

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Microbiología III



**ANÁLISIS DE FACTORES ECOFISIOLÓGICOS
QUE INFLUYEN EN LA EXPRESIÓN DE GENES
RELACIONADOS CON LA BIOSÍNTESIS DE
TOXINAS EN ESPECIES DE “FUSARIUM”.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Patricia Marín García

Bajo la dirección de las doctoras

María Teresa González-Jaén
Covadonga Vázquez Estévez

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-5991-4

© Patricia Marín García, 2010

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III**



**ANÁLISIS DE FACTORES ECOFISIOLÓGICOS
QUE INFLUYEN EN LA EXPRESIÓN DE GENES
RELACIONADOS CON LA BIOSÍNTESIS DE
TOXINAS EN ESPECIES DE *Fusarium***

TESIS DOCTORAL

PATRICIA MARÍN GARCÍA

MADRID, 2010

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III**

**ANÁLISIS DE FACTORES ECOFISIOLÓGICOS
QUE INFLUYEN EN LA EXPRESIÓN DE GENES
RELACIONADOS CON LA BIOSÍNTESIS DE
TOXINAS EN ESPECIES DE *Fusarium***

**Tesis doctoral presentada por Patricia Marín García
para optar al grado de Doctora en Biología por la
Universidad Complutense de Madrid.**

Directoras:

Dra. María Teresa González-Jaén
Profesora Titular de la
Universidad Complutense de Madrid

Dra. Covadonga Vázquez Estévez
Profesora Titular de la
Universidad Complutense de Madrid

MADRID, 2010

Bajé al mercado
y traje
tomates diarios aguaceros
endivias y envidias
gambas grupas y amenes
harina monosílabos jerez
instantáneas estornudos arroz
alcachofas y gritos
rarísimos silencios

página en blanco
aquí te dejo todo
haz lo que quieras
espabílate
o por lo menos organízate

yo me echaré una siesta
ojalá me despiertes
con algo original
y sugestivo
para que yo lo firme

PÁGINA EN BLANCO (MARIO BENEDETTI)

La mente no es una vasija que tengamos que llenar sino
un leño que hay que hacer arder para que avive el placer
por la investigación y el amor por la verdad.

FRASES CÉLEBRES (PLUTARCO)

AGRADECIMIENTOS.

Son tantas las veces que he deseado este momento... El momento de verme escribiendo las últimas líneas de mi tesis, el momento de agradecer a todas y cada una de las personas que desinteresadamente han contribuido a la realización de este trabajo, ayudándome, apoyándome, aguantándome, haciéndome la vida más fácil... Son tantas las veces... Son tantas las personas... ¡!

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directoras de tesis la oportunidad que me brindaron al permitirme realizar la tesis doctoral en su grupo de investigación. A la Dra. M^a Teresa González Jaén por la confianza que siempre ha depositado en mí y por compartir en todo momento sus conocimientos conmigo. A la Dra. Covadonga Vázquez Estévez por su gran dedicación y sus sabios consejos.

A mi grupo de investigación... A la Dra. Belén Patiño, por su paciencia y entrega. A la Dra. Amaia González y a Jessi por sus palabras de ánimo, a todos los que se fueron como doctores y a los que están aprendiendo y sacando al grupo adelante. Al Dr. Miguel Jurado, por sus consejos científicos y personales, por su amistad. A Ale y Cova por ser tan buenas alumnas y hacerme el trabajo más sencillo. A la Dra. Carmen Callejas por su interés.

Al profesor Naresh Magan, por permitirme realizar parte de mi trabajo en su grupo de investigación en Cranfield University. Por su buen hacer, por su generosidad y por su gran apoyo. Sin todo el esfuerzo y trabajo realizados allí, no podría haber escrito esta tesis. A mis compañeros Neus, Joao, Lucile, Schale, Ahmed, Yusef... por todo el tiempo compartido y disfrutado, por su gran compañerismo. A mi "Cranfield family": Paolo, Belén, Viki, Enrique, por hacer la vida mucho más divertida y llevadera, por nuestras reuniones en la cocina más chachi del campus.

A cada uno de los profesores y personal del Departamento de Genética de la UCM por su por su disponibilidad, atención y amabilidad.

A mis compis de laboratorio y amigos... Por los grandes momentos que hemos vivido juntos y los que nos quedan por vivir! A Silva, por brindarme su amistad y por proporcionarme tanta energía positiva en los momentos más difíciles. A Bea, por saber escuchar y darme tan buenos consejos. A Natalia, por su dulzura y

buen rollo. A Keta y a Diego que siempre me han ayudado con las nuevas tecnologías. A María Cuacos por compartir momentos muy especiales por las calles londinenses. A Ceci, Alberto, Javi, Moni, Myriam, Moni González, Bárbara, Ana Luisa, Daa, Pablo, Elisa, Estrella, Nohelia, Pedro, Edu... por ofrecerme tanto apoyo y compartir mis alegrías con las tuyas. A Laurita, por estar ahí, muy cerca de mí en momentos difíciles y en momentos alegres. A todos los que ahora no están en el departamento, pero estuvieron compartiendo ocasiones agradables: Manolo, Gus, Lula, Manu, Miki, Carmen, Almu...

A la Dra. María Salgado... Por el apoyo incondicional que me ha mostrado desde el primer día que la conocí y por su gran amistad... A Paula, por comprenderme, escucharme, valorarme y por su gran interés por la ciencia. A todos aquellos que de alguna manera han estado presentes durante todo este tiempo y que han marcado mi vida...

A mi familia, a mis tíos, primos, abuelos... por su interés lo largo de todo este tiempo y especialmente, a mis padres Pedro y Tere, por ser las personas a las que les debo todo lo que soy, por ser las personas que más me han aguantado, por su apoyo, por su tolerancia, por su cariño...

La realización de esta tesis ha sido posible gracias a la obtención de una beca para la Formación de Personal Investigador (FPI) asociada al proyecto AGL2004-07549-C05-05/ALI, concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación.

La estancia en Cranfield University ha sido subvencionada mediante la obtención de una ayuda para estancias breves en España y en el extranjero, concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación.

La realización del trabajo de laboratorio ha sido posible gracias a la financiación de los proyectos AGL2004-07549-C05-05/ALI y AGL2007-66416-C05-02/ALI, concedidos por el Ministerio de Ciencia e Innovación.

Igualmente quiero agradecer a los Departamentos de Genética y Microbiología III de la Universidad Complutense de Madrid por permitirme llevar a cabo este trabajo y por las facilidades proporcionadas.

ÍNDICE.

RESUMEN.	1
ABSTRACT.	7
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.	13
1.1 El GÉNERO <i>Fusarium</i>	15
1.1.1 El género <i>Fusarium</i> y su taxonomía, de caracteres morfológicos a caracteres genéticos	16
1.1.2 <i>Fusarium</i> como agente fitopatógeno	21
1.2 TOXINAS PRODUCIDAS POR <i>Fusarium</i>	25
1.2.1 Fumonisinias	28
Estructura química de las fumonisinias	30
Biosíntesis de las fumonisinias	32
1.2.2 Tricotecenos	35
Estructura química de los tricotecenos	36
Biosíntesis de los tricotecenos	38
1.2.3 Otras toxinas producidas por <i>Fusarium</i>	41
Zearalenona	41
Eniantinas	43
Moniliformina	44
Fusaproliferina	45
Micotoxinas emergentes	45
1.3 FACTORES QUE DETERMINAN EL DESARROLLO FÚNGICO Y LA PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS	46
1.3.1 Actividad de agua (a_w) y potencial de agua total (Ψ_T)	47
1.3.2 Temperatura	48
1.3.3 pH	49
1.3.4 Niveles de oxígeno (O_2) y dióxido de carbono (CO_2) y nitrógeno	50
1.3.5 Substrato	51

1.3.6 Interacciones microbianas	52
1.3.7 Insectos	53
1.3.8 Genotipo del hospedador	53
1.4 OTROS HONGOS TOXIGÉNICOS ASOCIADOS A CEREALES: <i>Alternaria, Aspergillus y Penicillium</i>	54
1.5 PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN DE CEREALES CON HONGOS TOXÍGENOS	57
1.6 OBJETIVOS	61
CAPÍTULO 2. EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO Y DE LA TEMPERATURA SOBRE LA TASA DE CRECIMIENTO FÚNGICO Y LA EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN <i>FUM1</i> EN <i>Fusarium verticillioides</i>. _____	63
2.1 INTRODUCCIÓN.....	65
2.2 MATERIAL Y MÉTODOS	67
2.2.1 Material biológico	67
2.2.2 Medio de cultivo	68
2.2.3 Condiciones de inoculación, incubación y medición del crecimiento fúngico	69
2.2.4 Extracción de RNA total	70
2.2.5 Síntesis de cDNA	71
2.2.6 RT-PCR a tiempo real	73
2.2.7 Análisis cuantitativo de los datos obtenidos por RT- PCR a tiempo real	74
2.2.8 Análisis estadístico de los resultados	75
2.3 RESULTADOS	76
2.3.1 Efecto de la temperatura, el potencial osmótico y el potencial matricial sobre el crecimiento fúngico	76

2.3.2 Efecto de la temperatura, el potencial osmótico y el potencial matricial sobre la expresión relativa del gen <i>FUM1</i>	78
2.3.3 Efecto de la temperatura y el potencial osmótico no iónico sobre la tasa de crecimiento	82
2.3.4 Efecto de la temperatura y el potencial osmótico no iónico sobre la expresión relativa del gen <i>FUM1</i>	83
2.3.5 Efecto del potencial osmótico iónico sobre a expresión relativa temporal del gen <i>FUM1</i>	86
2.4 DISCUSIÓN.....	87
CAPÍTULO 3. EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO Y DE LA TEMPERATURA SOBRE LA TASA DE CRECIMIENTO FÚNGICO Y LA EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN <i>FUM1</i> EN <i>Fusarium proliferatum</i>.	95
3.1 INTRODUCCIÓN.....	97
3.2 MATERIAL Y MÉTODOS	99
3.2.1 Material biológico	99
3.2.2 Medio de cultivo	101
3.2.3 Condiciones de inoculación, incubación y cuantificación del contenido total de fumonisinas para el estudio de la correlación	102
3.2.4 Condiciones de inoculación, incubación y medición del crecimiento fúngico para el estudio ecofisiológico	102
3.2.5 Extracción de RNA total	103
3.2.6 Síntesis de cDNA	103
3.2.7 RT-PCR a tiempo real	103
3.2.8 Análisis cuantitativo de los datos obtenidos por RT-PCR a tiempo real	104
3.2.9 Análisis estadístico de los resultados	104

3.3 RESULTADOS	105
3.3.1 Detección y cuantificación relativa de la expresión del gen <i>FUM1</i> y determinación de la capacidad productora de fumonisinas en <i>F. proliferatum</i>	105
3.3.2 Efecto de la temperatura y el potencial osmótico no iónico sobre la tasa de crecimiento	107
3.3.3 Efecto de la temperatura y el potencial osmótico no iónico sobre la expresión relativa del gen <i>FUM1</i>	108
3.3.4 Efecto del potencial osmótico iónico sobre la expresión relativa temporal del gen <i>FUM1</i>	110
3.4 DISCUSIÓN.....	112

CAPÍTULO 4. EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO Y DE LA TEMPERATURA SOBRE LA TASA DE CRECIMIENTO FÚNGICO Y LA EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN *TRI5* EN *Fusarium graminearum*. _____ **117**

4.1 INTRODUCCIÓN.....	119
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	121
4.2.1 Material biológico	121
4.2.2 Medio de cultivo	122
4.2.3 Condiciones de inoculación, incubación y medición del crecimiento fúngico	122
4.2.4 Extracción del RNA total	123
4.2.5 Síntesis de cDNA	123
4.2.6 Diseño de cebadores para los genes <i>TRI5</i> y <i>TUB2</i> de <i>F. graminearum</i>	123
4.2.7 RT-PCR a tiempo real	128
4.2.8 Análisis cuantitativo de los datos obtenidos por RT-PCR a tiempo real	128
4.2.9 Análisis estadísticos de los resultados	128

4.3 RESULTADOS	128
4.3.1 Método de RT-PCR a tiempo real para <i>F. graminearum</i>	128
4.3.2 Efecto de la temperatura y el potencial osmótico no iónico sobre la tasa de crecimiento	130
4.3.3 Efecto de la temperatura y el potencial osmótico no iónico sobre la expresión relativa del gen <i>TRI5</i>	132
4.3.4 Efecto del potencial osmótico iónico sobre la expresión relativa temporal del gen <i>TRI5</i>	134
4.4 DISCUSIÓN.....	135
CAPÍTULO 5. DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES DE <i>Fusarium</i> Y MICROBIOTA ACOMPAÑANTE ASOCIADA A CEREALES EN ESPAÑA.	141
5.1 INTRODUCCIÓN.....	143
5.2 MATERIAL Y MÉTODOS	146
5.2.1 Material biológico	146
5.2.2 Procesamiento y análisis de las muestras mediante diagnóstico molecular	149
5.2.3 Aislamiento e identificación de cepas mediante métodos microbiológicos tradicionales	150
5.3 RESULTADOS	151
5.3.1 Análisis molecular de especies de <i>Fusarium</i> en cebada y trigo blando de Castilla y León y Castilla-La Mancha en las campañas 2006 y 2007	151
5.3.2 Análisis microbiológico tradicional de muestras de cebada y trigo blando de Castilla y León y Castilla-La Mancha en la campaña 2006	154
5.3.3 Análisis molecular de los aislamientos de <i>Fusarium</i> obtenidos mediante métodos microbiológicos tradicionales. Distribución en las muestras de cereales	156

5.4 DISCUSIÓN.....	159
CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN GENERAL. _____	169
CONCLUSIONES. _____	181
CONCLUSIONS. _____	187
BIBLIOGRAFÍA. _____	193
ARTÍCULOS. _____	235

ABREVIATURAS.

AEMET: Agencia Estatal de Meteorología

ANOVA: Análisis de la Varianza

a_w: Actividad de Agua

BEA: Beauvericina

CCP: *Critical Control Point*. Puntos de *Control* Crítico

cDNA: DNA complementario del RNA mensajero

C_T: Ciclo Umbral de la PCR a Tiempo Real

DEPC: dietilpirocabonto

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNasa: Deoxyribonucleasa

dNTP: Deoxinucleótido Trifosfato

DON: Deoxinivalenol

DTT: Ditioneitol

EC: Comisión Europea

EDTA: Ácido etilen-diamino-tetracético

EF-1 α : Gen codificador del Factor de Elongación 1 α

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

ELISA: Ensayo Indirecto de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas

EN: Eniantina

FAO: *Food and Agriculture Organization*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

FB₁: Fumonisina B₁

FHB: *Fusarium Head Blight*. Fusariosis de la Espiga o Golpe blanco

FUM1: Gen codificador de la Poliquétido Sintasa

FUP: Fusaproliferina

GAP: *Good Agricultural Practice*. Buenas Prácticas Agrícolas

GenBank: *International Nucleotide Sequence Database*

GENVCE: Grupo para la Evaluación de Nuevas Variedades de Cultivos Extensivos en España

GYEP: *Glucose-Yeast Extract-Peptide*

GMO: *Good Manufacturing Practice*. Buenas Prácticas Industriales

HACCP: *Hazard Analysis and Critical Control Point*. APPCC, Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

IARC: Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer

IGS: Espaciador Intergénico del DNA ribosomal

ITACyL: Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León

ITAP: Instituto Técnico Agronómico Provincial de Albacete

ITS: Espaciador Intergénico Trascrito del rDNA

JECFA: Comité Mixto FAO/WHO de Expertos en Aditivos Alimentarios

kb: Kilobase

MP (A-I): *Mating Population (A-I)*. Especies Biológicas o Apareantes

MON: Moniliformina

MPa: MegaPascales

mRNA: RNA mensajero

NIV: Nivalenol

OTA: Ocratoxina A

pb: Pares de Bases

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PDA: Agar Patata Dextrosa

PEG: Polietilén glicol

PKS: Poliquétido Sintasa

PMTDI: Ingesta Diaria Máxima Tolerable Provisional

ppm: Partes por Millón

PR: Periodo de referencia

RASFF: Sistema Rápido de Alertas para Alimentos y Semillas

rDNA: DNA ribosómico

RNA: Ácido Ribonucleico

RT: Transcripción Inversa

RT-PCR: Transcripción Inversa- Reacción en Cadena de la Polimerasa

TAE: Tampón Tris-Acetato y EDTA

TRIS: Gen codificador de la Tricodieno Sintasa

Tris: Tris-hidroxil-animometano

TUB2: Gen codificador de la β -Tubulina

UCM: Universidad Complutense de Madrid

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

UV: Ultravioleta

WHO: *World Health Organization*. Organización Mundial de la Salud

ZEA: Zearalenona

Ψ_m : Potencial Matricial

Ψ_s : Potencial Osmótico

Ψ_T : Potencial Total de Agua

RESUMEN.

RESUMEN.

La contaminación de los cereales destinados al consumo humano y animal con hongos filamentosos productores de toxinas tiene efectos negativos sobre la salud animal y humana, debido a su elevada contribución como alimento de la dieta básica. Además, causa pérdidas millonarias en la industria agroalimentaria. Por ello, las micotoxinas constituyen uno de los riesgos alimentarios más importantes, como se reconoce en los Codex Alimentarius publicados por las organizaciones internacionales FAO y WHO y en las normativas elaboradas por la Unión Europea, sobre los límites que se deben establecer en cuanto a la presencia de las principales toxinas en alimentos y materias primas.

Uno de los principales géneros fúngicos toxígenos que afecta a cereales durante la etapa pre-cosecha es *Fusarium*. Es un hongo fitopatógeno, con una distribución prácticamente cosmopolita, que aparte de cereales coloniza un gran número de plantas. Las toxinas más importantes que produce en estos vegetales son las fumonisinas y los tricotecenos.

El estudio del efecto que los principales factores ecofisiológicos (potencial hídrico y temperatura) tienen sobre el crecimiento fúngico y la producción de las toxinas, permite conocer y predecir el establecimiento de poblaciones fúngicas en unas determinadas regiones geográficas. Además de predecir eficientemente el riesgo potencial de producción de las toxinas bajo unas condiciones ambientales determinadas.

En este contexto, el objetivo central de la tesis fue conocer el efecto del potencial hídrico y la temperatura sobre el crecimiento fúngico y la regulación de la biosíntesis de fumonisinas y tricotecenos en tres especies: *F. verticillioides* y *F. proliferatum* (productoras de fumonisinas) y *F. graminearum* (productora de tricotecenos). Para la determinación de la capacidad productora de toxinas se utilizaron y se desarrollaron en esta

tesis, protocolos específicos de especie de RT-PCR a tiempo real para los genes *FUM1* (gen principal de la ruta de biosíntesis de las fumonisinas) y *TRI5* (gen clave de la ruta de síntesis de los tricotecenos). Los estudios ecofisiológicos de estas especies toxígenas de *Fusarium* se realizaron *in vitro* mediante el cultivo de cada especie fúngica en un medio sólido específico e inductor de la síntesis de cada toxina, a unos determinados potenciales de agua (de -0,7 a -9,8 MPa). Los medios de cultivo se modificaron con solutos iónicos o no iónicos (cloruro sódico o glicerol, respectivamente) para conseguir los diferentes niveles de potencial osmótico, mientras que para conseguir los diferentes niveles de potencial matricial el medio de cultivo se modificó con PEG8000. Las condiciones de incubación fueron de 15 a 35 °C durante 10 ó 12 días, según el experimento. Estos estudios permitieron obtener los perfiles de crecimiento y producción de sus correspondientes toxinas para cada una de las tres especies.

F. verticillioides y *F. proliferatum*, mostraron patrones similares de crecimiento, aunque existieron diferencias significativas a nivel intra e inter-específico, siendo *F. verticillioides* capaz de crecer en un rango más amplio de temperatura y potencial hídrico que *F. proliferatum* (llegando a alcanzar los 35 °C). Además, otros experimentos realizados con *F. verticillioides* revelaron que el crecimiento efectivo de esta especie sobre el suelo tiene un rango de potenciales de agua mucho más estrecho que el rango de potenciales de agua en los que podría crecer sobre el cereal. El perfil de crecimiento obtenido en el caso de *F. graminearum*, fue diferente ya que las condiciones más favorables para su crecimiento fueron bajas temperaturas y bajo estrés hídrico. Además, su tasa de crecimiento fue superior a las especies productoras de fumonisinas.

La determinación de la capacidad productora de micotoxinas mediante RT-PCR a tiempo real mostró diferentes niveles de expresión de los genes clave de la ruta de síntesis de las toxinas, y por tanto de su regulación. *F. verticillioides* y *F. proliferatum* presentaron una temperatura de inducción máxima del gen *FUM1* estadísticamente significativa a 20 °C,

mientras que *F. graminearum*, mostró inducción máxima del gen *TRI5* en un rango de temperaturas más amplio (incluyendo 20 °C) en los diferentes niveles de potencial hídrico analizados. *F. verticillioides* mostró una relación positiva entre los niveles de estrés hídrico y de expresión de *FUM1*, aunque el crecimiento se afectó negativamente. Sin embargo, el efecto del estrés hídrico sobre la inducción de la expresión del gen *FUM1* en *F. proliferatum* fue mucho menor y no se observó una relación positiva significativa. Los niveles de expresión del gen *TRI5* en *F. graminearum* se mantuvieron generalmente constantes. Se observó que el aumento del estrés hídrico no tiene un efecto positivo con la inducción de la expresión de *TRI5*. En esta especie la inducción coincide con las condiciones más favorables para el crecimiento fúngico. Estos datos sugieren que la biomasa acumulada de *F. verticillioides* no sería un buen indicador de la cantidad de fumonisina total acumulada, mientras que sí lo sería en el caso de *F. proliferatum* y *F. graminearum*.

Por otro lado, el perfil específico de expresión del gen *FUM1* en *F. verticillioides* podría conferir a esta especie cierta adaptación al maíz, su hospedador principal, mientras que el perfil de expresión de este gen en *F. proliferatum* podría estar relacionado con un patrón menos específico de colonización, como confirma el amplio rango de hospedadores que es capaz de colonizar.

Por tanto, el efecto que la temperatura y el estrés hídrico tienen sobre el crecimiento fúngico y la producción de la toxinas es diferente y específico para cada especie fúngica.

El segundo objetivo de esta tesis fue analizar la distribución de las especies toxígenas de *Fusarium* y su microbiota acompañante, en cereales (trigo y cebada) procedentes de dos de las regiones productoras más importantes de España, que presentan características agroclimáticas diferentes (Castilla y León y de Castilla la Mancha), durante dos campañas consecutivas (2006 y 2007). Para ello se realizó un muestreo de estos cereales en campo, durante el periodo sensible a la infección y colonización del grano. El estudio de las especies toxígenas más frecuentes se llevó a

cabo mediante diagnósticos moleculares, mientras que la identificación de otras especies fúngicas potencialmente toxígenas y micobiota acompañante se realizó mediante los métodos microbiológicos tradicionales. La distribución de especies fúngicas toxígenas mostró diferencias geográficas y anuales. Estas diferencias se podrían relacionar con las características climáticas y meteorológicas de cada región y cada año muestreado. *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. graminearum* se detectaron en ambas regiones. En el Norte de España las especies más importantes fueron *F. verticillioides* y *F. proliferatum* mientras que en Castilla-La Mancha tuvo mayor incidencia *F. graminearum*. Los perfiles de crecimiento de las tres especies en función de los factores ambientales analizados en esta tesis corroborarían la diferente distribución en ambas regiones. También se identificaron otras especies de este género como *F. equiseti*, *F. acuminatum* y *F. circinatum*. El riesgo potencial que estas especies representan aún está por determinarse, puesto que faltarían los correspondientes estudios toxígenos que permitirían predecir el riesgo que dichas especies representan en estos cereales y en estas regiones.

ABSTRACT.

ABSTRACT.

Fungal colonization by *Fusarium* species can severely affect the yield of cereals and results in accumulation of a number of secondary metabolites which are toxic to human and animals. Therefore, mycotoxin contamination of cereals is one of the most important food hazards, recognized by national and international associations involved in food safety. Their importance, and their occurrence in a number of commodities, besides cereals, is currently under regulation in many countries including the European Union.

Fusarium is one of the most important toxigenic fungi in cereals. This fungus is a cosmopolitan phytopathogen which can also occur in many other plant species. Several *Fusarium* species are able to produce a number of diverse mycotoxins and among them, fumonisins and trichothecenes are the most important.

Both accurate diagnosis and control of mycotoxin-producing species are the key strategies to prevent mycotoxins entering into the food chain. In order to elaborate these prevention strategies it is necessary to gain knowledge on the effects of ecophysiological factors such as temperature and water stress, since they mostly determine fungal growth and mycotoxin production. This knowledge is essential to predict the distribution of some species in certain areas and the potential risk of mycotoxin production and accumulation under specific environmental conditions.

In this context, the main objective of this thesis was to analyze the effect of water potential and temperature on fungal growth and on the regulation of the key gene of the fumonisin biosynthesis (*FUM1*) in *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* (the main fumonisin-producing species) and *TRI5* key gene in the trichothecene-producing *F. graminearum*. The quantification of relative expression levels of both *FUM1* and *TRI5* genes was performed by species specific real time RT-PCR protocols developed in this thesis. The *in vitro* experiments were carried out using specific

mycotoxin-inducing media at different water potentials (from -0.7 to -9.8 MPa) and different temperatures (from 15 to 35 °C) during 10 or 12 days depending on the experiment. Solute potentials were modified with ionic (NaCl) or non-ionic (glycerol) solutes whereas matric potential was modified with PEG8000.

The two dimensional growth profiles obtained for *F. verticillioides* and *F. proliferatum* showed quite similar patterns, although *F. verticillioides* was able to grow in a wider range of conditions, in particular at high temperature and water stress. In contrast, *F. graminearum* showed a different growth pattern. In this case, growth rate was higher than both fumonisin-producing species and its most favorable conditions to grow were at milder temperatures and low water stress.

The analysis of *FUM1* and *TRI5* gene expression in the three species revealed an effect of temperature and water potential at a transcriptional level. Both *F. verticillioides* and *F. proliferatum* showed the relative highest *FUM1* induction at 20 °C in all three water potentials tested, whereas *TRI5* induction occurred over a wider range of temperatures, at around 20°C. However, the response to water stress was markedly different in the three species, in particular in the case of *F. verticillioides*. In this species, increasing water stress resulted in a parallel higher induction of *FUM1* expression (particularly at highest water stress). In the case of *F. proliferatum* a similar trend could be detected although at much lower intensity. On the other hand, *F. graminearum* showed a rather constant *TRI5* gene expression within a wider range of conditions coincident with favorable conditions to grow, suggesting that trichothecene production would always accompany the colonization process. These results suggest that *F. verticillioides* biomass might not be a good indicator of fumonisin contamination levels whereas fungal biomass might be a good indicator of toxin content only in the case of *F. proliferatum* and *F. graminearum*.

On the other hand, the pattern of *FUM1* induction by *F. verticillioides* in response a water stress might be envisaged as advantageous for this species to retain its niche and prevent dominance by other fungal species, and to improve adaptation to maize at expenses of reducing the host range. In contrast, *F. proliferatum* showed a relatively stable and constant *FUM1* gene expression levels more compatible with a less specific colonization pattern, and the broad range of host plants which this species is able to colonize.

Therefore, the effect of temperature and water potential showed different and species specific patterns of growth and toxin biosynthesis in the *Fusarium* species studied.

The second main objective of this thesis was to analyze the occurrence of toxigenic *Fusarium* and other fungal species, in barley and wheat from two different agroclimatic and important cereal-producing Spanish regions (Castilla y León and Castilla-La Mancha) in two consecutive years (2006 and 2007). A combined strategy of traditional and DNA-based methods was used to detect specific toxigenic *Fusarium* species and identify other potential toxigenic fungal species. The distribution of the main toxigenic *Fusarium* species (*F. verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum*) was different in both regions and both years analyzed. These results might be explained on the basis of climatic differences between both regions and on differences in the weather conditions (temperature and precipitation) between both years. *F. verticillioides* and *F. proliferatum* were more relevant in Castilla y León whereas *F. graminearum* was more prevalent in Castilla-La Mancha. These results are in agreement with the growth profiles obtained in the *in vitro* experiments in this thesis. Additionally, other *Fusarium* species potentially toxigenic were identified such as *F. equiseti*, *F. acuminatum* and *F. circinatum*, which had not been reported in Spain so far. The relative importance of these species in terms of mycotoxin risk remains to be determined since there are no studies of their mycotoxin profiles available yet.

CAPÍTULO 1.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.

1.1 EL GÉNERO *Fusarium*

Las especies del género *Fusarium* constituyen un grupo cosmopolita de hongos filamentosos que están ampliamente distribuidas en el suelo y que colonizan las partes aéreas y subterráneas de las plantas, así como residuos vegetales y otros substratos orgánicos. Se considera un género de hongos fitopatógenos, ya que son capaces de infectar especies vegetales y producir enfermedades, aunque también pueden vivir de manera saprófita sobre residuos de éstas o en productos derivados de ellas. Son responsables de marchitamientos, podredumbres de la raíz y chancros en una amplia variedad de plantas de cultivo, como por ejemplo los cereales. Por ello, provocan grandes pérdidas económicas en la agricultura y en la industria de procesado y transformación en alimentos y piensos debido a la disminución de su calidad. 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.

Por todo ello, es importante desarrollar estrategias de prevención y control que permitan reducir los riesgos de contaminación por especies del género *Fusarium*. Para llevar a cabo esto, es imprescindible poseer información de numerosos aspectos implicados entre sí, que incluyen el conocimiento de los factores ecofisiológicos que condicionan el crecimiento de los hongos y la producción de las micotoxinas, el desarrollo de estudios epidemiológicos para conocer las especies fúngicas asociadas a una zona geográfica y a un hospedador, así como el estudio de la estructura de las poblaciones y la variabilidad inter o intra-específica, que es la base para el desarrollo de métodos de diagnóstico adecuados y eficaces.

1.1.1 El género *Fusarium* y su taxonomía, de caracteres morfológicos a caracteres genéticos

El género *Fusarium* pertenece al phylum *Ascomycota*, orden *Hypocreales*. Algunas de las especies del género *Fusarium* sólo presentan una fase asexual (anamorfo o forma imperfecta), mientras que otras especies pueden presentar además un estado teleomórfico (forma sexual o perfecta). Los estados teleomórficos de *Fusarium*, pueden estar encuadrados en cuatro géneros, siendo *Gibberella* el género que agrupa la mayoría de los teleomorfos de *Fusarium*. Los géneros *Neocosmospora* (o *Haematonectria*), *Cosmospora* y *Albonectria* engloban las restantes especies de *Fusarium* (Seifert y Lévesque, 2004).

Las bases genéticas de los mecanismos que controlan los fenómenos de reproducción sexual en los ascomicetos filamentosos han sido esclarecidas en los últimos años. Los encargados de regular la reproducción sexual son los productos de los genes que determinan el tipo apareante ("mating type", MT), que consisten en un locus con dos alelos funcionales, a menudo designados como *MAT-1* y *MAT-2* (Yoder *et al.*, 1986; Glass *et al.*, 1990; Kerenyi *et al.*, 2004; Hornok *et al.*, 2007; Keszthelyi *et al.*, 2007). Estos genes determinan la habilidad de dos cepas para fusionar sus núcleos y formar una célula diploide (Nelson, 1996).

El género *Fusarium* fue descrito por primera vez en la terminología científica moderna por Link (1809), sin embargo, los primeros datos fueron aportados por un monje franciscano en México en el siglo XVI. Estos datos se basaban en las descripciones realizadas por los aztecas, que habían observado la podredumbre que en el maíz producía el ahora conocido *Fusarium verticillioides*. Desde su primera descripción se han realizado numerosas clasificaciones, por ello la taxonomía de este género ha estado y está en continua revisión. Wollenweber y Reinking (1935) reconocían la existencia de 140 especies o variedades. El sistema de Snyder y Hansen aceptaba sólo 9 especies (Snyder *et al.*, 1956). El atlas fotográfico de Gerlach y Nirenberg (1982), que es una moderna interpretación de la clasificación de Wollenweber y Reinking, aceptaba 90 especies o variedades.

El manual de clasificación de Nelson *et al.* (1983) propone la existencia de 30 especies comunes y otras 15 menos comunes. Estas clasificaciones se han centrado en el estudio de la morfología y la ausencia o presencia de los tres tipos de esporas asexuales que las especies de este género pueden producir: macroconidios, microconidios y clamidosporas (Figura 1) (Nelson *et al.*, 1983). Otras de las claves utilizadas y que complementan las anteriores son la morfología de la colonia y la pigmentación, así como la presencia de peritecios.

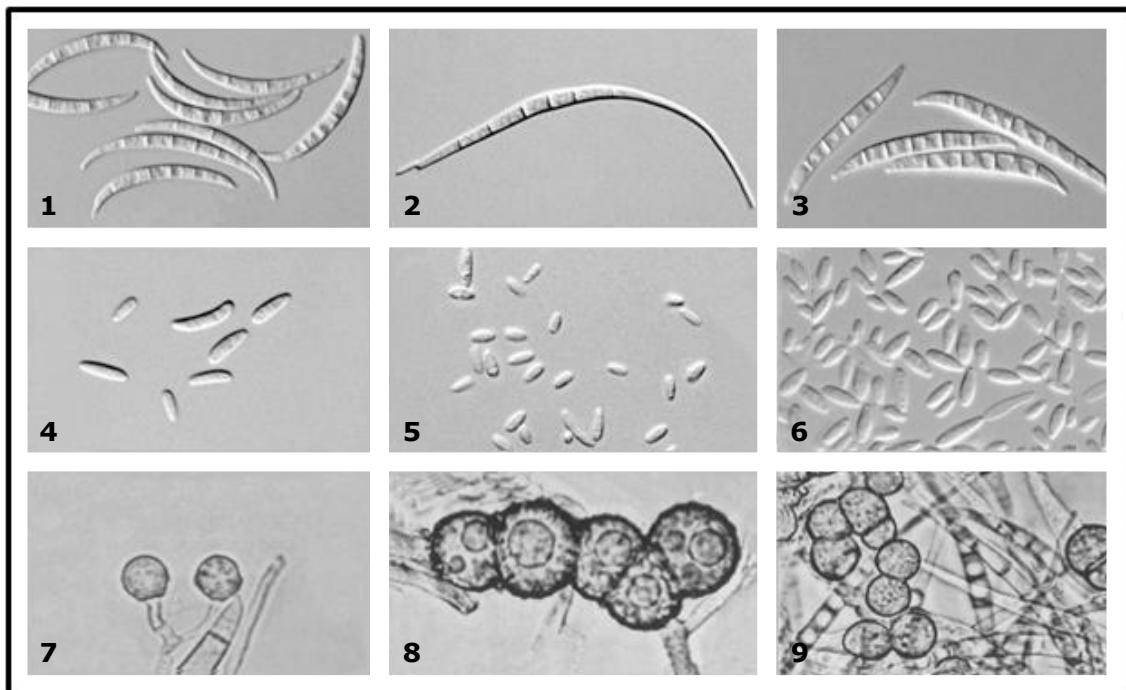


Figura 1: Macroconidios de *F. acuminatum* (1), *F. equiseti* (2) y *F. graminearum* (3). Microconidios de *F. fujikuroi* (4), *F. proliferatum* (5) y *F. verticillioides* (6). Adaptado de Leslie y Summerell (2006). Clamidosporas de *F. oxysporum* (7), *F. equiseti* (8) y *F. solani* (9). Adaptado de Nelson *et al.* (1994a).

El atlas fotográfico de Gerlach y Nirenberg (1982) y el manual de clasificación de Nelson *et al.* (1983) han sido la base de la que han partido una serie de autores para aclarar la taxonomía de *Fusarium*, gracias a la

construcción de filogenias moleculares, y a la aparición del concepto de "especie filogenética". Según este concepto, los límites de una especie estarían determinados por la congruencia entre las filogenias derivadas de diferentes genes en un grupo de organismos, es decir, utilizando un análisis multilocus (Taylor *et al.*, 2000). Además, estos estudios de concordancia genealógica (Taylor *et al.*, 2000), han sido usados para determinar el carácter monofilético de algunas de las especies de *Fusarium* y la existencia de diferentes linajes en una misma especie de este género, o incluso para discernir entre especies muy próximas entre sí y por tanto casi idénticas. Por ejemplo, Starkey *et al.* (2007) ha descrito la existencia de hasta 11 especies diferentes que forman parte del complejo de especies de *Fusarium graminearum*, que están distribuidas geográficamente de manera diferente, y que anteriormente se pensaba que eran diferentes linajes de una misma especie (*F. graminearum*) (O'Donnell *et al.*, 2000, 2004). La determinación de estas 11 especies se realizó en base a los análisis filogenéticos de las secuencias parciales de DNA de 11 genes nucleares diferentes, entre los que destacamos, el gen del factor de elongación (*EF-1 α*), el gen de la β -tubulina (*TUB2*) o incluso los genes que determinan el tipo apareante (*MAT-1* y *MAT-2*).

En la actualidad, se han descrito alrededor de 150 especies morfológicas y/o filogenéticamente diferentes bien caracterizadas y aceptadas por los taxónomos, a pesar de que no existe ningún manual disponible para abordar el tema de una manera clara y rápida (Seifert y Lévesque, 2004).

Mientras que el análisis filogenético de dos o más genes es requerido para el completo desarrollo de un análisis de concordancia genealógica, la identificación precisa de cada una de las especies de *Fusarium* sólo necesita basarse en ensayos específicos sobre una región determinada del DNA. Para la elección de esta región en las especies del género *Fusarium* hay que tener en cuenta la variabilidad que existe a nivel inter o intra-específico. De este modo, se podrían discriminar las especies a nivel individual, mediante un método de diagnóstico basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que fuera específico y sensible para cada una de las especies

toxígenas. La mayoría de los cebadores diseñados específicamente para la identificación y detección de estas especies se basan en secuencias de DNA ribosómico nuclear (rDNA) (Seifert y Lévesque, 2004). Estas pueden ser las secuencias de los espaciadores intergénicos transcritos ITS1 e ITS2 (que se encuentran entre la subunidad 18S y la 5,8S y entre la subunidad 5,8 y la 28S, respectivamente) y la secuencia de la región espaciadora intergénica, IGS (que se encuentra entre la subunidad 28S y la 18S) (Figura 2). El rDNA está presente en el genoma fúngico en múltiples copias repetidas en "tándem" (Smith, 1976), estimándose en torno a 200 copias (Butler y Metzenberg, 1989), por ello el desarrollo de cebadores específicos basados en estas secuencias multicopia aumenta la sensibilidad del ensayo de PCR.



Figura 2: Esquema de los genes que codifican para el DNA ribosómico en *Fusarium* y sus regiones espaciadoras ITS e IGS.

En los últimos años se han desarrollado con éxito protocolos de PCR basados en los espaciadores ITS (Bluhm *et al.*, 2002; Konstantinova y Yli-Mattila, 2004; Kulik *et al.*, 2004) y en la región IGS (Patiño *et al.*, 2004; Jurado *et al.*, 2005, 2006a), para el diagnóstico específico de una serie de especies de *Fusarium*. La región IGS presenta una serie de ventajas, debido a que esta región evoluciona más rápidamente que la ITS (Hillis y Dixon, 1991; Mishra *et al.*, 2002), además de contener altos niveles de variabilidad entre especies del mismo género, permitiendo la identificación de especies muy relacionadas filogenéticamente, y mostrando incluso variabilidad intra-específica (Mirete *et al.*, 2003, 2004).

Por otro lado, también se tienen en consideración para este tipo de estudios secuencias codificadoras de copia única ricas en intrones, tales como los genes codificadores de la calmodulina, la β -tubulina, la histona H3

o el gen *EF-1 α* (Figura 3). Los intrones de estos genes son más variables que las zonas codificadoras (Geiser *et al.*, 2004; Seifert y Lévesque, 2004). El gen *EF-1 α* tiene una gran utilidad a nivel filogenético porque es informativo ya que permite la discriminación a nivel de especie en el género *Fusarium*. Además, no se han detectado copias no-ortólogas de este gen y se han diseñado cebadores universales que funcionan para todas las especies del género *Fusarium*, además de otros géneros fúngicos (Seifert y Lévesque, 2004). Por ello, se creó FUSARIUM-ID v. 1.0, una base de datos de secuencias parciales de *EF-1 α* , que contiene una representación de la diversidad del género *Fusarium* (Geiser *et al.*, 2004), y que además están incluidas en las bases de datos generales como el GenBank (International Nucleotide Sequence Database). No obstante, pese a que la región parcial de este gen *EF-1 α* , muestra un alto nivel de polimorfismo en su secuencia entre especies relacionadas, los ensayos de PCR para el diagnóstico directo de la especie en concreto son menos sensibles por ser un gen de copia única (Seifert y Lévesque, 2004).

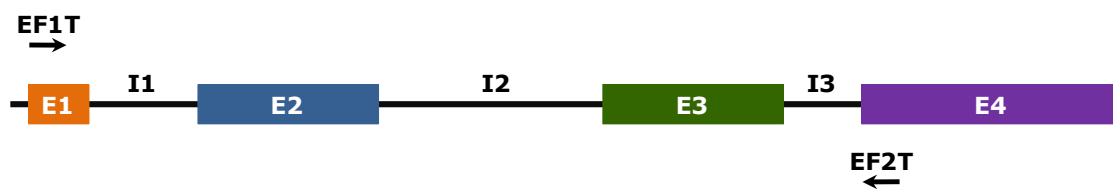


Figura 3: Esquema de la secuencia parcial del gen del factor de elongación (*EF-1 α*) en *Fusarium*. Adaptado O'Donnell *et al.* (1998a).

Las especies toxígenas de *Fusarium* presentan perfiles de toxinas propios, por lo que la identificación precisa de estas especies permite predecir las toxinas potencialmente presentes en los sustratos que contaminan, como por ejemplo ocurre en el caso de las especies productoras de tricotecenos (Mulè *et al.*, 1997; Tan y Niessen, 2003; Kristensen *et al.*, 2005). Sin embargo, especies o cepas muy relacionadas filogenéticamente pueden tener perfiles de producción diferentes, como

ocurre en *F. verticillioides*, donde se han descrito 2 linajes que difieren en la capacidad de producir o no fumonisinas (Mirete *et al.*, 2004). Por ello, el diseño de métodos de diagnóstico precisos necesita el respaldo ineludible de filogenias que los apoyen y que discriminen las especies a nivel inter o incluso intra-específico.

Otro concepto utilizado para la clasificación en la taxonomía de *Fusarium* es el de "especie biológica", que es aquella en la que sus individuos pueden reproducirse sexualmente. Así, por ejemplo, *Gibberella fujikuroi* es un complejo de al menos 9 especies biológicas o apareantes ("mating populations") aisladas reproductivamente y designadas con letras (A-I) (Leslie, 1995; Klaasen y Nelson, 1996; Britz *et al.*, 1999; Zeller *et al.*, 2003), que ahora se reconocen como especies diferentes (Desjardins, 2003). Sin embargo, este concepto tendría una aplicación limitada a aquellas especies con estados teleomorfos y por tanto, no sería de utilidad para la identificación de las especies que únicamente se reproducen asexualmente.

1.1.2 *Fusarium* como agente fitopatógeno

Numerosas especies del género *Fusarium* están consideradas como importantes fitopatógenos, capaces de colonizar plantas y materias primas agrícolas o como saprófitos sobre restos vegetales (Logrieco *et al.*, 2003). En los últimos años algunas especies de este género están cobrando importancia como patógenos emergentes oportunistas, capaces de causar infecciones cardíacas (Guzman-Cottrill *et al.*, 2004), pulmonares (Pagano *et al.*, 2005), cutáneas (Gardner *et al.*, 2005) e incluso oculares (O'Donnell *et al.*, 2007) en pacientes inmunodeprimidos. Este tipo de infecciones conlleva una elevada mortalidad en humanos, ya que muestran una elevada resistencia a los agentes antifúngicos (Castón-Osorio *et al.*, 2008).

Como agente fitopatógeno, *Fusarium* es capaz de colonizar una gran variedad de hospedadores vegetales, tan diversos como el tomate, la patata, el pino o el tabaco (Desjardins *et al.*, 2003; Schweigkofler *et al.*, 2004; Alves-Santos *et al.*, 2007). Los cereales, como el trigo, la cebada, el maíz, etc, están frecuentemente contaminados por especies de *Fusarium*

(Bottalico y Perrone, 2002; Carter *et al.*, 2002; Desjardins *et al.*, 2003; Logrieco *et al.*, 2003). En estos cultivos ocasiona grandes pérdidas económicas porque disminuye la cantidad y la calidad del grano producido. Por ejemplo, en el Norte y el centro de Estados Unidos, estas pérdidas se estimaron en los 2700 millones de dólares entre los años 1998 y 2000 (Goswami y Kistler, 2004). Por otra parte, los granos de estos cereales pueden contener diversas toxinas producidas por estos agentes patógenos. Estas toxinas se han podido empezar a acumular en las semillas de plantas infectadas antes de la cosecha o en materias primas agrícolas que se han almacenado o incluso en productos derivados de ellas, como por ejemplo en cerveza (Torres *et al.*, 1998) o en aceite de consumo humano (Schollenberger *et al.*, 2008). La incidencia de estas toxinas tanto en los cereales de las grandes áreas de cultivo y producción, como en los alimentos derivados de estos, está a menudo asociado a enfermedades severas agudas y crónicas en humanos y animales conocidas como micotoxicosis (Logrieco *et al.*, 2003).

De manera general, el ciclo infectivo de *Fusarium* (Figura 4) en cereales parte de un inóculo primario que se encuentra en materiales vegetales infectados. Estos proceden de los residuos de la cosecha que pueden encontrarse sobre o dentro del suelo en el mismo campo o en campos cercanos (Xu, 2003). En estos residuos, *Fusarium* puede vivir de forma saprófita o bien encontrarse en forma de peritecios, clamidosporas, macro y microconidios, según la especie que esté presente en el material vegetal (Goswami y Kistler, 2004). La formación de estas estructuras está determinada esencialmente por factores ambientales como por ejemplo, la temperatura y la humedad (Xu, 2003). Condiciones meteorológicas tales como viento, lluvia y algunos insectos favorecen la dispersión de las esporas a largas distancias afectando a cultivares cercanos (viento e insectos) o a cortas distancias (agua), por ejemplo en un mismo cultivar (Munkvold *et al.*, 2003a; Xu, 2003). El inóculo puede encontrarse también en semillas infectadas, en ese caso tras la germinación puede producirse la colonización de la plántula por *Fusarium* (Bacon *et al.*, 2001), aunque parece ser una fuente de inóculo con una incidencia mucho menor que las anteriores

debido a la selección previa de las semillas (Gillette, 1999, Munkvold *et al.*, 2003a).

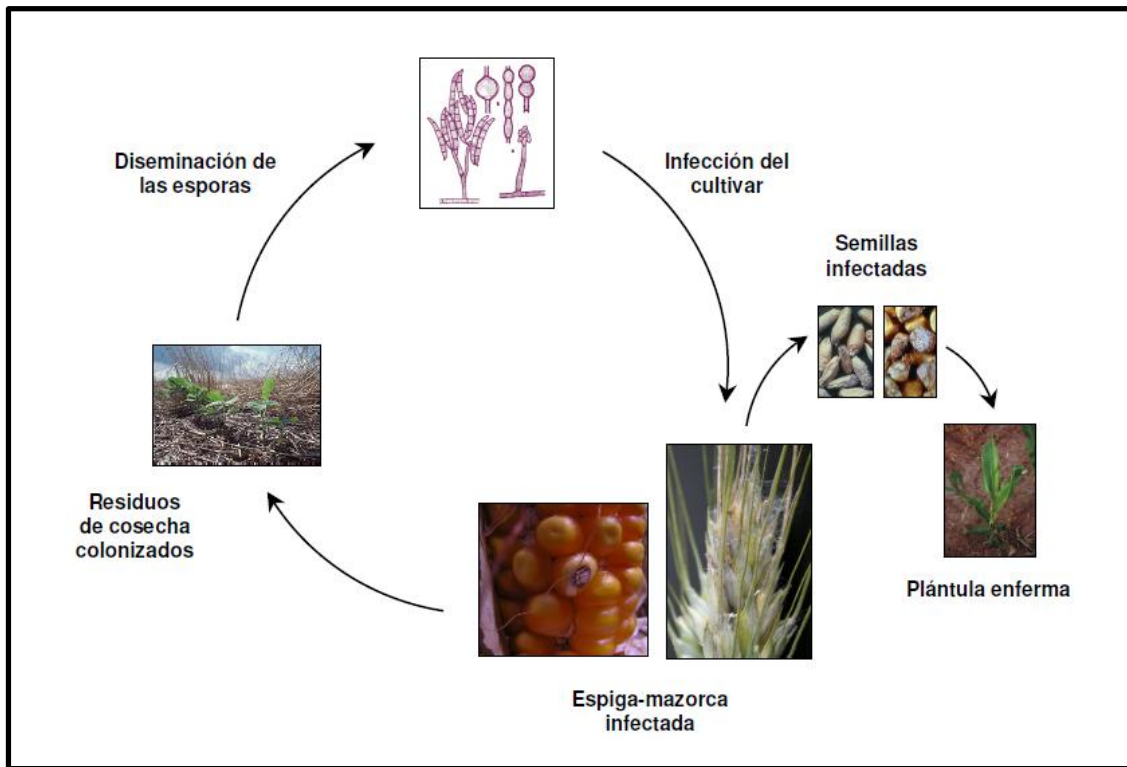


Figura 4: Ciclo infeccioso de *Fusarium*. Tomado de Jurado (2006).

La colonización de la planta por el micelio del hongo se produce tanto intra como intercelularmente, y se ve favorecida por la degradación de compuestos como xilano, pectina, y celulosa mediados por los equipos enzimáticos del hongo (Kang y Buchenauer, 2002). La antesis parece ser el periodo en el cual aumenta la susceptibilidad de las espigas a una infección por *Fusarium* (Xu, 2003), aunque también se puede producir cuando existen heridas en el tejido vegetal (Munkvold *et al.*, 2003b). Durante la invasión de los tejidos vegetales, muchas especies pueden producir y secretar micotoxinas. Además algunas de estas se han descrito como factores de virulencia del hongo, como por ejemplo los tricotecenos en trigo (Proctor *et al.*, 2002).

En el trigo y otros cereales de grano pequeño como la cebada, la avena o el centeno, entre otros, se produce la conocida "fusariosis de la espiga" o "golpe blanco" ("*Fusarium Head Blight*", FHB). Esta enfermedad afecta a los granos o a la espiga entera causando una costra sobre el lugar de colonización. La especie más importante que la produce es *F. graminearum*, aunque recientemente se han descrito otras que también causan esta enfermedad y que forman parte del complejo de especies *Fusarium graminearum* (Starkey *et al.*, 2007). Además se pueden encontrar *F. culmorum* y *F. poae*. Debido a que estas especies producen micotoxinas, nos podremos encontrar en el cereal contaminado zearalenona (ZEA), tricotecenos tipo B como deoxinivalenol (DON) y nivalenol (NIV) o de tipo A como la toxina T-2 o HT-2 y derivados de ellos (Logrieco *et al.*, 2003).

La enfermedad que producen en el maíz se denomina "fusariosis de la mazorca" ("*Maize Ear Rot*"). En función de las especies de *Fusarium* que colonicen el cereal, puede denominarse como "fusariosis roja o rosa". En el caso de la "fusariosis roja", las especies que están presentes en el maíz principalmente son *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. avenaceum* y *F. subglutinans*. Debido a la presencia de estas especies el perfil toxígeno contendrá ZEA, DON, NIV e incluso moniliformina (MON). Cuando a la enfermedad se la denomina "fusariosis rosa", es por la presencia de otras especies tales como, *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans*. Las toxinas más importantes detectadas el maíz infectado con estas especies son las fumonisinas, siendo la más abundante la FB₁, aunque también hay incidencia de otras como MON, beauvericina (BEA), o fusaproliferina (FUP). Las especies *F. verticillioides*, *F. graminearum* y *F. culmorum*, también pueden producir la "fusariosis del tallo" ("*Stalk rot of maize*"), por tanto las micotoxinas asociadas a esta enfermedad serán ZEA, DON y fumonisinas.

La severidad de la enfermedad y la incidencia de las especies de *Fusarium* puede variar de un año a otro en la misma región, o entre regiones diferentes en un mismo año, dependiendo de las condiciones climáticas (temperatura y actividad de agua, entre otras), las prácticas agrícolas (rotación de cultivos, el uso de fertilizantes, etc), el genotipo del hospedador e incluso el daño que pueden causar los insectos sobre el

material vegetal. El conocimiento de los factores ambientales (temperatura y actividad de agua) que favorecen la infección en un determinado cereal, por unas determinadas especies fúngicas que o bien coexisten o bien se suceden rápidamente en el tiempo, y el posterior desarrollo de la enfermedad, es esencial para evaluar el riesgo potencial de contaminación fúngica y de producción de las toxinas. Por otra parte, la identificación correcta de cada una de las especies que forma el complejo contaminante, es necesaria para determinar de manera precisa el riesgo potencial de encontrar una serie de toxinas concretas. Esta información es fundamental para el desarrollo de estrategias de control y prevención de estos hongos.

1.2 TOXINAS PRODUCIDAS POR *Fusarium*

Las micotoxinas son productos naturales de bajo peso molecular con elevada diversidad estructural. Son producidas como consecuencia del metabolismo secundario de hongos filamentosos que pueden crecer sobre diversos tipos de vegetales, como los cereales. Por ello, pueden estar presentes en materias primas, productos derivados de ellas y en productos almacenados. La ingestión de alimentos contaminados con micotoxinas puede ocasionar una micotoxicosis que puede llegar a ser grave aguda o crónica en animales o en el ser humano. Su toxicidad es muy variada, dependiendo de la toxina, y puede afectar al sistema nervioso central, a los sistemas cardiovascular, pulmonar y el tracto digestivo (riñones e hígado). Además, algunas también pueden actuar como agentes cancerígenos, mutagénicos, teratógenos e inmunodepresores (Bennett y Klich, 2003).

