

DIFERENCIACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Fusarium graminearum* POR PATOGENICIDAD Y PCR

DIFFERENTIATION OF ISOLATES DE *Fusarium graminearum* BY PATHOGENICITY AND PCR

S. Gerardo Leyva Mir^{1*}, Ma. Leticia Vivas Enríquez¹, Héctor Villaseñor Mir², Eduardo Espitia Rangel,² Ernestina Valadez Moctezuma¹ y Julio Huerta Espino²

¹ Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 Carr. México-Texcoco, C. P. 56230, Chapingo, Edo. de México, Tel. 01 (595) 952-1500, Ext. 6179, Fax: 01 (595) 952-1646, Correo electrónico: lsantos@taurus1.chapingo.mx, ² Programa de Trigo de Temporal, Campo Experimental Valle de México, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Apartado Postal 10, CP. 56230. Chapingo, Edo. de México. Tel. 01(595) 954-2877. Fax: 01(595) 954-6528

* Autor responsable

RESUMEN

Con el objetivo de diferenciar aislamientos del agente causal de la roña (*Fusarium graminearum* Shw. Petch) en el trigo (*Triticum aestivum* L.), de acuerdo con el grado de patogenicidad y huellas de ADN, se evaluaron 10 aislamientos de *F. graminearum* procedentes de los estados de México, Michoacán, Jalisco, Tlaxcala y Puebla, en espigas de seis genotipos de trigo harinero: tres moderadamente resistentes (Buc/Alucan, Chil/Chum 18 y Milán) y tres susceptibles (Gálvez, Pavón y Zacatecas). Las espigas se inocularon con cultivos monoconidiales en condiciones de invernadero. Hubo diferencias significativas entre los aislamientos por grado de patogenicidad en una escala de 0 a 5; el aislamiento procedente de Juchitepec, Méx. fue el más patogénico y el de Tepatitlán, Jal., el menos patogénico. La resistencia observada en los genotipos Buc/Alucan, Chil/Chum 18 y Milán no fue la esperada. El análisis del ADN de los aislamientos se realizó con la técnica de RAPDs-PCR, y de acuerdo a 0.82 del coeficiente de similitud genética se formaron cinco diferentes grupos, que no mostraron relación con los grupos conformados por el grado de patogenicidad en campo.

Palabras clave: *Fusarium graminearum*, patogenicidad, PCR, ADN, coeficiente de similitud genética

SUMMARY

To differentiate wheat (*Triticum aestivum* L.) strains regarding the pathogen producing the fusarium head scab (*Fusarium graminearum* Shw. Petch), according to the pathogenic level and to DNA markers, we evaluated 10 strains of *F. graminearum* collected in the States of México, Michoacán, Jalisco, Tlaxcala and Puebla, from spikes of six different genotypes: three considered as tolerant (Buc/Alucan, Chil/Chum 18 and Milán) and three susceptibles (Gálvez, Pavón y Zacatecas). Spike inoculation was carried out with single conidia isolates under greenhouse conditions. There were significant differences among isolates based upon spike pathogenicity. The isolate from Juchitepec, México was the most severe, and the one from Tepatitlán, Jalisco was the less pathogenic. Genotypes Buc/Alucan, Chil/Chum 18 and Milán did not behave as resistant, as it was expected. The DNA analyses among isolates were made by the RAPD-PCR technique based on a 0.82 genetic similar

coefficient. Five different groups were detected among isolates, which were not related to their pathogenicity in field conditions.

Index words: *Fusarium graminearum*, pathogenic, PCR, DNA, genetic similarity coefficient.

INTRODUCCIÓN

Fusarium graminearum Schwabe (estado sexual *Gibberella zeae* Shw., Petch) es el agente causal de la roña, tizón o fusariosis de la espiga de trigo (*Triticum aestivum* L.). El género *Fusarium* se caracteriza por producir micotoxinas y otros metabolitos, especialmente cuando ataca a cereales como el maíz (*Zea mays* L.), trigo, arroz (*Oriza sativa* L.) o sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench); y su toxicidad es reconocida como uno de los mayores problemas de la agricultura. Particularmente *F. graminearum* produce las micotoxinas deoxinivalenol (DON), nivalenol (vomitoxinas) y zearalenona (ZEA) (Reid *et al.*, 1996; McMullen *et al.*, 1997; Salas *et al.*, 1999). Los primeros reportes de esta enfermedad datan de Inglaterra en 1884 y posteriormente en los Estados Unidos en 1890 (Parry *et al.*, 1995). Actualmente este se presenta en regiones templadas y húmedas del mundo como el Norte-Centro de Europa y Asia (Ireta y Gilchrist, 1994; McMullen *et al.*, 1997).

