variedades de plantas. Los valores (%) son la media del número de granos con síntomas visibles en los tres años analizados (60 espigas evaluadas por aislamiento) más la desviación estándar (%).

	HSu1a [†]	TSS1a	TSa1a	MICA-T-01	MICA-T-08
Apogee [‡]	3.31 ± 0.15	7.94 ± 0.81	5.60 ± 1.00	3.59 ± 0.32	5.03 ± 0.60
Chaja	1.10 ± 0.00	4.61 ± 0.42	2.80 ± 0.29	1.93 ± 0.58	4.93 ± 0.57
Bigua	1.28 ± 0.07	4.33 ± 0.37	2.59 ± 0.21	3.31 ± 0.43	3.17 ± 0.49
Chagual	1.63 ± 0.23	1.91 ± 0.23	1.70 ± 0.31	2.96 ± 0.57	2.42 ± 0.03
Stander	4.42 ± 0.86	5.14 ± 0.53	4.49 ± 0.37	2.73 ± 0.06	2.59 ± 0.05
Scarlett	3.27 ± 0.31	2.90 ± 0.45	2.27 ± 0.00	0.00 ± 0.00	3.31 ± 0.66

[†] Hsu1a was isolated from barley; TSS1a, TSa1a, MICA-T-01, and MICA-T-08 were isolated from wheat ♦ Hsu1a fue aislado de cebada; TSS1a, TSa1a, MICA-T-01, y MICA-T-08 fueron aislados de trigo.

[‡] Apogee, Chaja, Bigua and Chagual are wheat varieties; Stander and Scarlett are barley varieties ♦ Apogee, Chaja, Bigua y Chagual son variedades de trigo; Stander y Scarlett son variedades de cebada.

isolate used to inoculate each plant genotype in all the experiments. These reisolation tests are essential to show the absence of cross-infection with other *Fusarium* species or other *F. poae* isolates, or both, used in our study that could interfere with the results and conclusions.

All *F. poae* isolates were re-isolated from each inoculated plant varieties, except for the barley Scarlett variety inoculated with MICA-T-01 (Table 2). Surprisingly, the number of grains from which we recovered isolates was always higher than the number of grains with visible symptoms in the three years (Tables 1 and 2). For example, the wheat variety Apogee presented 7.94 % of grains with symptoms and we re-isolated isolates from 23.98 % grains (Tables 1 and 2), and the wheat variety Chagual showed ± 10 % differences between symptomatic and infected grains (Table 1 and 2). Another interesting result was that, although in 2008 the conditions favored *F. poae* infections and was the only year for which we observed statistical significances, the numbers of re-isolated isolates were similar during each of the three years analyzed (data not shown).

The Chi-square test to prove independence between plant varieties and *F. poae* isolates re-isolated showed that only in 2008 we can reject the null hypothesis; thus, these variables were dependent ($p=0.01$). This allows confirming that the degree of success for *F. poae* infection depends on the environmental conditions, a result in agreement with reports by Turner and Jennings (1997) and Xu *et al.* (2008).

coincide con lo reportado por Turner y Jennings (1997) y Xu *et al.* (2008).

No se obtuvieron aislamientos de *F. poae* de los granos testigo. Todos los aislamientos re-aislados corresponden a *F. poae* (no se aislaron otras especies de *Fusarium* de los granos inoculados) y se usó el método ISSR para comprobar que los aislamientos re-aislados correspondían a cada aislamiento de *F. poae* usado para inocular cada genotipo de planta en todos los experimentos. Estas pruebas en aislamientos re-aislados son esenciales para mostrar la ausencia de contaminación cruzada con otras especies de *Fusarium* u otros aislamientos de *F. poae*, o ambos, usados en el estudio y que podrían interferir con los resultados y las conclusiones.