Por ello, la presencia de micotoxinas en niveles muy superiores a los tolerables representa un riesgo importante para la salud. No obstante, la posible toxicidad crónica de muchas micotoxinas (aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas o zearalenona) en bajas dosis suele suscitar mayor preocupación que la toxicidad aguda (Galán y Rodríguez, 2003). En la actualidad, raramente se registran casos de micotoxicosis agudas en humanos por el consumo de alimentos contaminados con niveles altos de micotoxinas, excepto en algunos países en vías de desarrollo (Wagacha y

Muthomi, 2008). El Comité Mixto FAO/WHO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/Organización Mundial de la Salud) de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) ha evaluado los efectos tóxicos de diversas micotoxinas, considerando que el riesgo de intoxicación aguda es entre moderado y bajo en comparación con otras familias de compuestos de origen microbiológico. Sin embargo, según el organismo de Naciones Unidas, el riesgo se incrementa cuando se habla de efectos crónicos (WHO, 2002).

La introducción de la Ley General de Alimentos en 2002 (Parlamento Europeo, 2002) fue un paso importante en la evolución hacia el Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Semillas (RASFF: "*Rapid Alert System for Food and Feed*"), tal y como existe en la actualidad. Este sistema implica un intercambio rápido de información entre las autoridades competentes de los estados miembros de la Unión Europea y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA: "*European Food Safety Authority*"). La EFSA fue creada en 2002 para desarrollar valoraciones de riesgos en el suministro de alimentos y semillas, entre otras tareas (Parlamento Europeo, 2002). En los informes anuales que elabora el RASFF desde 2002, las micotoxinas suponen generalmente la categoría de riesgo con mayor número de notificaciones, en torno a un 40% del total. Así por ejemplo, en su último informe se produjeron un total de 1433 notificaciones de productos que fueron rechazados por los países que forman parte de la Unión Europea, de las cuales 802 estaban relacionadas con riesgos por micotoxinas, lo que representa un porcentaje del 56% (RASFF, 2008).

Las micotoxinas son objeto de interés mundial debido a las importantes pérdidas económicas que conllevan sus efectos sobre la salud de las personas, la productividad de los animales y el comercio nacional e internacional. Se ha estimado que hasta un 25% de los cultivos alimentarios mundiales están contaminados con micotoxinas (WHO, 1999). En los países en desarrollo, donde los alimentos básicos (como los cereales) son susceptibles de contaminación, la población humana y la ganadería se ve afectada de forma significativa por la morbilidad y las muertes prematuras relacionadas con las micotoxinas (Wagacha y Muthomi, 2008).

Las especies más importantes productoras de toxinas son *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. En el caso de *Fusarium*, esencialmente patógeno de campo, las micotoxinas son sintetizadas principalmente durante la infección de la planta, y en el caso de los cereales, se pueden acumular en el grano. Las especies de este género contaminantes de estos vegetales son capaces de producir una gran variedad de micotoxinas. El perfil micotoxígeno puede variar a nivel inter e intra-específico y a menudo incluye un amplio rango de micotoxinas. Las fumonisinas y los tricotecenos son las micotoxinas más frecuentes y tóxicas producidas por *Fusarium*, aunque son capaces de producir otras importantes como son la zearalenona, las eniانتinas, la moniliformina y la fusaproliferina.

En los últimos años, la toxicología de *Fusarium* ha entrado en la "era de la genómica". Se ha secuenciado el genoma haploide completo de dos de las especies toxígenas más importantes: *F. graminearum* (con un tamaño de genoma aproximado de 36 Mb, formando 4 cromosomas) y *F. verticillioides* (con 46 Mb en 12 cromosomas) en el 2003 y en el 2006, respectivamente (Brown *et al.*, 2006). Además, para ambas especies existen diferentes bases de datos (Brown *et al.*, 2006) que proporcionan, entre otros, información sobre las secuencias de algunos de los genes principales en la ruta de síntesis de algunas de estas micotoxinas (Desjardins y Proctor, 2007). De manera general, estos genes se encuentran agrupados en una misma región cromosómica, conocida con el nombre de "cluster", aunque no todos están formado parte de él. Existen diferentes métodos moleculares basados en estos genes y en sus homólogos (en especies en las que aún no se ha secuenciado completamente su genoma). Uno de ellos es la RT-PCR a tiempo real específica para especies de *Fusarium*. López-Errasquín *et al.* (2007) demostró la existencia de correlación positiva entre la cantidad de fumonisina producida en *F. verticillioides* con los niveles de expresión del gen *FUM1*, mediante RT-PCR a tiempo real, mientras que Doohan *et al.* (1999) demostró la correlación positiva que existe entre los niveles de expresión del gen *TRI5* y la cantidad de DON detectada sobre trigo, analizada mediante RT-PCR. Por tanto, esta técnica permite estudiar los

niveles de expresión de los genes principales en la ruta de las toxinas, y así analizar la capacidad productora de una especie. Por otro lado, se están llevando a cabo análisis que permiten el estudio simultáneo de los genes usando DNA o cDNA con microarrays, para así demostrar y comparar la expresión diferencial de los que están involucrados en un determinado proceso biológico, como en la síntesis de una toxina determinada (Brown *et al.*, 2008).

El objetivo fundamental que se persigue con el estudio de estas rutas metabólicas es reducir la contaminación de micotoxinas en cereales. Así, conociendo los genes principales biosintéticos y usando las herramientas moleculares disponibles actualmente, se puede estudiar la regulación de estos en relación a factores ambientales (por ejemplo, temperatura y estrés hídrico). El conocimiento de esto nos proporciona información sobre el riesgo de contaminación de los cereales y nos permite establecer estrategias de control y prevención sobre las micotoxinas (Brul *et al.*, 2006).

1.2.1 Fumonisin

Las fumonisin fueron descritas por primera vez por Gelderblom y Bezuidenhout en el año 1988, mientras estudiaban la asociación del cáncer esofágico en humanos y el consumo de maíz contaminado con *F. verticillioides* (Bezuidenhout *et al.*, 1988; Gelderblom *et al.*, 1988). Las fumonisin son producidas por algunas especies del género *Fusarium*. Concretamente por especies pertenecientes al antes desconocido complejo de especies *Gibberella fujikuroi* (Nelson, 1992; Desjardins *et al.*, 1997; Flaherty *et al.*, 2003), como *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, que se consideran los principales patógenos del maíz (Logrieco *et al.*, 2002) y los principales productores de fumonisin (Creppy, 2002).

El *cluster* de genes necesarios para su biosíntesis puede estar completo, parcialmente o completamente delecionado en el complejo de especies *Gibberella fujikuroi*. Esto implica que especies filogenéticamente próximas difieran en su capacidad para la producción de fumonisin (González-Jaén *et al.*, 2004; Proctor *et al.*, 2004). Diversos aislamientos de

F. verticillioides asociados a banana y que forman un grupo filogenéticamente separado, no poseen los genes necesarios para la síntesis sugiriendo una delección parcial del *cluster* de fumonisinas e incluso una nueva especie filogenética de *Fusarium* (González-Jaén *et al.*, 2004; Mirete *et al.*, 2004). Otras especies de este complejo, próximas filogenéticamente a *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, como *F. fujikuroi* y *F. nygamai*, poseen los genes del *cluster*, sugiriendo que ambas especies podrían producir fumonisinas (González-Jaén *et al.*, 2004; Waalwijk *et al.*, 2004a). Por otro lado, recientes estudios han descrito la producción de fumonisinas por otras especies como *F. oxysporum* (Proctor *et al.*, 2008) o incluso *A. niger* (Frisvad *et al.*, 2007; Noonim *et al.*, 2009), sugiriendo la existencia de este *cluster* de genes en otras especies de este género o en otros géneros de ascomicetos.

La incidencia de las fumonisinas en maíz y otros productos básicos de la dieta o en productos derivados de ellas (Creppy, 2002), se ha convertido en una importante inquietud para la salud de animales y humanos en todo el mundo (Wang *et al.*, 2006), ya que son responsables de enfermedades graves agudas y crónicas. Son el agente causal de la leucoencefalomalacia (ELEM) en caballos (Marasas *et al.*, 1988, 2001), edema pulmonar (PES) en cerdos (Harrison *et al.*, 1990), y son hepatotóxicas y hepatocarcinogénicas en ratas (Nelson *et al.*, 1993; Gelderblom *et al.*, 2001). Aunque no existe una evidencia directa de las consecuencias de las fumonisinas sobre la salud humana (Shephard *et al.*, 1996), varios estudios han demostrado que estas micotoxinas están asociadas con una alta incidencia de cáncer esofágico en Sudáfrica (Rheeder *et al.*, 1992; Marasas *et al.*, 2001), China (Chu y Li, 1994), Italia (Franceschi *et al.*, 1990) e Irán (Shephard *et al.*, 2000).

En 2002, el Comité Mixto FAO/WHO de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) hizo público de manera provisional los valores de ingesta diaria máxima tolerable provisional (PMTDI) de 2 mg/Kg peso corporal para las fumonisinas (WHO, 2002). En 2003, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, 2002) clasificó las fumonisinas como carcinógenos del grupo 2B (posibles carcinógenos humanos). La Unión Europea ha legislado sobre los contenidos máximos

permitidos para esta toxina en maíz y alimentos derivados (Comisión Europea, 2007). Por ejemplo, han establecido una cantidad de 4 ppm de fumonisinas en el maíz no elaborado (con la excepción del maíz destinado para molienda húmeda).

Estructura química de las fumonisinas

Las fumonisinas son aminopolioles cuya estructura principal consiste en una cadena lineal de 20 átomos de carbono, la cual tiene un grupo amino en el carbono 2, junto con grupos metilo, hidroxilo y ácido tricarbónico en diferentes posiciones a lo largo del esqueleto carbonado (Proctor *et al.*, 2003) (Figura 5A). Según los grupos químicos presentes a lo largo de la cadena lineal, las fumonisinas se pueden clasificar en cuatro series: fumonisinas A, B, C y P (Musser y Plattner, 1997; Rheeder *et al.*, 2002). Las fumonisinas de la serie B son las más abundantes en maíz contaminado de manera natural (Nelson *et al.*, 1993) y en función de la presencia o ausencia de grupos hidroxilo en los carbonos 5 y 10 se distinguen los cuatro tipos (FB₁, FB₂, FB₃ y FB₄) (Proctor *et al.*, 2003) (Figura 5A). La fumonisina más importante es la FB₁, ya que puede constituir hasta un 70 % de todas las fumonisinas presentes en los alimentos (Nelson *et al.*, 1993). Las otras fumonisinas de la serie B, aparecen en niveles más bajos, suponiendo que la FB₂ y la FB₃ constituyen un 10 y un 20 % del contenido total de fumonisinas, respectivamente (Musser y Plattner, 1997).

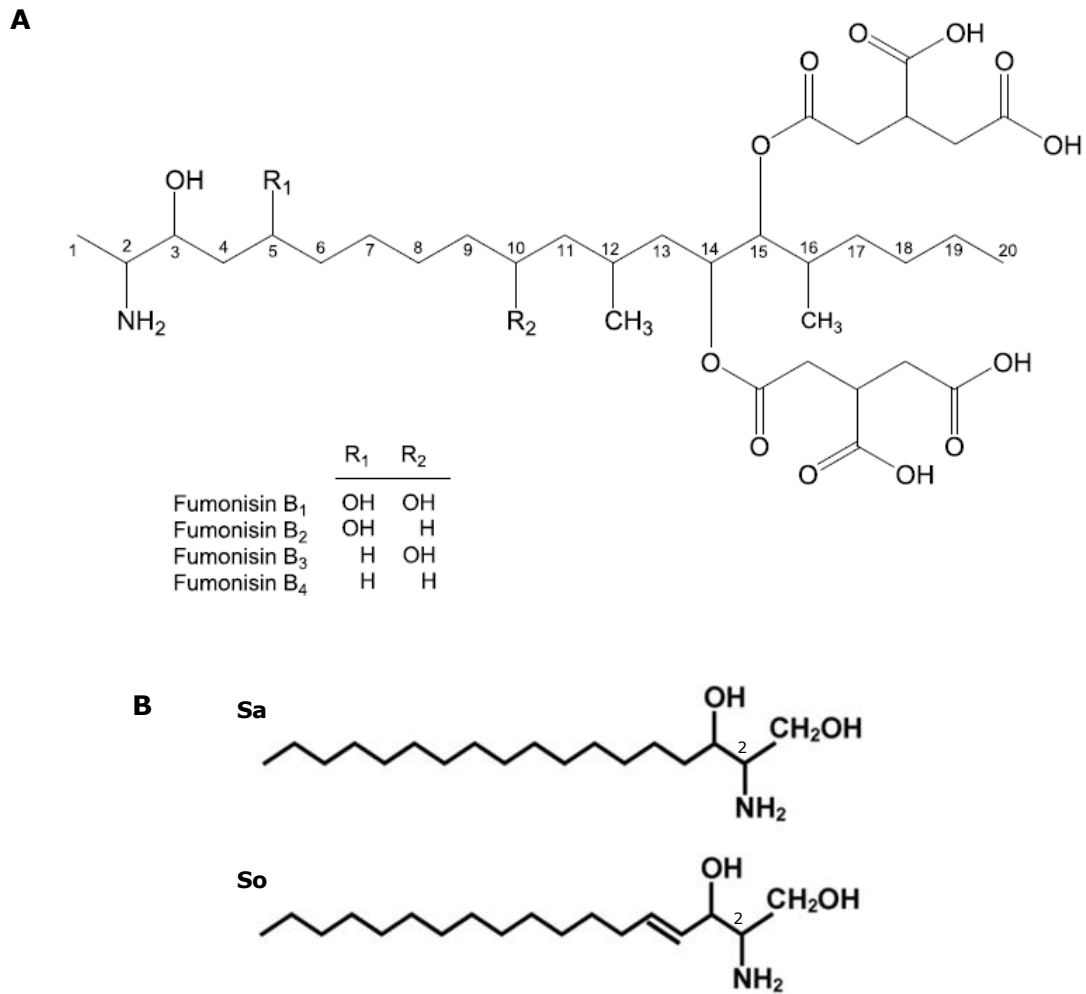


Figura 5: Estructura química de las fumonisinas de la serie B (A). R1 y R2 indican los diferentes radicales que pueden ocupar los carbonos 5 y 10 en los cuatro tipos de fumonisinas de la serie B. Tomado de Proctor *et al.* (2003). La estructura de las fumonisinas es similar a la esfinganina (Sa) y la esfingosina (So) (B). Adaptado de Voss *et al.* (2007).

La estructura química de FB₁ en particular, y de las fumonisinas en general, es muy similar a la esfinganina y a la esfingosina (Figura 5B), que son intermediarios derivados de los ácidos grasos en el metabolismo de los esfingolípidos (Merrill *et al.*, 2001; Riley *et al.*, 2001). Por tanto, la toxicidad de las fumonisinas se atribuye a la interrupción de la ruta de síntesis de los esfingolípidos (Merrill *et al.*, 2001), mediada por la inhibición de la enzima

ceramida sintética (Wang *et al.*, 1991; Norred *et al.*, 1992). Esto conduce a la acumulación de ambos intermediarios de la ruta y a una disminución de las ceramidas, lo que provoca fragmentaciones en el DNA, disminución en la viabilidad y pérdida de la regulación en la diferenciación y apoptosis (Tolleson *et al.*, 1999). La apoptosis junto con la inducción de las respuestas de defensa típicas de las interacciones entre planta y patógeno (Asai *et al.*, 2000), se ha observado en plantas (*Arabidopsis*) cuando se las trataban con fumonisin FB₁. El papel de las fumonisinas en la patogénesis del maíz es controvertido. Sin embargo recientes estudios sugieren que la producción de fumonisinas en *F. verticillioides* es necesaria para el desarrollo de la enfermedad en el maíz (Glenn *et al.*, 2008).

Biosíntesis de las fumonisinas

Los genes relacionados con la síntesis de las fumonisinas se encuentran juntos organizados en un *cluster* que ha sido cartografiado y que consta de 42 kilobases (Desjardins y Proctor, 2007). La síntesis de las fumonisinas comienza con la formación de la cadena lineal desde el carbono 3 al 20 (Proctor *et al.*, 1999), a partir de un derivado del acetato. Este paso está catalizado por la enzima poliketido sintasa (PKS), codificada por el gen *FUM1*. Los genes *FUM2* y *FUM3* confieren la capacidad de hidroxilar la cadena de la molécula en las posiciones C-10 y C-5, respectivamente (Desjardins *et al.*, 1996a). Las fumonisinas FB₁, FB₂ y FB₃ se sintetizan, por tanto, a partir de un precursor menos hidroxilado, y con la participación de diferentes enzimas codificadas por los diferentes genes (Figura 6).

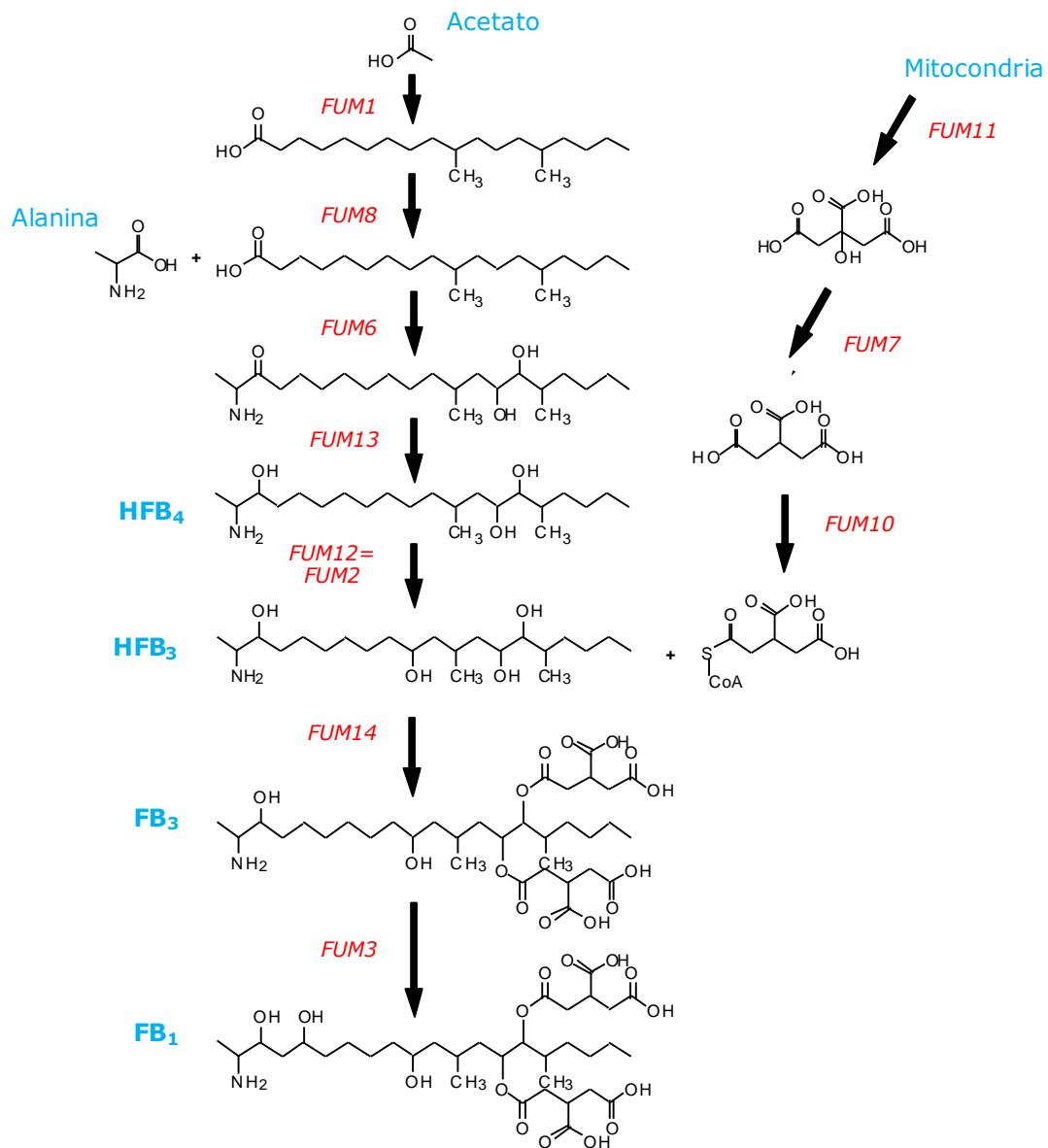


Figura 6: Modelo propuesto para la ruta de síntesis de fumonisinas. Adaptado de Proctor *et al.* (2003).

Se han ido describiendo diferentes genes (*FUM5*, *FUM6*, *FUM7*, *FUM8* y *FUM9*), en los que también se ha demostrado una correlación entre su expresión y la síntesis de fumonisinas (Seo *et al.*, 2001). Actualmente, el *FUM5* parece corresponder en realidad al gen *FUM1* (Proctor *et al.*, 2003), el

FUM9 al *FUM3*, y el *FUM12* al *FUM2* (Butchko *et al.*, 2003). Posteriormente se describieron 10 genes más (*FUM10-FUM19*), localizados en el mismo *cluster* (Proctor *et al.*, 2003). Uno de ellos, el gen *FUM19*, estaría relacionado con el transporte de las fumonisinas fuera de la célula (Proctor *et al.*, 2003). Además, en estudios previos se han descrito varios genes (*PAC1*, *FCC1* y *ZFR1*) que estarían implicados en la regulación de la síntesis de fumonisinas, y residirían fuera del *cluster* (Flaherty *et al.*, 2003; Shim *et al.*, 2003; Flaherty y Woloshuck, 2004)

El gen *FUM1* fue el primer gen descrito relacionado con la biosíntesis de fumonisinas en *F. verticillioides*. Codifica para una poliketido sintasa que, como ya hemos comentado anteriormente, cataliza el primer paso de la ruta de síntesis de estas micotoxinas (Proctor *et al.*, 1999). Las PKSs están presentes en hongos, bacterias y plantas produciendo metabolitos secundarios tan variados como pigmentos, micotoxinas, factores de virulencia o antibióticos.

Se ha descrito que la poliketido sintasa que codifica el gen *FUM1* (que tiene una región codificadora de 7,8 Kb, con seis exones y cinco intrones) tiene 7 dominios catalíticos, que se encuentran en el mismo polipéptido (Figura 7). Estos dominios son el β -ketoacil sintasa (KS), acil-transferasa (AT), deshidratasa (DH), metil transferasa (MT), enoil reductasa (ER), β -ketoacil reductasa (KR), y proteína transportadora de grupos acil (ACP) (Proctor *et al.*, 1999; Linnemannstöns *et al.*, 2002; Desjardins y Proctor, 2007). Al interrumpir este gen se observó que no se producían fumonisinas. Por tanto, es el gen principal de la ruta de biosíntesis de esta toxina, que se usa para estudios de expresión, mediante técnicas moleculares como la RT-PCR a tiempo real.

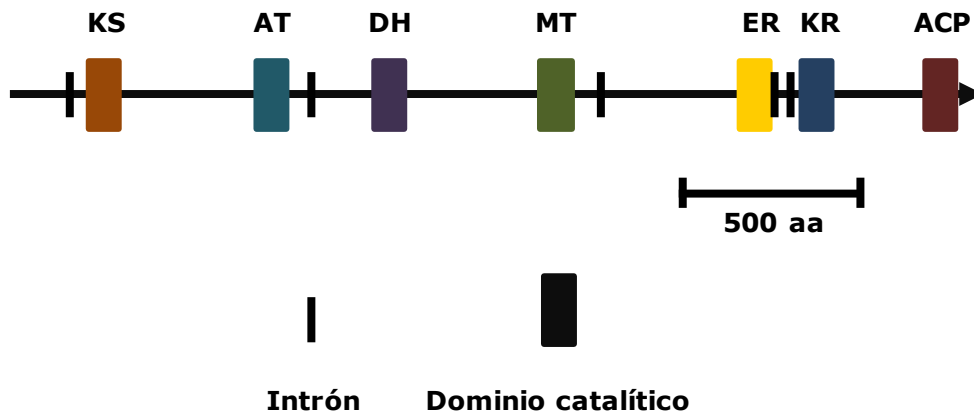


Figura 7: Organización de los dominios catalíticos en el gen *FUM1*. Adaptado de Linnemannstöns *et al.* (2002). Los dominios están definidos por las siguientes siglas: "RS": β -ketoacil sintasa, "AT": Acil-transferasa, "DH": Dehidratasa, "MT": Metil transferasa, "ER": Enoil reductasa, "KR": β -ketoacil reductasa y "ACP": Proteína transportadora de grupos acil.

1.2.2 Tricotecenos

Los tricotecenos constituyen una familia de micotoxinas formada por más de 60 metabolitos sesquiterpenoides producidos por diversos géneros fúngicos, tales como *Fusarium*, *Myrothecium*, *Phomopsis*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, entre otros (Cole y Cox, 1981; Scott, 1989; Smith *et al.*, 1994).

Las especies de *Fusarium* productoras de tricotecenos, como se ha descrito anteriormente, contaminan principalmente cereales de grano pequeño, como el trigo o la cebada, o el maíz. La ingestión de estos cereales contaminados con tricotecenos, ha causado importantes enfermedades en el hombre como el Akakabi en Japón (también conocida como "red mold disease" o "enfermedad del moho rojo") (Bennet y Klich, 2003) o la Aleucia Tóxica Alimentaria (ATA). Esta enfermedad se caracteriza por una fase inicial donde se produce una irritación intestinal que causa vómito y diarrea, seguido de leucemia y anemia y posteriormente puede llevar a la muerte (Foroud y Eudes, 2009). Los primeros documentos sobre

el brote de ATA aparecen en Siberia en 1913, aunque en 1730 los mismos síntomas de ATA estaban relacionados con una enfermedad epidémica en New Hampshire (Stack, 2003). El brote más importante de ATA sucedió durante la Segunda Guerra Mundial en Rusia, el cual afectó a miles de personas (Bennet y Klich, 2003). El aspecto más polémico de los tricotecenos se relaciona con su uso como arma biológica por la Unión Soviética en el sudeste asiático a principios de la década de los 80, en una mezcla que contenía deoxinivalenol, nivalenol y toxina T-2 y a la que se le dio el nombre de "lluvia amarilla" (Marshall, 1982).

Los animales también presentan una alta sensibilidad a los tricotecenos. Todas las especies de animales de interés zootécnico que han sido sometidos a tests de sensibilidad a tricotecenos han dado resultados positivos, a pesar de que la sintomatología varía según la especie de animal y el tipo de tricoteceno. Los cerdos son los animales más sensibles seguidos de las aves y por último los rumiantes (Eriksen y Peterson, 2004).

Según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), los efectos de los tricotecenos pueden ser crónicos o agudos e incluyen inflamación de la piel, desórdenes digestivos, taquicardia, edemas y hemorragias severas en órganos internos, desórdenes nervioso e inmunodepresión (IARC, 1993). Actualmente solo están legislados algunos de los tricotecenos más importantes, concretamente el DON y las toxinas T-2 y HT-2. La legislación establece un contenido máximo de 1,25 ppm de DON en cereales que no sean ni trigo duro, avena y maíz y 1,75 ppm de DON en trigo duro, avena y maíz (salvo el utilizado para molienda húmeda) (Comisión Europea, 2007). Los límites para las toxinas T-2 o HT-2 son provisionalmente de $6 \cdot 10^{-5}$ ppm, aunque aún están por legislar (Comisión Europea, 2006).

Estructura química de los tricotecenos

Los tricotecenos son un complejo grupo de sesquiterpenoides químicamente relacionados, que comparten un núcleo tricíclico llamado tricodieno caracterizado por un doble enlace en la posición 9, 10 y un grupo epóxido entre los carbonos 12 y 13 (Figura 8A), responsable de su toxicidad

(Desjardins *et al.*, 2003). Su gran diversidad estructural se debe a que existen cinco posiciones en el tricodieno que pueden albergar grupos hidroxilo o acetilo (Figura 8B) (Foroud y Eudes, 2009).

Existen cuatro tipos de tricotecenos que son producidos por especies fúngicas, tricotecenos tipo A, B, C y D, en base a la similitud de sus grupos funcionales y a sus hospedadores (Ueno, 1987; Osweiler, 2000; Krska *et al.*, 2001). Los tricotecenos producidos por especies de *Fusarium* pertenecen al tipo A y B. Los tricotecenos tipo A se caracterizan por la ausencia de un grupo ceto en el carbono 8 (Mirocha *et al.*, 2003). Están representados principalmente por la toxina T-2 y la toxina HT-2. Las principales especies productoras de los tricotecenos tipo A, son *F. sporotrichioides* y *F. poae* (Liddell, 2003), aunque también están descritas otras como *F. sambucinum* o *F. acuminatum* (Bottalico y Perrone, 2002; Moss y Thrane, 2004). Los tricotecenos tipo B poseen un grupo ceto en el carbono 8 (Mirocha *et al.*, 2003). Los más importantes son el deoxinivalenol, también conocida por vomitoxina (DON) y el nivalenol (NIV), junto con sus derivados. Las principales especies productoras son *F. graminearum* y *F. culmorum* (Liddell, 2003), aunque también los pueden producir otras especies como *F. equiseti*, *F. cerealis* o *F. pseudograminearum* (Bottalico y Perrone, 2002; Moss y Thrane, 2004). La toxicidad de los tricotecenos varía en función de su diversidad química, siendo los del tipo A más tóxicos que los del tipo B (Visconti *et al.*, 1991). Y en el grupo B, DON es más frecuente que NIV aunque menos tóxico (Eudes *et al.*, 2001).

Su toxicidad se debe a que son potentes inhibidores de la síntesis proteica en eucariotas (Brown *et al.*, 2001), al unirse al ribosoma e inhibir la actividad peptidil-transferasa (Bennet y Klich, 2003). Los síntomas relacionados con una micotoxicosis producida por la toxina T-2 serían gastrointestinales, dermatológicos y neurológicos (Trenholm *et al.*, 1989), mientras que los producidos por DON serían náuseas, vómitos y diarrea que causan la pérdida de masa corporal (Bennet y Klich, 2003). Además los tricotecenos están considerados como factores de virulencia, dependiendo

del hospedador, y favoreciendo la infección de la planta por *Fusarium* (Kang y Buchenauer, 2002; Proctor *et al.*, 2002).

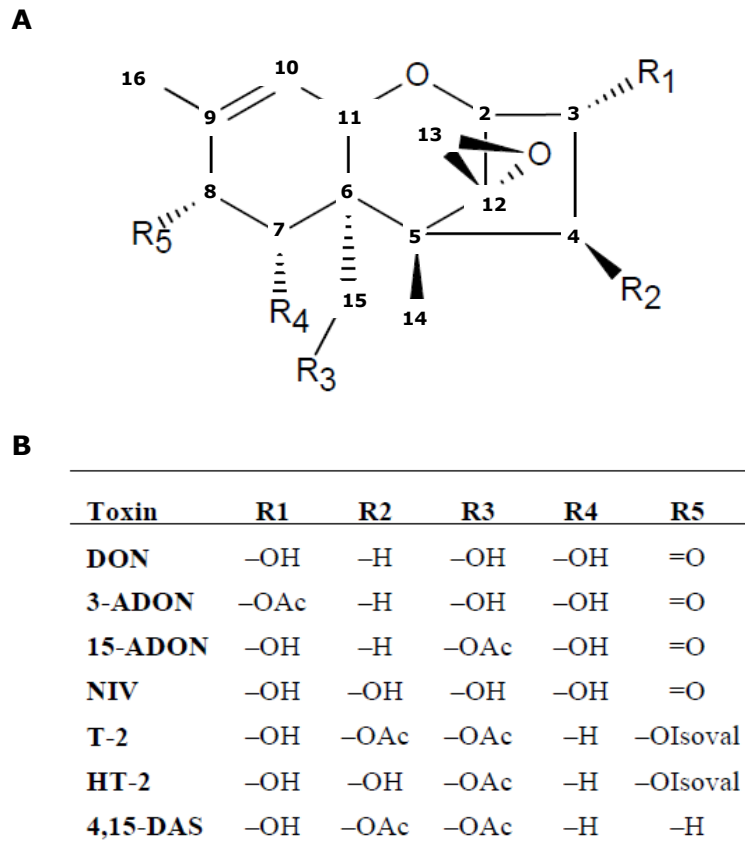


Figura 8: Estructura química general de los tricotecenos tipo A y B (A). Los ejemplos de tipo A incluyen la toxina T-2 (T-2), la toxina HT-2 (HT-2) y 4,15-diacetoxyscirpenol (4,15-DAS). Los ejemplos de tricotecenos tipo B incluyen nivalenol (NIV), 4-deoxinivalenol (DON), 3-O-acetil DON (3-ADON) y 15-O-acetil DON (15-ADON). OAc= grupo acetilo, OIsoval= grupo ceto (B). Adaptado de Foroud y Eudes (2009).

Biosíntesis de los tricotecenos

La síntesis de los tricotecenos comienza con la ciclación del farnesil pirofosfato hasta tricodieno (Figura 9). Este paso está catalizado por la enzima tricodieno sintasa que está codificada por el gen *TR15* (Hohn y

Vanmiddlesworth, 1986; Desjardins *et al.*, 1993; Proctor *et al.*, 1995). Una citocromo P450 monooxigenasa con carácter multifuncional, codificada por el gen *TRI4*, cataliza los siguientes 4 pasos (hidroxilaciones y epoxidaciones en diferentes posiciones) (McCormick *et al.*, 2006), dando lugar al isotricotriol. Tras dos isomerizaciones no enzimáticas y una ciclación, se forma el isotricodermol, que forma el esqueleto de la estructura del tricoteceno. Posteriormente es acetilado y hidroxilado por las enzimas que codifican los genes *TRI101* y *TRI11*, respectivamente, dando lugar a la 15-decalonectrina (Alexander *et al.*, 1998). Este intermediario puede ser sustrato para producir DON (tras una hidroxilación y la adición del grupo ceto) o tras una acetilación puede dar lugar a la calonectrina (McCormick *et al.*, 1996).

La calonectrina es el sustrato para la formación de NIV y DON, además del 3,15 diacetildeoxinivalenol (3,15-ADON), 15-acetildeoxinivalenol (15-ADON) y 4-acetilnivalenol (4-ANIV). La expresión de los genes *TRI7* y *TRI13* es necesaria para la producción de NIV, la ausencia de funcionalidad de estos genes da lugar a la producción de DON (Lee *et al.*, 2002; Desjardins, 2008). Esto confiere una variabilidad a nivel intraespecífico, ya que especies como *F. culmorum* o *F. graminearum* pueden ser o bien quimiotipo NIV o quimiotipo DON (Chandler *et al.*, 2003). NIV se produce directamente a partir de DON o por medio de la conversión de la calonectrina a 3,15-diacetoxiscirpenol (3,15-DAS), tras añadir un grupo ceto en el carbono 8. Se ha descrito que existe la posibilidad que una cepa produzca tanto NIV como DON simultáneamente (Llorens *et al.*, 2004a). El compuesto 3,15-DAS puede ser también el sustrato que catalicen otras enzimas para dar lugar a los tricotecenos de tipo A (Toxina T-2 y HT-2) en las especies productoras de estos (Brown *et al.*, 2001).

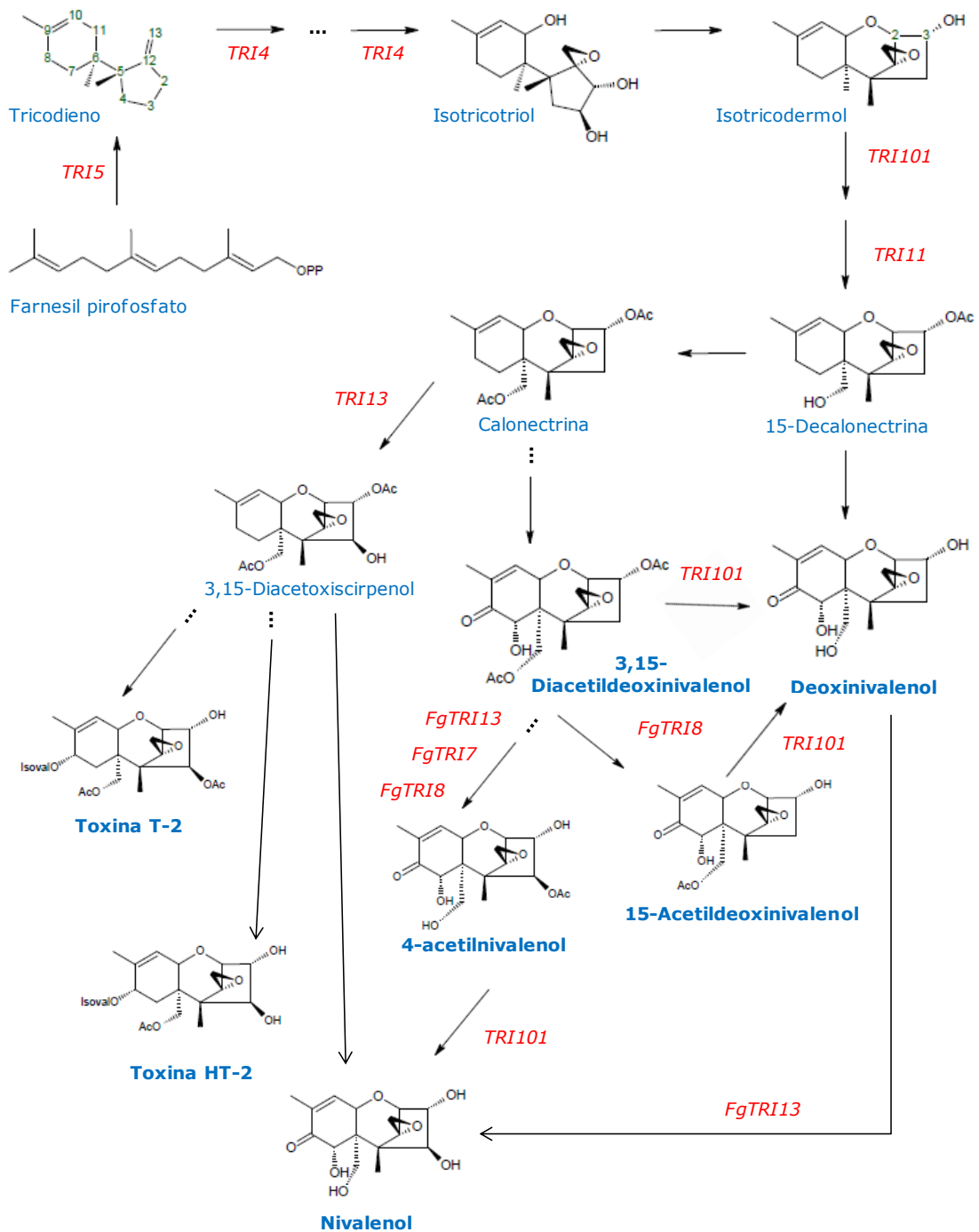


Figura 9: Esquema de la ruta de síntesis de los tricotecenos. Las flechas se corresponden con los pasos de la síntesis y los puntos suspensivos con otros pasos intermedios. En la mayoría de los casos se señala el gen responsable de ese paso. Fg: se designa a los genes que intervienen en la ruta de *F. graminearum*. OAc: acetilo, IsovalO: ceto. El diagrama ha sido adaptado de Foroud y Eudes (2009).

Además de los genes biosintéticos que intervienen en la ruta, existen otros genes que son necesarios que se expresen para llevar a cabo la producción de los tricotecenos. Estos genes pueden codificar para proteínas relacionadas con la expulsión de los tricotecenos fuera de la célula (Brown *et al.*, 2004) o pueden ser genes reguladores (*TRI6* y *TRI10*). Al menos 12 de los genes de la ruta de síntesis de los tricotecenos se encuentra agrupados en un *cluster* de 25 Kb, y es necesaria la expresión de 10 de ellos para la producción de la toxina. Existen otros 4 genes fuera del *cluster*. La interrupción de los genes *TRI5*, *TRI6* o *TRI10*, da lugar a la reducción completa de la producción de los tricotecenos (Desjardins y Proctor, 2007). Estudios previos han descrito la correlación positiva que existe entre la expresión de *TRI5* con la cantidad de DON producido mediante RT-PCR (Doohan *et al.*, 1999).

La especie característica utilizada para dilucidar la síntesis de los tricotecenos tipo A fue *F. sporotrichioides*, mientras que para los de tipo B fue *F. graminearum* (Brown *et al.*, 2001; Kimura *et al.*, 2003).

1.2.3 Otras toxinas producidas por *Fusarium*

Zearalenona

La zearalenona (ZEA) es una micotoxina que fue aislada por primera vez del maíz contaminado por *F. graminearum* (Stob *et al.*, 1962), siendo Urry *et al.* (1966) los que la describieron como tal. La zearalenona es una micotoxina no esteroidea, con actividad estrogénica. Son producidas por varias especies del género *Fusarium*, como *F. graminearum*, *F. culmorum* (especies más relevantes), y *F. equiseti* y *F. crookwellense*, cómo especies de menor importancia (Bennet y Klinch, 2003). Estas especies contaminan los cereales de grano pequeño, como el trigo y la cebada o el maíz, en todo el mundo, variando su incidencia y niveles de contaminación en estrecha dependencia con los factores ambientales en el que se encuentra el hongo. Además, cómo se ha descrito anteriormente, *F. graminearum* y *F. culmorum* pueden sintetizar tricotecenos, por lo que se pueden presentar efectos sinérgicos (Placinta *et al.*, 1999).

La zearalenona es un macrólido que se describe como 6-(10-hidroxi-6-oxo-trans-1-undecenil)- β -ácido resorcíclico (Figura 10). Su toxicidad se debe a su actividad estrogénica, por su similitud con la estructura química del 17- β -estradiol y otros estrógenos. La ingestión de alimentos contaminados con ZEA en humanos no tiene asociado graves micotoxicosis. Solo a altas concentraciones y a muy pequeña escala, pueden producir efectos inmunosupresores en humanos (Berek *et al.*, 2001), o hiperplasia endometrial y adenocarcinomas (Creppy, 2002). Las micotoxicosis que se producen en animales tienen mayor gravedad, sobre todo en cerdos, aunque también afecta a rumiantes y aves. Producen una disminución de la fertilidad, abortos por reabsorción fetal, reducción del tamaño de la camada y disminución de la respuesta inmune (Creppy, 2002).

La Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer, ha catalogado a las zearalenonas como compuestos de limitada carcinogenicidad (IARC, 1993). La legislación europea establece unos límites máximos permitidos de 0,1; 0,075 y 0,35 ppm de zearalenona en cereales no elaborados (excepto maíz), harina de cereales (excepto maíz) y en maíz no elaborado, respectivamente (Comisión Europea, 2007).

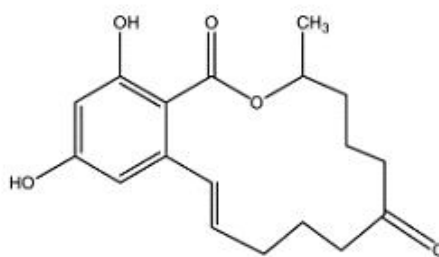


Figura 10: Estructura química de la zearalenona.

Eniانتinas

Las eniانتinas (ENs) están producidas por diversas especies del género *Fusarium*, entre las que destacan *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. poae*, *F. oxysporum*, *F. avenacium*, *F. sambucinum* y *F. tricinctum* (Bottalico y Perrone, 2002; Logrieco *et al.*, 2002; Nicholson *et al.*, 2004). Puesto que estas especies colonizan cereales, estas toxinas se pueden acumular en el grano. Sin embargo, aún no se las ha asociado a ningún brote o enfermedad animal trascendente vía natural.

Las eniانتinas son depsipéptidos hexacíclicos no ribosomales. En función de los grupos funcionales que pueden unirse a los residuos ácido N-metilamino se han aislado hasta 10 eniانتinas diferentes (Figura 11) (Uhlige e Ivanova, 2004). La más importante de todas es la beauvericina (BEA), por aislarse predominantemente de trigo (Bottalico y Perrone, 2002; Logrieco *et al.*, 2002).

Su toxicidad es leve o moderada y se debe a que producen un aumento de la permeabilidad de las membranas a los iones. Además son desacopladores de la fosforilación oxidativa (Hornbogen *et al.*, 2002). Concretamente, la beauvericina es altamente tóxica en células de mamífero, y se ha demostrado que son capaces de inducir la apoptosis en líneas celulares humanas y de ratón (Macchia *et al.*, 1995), e inhiben la contractibilidad del músculo liso en cerdos (Krska *et al.*, 1997). A pesar de ello, no existe ningún tipo de legislación que establezca límites máximos de existencia. Sin embargo, estudios recientes han descrito la incidencia natural de BEA y ENs en grandes cantidades cuando se produce la conocida "*Fusarium Head Blight*", FHB (Logrieco *et al.*, 2008). Esto junto con su potencial fitotoxicidad y zootoxicidad, contribuye a evaluar de nuevo la relación que existe entre la severidad de FHB y la presencia de estas toxinas sobre el cereal.

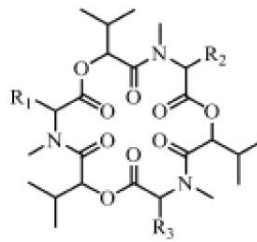


Figura 11: Estructura química del núcleo de las eniantinas y la beauvericina. Con los diferentes radicales que ocupan diferentes residuos ácido N-metilamino libres.

Moniliformina

La moniliformina es una micotoxina producida por *F. verticillioides* (Moretti *et al.*, 2004), *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. avenacium* y *F. tricinctum* (Bottalico y Perrone, 2002; Logrieco *et al.*, 2002). Por tanto la moniliformina, generalmente, se ha aislado de trigo y de maíz.

Su estructura química es de una sal sódica o potásica de 1-hidroxiciclobut-1-en-3,4-diona (Fotso *et al.*, 2002) (Figura 12). Su toxicidad consiste en la inhibición del sistema enzimático de la piruvato deshidrogenasa, y como consecuencia en la inhibición del ciclo de Krebs y por tanto, la respiración celular (Conkova *et al.*, 2003). Las manifestaciones tóxicas incluyen hipertrofia cardíaca y desordenes hematológicos (Logrieco *et al.*, 2002). Se ha descrito una alta mortalidad asociada al consumo de piensos contaminados con moniliformina en pollos (Conkova *et al.*, 2003). Y se ha descrito que es altamente tóxico para otros animales como patos, ratas, cerdos (Fotso *et al.*, 2002).

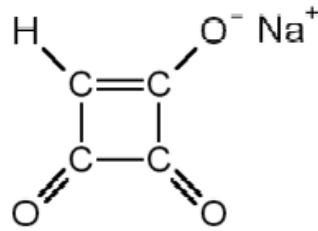


Figura 12: Estructura química de la moniliformina (sal sódica).

Fusaproliferina

La fusaproliferina es un terpeno que se aisló por primera vez en 1995 de un cultivo de *F. proliferatum* procedente de maíz del norte de Italia (Ritieni *et al.*, 1995). Posteriormente se comprobó que también podía ser sintetizado por *F. subglutinans* (Moretti *et al.*, 1997). La fusaproliferina es tóxica para linfocitos B humanos (Logrieco *et al.*, 1996) y causa efectos teratogénicos en embriones de pollo (Ritieni *et al.*, 1997).

Otras micotoxinas

Se han descrito otras micotoxinas producidas por *Fusarium*, como el butenilido, que es producido por *F. graminearum*, entre otros productores de tricotecenos. Es moderadamente tóxico frente a ratones, aunque también se ha descrito una enfermedad del ganado que se conoce con el nombre de “*fescue foot*” y se caracteriza por edemas y gangrena en las extremidades.

La equitesina es de particular interés debido a su actividad contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Se ha descrito que la producen *F. equiseti* y *F. semitectum*. También tiene una leve actividad contra bacterias gram positivas y moderada toxicidad frente a ratones.

Por último, la fusarina C que ha estado asociada con brotes epidémicos, a pesar de que nunca se ha llegado a esclarecer esta relación.

En determinadas condiciones es capaz de tener carácter mutagénico, aunque nunca derivado de la ingesta de alimentos contaminados con esta micotoxina. Las especies que la producen son *F. verticillioides* y *F. graminearum* (Desjardins y Proctor, 2007).

1.3 FACTORES QUE DETERMINAN EL DESARROLLO FÚNGICO Y LA PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS

La contaminación fúngica y la síntesis de micotoxinas, tanto en el campo como durante el almacenamiento de los productos agroalimentarios, es en gran parte dependiente de factores ecofisiológicos. Para el género *Fusarium*, los más importantes son la actividad de agua (a_w) (o potencial de agua total (Ψ_T), cuando hablamos de ecosistemas terrestres) y la temperatura (Doohan *et al.*, 2003), además del pH y la composición gaseosa de la atmósfera (niveles de oxígeno y dióxido de carbono). Existen otros factores que pueden influir en la proliferación fúngica, como la composición del sustrato (las condiciones físicas del grano), las interacciones microbianas o fúngicas, las interacciones con vectores invertebrados o el genotipo del hospedador (Magan y Lacey, 1984a, 1984b; Magan y Aldred, 2007).

Las condiciones ambientales que permiten el crecimiento fúngico en el campo, son difíciles de controlar. Sin embargo, estas condiciones sí pueden ser controladas tras la cosecha y durante el almacenamiento. El estudio de las mismas nos permite conocer las condiciones óptimas de crecimiento y de producción de toxinas. Por tanto, se podría predecir el riesgo potencial que tiene un determinado cultivo agrícola a estar contaminado con un determinado hongo o con su toxina. El conocimiento de esta información nos ayuda a poder desarrollar estrategias de control y prevención de estos hongos y sus toxinas sobre los cereales tanto en el campo como en su lugar de almacenamiento.

1.3.1 Actividad de agua (a_w) y potencial de agua total (Ψ_T)

La disponibilidad de agua es quizás uno de los factores más importantes y limitantes de la colonización fúngica de un determinado substrato y/u hospedador, y de la producción de las toxinas. Esto se debe a que el agua disponible determina la germinación de las esporas, la tasa de crecimiento y puede afectar a la regulación de la biosíntesis de las toxinas (Marín *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2004a, 2004b, 2006). De todos los microorganismos que pueden colonizar vegetales, los hongos filamentosos son los que pueden crecer con menor cantidad de agua disponible y en consecuencia son los principales causantes del deterioro de los mismos (Lacey y Magan, 1991).

La actividad de agua (a_w) se define desde el punto de vista microbiológico, como el agua libre de un substrato, en equilibrio con la humedad relativa ambiental, disponible para el crecimiento microbiano o fúngico. En ecosistemas terrestres, la actividad de agua se puede expresar como potencial de agua total (Ψ_T), definida como la fracción disponible del contenido de agua total, necesaria para el crecimiento microbiano o fúngico, medido en pascales. Y es la suma de tres factores: (i) potencial osmótico, debido a la presencia de iones y otros solutos, el agua fluirá desde una solución poco concentrada a una solución más concentrada, por ejemplo en el vegetal; (ii) potencial matricial, debido a las fuerzas que mantienen unidas las moléculas de agua a una matriz en espacios pequeños (fuerzas de capilaridad o tensión superficial), por ejemplo en el suelo; (iii) potencial de turgor, debido al balance del medio interno (célula microbiana o fúngica) y del medio externo (medio ambiente), el agua fluirá desde un sistema con presión alta hasta un sistema con baja presión. Ψ_T se relaciona con a_w mediante la siguiente fórmula: $\Psi_T: R T/V \ln a_w (+P)$, donde "R" es la constante universal de los gases ideales, "T" es la temperatura absoluta, "P" es la presión atmosférica y "V" es el volumen de un mol de agua (Palazzini *et al.*, 2009).

La actividad de agua mínima para el desarrollo de la mayoría de las especies fúngicas que colonizan los granos de cereal está alrededor de

0,70; siendo $a_w=1$ por definición, para el agua destilada. Sin embargo, las especies del género *Fusarium*, la germinación de las esporas se produce a partir de 0,88, mientras que el crecimiento se produce a partir de 0,90 de a_w (Marín *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2004a; Sanchis *et al.*, 2006; Palmero *et al.*, 2008). Una a_w del 0,70 puede ser consecuencia del estado de maduración del grano en formación en la planta, así como el resultado de la penetración de agua de lluvia o nieve en el grano, de un secado inadecuado antes del almacenamiento o de la migración de la humedad debido al gradiente de temperaturas en el interior del silo (Lacey, 1989).

Varios estudios han demostrado el efecto interactivo de la actividad de agua con otros factores ecofisiológicos como la temperatura, substrato y pH y su influencia en la tasa de crecimiento y en la producción de las micotoxinas asociadas usando técnicas cromatográficas como el HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), que detectan la toxina directamente o moleculares como las técnicas de RT-PCR a tiempo real, que detectan los niveles de expresión de los genes principales que intervienen en la ruta de síntesis de la toxina (Velluti *et al.*, 2000a; Llorens *et al.*, 2004a; Marín *et al.*, 2004; Mateo *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2006; Schmidt-Heydt *et al.*, 2008). Estos estudios ponen de manifiesto que la producción de micotoxinas ocurre dentro de un rango de a_w o Ψ_T concreto. Generalmente no coinciden los rangos de crecimiento fúngico y de germinación de las esporas. Además éstos pueden variar entre toxinas producidas por una misma especie o por diferentes especies (Lacey y Magan, 1991).

1.3.2 Temperatura

La temperatura es otro de los factores más importantes que afecta al crecimiento fúngico y a la producción de las toxinas. De la misma manera que éstos están afectados por la disponibilidad de agua, cada especie fúngica tiene una temperatura mínima, permisiva y óptima para su crecimiento (Lacey, 1989) y para la síntesis de las toxinas. Los hongos, en general, crecen en un amplio rango de temperaturas, que puede ir desde -4 °C hasta alcanzar temperaturas máximas de 60- 65 °C. La mayoría de los

hongos que colonizan cereales antes y durante la cosecha, crecen entre 0 y 35 °C (Lacey, 1989; Marín *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2006). El rango de producción de las toxinas difiere del de crecimiento y dependerá de cada especie fúngica.