En México se cultivan cerca de 227 000 ha de trigo en condiciones de secano o temporal y riego en los estados de México, Jalisco, Michoacán, Guanajuato, Tlaxcala e Hidalgo. La enfermedad se ha incrementado en los últimos años en estas regiones debido a que se practica la rotación maíz- trigo, y ambas especies son hospedantes del hongo. Los daños se estiman hasta de 60 % a nivel

poblacional y de 10 a 15 % a nivel individual o de espiga (Ireta, 1986; Ireta y Gilchrist, 1994).

No se han establecido métodos de estudio sobre la variabilidad de *F. graminearum*, y las variedades diferenciales aún no están definidas. Díaz y Kohli (1996) estudiaron la variación del hongo en tres variedades de trigo utilizadas como diferenciales y encontraron diferencias significativas en el daño por aislamiento. Sin embargo, al analizar la diversidad genética del hongo Bowden y Leslie (1996) mencionan que la fase sexual *Gibberella zeae* es la principal fuente de variación del hongo. Wang (1996) indica que existen diferencias en patogenicidad entre aislamientos de *F. graminearum* provenientes de tres regiones de China, y que los aislamientos más patógenos fueron los provenientes de regiones donde existen altas incidencias del hongo.

Dill-Macky (1996) sugiere el uso de técnicas de marcadores genético-moleculares, para la detección de material resistente al tizón de la espiga, así como su mapeo genómico (Buerstmayr *et al.* 1996). Estas herramientas pueden ayudar en la diferenciación de especies, aislamientos y razas fisiológicas del género *Fusarium*. Al respecto, se han logrado avances notables utilizando, por ejemplo, la técnica RAPD (Random Amplified Polymorphisms DNA) (Schilling *et al.*, 1994; Campbell y Lipps, 1998).

En esta investigación se procuró detectar variabilidad genética de diez diferentes aislamientos de *F. graminearum* mediante el grado de patogenicidad y huellas de ADN.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de semilla y aislamiento de *F. graminearum*. Se recolectaron semillas de trigo con síntomas de fusariosis (arrugamiento y manchas de color rojo y negro) de diferentes sitios: Juchitepec (A1), Metepec II (A2), Metepec I (A3) y Chapingo (A7) del estado de México; Bonilla (A4) y Potzumarán (A9) de Michoacán; Jesús María (A5) y Tepatitlán (A10) de Jalisco; Cuyuaco (A6) de Puebla y Calpulalpan (A8) de Tlaxcala. Las semillas se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio 1 % por un min y se colocaron en cajas de Petri con medio nutritivo de tomate (90 mL de jugo de tomate, 20 g de agar, 4 g de carbonato de calcio) bajo luz continua. Después de 48 h, al observar crecimiento de las colonias, se procedió a aislar e identificar a *F. graminearum* de acuerdo con Warham *et al.* (1994).

Producción de inóculo. Se utilizó una porción de micelio del aislamiento original crecido en cajas Petri y se dispersó por agitación en agua destilada estéril; se tomó 1 mL de la suspensión conteniendo macroconidios y se dispersó en cajas Petri con medio nutritivo. Las cajas se colocaron bajo luz continua para estimular la formación de conidios; después de 48 h se obtuvieron colonias aisladas que se transfirieron independientemente a otra caja Petri para la obtención de cultivos monoconidiales. En matraces de 125 mL que contenían 100 mL de cultivo nutritivo líquido de frijol chino (*Vigna* sp.) (20 g de frijol chino hervido durante 30 min, el caldo se afora a 1 L con agua destilada), se agregó un trozo de agar del cultivo monoconidial y se mantuvo en agitación a 500 g por 15 días en luz continua y a temperatura ambiente para la producción del inóculo.