Todos los aislamientos de *F. poae* utilizados fueron re-aislados de cada una de las variedades de plantas inoculadas, excepto la variedad de cebada Scarlett inoculado con MICA-T-01 (Cuadro 2). Sorprendentemente, el número de granos de los que se recuperaron aislamientos fue siempre mayor que el de granos con síntomas visibles en los tres años (Cuadros 1 y 2). Por ejemplo, la variedad de trigo Apogee presentó 7.94 % de granos con síntomas y se re-aislaron aislamientos de 23.98 % de granos (Cuadros 1 y 2), y la variedad de trigo Chagual mostró ± 10 % de diferencias entre granos sintomáticos e infectados (Cuadros 1 y 2). Otro resultado interesante fue que, si bien en 2008 las condiciones favorecieron las infecciones por *F. poae* y fue el único año donde se observaron datos estadísticamente significativos, los números

Table 2. *Fusarium poae* isolates re-isolated from wheat/barley varieties. Values (%) are the mean of the number of isolates re-isolated from grains (60 evaluated heads per isolate) of the three years (2008, 2009, 2010) analyzed plus the standard deviation (%).

Cuadro 2. Aislamientos re-aislados de *Fusarium poae* de las variedades de trigo/cebada. Los valores (%) corresponden a la media del número de aislamientos re-aislados de granos (60 espigas evaluadas por aislamiento) en los tres años (2008, 2009, 2010) analizados, más la desviación estándar (%).

	HSu1a [†]	TSS1a	TSa1a	MICA-T-01	MICA-T-08
Apogee [‡]	7.30 $\pm$ 0.45	23.98 $\pm$ 0.37	11.27 $\pm$ 0.80	6.53 $\pm$ 0.61	5.68 $\pm$ 0.41
Chaja	1.76 $\pm$ 0.15	6.64 $\pm$ 0.47	4.94 $\pm$ 0.31	4.77 $\pm$ 0.38	5.27 $\pm$ 0.41
Bigua	12.12 $\pm$ 0.63	15.61 $\pm$ 0.66	8.68 $\pm$ 0.44	12.41 $\pm$ 1.44	7.04 $\pm$ 0.73
Chagual	10.62 $\pm$ 0.50	13.85 $\pm$ 0.34	13.94 $\pm$ 0.27	14.93 $\pm$ 0.84	12.46 $\pm$ 0.27
Stander	8.92 $\pm$ 0.99	16.76 $\pm$ 0.56	6.37 $\pm$ 0.28	7.56 $\pm$ 0.09	8.30 $\pm$ 0.33
Scarlett	5.47 $\pm$ 0.03	4.63 $\pm$ 0.72	9.07 $\pm$ 0.04	0.00 $\pm$ 0.00	9.80 $\pm$ 0.69

[†] Hsu1a was isolated from barley; TSS1a, TSa1a, MICA-T-01, and MICA-T-08 were isolated from wheat ♦ Hsu1a se aisló de cebada; TSS1a, TSa1a, MICA-01-T, y MICA-08-T se aislaron de trigo.

[‡] Apogee, Chaja, Bigua and Chagual are wheat varieties; Stander and Scarlett are barley varieties ♦ Apogee, Chaja, Biguá y Chagual son variedades de trigo; Stander y Scarlett son variedades de cebada.

The number of grains from which isolates could be re-isolated was higher than the number of grains with observable symptoms in wheat varieties, but no correlations were found. However, in barley there were positive correlations, and therefore linear regressions analyses were performed. The 2008 analysis showed a correlation of 0.82 and the linear regression equation was: $y = 2.3049x + 0.2073$ ($r^2 = 0.67$). For 2009 and 2010 the correlation coefficients were 0.84 and 0.63 and the regression equations were: $y = 3.0198x - 0.4455$ ($r^2 = 0.71$), and $y = 2.3043x + 1.2609$ ($r^2 = 0.40$). These results allow suggesting that for each grain with visual symptoms two barley grains could actually contain the fungus. Stenglein (2009) highlights the increasingly recognized importance of *F. poae* in different countries and summarizes the potential mycotoxin production, with particular regard to possible human and animal health issues. Niessen (2008) indicate that the level of contamination with certain mycotoxins may be related to the amount of pathogen biomass present in plant material. Correlations between DNA level and enniatins and nivalenol in barley grains samples were found using TaqMan assays (Yli-Mattila *et al.*, 2008). However, in asymptomatic wheat samples contaminated with *F. poae* and using a TaqMan assay, no positive correlation was found between *F. poae* DNA and the quantity of enniatins B+B1 (Kulik and Jestoi, 2009).