La temperatura tiene una considerable influencia sobre la disponibilidad de agua, pues los requerimientos mínimos para el crecimiento fúngico y la producción de la toxina son distintos a diferentes temperaturas y en diferentes substratos. Cada factor por separado y su interacción tiene influencia sobre las especies fúngicas que están colonizando el cereal, pudiéndose establecer especies predominantes más tolerantes según sean dichas condiciones (Magan y Aldred, 2007).

1.3.3 pH

Los hongos suelen crecer en pH de 4 a 7, aunque se ha descrito que también se pueden desarrollar a pH inferiores o superiores a este rango. En condiciones donde el pH es más extremo el crecimiento fúngico se dificulta, y se comienzan a producir metabolitos secundarios (Holmquist *et al.*, 1983).

Generalmente, los hongos tienen la capacidad de desarrollarse a pH ácidos, siendo la microbiota más abundante en alimentos ácidos, y en general en alimentos de origen vegetal. El pH óptimo para casi todas las especies contaminantes de vegetales es de 5,6.

Estudios previos han demostrado que en pHs ácidos se crea el ambiente más idóneo para comenzar a sintetizar las toxinas. Flaherty *et al.* (2003) demostró la existencia de un gen (*PAC1*) que codifica para uno de los principales reguladores transcripcionales como respuesta a cambios en el pH. Determinó que a pHs ácidos hay un aumento de la síntesis de las fumonisinas en *F. verticillioides* mientras que a pHs básicos no se producía la toxina. La interrupción de *PAC1* daba como resultado un mutante que tanto en pHs ácidos como en pHs básicos producía mucha más fumonisinas que el tipo silvestre. Recientes estudios han demostrado que una cepa de *F. graminearum* aumenta la expresión del gen *TRI5* y por tanto la

concentración de DON al someterla a un pH bajo extracelular (Gardiner *et al.*, 2009a).

1.3.4 Niveles de oxígeno (O₂), dióxido de carbono (CO₂) y nitrógeno

El crecimiento y la producción de toxinas para la mayor parte de los hongos contaminantes de cereales, se ve influenciado por los niveles ambientales de oxígeno (O₂), dióxido de carbono (CO₂) y en menor medida de nitrógeno (Pitt y Hocking, 1985).

Estudios recientes sugieren que la producción de micotoxinas es más sensible a los niveles de gases atmosféricos que el crecimiento fúngico. Se ha demostrado la inhibición de la síntesis de fumonisina B₁ en *F. verticillioides* y *F. proliferatum* en atmósferas modificadas con 10% y 40-30% de CO₂, respectivamente. Esta inhibición se produce en condiciones en las que aún se puede producir crecimiento fúngico. Por tanto, el crecimiento y la producción de toxinas se vería limitado a altas concentraciones de CO₂, aunque de diferente manera (Samapundo *et al.*, 2007a). Por el contrario, la aerobiosis es un requisito esencial para el crecimiento fúngico y la producción de las toxinas, aunque los requerimientos de O₂ pueden ser bajos. El crecimiento fúngico se produce incluso en atmósferas modificadas al 2% con O₂. La producción de la toxina se reduce con atmósferas de 70% y 20% para *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, respectivamente (Samapundo *et al.*, 2007b). Por tanto, la sensibilidad de cada especie fúngica a la composición gaseosa es un factor relevante que hay que tener en cuenta, especialmente en condiciones de almacenaje. Además, estos estudios han demostrado que la composición gaseosa tiene un efecto sinérgico inhibitorio sobre el crecimiento fúngico y la producción de la fumonisina FB₁ en ambas especies fúngicas (Samapundo *et al.*, 2007a).

Otros estudios han descrito que la disminución del ión amonio por debajo de unas concentraciones determinadas (10 mM) aumenta de manera significativa y acusada la expresión del gen *FUM1* en una cepa de *F. proliferatum*, mientras que el crecimiento se ve afectado. Por tanto existiría un riesgo potencial de aumento significativo de la producción de las fumonisinas cuando se produce ayuno de nitrógeno (Kohut *et al.*, 2009).

1.3.5 Substrato

Los hongos productores de micotoxinas son capaces de crecer en una amplia gama de substratos. Sin embargo los diferentes substratos difieren en su susceptibilidad para soportar la producción de micotoxinas, lo que afecta a la naturaleza y cantidad de metabolitos tóxicos que se producen y en consecuencia que se acumulan en el mismo (Madhyastha *et al.*, 1990). Estas diferencias en cuanto al crecimiento y producción de micotoxinas pueden atribuirse entre otros factores a la diferencia en las características físicas y químicas de cada substrato.

Las características físicas incluyen parámetros como la a_w intrínseca del substrato o la que presenta tras un determinado tratamiento; la resistencia mecánica al embalaje lo que determina su integridad y el aire residual y, por tanto la disponibilidad de oxígeno; y la conductividad térmica que influye en la migración de la temperatura de la mercancía (Le Bars, 1982).

Las características químicas como el contenido en grasas, proteínas, minerales traza, composición en ácidos grasos y aminoácidos, pueden influir en la producción de micotoxinas. Por ejemplo, el ácido ferúlico (que forma parte de la pared vegetal) o los flavonoides, inhiben la expresión de los genes que intervienen en la ruta de síntesis de los tricotecenos, y por tanto en su producción (Desjardins *et al.*, 1998; Boutigny *et al.*, 2009). Intermediarios de la ruta de síntesis de la arginina-poliamina o el bicarbonato sódico o amónico también inhibe la producción de las fumosisinas (Samapundo *et al.*, 2007c; Gardiner *et al.*, 2009b).

Los estudios realizados sobre diferentes medios, matrices o substratos (medios sintéticos inductores o medios con componentes más naturales, como harinas o granos de cereales irradiados con luz ultravioleta, etc) para determinar la producción de ciertas toxinas, tales como fumonisinias o tricotecenos, han revelado la existencia de diferencias en la concentración de toxina extracelular obtenida tras largos periodos de incubación (Llorens *et al.*, 2004a; Marín *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2006).

1.3.6 Interacciones microbianas

Las interacciones entre hifas de hongos que cohabitan en un mismo sustrato o entre hongos y bacterias ocurren inevitablemente. Estas interacciones pueden ser intra e inter-específicas. Las interacciones de hongos entre sí, y con el resto de la microbiota del grano pueden tener un profundo efecto en el crecimiento y en la capacidad de las especies fúngicas para producir toxinas (Cuero *et al.*, 1987) debido a la competitividad que se establece especialmente por los nutrientes disponibles del medio (Wicklow *et al.*, 1980). Sin embargo, con frecuencia la producción de metabolitos generalmente secundarios por determinados microorganismos, bien sean hongos o bacterias, afecta drásticamente al desarrollo y en consecuencia podrían afectar a la producción de micotoxinas por otras especies que comparten el mismo nicho ecológico (Marín *et al.*, 2001; Magan, 2007; Giorni *et al.*, 2009).

Se han realizado diferentes estudios sobre las especies que colonizan los granos de maíz (*Fusarium*, *Aspergillus* o *Penicillium*) en base a los factores ecofisiológicos y sus interacciones (Marín *et al.*, 1998; Velluti *et al.*, 2000a). Estos estudios han demostrado que *F. proliferatum* y *F. verticillioides* reducen la tasa de crecimiento en presencia de *F. graminearum* (Marín *et al.*, 1998; Velluti *et al.*, 2000a). De manera similar, la producción de fumonisinas se inhibe en las dos especies del complejo *Gibberella fujikuroi*, por la presencia de *F. graminearum*, mientras que la producción de zearalenona no se altera por la presencia de las especies productoras de fumonisinas (Velluti *et al.*, 2000a). Se ha demostrado la prevalencia de *F. verticillioides* bajo ciertas condiciones ambientales frente a otras especies como *F. graminearum* o *A. flavus* (Marín *et al.*, 2004). Recientes estudios determinan los nichos ecológicos que ocupan *F. verticillioides* y *A. flavus* en el maíz son diferentes debido a que utilizan diferentes fuentes de carbono. Solo bajo condiciones extremas (20 °C y -7,0 MPa de potencial hídrico) existe una dominancia de *F. verticillioides* frente a *A. flavus* (Giorni *et al.*, 2009).

1.3.7 Insectos

Los insectos causan importantes deterioros del grano antes, durante y después de la cosecha, pues producen un daño mecánico ya durante el cultivo, estropeando y alterando la integridad de la cubierta de la semilla, pero además también interaccionan con la microbiota presente en el grano de diferentes formas. Pueden causar un ambiente propicio para el crecimiento fúngico, pues producen un calentamiento y liberación de agua debido a su actividad metabólica y respiración (Sinha y Wallace, 1966). Algunos de estos insectos, cuyas larvas se desarrollan en el interior del grano afectado, pueden actuar como vectores de la infección, ya que pueden transportar esporas fúngicas en pelos, boca, intestino (Dunkel, 1988). Por su parte, los hongos pueden atraer o inhibir la presencia de insectos, quizás a través de compuestos volátiles o micotoxinas (Wright *et al.*, 1976) o incluso pueden servir como alimentos para ellos (Lacey y Magan, 1991).

Estudios realizados por Cardwell *et al.* (2000) sugieren que el grado de infección de una determinada especie vegetal por especies fúngicas (*F. verticillioides* y *A. flavus*) podría estar relacionado con el daño que los insectos producen sobre la planta. Folcher *et al.* (2009), sugiere que el uso de pesticidas disminuye la población de insectos que dañan el maíz, reduciendo la cantidad de fumonisinas sobre el vegetal. Por ello propone que los insectos que dañan vegetales como el maíz, favorecen la entrada de patógenos micotoxígenos como algunas de las especies productoras de fumonisinas de *Fusarium*.

1.3.8 Genotipo del hospedador

La existencia de hospedadores susceptibles a la colonización por las especies fúngicas aumenta los esfuerzos de los investigadores de buscar cultivares resistentes a la germinación de las esporas fúngicas y por tanto, al establecimiento de la enfermedad y la producción de las micotoxinas. Diferentes estudios describen la necesidad de buscar marcadores moleculares que tengan un efecto cuantitativo sobre la resistencia a estos patógenos (Anderson *et al.*, 2007; Foroud y Eudes, 2009). Las

investigaciones que se están llevando a cabo se centran en el estudio detallado de la interacción hospedador-patógeno, como es en el caso de trigo y *F. graminearum* y/o *F. culmorum*, que causan la conocida "Fusarium Head Blight" (Walter *et al.*, 2009). Se conocen los mecanismos de resistencia del hospedador y los mecanismos de penetración del hongos, etc, además de la importancia que tienen toxinas como el DON que facilita la entrada del hongo en la planta (Bai *et al.*, 2004; Walter *et al.*, 2008, 2009). Otros estudios demuestran la resistencia que tiene el hospedador dependería de la población de especies o de la comunidad de especies fúngicas que se desarrolla sobre ella (Xu *et al.*, 2008). Como es el caso de la variabilidad que presentan las poblaciones de *F. verticillioides* que contaminan el maíz en Argentina. Además sugieren que cultivares de diferentes localizaciones responden de manera diferente a la agresión debido que las condiciones ambientales a las que están sometidos son diferentes (Reynoso *et al.*, 2009).

Por otro lado, el uso de variedades transgénicas para hacer frente a la infección o a la producción de la toxina, están siendo aplicadas en los cultivares. Por ejemplo, el uso del "maíz Bt" reduce el daño del maíz por insectos, por lo que reduce la infección de especies fúngicas del género *Fusarium*. Y por tanto tiene como consecuencia final la reducción de la producción de la toxina (Kumar *et al.*, 2008; Folcher *et al.*, 2009).

1.4 OTROS HONGOS TOXIGÉNICOS ASOCIADOS A CEREALES: *Alternaria*, *Aspergillus* y *Penicillium*

Los hongos productores de toxinas capaces de contaminar los cereales son muy numerosos. Se pueden agrupar en hongos típicamente denominados pre-cosecha, como es el caso generalmente de *Fusarium*, y hongos post-cosecha que principalmente proliferan durante la fase de almacenamiento.

El género *Alternaria*, encuadrado en el orden *Pleosporales*, pertenece generalmente al grupo de hongos pre-cosecha, siendo capaz de producir

enfermedades y micotoxinas en cereales y otros vegetales, aunque también se le puede considerar como hongo post-cosecha, por su incidencia en productos alimenticios almacenados. De todas las especies del género, *Alternaria alternata* es la más común en cereales (Lacey y Magan, 1991; Medina *et al.*, 2006). Al contaminar el cereal produce ennegrecimiento del grano, disminuye el valor nutritivo del mismo y da lugar a sabores anómalos (Kosiak *et al.*, 2004). Pero además es capaz de producir micotoxinas como el ácido tenuazoico, los alternarioles y las altertoxinas (Scott, 2001; Lacey y Magan, 1991).

Los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* pertenecen al orden *Eurotiales*, y constituyen uno de los grupos de ascomicetos post-cosecha más intensamente estudiados (Seifert y Lévesque, 2004). En el género *Aspergillus* destacan como productoras de ocratoxinas: *A. ochraceus* y otras especies pertenecientes a la sección *Circumdati* (Varga *et al.*, 1996; Frisvad *et al.*, 2004; Gil-Serna *et al.*, 2009). Dentro de la sección *Nigri* las especies más importantes son *A. niger* (Abarca *et al.*, 1994), *A. carbonarius* (Horie, 1995) y *A. tubingensis* (Medina *et al.*, 2005). Y esporádicamente, también se han descrito otras especies que no pertenecen a ninguna de las secciones anteriores como *A. albertensis* (Varga *et al.*, 1996) *A. fumigatus* o *A. terreus* (Riba *et al.*, 2008). Dentro del género *Penicillium* nos encontramos con *P. verrucosum* y *P. nordicum* (Bragulat *et al.*, 2008). Las ocratoxinas forman parte de un grupo de toxinas cuya estructura química consiste en un núcleo de isocumarina unido a una molécula de L-fenilalanina mediante un enlace amida (Figura 13). La ocratoxina A (OTA) es una de las más importantes, y está asociada a cereales. Su toxicidad está determinada porque inhibe la síntesis proteica al competir con la fenilalanina (Phe) en la reacción catalizada por la Phe-RNAt-sintasa (Rizzo *et al.*, 2002). Por tanto, la OTA es principalmente nefrotóxica para el hombre y los animales, y en estos últimos años se ha demostrado que es además inmunosupresora, hepatotóxica, teratogénica y cancerígena (Bennet y Klich, 2003). La legislación Europea establece un límite máximo de $5 \cdot 10^{-3}$ ppm de OTA en cereales (Comisión Europea, 2006).

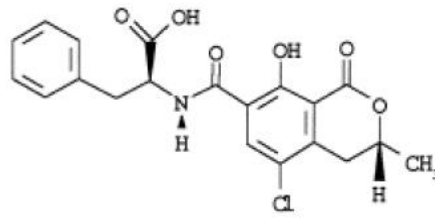


Figura 13: Estructura química de la ocratoxina A.

Otro grupo importante de micotoxinas presentes en los cereales son las aflatoxinas. Son sintetizadas por especies de género *Aspergillus*, principalmente por *A. flavus*, y *A. parasiticus* (Creppy, 2002). Las aflatoxinas son derivados de la difuranocumarina (Figura 14). Existen cuatro tipos naturales (B_1 , B_2 , G_1 y G_2) y dos derivados monohidroxilados de la aflatoxina B_1 y B_2 , llamadas M_1 y M_2 , respectivamente. Estos derivados se caracterizan por ser excretados en la leche de los animales que han ingerido alimento contaminado con aflatoxinas (Sweeney y Dobson, 1999). De todas las aflatoxinas, la B_1 es la más frecuente en cereales, particularmente en maíz. Su toxicidad se debe a su carácter inmunosupresor y hepatotóxico. En el caso de intoxicaciones agudas pueden producir la muerte (Bennet y Klich, 2003). La aflatoxina B_1 es el agente cancerígeno natural más potente que se conoce, asociado principalmente al cáncer hepático, y está considerado como carcinógeno del grupo I por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, 1982). La legislación Europea establece un límite máximo de $4 \cdot 10^{-3}$ ppm de aflatoxinas totales en cereales (Comisión Europea, 2006).

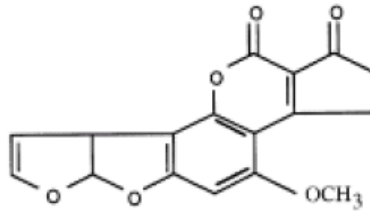


Figura 14: Estructura química de la aflatoxina B₁.

1.5 PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN DE CEREALES CON HONGOS TOXÍGENOS

La contaminación de los cereales con especies micotoxígenas es un problema que ocasiona pérdidas en la agricultura y en la industria de transformación de sus productos, así como en el sector ganadero, y al afectar al hombre, supone principalmente un importante problema de salud pública. La contaminación de los cereales en el campo con micotoxinas se produce de manera natural y su concentración puede aumentar como resultado de los factores ecofisiológicos o de operaciones inadecuadas de recolección, almacenamiento y elaboración de los productos alimentarios. Por ello, es importante desarrollar estrategias de control que permitan reducir los riesgos. El objetivo de estas estrategias es evitar la contaminación de los cereales mediante el establecimiento de unas medidas preventivas. Además, deben garantizar su salubridad para que lleguen en las condiciones adecuadas al hombre y los animales. En este sentido, la prevención se centra principalmente en las buenas prácticas agrícolas (GAP: "Good Agricultural Practice") e industriales (GMO: "Good Manufacturing Practice"). Además en la industria alimentaria se ha desarrollado el Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (HACCP: "Hazard Analysis and Critical Control Point"), que es una herramienta que sistemáticamente identifica, evalúa y controla los peligros potenciales que son significativos para la seguridad de los alimentos. Los Puntos de Control Crítico (CCP), se definen como las etapas del proceso en que es posible aplicar medidas de

control para prevenir, eliminar o reducir un peligro hasta los niveles aceptables, y en el caso de cereales son la pre-cosecha y el almacenamiento. El HACCP se incluyó como prioridad en el campo de la seguridad y calidad alimentaria en el VI Programa Marco de la Unión Europea (Comisión Codex Alimentarius, 2002).

A nivel mundial se ha descrito que la formación de las micotoxinas puede ocurrir durante las diferentes etapas del proceso de manejo de los cereales: pre-cosecha, cosecha y procesado o almacenamiento (Cleveland *et al.*, 2003; Perrone *et al.*, 2007). La importancia de cada fase depende de la toxina, de la especie fúngica involucrada y del cultivo. En el género *Fusarium* los puntos críticos más importantes son los momentos pre-cosecha (durante la floración) y cosecha (Marín *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2004a). Por tanto, el control de las micotoxinas producidas por este género se enfoca en dos estrategias no excluyentes: la más importante es la inhibición o reducción del crecimiento de *Fusarium* en el cereal (prevención de contaminación por micotoxinas), y por otro lado es la destrucción de éstas, si es que ya existen en el cereal (detoxificación) (Kabak *et al.*, 2006).

Para evitar la contaminación de *Fusarium* en el campo son necesarias unas buenas prácticas agrícolas. Éstas incluyen el arado en profundidad (para eliminar residuos contaminantes de la superficie) y la rotación con otros cultivos como las leguminosas (para romper el ciclo infectivo). Además, este propósito se puede conseguir con la selección de variedades resistentes a este patógeno micotoxígeno (Muehlbauer y Bushnell, 2003) y la lucha biológica (Khan *et al.*, 2004).

Por otro lado, el crecimiento fúngico se puede inhibir o reducir mediante el uso de fungicidas. La industria química ha desarrollado numerosos tratamientos antifúngicos de amplio espectro que pueden ser empleados para diferentes especies y en diversos cultivos (Yan *et al.*, 1993; Ramírez *et al.*, 2004a). Los conservantes y antioxidantes alimentarios o incluso los aceites esenciales pueden ser eficaces inhibiendo el crecimiento fúngico en algunos casos (Velluti *et al.*, 2003; Melin *et al.*, 2008). Sin embargo, existe un problema asociado al uso de éstos, ya que en ciertas

ocasiones se ha comprobado que a dosis subletales puede inducir la síntesis de micotoxinas (Milus y Parson, 1994; D'Mello *et al.*, 1998; Magan, 2006; Schmidt-Heydt *et al.*, 2008). Además existe cierta presión social en los últimos años para reducir el uso de aditivos químicos en la industria alimentaria. Los consumidores actuales demandan cada vez más, alimentos sin sustancias conservantes o antimicrobianas sintetizadas químicamente, y asocian alimentos sanos y seguros con alimentos frescos o mínimamente procesados (Magan, 2006).

La cosecha debe ser realizada cuando el grano esté suficientemente seco, y en el almacenamiento es especialmente importante controlar las condiciones de temperatura, humedad y aireación (Aldred y Magan, 2004), puesto que la contaminación fúngica puede persistir tras la cosecha. Es importante igualmente en esta etapa controlar la presencia de insectos, que dañan al grano haciéndolo más susceptible al ataque de los hongos, y tienen un papel importante como diseminadores de esporas (Aldred y Magan, 2004).

Existen una serie de métodos físicos y/o químicos para destruir las micotoxinas que ya están presentes sobre el cereal, que con el tiempo van quedando en desuso por presentar una serie de inconvenientes. Estos métodos son tratamientos con calor (Kabak *et al.*, 2006), con hipoclorito (Castegnaro *et al.*, 1991), etc. Concretamente, la detoxificación química está prohibida en la legislación actual (Comisión Europea, 2006).

Por todo ello, es especialmente aconsejable la detección temprana de las especies micotoxígenas de *Fusarium*. Es importante disponer de métodos que permitan la identificación del material contaminado, con el fin de poder tomar medidas para evitar una nueva contaminación y que el producto pase a la cadena alimentaria. Hasta ahora los principales métodos de análisis utilizados eran químicos o inmunológicos, orientados a la búsqueda de una micotoxina en particular. Sin embargo, en los últimos años se están desarrollando métodos de diagnóstico basados en el DNA para algunas de las especies toxígenas de *Fusarium* más importantes (Patiño *et al.*, 2004; Jurado *et al.*, 2005, 2006a). Además, el conocimiento

de los factores ecofisiológicos que determinan el crecimiento de *Fusarium* sobre el cereal y la producción de las toxinas correspondientes según la especie de *Fusarium*, permiten elaborar estrategias de prevención y control de estas especies durante la fase de campo y almacenamiento del grano.

Este trabajo se centró en determinar las condiciones ecofisiológicas características de crecimiento y de producción de toxinas en tres especies de *Fusarium* frecuentes en cereales españoles como *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, productoras de fumonisinas y *F. graminearum*, productora de tricotecenos. La detección de la biosíntesis de estas micotoxinas se llevó a cabo mediante RT-PCR a tiempo real, ya que la regulación de los genes principales de las rutas metabólicas de estas micotoxinas se produce a nivel transcripcional (Proctor *et al.*, 1999). Esta técnica permitió detectar y cuantificar los niveles de expresión de estos genes (*FUM1* para las especies productoras de fumonisinas y *TRI5* para *F. graminearum*) de una forma rápida, sensible, específica y sencilla. Por otra parte, se realizaron estudios epidemiológicos que permitieron conocer la distribución de las especies fúngicas potencialmente productoras de toxinas, como especies de *Fusarium* productoras de fumonisinas o tricotecenos, asociadas a un determinado cereal u hospedador, en un momento determinado (pre-cosecha). Mediante la identificación y caracterización de éstas, usando los diagnósticos basados en PCR específicos de especie, se determinó de manera exacta el complejo de especies que estaría presente en un determinado vegetal para realizar predicciones más precisas.

1.6 OBJETIVOS

- (i) Determinar los perfiles de crecimiento de las principales especies toxígenas asociadas a cereales en España, *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. graminearum*, en relación a la temperatura y al estrés hídrico.
- (ii) Desarrollar métodos de RT-PCR a tiempo real para los genes *FUM1* y *TRI5*, de las especies *F. proliferatum* y *F. graminearum*, respectivamente.
- (iii) Determinar el efecto de la temperatura y el estrés hídrico sobre los genes principales de biosíntesis de fumonisinas (*FUM1*) en *F. verticillioides* y *F. proliferatum* y tricotecenos (*TRI5*) en *F. graminearum*, mediante RT-PCR a tiempo real.
- (iv) Determinar el efecto del estrés hídrico sobre el crecimiento fúngico y la expresión del gen *FUM1* en *F. verticillioides* y *F. proliferatum* y del gen *TRI5* en *F. graminearum* mediante RT-PCR a tiempo real, a lo largo del tiempo.
- (v) Estudiar la distribución de especies de *Fusarium*, especialmente las especies toxígenas y la micobiota asociada en trigo y cebada, en Castilla y León y Castilla-La Mancha utilizando una estrategia combinada de detección tradicional y molecular.

CAPÍTULO 2.

CAPÍTULO 2. EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO Y DE LA TEMPERATURA SOBRE LA TASA DE CRECIMIENTO FÚNGICO Y LA EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN *FUM1* EN *Fusarium verticillioides*.

2.1 INTRODUCCIÓN

Fusarium verticillioides (Saccardo) Nirenberg MP-A (O'Donnell *et al.*, 1998b) es una de las principales especies productoras de fumonisinas perteneciente al complejo de especies *Gibberella fujikuroi*. En los últimos años se han catalogado taxonómicamente como *F. verticillioides* una gran parte de las especies antiguamente denominadas como *F. moniliforme* (Seifert *et al.*, 2003). Su correspondiente estado teleomórfico es *Gibberella moniliformis* (*Gibberella fujikuroi* especie biológica o apareante A, "mating population A").

F. verticillioides es un hongo fitopatógeno ampliamente distribuido en regiones templadas (Desjardins *et al.*, 2000; De Souza y Formento, 2004; Desjardins *et al.*, 2007; Cavaglieri *et al.*, 2009;) y es particularmente relevante en el sur de Europa (Logrieco *et al.*, 2002; Soldevilla *et al.*, 2005; Jurado *et al.*, 2006b; Medina *et al.*, 2006). Esencialmente, esta especie coloniza maíz donde provoca la podredumbre de la mazorca y del tallo ("Maize Pink-Ear Rot" y "Maize Stalk Rot", respectivamente), aunque también se ha descrito en otros cereales como el trigo, la cebada, etc (McMullen y Satck, 1984; Leslie *et al.*, 2004, 2005; Soldevilla *et al.*, 2005; Medina *et al.*, 2006) e incluso en banana (Mirete *et al.*, 2004).

Las fumonisinas son unas de las toxinas más importantes producidas por *F. verticillioides*. Algunas de sus cepas son capaces de producir grandes cantidades de este metabolito (Nelson *et al.*, 1994b; Miller *et al.*, 1995). Como se ha descrito en el capítulo 1 (apartado 1.2.1.), las fumonisinas comprenden un grupo de compuestos tóxicos y potencialmente carcinogénicos que causan diversas enfermedades severas, agudas y crónicas en animales y humanos (Marasas *et al.*, 2004). Por ello, están bajo

legislación en la mayoría de los países Europeos (Comisión Europea, 2007). *FUM1* es el gen principal relacionado con la biosíntesis de las fumonisinas. Este gen codifica para la enzima poliquétido sintasa (PKS) que cataliza la primera reacción en la síntesis de fumonisinas. La regulación de su expresión y del resto de los genes implicados en la biosíntesis de esta toxina, ocurre a nivel transcripcional (Proctor *et al.*, 1999; Seo *et al.*, 2001). En base a este hecho, estudios previos determinaron que la producción de fumonisinas (FB₁) se correlaciona positivamente con la expresión de *FUM1*, mediante RT-PCR a tiempo real (López-Errasquín *et al.*, 2007).

Durante el ciclo de vida de *F. verticillioides* en maíz, el patógeno coloniza el suelo y sobrevive sobre los residuos de la cosecha. Sus esporas son dispersadas generalmente mediante las gotas de lluvia al caer sobre el cereal y a través del viento. El crecimiento fúngico y la producción de las toxinas están influidos por la interacción de una serie de factores (bióticos y abióticos). El estrés hídrico y la temperatura son los factores ambientales más importantes (Marín *et al.*, 2004) que determinan el crecimiento de *F. verticillioides* y la producción de fumonisinas. Por lo tanto, el conocimiento de cada uno de los factores involucrados, es esencial para comprender los procesos en su conjunto y poder predecir y prevenir el desarrollo fúngico y la producción de las toxinas sobre el cereal (Charmley *et al.*, 1994).

Los objetivos de este capítulo fueron:

- (i) Estudiar el efecto del estrés hídrico y la temperatura sobre el crecimiento fúngico en *F. verticillioides*.
- (ii) Evaluar el efecto del estrés hídrico y la temperatura sobre la expresión del gen *FUM1* usando RT-PCR a tiempo real en *F. verticillioides*.

2.2 MATERIAL Y MÉTODOS

2.2.1 Material biológico

Las cepas utilizadas para la realización de este trabajo fueron FvMM7-3 (FvA) y FvMM1-2 (FvB) de *F. verticillioides* (Figura 1). Ambas cepas fueron aisladas de un campo de maíz en Madrid (España), en Septiembre de 2003. Estos aislamientos se catalogaron como haplotipos diferentes tras analizar la secuencia parcial de la región IGS, la secuencia parcial del gen *EF-1 α* y la presencia de los alelos de compatibilidad sexual (*MAT-1* o *MAT-2*) (Jurado, 2006). Así mismo, la capacidad para producir fumonisinas de ambos aislamientos ha sido demostrada previamente en Jurado (2006).

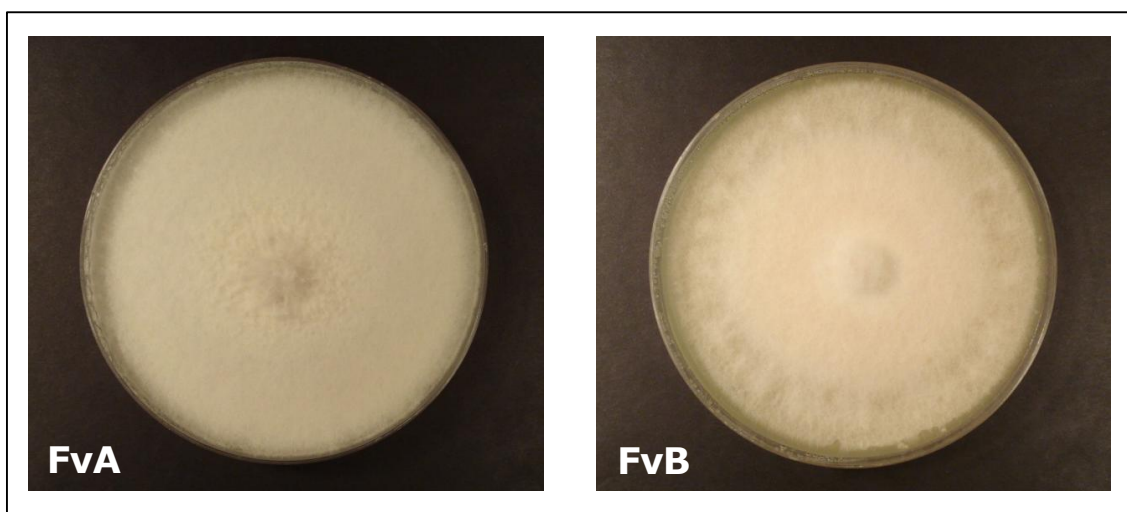


Figura 1: *F. verticillioides*. Cepas FvA y FvB cultivadas en PDA a 25 °C durante 7 días.

Los cultivos se mantuvieron en medio PDA (Scharlau Chemie, España) a 4 °C y se conservaron como suspensión de esporas en glicerol al 15% a -80 °C en el Departamento de Genética de la Universidad Complutense de Madrid.

2.2.2 Medio de cultivo

El cultivo de los hongos se llevó a cabo en un medio sólido que induce la síntesis de fumonisinas (López-Errasquín *et al.*, 2007). Su composición fue: extracto de malta (0,5 g/l), extracto de levadura (1 g/l), peptona (1 g/l), KH₂PO₄ (1 g/l), MgSO₄·7H₂O (0,3 g/l), KCl (0,3 g/l), ZnSO₄·7H₂O (0,05 g/l), CuSO₄·5H₂O (0,01 g/l), fructosa (20 g/l) y agar bacteriológico (15 g/l).

El medio de cultivo que induce la síntesis de fumonisinas fue modificado con el soluto iónico, cloruro sódico (NaCl) (Lang, 1967) y con el soluto no iónico, glicerol (Dallyn y Fox, 1980) para dar lugar a los siguientes niveles de potencial osmótico: -2,8; -7,0; y -9,8 MPa (que se corresponden con las a_w: 0,982; 0,955 y 0,937, respectivamente) (Tabla 1). Estos solutos no fueron añadidos al medio control (-0,7 MPa) (Tabla 1). Las placas de Petri donde se añadió el medio modificado o medio control para ambos tratamientos fueron cubiertas con discos circulares de celofán estéril (P400; Cannings, Ltd., Bristol., Reino Unido) antes de la inoculación del material biológico. El celofán facilitó la retirada de la masa fúngica crecida tras el periodo de incubación, que se conservó a -80 °C hasta el momento de la extracción de RNA.

Ψ_s (MPa)	Ψ_m (MPa)	a_w
-0,7	-0,7	0,995
-2,8	-2,8	0,982
-7,0	-7,0	0,955
-9,8	-9,8	0,937

Tabla1: Potencial osmótico (Ψ_s) y potencial matricial (Ψ_m) en MPa, con su actividad de agua (a_w) equivalente.

Para obtener los diferentes niveles de potencial matricial (-2,8; -7,0 y -9.8 MPa, Tabla 1) el medio de cultivo que induce la síntesis de fumonisinas se modificó con polietilén glicol 8000 (PEG 8000). El PEG 8000 se conoce

como un agente que actúa principalmente por fuerzas matriciales (Steuter *et al.*, 1981). Las cantidades exactas de PEG 8000 fueron añadidas según la ecuación de Michel y Kaufmann (1973) como detalla Magan (1988). Este agente no fue añadido al medio control (-0,7 MPa) (Tabla 1), que se preparó de la misma manera que el resto de los medios modificados matricialmente. Para éstos se eliminó el uso del agar y se esterilizaron discos circulares de estera capilar ("*capillary matting*") (Nortene; 8,5 cm de diámetro y 2 mm de grosor) y discos de poliéster. Ambos tipos de discos se utilizaron para dar soporte al crecimiento del hongo en la placa de Petri. Se colocó el disco de estera capilar en la placa de Petri en la que se añadió el medio modificado o control. Una vez embebido este disco en el medio de cultivo se colocó el disco de poliéster. Por último se utilizaron discos de celofán estériles para cada placa de Petri del tratamiento.

2.2.3 Condiciones de inoculación, incubación y medición del crecimiento fúngico

La inoculación del primer bloque de experimentos, se llevó a cabo a partir de un disco de agar de 3 mm de diámetro, obtenido marginalmente de los cultivos puros de cada una de las cepas (FvA y FvB) cultivados durante 7 días a 25 °C en PDA. Cada disco de agar se inoculó en el centro de la placa de Petri que contenía el medio de cultivo modificado o control deseado en cada tratamiento. Estos tratamientos se realizaron para imponer diferentes niveles de estrés hídrico (-2,8; -7,0 y -9,8 MPa) mediante el potencial osmótico (con NaCl o con glicerol), y el potencial matricial. Para cada cepa y cada tratamiento se realizaron tres réplicas biológicas que se incubaron a dos temperaturas diferentes (15 y 25 °C) durante 10 días.

Las mediciones del crecimiento fúngico se llevaron a cabo diariamente durante los 10 días que duró el periodo de incubación. Se midieron dos diámetros perpendiculares por placa hasta que la masa fúngica alcanzó el filo de ésta. La tasa de crecimiento se calculó mediante una regresión lineal y se definió, como la pendiente de la recta que se

obtuvo tras enfrentar el radio del inóculo en milímetros frente al tiempo en días.

Así mismo, se realizó un segundo experimento con un único aislamiento: FvA. El medio inductor de la síntesis de fumonisinas fue modificado con glicerol para dar lugar a diferentes niveles de estrés hídrico. Se realizaron tres réplicas biológicas por nivel de potencial (-0,7; -2,8 y -7,0 MPa) que se incubaron durante 10 días a cinco temperaturas diferentes: 15, 20, 25, 30 y 35 °C. La inoculación y la obtención de la tasa de crecimiento se realizaron de la misma manera que en el experimento anterior.

Finalmente se realizó un estudio cinético con la cepa FvA. El medio inductor de la síntesis de fumonisinas fue modificado con cloruro sódico para dar lugar a diferentes niveles de estrés hídrico. Se realizaron tres réplicas biológicas por nivel de potencial (-0,7; -2,8; -7,0 y -9,8 MPa) que fueron incubadas durante de 3, 6, 9 y 12 días a 25 °C. La inoculación y la obtención de la tasa de crecimiento se realizaron de la misma manera que en el primer experimento.

2.2.4 Extracción de RNA total

La masa fúngica se retiró con la ayuda del celofán estéril al finalizar el periodo de incubación de cada experimento y se congeló a -80 °C hasta el momento de la extracción del RNA.

Para el aislamiento del RNA total de los micelios se utilizó el kit "Total Quick RNA Cells and Tissues" (Talent, Italia), siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA total fue mantenido a -80 °C.

La concentración de RNA fue estimada por absorción a 260 nm mediante el espectrofotómetro NanoDrop[®] ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Estados Unidos), asumiendo que una concentración de 40 µg/ml se corresponde con una unidad de densidad óptica.

Su integridad fue comprobada mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa de alta temperatura de gelificación (Bio-Rad, Estados Unidos) al 1%, en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM) y bromuro de etidio (1 µg/ml) a una concentración de 1µl/20 ml. Toda el agua que se utilizó para realizar los tampones se trató con DEPC, a una concentración de 1 ml/l de agua destilada, durante 24 horas a 37 °C, y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Las muestras se disolvieron en tampón de carga (glicerol 50%, EDTA 1mM pH 8, cianol xilano 0,25% y azul de bromofenol 0,25%). Se aplicó 1 µg de muestra.

El material utilizado para las electroforesis fue lavado previamente con una solución de peróxido de hidrógeno al 10%. La electroforesis se llevó a cabo en tampón TAE a voltaje constante y, una vez finalizada, las muestras fueron visualizadas mediante irradiación con luz UV (Sambrook y Russell, 2006). El marcador de peso molecular utilizado fue el Ladder Plus de 100 pb (Fermentas, Lituania).

El RNA total se incubó con la DNAsa "Deoxyribonuclease I, Amplification Grade" (Invitrogen, Gran Bretaña) durante 15 minutos a temperatura ambiente, siguiendo las instrucciones del fabricante, para eliminar la posible contaminación con DNA genómico.

2.2.5 Síntesis de cDNA

Las reacciones de transcripción inversa se realizaron utilizando el kit "GeneAmp Gold RNA PCR Reagent Kit" (Applied Biosystems, Estados Unidos) a partir de 500 ng de RNA total libre de DNA genómico. Las mezclas de reacción contenían 10 µl del tampón de reacción 5X, 2 µl de cloruro de magnesio (MgCl₂) (25 mM), 2 µl de la solución de deoxinucleótidos trifosfato (dNTP) (10 mM), 0,5 µl (10 U) de inhibidor de RNAsa (20 U/µl), 2 µl de ditiotreititol (DTT) (100 mM), 0,5 µl de oligo-d(T)₁₆ (50 µM), 0,3 µl (15 U) de la transcriptasa inversa MultiScribe (50 U/µl) y agua DEPC en un volumen final de reacción de 20 µl. El programa de la transcripción inversa consistió en un ciclo de 10 minutos a 25 °C (hibridación), un ciclo de 12 minutos a 42 °C (transcripción inversa) y parada a 4 °C. La síntesis de cDNA se llevó a

cabo en un termociclador "Mastercycler gradient" (Eppendorf, Alemania). Tras el proceso de síntesis del cDNA, éste se guardó a -20 °C. De cada una de las muestras se realizaron controles negativos a los que no se añadió la enzima transcriptasa inversa.

Para comprobar la integridad del cDNA y su posible contaminación con DNA, se realizaron amplificaciones mediante PCR convencional empleando los cebadores EF1T (5' ATGGGTAAGGAGGACAAGAC 3') y EF2T (5' GGAAGTACCAGTGATCATGTT 3') descritos en O'Donnell *et al.* (1998a). Estos cebadores amplifican un fragmento del gen *EF-1 α* , que contiene 3 intrones (Figura 3, capítulo 1), de manera que se obtiene un fragmento de 659 pb en el DNA genómico y de alrededor de 350 en el cDNA. Las muestras no contaminadas con DNA genómico, presentan una única banda de aproximadamente 350 pb, mientras que en los controles negativos obtenidos para cada una de las muestras, no se observó ningún producto de amplificación, ni contaminación con DNA genómico.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en el termociclador "Mastercycler gradient" (Eppendorf, Alemania) y fueron realizadas en un volumen total de 25 μ l, que contenía los siguientes reactivos: 0,5 μ l de cDNA, 0,25 μ l de dNTPs (100 mM) (Ecogen, Barcelona, España), 1 μ l de MgCl₂ (50 mM), 1,25 μ l de cada cebador correspondiente (20 μ M de cada uno), 0,2 μ l de Taq DNA polimerasa (5 U/ μ l) (Ecogen, Barcelona, España) y 2,5 μ l de tampón 10X con MgCl₂ (166 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM TRIS-HCl (pH 8,8 a 25 °C) y 0,1% Tween-20). El volumen final se completó con agua Milli-Q estéril.

El programa de amplificación constaba de un paso previo de desnaturalización a 95 °C durante 85 segundos, seguido de 35 ciclos de amplificación. Cada ciclo de amplificación consistió en un paso de 35 segundos a 95 °C (desnaturalización), 55 segundos a 53 °C (hibridación) y 60 segundos de extensión a 72 °C. El programa terminaba con un ciclo final de extensión de 10 minutos a 72 °C y parada a 4 °C.

Los productos de PCR se observaron mediante electroforesis estándar en geles horizontales de agarosa de alta temperatura de gelificación (Bio-Rad, Estados Unidos) al 1% en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM) y bromuro de etidio (1 µg/ml) a una concentración de 1 µl/20 ml. Las muestras se disolvieron en tampón de carga (glicerol 50%, EDTA 1 mM pH 8 y azul de bromofenol 0,25%). Se cargó toda la muestra. La electroforesis se llevó a cabo en tampón TAE a voltaje constante y, una vez finalizada, las muestras se visualizaron mediante la irradiación con luz UV (Sambrook y Russell, 2006). El marcador de peso molecular utilizado fue Ladder Plus de 100 pb (Fermentas, Lituania).

2.2.6 RT-PCR a tiempo real

El método de RT-PCR a tiempo real se utilizó para amplificar el gen *FUM1* y el gen *TUB2* (gen de la β-tubulina, de expresión constitutiva) en las cepas FvA y FvB usando las parejas de cebadores descritas previamente en López-Errasquín *et al.* (2007) y en Jurado (2006), respectivamente. Estas parejas de cebadores fueron PQF5-F y PQF5-R específicos para el gen *FUM1* de *F. verticillioides*, y PQTUB-F2 y PQTUB-R2 para el gen *TUB2* de *F. verticillioides* y *F. proliferatum* (Tabla 2).

Gen amplificado	Nombre	Secuencia (5'-3')
Poliquétido sintasa (PKS) (<i>FUM1</i>)	PQF5-F	GAGCCGAGTCAGCAAGGATT
	PQF5-R	AGGGTTCGTGAGCCAAGGA
β-tubulina (<i>TUB2</i>)	PQTUB-F2	ACATCCAGACAGCCCTTTGTG
	PQTUB-R2	AGTTTCCGATGAAGGTCTGAAGA

Tabla 2: Secuencias (5'-3') de los cebadores utilizados en las reacciones de amplificación de RT-PCR a tiempo real en *F. verticillioides*.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador a tiempo real "ABIPRISM 7700" (Applied Biosystems, Estados Unidos), utilizando la mezcla maestra "SYBR[®] Green PCR Master Mix" (Applied Biosystems, Estados Unidos) en la Unidad de Genómica de la UCM. Esta mezcla incluye, en las cantidades adecuadas, la enzima "AmpliTaQ Gold[®] DNA Polymerase", dNTPs, MgCl₂ y el tampón de PCR, e incorpora el colorante SYBR Green I (Wittwer *et al.*, 1997). Este colorante detecta DNA de doble hélice, intercalándose en ella y generando una señal fluorescente cuando la muestra es excitada por una fuente de luz. Las muestras se amplificaron por duplicado en placas de 96 pocillos para reacciones ópticas (Applied Biosystems, Estados Unidos). Cada reacción se llevó a cabo en un volumen de 20 µl con los siguientes elementos: 10 µl de la mezcla maestra "SYBR[®] Green PCR Master Mix", 2,6 µl de agua Mili-Q estéril, 1,2 µl de cada cebador a 5 µM (siendo su concentración final 300 nM) y 5 µl de cDNA. Las condiciones térmicas de la amplificación para ambos genes fueron: un ciclo inicial de 10 minutos a 95 °C (activación enzimática), seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C (desnaturalización y extensión). Para todas las muestras, se incluyeron controles negativos ausente de cDNA (control negativo de la síntesis de cDNA), para comprobar posibles contaminaciones por DNA genómico. Estos controles se procesaron de la misma manera que el resto de las muestras.

2.2.7 Análisis cuantitativos de los datos obtenidos por RT-PCR a tiempo real

El método llevado a cabo para analizar los datos de este estudio fue el método del $\Delta\Delta C_T$, o método de cuantificación relativa de los niveles de expresión del gen problema (*FUM1*) respecto del gen de control endógeno o constitutivo ("housekeeping") (*TUB2*) (Ginzinger, 2002; User Bulletin N^o2), ambos amplificados en la misma placa, descrito previamente por López-Errasquín (2005). Por ello, el gen *TUB2* se utilizó para normalizar la cantidad de mRNA del gen problema (*FUM1*) por diferencias en la cantidad total de cDNA en cada reacción. En el análisis de resultados en RT-PCR a tiempo real, la cuantificación se basa en la determinación del ciclo umbral

(“threshold cycle”, C_T) de cada muestra, que se define como el primer ciclo de amplificación donde la señal de fluorescencia es mayor que el límite de detección mínimo establecido previamente mediante la línea base o umbral, indicando que los productos de PCR son detectables.

El método del $\Delta\Delta C_T$ consiste en lo siguiente: el valor de ΔC_T se determina restando la media de los valores C_T obtenidos para el gen endógeno, de la media de los valores C_T del gen problema. Su desviación estándar se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$(s_1^2 + s_2^2)^{1/2}$$

Donde, s_1 y s_2 son las desviaciones estándar de la media de los valores de C_T obtenidos para el gen problema y el gen endógeno, respectivamente. El cálculo del valor $\Delta\Delta C_T$ implica restar a cada ΔC_T el valor del ΔC_T de un calibrador, que es la muestra utilizada como base o referencia para obtener el valor relativo de las demás muestras. Al ser una resta de un valor arbitrario, la desviación del $\Delta\Delta C_T$ es la misma que la del ΔC_T . Una vez obtenidos estos valores, la cantidad de un gen problema, normalizado a una referencia endógena y relativa a un calibrador, se obtiene mediante la fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$

2.2.8 Análisis estadístico de los resultados

Los resultados obtenidos de las tres réplicas biológicas tanto para la tasa de crecimiento como para la expresión del gen *FUM1*, fueron tratados estadísticamente. Los resultados fueron evaluados mediante un análisis de la varianza (ANOVA) usando el programa StatsGraphics Plus V.5.1 (Statistical Graphics Corp., Herndon, VA).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Efecto de la temperatura, el potencial osmótico y el potencial matricial sobre el crecimiento fúngico

Se determinó la tasa de crecimiento de dos aislamientos de *F. verticillioides* (FvA y FvB), cultivados en el medio sólido inductor de la síntesis de fumonisinas durante 10 días, en respuesta a cambios en el potencial hídrico (-0,7; -2,8; -7,0 y -9,8 MPa) osmótico (iónico y no iónico) y matricial, a 15 y 25 °C.

Se observó que la tasa de crecimiento se redujo considerablemente a 15 °C en ambas cepas. A esta temperatura, no se detectó crecimiento en los tratamientos de potencial matricial a -7,0 y -9,8 MPa en ninguna de las dos cepas (Figura 2). En ambas temperaturas, la tasa de crecimiento fue similar en respuesta tanto al tratamiento osmótico iónico como al no iónico. Sin embargo, los resultados obtenidos tras la imposición del tratamiento del potencial matricial reflejaron una mayor y significativa reducción de la tasa de crecimiento en ambas cepas y a ambas temperaturas.

Se realizó un ANOVA para cada temperatura con el fin de analizar el efecto de cada uno de los factores considerados en el estudio (cepa, nivel de estrés hídrico, y tipo de potencial hídrico, ya sea osmótico –iónico o no iónico- o matricial) y sus interacciones sobre la tasa de crecimiento. Como se puede observar en las Tablas 3 y 4, existieron diferencias significativas tanto para los factores por separado como para sus interacciones, a ambas temperaturas. Sin embargo no se observaron efectos significativos en la interacción entre cepa, diferentes niveles de estrés hídrico y tipo de potencial hídrico a 25 °C. La tasa de crecimiento de FvA fue mayor que la de FvB. Este hecho explicaría los resultados analizados por ANOVA que mostraron diferencias significativas entre ambas, aunque tuvieran un patrón semejante de reducción del crecimiento.

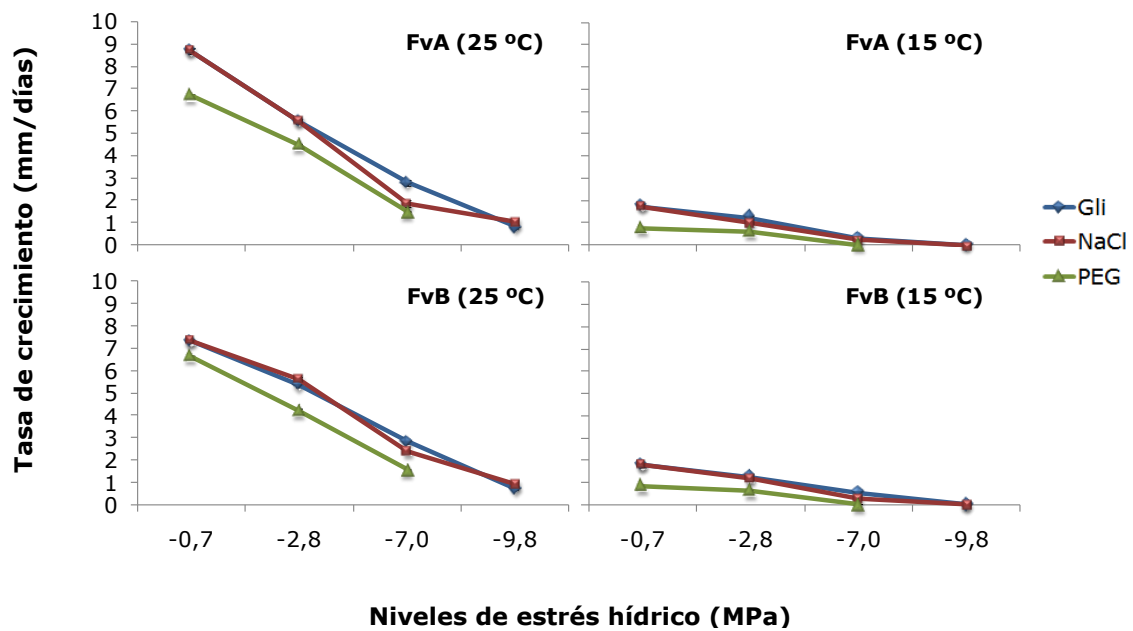


Figura 2: Estudio de la tasa de crecimiento en las cepas FvA y FvB, en respuesta a cambio en los potenciales osmóticos -iónico (NaCl) y no iónico (Gli)- y al potencial matricial (PEG) a 25 y 15 °C. Cada punto es la tasa de crecimiento media de los valores de las tres réplicas. Se representan las barras de error para cada una de las medias obtenidas.

Fuente de variación	Grados de libertad	Media de cuadrados	Estadístico F-Snedecor
Cepa	1	0,730	56,153 *
Nivel de estrés hídrico	3	146,662	11277,404 *
Tipo de potencial hídrico	2	7,970	612,851 *
Cepa x nivel de estrés hídrico	3	1,059	81,432 *
Cepa x tipo de potencial hídrico	2	0,156	11,976 *
Nivel de estrés hídrico x tipo de potencial hídrico	5	0,372	28,595 *
Cepa x nivel de estrés hídrico x tipo de potencial hídrico	5	0,350	26,915

Tabla 3: ANOVA que describe el efecto de los factores: cepa de *F. verticillioides* (FvA y FvB), niveles de estrés hídrico (-0,7; -2,8; -7,0 y -9,8 MPa), tipo de potencial hídrico (osmótico -iónico y no iónico- y matricial) y sus interacciones sobre la tasa de crecimiento a 25 °C. * Valores con diferencias significativas a $P < 0,05$.

Fuente de variación	Grados de libertad	Media de cuadrados	Estadístico F-Snedecor
Cepa	1	0,059	18,652 *
Nivel de estrés hídrico	3	7,877	2476,430 *
Tipo de potencial hídrico	2	2,225	699,582 *
Cepa x nivel de estrés hídrico	3	0,010	3,113 *
Cepa x tipo de potencial hídrico	2	0,009	2,881 *
Nivel de estrés hídrico x tipo de potencial hídrico	5	0,171	53,853 *
Cepa x nivel de estrés hídrico x tipo de potencial hídrico	5	0,010	3,260 *

Tabla 4: ANOVA que describe el efecto de los factores: cepa de *F. verticillioides* (FvA y FvB), niveles de estrés hídrico (-0,7; -2,8; -7,0 y -9,8 MPa), tipo de potencial hídrico (osmótico -iónico y no iónico- y matricial) y sus interacciones sobre la tasa de crecimiento a 15 °C. * Valores con diferencias significativas a $P < 0,05$.