Inoculación. Bajo condiciones de invernadero re-evaluaron seis genotipos de trigo harinero de las variedades Buc/Alucan, Chil/Chum 18 y Milán (reportados como moderadamente resistentes) y Gálvez, Pavón y Zacatecas (reportados susceptibles), proporcionados por el Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Los genotipos se sembraron en macetas bajo un diseño experimental de parcelas apareadas, donde la parcela estuvo representada por las variedades y los bloques por las repeticiones de cada aislamiento (cuatro por aislamiento). Se inocularon cinco espigas por genotipo en la etapa de anthesis (que se considera la etapa fenológica más susceptible) con una suspensión de 2×10^5 conidios por mL por aislamiento, los cuales se impregnaron en pequeños copetes de algodón que se colocaron bajo una de las glumas de las espiguillas ubicadas en el tercio medio de la espiga; después se cubrieron con papel encerado. La suspensión utilizada contenía Tween 20 como adherente (1 mL L^{-1}). Las plantas inoculadas se mantuvieron durante 72 h con una humedad relativa aproximada de 100 % y luego 18 días a temperatura ambiente (25 a 30 °C).

Evaluación de los síntomas. Se consideró el número de espiguillas enfermas por espiga de acuerdo con la escala propuesta por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (Warham *et al.*, 1994), que se anota en el Cuadro 1. Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza y cuando éste indicó diferencias significativas entre tratamientos se realizó la comparación de medias mediante la prueba de Tukey, mediante el programa SAS versión 1996.

Cuadro 1. Escala utilizada para evaluar la respuesta al tizón de la espiga ocasionado por *F. graminearum* en seis genotipos de trigo harinero.

Escala	Espiguillas enfermas en una espiga	Nivel de Resistencia
9	0	Inmune
T	1	Altamente resistente
1	1-2	Resistente
2	2-4	Moderadamente resistente
3	5-6	Moderadamente susceptible
4	>7	Susceptible
5	Toda la espiga	Altamente susceptible

Tomado de CIMMYT Report on Wheat Improvement (1988).

Extracción de ADN. El micelio de cada uno de los aislamientos fue producido de igual forma que para la inoculación de las espigas, con excepción de que el cultivo se mantuvo en oscuridad para favorecer su desarrollo. Se utilizó el método de George *et al.* (1998) con algunas modificaciones, consistente en moler el micelio con nitrógeno líquido en un mortero estéril 500 mg de micelio deshidratado, y después fue transferido a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se resuspendió en 900 µL de buffer de extracción (100 mM Tris pH 8.0, 100 mM EDTA, 250 mM NaCl y 1 % p/vol Dodecil sulfato de sodio), y se incubó a 65 °C durante 1 h con agitación continua. El ADN se precipitó con 300 µL de acetato de potasio (3 M de Potasio y 5 M de acetato, pH 4.8) a 4 °C durante una hora y se centrifugó durante 10 min a 8160 g. Se adicionaron ¼ del volumen de isopropanol frío al sobrenadante y se incubó por 1 h más, a -20 °C; se centrifugó nuevamente durante 5 min a 8160 g y se eliminó el isopropanol. El ADN se trató con ARNasa y se precipitó nuevamente con isopropanol y acetato de sodio 3M.

PCR. El análisis de ADN se llevó a cabo con siete iniciadores aleatorios de Carl Roth GmbH Company & Co., Karlsruhe, Germany: C-01 (5'-TTC GAG CCAG-3'), C-06 (5'-GAA CGG ACTC-3'), C-12 (5'-TGT CAT CCC C-3'), C-13 (5'-AAG CCT CGTC-3'), C-15 (5'-GAC GGA TCAG-3'), C-16 (5'-CAC ACT CCAG-3') y C-20 (5'-ACT TCG CCAC-3'). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 µL y contenía agua bidestilada, dNTP's 200 µM, amortiguador 10X para *Taq* ADN polimerasa, MgCl₂ 1.5 mM, ADN 150 ng, iniciador 20 pmol y *Taq* ADN polimerasa 2.0 U. Todos los reactivos para PCR fueron de Gibco BRL, Maryland, USA. La cantidad y concentración de los componentes que integraron la mezcla de reacción fueron los propuestos Kelly *et al.* (1994). La mezcla de reacción se cubrió con un volumen igual de aceite mineral para evitar la evaporación durante el proceso de termociclaje. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador (Perkin-Elmer DNA Thermal Cycler Cetus 480 CT, USA) con el siguiente programa: un ciclo a 94 °C, 60s; 38 ciclos [94 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 90 s] y un ciclo de extensión final de 2.5 min a 72 °C. En cada amplificación se incluyó un control negativo que contenía todos los reacti-