CONCLUSIONS

The results confirm the importance of *Fusarium poae*. Thus, the environmental conditions during anthesis are important for the development of the symptoms but they do not seem to be determinant for fungus colonization of the grains. Moreover, the actual number of grains contaminated with *F. poae* is significantly higher than the number with observable disease symptoms. Therefore, the actual degree of grain contamination with *F. poae* is currently underestimated and should be considered for a food risk analysis.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by FONCYT-SECYT PICT-PRH 2008/110 and PIP 167 CONICET.

de aislamientos re-aislados fueron similares en cada uno de los tres años analizados (datos no mostrados).

La prueba Ji-cuadrada para probar la independencia entre las variedades de plantas y los aislamientos re-aislados de *F. poae* mostró que sólo en 2008 se pudo rechazar la hipótesis nula; entonces estas variables fueron dependientes ($p = 0.01$). Esto permite confirmar que el grado de éxito de la infección por *F. poae* depende de las condiciones ambientales, resultado acorde con lo reportado por Turner y Jennings (1997) y Xu *et al.* (2008).

El número de granos en los cuales los aislamientos podrían ser re-aislados fue mayor que el número de granos con síntomas observables en las variedades de trigo, pero no se encontraron correlaciones. Sin embargo, en la cebada hubo correlaciones positivas y, por tanto, se realizaron análisis de regresiones lineales. El análisis en 2008 mostró una correlación de 0.82 y la ecuación de regresión lineal fue: $y = 2.3049x + 0.2073$ ($r^2 = 0.67$). Para 2009 y 2010, los coeficientes de correlación fueron 0.84 y 0.63 y las ecuaciones de regresión fueron: $y = 3.0198x - 0.4455$ ($r^2 = 0.71$), e $y = 2.3043x + 1.2609$ ($r^2 = 0.40$). Estos resultados permiten sugerir que por cada grano con síntomas visibles, dos granos de cebada podrían contener al hongo. Stenglein (2009) resalta el aumento en la importancia de *F. poae* en diferentes países y resume el potencial de producción de las micotoxinas, con especial atención a posibles problemas de salud humana y animal. Niessen (2008) indica que el nivel de contaminación con ciertas micotoxinas puede estar relacionado con la cantidad de biomasa patógena presente en el material vegetal. Mediante la técnica TaqMan se observaron correlaciones entre el nivel de ADN y el de eniatinas y nivalenol, en granos de cebada (Yli-Mattila *et al.*, 2008). Sin embargo, en muestras asintomáticas de trigo contaminadas con *F. poae* y usando la prueba TaqMan, no se encontró correlación positiva entre el ADN de *F. poae* y la cantidad de eniatinas B+B1 (Kulik y Jestoi, 2009).

CONCLUSIONES

Los resultados confirman la importancia de *Fusarium poae*. Las condiciones ambientales durante la antesis son importantes para el desarrollo de los síntomas, pero no parecen ser determinantes en la colonización del hongo en los granos. Además, el número real de granos contaminados con *F. poae* es