2.3.2 Efecto de la temperatura, el potencial osmótico y el potencial matricial sobre la expresión relativa del gen *FUM1*

La Figura 3 muestra la expresión relativa del gen *FUM1* de las cepas FvA y FvB, cultivadas en el medio sólido inductor de la síntesis de fumonisinas durante 10 días, en respuesta cambios en el potencial hídrico (-0,7; -2,8; -7,0 y -9,8 MPa), osmótico (iónico y no iónico) y matricial, a 15 y 25 °C. Los valores obtenidos para el gen *FUM1* fueron normalizados con los valores de C_T obtenidos para las amplificaciones del cDNA del gen *TUB2*, llevadas a cabo en la misma placa. Los valores representan el número de veces que *FUM1* se expresó en cada tratamiento, comparado con su calibrador, que fue su correspondiente medio control (-0,7 MPa) a 25 °C para cada uno de los aislamientos.

Los resultados mostraron influencia de la temperatura sobre los niveles de expresión del gen *FUM1*. Los efectos de cada tratamiento sobre los niveles de expresión de este gen reflejaron a una mayor inducción a 25 °C que a 15 °C, en ambas cepas.

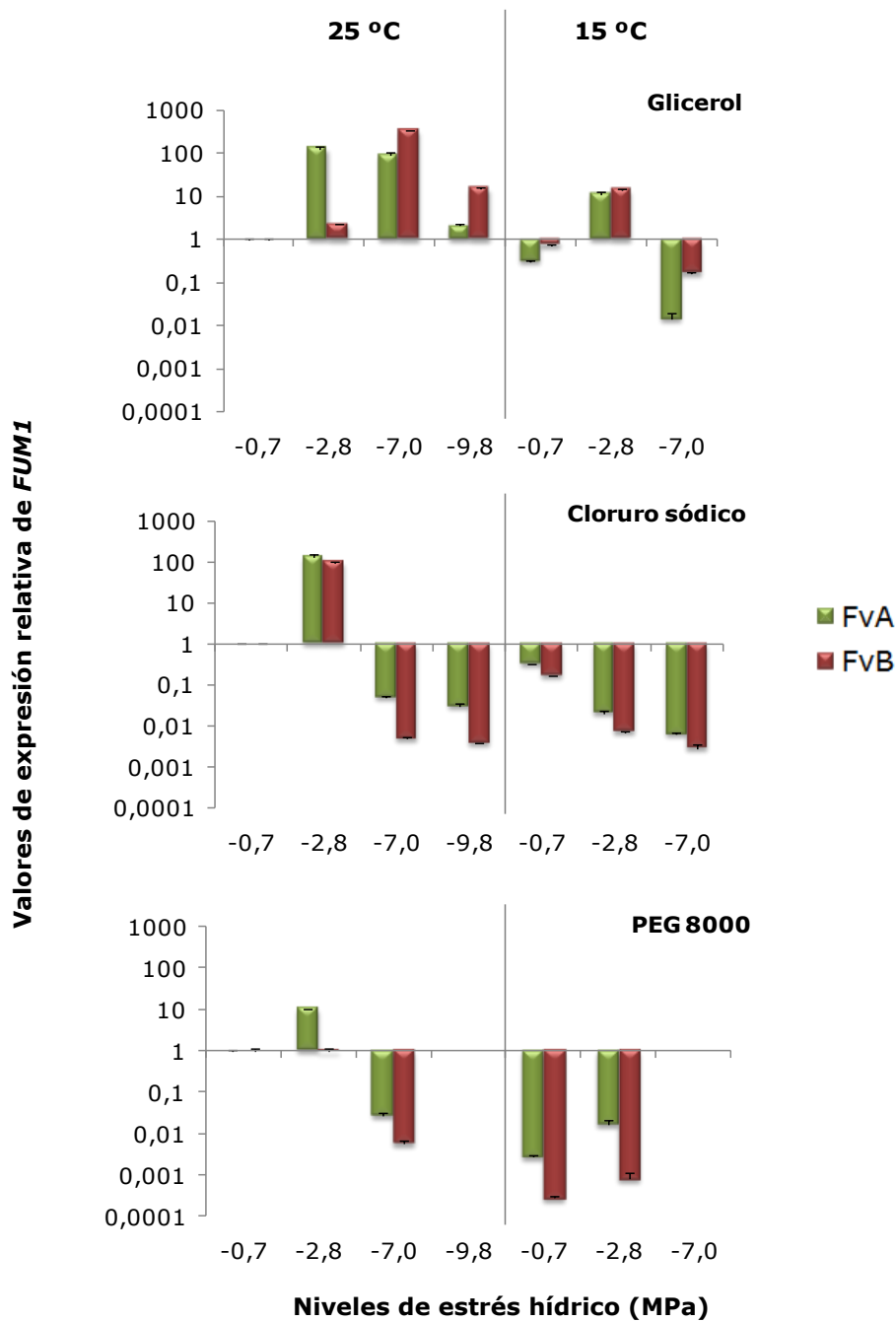


Figura 3: Representación gráfica de los valores de expresión relativos del gen *FUM1* en respuesta a glicerol o NaCl para el potencial osmótico, y para el potencial matricial en FvA (■) y FvB (■), a 25 y 15 °C durante 10 días de incubación. Los niveles de expresión son relativos al calibrador elegido, que en cada tratamiento y para cada cepa fue el medio control (-0,7 MPa) a 25 °C. Al calibrador se le asignó el valor de 1. Los resultados corresponden a la media de las tres réplicas. Se representan las barrar de error.

De la misma manera que para la tasa de crecimiento, se realizó un ANOVA para cada temperatura con el fin de analizar el efecto de cada uno de los factores por separado y de sus interacciones sobre la expresión relativa del gen *FUM1*. El ANOVA realizado para 25 °C mostró la existencia de efectos estadísticamente significativos para cada uno de los factores considerados, excepto cuando se trataba del factor cepa o la interacción entre cepa y tipo de potencial hídrico (Tabla 5). Ambas cepas mostraron patrones similares en respuesta a cada tratamiento. Sin embargo, el efecto del tratamiento del soluto no iónico en comparación con los efectos del soluto iónico y del tratamiento del potencial matricial, mostraron diferencias significativas sobre la expresión relativa del gen estudiado. Bajo la imposición del soluto no iónico, se observó la inducción de los niveles de expresión relativa del gen *FUM1* en todos los niveles de estrés hídrico estudiados. Por el contrario, en los tratamientos donde se impuso el soluto iónico y el potencial matricial, la expresión relativa de *FUM1* únicamente fue inducida a -2,8 MPa, reduciéndose a menores niveles de potencial hídrico.

Fuente de variación	Grados de libertad	Media de cuadrados	Estadístico F-Snedecor
Cepa	1	35,188.610	0,916
Nivel de estrés hídrico	3	141,253.453	3,679*
Tipo de potencial hídrico	2	175,702.621	4,576*
Cepa x nivel de estrés hídrico	3	135,309.847	3,524*
Cepa x tipo de potencial hídrico	2	94,435.582	2,459
Nivel de estrés hídrico x tipo de potencial hídrico	5	180,926.662	4,712*
Cepa x nivel de estrés hídrico x tipo de potencial hídrico	5	124,496.730	3,242*

Tabla 5: ANOVA que describe el efecto de los factores: cepa (FvA y FvB), niveles de estrés hídrico (-0,7; -2,8; -7,0 y -9,8 MPa), tipo de potencial hídrico (osmótico – iónico y no iónico- y matricial) y sus interacciones sobre la expresión relativa del gen *FUM1* a 25°C. * Valores con diferencias significativas a P<0,05.

La Tabla 6 muestra el ANOVA realizado para cada uno de los factores y sus interacciones a 15 °C. Se observó que sólo existieron diferencias significativas entre los factores: nivel de estrés hídrico y tipo de potencial hídrico, además de su propia interacción. De manera similar a los resultados obtenidos a 25 °C, a 15 °C se observó cómo los perfiles de expresión relativa del gen de ambas cepas y para cada uno de los tratamientos fueron similares, siendo el tratamiento más permisivo el del soluto no iónico (glicerol), mostrando mayor inducción del gen a -2,8 MPa. En los tratamientos donde se realizaron cambios de potencial hídrico usando el soluto iónico como respuesta a Ψ_s o PEG 8000 como respuesta a Ψ_m , la expresión del gen se redujo en los dos casos.

Fuente de variación	Grados de libertad	Media de cuadrados	Estadístico F-Snedecor
Cepa	1	7,176	0,537
Nivel de estrés hídrico	2	249,480	18,679*
Tipo de potencial hídrico	2	282,567	21,156*
Cepa x nivel de estrés hídrico	2	9,191	0,688
Cepa x tipo de potencial hídrico	2	13,295	0,995
Nivel de estrés hídrico x tipo de potencial hídrico	3	279,459	20,923*
Cepa x nivel de estrés hídrico x tipo de potencial hídrico	3	9,717	0,728

Tabla 6: ANOVA que describe el efecto de los factores: cepa (FvA y FvB), niveles de estrés hídrico (-0,7; -2,8; -7,0 y -9,8 MPa), tipo de potencial hídrico (osmótico – iónico y no iónico- y matricial) y sus interacciones sobre la expresión relativa del gen *FUM1* a 15°C. * Valores con diferencias significativas a $P < 0,05$.

El error típico de la media de los valores de las dos amplificaciones por cada muestra realizadas en la misma placa, fue muy reducido (alrededor de 0,12%) y nunca fue mayor del 2%. Este resultado indica la alta reproducibilidad de la técnica de RT-PCR a tiempo real empleada.

2.3.3 Efecto de la temperatura y el potencial osmótico no iónico sobre la tasa de crecimiento

Se determinó el perfil bidimensional de la tasa de crecimiento de la cepa FvA, en el medio sólido inductor de la síntesis de fumonisinas como respuesta a cambios en el potencial hídrico (-0,7, -2,8 y -7,0 MPa) usando glicerol y a cinco temperaturas diferentes (de 15 a 35°C) durante 10 días.

Las condiciones óptimas de crecimiento (5-6 mm/día) para FvA estuvieron comprendidas entre 24 y 35 °C de temperatura y entre -0,7 y -4,0 MPa de potencial hídrico (Figura 4). El crecimiento más lento (1-3 mm/día) se observó por debajo de -7,0 MPa en todas las temperaturas, aunque las temperaturas más restrictivas para su crecimiento fueron menores de 17 °C o mayores de 35 °C.

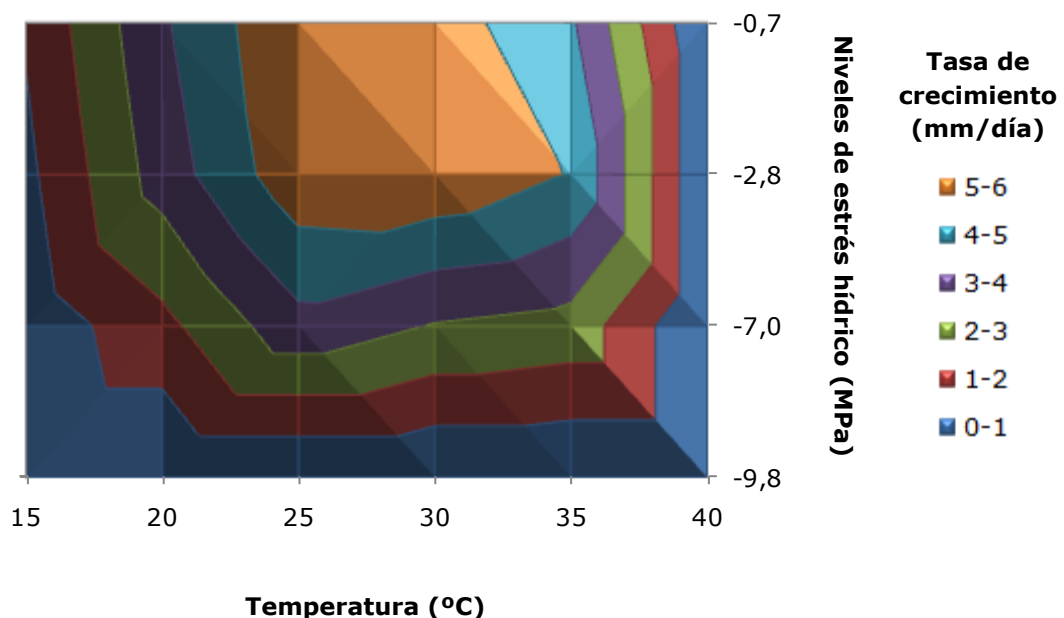


Figura 4: Perfil bidimensional que muestra la influencia de la temperatura y del potencial osmótico (no iónico) sobre la tasa de crecimiento en FvA, cultivada en el medio sólido inductor de la síntesis de fumonisinas durante 10 días. La tasa de crecimiento en cada punto está determinada por el valor medio de las tres réplicas.

Se realizó un ANOVA para analizar el efecto de cada uno de los factores considerados en este estudio (temperatura y niveles de estrés hídrico) sobre la tasa de crecimiento, además de la interacción entre ambos factores (Tabla 7). Ambos factores y su interacción mostraron efectos estadísticamente significativos sobre la tasa de crecimiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	Media de cuadrados	Estadístico F-Snedecor
Temperatura	4	146,798	886,07*
Nivel de estrés hídrico	2	89,0457	537,48*
Temperatura x nivel de estrés hídrico	8	4,35065	26,26*

Tabla 7: ANOVA que describe el efecto de la temperatura (15, 20, 25, 30 y 35°C) y de los niveles de estrés hídrico como potencial osmótico no iónico (-0,7; -2,8 y -7,0 MPa) además de su interacción, sobre la tasa de crecimiento de FvA. * Valores con diferencias significativas a $P < 0,05$.

2.3.4 Efecto de la temperatura y el potencial osmótico no iónico sobre la expresión relativa del gen *FUM1*

En la Figura 5 se muestra la expresión relativa del gen *FUM1* de la cepa FvA, en el medio sólido inductor de la síntesis de fumonisinas como respuesta a cambios en el potencial hídrico (-0,7; -2,8 y -7,0 MPa), usando glicerol como soluto no iónico y a cinco temperaturas diferentes (de 15 a 35 °C) durante 10 días. Los valores obtenidos para el gen *FUM1* fueron normalizados con los valores de C_T obtenidos para las amplificaciones del cDNA del gen *TUB2*, llevadas a cabo en la misma placa. Los valores representan el número de veces que *FUM1* se expresó en cada nivel de potencial hídrico, comparado con su calibrador que fue el cultivo incubado a 15 °C en cada uno de los potenciales.

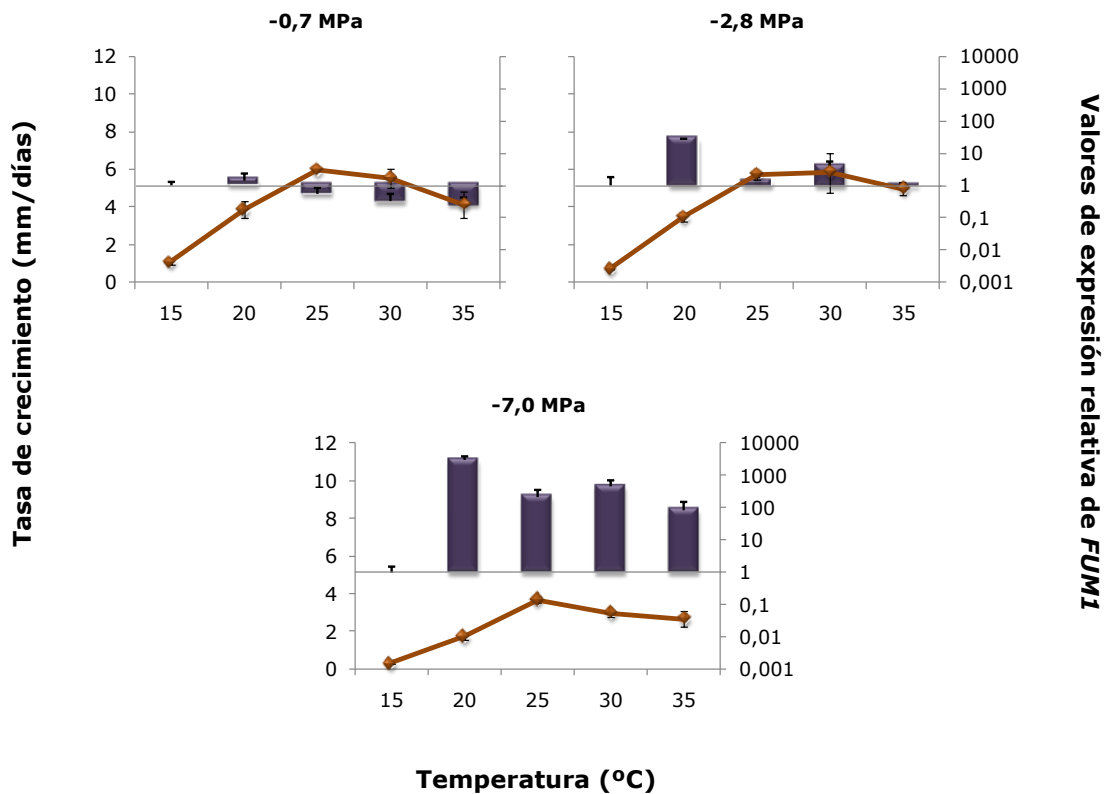


Figura 5: Comparación de la tasa de crecimiento (◆) con la inducción de la expresión relativa del gen *FUM1* (■) en respuesta al potencial osmótico producido por el soluto no iónico en FvA, durante 10 días de incubación a tres diferentes niveles de estrés hídrico (-0,7; -2,8 y -7,0 MPa) y a cinco temperaturas diferentes (15, 20, 25, 30 y 35 °C). Los niveles de expresión son relativos al calibrador elegido, que en cada caso fue el cultivo incubado a 15 °C. Al calibrador se le asignó el valor de 1. Los resultados corresponden a la media de las tres réplicas. Se representan las barras de error.

Se realizó un ANOVA para analizar el efecto de cada factor (temperatura y estrés hídrico) y su interacción sobre la expresión relativa del gen *FUM1* (Tabla 8). Los resultados obtenidos mostraron un efecto estadísticamente significativo para cada factor por separado y para su interacción. La expresión relativa del gen *FUM1*, referida a su respectivo calibrador, fue significativamente diferente entre los tres potenciales

osmóticos no iónicos. Sin embargo, en cada uno de ellos la máxima inducción se produjo a 20 °C, siendo estadísticamente significativa a -2,8 y -7,0 MPa. Los niveles de expresión de *FUM1* a -0,7 MPa estuvieron inducidos solo a 20 °C. El aumento el estrés hídrico (a valores de -2,8 y -7,0 MPa) dio lugar a una mayor inducción de *FUM1* en todas las temperaturas analizadas. Por lo tanto, la inducción mayor del gen *FUM1* se produciría a 20 °C y a menores potenciales osmóticos (-7,0 MPa), donde la tasa de crecimiento fúngico fue menor.

Fuente de variación	Grados de libertad	Media de cuadrados	Estadístico F-Snedecor
Temperatura	4	3,78524	27,26*
Nivel de estrés hídrico	2	4,16745	30,01*
Temperatura x nivel de estrés hídrico	8	1,65083	11,89*

Tabla 8: ANOVA que describe el efecto de la temperatura (15, 20, 25, 30 y 35°C) y de los niveles del potencial osmótico no iónico (-2,8 y -7,0 MPa) además de su interacción, sobre la expresión relativa del gen *FUM1* de FvA. * Valores con diferencias significativas a $P < 0,05$.

Sin embargo, el crecimiento óptimo se produjo a 25 °C (Figura 5). Por tanto, parece existir un desacoplamiento entre crecimiento fúngico e inducción de la expresión de *FUM1*, que aumentaba a medida que el estrés hídrico era mayor.

El error típico de la media de los valores de cada muestra de cDNA amplificada en la misma placa, fue muy reducido (alrededor de 0,1%), y nunca fue superior al 1%.

2.3.5 Efecto del potencial osmótico iónico sobre el crecimiento y la expresión relativa temporal del gen *FUM1*

La Figura 6 muestra el efecto que produjeron los cambios en el potencial hídrico (-0,7; -2,8; -7,0 y -9,8 MPa), usando el soluto iónico, sobre la tasa de crecimiento, expresada como el área de la masa fúngica y sobre la expresión relativa del gen *FUM1*, de la cepa FvA durante 3, 6, 9 y 12 días a 25 °C. Los valores obtenidos para el gen *FUM1* fueron normalizados con los valores de C_T obtenidos para las amplificaciones del cDNA del gen *TUB2*, llevadas a cabo en la misma placa. Los valores representan el número de veces que *FUM1* se expresó en cada tratamiento, comparado con su calibrador que fue el cultivo de los 3 días.

Los resultados indicaron un incremento de la expresión del gen *FUM1* a lo largo del tiempo en respuesta a la disminución del potencial osmótico iónico, concretamente de -7,0 a -9,8 MPa, mientras que a -0,7 MPa se observó una reducción en la expresión relativa de *FUM1*. En el caso de -2,8 MPa de potencial osmótico iónico, la inducción de *FUM1* se mantuvo constante a lo largo del tiempo.

Si se observa la tasa de crecimiento en los diferentes niveles de potencial hídrico, se comprobó que al aumentar el estrés hídrico la tasa de crecimiento disminuye considerablemente, mostrando los menores valores a -9,8 MPa.

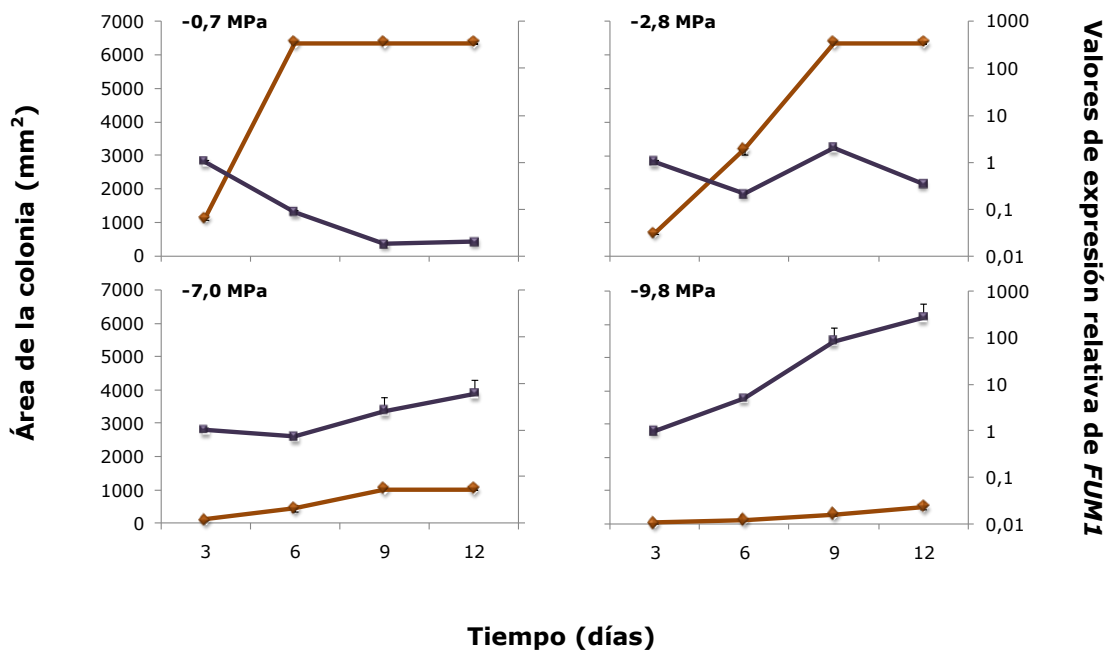


Figura 6: Estudio temporal (3, 6, 9 y 12 días) del efecto del potencial osmótico iónico sobre el tamaño relativo de la masa fúngica (♦) y sobre la expresión relativa del gen *FUM1* (■) en la cepa FvA a 25 °C a cuatro niveles de potencial hídrico (-0,7; -2,8; -7,0 y -9,8 MPa). Los niveles de expresión son relativos al calibrador elegido, que es cada caso fue el cultivo de 3 días. Al calibrador se le asignó el valor de 1. Los resultados representados corresponden a la media de las tres réplicas. Se representan las barras de error.

2.4 DISCUSIÓN

Los factores ambientales más importantes que condicionan el crecimiento fúngico y la producción de la toxina son el estrés hídrico y la temperatura. El estudio de estos factores en *F. verticillioides* mediante experimentos *in vitro*, permite conocer o predecir la distribución de esta especie y su respuesta al someterse a diferentes condiciones ambientales. Además, la predicción de su distribución está relacionada con la predicción del riesgo potencial de encontrar fumonisinas sobre el cereal.

Uno de los objetivos planteados en este capítulo fue estudiar la influencia de la temperatura y del estrés hídrico sobre la tasa de crecimiento en *F. verticillioides*. La respuesta de dos cepas de esta especie de *Fusarium* a cambios de estrés hídrico, mostró patrones similares en cuanto a la reducción del crecimiento en las temperaturas analizadas. Sin embargo, los ANOVAs realizados mostraron diferencias significativas entre las cepas. Esto sugiere la existencia de un grado de variabilidad intra-específica como respuesta a las condiciones ambientales. Las cepas objeto de estudio están catalogadas como haplotipos diferentes tras analizar la secuencia parcial de la región IGS, la secuencia parcial del gen *EF-1 α* y la presencia de los alelos de compatibilidad sexual, siendo FvA el haplotipo 6 y FvB el haplotipo 1, dentro de un mismo campo de maíz (Jurado, 2006). Además, estas diferencias podrían estar relacionadas con la capacidad de sintetizar y acumular solutos intracelulares ("solutos compatibles"), los cuales podrían reducir los efectos negativos del estrés hídrico ambiental al cual están sometidas (Magan, 2001).

Por otro lado, estas cepas de *F. verticillioides* fueron más tolerantes al estrés osmótico que al estrés producido por el potencial matricial. Resultados similares se han obtenido para otros ascomicetos como *Aspergillus flavus* (Nesci *et al.*, 2004; Giorni *et al.*, 2008). Por el contrario, estudios con *F. culmorum* o *F. graminearum* describieron que el crecimiento fúngico estaba afectado de manera similar por ambos tipos de potenciales hídricos (Magan, 1988; Ramírez *et al.*, 2004b). Estos resultados son importantes si consideramos el ciclo de vida de *F. verticillioides* como patógeno de maíz. Magan y Lynch (1986), describieron que el potencial matricial es el componente más importante del potencial de agua total, presente en el suelo y en residuos de cosecha. El crecimiento efectivo en el suelo y la colonización de los residuos de la cosecha es una fase crítica que determina el reservorio de inóculo del patógeno disponible para la siguiente infección. Por otro lado, la baja tolerancia que *F. verticillioides* presenta al estrés ocasionado por disminución de los niveles del potencial matricial, estaría relacionado con la gran dificultad de extraer agua de los poros del suelo y del limitado transporte de solutos que existe a través de él

(Adebayo y Harris, 1971). Como consecuencia de esto, la colonización del suelo podría ocurrir bajo un rango pequeño de potenciales de agua. Por el contrario, el rango de potenciales de agua durante la colonización de las mazorcas de maíz, es más amplio y se atribuye principalmente al potencial osmótico (Giorni *et al.*, 2008).

Las condiciones óptimas de crecimiento para *F. verticillioides* fueron bastante amplias (entre 24 °C y 35 °C y desde -0,7 hasta aproximadamente -4,0 MPa), aunque pudo crecer en un gran rango de condiciones ambientales. Marín *et al.* (2004) describió que el crecimiento de esta especie estaría comprendido entre unos grandes rangos de temperatura (4 a 37 °C), mostrándose crecimiento más lento en los valores más marginales. Además, se podría iniciar a valores de -14,0 MPa, cuando la temperatura estuviera dentro de sus valores óptimos. El crecimiento fúngico disminuyó acusadamente a altos niveles de estrés hídrico y bajas temperaturas, lo que concuerda con otros estudios previos (Marín *et al.*, 1995). Nuestros resultados sugieren que *F. verticillioides* es capaz de crecer en un gran rango de condiciones ambientales, preferentemente a altas temperaturas y altos niveles de estrés hídrico. Estos datos corroboran estudios epidemiológicos que asocian esta especie de *Fusarium* a zonas geográficas en las que se producen cambios en la disponibilidad de agua y altas temperaturas (entre 30 y 35 °C) (Desjardins *et al.*, 2000; De Souza y Formento, 2004; Desjardins *et al.*, 2007; Cavaglieri *et al.*, 2009). Así, la alta incidencia de *F. verticillioides* en los campos de maíz en países del Sur de Europa, más concretamente en el Centro y Sur de España, donde nuestro grupo ha realizado varios estudios (Jurado *et al.*, 2004, 2006b), puede estar relacionado con las condiciones ambientales de estas regiones, donde los veranos son más secos y cálidos. Además, las fases finales de los cultivos de maíz, antes del almacenamiento, se producen en el mes de agosto, cuando la temperatura es alta y la humedad es extremadamente baja (Logrieco *et al.*, 2002; Soldevilla *et al.*, 2005; Jurado *et al.*, 2006b; Medina *et al.*, 2006). A pesar de que el maíz no es un cereal muy común en el Centro o en el Sur de España, nuevas variedades y nuevos métodos de cultivo permiten el desarrollo de cultivares de maíz en estas regiones. Las

condiciones ambientales en estas áreas son claramente diferentes a aquellas del Norte de Europa con temperaturas más bajas y niveles de humedad mayores.

Sólo algunos estudios han analizado la influencia que ejercen los factores ambientales sobre la expresión de los genes principales de la ruta de biosíntesis de las toxinas más importantes producidas por hongos toxígenos y fitopatógenos (Feng y Leonhard, 1998; Geisen, 2004; O'Callaghan *et al.*, 2006; Schmidt-Heydt y Geisen, 2007; Schmidt-Heydt *et al.*, 2008). Por ello, en este capítulo se demuestra la influencia que tienen el estrés hídrico y la temperatura sobre los niveles del transcrito *FUM1* en *F. verticillioides*. López-Errasquín *et al.* (2007) describió la existencia de correlación positiva entre la producción de fumonisina B₁ y los niveles de expresión de *FUM1* mediante RT-PCR a tiempo real en *F. verticillioides*. Estudios previos demostraron que la regulación de este gen (*FUM1*) se produce a nivel transcripcional (Proctor *et al.*, 1999; Seo *et al.*, 2001). Geisen (2004) puso a punto un protocolo de RT-PCR a tiempo real específico para el gen OTA poliquétido sintasa (*Pnotapks*), demostrando correlación positiva entre la inducción de este gen, regulada a nivel transcripcional, con la biosíntesis de ocratoxina A (OTA) en *Penicillium nordicum*. Además, este protocolo le permitió estudiar la influencia de los factores ambientales sobre la inducción de los genes principales relacionados con la biosíntesis de OTA. Por ello, y de manera similar, la cuantificación de los niveles de expresión del gen *FUM1* mediante RT-PCR a tiempo real permitió evaluar de una manera sensible y específica los efectos que ejercen los factores ambientales sobre la biosíntesis de fumonisinas.

En el caso del gen principal de la ruta de biosíntesis de las fumonisinas (*FUM1*), los niveles de transcrito parecen estar más influenciados por el estrés hídrico que por la temperatura, aunque el mayor efecto parece depender del tipo de estrés hídrico impuesto. Estudios previos sugieren que el descenso en la actividad de agua a -2,8 MPa induce la máxima acumulación de toxina *in vitro* (Marín *et al.*, 1995). La expresión del gen *FUM1* en *F. verticillioides* sigue este patrón, bajo condiciones de

estrés hídrico suaves, especialmente a 25 °C en todos los tratamientos. Sin embargo, la inducción se mantiene a altos niveles de estrés hídrico a 25 °C, mientras que a la temperatura más baja (15 °C) solo se mantiene a -2,8 MPa, en el caso del tratamiento con glicerol. Por el contrario, la inducción de *FUM1* se vio afectada de manera diferente por la imposición del potencial osmótico iónico y del potencial matricial en ambas temperaturas, manteniéndose -2,8 MPa como el nivel de potencial de máxima inducción. Se ha demostrado que en algunas especies fúngicas el crecimiento es más sensible al estrés producido por el soluto iónico (cloruro sódico) o por el potencial matricial, que por el soluto no iónico (glicerol) (Ramírez *et al.*, 2004b; Giorni *et al.*, 2008). Por tanto, los diferentes tratamientos aplicados podrían influenciar de diferente manera a los genes responsables de estas funciones o de otras que son clave y que están relacionados con las síntesis de toxinas, obteniéndose diferencias en su expresión. Este hecho podría estar relacionado con la acumulación intracelular de ciertos polioles (que tienen un papel osmorregulador y protegen a la célula de cambios en el estrés hídrico, entre otros factores de estrés), que pueden intervenir en funciones bioquímicas, enzimáticas, incluso en funciones relacionadas con la expresión génica (Nesci *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2004b). Sin embargo, existen otros ascomicetos como *P. nordicum*, en los que incrementos en la concentración de cloruro sódico producen una estimulación del crecimiento fúngico y en el aumento de la cantidad de OTA extracelular (Geisen, 2004).

La temperatura de máxima inducción del gen *FUM1* en los tres niveles de estrés hídrico fue de 20 °C, temperatura subóptima para su crecimiento. Esto sugiere que no es necesario que se produzcan unas condiciones óptimas de crecimiento (25 °C) para que se induzca la expresión del gen *FUM1*, confirmando una cierta preferencia de temperatura de inducción máxima para este gen. Schmidt-Heydt *et al.* (2008) describieron una situación similar en otras especies fúngicas toxígenas, tales como *F. culmorum* (productor de tricotecenos), *A. parasiticus* (productor de aflatoxinas) y *P. verrucosum* (productor de ocratoxinas). Además, otros estudios han determinado que el rango óptimo de temperaturas a las que se produciría la máxima cantidad de fumonisina en esta especie se

encuentra entre 20 y 30°C (Marín *et al.*, 2004). Así, la producción de fumonisinas estaría afectada por las variaciones cíclicas de temperatura que se producen en el campo durante un día completo, produciéndose alteraciones en el patrón de expresión del gen y por tanto en la acumulación final de la toxina. Además, la máxima inducción del gen *FUM1* se produce cuanto mayor es el estrés hídrico. Factor que se ha descrito como una de las principales variables que influyen en la producción de fumonisinas en esta especie (Marín *et al.*, 2004). Esto sugiere que al producirse un aumento paulatino del estrés hídrico, bajo un rango de temperaturas óptimas o subóptimas para el crecimiento de *F. verticillioides* (20-30 °C), tendría lugar una acumulación mayor de fumonisinas sobre el cereal.

El estudio cinético confirmó la importancia del estrés hídrico sobre la inducción del gen principal en la ruta de biosíntesis de las fumonisinas en *F. verticillioides*. Los resultados indicaron una posible independencia entre la tasa de crecimiento y la expresión de *FUM1*, debido a que un incremento de la biomasa fúngica estuvo relacionada con un aumento o con una disminución de la expresión de *FUM1*, según el nivel de estrés hídrico impuesto. La expresión de *FUM1* se mantuvo constante a -2,8 MPa de potencial hídrico. Esto sugiere, que las condiciones en las que exista estrés hídrico suave, serían en las que se esperaría una mayor acumulación de la toxina. Sin embargo, cuando aumentó el estrés hídrico, aumentó la inducción de *FUM1* aunque su crecimiento estuvo limitado. Esto podría dar lugar a una acumulación de fumonisinas a lo largo del tiempo sin que tenga que existir un aumento en la biomasa fúngica. Bajo condiciones naturales, el estrés hídrico aumenta progresivamente durante la maduración de la mazorca, lo que puede llegar a ser un factor crítico que afecte la acumulación de fumonisinas en *F. verticillioides*. Además, las mismas condiciones ambientales pueden alargar los periodos de estrés hídrico, influenciando de esta manera la acumulación total de fumonisinas, y por tanto, la biomasa fúngica no sería un indicador de la contaminación fúngica en esta especie de *Fusarium*.

En la actualidad, el papel biológico de las micotoxinas está aún por esclarecerse, aunque se han descrito ciertos casos en los que las micotoxinas están relacionadas con la patogénesis, como por ejemplo el caso de DON y *F. graminearum* (Desjardins *et al.*, 1996b). En el caso de las fumonisinas, recientes estudios sugieren que la producción de estas toxinas por *F. verticillioides* es necesaria para el desarrollo de la enfermedad en maíz (Glenn *et al.*, 2008). Durante la colonización de un determinado hospedador vegetal, existe una comunidad de especies fúngicas que compiten por los nutrientes y por el espacio existente. En este escenario, estrategias relacionadas con las diferentes capacidades nutricionales (Wilson y Lindow, 1994) y/o la producción de metabolitos secundarios, como las micotoxinas, podría conferir ciertas ventajas para poder ocupar o conservar un nicho determinado. En este sentido, las micotoxinas podrían considerarse como factores de competencia (antagonistas químicos). No existen muchas evidencias acerca de esto, sin embargo existen estudios de competencia de especies fúngicas relacionadas con maíz (*F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. graminearum*, *A. flavus* y *A. parasiticus*), que sugieren que las fumonisinas podrían jugar un papel importante en la interacción entre ellas (Marín *et al.*, 2004). Otros estudios describen la prevalencia de *F. verticillioides* frente a *F. graminearum* o *A. flavus* bajo unas determinadas condiciones ambientales y sugieren un efecto de su interacción sobre la producción de toxinas (Zimo y Scott, 1992; Velluti *et al.*, 2000b). Por otro lado, la importancia de estas condiciones ambientales (temperatura y estrés hídrico) fue también demostrada en un reciente estudio sobre el efecto de estos factores ambientales sobre los patrones nutricionales relacionados con la fuente de carbono y el nicho que ocupan las especies *A. flavus* y *F. verticillioides* (Giorni *et al.*, 2009). Este estudio demuestra que estas dos especies utilizan diferentes fuentes de carbono y por tanto ocupan diferentes nichos en el maíz, bajo unas determinadas condiciones ambientales. Solo bajo condiciones extremas existe una dominancia de una de las especies frente a la otra. La dominancia nutricional de *F. verticillioides* ocurre a 20 °C, y principalmente a -7,0 MPa. Estas condiciones favorecen la inducción de la expresión de *FUM1*, y al

mismo tiempo las que limitan el crecimiento de *F. verticillioides*. Por tanto, es posible que esta inducción y la consecuente producción de fumonisinas le podría otorgar ventajas de permanencia y dominancia frente *A. flavus*. Esto sugiere que esta estrategia permitiría una mejor adaptación de *F. verticillioides* al maíz. Así, la regulación de la biosíntesis de fumonisinas jugaría como ventaja adaptativa en relación a un hospedador más frecuente o más típico para esta especie, como es el maíz.

CAPÍTULO 3.

CAPITULO 3. EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO Y DE LA TEMPERATURA SOBRE LA TASA DE CRECIMIENTO FÚNGICO Y LA EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN *FUM1* EN *Fusarium proliferatum*.

3.1 INTRODUCCIÓN

Fusarium proliferatum (Matsushima) Nirenberg MP-D (O'Donnell *et al.*, 1998b) pertenece al complejo de especies *Gibberella fujikuroi* y es una de las principales especies productoras de fumonisinas junto con *F. verticillioides*. Su correspondiente estado teleomórfico es *Gibberella intermedia* (*Gibberella fujikuroi* especie biológica o apareante D, "mating population D").

Esta especie, de la misma manera que *F. verticillioides*, es un hongo fitopatógeno ampliamente distribuido en regiones templadas (Desjardins *et al.*, 2000; De Souza y Formento, 2004; Desjardins *et al.*, 2007; Cavaglieri *et al.*, 2009). Además, su presencia es relevante en el sur de Europa (Logrieco *et al.*, 2002; Soldevilla *et al.*, 2005; Jurado *et al.*, 2006b; Medina *et al.*, 2006). *F. proliferatum*, tiene la capacidad de colonizar un amplio rango de hospedadores, como el maíz en el que causa la podredumbre de la mazorca y del tallo (al igual que *F. verticillioides*). Además, esta especie ha sido aislada entre otros de pinos, espárragos, palmeras, bananas, cítricos y otros cereales como arroz o sorgo (Leslie *et al.*, 1990; Jiménez *et al.*, 1993; Desjardins *et al.*, 2000; Elmer, 2001; Hyun *et al.*, 2000; Ocamb *et al.*, 2002; Leslie *et al.* 2004; Neumann *et al.*, 2004).

Como he comentando anteriormente, las toxinas más importantes producidas por *F. proliferatum* son las fumonisinas, las cuales son capaces de producir en grandes cantidades (Marasas *et al.*, 2001; Leslie *et al.*, 2004). La regulación de estas toxinas ocurre a nivel transcripcional (Proctor *et al.*, 1999; Seo *et al.*, 2001). López-Errasquín *et al.* (2007) demostró la existencia de correlación positiva entre la producción de fumonisina B₁ y los niveles de expresión del gen *FUM1* mediante RT-PCR a tiempo real en *F.*

verticillioides. Este hecho sugiere que podría existir correlación positiva también en *F. proliferatum*. Por ello, para la detección de los niveles de expresión del gen principal de la ruta de síntesis de esta toxina (*FUM1*), sería necesario el desarrollo de un método de RT-PCR a tiempo real.

Se han realizado estudios sobre la influencia que ejercen los factores ambientales más importantes (temperatura y estrés hídrico) en el crecimiento y la producción de fumonisinas en *F. proliferatum* (Marín *et al.*, 2004). Sin embargo, en la realización de estos estudios no se han utilizado hasta ahora los métodos basados en la expresión de los genes de biosíntesis de estas toxinas. El uso de RT-PCR a tiempo real permitiría estudiar el efecto de la temperatura y el estrés hídrico sobre la biosíntesis de fumonisinas en *F. proliferatum*. Esta estrategia nos permitiría realizar una valoración más precisa e inmediata de los efectos que estos factores ambientales tienen sobre la inducción de estas toxinas y además, nos permitiría establecer estrategias de control y prevención para disminuir los riesgos de contaminación por estos hongos y estas toxinas en los cereales.

Los objetivos de este capítulo fueron:

- (i) Desarrollar un método de RT-PCR a tiempo real para el gen *FUM1* de *F. proliferatum* y el estudio de la posible correlación entre la expresión relativa de este gen y la producción de fumonisinas.
- (ii) Estudiar el efecto del estrés hídrico y la temperatura sobre el crecimiento fúngico en *F. proliferatum*.
- (iii) Evaluar el efecto del estrés hídrico y la temperatura sobre la expresión del gen *FUM1* en *F. proliferatum*.

3.2 MATERIAL y MÉTODOS

3.2.1 Material biológico

Las cepas utilizadas en el estudio de la correlación entre la expresión relativa del gen *FUM1* por RT-PCR a tiempo real y la producción de fumonisinas, pertenecen a la especie *F. proliferatum* y se presentan en la Tabla 1. Las primeras siete cepas, que están denominadas como "FpMM", fueron aisladas de un campo de maíz en la Comunidad de Madrid (España), en Septiembre de 2003 y se catalogaron como haplotipos diferentes tras analizar la secuencia parcial de la región IGS, la secuencia parcial del gen *EF-1 α* y la presencia de los alelos de compatibilidad sexual (*MAT-1* o *MAT-2*) (Jurado, 2006). El resto de las cepas se eligió por tener diferentes hospedadores además de diferentes orígenes geográficos.

Por otra parte, la cepa utilizada para evaluar el efecto del estrés hídrico y la temperatura sobre la tasa de crecimiento fúngico y la expresión relativa del gen *FUM1*, fue FpMM1-2 (FpA) de *Fusarium proliferatum* (Figura 1). Esta cepa representa uno de los siete haplotipos utilizados en el experimento anterior. Además, fue elegida por presentar inducción de la expresión relativa del gen *FUM1*, así como niveles detectables de fumonisina B₁ extracelular (Jurado, 2006).

Los cultivos se mantuvieron en medio PDA (Scharlau Chemie, España) a 4 °C y se guardaron como suspensión de esporas en glicerol al 15% a -80 °C en el Departamento de Genética de la UCM.

Aislamiento	Especie (haplotipo)	Hospedador	Origen	MAT	Nº Acceso
FpMM1-2* (FpA)	<i>F. proliferatum</i>	<i>Zea mays</i>	Madrid (España)	1	AM422696
FpMM1-3*	<i>F. proliferatum</i>	<i>Z. mays</i>	Madrid (España)	2	AM422697
FpMM3-1*	<i>F. proliferatum</i>	<i>Z. mays</i>	Madrid (España)	1	AM422694
FpMM4-1*	<i>F. proliferatum</i>	<i>Z. mays</i>	Madrid (España)	2	AM422698
FpMM4-2*	<i>F. proliferatum</i>	<i>Z. mays</i>	Madrid (España)	1	AM422692
FpMM6-1*	<i>F. proliferatum</i>	<i>Z. mays</i>	Madrid (España)	2	AM422693
FpMM6-2*	<i>F. proliferatum</i>	<i>Z. mays</i>	Madrid (España)	1	AM422691
Fp101**	<i>F. proliferatum</i>	<i>Triticum aestivum</i>	Norte de Francia	1	AM397460
FpB15**	<i>F. proliferatum</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	Burgos (España)	2	AM397471
Gf33***	<i>F. proliferatum</i>	<i>Pinus</i> spp.	Madrid (España)	2	AM397477
ITEM 4293	<i>F. proliferatum</i> (I) ^h	<i>Chamaerops</i> spp.	Alicante (España)	N.A.	AM404122
ITEM 4306	<i>F. proliferatum</i> (VII) ^h	<i>Washingtonia</i> spp.	Tarragona (España)	2	AM404128
ITEM 1456	<i>F. proliferatum</i> (VIII) ^h	<i>Asparagus</i> spp.	Potenza (Italia)	2	AM404129
ITEM 2343	<i>F. proliferatum</i> (XIa) ^h	<i>Phoenix</i> spp.	Arabia Saudí	N.A.	AM404133

Tabla 1: Aislamientos de *F. proliferatum* analizados, indicando la especie, el hospedador, el origen geográfico, el alelo MAT y el número de acceso en la base de datos GenBank. Con un asterisco, se indican los aislamientos pertenecientes al mismo campo de maíz muestreado, con dos asteriscos, se indican otras cepas de esta especie que tiene como hospedador otros cereales. Todas ellas descritas en Jurado (2006). Con tres asteriscos se indica la cepa descrita en Mirete *et al.* (2003). Con números romanos se indican los haplotipos de *F. proliferatum* según el perfil de digestión del DNA mitocondrial (Láday *et al.*, 2004). h= haplotipo. N.A.: No se obtuvo amplificación.

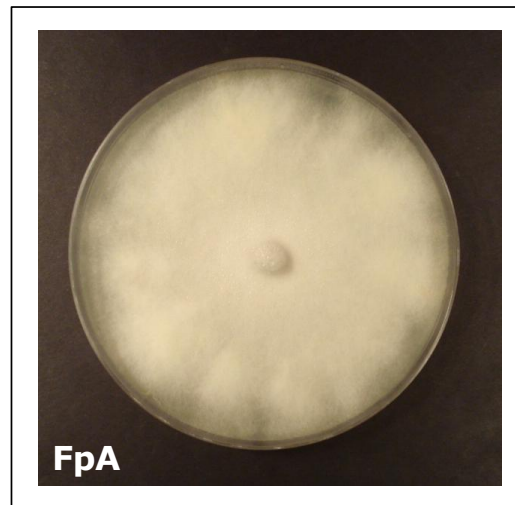


Figura 1: *F. proliferatum*. Cepa FpA cultivada en medio PDA a 25 °C durante 7 días.

3.2.2 Medio de cultivo

Para el estudio de la correlación, todas las cepas se cultivaron en el medio líquido que induce la síntesis de fumonisinas (López-Errasquín *et al.*, 2007). Su composición se describe en el capítulo 2, con la excepción de que no se añadió agar. Además, las cepas FpMM2-1, FpMM3-1 y FpMM6-1 fueron cultivadas en un medio no inductor de la síntesis de estas toxinas, para ser utilizadas como controles. Este fue el medio general de Sabouraud (Pronadisa, España). A estas cepas se las designó como FpMM2-1C, FpMM3-1C y FpMM6-1C, respectivamente.

Se prepararon matraces Erlenmeyer de 250 ml con volúmenes de 50 ml del medio de cultivo líquido inductor de la síntesis de fumonisinas o del medio de cultivo general de Sabouraud (Pronadisa, España).

Para el estudio ecofisiológico, el cultivo de la cepa FpA se llevó a cabo en el medio sólido que induce la síntesis de fumonisinas (López-Errasquín *et al.*, 2007), descrito en el capítulo 2 (apartado 2.2.2).

Este medio de cultivo, al igual que en el capítulo 2 (apartado 2.2.2), fue modificado con NaCl (solute iónico) y con glicerol (solute no iónico), para dar lugar a los siguientes niveles de potencial osmótico: -2,8; -7,0 y -9,8 MPa (Tabla 1, capítulo 2). De la misma manera, no se añadieron los solutos al medio control (-0,7 MPa). La preparación de los medios de ambos tratamientos siguió el mismo protocolo descrito en el capítulo 2 (apartado 2.2.2).

3.2.3 Condiciones de inoculación, incubación y cuantificación del contenido total de fumonisinas. Estudio de la correlación

La inoculación de los matraces se realizó con 1 ml de una suspensión de esporas que contenía 10^6 esporas/ml, en condiciones de esterilidad y por triplicado para cada cepa objeto de este estudio. La suspensión de esporas se preparó a partir de cultivos esporulados que habían crecido en medio sólido (PDA) durante un periodo de 7 días a 25 °C.

La incubación se llevó a cabo en estufa a 20 °C durante 7 días sin agitación. Una vez finalizado el periodo de incubación, el micelio se separó por filtración con una bomba de vacío a través de papel Whatman N° 1 y se conservó a -80 °C hasta el momento de la extracción de RNA. El líquido filtrado fue conservado a -20 °C hasta su análisis.

La cuantificación del contenido total de fumonisinas se realizó a partir de los líquidos recogidos por filtración (o diluciones decimales de los mismos) mediante ELISA (RIDASCREEN® Fumonisin, R-Biopharm AG, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. El límite inferior de detección del kit fue de 0,025 ppm y la tasa de recuperación fue aproximadamente de un 60% con una media del coeficiente de correlación de aproximadamente el 8%.

3.2.4 Condiciones de inoculación, incubación y medición del crecimiento fúngico. Estudio ecofisiológico

Como se ha descrito en el capítulo 2 (apartado 2.2.3), la inoculación en los experimentos con medio sólido inductor de la síntesis de fumonisinas

modificado o control, se llevó a cabo a partir de un disco de agar de 3 mm de diámetro, obtenido marginalmente del cultivo puro de FpA cultivado durante 7 días a 25 °C. Cada disco de agar se inoculó en el centro de la placa de Petri. El experimento se realizó usando glicerol. Los potenciales de agua fueron: -0,7; -2,8 y -7,0 MPa. El periodo de incubación fue de 10 días a cinco temperaturas diferentes: 15, 20, 25, 30 y 35 °C. El experimento se realizó por triplicado.

Las mediciones del crecimiento fúngico y por tanto, la obtención de la tasa de crecimiento están descritas en el capítulo 2 (apartado 2.2.3).

Además, se realizó un estudio cinético con FpA. El medio inductor de la síntesis de fumonisinas fue modificado con cloruro sódico, para dar lugar a diferentes niveles de estrés hídrico. Se realizaron tres réplicas biológicas por nivel de potencial (-0,7; -2,8; -7,0 y -9,8 MPa) que fueron incubadas durante 3, 6, 9 y 12 días a 25 °C. La inoculación y la obtención de la tasa de crecimiento se realizaron de la misma manera que en el experimento anterior.

3.2.5 Extracción de RNA total

El aislamiento de RNA total de los micelios obtenidos por filtración del experimento de correlación y de los micelios retirados con la ayuda del celofán (P400; Cannings, Ltd., Bristol., Reino Unido), se realizó de la misma manera descrita en el capítulo 2 (apartado 2.2.4).

3.2.6 Síntesis de cDNA

Las reacciones de transcripción inversa realizadas a partir del RNA total libre de DNA genómico, tratado con DNasa I, se realizaron siguiendo el mismo protocolo que el descrito en el capítulo 2 (apartado 2.2.5).

3.2.7 RT-PCR a tiempo real

La RT-PCR a tiempo real se utilizó para amplificar el gen *FUM1* y el gen *TUB2* en las diferentes cepas de *F. proliferatum* objeto de los estudios llevados a cabo en este capítulo. Para ello se utilizó la pareja de cebadores:

FUM1P2-F y FUM1P2-R que amplifica el gen *FUM1* de *F. proliferatum* (Jurado, 2006) (Tabla 2). El gen *TUB2* fue amplificado usando la misma pareja de cebadores descrita para la especie *F. verticillioides* (PQTUB-F2 y PQTUB-R2) (Tabla 2, capítulo 2).

Las reacciones de RT-PCR a tiempo real se realizaron siguiendo el mismo protocolo descrito en el capítulo 2 (apartado 2.2.6).

Gen amplificado	Nombre	Secuencia (5'-3')
Poliketido sintasa (PKS) (<i>FUM1</i>)	FUM1P2-F	CCCCATCATCCCGAGTAT
	FUM1P2-R	TGGGTCCGATAGTGATTTGTCA

Tabla 2: Secuencias de los cebadores utilizados en las reacciones de amplificación de RT-PCR a tiempo real en *F. proliferatum*.

3.2.8 Análisis cuantitativo de los datos obtenidos por RT-PCR a tiempo real

El método llevado a cabo para analizar los datos de este estudio fue el método del $\Delta\Delta C_T$, o método de cuantificación relativa de los niveles de expresión del gen problema (*FUM1*) respecto del gen de control endógeno (*TUB2*), descrito anteriormente en el capítulo 2 (apartado 2.2.7).