vos para PCR, excepto ADN. La separación de los productos amplificados se hizo en geles de agarosa 1.2 % con amortiguador TAE 1X (Tris-acetato, EDTA), incluyendo el marcador de peso molecular de 1 kb de GibcoBRL. El ADN de los geles se tiñó con bromuro de etidio y las bandas se visualizaron y documentaron en un fotodocumentador Kodak, Digital Science 1D Image Analysis Software version 2.0.3 (Kodak Company, New Haven, CT, USA). Los patrones de bandas obtenidos con cada iniciador para cada uno de los aislamientos de *F. graminearum* se transformaron a una matriz binaria de datos en donde el dígito "1" indicó presencia y "0" la ausencia de un fragmento de ADN. Se construyó el dendrograma correspondiente utilizando el Coeficiente de Similitud Genética de Nei, mediante método de agrupamiento con el programa NTSYS-pc2 (Rohlf, 1989).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis estadístico detectó dos grupos diferentes (Cuadro 2): el A representado por los genotipos moderadamente susceptibles, y el B que incluyó a genotipos moderadamente susceptibles y susceptibles. La respuesta del grupo A concuerda con lo reportado por Vivas (Comunicación personal¹), ya que estos genotipos se comportaron como susceptibles en condiciones de campo; pero los del grupo B que en este estudio también mostraron susceptibilidad, al evaluarlos en campo los reportó como tolerantes a *F. graminearum*. La respuesta de susceptibilidad observada en los seis genotipos evaluados, pudiera indicar efectivamente que los niveles de resistencia se rompen cuando las condiciones para la infección por *F. graminearum* son favorables, como lo citan Mc Mullen *et al.* (1997) y Parry *et al.* (1995). También es posible que el manejo experimental que se siguió en esta investigación haya favorecido el desarrollo del patógeno; sin embargo, es necesario considerar la posibilidad de que los genotipos de trigo utilizados tengan bajos niveles de resistencia, pues a la fecha no existen variedades de trigo reportadas como resistentes a *F. graminearum* (Galich, 1996; Piñeiro, 1996).

Cuadro 2. Respuesta de susceptibilidad de seis variedades de trigo harinero inoculadas con 10 aislamientos de *F. graminearum*.

Genotipo	Media (Número de espiguillas dañadas/espiga)
Gálvez	4.30 A
Pavón	4.24 A
Zacatecas	4.16 A
Buc/Alucan	3.74 B
Milán	3.72 B
Chil/Chum 18	3.70 B

Letras iguales tienen la misma significancia estadística (Tukey, 0.05).

¹ E L Vivas (2002) Diferenciación de aislamientos de *Fusarium graminearum* Shw por patogenicidad y PCR. Tesis de M C., Univ. Aut. Chapingo. 33 p.

Al evaluar el grado de patogenicidad de los aislamientos sobre los genotipos en estudio, la agrupación de medias formó seis grupos; el aislamiento de Juchitepec, México (A1) se ubicó como el más patogénico, mientras que el de Tepatitlán, Jalisco (A10) fue el menos agresivo (Cuadro 3). Desde el punto de vista biológico se podría considerar que la diferencia en patogenicidad pudiera ser no significativa, ya que la diferencia entre la cantidad de espiguillas dañadas por espiga entre ambos, es mínima (de 3.6 a 4.2). También fue evidente que aislamientos de origen distinto como el A3, A4, A5 y A6 (grupo ABC), o el A8 y A9 (grupo CD) mostraron el mismo grado de patogenicidad, aún cuando se desarrollaron en localidades geográficas y ambientes diferentes (Cuadro 3).