LITERATURE CITED

- Bennet, J., W., and M. Klich. 2003. Mycotoxins. Clin. Microbiol. Rev. 16: 497-516.
- Buerstmayr, H., L. Legzdina, B. Steiner, and M. Lemmens. 2004. Variation for resistance to *Fusarium* head blight in spring barley. Euphytica 137: 279-290.
- D'Mello, J., P., F., C. M. Placinta, and A. M. C. McDonald. 1999. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. Anim. Feed Sci. Technol. 80: 183-205.
- Dinolfo, M., I., S. A. Stenglein, M. V. Moreno, P. Nicholson, P. Jennings, and G. L. Salerno. 2010. ISSR markers detect high genetic variation among *Fusarium poae* isolates from Argentina and England. Eur. J. Plant Pathol. 127: 483-491.
- Edwards, S., G. 2004. Influence of agricultural practices on *Fusarium* infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins. Toxicol. Lett. 153: 29-35.
- González, H., H., L., G. A. Moltó, A. Pacin, S. L. Resnik, M. J. Zelaya, M. Masana, and E. J. Martínez. 2008. Trichothecenes and mycoflora in wheat harvested in nine locations in Buenos Aires province, Argentina. Mycopathologia 165: 105-114.
- Kulik, T., and M. Jestoi. 2009. Quantification of *Fusarium poae* DNA and associated mycotoxins in asymptotically contaminated wheat. Int. J. Food Microbiol. 130: 233-237.
- Mackintosh, C., A., D. F. Garvin, L. E. Radmer, S. J. Heinen, and G. J. Muehlbauer. 2006. A model wheat cultivar for transformation to improve resistance to *Fusarium* head blight. Plant Cell Rep. 25: 313-319.
- Niessen, L. 2008. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin-producing fungi. Adv. Food Nutr. Res. 54: 81-138.
- Parry, D., W., and P. Nicholson. 1996. Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. Plant Pathol. 45: 383-391.
- Stenglein, S., A. 2009. *Fusarium poae*: a pathogen that needs more attention. J. Plant Pathol. 91: 25-36.
- Stenglein, S., A., and P. A. Balatti. 2006. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Argentina as revealed by pathogenic and molecular markers. Physiol. Mol. Plant Pathol. 68: 158-167.
- Turner, J., A., and P. Jennings. 1997. The effect of increasing humidity on *Fusarium* ear blight and grain quality. Cereal Res. Commun. 15: 825-826.
- significativamente mayor que el número con síntomas observables de la enfermedad. Por tanto, el grado real de contaminación del grano con *F. poae* es actualmente subestimado y se debe considerar para un análisis de riesgos alimentarios.
- Fin de la versión en Español—
- *—
- Urrea, C., A., R. D. Horsley, B. J. Steffenson, and P. B. Schwarz. 2005. Agronomic characteristics, malt quality, and disease resistance of barley germplasm lines with partial *Fusarium* head blight resistance. Crop Sci. 45: 1235-1240.
- Vogelgsang, S., M. Sulyok, A. Hecker, E. Jenny, R. Krska, R. Schuhmacher, and H. R. Forrer. 2008. Toxigenicity and pathogenicity of *Fusarium poae* and *Fusarium avenaceum* on wheat. Eur. J. Plant Pathol. 122: 265-276.
- Xu, X., P. Nicholson, M. A. Thomsett, D. Simpson, B. M. Cooke, F. M. Doohan, J. Brennan, S. Monaghan, A. Moretti, G. Mule, L. Hornok, E. Beki, J. Tatnell, A. Ritieni, and S. G. Edwards. 2008. Relationship between the fungal complex causing *Fusarium* head blight of wheat and environmental conditions. Phytopathology 98: 69-78.
- Xu, X., D. Parry, P. Nicholson, M. Thomsett, D. Simpson, S. Edwards, B. Cooke, F. Doohan, J. Brennan, A. Moretti, G. Tocco, G. Mulè, L. Hornok, G. Giczey, and J. Tatnell. 2005. Predominance and association of pathogenic fungi causing *Fusarium* ear blight in wheat in four European countries. Eur. J. Plant Pathol. 112: 143-154.
- Xue, A., G., K. M. Ho, G. Butler, B. J. Vigier, and C. Babcock. 2006. Pathogenicity of *Fusarium* species causing head blight in barley. Phytoprotection 87:55-61.
- Yli-Mattila, T., S. Paavanen-Huhtala, M. Jestoi, P. Parikka, V. Hietaniemi, T. Gagkaeva, T. Sarlin, A. Haikara, S. Laaksonen, and A. Rizzo. 2008. Real-time PCR detection and quantification of *Fusarium poae*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae* in cereal grains in Finland and Russia. Arch. Phytopathol. Plant Protec. 41: 243-260.