3.2.9 Análisis estadístico de los resultados

Una vez obtenidos los resultados de la RT-PCR a tiempo real, y los valores de ELISA obtenidos tras analizar los filtrados, se procedió a estudiar la correlación de la expresión relativa de gen *FUM1* con la producción de fumonisinas. Para ello se realizó una regresión lineal estableciendo la expresión relativa de *FUM1* frente a la cantidad de fumonisinas obtenidas en ppm. La regresión lineal se realizó usando el programa StatsGraphics Plus V.5.1 (Statistical Graphics Corp., Herndon, VA).

Por otro lado, las tres réplicas de los datos de la tasa de crecimiento y de la expresión del gen *FUM1* fueron evaluados por medio de un análisis de la varianza (ANOVA) usando el programa StatsGraphics Centurion XV.II (Statistical Graphics Corp., Herndon, VA), descrito en el capítulo 2 (apartado 2.2.8).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Detección y cuantificación relativa de la expresión del gen *FUM1* y determinación de la capacidad productora de fumonisinas en *F. proliferatum*

Se determinó la expresión del gen *FUM1* mediante RT-PCR a tiempo real y la capacidad productora de fumonisinas mediante ELISA, en diversas cepas de *F. proliferatum* procedentes de un campo de maíz de Madrid. Estas cepas fueron cultivadas en medio inductor de fumonisinas durante 7 días a 20 °C. Además, se utilizaron como controles las cepas FpMM2-1, FpMM3-1 y FpMM6-1 que también se cultivaron en el medio general de Sabouraud (Pronadisa, España).

Los resultados obtenidos sobre la expresión relativa del gen *FUM1*, usando como calibrador FpMM6-1C (por tanto, adquiriendo el valor de 1 y refiriendo el resto de los valores obtenidos a él) y la capacidad productora de fumonisinas en ppm, aparecen en la Tabla 3. La expresión del gen *FUM1* estuvo comprendida en un rango de 0,14 a 221,86; respecto del calibrador (FpMM6-1C, con valor 1). El rango de producción de la toxina estuvo comprendido entre 0,01 y 198,89 ppm. Todas las cepas de *F. proliferatum* analizadas en este estudio, producían cantidades detectables de fumonisinas mediante ELISA, excepto la cepa Gf33. Sin embargo estudios previos habían detectado producción de FB₁ y FB₂ mediante HPLC en esta cepa (Mirete *et al.*, 2003).

Con los datos obtenidos de las tres réplicas biológicas de cada aislamiento, se analizó la correlación entre la expresión del gen *FUM1* y la

producción de fumonisinas. Se obtuvieron 51 valores, en el que cada uno de ellos representa el valor de expresión del gen *FUM1* de cada réplica frente a la concentración de fumonisinas encontradas en el medio líquido correspondiente. Se realizó una regresión lineal entre la expresión relativa de *FUM1* y el valor de fumonisinas detectado. La ecuación de la recta fue:

$$Y = 7,60 + 0,67X$$

Siendo el coeficiente de correlación de 0,77. El análisis de la regresión lineal fue estadísticamente significativo ($P < 0,001$).

Cepa	Niveles relativos de expresión del gen <i>FUM1</i>	Producción de fumonisinas (ppm)
FpMM6-1C	1 ± 0,31	0,01 ± 0
FpMM3-1C	0 ± 0	0,21 ± 0
FpMM1-2C (FpA C)	0,03 ± 0,001	0,01 ± 0
FpMM1-2 (FpA)	16,67 ± 3,02	91,73 ± 6,19
FpMM1-3	35,47 ± 4,72	25,14 ± 5,12
FpMM3-1	221,86 ± 23,5	23,82 ± 9,91
FpMM4-1	36,82 ± 6,53	70,38 ± 8,21
FpMM4-2	69,97 ± 29,67	198,89 ± 40,03
FpMM6-1	0,52 ± 0,15	0,01 ± 0
FpMM6-2	43,15 ± 1,32	23,82 ± 1,32
ITEM 4293	75,95 ± 26,23	39,64 ± 6,17
ITEM 2343	4,71 ± 0,82	0,18 ± 0,05
Fp101	55,41 ± 1,22	41,48 ± 2,08
ITEM 4306	3,95 ± 0,61	6,26 ± 0,31
FpB15	53,08 ± 16,28	46,37 ± 6,75
Gf33	0,14 ± 0,06	0 ± 0
ITEM 1456	1,71 ± 0,54	0,08 ± 0,02

Tabla 3: Cuantificación relativa de la expresión del gen *FUM1* y la producción de fumonisinas de diferentes cepas de *F. proliferatum* cultivadas en medio inductor de la síntesis de fumonisinas y en medio control de Sabouraud durante 7 días a 20 °C. Los valores de expresión de *FUM1* representan el número de veces que este gen se expresa en cada una de las muestras en comparación con el calibrador FpMM6-1C (con valor 1). Los valores expuestos en esta tabla representan la media de las réplicas en la expresión del gen *FUM1* y en la producción de fumonisinas, con sus valores de error estándar respectivos.

3.3.2 Efecto de la temperatura y el potencial osmótico no iónico sobre la tasa de crecimiento

Se determinó el perfil bidimensional de la tasa de crecimiento de FpA en el medio sólido que induce la síntesis de fumonisinas como respuesta a cambios en el potencial osmótico (-0,7; -2,8 y -7,0 MPa) usando glicerol como soluto no iónico, a cinco temperaturas diferentes (de 15 a 35 °C) durante 10 días.

Las condiciones óptimas de crecimiento (5-6 mm/día) para FpA fueron entre 23 y 30 °C, y de -0,7 a -3,5 MPa de potencial osmótico (Figura 2). La tasa de crecimiento fue lenta (1-3 mm/día) a valores iguales o menores de -7,0 MPa de potencial osmótico en todas las temperaturas analizadas, observándose crecimiento más restringido a valores marginales de temperatura.

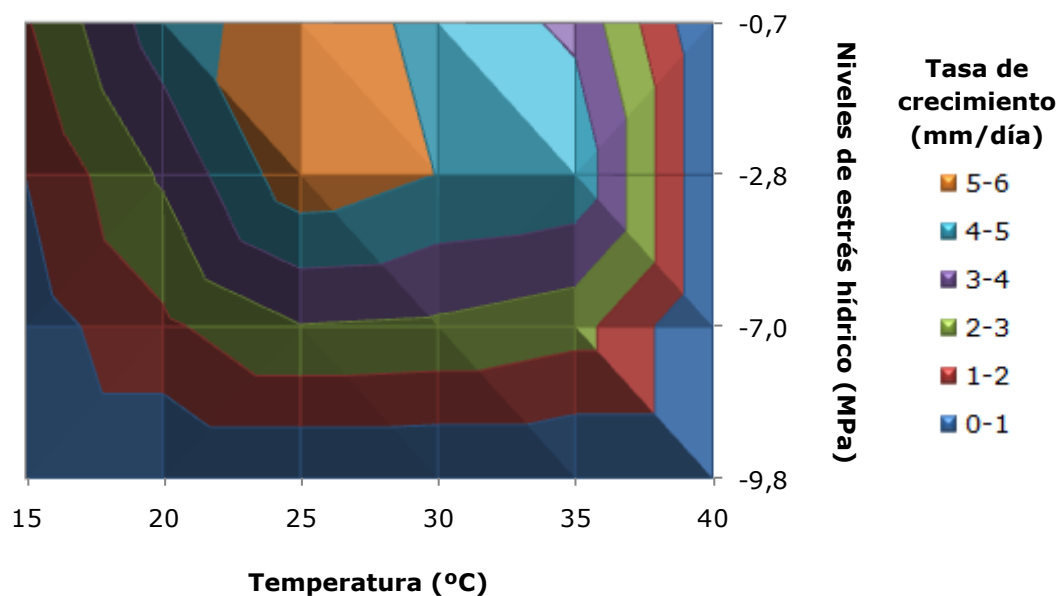


Figura 2: Perfil bidimensional que muestra la influencia de la temperatura y del potencial osmótico (con glicerol) sobre la tasa de crecimiento en FpA, cultivada en el medio sólido inductor de la síntesis de fumonisinas durante 10 días. La tasa de crecimiento en cada punto está determinada por el valor medio de las tres réplicas.

El ANOVA realizado para analizar el efecto de cada uno de los factores considerados en este estudio (temperatura y niveles de estrés hídrico) y su interacción sobre la tasa de crecimiento (Tabla 4), mostró que dichos efectos fueron estadísticamente significativos.

Fuente de variación	Grados de libertad	Media de cuadrados	Estadístico F-Snedecor
Temperatura	4	92,1769	929,55*
Nivel de estrés hídrico	2	99,5896	1004,30*
Temperatura x nivel de estrés hídrico	8	5,6849	57,33*

Tabla 4: ANOVA que describe el efecto de la temperatura (15, 20, 25, 30 y 35 °C) y de los niveles de estrés hídrico como potencial osmótico no iónico (-0,7; -2,8 y -7,0 MPa) además de su interacción, sobre la tasa de crecimiento de FpA. * Valores con diferencias significativas a $P < 0,05$.

3.3.3 Efecto de la temperatura y el potencial osmótico no iónico sobre la expresión relativa del gen *FUM1*

En la Figura 3 se muestra la expresión relativa del gen *FUM1* de FpA, en el medio sólido que induce la síntesis de fumonisinas como respuesta a cambios en el potencial osmótico (-0,7; -2,8 y -7,0 MPa) usando glicerol, a cinco diferentes temperaturas (de 15 a 35°C) durante 10 días. Los valores obtenidos para el gen *FUM1* fueron normalizados con los valores de C_T obtenidos para las amplificaciones del cDNA del gen *TUB2*, llevadas a cabo en la misma placa. Los valores representan el número de veces que *FUM1* se expresó en cada nivel de potencial hídrico, comparado con su calibrador que fue el cultivo incubado a 15 °C en cada uno de los potenciales.

Los resultados mostraron diferentes patrones de expresión en cada uno de los tres niveles de estrés hídrico. La inducción de la expresión del gen *FUM1*, pareció estar más influenciada por la temperatura, produciéndose a 20 °C la mayor y única inducción de la expresión de este gen en cada uno de los niveles de estrés hídrico. La reducción de la

expresión de *FUM1* que se observó a altas temperaturas (por ejemplo en -0,7 MPa de potencial osmótico), disminuye al aumentar el estrés hídrico (-7,0 MPa), sugiriendo que esta condición (de estrés hídrico) podría tener cierto efecto positivo en la expresión de *FUM1*.

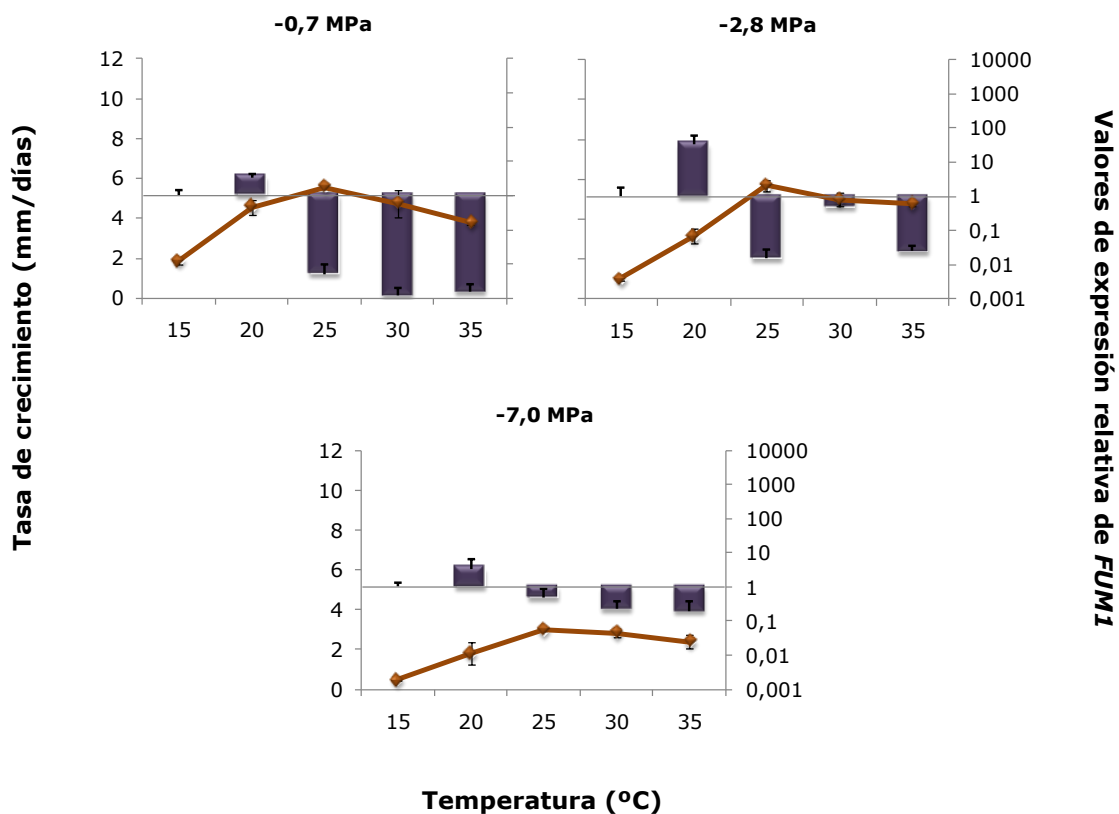


Figura 3: Comparación de la tasa de crecimiento (♦) con la inducción de la expresión relativa del gen *FUM1* (■) en respuesta al potencial osmótico producido por el soluto no iónico en FpA, durante 10 días de incubación a tres diferentes niveles de estrés hídrico (-0,7; -2,8 y -7,0 MPa) y a cinco temperaturas diferentes (15, 20, 25, 30 y 35 °C). Los niveles de expresión son relativos al calibrador elegido, que en cada caso fue el cultivo incubado a 15 °C. Al calibrador se le asignó el valor de 1. Los resultados corresponden a la media de las tres réplicas. Se representan las barras de error.

Se analizaron, mediante un ANOVA, los efectos de la temperatura, el estrés hídrico y su interacción sobre la expresión relativa del gen *FUM1* (Tabla 5). El análisis mostró un efecto estadísticamente significativo para cada factor por separado, así como para su interacción.

Fuente de variación	Grados de libertad	Media de cuadrados	Estadístico F-Snedecor
Temperatura	4	10,743	22,20*
Nivel de estrés hídrico	2	5,99196	12,38*
Temperatura x nivel de estrés hídrico	8	1,18482	2,45*

Tabla 5: ANOVA que describe el efecto de la temperatura (15, 20, 25, 30 y 35°C) y de los niveles del potencial osmótico no iónico (-0,7; -2,8 y -7,0 MPa) además de su interacción, sobre la expresión relativa del gen *FUM1* de FpA. * Valores con diferencias significativas a $P < 0,05$.

Además, como se puede observar en la Figura 3, en los tres niveles de estrés hídrico, la mayor inducción de la expresión del gen *FUM1* fue a 20 °C, mientras que la mayor tasa de crecimiento se produjo a 25 °C. Por tanto la inducción del gen *FUM1* se produciría a temperaturas subóptimas de crecimiento fúngico.

El error típico de la media de los valores de cada muestra de cDNA amplificada en la misma placa, fue por lo general muy bajo (sobre un 0,1%), y nunca fue superior al 1%, indicando la alta reproducibilidad de la técnica de RT-PCR a tiempo real.

2.3.4 Efecto del potencial osmótico iónico sobre la expresión relativa temporal del gen *FUM1*

El estudio cinético muestra el efecto que producen cambios en el potencial osmótico iónico (-0,7; -2,8; -7,0 y -9,8 MPa) sobre la tasa de crecimiento expresada como el área de la masa fúngica y sobre la expresión relativa del gen *FUM1* de la cepa FpA, durante 3, 6, 9 y 12 días a 25 °C

(Figura 4). Los valores obtenidos para el gen *FUM1* fueron normalizados con los valores de C_T obtenidos para las amplificaciones del cDNA del gen *TUB2*, llevadas a cabo en la misma placa. Los valores representan el número de veces que *FUM1* se expresó en cada tratamiento, comparado con su calibrador que fue el cultivo de los 3 días.

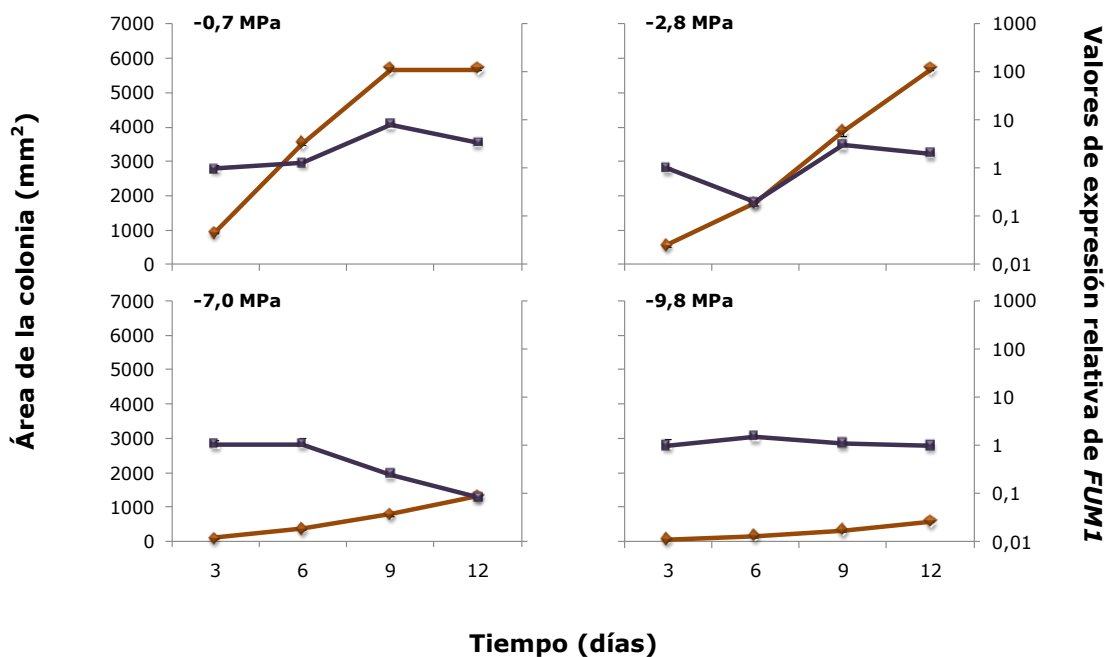


Figura 4: Estudio temporal (3, 6, 9 y 12 días) del efecto del potencial osmótico iónico sobre el tamaño relativo de la masa fúngica (♦) y sobre la expresión relativa del gen *FUM1* (■) en la cepa FpA a 25 °C a cuatro niveles de potencial hídrico (-0,7; -2,8; -7,0 y -9,8 MPa). Los niveles de expresión son relativos al calibrador elegido, que fue cada caso es el cultivo de 3 días. Al calibrador se le asignó el valor de 1. Los resultados representados corresponden a la media de las tres réplicas. Se representan las barras de error.

Los resultados indicaron que existe una síntesis constante aunque fluctuante del RNA mensajero a lo largo del tiempo y en respuesta a los diferentes niveles de estrés hídrico. Se observó cierta variabilidad, por

ejemplo el gen mostró inducción a -0,7 y -2,8 MPa de potencial osmótico en el día 9, y no hubo inducción a -2,8 MPa en el día 6 y a -7,0 MPa en los días 9 y 12.

La tasa de crecimiento en los diferentes niveles de potencial hídrico disminuyó considerablemente al aumentar el estrés hídrico, mostrando los menores valores a -9,8 MPa.

3.4 DISCUSIÓN

El primer objetivo de este capítulo fue desarrollar un ensayo específico de RT-PCR a tiempo real que permitiera estimar la capacidad productora de fumonisinas en *F. proliferatum*. El ensayo de RT-PCR a tiempo real desarrollado, está basado en el gen *FUM1* que codifica la enzima poliquétido sintasa. Esta enzima cataliza el primer paso de la ruta de biosíntesis de esta toxina en *F. verticillioides* y *F. proliferatum* (Proctor *et al.*, 1999, 2003; González-Jaén *et al.*, 2004; Desjardins y Proctor, 2007). La cuantificación de la expresión relativa del gen *FUM1* mediante este ensayo específico de RT-PCR a tiempo real mostró una correlación positiva con la producción extracelular de fumonisina B₁, valorada mediante ELISA. El valor del coeficiente de correlación (0,77) fue menor que el que se obtuvo para *F. verticillioides* en un estudio similar (López-Errasquín *et al.*, 2007). Esto podría estar relacionado con la menor eficiencia de transporte de la fumonisina B₁ fuera de la célula. Pero también, por la existencia de intermediarios de la ruta de síntesis de las fumonisinas, que pudieran estar interviniendo en la síntesis de otras toxinas o de otros metabolitos secundarios, que también produce *F. proliferatum* (Stankovic *et al.*, 2007; Proctor *et al.*, 2010). Lo cual sugeriría una interconexión de rutas metabólicas secundarias (de biosíntesis de otras toxinas o de otros metabolitos secundarios) muchas de las cuales aún no han sido elucidadas.

A pesar de que otros autores han descrito protocolos de PCR específicos para la detección de *F. proliferatum* basados en secuencias de

copia única (Mulè *et al.*, 2004) o en secuencias multicopia (Jurado *et al.*, 2006a), el ensayo descrito en este capítulo permite un diagnóstico específico de cepas de *F. proliferatum* productoras de fumonisinas metabólicamente activas, además de permitir una evaluación relativa de la capacidad productora de la toxina. Los datos obtenidos sugieren que *F. proliferatum* constituye un riesgo potencial para la salud de animales y humanos por su presencia en los alimentos, como el maíz donde la incidencia de esta especie se correlaciona con la presencia de fumonisinas (Chulze *et al.*, 1996). Además presentó una gran variabilidad intra-específica como productor de fumonisinas (Marín *et al.*, 1999; Mirete *et al.*, 2003; Jurado, 2006; Desjardins *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007) y como patógeno de diferentes hospedadores (Leslie *et al.*, 1990; Jiménez *et al.*, 1993; Desjardins *et al.*, 2000; Elmer, 2001; Hyun *et al.*, 2000; Ocamb *et al.*, 2002; Leslie *et al.*, 2004; Neumann *et al.*, 2004; Desjardins *et al.*, 2007; Marín *et al.*, 2007; Cavaglieri *et al.*, 2009).

El ensayo de RT-PCR a tiempo real específico para *F. proliferatum*, y el descrito por López-Errasquín *et al.* (2007) para *F. verticillioides*, proporcionan una herramienta molecular efectiva para discriminar estas dos especies. La importancia de esta discriminación radica en que ambas especies colonizan el mismo hospedador y tienen un perfil toxígeno diferente. De esta manera, se podría evaluar la contribución de cada una estas especies al contenido total de fumonisinas en alimentos como el maíz donde ambas pueden estar presentes de forma simultánea.

Por tanto, el ensayo de RT-PCR a tiempo real descrito en este capítulo ofrece una buena alternativa que estima el potencial de diferentes cepas de *F. proliferatum* para producir fumonisinas, reduciendo el tiempo de experimentación. Por otro lado, este ensayo permite evaluar la influencia que diferentes factores ambientales pueden tener sobre la regulación del gen *FUM1* (como hemos visto en el capítulo anterior), lo que nos proporciona un sistema de evaluación de los efectos que diversos factores abióticos tienen sobre la producción de las toxinas.

El estudio de los efectos que tienen la temperatura y el estrés hídrico sobre *F. proliferatum* indicaron que el perfil de crecimiento obtenido para esta especie fue semejante al de *F. verticillioides* en un experimento similar (capítulo 2). Estos resultados están de acuerdo con estudios previos, en los que se describe que las dos principales especies de *Fusarium* productoras de fumonisin, *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, tienen perfiles de crecimiento similares (Marín *et al.*, 2004). Sin embargo, las condiciones óptimas de crecimiento para *F. proliferatum* fueron más restringidas. De la misma manera que ocurrió con *F. verticillioides*, el crecimiento se limitó cuando las temperaturas fueron marginales a altos niveles de estrés hídrico, aunque *F. verticillioides* toleró mejor que *F. proliferatum* altas temperaturas y niveles elevados de estrés hídrico. Esto estaría relacionado con la mayor incidencia de *F. verticillioides* frente a *F. proliferatum* (que también estaría presente aunque con menor frecuencia) en cultivos de maíz en regiones donde predominan altas temperaturas y periodos de sequías severas (como el Sur de Europa) (Logrieco *et al.*, 2003; Soldevilla *et al.*, 2005; Jurado *et al.*, 2006b). Por otra parte, el último periodo del cultivo de maíz en el campo durante el cual las mazorcas maduran y su contenido de agua disminuye notablemente (de -0,7 a 14,0 MPa), favorece el establecimiento de *F. verticillioides* y *F. proliferatum* antes de la cosecha, cuando la actividad de agua es adecuada (Marín *et al.*, 2004).

Como se ha comentado en la discusión del capítulo anterior, el conocimiento del efecto que ejercen estos factores ambientales sobre la tasa de crecimiento fúngica de especies de *Fusarium* tóxicas, como *F. proliferatum* y *F. verticillioides*, es muy importante puesto que nos permite predecir el comportamiento de la distribución de estas especies según unas determinadas condiciones ambientales y en base a esto, elaborar estrategias de control y prevención de estos hongos tóxicos.

El estudio del efecto de estos factores ecofisiológicos sobre la expresión del gen *FUM1* en *F. proliferatum* reveló que, de la misma manera que ocurre en *F. verticillioides*, la temperatura de máxima inducción de este gen en los tres niveles de estrés hídrico fue de 20 °C. Esta temperatura fue

subóptima para su crecimiento (25 °C), confirmando al igual que en el caso de *F. verticillioides*, y otras especies fúngicas tóxicas una cierta preferencia de temperatura de inducción máxima (Schmidt-Heydt *et al.*, 2008). Sin embargo, los perfiles de expresión de gen *FUM1* en las dos especies de *Fusarium* productoras de fumonisinas son muy diferentes, puesto que en *F. proliferatum* únicamente hay inducción a 20 °C. A diferencia de lo que ocurre con *F. verticillioides*, no se observó inducción de la expresión de *FUM1* al aumentar el estrés hídrico, a pesar que a niveles de -7,0 MPa es cuando se producen las condiciones más favorables para producir la toxina, si se compara este potencial con los anteriores en los que el estrés hídrico es mucho menor. Esto sugiere que las variaciones cíclicas de temperatura que se producen en el campo durante un día, serían un factor fundamental que afectaría a los niveles de fumonisina acumulada, como también han señalado otros autores (Marín *et al.*, 2004). Por otro lado, el aumento del estrés hídrico podría contribuir también, aunque en el caso de *F. proliferatum* en mucha menor medida que en *F. verticillioides*.

El estudio cinético en *F. proliferatum* reveló un patrón de expresión constante del gen *FUM1* a lo largo del tiempo y en los diferentes niveles de estrés hídrico, a diferencia de lo que ocurre en *F. verticillioides*. En *F. verticillioides* un aumento del estrés hídrico produce un incremento de la expresión de *FUM1*, en periodos largos de tiempo (9 o 12 días), sin que exista un aumento de la biomasa fúngica. Esto sugiere que la contribución relativa de cada especie al contenido total de fumonisinas en el maíz sería diferente. En las primeras etapas del cultivo cuando las temperaturas son aún suaves, se esperaría que la contribución relativa por parte de ambas especies fuera similar. Sin embargo, la contribución relativa de *F. verticillioides* se incrementaría frente a la de *F. proliferatum* en las últimas etapas del cultivo en que el estrés hídrico aumenta progresivamente.

Por otro lado, la tendencia general biosintética de las fumonisinas en *F. proliferatum* fue estable a cualquier nivel de estrés hídrico. Por el contrario el crecimiento fúngico disminuyó a medida que aumentó el estrés hídrico. Estos datos sugieren que *F. proliferatum* podría estar produciendo

la toxina de manera constante. Por ello, la presencia de mayor cantidad de biomasa fúngica de esta especie estaría acompañada por una mayor presencia de fumonisinas, indicando de nuevo el riesgo potencial de que tiene *F. proliferatum* para la salud de animales y humanos.

Como hemos comentado en el capítulo 2, las fumonisinas podrían tener un papel ecológico durante el proceso de colonización del vegetal. En el caso de *F. proliferatum*, la producción de fumonisinas parece ser una característica general de esta especie (Jurado, 2006). El patrón de expresión del gen *FUM1* fue constante a lo largo del tiempo y con escasa variación según el nivel de estrés hídrico analizado, sugiriendo que la regulación de síntesis de fumonisinas tendría un patrón menos específico que en el caso de *F. verticillioides* y podría estar relacionado con el amplio rango de hospedadores que esta especie de *Fusarium* es capaz de colonizar y en los que es capaz de producir fumonisinas (Jurado *et al.*, 2010).

CAPÍTULO 4.

CAPITULO 4. EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO Y DE LA TEMPERATURA SOBRE LA TASA DE CRECIMIENTO FÚNGICA Y LA EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN *TRIS* EN *Fusarium graminearum*.

4.1 INTRODUCCIÓN

Fusarium graminearum Schwabe es un fitopatógeno cosmopolita que provoca grandes pérdidas económicas en la agricultura debido a que es uno de los principales causantes de la "fusariosis de la espiga" o "golpe blanco" ("*Fusarium Head Blight*", FHB). Esta especie provoca la disminución de la cantidad y la calidad del grano del cereal, además de contaminarlo con toxinas como tricotecenos (NIV o DON) o zearalenona (ZEA) (Snijders, 1990; Tuite *et al.*, 1990; Bai y Shaner, 1994; Bennett y Klich, 2003; Richard, 2007; Kumar *et al.*, 2008; Yazar y Omurtag, 2008). En los últimos años, se han identificado hasta 11 especies que forman parte de denominado complejo de especies de *Fusarium graminearum* que participan en el desarrollo de la FHB. La identificación de éstas, está esclareciendo la controversia que había en relación a las diferentes especies que lo forman, su diversidad quimiotípica, el rango de hospedadores que colonizan y su distribución mundial (O'Donnell *et al.*, 2000, 2004; Starkey *et al.*, 2007). El estado teleomórfico de *F. graminearum* es *Gibberella zeae*.

El ciclo de vida de *F. graminearum* está influido por factores ambientales, especialmente por estrés hídrico y temperatura (Munkvold, 2003a; Sanchis y Magan, 2004). Condiciones ambientales con temperaturas suaves y humedad relativa alta durante la etapa de floración favorecen la infección de las espigas maduras del cereal por especies de *Fusarium* spp., principalmente por *F. graminearum*, dando lugar a la fusariosis de la espiga de trigo (Gilbert y Fernando, 2004; Goswami y Kistler, 2004) o de otros cereales de grano pequeño, como la cebada (Mathre, 1997) o la avena (Tekauz *et al.*, 2004). También pueden colonizar maíz (White, 1999) donde provoca la podredumbre de la mazorca ("*Maize Red-Ear Rot*"). Además ha

sido aislado de otros cereales como el arroz y el sorgo, incluso de acacias, eucaliptus y claveles (Broadhurst, 1990; Menkir *et al.*, 1996; Nyvall *et al.*, 1999; Roux *et al.*, 2001). Esta especie que forma parte del complejo de especies de *Fusarium graminearum* es la única descrita hasta el momento con carácter cosmopolita (Logrieco *et al.*, 2003; O'Donnell *et al.*, 2004; Starkey *et al.*, 2007).

Como se ha indicado anteriormente, *F. graminearum* produce diferentes toxinas como ZEA y tricotecenos de tipo B (DON y NIV). Estos últimos, son potentes inhibidores de la síntesis proteica en eucariotas (Brown *et al.*, 2001). Además de estar considerados como factores de virulencia, favoreciendo la infección de la planta (Kang y Buchenauer, 2002; Proctor *et al.*, 2002; Langevin *et al.*, 2004). La contaminación de productos agrícolas con estas micotoxinas se ha considerado como un riesgo para la salud pública por las autoridades de Salud Alimentaria (SCF, 2000, 2002). Por ello, los niveles de DON en alimentos están legislados en la Unión Europea (Comisión Europea, 2006, 2007). En los últimos años se ha dilucidado la ruta de síntesis de los tricotecenos y se han identificado los genes que controlan la biosíntesis en *F. graminearum* (Foroud y Eudes, 2009). El gen *TRI5* codifica la enzima tricodieno sintasa, que cataliza la primera reacción de síntesis de los tricotecenos. Estudios previos han demostrado una elevada correlación positiva entre la producción de DON y la expresión de *TRI5* mediante RT-PCR ($r^2= 0.95$; Doohan *et al.*, 1999).

Como se ha comentado anteriormente, los factores ambientales son muy importantes para el crecimiento fúngico, pero además para la producción de las toxinas sobre el vegetal. Estudios previos han determinado las condiciones óptimas y marginales para el crecimiento de *F. graminearum* y para la producción de DON, y han revelado que el rango permisivo para la producción de la toxina es diferente al rango en el que se produce el crecimiento fúngico (Vesonder *et al.*, 1982; Hope y Magan, 2003; Sanchis y Magan, 2004; Hope *et al.*, 2005). Sin embargo, no se conocen datos del efecto de dichos factores ecofisiológicos sobre los genes implicados en la biosíntesis de la toxina. La aplicación de una estrategia

basada en la cuantificación de la transcripción relativa de dichos genes mediante la técnica de RT-PCR a tiempo real, de forma similar a la realizada en otras especies fúngicas toxígenas (Feng y Leonhard, 1998; Geisen, 2004; O'Callaghan *et al.*, 2006; Schmidt-Heydt y Geisen, 2007; Schmidt-Heydt *et al.*, 2008), podría aportar datos más precisos que ayuden a comprender el proceso global y establecer estrategias de control y prevención más eficaces contra *F. graminearum* y sus toxinas.

Los objetivos de este capítulo fueron:

- (i) Desarrollar un protocolo de RT-PCR a tiempo real para el gen *TRI5* de *F. graminearum*,
- (ii) Estudiar el efecto del estrés hídrico y la temperatura sobre el crecimiento fúngico en *F. graminearum*,
- (ii) Evaluar el efecto del estrés hídrico y la temperatura sobre la expresión del gen *TRI5* en *F. graminearum*.

4.2 MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1 Material Biológico

La cepa utilizada para este estudio fue L1-2/2D (FgB) de *Fusarium graminearum* (Figura 1). Esta cepa fue aislada de un campo de trigo en Lebrija, Sevilla (España), en Abril del 2003. Estudios previos han identificado esta cepa como quimiotipo productor de DON (Jurado, 2006).

Los cultivos se mantuvieron en medio PDA (Scharlau Chemie, España) a 4 °C y se guardaron como suspensión de esporas en glicerol al 15% a -80 °C en el Departamento de Genética de la UCM.

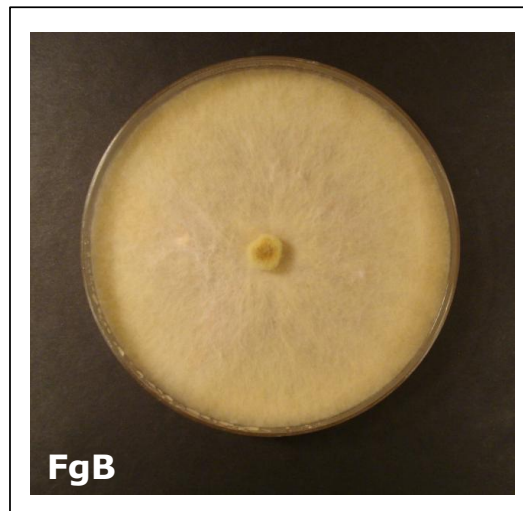


Figura 2: *F. graminearum*. Cepa FgB cultivada en medio PDA a 25 °C durante 7 días.

4.2.2 Medio de cultivo

El cultivo del hongo se llevó a cabo en un medio sólido inductor de la síntesis de tricotecenos (GYEP), que contiene: Extracto de malta (0,1%), peptona (0,1%), glucosa (0,5%) y agar (15 g/l).

El medio de cultivo anterior, al igual que en el capítulo 2 (apartado 2.2.2), fue modificado con el soluto iónico, cloruro sódico (NaCl), y con el soluto no iónico (glicerol), para dar lugar a los siguientes niveles de potencial osmótico: -2,8 y -7,0 MPa (Tabla 1, capítulo 2). De la misma manera, no se añadieron los solutos al medio control (-0,7 MPa). La preparación de los medios de ambos tratamientos siguió el mismo protocolo descrito en el capítulo 2 (apartado 2.2.2).

4.2.3 Condiciones de inoculación, incubación y medición del crecimiento fúngico

Como se describió en el capítulo 2 (apartado 2.2.3), la inoculación en los experimentos con medio sólido inductor de la síntesis de tricotecenos

modificado o control, se llevó a cabo a partir de un disco de agar de 3 mm de diámetro, obtenido marginalmente del cultivo puro de FgB que fue cultivado durante 7 días a 25 °C. Cada disco de agar se inoculó en el centro de la placa de Petri. El experimento se realizó usando el soluto no iónico (glicerol). Los niveles de potencial hídrico analizados fueron: -0,7; -2,8 y -7,0 MPa. El periodo de incubación fue de 10 días a cinco temperaturas diferentes: 15, 20, 25, 30 y 35 °C. El experimento se realizó por triplicado.

Las mediciones del crecimiento fúngico y por tanto, la obtención de la tasa de crecimiento están descritas en el capítulo 2 (apartado 2.2.3).

Además, se realizó un estudio cinético con FgB. El medio inductor de la síntesis de tricotecenos fue modificado con el soluto iónico, para dar lugar a los diferentes niveles de estrés hídrico. Se realizaron tres réplicas biológicas por nivel de potencial de agua (-0,7; -2,8 y -7,0 MPa), que fueron incubadas durante 3, 6, 9 y 12 días a 25 °C. La inoculación y la obtención de la tasa de crecimiento se realizaron de la misma manera que en el experimento anterior.

4.2.4 Extracción del RNA total

El aislamiento de RNA total de los micelios retirados con la ayuda del celofán (P400; Cannings, Ltd., Bristol., Reino Unido), se realizó de la misma manera descrita en el capítulo 2 (apartado 2.2.4).

4.2.5 Síntesis de cDNA

Las reacciones de transcripción inversa realizadas a partir del RNA total libre de DNA genómico, tratado con DNasa I, se realizaron siguiendo el mismo protocolo que el descrito en el capítulo 2 (apartado 2.2.5).

4.2.6 Diseño de cebadores para los genes *TRI5* y *TUB2* de *F. graminearum*

El diseño de cebadores para RT-PCR a tiempo real del gen *TRI5* se realizó a partir de secuencias parciales de este gen, procedentes de las principales especies de *Fusarium* productoras de tricotecenos asociadas a

cereales (Tabla 1). Estas secuencias fueron obtenidas del Genbank y alineadas con el programa MegAlign, programa incluido en el paquete Dnastar (Lasergene, Madison, WI, Estados Unidos), por el método Clustal (Wilbur y Lipman, 1983). En base a dicho alineamiento se eligieron las regiones codificadoras de *TRI5* más adecuadas en tamaño y características requeridas para los ensayos de RT-PCR a tiempo real, y se diseñó una pareja de cebadores mediante el programa Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). La pareja de cebadores elegida se localizó entre el nucleótido 577 y el 648 de un total de 1187 de gen *TRI5*. Las secuencias de esta pareja de cebadores aparecen en la Tabla 2.

Cepa	Especie	Hospedador	Origen	Nº Acceso
¹ NRRL 6394	<i>F. graminearum</i>	<i>Polypogon monspeliensis</i>	Hungría	AY102605
¹ NRRL 5883	<i>F. graminearum</i>	<i>Z. mays</i>	USA (Ohio)	AY102603
¹ NRRL 29169	<i>F. graminearum</i>	<i>T. aestivum</i>	USA (Kansas)	AY102599
¹ NRRL 28338	<i>F. pseudograminearum</i>	Suelo	Australia	AY102585
¹ NRRL 28334	<i>F. pseudograminearum</i>	<i>Medicago</i> spp.	Sudáfrica	AY102583
¹ NRRL 3288	<i>F. culmorum</i>	-	-	AY102602
¹ NRRL 25475	<i>F. culmorum</i>	<i>H. vulgare</i>	Dinamarca	AY102571
-	<i>F. poae</i>	-	-	AY130294
² NRRL 3299	<i>F. sporotrichioides</i>	-	-	AF364179

Tabla 1: Cepas de *Fusarium* de las que se obtuvo la secuencia del gen *TRI5* en el Genbank, hospedador, origen y número de acceso a la base de datos (Genbank). "1": cepas descritas por O'Donnell *et al.* (2000) por primera vez, siendo Ward *et al.* (2002) quien caracterizó el gen *TRI5*. "2": cepa descrita por Hohn *et al.* (1989).

La especificidad de esta pareja de cebadores se determinó mediante PCR convencional con DNA genómico de cepas del complejo de especies de *Fusarium graminearum* (O'Donnell *et al.*, 2004; StarKey *et al.*, 2007) de diversas procedencias geográficas y otras especies de *Fusarium* (*F. culmorum*, *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. equiseti*, *F. proliferatum*, y *F. verticillioides*) (Tabla 3).

Gen amplificado	Nombre	Secuencia (5'-3')
Tricodieno sintasa (<i>TRI5</i>)	PQTRI5-MF	GATCTGATGACTACCCTCAATTCCTT
	PQTRI5-MR	GCCATAGAGAAGCCCCAACAC
β -tubulina (<i>TUB2</i>)	TUB2PQ-PF	CCGAGGCCCGAGTCCAACCT
	TUB2PQ-PR	GGCGTCTTGGTATTGCTGGTA

Tabla 2: Secuencias de los cebadores utilizados en las reacciones de amplificación de RT-PCR a tiempo real en *F. graminearum*.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen total de 25 μ l, con los mismos volúmenes, para los reactivos, descritos en el capítulo 2 (apartado 2.2.5), excepto que en este caso se añadieron 100 ng en 3 μ l de DNA genómico, en vez de 0,5 μ l de cDNA. La reacción de PCR convencional se llevó a cabo en un termociclador "Mastercycler gradient" (Eppendorf, Alemania). El programa de amplificación constaba de un paso previo de desnaturalización a 94 °C durante 120 segundos, seguido de 35 ciclos de amplificación. Cada ciclo de amplificación consistió en un paso de 35 segundos a 94 °C (desnaturalización), 30 segundos a 64 °C (hibridación) y 30 segundos de extensión a 72 °C. El programa terminaba con un ciclo final de extensión de 10 minutos a 72 °C y parada a 4 °C. Los productos de PCR se observaron mediante electroforesis estándar en geles horizontales de agarosa de alta temperatura de gelificación (Bio-Rad, Estados Unidos) al 1% en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM), y bromuro de etidio (1 μ g/ml) a una concentración de 1 μ l/20 ml. Las muestras se disolvieron en tampón de carga (glicerol 50%, EDTA 1 mM pH 8 y azul de bromofenol 0,25%). Se cargó toda la muestra. La electroforesis se llevó a cabo en tampón TAE a voltaje constante y, una vez finalizada, las muestras se visualizaron mediante la irradiación con luz UV (Sambrook y Russell, 2006). El marcador de peso molecular utilizado fue Ladder Plus de 100 pb (Fermentas, Lituania).

Cepa	Especie	Hospedador	Origen	Nº Acceso
¹ NRRL 28585	<i>F. austroamericanum</i>	<i>Herbaceous vine</i>	Venezuela	AF212439
¹ NRRL 28436	<i>F. meridionale</i>	<i>Cornus alba</i>	Nueva Caledonia	AF212435
¹ NRRL 29020	<i>F. boothii</i>	<i>Z. mays</i>	Sudáfrica	AF212443
¹ NRRL 29148	<i>F. mesoamericanum</i>	<i>Cissus rhombifolia</i>	USA (Pensilvania)	AF212442
¹ NRRL 26755	<i>F. acaciae-mearsii</i>	<i>Acacia mearnsii</i>	Sudáfrica	AF212449
¹ NRRL 13818	<i>F. asiaticum</i>	<i>H. vulgare</i>	Japón	AF212451
¹ NRRL 29169	<i>F. graminearum</i>	<i>T. aestivum</i>	USA (Kansas)	AF212461
² NRRL 29306	<i>F. cortaderiae</i>	<i>Z. mays</i>	Nueva Zelanda (Wanganui)	-
³ L1-2-2	<i>F. graminearum</i>	<i>Triticum durum</i>	España (Andalucía)	-
³ L1-2-3	<i>F. graminearum</i>	<i>T. durum</i>	España (Andalucía)	-
⁴ Fcu2	<i>F. culmorum</i>	<i>Z. mays</i>	España (Valencia)	-
ITEM 555	<i>F. sporotrichioides</i>	-	-	-
MUCL 7555	<i>F. poae</i>	-	-	-
⁵ U6-1-1	<i>F. equiseti</i>	<i>T. durum</i>	España (Andalucía)	-
³ FpMM1-2	<i>F. proliferatum</i>	<i>Z. mays</i>	España (Madrid)	AM422696
FvMM1-2	<i>F. verticillioides</i>	<i>Z. mays</i>	España (Madrid)	-

Tabla 3: Muestra representativa de cepas de *Fusarium* utilizadas para comprobar las especificidad de la pareja de cebadores diseñada para el gen *TRI5* y para el gen *TUB2* mediante PCR convencional. Se indica hospedador, origen y número de acceso a la base de datos (Genbank). "1": Cepas cedidas por el Dr. Kerry O'Donnell y descritas por O'Donnell *et al.* (2000). "2": Cepa descrita por Ward *et al.* (2002). Todas estas cepas son especies que forman parte del complejo *Fusarium graminearum* descrito por O'Donnell *et al.* (2004) y Starkey *et al.* (2007). "3": Cepas descritas por Jurado (2006). "4": Cepa descrita por Llorens *et al.* (2004a, 2004b). "5": Cepa descrita por Jurado *et al.* (2006b).

La pareja de cebadores utilizada para amplificar el gen *TUB2* (gen de control endógeno utilizado en la RT-PCR a tiempo real para normalizar los datos), se diseñó usando el programa Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos), a partir de secuencias del gen *TUB2* de *F.*

graminearum obtenidas del Genbank (Tabla4). Como se ha descrito anteriormente, el alineamiento se realizó por el método Clustal (Wilbur y Lipman, 1983), usando el programa MegAlign, programa incluido en el paquete Dnastar (Lasergene, Madison, WI, Estados Unidos). La pareja de cebadores elegida se localizó entre el nucleótido 879 y el 937 de un total de 997 de gen *TUB2*. Las secuencias de esta pareja de cebadores aparecen en la Tabla 2.

Cepa	Nº Acceso
JT04	AY781313
2F2052	AY781312
43-7	AY781311
43-6	AY781310
43	AY781309

Tabla 4: Cepas de *F. graminearum* de las que se obtuvo la secuencia del gen *TUB2* en el Genbank, y su número de acceso a la base de datos.

Para valorar su especificidad se realizó una reacción de PCR convencional con los cebadores diseñados para *TUB2*, con el DNA genómico de las especies del complejo de *Fusarium graminearum* y de otras especies de *Fusarium* (las mismas con las que se determinó la especificidad de la pareja de cebadores del gen *TRI5*) (Tabla 3). Las reacciones de PCR, programa y visualización en gel se realizaron como se comentó anteriormente para *TRI5*.

Por otra parte, se comprobaron las eficiencias de ambas parejas de cebadores. Para ello se llevó a cabo una reacción de RT-PCR a tiempo real, a partir de una serie de diluciones decimales de cDNA, usado de control positivo. Las reacciones se realizaron de la misma manera que en el apartado 2.2.6 del capítulo 2.

4.2.7 RT-PCR a tiempo real

Las parejas de cebadores utilizadas en la RT-PCR a tiempo real para amplificar el gen *TRI5* y *TUB2* de la cepa FgB de *F. graminearum*, fueron diseñadas y descritas en el apartado anterior y sus secuencias están indicadas en la Tabla 2.

Las reacciones de RT-PCR a tiempo real se realizaron siguiendo el mismo protocolo descrito en el capítulo 2 (apartado 2.2.6).

4.2.8 Análisis cuantitativo de los datos obtenidos por RT-PCR a tiempo real

El método llevado a cabo para analizar los datos de este estudio fue el método del $\Delta\Delta C_T$, o método de cuantificación relativa de los niveles de expresión del gen problema (*TRI5*) respecto del gen de control endógeno (*TUB2*), descrito anteriormente en el capítulo 2 (apartado 2.2.7).

4.2.9 Análisis estadístico de los resultados

Los resultados de los experimentos relacionados con la tasa de crecimiento y de la expresión del gen *TRI5* fueron evaluados mediante un análisis de la varianza (ANOVA) usando el programa StatsGraphics Centurion XV.II (Statistical Graphics Corp., Herndon, VA), descrito en el capítulo 2 (apartado 2.2.8).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Método de RT-PCR a tiempo real para *F. graminearum*

Las amplificaciones obtenidas con la pareja de cebadores diseñada para el gen *TRI5*, de una muestra de especies representativa del complejo de especies *Fusarium graminearum* y otras de este género (Tabla 3), están representados en la Figura 2. Se observó que todas las especies de este complejo mostraron una banda de 72 pb, excepto *F. cortaderiae*. Además

hubo amplificación en *F. culmorum*, debido a que el diseño de los cebadores se realizó sobre una zona conservada para esta especie.

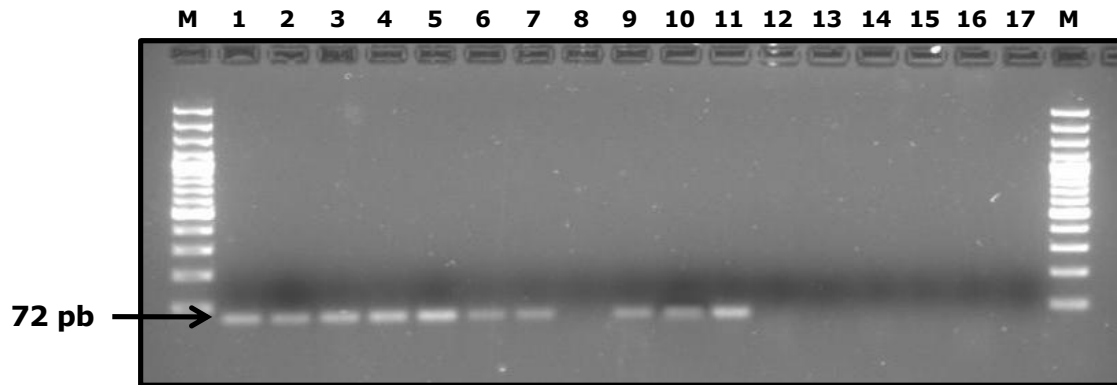


Figura 2: Amplificación mediante PCR con los cebadores PQTRI5-MF y PQTRI5-MR y DNA de las especies del complejo *Fusarium graminearum* (NRRL 28585; NRRL 28436; NRRL 29020; NRRL 29148; NRRL 26755; NRRL 13818; NRRL 29169; NRRL 29306; L1-2-2; L1-2-3) (carriles 1-10) y de DNA de otras especies de *Fusarium* (*F. culmorum*, Fcu2; *F. sporotrichioides*, ITEM 555; *F. poae*, MUCL 7555; *F. equiseti*, U6-1-1; *F. proliferatum*, FpMM1-2; *F. verticillioides*, FvMM1-2) (carriles 11-16); control negativo (carril 17); marcador molecular Ladder Plus de 100 pb (M). Se indica el tamaño de banda esperado en pb.

Los resultados obtenidos con la pareja de cebadores que amplifica una región del gen *TUB2* están representados en la Figura 3. Se pudo observar que todas las especies del complejo *Fusarium graminearum* mostraron una banda de 59 pb. Además, hubo amplificación en todas aquellas especies de *Fusarium* analizadas en los ensayos y que aparecen en la Tabla3.

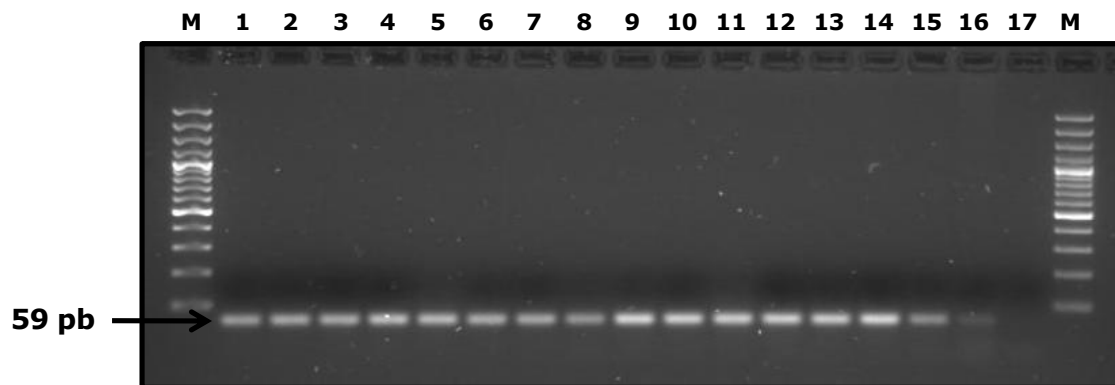


Figura 3: Amplificación mediante PCR con los cebadores TUB2PQ-PF y TUB2PQ-PR y DNA de las especies del complejo *Fusarium graminearum* (NRRL 28585; NRRL 28436; NRRL 29020; NRRL 29148; NRRL 26755; NRRL 13818; NRRL 29169; NRRL 29306; L1-2-2; L1-2-3) (carriles 1-10) y de DNA de otras especies de *Fusarium* (*F. culmorum*, Fcu2; *F. sporotrichioides*, ITEM 555; *F. poae*, MUCL 7555; *F. equiseti*, U6-1-1; *F. proliferatum*, FpMM1-2; *F. verticillioides*, FvMM1-2) (carriles 11-16); control negativo (carril 17); marcador molecular Ladder Plus de 100 pb (M). Se indica el tamaño de banda esperado en pb.