La variación en la agresividad del patógeno se ha hecho evidente sólo cuando se sigue la epidemiología de *F. graminearum* por cultivar por año, en un tiempo y ambiente determinado, Díaz y Kohli (1996) observaron que los niveles de infección muestran diferencias significativas de un año a otro. Sin embargo, si el estudio se limita a un ciclo decultivo, sólo se observan niveles diferentes de respuesta en función de los cultivares de trigo utilizados, pero no en la agresividad de diferentes aislamientos por región (Wang, 1996).

Análisis de huellas genómicas. El hecho de que algunos aislamientos se hayan diferenciado por el grado de patogenicidad, no indica que tales diferencias se reflejen necesariamente en el perfil genómico, realizado con siete iniciadores utilizados para el análisis respectivo (Valadez y Kahl, 2000). En la Figura 1 se muestra un ejemplo del perfil de ADN obtenido con dos de los iniciadores aleatorios utilizados, se puede apreciar claramente la presencia de bandas de ADN comunes en todos los aislamientos, así como las bandas polimórficas que hacen evidente la diferencia entre los genomas que se comparan. Así, el aislamiento A6 amplificado con el iniciador C-12 (lado izquierdo de la Figura 1) exhibe tres bandas de ADN de 2450, 2036 y 1300 pb que no están presentes en el resto de los aislamientos, mientras que A4 no presenta amplificación alguna. Con el iniciador C-13 (lado derecho de la Figura 1), el aislamiento A4 presenta bandas de ADN de 2200, 1636 y 1018 pb que difieren del resto. Estos resultados fueron reproducibles en al menos tres reacciones independientes de RAPDs, por lo que marcan diferencias genómicas claras entre los aislamientos de Cuyuaco (A6) y Bonilla (A4); sin embargo, ambos están ubicados en el mismo grupo de patogenicidad (Cuadro 3).

Cuadro 3. Patogenicidad de 10 aislamientos de *Fusarium graminearum* obtenidos de diferentes zonas trigueras de México e inoculados en seis genotipos de trigo.

Genotipo	Aislamiento de <i>Fusarium graminearum</i>										Media
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	
	Juchitepec	Metepec II	Metepec I	Bonilla	Jesús María	Cuyuaco	Chapingo	Calpulalpan	Potzumarán	Tepatitlán	
Gálvez	5.7A ¹	5.9A	5.6A	5.2 A	5.9A	4.8 A	4.6A	4.4A	4.6A	4.6A	5.1A ³
Pavón	5.3A	5.0A	5.5A	4.8 A	4.7B	5.7 A	4.9A	4.2A	4.0A	3.9A	4.8A
Zacatecas	4.7AB	4.3B	4.6AB	4.6AB	4.4B	5.0A	4.3AB	4.0AB	3.9AB	3.8AB	3.9AB
Bucalucan	3.8B	4.1B	4.5AB	3.3C	3.6BC	3.3B	3.7B	3.7B	3.6B	3.6AB	3.7B
Milán	3.3B	3.1C	2.7C	3.1C	2.5C	2.7B	2.7C	3.2BC	3.1BC	2.9C	3.6B
Chil/chum 18	2.5C	2.9C	2.7C	3.0C	2.9BC	2.7B	3.0BC	2.6C	3.0BC	2.5C	2.9BC
Media	4.2A ²	4.2AB	4.2ABC	4.0ABC	4.0ABC	4.0ABC	3.8BCD	3.7CD	3.7CD	3.6CD	

¹Números seguidos por la misma letra en columna, no muestran diferencia significativa (Tukey, 0.05).

² Medias por aislamientos, números seguidos por la misma letra en hilera, no muestran diferencia significativa (Tukey, 0.05).

³ Medias por genotipos, números seguidos por la misma letra en columna, no muestran diferencia significativa (Tukey, 0.05).

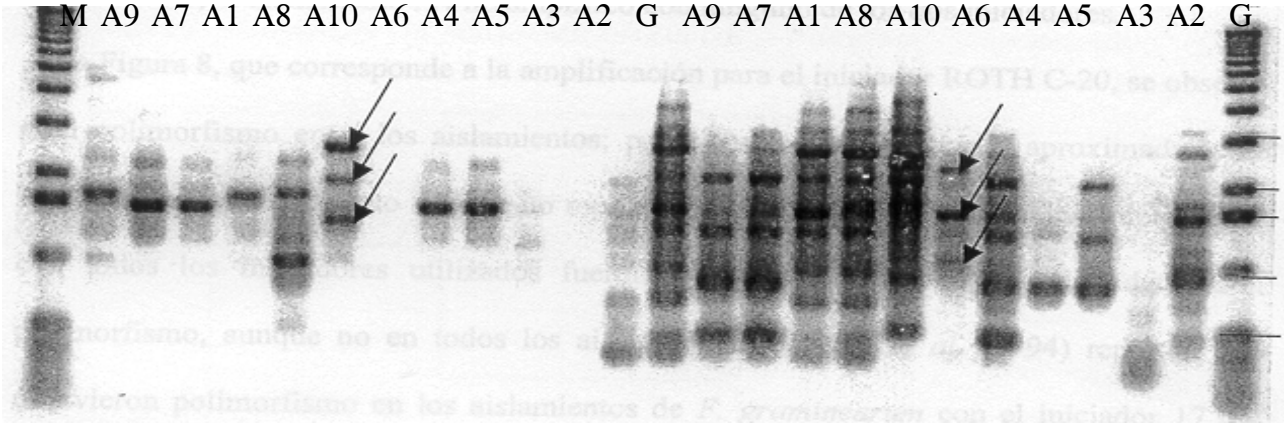


Figura 1. Patrones de ADN detectados con los iniciadores RothC-12 (izquierda) y RothC-13 (derecha) de los aislamientos A9 (Potzumarán, Mich.), A7 (Chapingo, Méx.), A1 (Juchitepec, Méx.), A8 (Calpulalpan, Tlax.), A10 (Tepatitlán, Jal.), A6 (Cuyuaco, Pue.), A4 (Bonilla, Mich.), A5 (Jesús María, Jal.), A3 (Metepec I, Méx.), A2 (Metepec II, Méx.). Marcador de peso molecular de 1 kb. G, ADN de garbanzo. Las flechas señalan bandas polimórficas.

El dendrograma que se muestra en la Figura 3 se construyó con 20 bandas producto de la amplificación de los siete iniciadores aleatorios utilizados. El dendrograma muestra que todos los aislamientos de *F. graminearum* están interrelacionados genéticamente, con un coeficiente de 0.70. Los aislamientos forman tres grupos: el grupo 1 representado por Potzumarán (A9), Calpulalpan (A8) y Tepatitlán (A10); el grupo 2 por Chapingo (A7), Juchitepec (A1), Metepec I (A3), Jesús María (A5), Bonilla (A4) y Metepec II (A2); y el grupo 3 conformado sólo por Cuyuaco (A6).

Los resultados de esta investigación sugieren que para detectar variabilidad patogénica en los aislamientos considerados de *F. graminearum* es necesario, en primer lugar, contar con genotipos de trigo contrastantes en la respuesta hacia el patógeno. Actualmente, en China se ha observado que los altos niveles de resistencia de la mayoría de sus líneas de trigo, están relacionados con baja severidad de la enfermedad. La selección de estas líneas, su caracterización genómica y la identificación de los genes de resistencia tipo 3, puede marcar la pauta a seguir para encontrar la resistencia al tizón de la espiga del trigo (Piñeiro, 1996). De manera complementaria, la diferenciación de aislamientos de *F. graminearum* con base en grados de patogenicidad, requiere de técnicas moleculares alternativas, como AFLPs para la caracterización y diferenciación de genomas de aislamientos contrastantes (más patogénico vs menos patogénico) o quizá de la técnica RT-PCR (despliegue diferencial de mensajeros) que permitiría aislar ARNs mensajeros involucrados directa-

mente en patogénesis (Valadez y Kahl, 2000; Valadez *et al.*, 2001). Sin embargo, los RAPDs han probado ser eficientes para la diferenciación de especies y formas especiales de *Fusarium* (Schilling *et al.*, 1994).