La eficiencia de las parejas de cebadores de los genes *TRI5* y *TUB2* fue obtenida a partir de una curva estándar generada a partir de una serie de diluciones decimales de cDNA control, mediante una reacción de RT-PCR a tiempo real. Las pendientes de las curvas de ambos genes fueron de -3,33 para *TRI5* y de -3,22 para *TUB2*. Por tanto, las eficiencias de ambos genes fueron elevadas y similares ($E = 99,71\%$ y $E = 104,26\%$, respectivamente). Los valores de eficiencia obtenidos para ambos genes estuvieron comprendidos entre el 90 y el 110% requerido por el método (User Bulletin N°2).

4.3.2 Efecto de la temperatura y el potencial osmótico no iónico sobre la tasa de crecimiento

Se determinó el perfil bidimensional de la tasa de crecimiento de FgB en el medio sólido que induce la síntesis de tricotecenos como respuesta a

cambios en el potencial osmótico (-0,7; -2,8 y -7,0 MPa) usando el soluto no iónico a cinco diferentes temperaturas (de 15 a 35 °C) durante 10 días.

La tasa de crecimiento óptima (9-10 mm/día) se observó a 25 °C y -2,8 MPa de potencial osmótico (Figura 4). El crecimiento se mantuvo con valores de 7-8 y 5-6 mm/día entre 20 y 30 °C, y desde -0,7 a -4,0 MPa. Sin embargo, niveles de potencial hídrico de -7,0 MPa o menores dieron lugar a una acusada disminución de la tasa de crecimiento, concretamente a temperaturas menores de 15 °C o de mayores de 30-35 °C.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos detectó que los dos factores principales estudiados (temperatura y niveles de estrés hídrico) y su interacción influían significativamente sobre la tasa de crecimiento (Tabla 5).

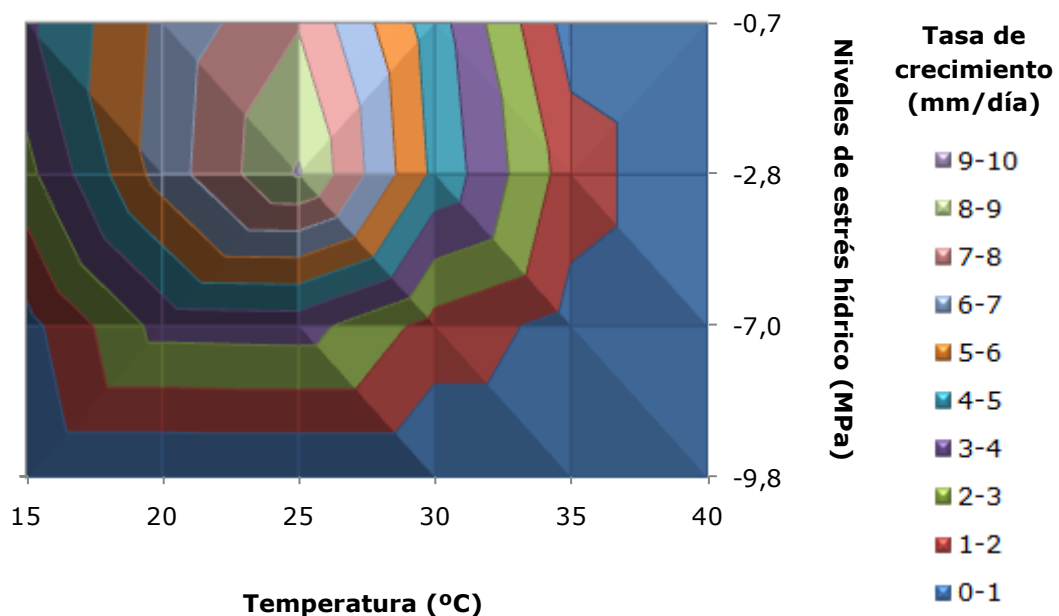


Figura 5: Perfil bidimensional que muestra la influencia de la temperatura y del potencial osmótico (con glicerol) sobre la tasa de crecimiento en FgB, cultivado en el medio sólido inductor de la síntesis de tricotecenos durante 10 días. La tasa de crecimiento en cada punto está determinada por el valor medio de las tres réplicas.

Fuente de variación	Grados de libertad	Media de cuadrados	Estadístico F-Snedecor
Temperatura	4	264,691	2769,47*
Nivel de estrés hídrico	2	211,733	2215,37*
Temperatura x nivel de estrés hídrico	8	17,851	186,78*

Table 5: ANOVA que describe el efecto de la temperatura (15, 20, 25, 30 y 35 °C) y de los niveles de estrés hídrico como potencial osmótico no iónico (-0,7; -2,8 y -7,0 MPa) además de su interacción, sobre la tasa de crecimiento de FgB. * Valores con diferencias significativas a $P < 0,05$.

4.3.3 Efecto de la temperatura y el potencial osmótico no iónico sobre la expresión relativa del gen *TRI5*

En la Figura 5 se muestra la expresión relativa del gen *TRI5* de FgB, en el medio sólido que induce la síntesis de tricotecenos como respuesta a cambios en el potencial osmótico (-0,7; -2,8 y -7,0 MPa) usando el soluto no iónico, a cinco diferentes temperaturas (de 15 a 35 °C) durante 10 días. Los valores obtenidos para el gen *TRI5* fueron normalizados con los valores de C_T obtenidos para las amplificaciones del cDNA del gen *TUB2*, llevadas a cabo en la misma placa. Los valores representan el número de veces que *TRI5* se expresa en cada nivel de potencial hídrico, comparado con su calibrador que fue el cultivo incubado a 15 °C en cada uno de los potenciales.

Se realizó un ANOVA para analizar el efecto de cada factor (temperatura y estrés hídrico) y su interacción sobre la expresión relativa del gen *TRI5* (Tabla 6). Los resultados obtenidos muestran un efecto estadísticamente significativo para cada factor por separado, mientras que su interacción no fue estadísticamente significativa. La expresión relativa del gen *TRI5* fue significativamente diferente entre los niveles de estrés hídrico, mostrando diferente patrón de expresión relativa de este gen. A 35 °C el patrón de expresión relativa de *TRI5* fue diferente de manera significativa. Las mejores condiciones en las que se produjo una inducción de la expresión del gen de estudio fueron a -7,0 MPa entre 20 y 35 °C,

aunque a -0,7 MPa entre 20 y 30 °C y a -2,8 MPa a 20 °C también se observó inducción de este gen.

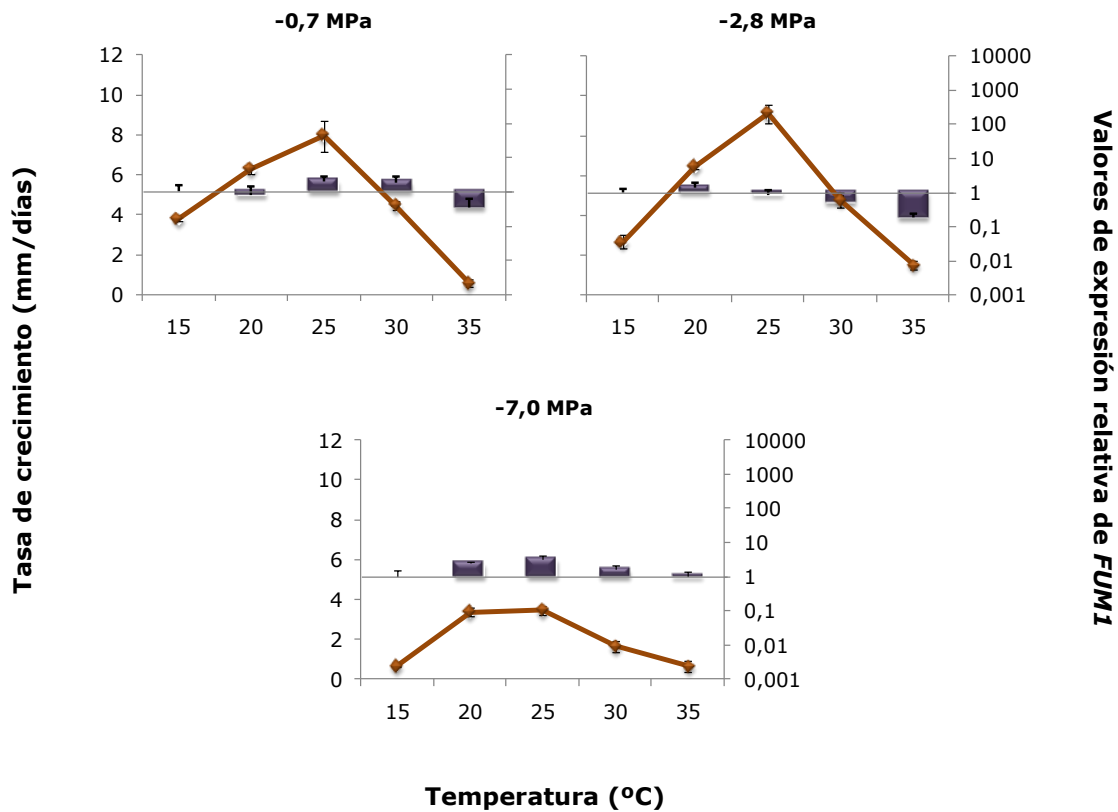


Figura 5: Comparación de la tasa de crecimiento (♦) con la inducción de la expresión relativa del gen *TRI5* (■) en respuesta al potencial osmótico producido por el soluto no iónico en FgB, durante 10 días de incubación a tres diferentes niveles de estrés hídrico (-0,7; -2,8 y -7,0 MPa) y a cinco temperaturas diferentes (15, 20, 25, 30 y 35 °C). Los niveles de expresión son relativos al calibrador elegido, que en cada caso fue el cultivo incubado a 15 °C. Al calibrador se le asignó el valor de 1. Los resultados corresponden a la media de las tres réplicas. Se representa la barra de error.

El error típico de la media de los valores de cada muestra de cDNA amplificada en la misma placa, fue por lo general muy bajo (sobre un

0,1%), y nunca fue mayor del 1%, indicando la alta reproducibilidad de la técnica de RT-PCR a tiempo real.

Fuente de variación	Grados de libertad	Media de cuadrados	Estadístico F-Snedecor
Temperatura	4	0,552501	5,56*
Nivel de estrés hídrico	2	2,9115	29,29*
Temperatura x nivel de estrés hídrico	8	0,131654	1,32

Tabla 6: ANOVA que describe el efecto de la temperatura (15, 20, 25, 30 y 35 °C) y de los niveles del potencial osmótico no iónico (-0,7; -2,8 y -7,0 MPa) además de su interacción, sobre la expresión relativa del gen *TRI5* de FgB. * Valores con diferencias significativas a $P < 0,05$.

4.3.4 Efecto del potencial osmótico iónico sobre la expresión relativa temporal del gen *TRI5*

La Figura 6 muestra el efecto que producen cambios en el potencial osmótico iónico (-0,7; -2,8 y 7,0 MPa) sobre la tasa de crecimiento expresada como el área de la masa fúngica crecida en la placa, y sobre la expresión relativa del gen *TRI5*, de la cepa FgB durante 3, 6, 9 y 12 días a 25 °C. Los valores obtenidos para el gen *TRI5* fueron normalizados con los valores de C_T obtenidos para las amplificaciones del cDNA del gen *TUB2*, llevadas a cabo en la misma placa. Los valores representan el número de veces que *FUM1* se expresó en cada tratamiento, comparado con su calibrador que fue el cultivo de los 3 días.

Los resultados indicaron que la expresión del gen *TRI5* se mantuvo relativamente constante durante los 12 días que duró el experimento en los tres niveles de potencial hídrico. Por el contrario, los patrones de crecimiento fueron diferentes, ya que el aumento del estrés hídrico produjo una considerable reducción del crecimiento.

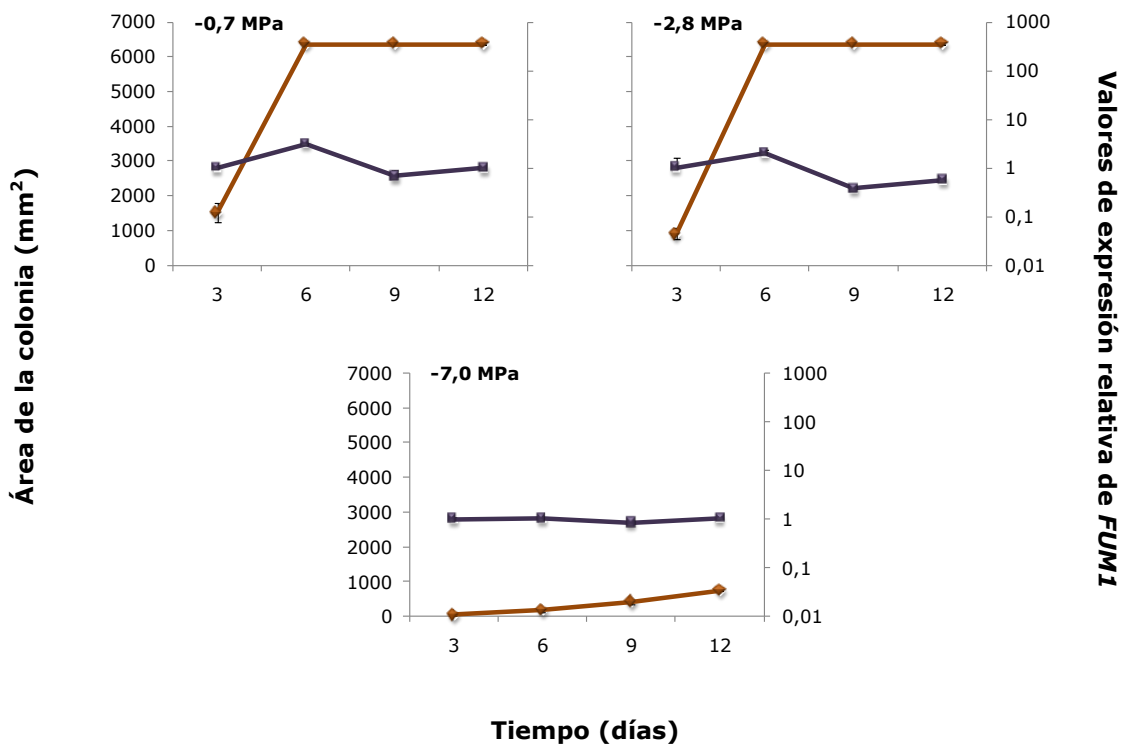


Figura 6: Estudio temporal (3, 6, 9 y 12 días) del efecto del potencial osmótico iónico sobre el tamaño relativo de la masa fúngica (♦) y sobre la expresión relativa del gen *FUM1* (■) en la cepa FgB a 25 °C a tres niveles de potencial hídrico (-0,7; -2,8 y -7,0 MPa). Los niveles de expresión son relativos al calibrador elegido, que es cada caso fue el cultivo de 3 días. Al calibrador se le asignó el valor de 1. Los resultados representados corresponden a la media de las tres réplicas. Se representa las barras de error.

4.4 DISCUSION

El efecto que tiene la temperatura y el estrés hídrico sobre el crecimiento y la biosíntesis de DON se ha analizado a partir de la cuantificación relativa del mRNA del gen *TRI5*, clave en la ruta de síntesis de los tricotecenos (Proctor *et al.*, 1995). Para ello se ha desarrollado un protocolo específico para *F. graminearum* de RT-PCR a tiempo real, puesto que anteriormente se había descrito la correlación positiva que existe entre

la expresión del gen *TRI5* mediante RT-PCR convencional y la producción de DON (Doohan *et al.*, 1999).

La pareja de cebadores diseñados y elegidos para el gen *TRI5* fue probada mediante un protocolo de PCR convencional, confirmando la amplificación de todas las especies del complejo *Fusarium graminearum*, excepto *F. cortaderiae*. Además se produjo amplificación en *F. culmorum*, especie muy próxima filogenéticamente a *F. graminearum* y a las especies de este complejo (O'Donnell *et al.*, 2004; Starkey *et al.*, 2007). Por tanto, esta pareja de cebadores también se podría utilizar en ensayos de diagnóstico de especies productoras de tricotecenos de tipo B (como la gran mayoría de especies del complejo *Fusarium graminearum* y *F. culmorum*), o para la cuantificación relativa de estas especies en plantas o en matrices alimenticias contaminadas no procesadas.

Las eficiencias de esta pareja de cebadores y de la correspondiente al gen *TUB2* (de carácter constitutivo), fueron semejantes, muy elevadas y se encontraban en el rango recomendado por los protocolos descritos de RT-PCR a tiempo real (User Bulletin N°2). Por tanto, se desarrolló un protocolo óptimo de RT-PCR a tiempo real que permitió cuantificar la expresión relativa de los niveles del transcrito *TRI5*, de la misma manera que el descrito por López-Errasquín *et al.* (2007) en *F. verticillioides* para el gen *FUM1*.

El estudio de la influencia que tiene el estrés hídrico y la temperatura sobre la tasa de crecimiento en *F. graminearum* proporcionó un detallado perfil bidimensional que muestra las condiciones óptimas, permisivas y marginales de crecimiento en respuesta a los factores ecofisiológicos analizados. Las condiciones óptimas de crecimiento fueron 25 °C a -2,8 MPa de potencial hídrico. Sin embargo, la tasa de crecimiento de esta especie mostró valores superiores o iguales a *F. verticillioides* y *F. proliferatum* de 20 a 30 °C y de -0,7 a -4,0 MPa. Estos resultados están confirmados por estudios previos realizados con aislamientos de *F. graminearum* de otras regiones, donde se determinó que a 25 °C se produce la mayor tasa de crecimiento en un rango de estrés hídrico suave (Ramírez *et al.*, 2004a;

Hope *et al.*, 2005; Ramírez *et al.*, 2006). Estos datos sugieren que cepas de varias partes de Europa y otras de América del Sur tienen un comportamiento similar bajo el mismo tipo de condiciones de estrés ambiental y confirmarían la importancia y prevalencia que tiene *F. graminearum* en regiones con temperaturas suaves. Las tasas de crecimiento máximas observadas en FgB, coinciden con la de algunos autores (Hope *et al.*, 2005), mientras que otros han obtenido tasas de crecimiento superiores (Ramírez *et al.*, 2004a, 2004b, 2006). En cualquier caso, nunca inferiores a las observadas en *F. verticillioides* y *F. proliferatum*. Las diferencias que existen entre las tasas de crecimientos de diferentes aislamientos sugiere cierta variabilidad intra-específica que podría estar relacionada con la elucidación de 11 especies que forman parte del complejo *Fusarium graminearum* (O'Donnell *et al.*, 2004; Starkey *et al.*, 2007).

Por otra parte, el crecimiento de esta especie se limitó al aumentar el estrés hídrico a temperaturas marginales (como por ejemplo a partir de 30 °C), sugiriendo una baja capacidad de colonización de cereales cuando existen condiciones ambientales extremas como altas temperaturas y elevado estrés hídrico. Este patrón de crecimiento explicaría la baja incidencia o ausencia que tiene esta especie, frente a las principales especies productoras de fumonisinas, en campos de maíz de ciertas regiones de España que están afectadas por largos periodos de sequía y altas temperaturas durante el periodo crítico del cereal (Jurado *et al.*, 2006b), indicando una diferente incidencia de *F. graminearum* en relación a la localización geográfica-climática. Estos datos confirmarían los resultados obtenidos por Miller *et al.* (1983), que observó la reducción de crecimiento de *F. graminearum* frente *F. verticillioides* a medida que aumenta la temperatura en cultivos realizados sobre maíz. Esto sugiere que, a pesar de que *F. graminearum* tenga una tasa de crecimiento superior a *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, cambios en los factores ecofisiológicos como el aumento del estrés hídrico y altas temperaturas, limitarían la competitividad de esta especie frente a las especies productoras de fumonisinas que soportan mejor estas condiciones (Velluti *et al.*, 2000a).

La temperatura y el estrés hídrico también presentaron un efecto significativo sobre la expresión relativa del gen *TRI5*, aunque diferente del observado para el crecimiento. En los tres niveles de estrés hídrico analizados, a temperaturas comprendidas entre 20 y 30 °C se produjeron los mayores niveles de inducción, mientras que a temperaturas más elevadas (35 °C) sólo se produjo inducción a -7,0 MPa. Por tanto, el efecto negativo que la temperatura más elevada (35 °C) y el estrés hídrico mayor (-7,0 MPa) ejerció sobre el crecimiento, no se observó sobre los niveles de expresión de *TRI5*. La información de la que disponemos sobre las condiciones óptimas y permisivas de producción de DON es muy variada, aunque de manera general se describen unas condiciones óptimas entre 25 y 30 °C y -0,7 y -2,8 MPa de estrés hídrico (Vesonder *et al.*, 1982; Llorens *et al.*, 2004a; Hope *et al.*, 2005; Ramírez *et al.*, 2006;). Niveles de estrés hídrico por debajo de -9,8 MPa, no provocan un aumento en la concentración de DON extracelular (Ramírez *et al.*, 2006). Esto se debe a que bajo esta condición el crecimiento fúngico se reduce severamente, dando lugar a una producción y acumulación de toxinas en cantidades demasiado bajas como para ser detectadas. Por otro lado, la comparación de nuestros resultados con los diferentes estudios realizados previamente (Vesonder *et al.*, 1982; Llorens *et al.*, 2004a; Hope *et al.*, 2005; Ramírez *et al.*, 2006;) aún resulta más complicada, puesto que los valores de DON han sido obtenidos tras largos periodos de incubación (por ejemplo, más de 40 días). Durante estos periodos de incubación, las condiciones fisiológicas pueden variar considerablemente afectando la regulación de la síntesis de DON. Además, el DON producido puede ser incluso degradado, u otros intermediarios de la ruta pueden dirigirse hacia otras rutas metabólicas resultando en una gran variabilidad en la cantidad de DON detectada al final de los experimentos.

Por último se estudió la influencia del estrés hídrico a lo largo del tiempo sobre la tasa de crecimiento y la expresión del gen *TRI5*, a la temperatura óptima para el crecimiento de *F. graminearum* (25 °C). Los resultados mostraron que existe un patrón constante de expresión del gen *TRI5*, independientemente del nivel de estrés hídrico aplicado a lo largo de

los 12 días. Estos datos contrastan significativamente con los datos obtenidos en el capítulo 2, para *F. verticillioides*, el cual mostraba un aumento significativo de la expresión del gen *FUM1* (gen principal en la ruta de síntesis de las fumonisinas) al aumentar el estrés hídrico, mientras que muestran una tendencia similar que en el caso de *F. proliferatum* (capítulo 3). Esto sugiere que las condiciones favorables para el crecimiento de *F. graminearum* darían lugar a una producción y acumulación más alta de tricotecenos. Por tanto, la producción de los tricotecenos, siempre acompañaría el proceso de colonización mientras las condiciones ambientales fueran permisivas para el crecimiento fúngico, aunque la contribución de toxina al total acumulada sería mayor en condiciones óptimas o permisivas para su crecimiento. Esto estaría respaldado por estudios previos que demostraron la existencia de una correlación elevada entre la biomasa fúngica y el contenido de DON (Schnerr *et al.*, 2002; Waalwijk *et al.*, 2004b; Fredlund *et al.*, 2008).

Las diferencias observadas en los patrones de regulación de los genes *TRI5* de *F. graminearum* y *FUM1* de *F. verticillioides* y *F. proliferatum* en respuesta a los mismos factores ambientales, indican que no sería posible desarrollar modelos climáticos predictivos generales de riesgo de contaminación por toxinas a todos los hongos toxígenos. Si no que el estudio individual de cada una de las especies toxígenas sería el necesario, para elucidar las diferencias que pueden existir entre ellas, teniendo en cuenta, la posible variabilidad intra-específica que pudiera existir en cada especie estudiada. Por otro lado, los resultados obtenidos sugieren que la producción de las toxinas podría jugar diferentes papeles ecofisiológicos según el determinado contexto ecológico (en el ciclo de vida de estos patógenos y en el proceso de colonización) y el hospedador.

CAPÍTULO 5.

CAPÍTULO 5. DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES DE *Fusarium* Y MICROBIOTA ACOMPAÑANTE ASOCIADA A CEREALES EN ESPAÑA.

5.1 INTRODUCCIÓN

La contaminación de los cereales con especies micotoxígenas es un problema que afecta a diversos niveles. Por una parte ocasiona pérdidas en la agricultura (al reducir la productividad y la calidad de la cosecha) y en la industria de transformación de sus productos, puesto que los hongos pueden producir enfermedades y por tanto alteraciones evidentes, además de acumular micotoxinas en el cereal recolectado, e incluso procesado en forma de harinas o piensos. Por otra parte, el consumo de estos productos contaminados por animales de interés zootécnico, produce importantes pérdidas en el sector ganadero, debido al aumento de los índices de conversión, disminución de los índices reproductivos y aumento de la morbilidad y mortalidad de los animales. Además, los cereales forman parte de la dieta humana básica, y por tanto la entrada de micotoxinas en la cadena alimentaria supone un importante problema de salud pública. Por ello, la Unión Europea ha legislado las toxinas principales y las normativas que existen, determinan el contenido máximo de cada uno de ellas en materias primas y en productos derivados de éstas.

Como se ha comentado anteriormente, el género *Fusarium* no solo incluye especies fitopatógenas y productoras de enfermedades importantes, sino también, productoras de toxinas durante la colonización del cereal, bien en el campo o en residuos de cosecha, o bien durante el almacenamiento, siempre que las condiciones ambientales sean favorables para su producción. Las principales toxinas y las especies productoras más comunes en cereales se detallan en la Tabla 1. De manera general, los principales cereales susceptibles a la contaminación por *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. avenaceum*, *F. sporotrichioides* y *F. poae* son el trigo, la cebada y otros cereales de grano pequeño, aunque *F. graminearum*

también tiene incidencia en el maíz. Así, las toxinas más importantes asociadas a estos pueden ser DON, NIV, ZEA y derivados de la toxina T2. Otras especies como *F. verticillioides* y *F. proliferatum* son importantes productoras de fumonisinas y moniliformina, están más comúnmente asociadas al maíz (Logrieco *et al.*, 2003), aunque *F. proliferatum* puede también afectar a otros vegetales.

Especies de <i>Fusarium</i>	Micotoxinas
<i>F. acuminatum</i>	T2, MON, HT2, DAS, MAS, NEO, BEA
<i>F. anthropilum</i>	BEA
<i>F. avenacium</i>	MON, EN, BEA,
<i>F. cereales (F. crookwellense)</i>	NIV, FUS, ZEA, ZOH
<i>F. chlamydosporum</i>	MON
<i>F. culmorum</i>	DON, ZEA, NIV, FUS, ZOH, AcDON
<i>F. equiseti</i>	ZEA, ZOH, MAS, DAS, NIV, DAcNIV, FUS, FUC, BEA
<i>F. graminearum</i>	DON, ZEA, NIV, FUS, AcDON, DAcDON, DAcNIV
<i>F. heterosporum</i>	ZEA, ZOH
<i>F. nygamai</i>	FB₁, BEA, FB₂
<i>F. oxysporum</i>	MON, EN, BEA
<i>F. poae</i>	DAS, NIV, FUS, MAS, T2, HT2, NEO, BEA
<i>F. proliferatum</i>	FB₁, BEA, MON, FUP, FB₂
<i>F. sambucinum</i>	DAS, T2, NEO, MAS, BEA
<i>F. semitectum</i>	BEA
<i>F. sporotrichioides</i>	T2, HT2, NEO, MAS, DAS
<i>F. subglutinans</i>	BEA, MON, FUP
<i>F. tricinctum</i>	MON, BEA
<i>F. verticillioides</i>	FB₁, FB₂, FB₃

Tabla 1: Especies toxígenas de *Fusarium* asociadas a cereales y sus toxinas. Las especies que están en negrita son objeto de este estudio. Las toxinas indicadas en negrita son las mayoritarias de cada especie. Adaptado de Logrieco *et al.* (2003). AcDON= mono-acetildeoxinivalenoles (3-AcDON, 15-AcDON); AcNIV= mono-acetilnivalenol (15 AcNIV); BEA= beauvericina; DiAcDON=di-acetildeoxynivalenol (3, 15-AcCON); DaCNIV= diacetilnivalenol (4, 15- AcNIV); DAS= diacetoxiscirpenol; DON= deoxinivalenol (vomitoxina); EN= eniantinas; FB₁= fumonisina B₁; FB₂= fumonisina B₂; FB₃= fumonisina B₃; FUP= fusaproliferina; FUS= fusarenona-X (=4-Acetyl-NIV); FUC= fusarocromanona; HT-2= toxina HT-2; MAS= monoacetoxiscirpenol; MON= moniliformina; NEO= neosolaniol; NIV= nivalenol; T2= toxina T-2; ZEA= zearalenona; ZOH= zearalenol (α y β isómeros).

Existe una cantidad considerable de información acerca de las especies micotoxígenas de *Fusarium* que contaminan cereales en los países de centro y norte de Europa. Sin embargo, la información sobre el sur de Europa, y particularmente de España es más escasa, aunque en los últimos años se han realizado estudios epidemiológicos en cereales y productos derivados (Sanchis *et al.*, 1994; Jiménez y Mateo, 2001; Sanchis *et al.*, 2001; Mateo *et al.*, 2004; Jurado *et al.*, 2006b). En España la producción de cereales de grano se circunscribe principalmente a cebada, trigo y maíz con un 42,62%; 28,9% y 17,58%, respectivamente, de un total de 19.092 miles de toneladas (datos del 2006 proporcionados por el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, MARM, 2006). Por regiones, Castilla y León contribuyó con el 28,01 % al total de trigo, y con el 38,96 % de cebada, mientras que Castilla-La Mancha contribuyó con el 9,67 % al total de trigo y con el 27,45 % al total de cebada. Las comunidades con la mayor producción de trigo total son Castilla y León y Andalucía, mientras que de cebada fueron Castilla León y Castilla-La Mancha.

La distribución geográfica de las diversas especies de *Fusarium* es diferente y está condicionada por los factores climáticos, las prácticas agrícolas como la rotación de cultivos, el genotipo del hospedador o su habilidad para colonizarlo (Bottalico y Perrone, 2002; Doohan *et al.*, 2003). Los estudios epidemiológicos constituyen un paso fundamental en el abordaje del problema. En este sentido, es necesario por una parte conocer cuáles son las especies micotoxígenas implicadas, para evaluar el riesgo potencial de contaminación, porque la incidencia de cada una de estas toxinas estaría determinada por la presencia de las especies productoras en el cereal y por la existencia de condiciones ambientales favorables para el desarrollo fúngico y para la biosíntesis de cada una de las toxinas. Y por otra parte, es importante poder caracterizar las cepas, mediante los métodos de diagnóstico moleculares disponibles y previamente descritos por Patiño *et al.* (2004) y Jurado *et al.* (2005, 2006a), que nos permiten realizar una identificación mucho más rápida y específica que los métodos tradicionales microbiológicos. Los análisis filogenéticos basados en el estudio de secuencias de DNA, han contribuido significativamente a la

mejora de la sistemática de *Fusarium* en relación a los perfiles de toxinas (Yli-Mattila *et al.*, 2002; Mirete *et al.*, 2004; Kristensen *et al.*, 2005) y han proporcionado una información muy útil acerca de la variabilidad genética, la estructura de las poblaciones (O'Donnell *et al.*, 2004; Starkey *et al.*, 2007) y la preferencia de hospedador, necesaria para comprender la distribución y la dinámica de las especies críticas, suministrando información indispensable para su control.

El objetivo de este capítulo fue:

(i) Conocer la presencia y distribución de especies toxígenas de *Fusarium* y de microbiota acompañante en trigo y cebada de Castilla y León y Castilla-La Mancha, mediante una estrategia de diagnóstico combinada con métodos microbiológicos tradicionales y métodos moleculares.

5.2 MATERIAL y MÉTODOS

5.2.1 Material biológico

Las muestras de cereales se recogieron en los años 2006 y 2007, durante los meses de Mayo y Junio. Estas muestras proceden de tres localidades de la Comunidad Autónoma de Castilla y León (Villabañez y Zamadueñas en Valladolid, y Villahoz en Burgos) y una en Castilla-La Mancha (Albacete). Las muestras procedentes de Castilla y León fueron recogidas en campos experimentales del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL) y las de Albacete en campos del Instituto Técnico Agronómico Provincial de Albacete (ITAP). La situación de las localidades de toma de las muestras aparece representada en el mapa de la Figura 1.



Figura 1: Situación de las localidades analizadas en Castilla León y Castilla la Mancha.

Se examinaron diferentes variedades de cebada (*Hordeum vulgare* L.) y trigo blando (*Triticum aestivum* L.). Se analizaron un total de 69 muestras de cereales del periodo previo a la pre-cosecha (en la última etapa de formación de la semilla). De éstas, 48 muestras fueron de cebada y 21 de trigo. Cada muestra se correspondía con una parcela de los campos experimentales de ITACyL e ITAP. Dicha muestra consistía en una serie de espigas tomadas al azar de cinco puntos de recogida en cada parcela, correspondientes a las cuatro esquinas de la misma y a un punto central. La variedad, procedencia y número de muestras analizadas están recogidos en la Tabla 2.

Cereal	Variedad	Procedencia	Número de muestras analizadas	Año de muestreo
Cebada (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	Hispanic	Albacete	6	2006
		Villabañez (Va)	3	2006
		Zamadueñas (Va)	3	2006
			3	2007
		Villahoz (Bu)	3	2006
			3	2007
	Cierzo	Albacete	6	2006
		Villabañez (Va)	3	2006
		Zamadueñas (Va)	3	2006
			3	2007
		Villahoz (Bu)	3	2006
			3	2007
	Cerosa	Zamadueñas (Va)	3	2006
			3	2007
Trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.)	Candeal Argelino	Villahoz (Bu)	1	2006
			1	2007
		Zamadueñas (Va)	1	2007
	Candeal Nava del Rey	Villahoz (Bu)	1	2006
			1	2007
		Zamadueñas (Va)	1	2007
	Candeal Salamanca	Villahoz (Bu)	1	2006
			1	2007
		Zamadueñas (Va)	1	2007
	Isengrain	Villahoz (Bu)	1	2006
			1	2007
		Zamadueñas (Va)	1	2007
	Marius	Villahoz (Bu)	1	2006
			1	2007
		Zamadueñas (Va)	1	2007
	Monbuey	Villahoz (Bu)	1	2006
			1	2007
		Zamadueñas (Va)	1	2007
Pané 247	Villahoz (Bu)	1	2006	
		1	2007	
	Zamadueñas (Va)	1	2007	

Tabla 2: Variedades de cebada y de trigo, procedencias, número de muestras analizadas, año en que se realizó el muestreo. Va: Valladolid, Bu: Burgos (provincias de Castilla y León) y Albacete (provincia de Castilla-La Mancha).

Las muestras se trasladaron desde sus respectivos lugares de origen en bolsas de plástico estériles a 4 °C. Las semillas (con las glumas) fueron separadas de las espigas y mezcladas. Para hacer el diagnóstico molecular, se tomaron 4 gramos de cada muestra, se fecharon y se mantuvieron a -20 °C hasta el momento de su análisis. Sin embargo, para hacer el diagnóstico microbiológico tradicional, se tomaron una serie de semillas elegidas al azar de cada una de las muestras, se fecharon y se mantuvieron en la cámara frigorífica a 4 °C durante el breve periodo de tiempo en que fueron almacenadas antes de ser analizadas.

5.2.2 Procesamiento e identificación de cepas mediante diagnóstico molecular

Los 4 gramos que se tomaron de cada muestra, se incubaron en matraces de 100 ml conteniendo 20 ml de medio líquido de Sabouraud suplementado con cloranfenicol al 0,5% (Pronadisa, Madrid), durante 5 días a 25 °C en agitación (150 rpm). Tras la incubación, el contenido del matraz se separó del líquido por filtración con una bomba de vacío a través de papel Whatman N°1 y se conservó a -80 °C hasta el momento de su análisis.

El material se trituró en un mortero en presencia de nitrógeno líquido hasta reducirlo a polvo. A continuación fue extraído el DNA total con el kit "DNeasy Plant Mini Kit" (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez extraído, el DNA genómico se conservó a -20 °C.

La concentración de DNA fue estimada por absorción a 260 nm mediante el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Estados Unidos), asumiendo que una concentración de 50 µg/ml corresponde a una unidad de densidad óptica.

El DNA total (200 ng) se sometió a las correspondientes reacciones de PCR para la identificación de *Fusarium* spp., especies de *Fusarium* productoras de tricotecenos, especies de *Fusarium* pertenecientes al

complejo *Gibberella fujikuroi*, según el esquema que representa los ensayos de PCR y protocolos descritos en Jurado *et al.* (2006a). Además de realizar la identificación de *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. proliferatum*, protocolos descritos en Jurado *et al.* (2005) y *F. verticillioides*, protocolo descrito en Patiño *et al.* (2004).

5.2.3 Aislamiento e identificación de cepas mediante métodos microbiológicos tradicionales

Se tomó como referencia el Método recomendado por las Reglas Internacionales para Ensayos de Semillas (ISTA, 1999), aunque con menor número de éstas. Así, se analizaron un total de 20 semillas por muestra y medio de cultivo Agar Sabouraud suplementado con cloranfenicol al 0,5% (Pronadisa, Madrid, España). No se desinfectaron ni las semillas ni las glumas, para asegurar un mayor número de especies fúngicas. Las semillas se sembraron en una campana de flujo laminar sobre el medio de cultivo agarizado. Este medio de cultivo garantiza la formación de micelios y estructuras de reconocimiento de un amplio espectro de especies fúngicas. Posteriormente, se hicieron lecturas cada 7 días de las semillas sembradas, a lo largo de 21 días, para el control de las colonias fúngicas. Estas se repicaron a Placas de Petri con el medio de cultivo general de PDA (Pronadisa, Madrid, España) para su aislamiento e identificación.

Para la determinación morfológica de las especies fúngicas se utilizaron diversas obras generales (Carmichael *et al.*, 1980; Von Arx, 1981; Smith *et al.*, 1992; Watanabe, 1994; Kiffer y Morelet, 1997; Barnett y Hunter, 1998; Sutton *et al.*, 1998). En el caso de géneros con especies toxígenas se han consultado textos más específicos (Ramírez, 1982; Nelson *et al.*, 1983; Klich y Pitt, 1998; Pitt, 2000; Leslie y Summerell, 2006).

Para la correcta identificación de los aislamientos de *Fusarium*, se utilizaron además los protocolos moleculares descritos anteriormente en Patiño *et al.* (2004) y Jurado *et al.* (2005, 2006a). Cuando los aislamientos no pertenecían a ninguna de las especies críticas, se amplificó el gen *EF-1 α* con la pareja de cebadores EF1T y EF2T (O'Donnell *et al.*, 1998a) mediante

el protocolo de amplificación de DNA genómico descrito en el apartado "2.2.5 Síntesis de cDNA" del capítulo 2. Los productos de PCR generados se purificaron utilizando el kit "UltraClean™ PCR Clean-Up™" (MoBio Laboratories Inc., Estados Unidos). Los productos de PCR purificados se visualizaron en los geles de agarosa al 1% (apartado "2.2.5 Síntesis de cDNA" del capítulo 2) y se secuenciaron con ambos cebadores (EF1T y EF2T) en la Unidad de Genómica de la UCM utilizando el equipo "3730 DNA Analyzer" y el kit "Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit" (Applied Biosystems, Estados Unidos). Para la corrección de las secuencias mediante cromatogramas se utilizó el programa Chromas V 1.43 (Brisbane, Australia). Las secuencias fueron analizadas y editadas utilizando el programa EditSeq del paquete informático Dnastar (Lasergene, Madison, WI, Estados Unidos).

Las secuencias obtenidas fueron enviadas a la base de datos Genbank. Esta base de datos compara la secuencia enviada con las secuencias del factor de elongación de un gran número de especies de *Fusarium* y proporciona los resultados expresados como porcentaje de similitud con la secuencia de la especie más probable.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Análisis molecular de especies de *Fusarium* en cebada y trigo blando de Castilla y León y Castilla-La Mancha en las campañas 2006 y 2007

Se analizaron mediante los ensayos de PCR específicos descritos previamente, un total de 48 muestras de cebada de dos regiones diferentes y 21 de trigo blando, recogido en el periodo de pre-cosecha, en dos campañas consecutivas (2006 y 2007).

Los datos de las muestras analizadas de trigo blando de Castilla y León de ambos años, mostraron que la contaminación de *Fusarium* spp. fue superior al 80% (Figura 2). Así, sólo un 14,29% de las muestras estaban

contaminadas con alguna de las especies de *Fusarium* productoras de tricotecenos en el 2006, mientras que en el 2007 aumentó la contaminación en más de un 10%. Por el contrario, las muestras contaminadas con alguna de las especies de *Fusarium* que pertenecen al complejo *Gibberella fujikuroi*, fue bastante elevada, mostrando unos niveles del 42,86% en el 2006 y de 85,71% en el 2007. Las especies detectadas en 2006 fueron *F. verticillioides* (14,29%) y *F. equiseti* (42,86%). Por el contrario, en el 2007 se detectaron además de *F. verticillioides* (21,43 %) y *F. equiseti* (7,14 %, que disminuye bastante con respecto del año anterior), otras especies como *F. proliferatum*, *F. graminearum* y *F. sporotrichioides* en baja proporción (7,14%). En ninguno de los dos años se detectó la presencia de *F. culmorum* o *F. poae*. Por lo tanto, las muestras analizadas de trigo en 2007, presentaron un porcentaje más elevado de contaminación y una mayor diversidad de especies toxígenas de *Fusarium* que en 2006.

Con referencia a las cebadas analizadas de Castilla-La Mancha y Castilla y León en 2006, se pudo observar un 100% de contaminación de *Fusarium* spp. en ambas regiones (Figura 2). Un 91,67% de las cebadas analizadas en Castilla-La Mancha presentaron especies de *Fusarium* productoras de tricotecenos, además del 59% de las muestras con especies de *Fusarium* del complejo *Gibberella fujikuroi*. En el caso de las cebadas de Castilla y León el 23,81% se correspondió con especies de *Fusarium* productoras de tricotecenos, mientras que el 66,67% con especies de *Fusarium* del complejo *Gibberella fujikuroi*. Las especies detectadas en Castilla León fueron *F. verticillioides* (28,57%), *F. graminearum* (9,52%) y *F. equiseti* en unos niveles bastante elevados (71,43%). En Castilla-La Mancha además de *F. verticillioides* (16,67%), *F. graminearum* que presentó niveles bastante más elevados (66,67%) y *F. equiseti* que mostró niveles muy elevados (91,67%), también se detectó *F. proliferatum* (16,67%). No se detectó la presencia de *F. culmorum*, *F. poae* o *F. sporotrichioides*. En general, las muestras analizadas procedentes de Castilla-La Mancha presentaron un porcentaje mayor de contaminación, que las procedentes de Castilla y León.

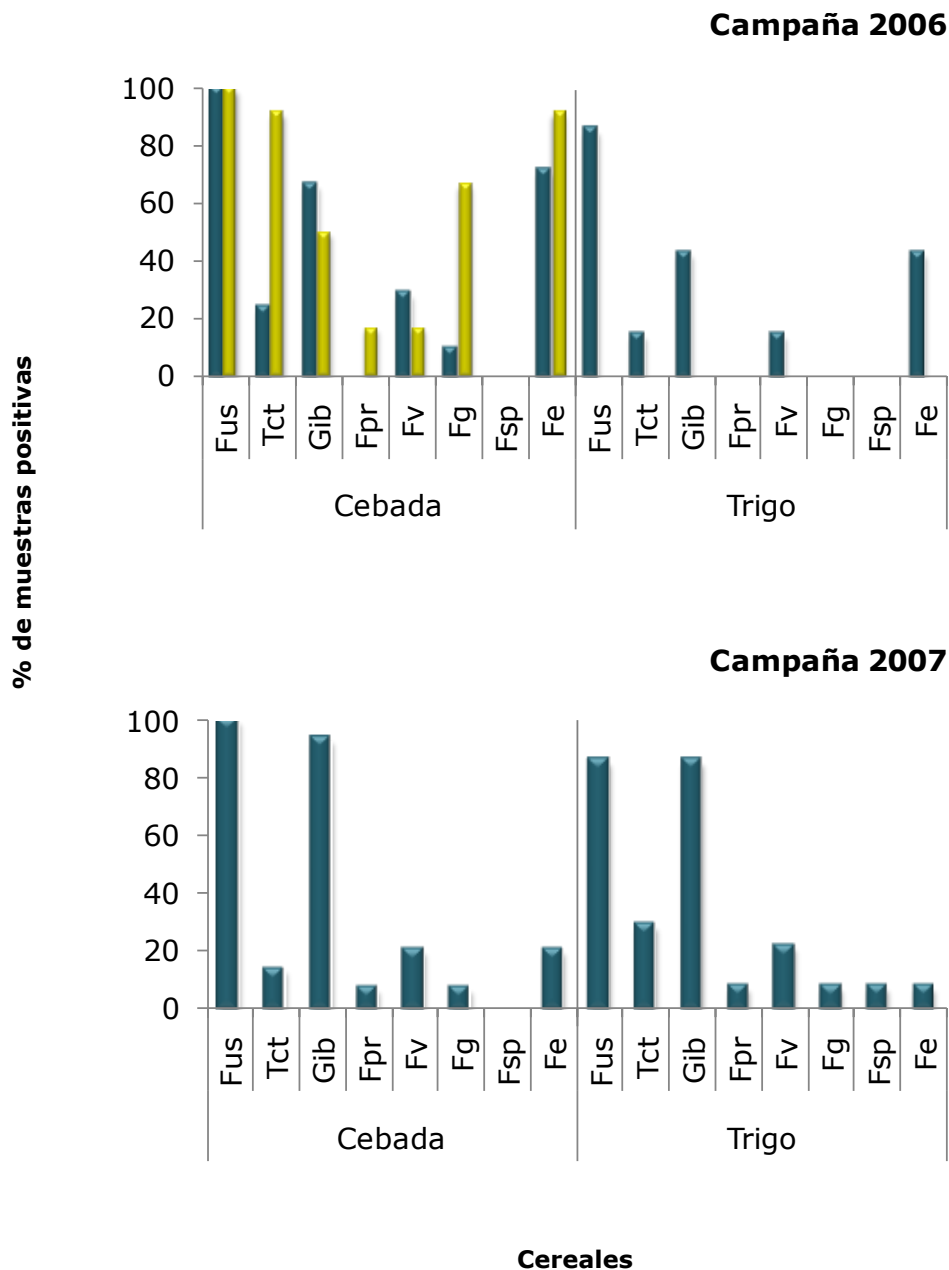


Figura 2: Porcentaje de muestras de cebada y trigo blando positivas en Castilla y León (■) y Castilla-La Mancha (■) a los ensayos de PCR para *Fusarium* spp. ("Fus"), especies de *Fusarium* productoras de tricotecenos ("Tct"), especies de *Fusarium* que pertenecen al complejo *Gibberella fujikuroi* ("Gib"), *F. proliferatum* ("Fpr"), *F. verticillioides* ("Fv"), *F. graminearum* ("Fg"), *F. sporotrichioides* ("Fsp"), *F. equiseti* ("Fe"). Cada figura representa un año de toma de muestras diferente. En cada una de las figuras está el porcentaje de muestras positivas separado para cebada y trigo.

Si comparamos las muestras de cebadas procedentes de Castilla y León de ambos años, lo que pudimos observar es la presencia de contaminación en el 100% de los casos en ambos años, a diferencia de los trigos que nunca llegaron a este porcentaje en ninguna de las dos campañas (Figura 2). En el año 2007, se pudo observar el descenso de las especies de *Fusarium* productoras de tricotecenos (13,33%) y el aumento de las especies de *Fusarium* pertenecientes al complejo *Gibberella fujikuroi* (93,33%). Además de las especies presentes en el 2006, *F. verticillioides* (20%), *F. graminearum* (6,67%) y *F. equiseti* con niveles reducidos con respecto al año anterior (20%), también se detectó *F. proliferatum* (6,67%). En ninguno de los dos años, se detectó *F. culmorum*, *F. poae* y *F. sporotrichioides*.

No se observó una distribución diferente de las especies de *Fusarium* en ninguna variedades de cereales, aunque sí entre ambos cereales, ambas campañas y en las localizaciones del muestreo, siendo Castilla-La Mancha la que presentó en 2006 mayor contaminación.

5.3.2 Análisis microbiológico tradicional de muestras de cebada y trigo blando de Castilla y León y Castilla-La Mancha en la campaña 2006

Se analizó un total de 33 muestras de cebada (12 muestras procedentes de Castilla-La Mancha y 21 muestras procedentes de Castilla León) y 7 muestras de trigo blando en la campaña 2006. Del total de semillas analizadas de trigo blando, se aislaron e identificaron 4 especies fúngicas diferentes, 7 especies fúngicas en la cebada procedente de Castilla-La Mancha y 8 especies fúngicas en la cebada procedente de Castilla y León (Tabla 3). Además se observó una distribución diferente de géneros fúngicos. El trigo blando presentó baja incidencia de especies fúngicas y bajo número de unidades formadoras de colonias (UFC), mientras que las cebadas mostraron una incidencia similar de especies fúngicas, teniendo un mayor número de UFCs en las muestras de cebada procedentes de Castilla-La Mancha. En todos los casos hay que destacar la presencia de especies de *Fusarium*.

Agente fúngico	Cebada Castilla-La Mancha			Cebada Castilla y León			Trigo blando Castilla y León		
	UFC	% UFC	%	UFC	% UFC	%	UFC	% UFC	%
<i>Alternaria alternata</i>	94	11,66	91,67	27	5,74	47,62	10	3,83	28,57
<i>Aspergillus niger</i> var. <i>niger</i>				4	0,85	9,52			
<i>Aureobasidium pullulans</i>	5	0,62	33,33	6	1,28	9,52			
<i>Balanium stygium</i>	1	0,12	8,33						
<i>Cephalosporium</i> spp.				8	1,70	19,05			
<i>Cladosporium herbarium</i>	621	77,05	100	388	82,55	95,24	243	93,10	100
<i>Fusarium</i> spp.	83	10,29	100	34	7,23	76,19	6	2,30	28,57
<i>Mucor</i> spp.	1	0,12	8,33						
<i>Papulospora</i> spp.							2	0,77	14,29
<i>Penicillium</i> spp.				2	0,43	4,76			
<i>Penicillium purpurogenum</i>				1	0,10	4,76			
<i>Trichoderma viride</i>	1	0,12	8,33						

Tabla 3: UFCs de los agentes fúngicos encontrados en las semillas de cebada de Castilla-La Mancha y Castilla y León y en las semillas de trigo de Castilla León, en el medio agarizado Sabouraud suplementado con 0,5% de cloranfenicol, porcentaje de UFCs respecto al total de UFCs para cada cereal y región (% UFC) y porcentaje de muestras contaminadas con cada especie (%) para cada cereal y región, con respecto al total de muestras (cebada Castilla-La Mancha n=12, cebada Castilla y León n=21 y trigo n=7), en la campaña 2006.

De las 12 muestras de cebada de Castilla-La Mancha analizadas se observó que la especie fúngica más representada fue *Cladosporium herbarium*, seguido de *Alternaria alternata* y el género *Fusarium*. Sin embargo, si atendemos al porcentaje de muestras positivas vimos como todas las muestras están contaminadas por especies de *Fusarium* y *C. herbarium*, y casi la totalidad por *A. alternata*, seguido de *Aureobasidium pullulans* (Tabla 3).

De las 21 muestras de cebada de Castilla León analizadas se observó que *C. herbarium* contamina el 95,24% de las muestras, seguido del género *Fusarium* y *A. alternata*. Si atendemos el porcentaje de aislamientos, observamos la elevada presencia de *C. herbarum* y de manera más reducida la presencia de *A. alternata*, resultados obtenidos de manera similar en las muestras anteriores. También hubo presencia de especies del

género *Fusarium*, *Aspergillus niger* var. *niger* y de especies del género *Penicillium*, como *Penicillium purpurogenum* (Tabla3).

Por último, de las 7 muestras de trigo blando analizadas procedentes de Castilla León, *C. herbarium* contaminó un 100% de las muestras, seguido de especies del género *Fusarium* y *A. alternata*. Con respecto al porcentaje de UFCs, se observó un predominio de *C. herbarum* y de manera más reducida la presencia de *A. alternata* y especies del género *Fusarium* (Tabla 3).

5.3.3 Diagnóstico e identificación molecular de los aislamientos de *Fusarium* obtenidos mediante métodos microbiológicos tradicionales. Distribución en las muestras de cereales.

La identificación de las cepas de *Fusarium* a nivel específico se realizó mediante la secuenciación de una región parcial del gen EF-1 α . La amplificación parcial de este gen por PCR se realizó a partir de DNA genómico obtenido de cada una de las cepas aisladas a través de los métodos de aislamiento microbiológico tradicionales. Los resultados referentes al porcentaje de muestras positivas se muestran en la Figura 3.

Se observó un 100% de muestras de cebada procedentes de Castilla-La Mancha contaminadas con especies de *Fusarium*. La especie predominante fue *F. acuminatum* (83,33%), seguida de *F. graminearum* (41,67%) y *F. equiseti* con un 25%. En las cebadas de Castilla y León se observó una reducción en el porcentaje de muestras contaminadas a niveles del 61,90%. Destacó la presencia de *F. circinatum* (28,57%), *F. proliferatum* (19,05%), *F. equiseti* (9,52%) y *F. culmorum* (4,76%). Atendiendo a las muestras de trigo, se observó que el porcentaje de muestras positivas disminuye hasta 42,86%. Las especies más relevantes fueron *F. proliferatum* y *F. circinatum* con 14,28%.

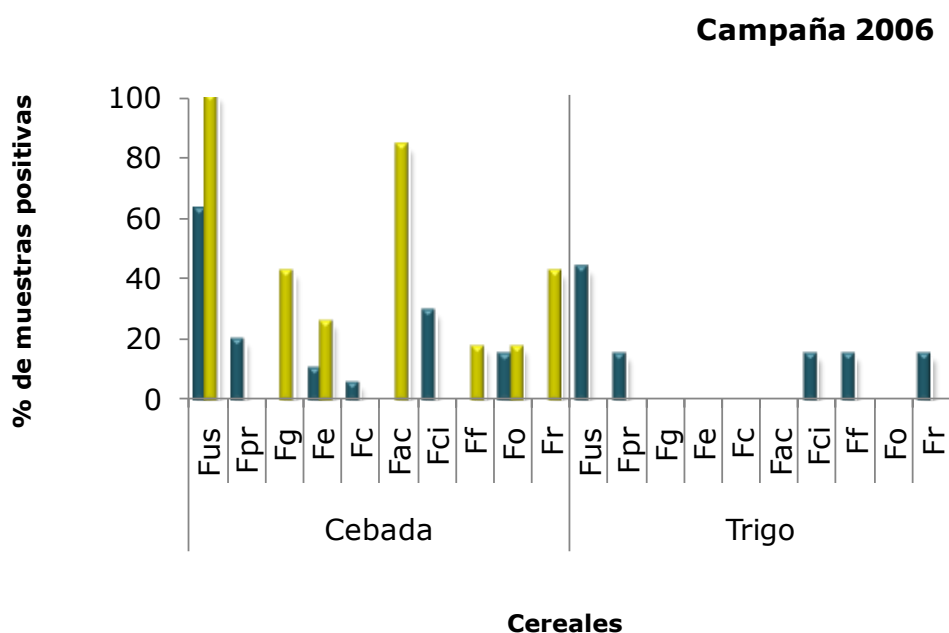


Figura 3: Porcentaje de muestras de cebada procedente de Castilla-La Mancha (■) y Castilla León (■) y de trigo de Castilla León (■) positivas a *Fusarium* spp. ("Fus"), *F. proliferatum* ("Fpr"), *F. graminearum* ("Fg"), *F. equiseti* ("Fe"), *F. culmorum* ("Fc"), *F. acuminatum* ("Fac"), *F. circinatum* ("Fci"), *F. flocciferum* ("Ff"), *F. oxysporum* ("Fo"), y *F. reticulatum* ("Fr").

Los resultados obtenidos mediante el método molecular y el método de aislamiento tradicional, referentes al porcentaje de muestras de cereal positivas para alguna de las especies de *Fusarium* mostraron que de manera general el método molecular es más informativo y sensible. Así, el porcentaje de muestras positivas en ambos cereales y ambas regiones mostró mayores valores por el método molecular, detectando especies que mediante el método tradicional no pudieron ser recuperadas, como *F. proliferatum* y *F. verticillioides* en el caso de la cebada de Castilla-La Mancha. Sin embargo, el método de aislamiento tradicional recuperó especies como *F. proliferatum* y/o *F. culmorum*, que no fueron detectadas mediante diagnóstico molecular en las cebadas y en los trigos de Castilla y León. (Figura 4). Esto podría indicar la alta capacidad germinativa o de

crecimiento miceliar que determinadas especies podrían presentar frente a otras.

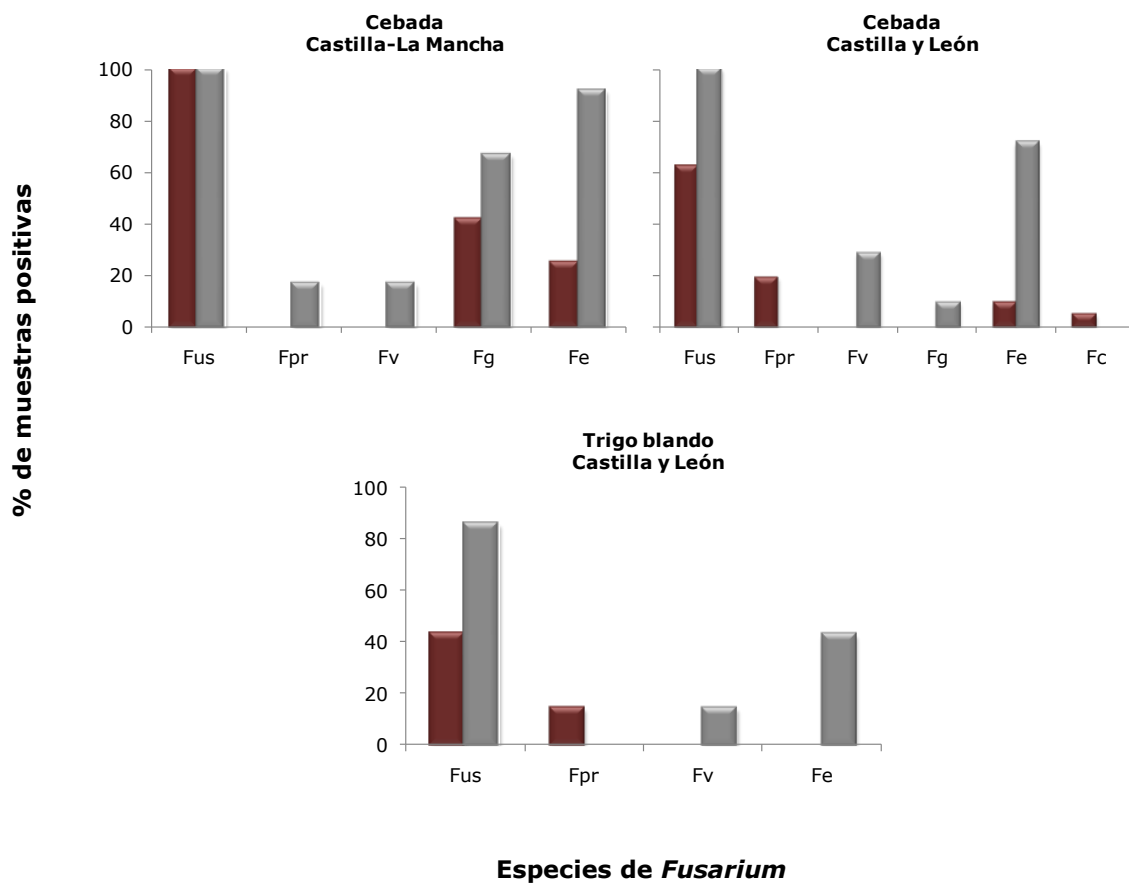


Figura 4: Porcentaje de muestras positivas de cebada procedente de Castilla-La Mancha (12 muestras) y Castilla y León (21 muestras) y de trigo blando procedente de Castilla y León (7 muestras) en los ensayos de PCR para *Fusarium* spp. ("Fus"), *F. proliferatum* ("Fpr"), *F. verticillioides* ("Fv"), *F. graminearum* ("Fg"), *F. equiseti* ("Fe"), y *F. culmorum* ("Fc") mediante el método microbiológico tradicional (■) y mediante el método molecular (■) a partir de DNA de estos cereales.

5.4 DISCUSIÓN

El análisis de contaminación general de cebada procedente de Castilla y León y de Castilla-La Mancha y de trigo blando procedente de Castilla y León, recolectados durante los años 2006 y 2007, presentó diferencias de distribución de las especies del género *Fusarium* entre ambos cereales, entre los diferentes lugares geográficos y entre las diferentes campañas.

Las muestras de trigo blando procedentes de Castilla y León analizadas mediante diagnóstico molecular y diagnóstico tradicional mostraron valores de contaminación por especies de *Fusarium* spp. inferiores a las que presentaron las muestras de cebada de ambas regiones (con valores del 100%). Así mismo, el trigo blando presentaba menores niveles de contaminación por otras especies fúngicas analizadas mediante diagnóstico tradicional. Por tanto, podría considerarse que el consumo de trigo blando procedente de esta región analizada representaría un riesgo potencial menor que el consumo de cebada. Sin embargo, Medina *et al.* (2006) determinó que la cebada destinada a producir cerveza procedente de diferentes regiones de España mostraba una baja incidencia de especies del género *Fusarium*. Las especies más importantes del género *Fusarium* detectadas fueron las principales especies productoras de fumonisinas (*F. verticillioides* y *F. proliferatum*) y *F. graminearum*, cuya identificación corroboramos en nuestro estudio. También se describió que la distribución de estas especies estuvo determinada por las características ambientales de cada región, siendo la más importante la humedad relativa.

En las muestras de cebada analizadas de Castilla-La Mancha se observó una mayor incidencia de especies de *Fusarium* productoras de tricotecenos (en concreto *F. graminearum* y *F. equiseti*), en particular si los comparamos con el porcentaje de muestras positivas de cebada en Castilla y León en 2006. La elevada incidencia de *F. graminearum* estaría relacionado por el clima característico de Castilla-La Mancha y en concreto Albacete, que es mediterráneo continental. Además los datos proporcionados por la AEMET explicarían este suceso ya que durante el invierno de 2006 gran parte del interior peninsular la temperatura fue

normal según el periodo 1971-2000 o el Periodo de Referencia (PR). Las precipitaciones producidas oscilaron en el área de Albacete, dando lugar a un clima seco, normal o incluso húmedo al aproximarse al sureste de España (AEMET, 2006, 2007). Estudios previos determinaron la incidencia de especies de *Fusarium* productoras de tricotecenos y su relación con las toxinas DON y ZEA en diferentes regiones de España (Castilla-La Mancha, Galicia, Castilla y León, País Vasco, Navarra y Aragón) (Mateo *et al.*, 2004; Genvce campaña 06-07). La presencia de estas especies de *Fusarium* en diferentes regiones geográficas podría explicarse por las condiciones lluviosas durante el año del muestro.

Por el contrario, el porcentaje de muestras positivas en Castilla y León de trigo y de cebada a especies del complejo *Gibberella fujikuroi* mostró una incidencia más elevada que para las especies de *Fusarium* productoras de tricotecenos, en ambas campañas. Sin embargo, en la campaña 2007 el porcentaje de muestras positivas aumentó para las especies de este complejo, en ambos cereales. Concretamente se detectó la presencia de las principales especies productoras de fumonisinas (*F. verticillioides* y *F. proliferatum*), aunque con baja incidencia. Estos datos se relacionan con el clima característico de Castilla y León (mediterráneo continental, con inviernos largos y fríos y con poca pluviosidad). La AEMET estableció que el invierno y principio de la primavera del año 2006 (previos a la recogida del cereal) tuvieron un carácter térmico frío en la mayor parte de España, esto es, temperatura media por debajo del mínimo PR. En cambio, el mismo periodo del año 2007 tuvo en su conjunto un carácter cálido o muy cálido con relación al PR. En cuanto a las precipitaciones, el año 2006 tuvo en su conjunto un carácter normal, desde el punto de vista pluviométrico, mientras que las precipitaciones del año 2007 estuvieron, para el conjunto del país, por debajo de la media del PR (AEMET, 2006, 2007). Por tanto, estos datos climatológicos, podrían explicar la mayor incidencia de especies de *Fusarium* pertenecientes al complejo *Gibberella fujikuroi* (*F. verticillioides* y *F. proliferatum*) en ambos cereales en Castilla y León, pero además explicaría su aumento en la campaña 2007, ya que las temperaturas fueron mucho más cálidas y hubo menos precipitaciones que

el año anterior, condiciones ambientales que favorecen a las especies de este complejo (Logrieco *et al.*, 2007).

Los diagnósticos moleculares y microbiológicos tradicionales permitieron la detección e identificación de una serie de especies de *Fusarium* toxígenas asociadas a los cereales españoles analizados. La presencia de las principales especies productoras de fumonisinas, *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, podría considerarse como una característica de los cereales españoles (Jurado *et al.*, 2006b). A pesar de que el hospedador principal de estas especies es el maíz, también pueden estar presentes en cereales de grano pequeño, sugiriendo que estas especies estarían mejor adaptadas a temperaturas cálidas y a bajos niveles de humedad (capítulo 2 y 3) condiciones ambientales características de las regiones analizadas. Sin embargo, estudios previos describieron que la capacidad productora de fumonisinas en estas especies sería mucho menor sobre trigo y cebada que la que presentan sobre el maíz, sugiriendo un menor riesgo de contaminación por estas toxinas cuando estas especies contaminan cereales de grano pequeño (Marín *et al.*, 1999). En ciertas regiones de Italia la incidencia de estas especies tiene un comportamiento similar (Logrieco *et al.*, 2003, 2007).

F. equiseti es otra de las especies toxígenas detectadas en este estudio en una elevada proporción en las muestras de ambas regiones en 2006, mientras que en 2007 se detectó en un porcentaje menor de muestras. Según se ha descrito en estudios anteriores, *F. equiseti* es un hongo filamentoso toxígeno muy común de regiones del Norte de Europa. Se ha descrito que o bien es capaz de adaptarse a condiciones ambientales muy diferentes, o bien existen diferentes linajes que están asociados a diferentes regiones (que están influenciadas por diversas condiciones ambientales). Además es capaz de producir un amplio número de toxinas, entre las que destacan los tricotecenos de ambos tipos y la zearalenona (Kosiak *et al.*, 2005). El análisis filogenético de diversos aislamientos de *F. equiseti* españoles (aislados de trigo de Andalucía) y de otras regiones Europeas, demostró la existencia de dos linajes. Cada linaje se relacionó

con una región determinada (Jurado *et al.*, 2006b). Dado que las diferencias genéticas implicarían dos poblaciones diferentes, cabría esperar diferencias en su perfil toxígeno, como ocurre en el caso de *F. verticillioides* (Mirete *et al.*, 2004). Por otra parte, su disminución en Castilla y León en la campaña de 2007 puede estar relacionada con la presencia de otras especies de *Fusarium* u otros ascomicetos, que compitan con *F. equiseti* y produzcan su disminución.

F. graminearum es una de las principales especies causantes de la fusariosis de la espiga de cereales de grano pequeño, como el trigo y la cebada. Esta especie es característica de las regiones mediterráneas, siempre que las condiciones ambientales sean temperaturas templadas y elevada humedad (Capítulo 4). A pesar de poder aislarse de zonas meridionales de Europa, esta especie es característica de zonas del Centro de Europa (Logrieco *et al.*, 2003; Gagkaeva y Yli-Mattila, 2004) especialmente en los últimos años, ya que las temperaturas más suaves están desplazando a otras especies típicas de estas zonas como *F. culmorum* (Waalwijk *et al.*, 2008; Ward *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008). Puede coexistir con especies productoras de fumonisinas, ya que comparten hospedador y tiene una tasa de crecimiento mucho mayor que ellas, aunque como se ha comentado anteriormente su crecimiento se limitaría cuando las condiciones ecofisiológicas favorezcan a *F. verticillioides* y *F. proliferarum* (Velluti *et al.*, 2000a). La mayor incidencia de *F. graminearum*, se produce en Castilla-La Mancha en 2006, donde se producen unas condiciones ambientales más favorables para el desarrollo de esta especie.

Existe otra especie productora de tricotecenos característica del Norte y el Centro de Europa que fue detectada en una proporción muy baja: *F. sporotrichioides*. Esta especie se ha descrito como contaminante menor en numerosos estudios realizados en diferentes partes de Europa. Su presencia no es común en España y de manera general es una especie que tiene menor incidencia en cereales en el Sur de Europa (Logrieco *et al.*, 2003; Jurado *et al.*, 2006b).

La alta incidencia de *F. acuminatum* en las muestras de cebada de Castilla-La Mancha podría estar relacionada con las condiciones ambientales de esta región en 2006, debido a que esta especie es característica de regiones donde se producen unas temperaturas templadas o frías que favorecen su proliferación. Esta especie está ampliamente distribuida y es capaz de colonizar suelo o diversos vegetales, como los cereales (Leslie y Summerell, 2006). Generalmente se comporta como saprófito aunque puede provocar algún tipo de enfermedad al colonizar a su hospedador. La importancia de esta especie está relacionada con la producción de toxinas. Se ha descrito que es capaz de producir tricotecenos (toxinas T2 o HT2), eniantina B, esteroides y moniliformina (Rabie *et al.*, 1986; Logrieco *et al.*, 1992; Leslie y Summerell, 2006).

F. circinatum es una especie patógena de pinos y otras coníferas, aunque no se ha descrito como colonizadora de cereales. Sin embargo los resultados obtenidos en nuestro estudio mostraron la presencia de esta especie en las muestras de trigo blando y de cebada de Castilla y León, aunque en baja proporción. *F. circinatum* ha sido descrita en Estados Unidos, Sudáfrica, México, Japón, Chile y España (Schweigkofler *et al.*, 2004; Gordon *et al.*, 2006; Leslie y Summerell, 2006). En España se describió en coníferas del Norte de la península (Pérez-Sierra *et al.*, 2007). La identificación de esta especie en cereales de Castilla y León se podría explicar por un salto de especie hospedadora, debido a la proximidad geográfica. Aunque también podría ser otro linaje que fuera específico de cereal (diferente a los que normalmente contaminan las coníferas). Los aislamientos de *F. circinatum* pueden producir beauvericina, pero no está claro que puedan producir otras toxinas tales como fumonisinas, fusaproliferinas o moniliforminas (Leslie y Summerell, 2006).

Otra especie identificada en este capítulo fue *F. oxysporum*. Esta especie es cosmopolita. Se caracteriza por ser un patógeno vascular muy importante de muchas especies vegetales. Esta considerada como no tóxigena aunque se ha descrito la producción de toxinas por parte de algunos aislamientos (Leslie y Summerell, 2006). Además han sido

detectadas *F. reticulatum* y *F. flocciferum*. La capacidad toxígena de ambas especies no ha sido descrita y al no tener una elevada incidencia, no muestran un mayor riesgo como contaminantes de alimentos.

El diagnóstico microbiológico tradicional también nos permitió estudiar la micoflora asociada a estos cereales españoles, durante la campaña 2006. Las especies que contaminaron las muestras de trigo y de cebada fueron *C. herbarium* (que está presente en niveles muy elevados en cada región y para cada cereal), *Fusarium* spp., y *A. alternata* (cuya incidencia es diferente, para cada región y cereal analizado). Existen otras especies fúngicas de importancia toxígena que están solo presentes en la cebada de Castilla y León y con incidencia muy baja (menor de 1%), como *A. niger* var. *niger*, y *P. purpurogenum*.

C. herbarium y *A. alternata* son unos de los hongos filamentosos más comunes del aire, y están descritos por ser unos de los hongos alérgenos respiratorios más importantes (Achatz *et al.*, 1995). Sin embargo, ambos hongos filamentosos pueden estar presentes en vegetales. La alta incidencia de *C. herbarium* en ambas regiones y cereales podría estar relacionada con los factores ambientales y su gran grado de adaptación a condiciones desfavorables. Su temperatura óptima oscila entre 18 y 28 °C, aunque puede llegar a crecer a temperaturas de -6 °C. Además, puede colonizar hojas y plantas, especialmente gramíneas, suelo y alimentos. *A. alternata* ha sido descrita en España como colonizadora de diversos vegetales como los cereales, en elevada proporción (Mateo *et al.*, 2004; Jurado, 2006; Medina *et al.*, 2006). Aunque los datos presentes en este capítulo demostraron una diferente proporción de muestras positivas para esta especie fúngica, dependiendo del origen geográfico de las muestras y el hospedador (el trigo blando fue el cereal en el que presentó menor contaminación). Estos datos coinciden con los ya observados en el Sur de Europa, donde esta especie también afecta a otros cultivos como el tomate, la aceituna y los cítricos. Esta especie ocasiona un ennegrecimiento del grano, lo que afecta a la calidad de la harina, y produce varios metabolitos de gran capacidad toxígena en humanos y animales, entre ellas el ácido

tenuazoico, los alternarios y las altertoxinas (Lacey y Magan, 1991; Medina *et al.*, 2006). No existe en la actualidad suficiente información acerca de estas toxinas para elaborar normativas o recomendaciones sobre límites. Sin embargo, su importancia es probablemente mayor de la que se le concede en la actualidad debido a su elevada incidencia particularmente en el Sur de Europa (Bottalico y Logrieco, 1998).

La contaminación por ocratoxina A (OTA) de granos de cereales y otros productos vegetales es un serio problema mundial de salud pública por el amplio rango de efectos tóxicos que presentan. *A. niger* var. *niger* ha sido la única especie post-cosecha descrita como productora de OTA (Abarca *et al.*, 1994; Klich y Pitt, 1998), identificada en muy bajo porcentaje en las muestras de cebada procedentes de Castilla y León. También se han detectado especies de *Penicillium* spp., que podrían estar dentro del grupo de productoras de OTA. *A. niger* var. *niger* es una especie cosmopolita (Varga *et al.*, 2001) que no sólo está presente en cereales sino también en uvas (Abarca *et al.*, 1994; Cabañes *et al.*, 2002; Battilani *et al.*, 2003; Peito y Venancio 2004; González-Salgado *et al.*, 2005). Otros estudios paralelos con muestras post-cosecha procedentes de las mismas localidades de Castilla y León (González-Salgado, 2008) demostraron la alta incidencia de esta especie de *Aspergillus* así como de otras especies de este género en mucha mayor proporción. Estos datos se corresponden con lo esperado, ya que la contaminación con los hongos del género *Aspergillus* es principalmente un problema post-cosecha y de almacenamiento del cereal (Comisión Europea, 2003). Los estudios existentes sobre contaminación de cereales en diversas fases (pre-cosecha, secado, almacenamiento y producto procesado) también muestran una mayor contaminación y presencia de OTA en los últimos estadios (Ozay *et al.*, 2008; Riba *et al.*, 2008).

Otra especie post-cosecha detectada en muy bajo porcentaje fue *P. purpurogenum*. Se ha descrito su presencia en el Norte de España en semilla seca de trigo blando y cebada de primavera (Soldevilla *et al.*, 2005), denotando una infección en la testa de los granos de estos cereales. Esta

especie no está considerada propiamente como un patógeno (Ramírez, 1982; Pitt, 2000), la rápida colonización de la testa puede impedir o reducir la presencia de otras especies fúngicas más importantes. Además, esta especie ha sido descrita como productora de las toxinas rubratoxina B y ácido penílico (Natori *et al.*, 1970), aunque no están sujetas a ninguna normativa en la actualidad.

A la luz de estos resultados podríamos predecir las toxinas que aparecerían en el trigo blando y en la cebada de ambas regiones. Y así, conocer el riesgo potencial de contaminación de los campos de cereales de estas regiones españolas. La caracterización genética y toxígena de las especies fúngicas más importantes asociadas a cereales, permite llevar a cabo un seguimiento de la distribución fúngica de una región determinada o para un hospedador concreto, además de una predicción toxígena más precisa. De este modo, se produciría un aumento de la seguridad alimentaria, en cereales y sus derivados.

Si comparamos los resultados obtenidos mediante el método molecular y el método microbiológico tradicional, podemos observar que el primero fue más informativo de manera general, salvo en determinadas circunstancias. Por ejemplo, sólo el método microbiológico tradicional pudo rescatar especies como *F. proliferatum* y/o *F. culmorum*. Las especies que fueron detectadas mediante el método molecular o bien no pudieron ser recuperadas mediante el aislamiento tradicional en placa o bien las que se aislaron están en un número menor de muestras (Jurado *et al.*, 2006b). La recuperación de las especies anteriormente citadas por medio del método microbiológico tradicional, podría estar relacionado por la presencia sobre el material vegetal de esporas con mayor capacidad germinativa a unas determinadas condiciones ambientales o que las condiciones de conservación o incubación de las muestras favorezcan más el crecimiento de unas especies fúngicas frente a otras.

El método molecular utilizado representa una herramienta útil para evaluar la calidad del vegetal, que puede emplearse en diferentes puntos de la cadena alimentaria, ya que está diseñado para detectar especies fúngicas

toxígenas claves para los cereales españoles. El uso de este método en estudios epidemiológicos, como los realizados en este capítulo, permiten predecir el riesgo potencial de contaminación por toxinas que los hongos detectados sobre material vegetal analizado podrían producir, y conllevaría el diseño de estrategias que reduzcan los riesgos de contaminación. Además, la combinación de los métodos moleculares junto con los métodos de aislamiento tradicional nos permitiría ampliar la búsqueda de especies fúngicas toxígenas que puedan formar parte de un proceso emergente, ya que el aumento generalizado de la temperatura, que se produce como consecuencia del cambio climático provocaría el desplazamiento de unas especies fúngicas frente a otras.

CAPÍTULO 6.

CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN GENERAL.

El establecimiento de una determinada comunidad fúngica sobre un cereal concreto y una región geográfica, dependerá de una serie de factores bióticos (interacciones entre las especies que forman la comunidad fúngica) y abióticos (factores ecofisiológicos) que están interrelacionados entre sí. Los factores ambientales más importantes que determinan el crecimiento fúngico y la biosíntesis de las toxinas son la temperatura y el estrés hídrico (Magan y Aldred, 2007).

F. verticillioides y *F. proliferatum* son característicos de regiones templadas y están descritos como los principales hongos fitopatógenos de maíz productores de fumonisinas (Desjardins *et al.*, 2007), aunque *F. proliferatum* tiene un rango de hospedadores mucho más amplio (Leslie *et al.*, 1990; Jiménez *et al.*, 1993; Desjardins *et al.*, 2000; Elmer, 2001; Hyun *et al.*, 2002; Ocamb *et al.*, 2002; Leslie *et al.*, 2004; Neumann *et al.*, 2004;). Como se ha demostrado en esta tesis la baja tolerancia que presentó *F. verticillioides* a cambios en el potencial matricial, al igual que ocurre en otras especies fúngicas como *A. flavus* (Nesci *et al.*, 2004; Giorni *et al.*, 2008), estaría relacionada con la gran dificultad que supone extraer agua de los poros del suelo (Adebayo y Harris, 1971). Como consecuencia, el crecimiento efectivo en el suelo y la colonización de los residuos de cosecha por *F. verticillioides* es una fase crítica que ocurriría en un rango muy estrecho de potenciales de agua (Giorni *et al.*, 2008). Por tanto, esta fase determina la cantidad de inóculo del patógeno en el suelo disponible para la siguiente infección. Por el contrario, el rango de potenciales de agua en los que se produciría la colonización del cereal, como por ejemplo en las mazorcas de maíz durante su desarrollo en el campo, sería más amplio, como también apuntan otros estudios realizados *in vitro* sobre maíz (Giorni *et al.*, 2008).

Ambas especies se caracterizan por tener un crecimiento óptimo similar, a pesar de que existen diferencias significativas a nivel intra e inter-específico, siendo *F. verticillioides* capaz de crecer a unos valores óptimos más amplios que *F. proliferatum* (por ejemplo a altas temperaturas, como 35 °C). Así se explicaría la incidencia de estas especies sobre cereales que están sometidos a unas condiciones climáticas características con periodos alternados de lluvia y sequía a altas temperaturas (Desjardins *et al.*, 2000; De Souza y Formento, 2004; Desjardins *et al.* 2007; Cavaglieri *et al.*, 2009). Los estudios epidemiológicos realizados demuestran una incidencia mayor de estas especies en cereales, en concreto en maíz (sobre todo en el caso de *F. verticillioides*) en países del Sur de Europa, más concretamente en España (como los trigos y cebadas procedentes de Castilla y León analizados en esta tesis) y otros que forman parte de la cuenca mediterránea (Logrieco *et al.*, 2002; Soldevilla *et al.*, 2005; Jurado *et al.*, 2006b; Medina *et al.*, 2006; Logrieco *et al.*, 2007). Por otro lado, las fases finales del cultivo se producen durante un mes en el que las condiciones ambientales, como la alta temperatura de estas regiones, favorecen el establecimiento de estas especies de *Fusarium*. Además la maduración de las mazorcas produce una disminución de la disponibilidad de agua favoreciendo la prevalencia de *F. verticillioides* frente a *F. proliferatum*.

Por el contrario, el modelo de crecimiento de *F. graminearum*, una de las principales especies fitopatógenas de cereales como el maíz o de grano pequeño, como trigo y cebada y a su vez, productora de tricotecenos tipo B, fue diferente. Por un lado, porque tiene una tasa de crecimiento superior a *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, y por otro lado, porque las condiciones óptimas de crecimiento están desplazadas hacia temperaturas más frescas o suaves. Esta especie aparece en regiones centroeuropeas (Gagkaeva y Yli-Mattila, 2003; Logrieco *et al.*, 2003; Waalwijk *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008), aunque también es identificada con alta frecuencia en cultivos de las regiones mediterráneas cuando las condiciones ambientales son adecuadas para su proliferación y establecimiento. Los estudios epidemiológicos demuestran la incidencia de esta especie en regiones de España como Castilla-La Mancha, que presentaron unas características ambientales

adecuadas para su crecimiento. Sin embargo, se produce una baja incidencia en los campos de maíz de ciertas regiones de España afectadas por largos periodos de sequía y altas temperaturas durante el periodo crítico del cereal, condiciones que favorecen a otras especies fúngicas como *F. verticillioides* y *F. proliferatum* (Jurado *et al.*, 2006b). Así, a pesar de que la tasa de crecimiento de *F. graminearum* sea superior a la de las especies productoras de fumonisinas, cuando las condiciones ecofisiológicas sean altas temperaturas y aumento progresivo del estrés hídrico, el crecimiento de *F. graminearum* se limitaría, mientras que el crecimiento de las especies productoras de fumonisinas se favorecería (Velluti *et al.*, 2000a).

El establecimiento de dos diferentes modelos de crecimiento en función del estrés hídrico y de la temperatura para tres de las especies de *Fusarium* con una mayor incidencia en España y diferente perfil toxígeno, permite estimar la distribución de estas especies a nivel geográfico, y por tanto, estimar el riesgo asociado a las micotoxinas que producen. De este modo se podrían establecer una serie de estrategias que reduzcan los riesgos de contaminación de estas especies pre-cosecha, evitando su entrada a la cadena alimentaria. Por otro lado, estos modelos de crecimiento podrían predecir una distribución diferente a la que hay en base a los cambios de temperatura que conlleva el cambio climático, esto haría esperar un desplazamiento de especies fúngicas y el consecuente cambio en su distribución (Miraglia *et al.*, 2009).

La determinación de la capacidad productora de las toxinas producidas por las especies objeto de estudio en esta tesis, se realizó a nivel génico, puesto que los genes principales de las rutas de biosíntesis de esta toxinas están regulados a nivel transcripcional (Proctor *et al.*, 1999; Seo *et al.*, 2001). El método molecular utilizado fue la RT-PCR a tiempo real, que nos permitió cuantificar los niveles relativos de expresión de los genes clave en la ruta de síntesis de las toxinas. López-Errasquín *et al.* (2007) demostró la existencia de correlación positiva entre el contenido de fumonisina B₁ y la expresión del gen *FUM1* en *F. verticillioides*. Por ello, se desarrolló un protocolo específico de RT-PCR a tiempo real para el gen

FUM1 de *F. proliferatum*, que permitió el diagnóstico específico de cepas de esta especie productoras de fumonisinas metabólicamente activas, además de evaluar la capacidad productora de la toxina. La correlación entre la expresión de *FUM1* y el contenido de fumonisina B₁ fue positiva aunque el coeficiente de correlación fue menor que el que se obtuvo para *F. verticillioides* (López-Errasquín *et al.*, 2007). Estos datos podrían estar relacionados con una menor eficiencia de los sistemas de expulsión de fumonisinas al medio extracelular, o con una interconexión de rutas metabólicas de tal manera que los intermediarios de la ruta de producción de esta toxina se podrían desviar hacia las rutas de otras toxinas u otros metabolitos secundarios (Stankovic *et al.*, 2007; Proctor *et al.*, 2010). La utilización de estos dos protocolos específicos de RT-PCR a tiempo real nos permitiría discriminar entre estas dos especies que colonizan el mismo hospedador, y así podríamos evaluar la contribución de cada una de ellas al contenido total de fumonisinas en el cereal.

Por otro lado, se desarrolló un protocolo específico de RT-PCR a tiempo real para el gen *TRI5* de *F. graminearum* en base a la correlación positiva existente entre los niveles de *TRI5* detectados mediante RT-PCR convencional y el contenido de DON extracelular (Doohan *et al.*, 1999). Este protocolo además podría detectar otras especies productoras de tricotecenos tipo B como *F. culmorum* y así estimar la cantidad de toxina producida por estas especies en plantas o en matrices alimentarias no procesadas.

Estos protocolos moleculares específicos reducen el tiempo de experimentación, permitiendo hacer una valoración más precisa de la capacidad productora de las toxinas. Los métodos usados hasta el momento que detectan el contenido extracelular de la toxina (Marín *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2004a; Hope *et al.*, 2005; Ramírez *et al.*, 2006), requieren largos tiempos de incubación que pueden variar las condiciones fisiológicas afectando la regulación de la síntesis de la toxina o incluso esta puede llegar a degradarse. Por tanto, los ensayos RT-PCR a tiempo real descritos en esta tesis ofrecen una buena alternativa para determinar la capacidad

productora de toxinas. Además de evaluar la influencia que diferentes factores ambientales tienen sobre la regulación de los genes principales de las rutas biosintéticas de las toxinas que estas especies producen. Sólo algunos estudios han analizado la influencia que ejercen los factores ambientales sobre la expresión de estos genes clave en otras especies toxígenas (Feng y Leonhard, 1998; Geisen, 2004; O'Callaghan *et al.*, 2006; Schmidt-Heydt y Geisen, 2007; Schmidt-Heydt *et al.*, 2008). En los últimos años, se están realizando estudios que no solo analizan las condiciones ambientales si no que también estudian la influencia que ciertas fuentes de nitrógeno, cambios en el pH, compuestos que forman parte de rutas metabólicas del hospedador, etc, tienen sobre la expresión de estos genes en algunas de las especies toxígenas (Kim *et al.*, 2008; Boutigny *et al.*, 2009; Gardiner *et al.*, 2009a, 2009b; Kohut *et al.*, 2009).

El patrón de expresión del gen *FUM1* en *F. verticillioides* mostró un perfil característico de producción de fumonisinas, y diferente al de las otras dos especies objeto de estudio. Cuando esta especie productora de fumonisinas se sometía a estrés hídrico suave, mostraba una inducción del gen *FUM1* constante. La temperatura de máxima inducción de este gen (20 °C) para las dos especies productoras de fumonisinas (*F. verticillioides* y *F. proliferatum*) se produjo a una temperatura subóptima de crecimiento, confirmando que la inducción máxima de este gen se produciría a una temperatura determinada (20 °C), como ocurre en otras especies toxígenas fúngicas (Schmidt-Heydt *et al.*, 2008). Por tanto, en el caso de *F. verticillioides* se esperaría una mayor acumulación de fumonisinas cuando el estrés hídrico fuera suave, puesto que esta especie podría mantenerse con una tasa de crecimiento bastante constante. Sin embargo, cuando aumenta el estrés hídrico la inducción del gen aumentaría mientras que la biomasa fúngica no lo haría. Esto daría lugar a una acumulación de fumonisinas sin aumento de la masa fúngica. Al final del periodo del cultivo del cereal, la cantidad de fumonisina acumulada tendería a ser superior a la biomasa fúngica detectada. Por tanto, la biomasa fúngica no sería un buen indicador de la contaminación por fumonisinas.

Por el contrario, *F. proliferatum* y *F. graminearum* mostraron unos perfiles de inducción de sus genes clave (*FUM1* y *TRI5*, respectivamente) diferente a *F. verticillioides*. En el caso de *F. proliferatum*, además de presentar una temperatura de máxima inducción similar a la de *F. verticillioides*, el aumento del estrés hídrico dio lugar al establecimiento de condiciones más favorables para la producción de la toxina, aunque nunca en la medida en que se inducía el gen *FUM1* de *F. verticillioides*. Sin embargo, la expresión de *FUM1* para *F. proliferatum* fue generalmente bastante constante, aunque con alguna fluctuación. Por tanto, la contribución relativa de cada especie al contenido total de fumonisinas en maíz será diferente. Durante las primeras etapas del cultivo cuando la temperatura y el estrés hídrico fueran suaves, se esperaría que ambas especies contribuyeran por igual, mientras que durante la maduración de la mazorca, al disminuir progresivamente el contenido de agua en el cereal *F. verticillioides* estaría en las condiciones más idóneas para producir más toxina y por tanto, aumentar el contenido total de fumonisinas acumuladas. Al tener una inducción estable, *F. proliferatum* tendría una producción constante de fumonisina mientras las condiciones ambientales fueran favorables para el crecimiento, por lo que en este caso la biomasa fúngica sí que podría correlacionarse con la contaminación de fumonisinas.

El caso de *F. graminearum* sería similar al de *F. proliferatum* ya que mostró un patrón de expresión constante a lo largo del tiempo, sugiriendo que las condiciones favorables de crecimiento darían lugar a la máxima acumulación de los tricotecenos y que por tanto, estos siempre acompañarían el proceso de colonización. Esto estaría apoyado por Frelund *et al.* (2008), Schnerr *et al.* (2002), Waalwijk *et al.* (2004b) que demostraron la existencia de correlación positiva entre el contenido de DON producido y la cantidad de DNA genómico detectado, como medida de la masa fúngica total.

Por tanto la determinación de la distribución de las especies fúngicas toxígenas, en base al conocimiento de los perfiles de crecimiento y al conocimiento de los patrones generales de expresión de los genes clave de

la ruta de biosíntesis de las toxinas en cada especie, nos aporta una información importante sobre el riesgo potencial de la existencia de unas determinadas toxinas, determinando si el riesgo potencial sería mayor o menor debido a las condiciones climáticas características del área y el año del cultivo. Así podríamos establecer estrategias de control para evitar la entrada de estos hongos y sus toxinas a la cadena alimentaria. Por otro lado, tenemos que tener en cuenta que no sería posible desarrollar modelos climáticos predictivos generales de riesgo de contaminación por micotoxinas al estudiar únicamente un grupo de hongos toxígenos, puesto que el perfil de producción es característico de cada especie fúngica. Por ello, debemos realizar estudios individuales de cada una de las especies fúngicas toxígenas teniendo en cuenta la posible variabilidad inter o intra-específica, para después elaborar los perfiles característicos de crecimiento y de producción de las toxinas de cada una de ellas.

En los últimos años, la importancia de las micotoxinas y otros metabolitos secundarios ha adquirido una mayor relevancia, debido a que podrían conferir ventajas adaptativas a los hongos que las producen y así proporcionarles un ambiente competitivo que en algunos casos les permitiría establecerse y mantenerse en un nicho determinado (Magan y Aldred, 2007). En el caso de los tricotecenos, se conoce que son factores que intervienen en el proceso de patogénesis del hongo, por lo que facilitan la colonización y establecimiento de la enfermedad en el cereal (Desjardins *et al.*, 1996b; Kang y Buchenauer, 2002; Proctor *et al.*, 2002; Munkvold *et al.*, 2003a). Por el contrario, el papel que tienen las fumonisinas aún no está totalmente esclarecido. Recientes estudios sugieren que la producción de fumonisinas de *F. verticillioides* es necesaria para el desarrollo de la enfermedad en maíz (Glenn *et al.*, 2008). Las especies que componen la microbiota presente en la planta interactúan entre sí, compitiendo por los nutrientes disponibles y el espacio. En este contexto, el uso diferencial de estos nutrientes (Wilson y Lindow, 1994) o la producción de metabolitos secundarios (micotoxinas) podría conferir ventajas adaptativas para ocupar o prevalecer en un nicho determinado. En este sentido, los estudios de competencia entre las especies asociadas al maíz (*F. verticillioides*, *F.*

proliferatum, *F. graminearum*, *A. flavus*, y *A. parasiticus*) sugieren un papel de las toxinas, en este caso concreto de las fumonisinas, en la interacción de estas especies (Marín *et al.*, 2004). Otros estudios describen la prevalencia de *F. verticillioides* frente a *F. graminearum* o *A. flavus* bajo unas determinadas condiciones ambientales y su efecto sobre la síntesis de micotoxinas (Zimo y Scott, 1992; Velluti *et al.*, 2000b). La importancia de las condiciones ambientales (temperatura y potencial hídrico) ha sido demostrada en un reciente estudio (Giorni *et al.* 2009) que mostró que *A. flavus* y *F. verticillioides* utilizaban diferentes fuentes de carbono, por lo que ocupaban diferentes nichos. Solo bajo condiciones ambientales extremas se producía una dominancia de una de ellas sobre la otra. La dominancia nutricional que *F. verticillioides* presentó frente a *A. flavus* ocurrió cuando el estrés hídrico aumentaba progresivamente a valores de -7,0 MPa a 20 °C, sugiriendo que estas condiciones favorecedoras de la inducción de *FUM1* y por tanto de una mayor producción de fumonisinas, otorgarían una ventaja de permanencia y dominancia frente a *A. flavus*.

En el caso de *F. proliferatum*, al tener un patrón constante y con escasa variación de inducción de la expresión de *FUM1*, podría decirse que la producción de fumonisinas podría ser una característica general de esta especie. Por lo que la síntesis de esta toxina tendría un patrón menos específico y podría estar relacionado con el mayor rango de hospedadores que es capaz de colonizar y en los que es capaz de producir toxinas (Jurado *et al.*, 2010).

Los estudios epidemiológicos aportaron una serie de información relacionada con la potencial distribución real de las especies toxígenas y microbiota acompañante para un cultivo determinado en un área concreta mediante el uso combinado de técnicas moleculares y diagnóstico microbiológico tradicional. La contribución de las técnicas de diagnóstico molecular a los estudios epidemiológicos permitieron abordar el trabajo de campo de una manera rápida y específica, identificando las especies de *Fusarium* fitopatógenas y toxígenas. Además, el diagnóstico microbiológico tradicional nos permitió analizar la microbiota acompañante y detectar

nuevas especies potencialmente toxígenas sobre ella. Los análisis demostraron que la distribución fue diferente en cada zona geográfica y en cada año muestreado. Las especies toxígenas más importantes detectadas en ambas regiones fueron *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. graminearum*. Las especies productoras de fumonisinas tuvieron mayor incidencia en las regiones del Norte de España, mientras que *F. graminearum* mostró mayor presencia en el Centro y Sur de la Península (Jurado *et al.*, 2006b). Estos datos están respaldados por las diferentes condiciones climáticas a las que estuvieron sometidas estas regiones durante las dos campañas muestreadas (AEMET, 2006, 2007). Además, estos resultados apoyan los perfiles de crecimiento obtenidos para estas especies en los estudios *in vitro* realizados en esta tesis. Se identificaron otras especies potencialmente toxígenas (*F. equiseti*, *F. acuminatum* y *F. circinatum*). Sin embargo, la importancia de estas especies sobre los cereales de estas regiones aún no está clara, ya que no se sabe con certeza su perfil toxígeno. Por ello se deberían realizar más estudios en este sentido.

Es muy importante conocer la distribución real de las especies toxígenas de *Fusarium* o de otro género fúngico. Los estudios ecofisiológicos realizados en esta tesis apoyan la diferente distribución de estas especies y aporta nuevos conocimientos sobre las condiciones óptimas en las que podrían acumularse la mayor cantidad de toxinas. Por tanto, todos estos datos hay que tenerlos en cuanto a la hora de establecer modelos de distribución de estas especies tras el aumento de temperatura que hay previsto como consecuencia del cambio climático (Miraglia *et al.*, 2009).

CONCLUSIONES.

CONCLUSIONES.

1. Los perfiles de crecimiento obtenidos a diferentes temperaturas (15-35 °C) y potenciales hídricos (de -0,7 a -7,0 MPa) en *F. verticillioides* y *F. proliferatum* fueron similares, aunque *F. verticillioides* creció en un rango más amplio que *F. proliferatum*. Por el contrario, las condiciones favorables de crecimiento en *F. graminearum* se produjeron a temperaturas más suaves, mostrando menos tolerancia al estrés hídrico.
2. La tasa de crecimiento de *F. graminearum* fue superior a la de las especies productoras de fumonisinas. Estas tres especies pueden colonizar el mismo hospedador, el maíz. Sin embargo, *F. verticillioides* y *F. proliferatum* predominarían sobre *F. graminearum* en el cereal en condiciones ambientales de altas temperaturas y estrés hídrico elevado.
3. Los protocolos de RT-PCR a tiempo real utilizados y desarrollados en esta tesis para detectar los niveles de expresión de los genes clave en la ruta de biosíntesis de las fumonisinas y los tricotecenos (*FUM1* y *TRI5*, respectivamente) en *F. verticillioides* y *F. proliferatum* (principales productores de fumonisinas) y *F. graminearum* (productor de tricotecenos) permitieron detectar diferentes niveles de expresión y por tanto, diferencias en su regulación, en las tres especies de *Fusarium*, en respuesta a cambios de temperatura (15-35 °C) y de potencial hídrico (de -0,7 a -9,8 MPa).
4. Las especies productoras de fumonisinas presentaron inducción significativa del gen *FUM1* a la temperatura de 20 °C, mientras que *F. graminearum*, presentó inducción del gen *TRI5* en un rango más amplio de temperaturas (incluyendo 20 °C) en los diferentes potenciales de agua.

5. El aumento del estrés hídrico provocó un aumento de la inducción del gen *FUM1* en *F. verticillioides*, situación en la que el crecimiento fúngico comenzó a limitarse. Por ello, la biomasa no sería un buen indicador de la cantidad de fumonisina acumulada. Por el contrario, en *F. proliferatum* y *F. graminearum* la expresión de los genes *FUM1* y *TRI5*, respectivamente, fue generalmente constante aunque fluctuante, por lo que en este caso la biomasa acumulada representaría un buen indicador de la cantidad de fumonisinas o tricotecenos sobre el material vegetal, respectivamente.
6. El patrón de expresión del gen *FUM1* en *F. verticillioides* y por tanto la capacidad productora de fumonisinas, en respuesta al estrés hídrico podría interpretarse como una adaptación a su hospedador principal, el maíz, ayudándolo a conservar o prevalecer en su nicho frente a otros hongos toxígenos. Sin embargo, el patrón de expresión de *FUM1* en *F. proliferatum* fue constante en los diferentes potenciales de agua. Esto podría estar relacionado con un patrón menos específico de colonización, como confirma el amplio rango de hospedadores que es capaz de colonizar.
7. La distribución de las principales especies toxígenas de *Fusarium* y de otras especies fúngicas asociadas a cereales (trigo y cebada) fue diferente en las dos regiones agroclimáticas analizadas (Castilla y León y Castilla-La Mancha) y en las dos campañas estudiadas (2006 y 2007).
8. Las especies toxígenas de *Fusarium* más importantes presentes en las dos regiones estudiadas fueron *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. graminearum*. Las especies productoras de fumonisinas tuvieron más incidencia en las regiones del Norte de España, mientras *F. graminearum* tuvo más relevancia en regiones más cercanas al centro y Sur de la Península Ibérica. Su diferente distribución estaría determinada por las condiciones meteorológicas producidas, de

acuerdo con los patrones de crecimiento *in vitro* descritos en esta tesis.

9. Se detectó la presencia de otras especies potencialmente toxígenas como *F. equiseti*, *F. acuminatum* y *F. circinatum*. Sin embargo, harían falta más estudios que determinen su perfil toxígeno real y su incidencia en España y en otras regiones con características climáticas similares.

10. Una de las estrategias utilizadas en esta tesis incluía el uso conjunto de los métodos de diagnóstico molecular y microbiológico tradicional, que permitieron determinar la distribución de especies fúngicas toxígenas y microbiota acompañante asociada a cereales. Los métodos moleculares proporcionaron una herramienta rápida y específica en la detección de especies toxígenas de *Fusarium* de manera selectiva, mientras que los métodos microbiológicos tradicionales posibilitaron la identificación de otras especies fúngicas potencialmente toxígenas.

CONCLUSIONS.

CONCLUSIONS.

1. The detailed two dimensional growth profiles obtained for *F. verticillioides* and *F. proliferatum* showed quite similar patterns in response to temperature (15-35 °C) and water potential values (from -0.7 to -7.0 MPa), although *F. verticillioides* was able to grow over a wider range of conditions, particularly at high temperatures and water stress. On the contrary, optimum conditions for *F. graminearum* were observed at milder temperatures and high water potentials.
2. The higher incidence of *F. verticillioides* and *F. proliferatum* in maize from regions with high temperatures and drought might be explained by their higher tolerance to these climatic conditions in comparison with *F. graminearum*, in spite of the higher growth rate exhibited by this species.
3. A specific real time RT-PCR protocol was developed for *FUM1* gene, involved in fumonisin biosynthesis, in *F. proliferatum*. *FUM1* gene expression showed a significant and positive correlation with fumonisin production in *in vitro* cultures. Additionally, a protocol for *TRI5* gene was developed for *F. graminearum*.
4. Analysis of *FUM1* and *TRI5* expression by real time RT-PCR in response to different temperatures and water potential was useful to unravel differences in toxin regulation among the three toxigenic *Fusarium* species studied in this work
5. The relative highest *FUM1* induction was observed at 20 °C for both *F. verticillioides* and *F. proliferatum* whereas *F. graminearum* showed relative *TRI5* induction at a wide range of temperatures (including 20 °C) in all the water potential tested.

6. *F. verticillioides* showed a marked induction of *FUM1* gene expression in response to increasing water stress in comparison with *F. proliferatum* and *F. graminearum*. Both species showed a stable pattern of *FUM1* and *TRI5*, respectively. These results suggest that fungal biomass might not be a good indicator of fumonisin content in the case of *F. verticillioides*.
7. The pattern of *FUM1* induction by *F. verticillioides*, and therefore fumonisin production in response to water stress could be envisaged as advantageous for *F. verticillioides* to retain its niche occupation and preventing dominance by other fungal species and might have improved adaptation of this species to maize, at the expense of reducing the host range. In contrast, *F. proliferatum* showed a less specific regulation pattern with a relatively stable and constant *FUM1* gene expression in relation to growth rate, more compatible with less specific colonization, in agreement with the broad range of host plants which this species is able to colonize.
8. The relative incidence of the main toxigenic *Fusarium* species (*F. verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum*) associated with barley and wheat was different in the two Spanish agroclimatic regions (Castilla y León and Castilla-La Mancha) and in the two years analyzed (2006 and 2007). These results might be explained by the existing differences in the climatic characteristics between these regions and in the weather conditions (temperature and precipitation) between 2006 and 2007 during the sensitive period (from post-anthesis to harvest). Moreover, the distribution of the species found was in agreement with the growth profiles obtained from the *in vitro* experiments.
9. The potentially toxigenic *F. equiseti*, *F. acuminatum* and *F. circinatum* were also detected in both regions with different incidence. However,

their toxigenic profile and their potential risk in cereals remain to be determined.

10. Combined strategy of traditional and DNA-based methods was useful for rapid and sensitive diagnosis of the main toxigenic *Fusarium* species and for the detection of another potentially toxigenic fungal species.

BIBLIOGRAFÍA.

BIBLIOGRAFÍA.

- Abarca, M. L., Bragulat, M. R., Castellá, G. y Cabañes, F. J.** (1994). Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 2650-2652.
- Achatz, G., Oberkofler, H., Lechenauer, E., Simon, B., Unger, A., Kandler, D., Ebner, C., Prillinger, H., Kraft, D. y Breitenbach, M.** (1995). Molecular cloning of major and minor allergens of *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum*. *Molecular Immunology*, 32: 213-227.
- Adebayo, A. A. y Harris, R. F.** (1971). Fungal growth responses to osmotic as compared to matric water potential. *Soil Science Society of American Journal*, 35: 465-469.
- AEMET** (2006, 2007). Agencia Estatal de Meteorología.
<http://www.aemet.es/es/elclima/datosclimatologicos/resumenes>
- Aldred, D. y Magan, N.** (2004). Prevention strategies for trichothecenes. *Toxicology Letters*, 153: 165-171.
- Alexander, N. J., Hohn, T. M. y McCormick, S. P.** (1998). The *TRI11* gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P-450 monooxygenase required for C-15 hydroxylation in trichothecene biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 221-225.
- Alves-Santos, F. M., Martínez-Bermejo, D., Rodríguez-Molina, M. C. y Díez, J. J.** (2007). Cultural characteristics, pathogenicity and genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from tobacco fields in Spain. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71: 26-32.
- Anderson, J. A.** (2007). Marker-assisted selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 51-53.
- Asai, T., Stone, J. M., Heard, J. E., Kovtun, Y., Yorgey, P., Sheen, J. y Ausubel, F. M.** (2000). Fumonisin B1-induced cell death in *Arabidopsis*

protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways. *The Plant Cell*, 12: 1823-1836.

Bai, G. y Shaner, G. (1994). Scab of wheat: prospects for control. *Plant Disease*, 78: 760-766.

Bai, G. y Shaner, G. (2004). Management and resistance in wheat and barley to *Fusarium* head blight. *Annual Review of Phytopathology*, 42: 135-161.

Bacon, C. W., Yates, I. E., Hinton, D. M. y Meredith, F. (2001). Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. *Environmental Health Perspectives*, 109: 325-332.

Barnett, H. L. y Hunter, B. B. (1998). Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth Edition. APS Press, St. Paul, Minnesota.

Battilani, P., Giorni, P. y Pietri, A. (2003). Epidemiology of toxin-producing fungi and ochratoxin A occurrence in grape. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 715-722.

Bennett, J. W. y Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16: 497-516.

Berek, L., Petri, I. B., Mesterházy, Téren, J. y Molnár, J. (2001). Effects of mycotoxins on human immune functions in vitro. *Toxicology in Vitro*, 15: 25-30.

Bezuidenhout, S. C., Gelderblom, W. C. A., Gorst-Allman, C. P., Horak, R. M., Marasas, W. F. O., Spiteller, G. y Vleggaar, R. (1988). Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *Journal of the Chemical Society*: 743-745.

Bluhm, B. H., Flaherty, J. E., Cousin, M. A. y Woloshuk, C. P. (2002). Multiplex polymerase chain reaction assay for the differential detection of trichothecene- and fumonisin-producing species of *Fusarium* in cornmeal. *Journal of Food Protection*, 65: 1955-1961.

Bottalico, A. y Logrieco, A. (1998). Toxigenic *Alternaria* species. En: *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. Sinha, K. K. y Bhatnagar, D. (Eds.). Marcel Dekker, Inc., N. York. Págs. 65-108.