CONCLUSIONES

Mediante el coeficiente de similitud genética, en el estudio se detectaron cinco grupos diferentes de variabilidad patogénica entre los diez diferentes aislamientos de *Fusarium graminearum*, los cuales no mostraron relación entre ellos. No se detectó relación entre los grupos de patogenicidad en campo, y los que se formaron con base al coeficiente de similitud genética en bandas de ADN.

BIBLIOGRAFÍA

- Bowden L R, J F Leslie (1996) Diversity and sexuality in *Gibberella zea*. In: *Fusarium Head Scab: Global Status and Future Prospects*. H J Dubin, L Gilchrist, J Reeves, A McNab (eds). CIMMYT. México, D.F. pp: 52-58.
- Buerstmayr H, M Lemmens, H Grausgruber, P Ruckebauer (1996) Breeding for Scab Resistance in Wheat: Inheritance of Resistance and Possibilities for *In vitro* Selection. In: *Fusarium Head Scab: Global Status and Future Prospects*. H J Dubin, L Gilchrist, J Reeves, A McNab (eds). CIMMYT. México D.F. pp: 52-58.

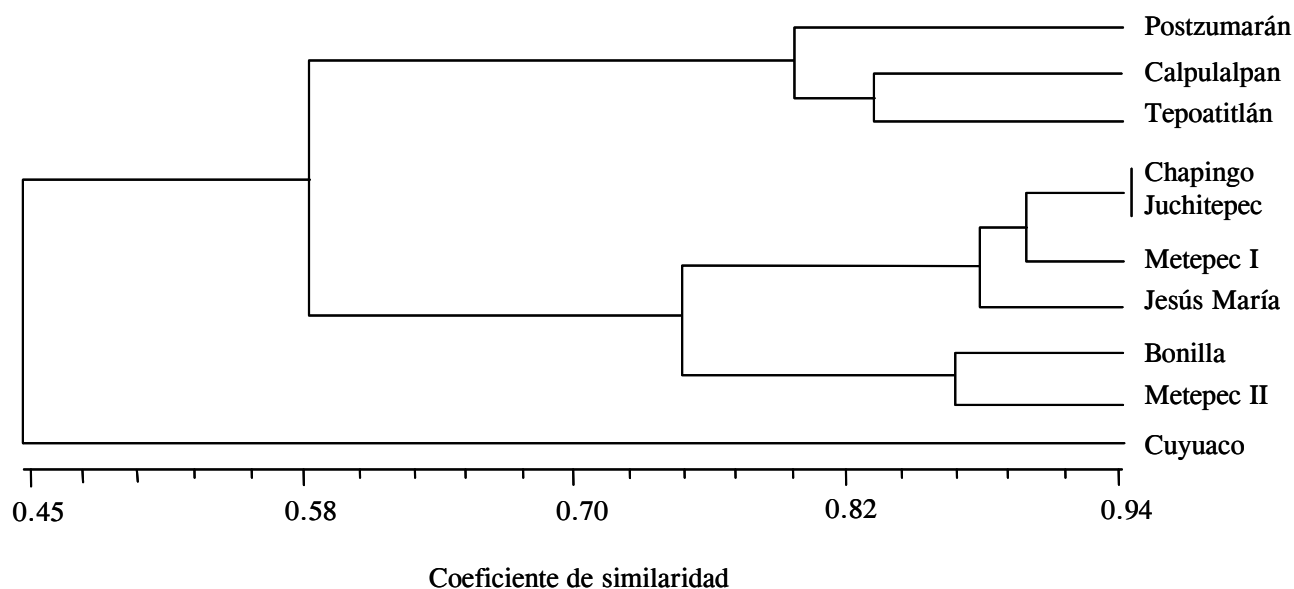


Figura 2. Dendrograma de agrupación de 10 aislamientos de *F. graminearum* de diferentes zonas geográficas, de acuerdo con la similitud de bandas de ADN amplificadas con siete iniciadores aleatorios de la serie C de Roth.

- Campbell K A G, P E Lipps (1998)** Allocation of resources: Sources of variation in *Fusarium* head blight screening nurseries. *Phytopathology* 88: 1078-1086.
- Díaz de Ackermann M, M M Kohli (1996)** Research on *Fusarium* head blight of wheat in Uruguay. *In: Fusarium Head Scab: Global Status and Future Prospects*. H J Dubin, L Gilchrist, J Reeves, A McNab (eds). CIMMYT. México D.F. pp: 13-18.
- Dill-Macky R (1996)** *Fusarium* head blight: Recent epidemics and research efforts in the upper Midwest of the United States. *In: Fusarium Head Scab: Global Status and Future Prospects*. H J Dubin, L Gilchrist, J Reeves A McNab (eds). México D.F. CIMMYT. Pp: 1-6.
- Galich M T (1996)** *Fusarium* head blight in Argentina. *In: Taller sobre la Fusariosis de la Espiga en América del Sur*. M M Kohli (ed). CIMMYT. México, D.F. pp: 19-28.
- George M L C, R J Nelson, R S Zeigler, H Leung (1998)** Rapid population analysis of *Magnaporthe grisea* by using rep-PCR and endogenous repetitive DNA sequences. *Phytopathology* 88:223-229.
- Ireta M J, L S Gilchrist (1994)** Roña o Tizón de la Espiga del Trigo (*Fusarium graminearum* Schwabe). Informe Especial de Trigo No. 20. CIMMYT. México, D.F. 25 p.
- Kelly A, A R Alcalá-Jiménez, B W Bainbridge, J B Heale, E Pérez-Artés, R M Jiménez-Díaz (1994)** Use of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. Ciceris infecting chickpea. *Phytopathology* 84:1293-1298.
- McMullen M, R Jones, D Gallenberg (1997)** Scab of wheat and barley: A re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease* 81: 1340-1348.
- Miller J D, H L Trenholm (1994)** Mycotoxins in Grain. Ed. Eagan Press. St. Paul, Minnessotta, USA. pp: 3-53.
- Parry D W, P Jenkinson, L Mcleod. (1995)** *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals, a review. *Plant Pathology* 44: 207-238.
- Piñeiro M (1996)** *Fusarium* toxins in Uruguayan wheat. *In: Fusarium Head Scab: Global Status and Future Prospects*. Dubin H J, L Gilchrist, J Reeves, A McNab (eds). CIMMYT. México D.F. pp: 125-128.
- Reid L M, D E Mather, R I Hamilton (1996)** Distribution of deoxynivalenol in *Fusarium graminearum*-infected maize ears. *Phytopathology* 86: 110-114.
- Rohlf F J (1989)** NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Exeter, New York. 140 p.
- Salas B, B J Steffenson, H H Casper, B Tacke, T G Jr Fetch, P B Schwars (1999)** *Fusarium* species pathogenic to barley and their associated mycotoxins. *Plant Disease* 83: 667-674.
- Schilling A G, E M Moller, H H Geiger (1994)** Modern Assays for Plant Pathogenic Fungi (Identification, Detection and Quantification). A Schots, F M Dewey and R P Oliver (eds). CAB Internacional. pp: 47-56.
- Valadéz M E, G Kahl (2000)** Huellas de ADN en Genomas de Plantas (Teoría y Protocolos de Laboratorio). Editorial MUNDIPRENSA. 147 p.
- Valadéz-Moctezuma E, G Kahl, J Ramser, B Hüttel, A Rubluo-Islas (2001)** Técnicas moleculares para la caracterización de genomas vegetales (Garbanzo) y algunas aplicaciones potenciales. *Rev. Fitotec. Mex.* 24(1):103-120.
- Wang Y Z (1996)** Epidemiology and management of wheat scab in China. *In: Fusarium Head Scab: Global Status and Future Prospects*. H J Dubin, L Gilchrist, J Reeves, A McNab (eds). CIMMYT. México, D.F. pp: 97-105.
- Warham E J, L D Butler, B C Sutton (1994)** Ensayos para la Semilla de Maíz y de Trigo. Manual de Laboratorio. CIMMYT. México, D.F. 84 p.