- Bottalico, A. y Perrone, G.** (2002). Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 611-624.
- Boutigny, A.-L., Barreau, C., Atanasova-Penichon, V., Verdal-Bonnin, M.-N., Pinson-Gadais, L. y Richard-Forget, F.** (2009). Ferulic acid, and efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and *Tri* gene expression in *Fusarium* liquid cultures. *Mycological Research*, 113: 746-753.
- Bragulat, M. R., Martínez, E., Castellá, G. y Cabañes, F. J.** (2008). Ochratoxin A and citrinin producing species of the genus *Penicillium* from feedstuffs. *International Journal of Food Microbiology*, 126: 43-48.
- Britz, H., Coutinho, T. A., Wingfield, M. J., Marasas, W. F. O., Gordon, T. R. y Leslie, J. F.** (1999). *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* represents a distinct mating population in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 1198-1201.
- Broadhurst, P. G.** (1990). *Fusarium graminearum* causing stub dieback of carnations in New Zealand. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 18: 137-140.
- Brown, D. W., McCormick, S. P., Alexander, N. J., Proctor, R. H. y Desjardins, A. E.** (2001). A genetic and biochemical approach to study trichothecene diversity in *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics Biology*, 32: 121-133.
- Brown, D. W., Dyer, R. B., McCormick, S. P., Kendra, D. F. y Plattner R. D.** (2004) Functional demarcation of the *Fusarium* core trichothecene gene cluster. *Fungal Genetics and Biology*, 41: 454-462.
- Brown, D. W., Butchko, R. A. E. y Proctor, R. H.** (2006). *Fusarium* genomic resources: Tools to limit crop diseases and mycotoxin contamination. *Mycopathologia*, 162: 191-199.
- Brown, D. W., Butchko, R. A. E. y Proctor, R. H.** (2008). Genomic analysis of *Fusarium verticillioides*. *Food Additives and Contaminants*, 25: 1158-1165.
- Brul, S., Schuren, F., Montijn, R., Keijser, B. J. F., Van der Spek, H. y Oomes, S. J. C. M.** (2006). The impact of functional genomics on

microbiological food quality and safety. *International Journal of Food Microbiology*, 112: 195-199.

Butchko, R. A. E., Plattner, R. D. y Proctor, R. H. (2003). *FUM9* is required for C-5 hydroxylation of fumonisins and complements the meiotically defined *Fum3* locus in *Gibberella moniliformis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 6935-6937.

Butler, D. K. y Metzenberg, R. L. (1989). Premeiotic change of nucleolus organizer size in *Neurospora*. *Genetics*, 122: 783-791.

Cabañes, F.J., Accensi, F., Bragulat, M. R., Abarca, M. L., Castellá, G., Minguez, S. y Pons, A. (2002). What is the source of ochratoxin A in wine?. *International Journal of Food Microbiology*, 79: 213-215.

Cardwell, K. F., Kling, J. G., Maziya-Dixon, B. y Bosque-Pérez, N. A. (2000). Interactions between *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus flavus*, and insect infestation in four maize genotypes in Lowland Africa. *Phytopathology*, 90: 276-284.

Carmichael, J. W., Brycekendrick, W. y Connors, I. L. (1980). The genera of *Hyphomycetes*. The University of Alberta, Press. Edmonton, Alberta Canadá.

Carter, J. P., Rezanoor, H. N., Holden, D., Desjardins, A. E., Plattner, R. D. y Nicholson, P. (2002). Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of *Fusarium graminearum*. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 573-583.

Castegnaro, M., Barek, J., Fremy, J. M., Lafontaine, M., Miraglia, M., Sansone, E. G. y Telling, G. M. (1991). Laboratory decontamination and destruction of carcinogens in laboratory wastes: some mycotoxins. *International Agency for Research on Cancer*. Lyon, Francia.

Castón-Osorio, J. J., Rivero, A. y Torre-Cisneros, J. (2008). Epidemiology of invasive fungal infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32: S103-S109.

Cavaglieri, L. R., Keller, K. M., Pereyra, C. M., González Pereyra, M. L., Alonso, V. A., Rojo, F. G., Dalcero, A. M. y Rosa, C. A. R. (2009). Fungi

and natural incidence of selected mycotoxins in barley rootlets. *Journal of Stored Products Research*, 45: 147-150.

Chandler, E. A., Simpson, D. R., Thomsett, M. A. y Nicholson, P. (2003). Development of PCR assays to *Tri7* and *Tri13* trichothecene biosynthetic genes, and characterisation of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62: 355- 367.

Charmley, L. L., Rosenberg, A. y Trenholm, H. L. (1994). Factors responsible for economic losses due to *Fusarium* mycotoxin contamination of grains, foods and feedstuffs. En: *Mycotoxins in grain compounds other than aflatoxin*. Miller, J. D. y Trenholm, H. L. (Eds.). Eagan Press, St. Paul, Minnesota, USA. Págs. 471-456.

Chu, F. S. y Li, G. Y. (1994). Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 847-852.

Chulze, S. N., Ramirez, N. L., Farnochi, M. C., Pascale, M., Visconti, A. y March, G. (1996). *Fusarium* and fumonisin occurrence in Argentinian corn at different ear maturity stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 2797-2801.

Cleveland, T. E., Dowd, P. F., Desjardins, A. E., Bhatnagar, D. y Cotty, P. J. (2003). United States Department of Agriculture- Agricultural Research Service research on pre-harvest prevention of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in US crops. *Pest Management Science*, 59: 629-642.

Cole, R. J., y R. H. Cox. (1981). Handbook of toxic fungal metabolites. Academic Press, New York.

Comisión Codex Alimentarius. 2002. Proposed draft code for practice for the prevention (reduction) of micotoxin contamination in cereals, including annexes on ochratoxin A, zearalenona, fumonisins and trichothecenes, CX/FAC 02/21. Joint FAO/WHO Food standards Programme, Rotterdam

- Comisión Europea** (2003). Health & Consumer Protection Directorate-General, Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on Undesirable Substances in Feed. Págs. 6-7.
- Comisión Europea** (2006). Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*.
- Comisión Europea** (2007). Commission Regulation (EC) No 1126/2007 of 28 September 2007 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards *Fusarium* toxins in maize and maize products. *Official Journal of the European Union*.
- Conkova, E., Laciaková, A., Kovác, G. y Seidel, H.** (2003). Fusarial toxins and their role in animal diseases. *The Veterinary Journal*, 165: 214-220.
- Creppy, E. E.** (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127: 19-28.
- Cuero, R. G., Smith, J. E. y Lacey, J.** (1987). Stimulation by *Hyphopichia burtonii* and *Bacillus amyloliquefaciens* of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in irradiated maize and rice grains. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 1142-1146.
- Dallyn, H. y Fox, A.** (1980). Spoilage of material of reduced water activity by xerophilic fungi. En: *Microbial Growth and Survival in Extremes of Environment*. Gould, G. H., Corry, J. E. L. (Eds.). Academic Press, London. Págs. 129-139.
- Desjardins, A. E., Hohn, T. M. y McCormick, S. P.** (1993). Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: Chemistry, genetics, and significance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 57: 595-604.
- Desjardins, A. E., Plattner, R. D. y Proctor, R. H.** (1996a). Linkage among genes responsible for fumonisin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 2571-2576.
- Desjardins, A. E., Proctor, R. H., Bai, G., McCormick, S. P., Shaner, G., Buechley, G., Hohn, T. M.** (1996b). Reduced virulence of trichothecenes

antibiotic-nonproducing mutants of *Gibberella zeae* in wheat field tests. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9: 775-781

Desjardins, A. E., Plattner, R. D. y Nelson, P. E. (1997). Production of fumonisin B₁ and moniliformin by *Gibberella fujikuroi* from rice from various geographic areas. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 1838-1842.

Desjardins A. E., Plattner, R. D. y Spencer, G. F. (1998). Inhibition of trichothecene toxin biosynthesis by naturally occurring shikimate aromatics. *Phytochemistry*, 27: 767-771.

Desjardins, A. E., Manandhar, H. K., Plattner, R. D., Manandhar, G. G., Poling, S. M. y Maragos, C. M. (2000). *Fusarium* species from Nepalese rice and production of mycotoxins and gibberellic acid by selected species. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 1020-1025.

Desjardins, A. E. (2003). *Gibberella* from A (*venetae*) to Z (*zeae*). *Annual Review of Phytopathology*, 41: 177-198.

Desjardins, A. E. y Proctor, R. H. (2007). Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 47-50.

Desjardins, A. E., Busman, M., Muhitch, M. J. y Proctor, R. (2007). Complementary host-pathogen genetic analyses of the role of fumonisins in the *Zea mays-Gibberella moniliformis* seedling interaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 70: 149-160.

Desjardins, A. E. (2008). Natural product chemistry meets genetics: When is a genotype a chemotype? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 7587-7592.

De Souza, J. C. y Formento, A. N. (2004). Estudio de antrax en trigo y su relación con la fusariosis. En: *VI Congreso Nacional de trigo. IV Simposio Nacional de Cultivos de Siembra Otoño-Invernal*. INTA (Eds.). Buenos Aires. Pág. 221.

D'Mello, J. P. F., Macdonald, A. M. C., Postel, D., Dijksma, W. T. P., Dujardin, A. y Placinta, C. M. (1998). Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 104: 741-751.

- Doohan, F. M., Weston, G., Rezanoor, H. N., Parry, D. W. y Nicholson, P.** (1999). Development and use of a reverse transcription-PCR assay to study expression of *Tri5* by *Fusarium* species in vitro and in planta. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 3850-3854.
- Doohan, F. M., Brennan, J. y Cooke, B. M.** (2003). Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 755-768.
- Dunkel, F. V.** (1988). The relationship of insects to the deterioration of stored grain by fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 7: 227-244.
- Elmer, W. H.** (2001). *Fusarium* diseases of asparagus. En: *Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium*. Summerell, B. A., Leslie, J. F., Backhouse, D., Bryden, W. L., y Burgess L. W. (Eds.). APS Press, St. Paul, Minnesota. Págs. 248-262.
- Eriksen, G. S. y Pettersson, H.** (2004). Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, 114: 205-239.
- Eudes, F., Comeau, A., Rioux, S. y Collin, J.** (2001). Impact of trichothecenes on *Fusarium* head blight (*Fusarium graminearum*) development in spring wheat (*Triticum aestivum*). *Canadian Journal of Plant Pathology*, 23: 318-322.
- Feng, G. H. y Leonhard, T. J.** (1998). Culture conditions control expression of the genes for aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* and *A. nidulans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 2275-2277.
- Flaherty, J. E., Pirttilä, A. M., Bluhm, B. H. y Woloshuck, C. P.** (2003). *PAC1*, a pH- regulatory gene from *Fusarium verticillioides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 5222-5227.
- Flaherty, J. E. y Woloshuck, C. P.** (2004). Regulation of fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides* by a zinc binuclear cluster-type gene, *ZFR1*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 2653-2659.
- Folcher, L., Jarry, M., Weissenberger, A., G rault, F., Eychenne, N., Delos, M. y Regnault-Roger, C.** (2009). Comparative activity of agrochemical treatments on mycotoxin levels with regard to corn borers and *Fusarium* mycoflora in maize (*Zea mays* L.) fields. *Crop Protection*, 28: 302-308.

- Foroud, N. A. y Eudes, F.** (2009). Trichothecenes in cereals grains. *International Journal of Molecular Sciences*, 10: 147-173.
- Fotso, J., Leslie, J. F. y Smith, J. C.** (2002) Production of beauvericin, moniliformin, fusaproliferin, and fumonisins (b)1, (b)2, and (b)3 by fifteen ex-type strains of *Fusarium* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 5195- 5197.
- Franceschi, S., Bidoli, E., Barón, A. E. y La Vecchia, C.** (1990). Maize and risk of cancers of the oral cavity, pharynx, and esophagus in North-Eastern Italy. *Journal of the National Cancer Institute*, 82: 1407–1411.
- Fredlund, E., Gidlund, A., Olsen, M., Börjesson, T., Spliid, N. H. H. y Simonsson, M.** (2008). Method evaluation of *Fusarium* DNA extraction from mycelia and wheat for down- stream real- time PCR quantification and correlation to mycotoxin levels. *Journal of Microbiology Methods*, 73: 33-40.
- Frisvad, J. C., Frank, J. M., Houbraken, J. A. M. P., Kuijpers, A. F. A. y Samson, R. A.** (2004). New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in Mycology*, 50: 23-43.
- Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Samson, R. A., Larsen, T. O. y Thrane, U.** (2007). Fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 9727–9732.
- Gagkaeva, T. Yu. y Yli-Mattila, T.** (2004). Genetic diversity of *Fusarium graminearum* in Europe and Asia. *European Journal of plant Pathology*, 110: 551-562.
- Galán, L. C. y Rodríguez, J. J.** (2003). La contaminación por Micotoxinas. En: *Observatori de la Seguretat Alimentaria*. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Gardiner, D. M., Osborne, S., Kazan, K. y Manners, J. M.** (2009a). Low pH regulates the production of deoxynivalenol by *Fusarium graminearum*. *Microbiology*, 115: 3149-3156.
- Gardiner, D. M., Kazan, K. y Manners, J. M.** (2009b). Nutrient profiling reveals potent inducers of trichothecene biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology*, 46: 604-613.

- Gardner, J. M., Nelson, M. M. y Heffernan, M. P.** (2005). Chronic cutaneous fusariosis. *Archives of Dermatology*, 141: 794-795.
- Geisen, R.** (2004). Molecular monitoring of environmental conditions influencing the induction of ochratoxin a biosynthetic genes in *Penicillium nordicum*. *Molecular Nutrition and Food Research*, 48: 532-540.
- Geiser, D. M., Del Mar Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., Zhang, N., Kuldau, G. A. y O'Donnell, K.** (2004). FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 473-479.
- Gelderblom, W. C., Jaskiewicz, K., Marasas, W. F., Thiel, P. G., Horak, R. M., Vlegaar, R. y Kriek, N. P.** (1988). Fumonisin- novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental microbiology*, 54: 806-1811.
- Gelderblom, W. C., Abel, S., Smuts, C. M., Marnewick, J., Marasas, W. F., Lemmer, E. R. y Ramljak, D.** (2001). Fumonisin-induced hepatocarcinogenesis: Mechanisms related to cancer initiation and promotion. *Environmental Health Perspectives*, 109: 291-300.
- GENVCE.** Campaña 2006- 2007. Nuevas variedades de cebada, trigo blando y trigo duro en España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Gerlach, W. y Nirenberg, H.** (1982). The genus *Fusarium* –a pictorial atlas. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem, 209: 1-406.
- Gilbert, J. y Fernando, W. G. D.** (2004). Epidemiology and biological control of *Gibberella zeae/Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 26: 464-472.
- Gillette, K. S.** (1999). Biodiversity of *Fusarium* species in Iowa maize fields and kernels: Preharvest and postharvest. M.S Thesis, Iowa State University, USA.
- Gil-Serna, J., Vázquez, C., Sardiñas, N., González-Jaén, M. T. y Patiño, B.** (2009). Discrimination of the main ochratoxin A-producing species in *Aspergillus* Section *Circumdati* by specific PCR assays. *International Journal of Food Microbiology*, 136: 83-87.

- Ginzinger, D. G.** (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30: 503-512.
- Giorni, P., Battilani, P. y Magan, N.** (2008). Effect of solute and matric potential on in vitro growth and sporulation of strains from a new population of *Aspergillus flavus* isolated in Italy. *Fungal Ecology*, 1: 102-106.
- Giorni, P., Magan, N. y Battilani, P.** (2009). Environmental factors modify carbon nutritional patterns and niche overlap between *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* strains from maize. *International Journal of Food Microbiology*, 130: 213-218.
- Glass, N. L., Metznerberg, R. L. y Raju, N. B.** (1990). Homothallic *Sordariaceae* from nature: the absence of strains containing only the a mating type sequence. *Experimental Mycology*, 14: 274-289.
- Glenn, A. E., Zitomer, N. C., Zimeri, A. M., Williams, L. D., Riley, R. T. y Proctor, R. H.** (2008). Transformation-mediated complementation of a *FUM* gene cluster deletion in *Fusarium verticillioides* restores both fumonisin production and pathogenicity on maize seedlings. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21: 87-97.
- González-Jaén, M. T., Mirete, S., Patiño, B., López-Errasquín, E. y Vázquez, C.** (2004). Genetic markers for the analysis of variability and for production of specific diagnostic sequences in fumonisin-producing strains of *Fusarium verticillioides*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 525-532.
- González-Salgado, A., Patiño, B., Vázquez, C. y González-Jaén, M. T.** (2005). Discrimination of *Aspergillus niger* and other *Aspergillus* species belonging to section *Nigri* by PCR assays. *FEMS Microbiology Letters*, 245: 353-361.
- González-Salgado, A.** (2008). Diagnóstico y control de especies de *Aspergillus* productoras de ocratoxina A. Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.
- Gordon, T. R., Kirkpatrick, S. C., Petersen, J. C. y Friel, C. J.** (2006). Potential diversity in vegetative compatibility groupings in the California population of *Gibberella circinata*. *Mycological Research*, 110: 936-940.

- Goswami, R. S. y Kistler, H. C.** (2004). Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*, 5: 515-525.
- Guzman-Cottrill, J. A., Zheng, X. y Chadwick, E. G.** (2004). *Fusarium solani* endocarditis successfully treated with liposomal amphotericin B and voriconazole. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 23: 1059-1061.
- Harrison, L. R., Colvin, B. M., Greene, J. T., Newman, L. E. y Cole Jr, J. R.** (1990). Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B₁, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2: 217-221.
- Hillis, D. M. y Dixon, M. T.** (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarter Review of Biology*, 66: 411-453.
- Hohn, T. M. y Vanmiddlesworth, F.** (1986). Purification and characterization of the sesquiterpene cyclase trichodiene synthetase from *Fusarium sporotrichioides*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 251: 756-761.
- Hohn, T. M. y Beremand, P. D.** (1989). Isolation and nucleotide sequence of a sesquiterpene cyclase gene from the trichothecene-producing fungus *Fusarium sporotrichioides*. *Gene*, 79: 131-138.
- Holmquist, G. U., Walter, H. W. y Stahr, H. M.** (1983). Influence of temperature, pH, water activity and antifungal agents on growth of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Food Science*, 48: 778-782.
- Hope, R. y Magan, N.** (2003). Two- dimensional environmental profiles of growth, deoxynivalenol and nivalenol production by *Fusarium culmorum* on a wheat-based substrate. *Letters in Applied Microbiology*, 37: 70-74.
- Hope, R., Aldred, D. y Magan, N.** (2005). Comparison of environmental profiles for growth and deoxynivalenol production by *F. culmorum* and *F. graminearum* on wheat grain. *Letters in Applied Microbiology*, 40: 295-300.
- Horie, Y.** (1995). Productivity of ochratoxin A of *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus* section *Nigri*. *Nippon Kingakukai Kaiho*, 36: 73-76.

- Hornbogen, T., Glinski, M. y Zocher R.** (2002). Biosynthesis of depsipeptide Mycotoxins in *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 713-718.
- Hornok, L., Waalwijk, C. y Leslie, J. F.** (2007). Genetic factors affecting sexual reproduction in toxigenic *Fusarium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 54-58.
- Hyun, J.-W., Lee, S.-C., Kim, D.-H., Ko, S.-W. y Kim, K.-S.** (2000). *Fusarium* fruit rot of citrus in Jeju Island. *Mycobiology*, 28: 158-162.
- IARC** (1982). The evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. IARC Monograph Supplement 4. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- IARC** (1993). Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. *World Health Organization*, 56: 397-444, 445-466, 467-488.
- IARC** (2002). Fumonisin B1. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans: Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *World Health Organization*, 82: 301-366.
- ISTA** (1999). International rules for seed testing. *Seed Science and Technology*, 27: Supplement, Rules.
- Jacobsen, B. J., Bowen, K. L., Shelby, R. A., Diener, U. L., Kempainen, B. W. y Floyd, J.** (1993). Mycotoxins and mycotoxicoses. Circular ANR 767, Auburn University, Auburn Alabama.
<http://www.aces.edu/Departmentof/grain/ANR767.htm>
- Jiménez, M., Logrieco, A. y Bottalico, A.** (1993). Occurrence and pathogenicity of *Fusarium* species in banana fruits. *Journal of Phytopathology*, 137: 214-220.
- Jiménez, M. y Mateo, R.** (2001). Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in agricultural commodities in Spain. En: *Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in plants, food and feed in Europe*. Logrieco, A. (Ed.). European Commission. COST Action 835. Págs. 173-190.

- Jurado, M., Vázquez, C., López-Errasquin, E., Patiño, B., y González-Jaén M. T.** (2004). Analysis of the occurrence of *Fusarium* species in Spanish cereals by PCR assays. En: *Proceedings of the 2nd International Symposium of Fusarium Head Blight incorporating the 8th European Fusarium Seminar*. Wageningen, The Netherlands. Págs. 460-464.
- Jurado, M., Vázquez, C., Patiño, B., González-Jaén, M. T.** (2005). PCR detection assay for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides*. *Systematic and Applied Microbiology*, 28: 562-568.
- Jurado, M.** (2006). Análisis y diagnóstico de especies de *Fusarium* productoras de toxinas, y su presencia en cereales españoles. Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.
- Jurado, M., Vázquez, C., Marín, S., Sanchis, V. y González-Jaén, M. T.** (2006a). PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in maize. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 681-689.
- Jurado, M., Vázquez, C., Callejas, C. y González-Jaén, M. T.** (2006b). Occurrence and variability of mycotoxigenic *Fusarium* species associated to wheat and maize in the south west of Spain. *Mycotoxin Research*, 22: 87-91.
- Jurado, M., Marín, P., Callejas, C., Moretti, A., Vázquez, C. y González-Jaén, M. T.** (2010). Genetic variability and fumonisin production by *F. proliferatum*. *Food Microbiology*, 27: 50-57.
- Kabak, B., Dobson, A. D. W. y Var, I.** (2006). Strategies to prevent micotoxin contamination of food and animal feed: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46: 593-619.
- Kang, Z. y Buchenauer, H.** (2002). Studies on the infection process of *Fusarium culmorum* in wheat spikes: Degradation of host cell wall components and localization of trichothecene toxins in infected tissue. *European Journal of plant Pathology*, 108: 653-660.

- Kerenyi, Z., Moretti, A., Waalwijk, C., Oláh, B. y Hornok, L.** (2004). Mating type sequences in asexually reproducing *Fusarium* species. *Applied and Environmental microbiology*, 70: 4419-4423.
- Keszthelyi, A., Jeney, A., Kerényi, Z., Mendes, O., Waalwijk, C. y Hornok, L.** (2007). Tagging target genes of the MAT1-2-1 transcription factor in *Fusarium verticillioides* (*Gibberella fujikuroi* MP-A). *Antonie Van Leeuwenhoek*, 91: 373-391.
- Khan, N. I., Schisler, D. A., Boehm, M. J., Lipps, P. E. y Slininger, P. J.** (2004). Field testing of antagonists of *Fusarium* head blight incited by *Gibberella zeae*. *Biological control*, 29: 245-255.
- Kiffer, E. y Morelet, M.** (1997). Les Deuteromycetes. Classification et clés d'identification générique. INRA Editions, Paris.
- Kim, H. y Woloshuk, C. P.** (2008). Role of *AREA*, a regulator of nitrogen metabolism, during colonization of maize kernels and fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics and Biology*, 45: 947-953.
- Kimura, M., Tokai, T., O'Donnell, K., Ward, T. J., Fujimura, M., Hamamoto, H., Shibata, T. y Yamaguchi, I.** (2003) The trichothecene biosynthesis gene cluster of *Fusarium graminearum* F15 contains a limited number of essential pathway genes and expressed non-essential genes. *FEBS Letters*, 593: 105-110.
- Klaasen, J. A. y Nelson, P. E.** (1996). Identification of a mating population, *Gibberella nygamai* sp. nov., within the *Fusarium nygamai* anamorph. *Mycologia*, 88: 965-969.
- Klich, M. A. y Pitt, J. I.** (1998). A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. North Ryde, Australia.
- Kohut, G., Ádám, A. L., Fazekas, B. y Hornok, L.** (2009). N-starvation stress induced *FUM* gene expression and fumonisin production is mediated via the HOG-type MAPK pathway in *Fusarium proliferatum*. *International Journal of Food Microbiology*, 130: 65-69.

- Konstantinova, P. y Yli-Mattila, T.** (2004). IGS-RFLP analysis and development of molecular markers for identification of *Fusarium poae*, *Fusarium langsethiae*, *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium kyushuense*. *International Journal of Food Microbiology*, 95: 321-331.
- Kosiac, E.B., Torp, M., Skjerve, E. y Andersen, B.** (2004). *Alternaria* and *Fusarium* in Norwegian grains of reduced quality- a matched pair sample study. *International Journal of Food Microbiology*, 93: 51-62.
- Kosiac, E. B., Holst-Jensen, A., Rundberget, T., González-Jaén, M. T. y Torp, M.** (2005). Morphological, chemical and molecular differentiation of *Fusarium equiseti* isolated from Norwegian cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 99: 195-206.
- Kristensen, R., Torp, M., Kosiak, B. y Holst-Jensen, A.** (2005). Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. *Mycological Research*, 109: 173-186.
- Krska R., Schuhmacher, R., Grasserbauer, M., Lemmens, M., Lemmens-Gruber, R., Adler A. y Lew, H.** (1997). Effects of beauvericin to mammalian tissue and its production by Austrian isolates of *Fusarium proliferatum* and *Fusarium subglutinans*. *Mycotoxin Research*, 13: 11-16.
- Krska, R., Baumgartner, S. y Josepha, R.** (2001). The state-of-the-art in the analysis of type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 371: 285-299.
- Kulik, T., Fordonski, G., Pszczółkowska, A., Plodzien, K. y Lapinski, M.** (2004). Development of PCR assay based on ITS2 rDNA polymorphism for the detection and differentiation of *Fusarium sporotrichioides*. *FEMS Microbiology Letters*, 239: 181-186.
- Kumar, V., Basu, M. S. y Rajendran, T. P.** (2008). Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. *Crop Protection*, 27: 891-905.

- Lacey, J.** (1989). Prevention of mold growth and mycotoxin production through control environmental factors. En: *Mycotoxins and Phytotoxins*. Natori, S., Hashimoto, K. y Ueno, Y. (Eds.). Elsevier, Amsterdam. Págs. 161-168.
- Lacey, J. y Magan, N.** (1991). Fungi in cereal grains: their occurrence and water and temperature relationship. En: *Cereal Grain. Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage*. Chelkowski, J. (Ed.). Elsevier, Amsterdam. Pags. 77-118.
- Láday, M., Juhász, Á., Mulè, G., Moretti, A., Szécsi, Á. y Logrieco, A.** (2004). Mitochondrial DNA diversity and lineage determination of European isolates of *F. graminearum* (*Gibberella zeae*). *European Journal of Plant Pathology*, 110: 545-550.
- Lang, A. R. G.** (1967). Osmotic coefficients and water potentials of sodium chloride solutions from 0–40°C. *Australian Journal of Chemistry*, 20: 2017–2023.
- Langevin, F., Eudes, F. y Comeau, A.** (2004). Effect of trichothecenes produced by *Fusarium graminearum* during *Fusarium* head blight development in six cereal species. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 735-746.
- Le Bars, J.** (1982). Toxigenesis as a function of the ecological conditions of the grain/microorganisms systems. En: *Preservation and storage of grains. Seeds and their byproducts*. Multon, J. L. (Ed.). Lavoisier Publising, New York. Págs. 347-366.
- Lee, T., Han, Y.-K., Kim, K.-H., Yun, S.-H. y Lee, Y.-W.** (2002). *Tri13* and *Tri7* determine deoxinivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 2148-2154.
- Leslie, J. F., Pearson, C. A. S., Nelson, P. E. y Toussoun, T. A.** (1990). *Fusarium* species from corn, sorghum, and soybean fields in the Central and Eastern United States. *Phytopathology*, 80: 343-350.
- Leslie, J. F.** (1995). *Gibberella fujikuroi*: available population and variable traits. *Canadian Journal of Botany*, 73: S282-S291.
- Leslie, J. F., Zeller, K. A., Logrieco, A., Mulè, G., Moretti, A. y Ritieni, A.** (2004). Species diversity of and toxin production by *Gibberella fujikuroi*

species complex strains isolated from native prairie grasses in Kansas. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 2254-2262.

Leslie, J. F., Zeller, K. A., Lamprecht, S. C., Rheeder, J. P. y Marasas, W. F. O. (2005). Toxicity, pathogenicity and genetic differentiation of five species of *Fusarium* from sorghum and millet. *Phytopathology*, 95: 275-283.

Leslie, J. F. y Summerell B. A. (2006). The *Fusarium* laboratory Manual. Blackwell Publishing. USA

Liddell, C. M. (2003). Systematics of *Fusarium* species and allies associated with *Fusarium* head blight. En: *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*. Leonard, K. J. y Bushnell, W. R. (Eds.). APS Press, St. Paul, Minnesota. Págs. 35-43.

Link, J. H. F. (1809). Observationes in Ordines plantarum naturales. *Gesellschaft Naturforschender Freunde Berlin*, 3: 3-42.

Linnemannstöns, P., Schulte, J., Del Mar Prado, M., Proctor, R. H., Avalos, J. y Tudzynski, B. (2002). The polyketide synthase gene *pk4* from *Gibberella fujikuroi* encodes a key enzyme in the biosynthesis of the red pigment bikaverin. *Fungal Genetics and Biology*, 37: 134-148.

Liu, C., Xu, W., Liu, F. y Jiang, S. (2007). Fumonisin production by *Fusarium proliferatum* strains isolated from asparagus crown. *Mycopathologia*, 164: 127-134.

Llorens A., Mateo R., Hinojo M. J., Valle-Algarra F. M. y Jiménez M. (2004a). Influence of environmental factors on the biosynthesis of type B trichothecenes by isolates of *Fusarium* spp. from Spanish crops. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 43-54.

Llorens, A., Mateo, R., Hinojo, M. J., Logrieco, A. y Jimenez, M. (2004b). Influence of the interactions among ecological variables in the characterization of zearalenone producing isolates of *Fusarium* spp. *Systematic and Applied Microbiology*, 27: 253-260.

Logrieco, A., Altomare, C., Moretti, A. y Bottalico, A. (1992). Cultural and toxigenic variability in *Fusarium acuminatum*. *Mycological Research*, 96: 518-523.

- Logrieco, A., Moretti, A., Fornelli, F., Fogliano, V., Ritieni, A., Caiaffa, M. F., Randazzo, G., Bottalico, A. y Macchia, L.** (1996). Fusaproliferin production by *Fusarium subglutinans* and its toxicity to *Artemia salina*, SF-9 insect cells, and IARC/LCL 171 human B lymphocytes. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3378–3384.
- Logrieco, A., Mulè, G., Moretti, A. y Bottalico, A.** (2002). Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 597-609.
- Logrieco, A., Bottalico, A., Mulé, G., Moretti, A. y Perrone, G.** (2003). Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 645-667.
- Logrieco, A., Moretti, A., Perrone, G. y Mulè, G.** (2007). Biodiversity of complexes of mycotoxigenic fungal species associated with *Fusarium* ear rot of maize and *Aspergillus* rot of grape. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 11-16.
- Logrieco, A., Moretti, A., Mulé, G., Paciolla, C. y Ritieni, A.** (2008). Advances on the toxicity of the cereal contaminant *Fusarium* esadepsipeptides. *Cereal Research Communications*, 36: 303- 313.
- López-Errasquín, E.** (2005). Análisis de genes de transportadores ABC y MFS en *Fusarium verticillioides* y su relación con la producción de fumonisinas. Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.
- López-Errasquín, E., Vázquez, C., Jiménez, M. y González-Jaén, M. T.** (2007). Real-Time RT-PCR assay to quantify the expression of *fum1* and *fum19* genes from the Fumonisin-producing *Fusarium verticillioides*. *Journal of Microbiological Methods*, 68: 312-317.
- Macchia, L., Di Paola, R., Fornelli, F., Nena, S., Moretti, A., Napolitano, R., Logrieco, A., Caiaffa, M. F., Tursi, A. y Bottalico A.** (1995). Cytotoxicity of beauvericin to mammalian cells. En: *Book of Abstracts of International Seminar on Fusarium: Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*. Martina Franca. Págs. 72-73.

- Madhyastha, S. M., Marquardt, R. R., Frohlich, A. A., Platord, G. y Abramson, D.** (1990). Effects of different cereal and oilseed substrates on the growth and production of toxins by *Aspergillus alutaceus* and *Penicillium verrucosum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38: 1506-1510.
- Magan, N. y Lacey, J.** (1984a). Effect of temperature and pH on water relations of field and storage fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 82: 71-81.
- Magan, N. y Lacey, J.** (1984b). Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 82: 83-93.
- Magan, N. y Lynch, J. M.** (1986). Water potential, growth and cellulolysis of fungi involved in decomposition of cereal residues. *Journal of General Microbiology*, 132: 1181-1187.
- Magan, N.** (1988). Effect of water potential and temperature on spore germination and germ-tube growth in vitro and on straw leaf sheaths. *Transactions of the British Mycology Society*, 90: 97-107.
- Magan, N.** (2001). Physiological approaches to improving ecological fitness of fungal biocontrol agents. En: *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. Butt, T. M., Jackson, C. W. y Magan, N. (Eds.). Cabi BioSciences, Wallingford, Oxfordshire, United Kingdom. Págs. 239-252.
- Magan, N.** (2006). Mycotoxin contamination of food in Europe: early detection and prevention strategies. *Mycopathologia*, 162: 245-253.
- Magan, N. y Aldred, D.** (2007). Environmental fluxes and fungal interactions: Maintaining a competitive edge. En: *Stress in yeast and filamentous fungi*. Van West, P., Avery, S. y Stratford, M. (Eds.). Elsevier Ltd., Amsterdam, Holland. Págs. 19-35.
- Marasas, W. F. O., Kellerman, T. S., Gelderblom, W. C., Coetzer, J. A., Thiel, P. G. y Van der Lugt, J. J.** (1988). Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 55: 97-203.

- Marasas, W. F. O., Miller, D. J., Riley, R. T. y Visconti, A.** (2001). Fumonisin-Occurrence, toxicology, metabolism and risk assessment. En: *Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium*. Summerell, B. A., Leslie, J. F., Backhouse, D., Bryden, W. L. y Burgess L. W. (Eds.). APS Press, St. Paul, Minnesota. Págs. 332-359.
- Marasas, W. F. O., Riley, R. T., Hendricks, K. A., Stevens, V. L., Sadler, T. W., Van Waes, J. G., Missmer, S. A., Cabrera, J., Torres, O., Gelderblom, W. C. A., Allegood, J., Martínez, C., Maddox, J., Miller, J. D., Starr, L., Sullards, M. C., Roman, A. V., Voss, K. A., Wang, E. y Merrill Jr, A. H.** (2004). Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: A potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated Maize. *The Journal of Nutrition*, 134: 711-716.
- Marín, S., Sanchis, V. y Magan, N.** (1995). Water activity, temperature and pH effects on growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates from maize. *Canadian Journal of Microbiology*, 41: 1063-1070.
- Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A. J., Vinas, I. y Magan, N.** (1998). Environmental factors, in vitro interactions, and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize grain. *Mycological Research*, 102: 831-837.
- Marín, S., Magan, N., Serra, J., Ramos, A. J., Canela, R. y Sanchis, V.** (1999). Fumonisin B₁ production and growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* on maize, wheat, and barley grain. *Journal of Food Science*, 64: 921- 924.
- Marín, S., Albareda, X., Ramos, A. J. y Sanchis, V.** (2001). Impact of environmental and interactions of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* with *Aspergillus parasiticus* on fumonisin B₁ and aflatoxins on maize grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81: 1060-1068.
- Marín, S., Magan, N., Ramos, A. J. y Sanchis, V.** (2004). Fumonisin-producing strains of *Fusarium*: A review of their ecophysiology. *Journal of Food Protection*, 67: 1792-1805.

- Marín, S., Ramos, A. J., Vázquez, C. y Sanchis, V.** (2007). Contamination of pine nuts by fumonisin produced by strains of *Fusarium proliferatum* isolated from *Pinus pinea*. *Letters in Applied Microbiology*, 44: 68-72.
- MARM** (2006). Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. <http://www.mapa.es/es/estadistica/pags/anuario/2007/indice.asp?parte=2&capitulo=6>.
- Marshall, E.** (1982). Yellow rain: filling in the gaps. *Science*, 217: 31-34.
- Mateo, R., Medina, A., Gimeno-Adelantado, J. V. y Jiménez, M.** (2004). An overview on the status of toxigenic fungi and mycotoxins in Spain. En: *An overview on toxigenic fungi and micotoxins in Europe*. Logrieco, A. y Visconti, A. (Eds.). Kluwer Academic Publishers, the Netherlands. Págs. 219-235.
- Mathre, D. E.** (1997). Compendium of Barley Diseases, Second Edition. Mathre, D. E. (Ed.). APS Press, St. Paul, Minnesota.
- McCormick, S. P., Hohn, T. M. y Desjardins, A. E.** (1996). Isolation and characterization of *Tri3*, a gene encoding 15-O-acetyltransferase from *Fusarium sporotrichioides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 353-359.
- McCormick, S. P., Alexander, N. J. y Proctor, R. H.** (2006). *Fusarium Tri4* encodes a multifunctional oxygenase required for trichothecene biosynthesis. *Canadian Journal of Microbiology*, 52: 636-642.
- McMullen, M. P. y Stack, R. W.** (1984). Effects of surface mining and reclamation on *Fusarium* populations of grassland soils. *Reclamation and Revegetation Research*, 2: 253-266.
- Medina, A., Mateo, R., López-Ocaña, L., Valle-Algarra, F. M. y Jiménez, M.** (2005). Study of Spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 4696-702.
- Medina, A., Valle-Algarra, F.M., Mateo, R., Gimeno-Adelantado, J.V., Mateo, F. y Jiménez, M.** (2006). Survey of the mycobiota of Spanish malting barley and evaluation of the mycotoxin producing potential of species of *Alternaria*,

Aspergillus and *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology*, 198: 196-203.

- Melin, P., Stratford, M., Plumridge, A. y Archer, D. B.** (2008). Auxotrophy for uridine increases the sensitivity of *Aspergillus niger* to weak-acid preservatives. *Microbiology*, 154: 1251-1257.
- Menkir, A., Ejeta, G., Butler, L. G., Melakeberhan, A. y Warren, H. L.** (1996). Fungal invasion of kernels and grain mold damage assessment in diverse sorghum germ plasm. *Plant Disease*, 80: 1399-1402.
- Merrill Jr, A. H., Sullards, M. C., Wang, E., Voss, K. A. y Riley, R. T.** (2001). Sphingolipid metabolism: Roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environmental Health Perspectives*, 109: 283-289.
- Michel, B. E. y Kaufmann, M. R.** (1973). The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology*, 51: 914-916.
- Miller, J. D., Young, J. C. y Trenholm, H. L.** (1983). *Fusarium* toxins in field corn. I. Time course of fungal growth and production of deoxinivalenol and other mycotoxins. *Canadian Journal of Botany*, 61: 3080-3087.
- Miller, J. D., Savard, M. E., Schaafsma, A. W., Seifert, K. A. y Reid, L. M.** (1995). Mycotoxin production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* from Ontario and occurrence of fumonisin in the 1993 corn crop. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 17: 233-239.
- Milus, E. A. y Parson, C. E.** (1994). Evaluation of foliar fungicides for controlling *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Disease*, 78: 697-699.
- Miraglia, M., Marvin, H. J. P., Kleter, G. A., Battilani, P., Brera, C., Coni, E., Cubadda, F., Croci, L., De Santis, B., Dekkers, S., Filippi, L., Hutjes, R. W. A., Noordam, M. Y., Pisante, M., Piva, G., Prandini, A., Toti, L., Van Den Born, G. J. y Vespermann, A.** (2009). Climatic change and food safety: An emerging issue with special focus on Europe. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 1009-1021.
- Mirete, S., Patiño, B., Vázquez, C., Jiménez, M., Hinijo, M. J., Soldevilla, C. y González-Jaén, M. T.** (2003). Fumonisin production by *Gibberella fujikuroi*

strains from *Pinus* species. *International Journal of Food Microbiology*, 89: 213-221.

- Mirete, S., Vázquez, C., Mulè, G., Jurado, M. y González-Jaén, M. T.** (2004). Differentiation of *Fusarium verticillioides* from banana fruits by IGS and EF-1 α sequence analyses. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 515-523.
- Mirocha, C. J., Xie, W. y Filho, E. R.** (2003). Chemistry and detection of *Fusarium* mycotoxins. En: *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*. Leonard, K. J. y Bushnell, W. R. (Eds.). APS Press, St. Paul, Minnesota. Págs. 144-164.
- Mishra, P. K., Fox, R. T. y Culham, A.** (2002). Restriction analysis of PCR amplified nrDNA regions revealed intraspecific variation within populations of *Fusarium culmorum*. *FEMS Microbiology Letters*, 215: 291-296.
- Moretti, A., Logrieco, A., Bottalico, A., Ritieni, A., Fogliano, V. y Randazzo, G.** (1997). Diversity in beauvericin and fusaproliferin production by different populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). *Sydowia*, 48: 44-56.
- Moretti, A., Mulè, G., Susca, A., González-Jaén, M. T. y Logrieco, A.** (2004). Toxin profile, fertility and AFLP analysis of *Fusarium verticillioides* from banana fruits. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 601-609.
- Moss, M. O. y Thrane, U.** (2004). *Fusarium* taxonomy with relation to trichothecene formation. *Toxicology Letters*, 153: 23-28.
- Muehlbauer, G. J. y Bushnell, W. R.** (2003). Transgenic approaches to *Fusarium* head blight resistance. En: *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*. Leonard, K. J. y Bushnell, W. R. (Eds.). APS Press, St. Paul, Minnesota. Págs. 318-362.
- Mulè, G., Logrieco, A., Stea, G. y Bottalico, A.** (1997). Clustering of trichothecene-producing *Fusarium* strains determined from 28S ribosomal DNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 1843-1846.
- Mulè, G., Susca, A., Stea, G. y Moretti, A.** (2004). Specific detection of the toxigenic species *Fusarium proliferatum* and *F. oxysporum* from asparagus

plants using primers based on calmodulin gene sequences. *FEMS Microbiology Letters*, 230: 235-240.

Munkvold, G. P. (2003a). Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 705-713.

Munkvold, G. P. (2003b). Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annual Review of Phytopathology*, 41: 99-116.

Musser, S. M. y Plattner, R. D. (1997). Fumonisin composition in cultures of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*, and *Fusarium nygamai*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 1169-1173.

Natori, S., Sakaki, S., Kurata, H., Udagawa, S.-I., Ichinoe, M., Saito, M., Umeda, M. y Ohtsubo, K. (1970). Production of rubratoxin B by *Penicillium purpurogenum* Stoll. *Applied and Environmental Microbiology*, 19: 613- 617.

Nelson, P. E., Toussoun, T. A. y Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium* species. En: *An Illustrated Manual for Identification*. The Pennsylvania State University Press. Pennsylvania.

Nelson, P. E. (1992). Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia*, 117: 29-36.

Nelson, P. E., Desjardins, A. E. y Plattner, R. D. (1993). Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: Biology, chemistry, and significance. *Annual Review of Phytopathology*, 31: 233-252.

Nelson, P. E., Dignani, M. C. y Anaissie E. J. (1994a). Taxonomy, biology and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology Reviews*, 7: 479-504.

Nelson, P. E., Juba, J. H., Ross, P. F. y Rice, L. G. (1994b). Fumonisin production by *Fusarium* species on solid substrates. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*, 77: 522-525.

Nelson, M. A. (1996). Mating systems in ascomycetes: a romp in the sac. *Trends in Genetics*, 12: 69-74.

- Neumann, M. J., Backhouse, D., Carter, D. A., Summerell, B. A. y Burgess, L. W.** (2004). Genetic structure of populations of *Fusarium proliferatum* in soils associated with *Livistona mariae* palms in Little Palm Creek, Northern Territory, Australia. *Australian Journal of Botany*, 52: 543-550.
- Nesci, A., Etcheverry, M. y Magan, N.** (2004). Osmotic and matric potential effects on growth and sugar alcohol and sugar accumulation by *Aspergillus* section *Flavi* strains from Argentina. *Journal of Applied Microbiology*, 96: 956-972.
- Nicholson, P., Simpson, D. R., Wilson, A. H., Chandler, E. y Thomsett, M.** (2004). Detection and differentiation of trichothecene and enniatin-producing *Fusarium* species on small-grain cereals. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 503- 514.
- Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K. F., Frisvad, J. C. y Samson, R. A.** (2009). Fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger* in thai coffee beans. *Food Additives and Contaminants*, 26: 94-100.
- Norred, W. P., Wang, E., Yoo, H., Riley, R. T. y Merrill Jr, A. H.** (1992). *In vitro* toxicology of fumonisins and the mechanistic implications. *Mycopathologia*, 117: 73-78.
- Nyvall, R. F., Percich, J. A. y Mirocha, C. J.** (1999). *Fusarium* head blight of cultivated and natural wild rice (*Zizania palustris*) in Minnesota caused by *Fusarium graminearum* and associated *Fusarium* spp. *Plant Disease*, 83: 159-164.
- O'Callaghan, J., Stapleton, P. C. y Dobson, A. D. W.** (2006). Ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli. *Fungal Genetics and Biology*, 43: 213-221.
- Ocamb, C. M., Juzwik, J. y Martin, F. B.** (2002). *Fusarium* spp. and *Pinus strobus* seedlings: Root disease pathogens and taxa associated with seed. *New Forests*, 24: 67-79.
- O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E., y Ploetz, R. C.** (1998a). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana:

Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 2044-2049.

O'Donnell, K., Cigelnik, E. y Nirenberg, H. I. (1998b). Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90: 465-493.

O'Donnell, K., Kistler, H. C., Tacke, B. K. y Casper, H. H. (2000). Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of the National Academy of Science*, 97: 7905-7910.

O'Donnell, K., Ward, T. J., Geiser, D. M., Kistler, H. C. y Aoki, T. (2004). Genealogical concordance between mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genetics and Biology*, 41: 600-623.

O'Donnell, K., Sarver, B. A. J., Brandt, M., Chang, D. C., Noble-Wang, J., Park, B. J., Sutton, D. A., Benjamin, L., Lindsley, M., Padhye, A., Geiser, D. M. y Ward, T. J. (2007). Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic *Fusaria*, including isolates from the multistate contact lens-associated U.S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006. *Journal of Clinical Microbiology*, 45: 2235-2248.

Osweller, G. D. (2000). Mycotoxins. Contemporary issues of food animal health and productivity. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 16: 511-530.

Ozay, G., Seyhan, F., Pembeci, C., Saklar, S. y Yilmaz, A. (2008). Factors influencing fungal and aflatoxin levels in Turkish hazelnuts (*Corylus avellana* L.) during growth, harvest, drying and storage: a 3-year study. *Food Additives and Contaminants*, 25: 209-218.

Pagano, L., Caira, M. y Fianchi, L. (2005). Pulmonary fungal infection with yeasts and pneumocystis in patients with hematological malignancy. *Annals of Medicine*, 37: 259-269.

- Palazzini J. M., Ramírez M. L., Alberione E. J., Torres A. M. y Chulze S. N.** (2009). Osmotic stress adaptation, compatible solutes accumulation and biocontrol efficacy of two potential biocontrol agents on *Fusarium* head blight wheat. *Biological Control*, 51: 370-376.
- Palmero, D., González, M. de C., Iglesias, C., Ruíz, G. y Tello, J. C.** (2008). Effects of water potential on spore germination and viability of *Fusarium* species. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35: 1411-1418.
- Parlamento Europeo** (2002). Regulación 178/2002 del 28 de Enero de 2002. Regulation laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures of food safety. Official Journal of the European communities, L31. Págs. 1-24.
- Patiño, B., Mirete, S., González-Jaén, M. T., Mulé, G., Rodríguez, M. T. y Vázquez, C.** (2004). PCR detection assay of fumonisin-producing *Fusarium verticillioides*. *Journal of Food Protection*, 67: 1278-1283.
- Peito, A. y Venancio, A.** (2004). An overview of mycotoxins and toxicogenic fungi in Portugal. En: *An overview on toxicogenic fungi and mycotoxins in Europe*. Logrieco, A. y Visconti, A. (Eds.). Kluwer Academic Publishers. Págs. 173-184.
- Pérez-Sierra, A., Landeras, E., León, M., Berbegal, M., García-Jiménez, J. y Armengol, J.** (2007). Characterization of *Fusarium circinatum* from *Pinus* spp. in northern Spain. *Mycological Research*, 111: 832-839.
- Perrone, G., Susca, A., Cozzi, G., Ehrlich, K., Varga, J., Frisvad, J. C., Meijer, M., Noonim, P., Mahakarnchanakul, W. y Samson, R. A.** (2007). Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in Micology*, 59: 53-66.
- Pitt, J. I. y Hocking, A. D.** (1985). Fungi and spoilage. Academic Press. Sydney, Australia.
- Pitt, J. I.** (2000). A laboratory guide to common *Penicillium* species. Food Science Australia, SCIRO. North Ryde, Australia.

- Placinta C. M., D'Mello J. P. F. y MacDonald A. M. C.** (1999). A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 78: 21-37.
- Proctor, R. H., Hohn, T. M. y McCormick, S. P.** (1995). Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8: 593-601.
- Proctor, R. H., Desjardins, A. E., Plattner R. D. y Honh, T. M.** (1999). A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Fungal Genetics and Biology*, 27: 100-112.
- Proctor, R. H., Desjardins, A. E., McCormick, S. P., Plattner, R. D., Alexander, N. J. y Brown, D. W.** (2002). Genetic analysis of the role of trichothecene and fumonisin mycotoxins in the virulence of *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 691-698.
- Proctor, R. H., Brown, D. W., Plattner, R. D., Desjardins, A. E.** (2003). Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. *Fungal Genetics and Biology*, 38: 237-249.
- Proctor, R. H., Plattner, R. D, Brown, D. W., Seo, J.-A. y Lee, Y.-W.** (2004). Discontinuous distribution of fumonisin biosynthetic genes in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycological Research*, 108: 815-822.
- Proctor, R. H., Busman, M., Seo, J.-A., Lee, Y. W. y Plattner, R. D.** (2008). A fumonisin biosynthetic gene cluster in *Fusarium oxysporum* strain O-1890 and the genetic basis for B versus C fumonisin production. *Fungal Genetics and Biology*, 45: 1016-1026.
- Proctor , R. H., Desjardins, A. E. y Moretti, A.** (2010). Biological and chemical complexity of *Fusarium proliferatum*. En: *The Role of Plant Pathology in Food Safety and Food Security. Plant Pathology in the 21st Century*. Strange, R. N. y Gullino, L. M. (Eds.). Springer Netherlands. Págs. 97-111.
- Rabie, C. J., Sydenham, E. W., Thiel, P. G., Lübbenm, A. y Marasas, W. F. O.** (1986). T-2 Toxin production by *Fusarium acuminatum* isolated from oats and barley. *Applied and environmental microbiology*, 52: 594-596

- Ramírez, C.** (1982). Manual and Atlas of the Penicillia. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- Ramírez, M. L., Chulze, S. y Magan N.** (2004a). Impact of environmental factors and fungicides on growth and deoxinivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentinian wheat. *Crop Protection*, 23: 117-125.
- Ramírez, M. L., Chulze, S. N. y Magan, N.** (2004b). Impact of osmotic and matric water stress on germination, growth, mycelial water potentials and endogenous accumulation of sugars and sugar alcohols in *Fusarium graminearum*. *Mycologia*, 96: 470-478.
- Ramírez, M. L., Chulze, S. y Magan, N.** (2006). Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxinivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grains. *International Journal of Food Microbiology*, 106: 291-296.
- RASFF** (2008). Rapid Alert System for Food and Feed, Annual Report 2008. Health and Consumer Protection Directorate-General, Office for Official Publications of the European Communities, Luxemburgo.
- Reynoso, M. M., Chulze, S. N., Zeller, K. A., Torres, A. M. y Leslie, J. F.** (2009). Genetic structure of *Fusarium verticillioides* populations isolated from maize in Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, 123: 207-215.
- Rheeder, J. P., Marasas, W. F. O., Thiel, P. G., Sydenham, E. W., Shephard, G. S. y Van Schalkwyk, D. J.** (1992). *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathology*, 82: 353-357.
- Rheeder, J. P., Marasas, W. F. O. y Vismer, H. F.** (2002). Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 2102-2105.
- Riba, A., Mokrane, S., Mathieu, F., Lebrihi, A. y Sabau, N.** (2008). Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat. *International Journal of Food Microbiology*, 122: 85-92.
- Richard, J. L.** (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses- An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 3-10.

- Riley, R. T., Enongene, E., Voss, K. A., Norred, W. P., Meredith, F. I., Sharma, R. P., Spitsbergen, J., Williams, D. E., Carlson, D. B. y Merrill Jr, A. H.** (2001). Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 109: 301–308.
- Ritieni, A., Fogliano, V., Randazzo, G., Scarallo, A., Logrieco, A., Moretti, A., Mannina, L. y Bottalico, A.** (1995). Isolation and characterization of fusaproliferin, a new toxic metabolite from *Fusarium proliferatum*. *Natural Toxins*, 3: 17–20.
- Ritieni, A., Monti, M. S., Randazzo, G., Logrieco, A., Moretti, A., Peluso, G., Ferracane, R. y Fogliano, V.** (1997). Teratogenic effects of fusaproliferin on chicken embryos. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 3039–3043.
- Rizzo, A., Eskola, M. y Atroshi, F.** (2002). Ochratoxin A in cereals, foodstuffs and human plasma. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 631–637.
- Roux, J., Steenkamp, E. T., Marasas, W. F. O., Wingfield, M. J. y Wingfield, B. D.** (2001). Characterization of *Fusarium graminearum* from *Acacia* and *Eucalyptus* using β -tubulin and histone gene sequences. *Mycologia*, 93: 704–711.
- Samapundo, S., De Meulenaer, B., Atukwase, A., Debevere, J. y Devlieghere, F.** (2007a). The influence of modified atmospheres and their interaction with water activity on the radial growth and fumonisin B₁ production of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on corn. Part I: The effect of initial headspace carbon dioxide concentration. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 160–167.
- Samapundo, S., De Meulenaer, B., Atukwase, A., Debevere, J. y Devlieghere, F.** (2007b). The influence of modified atmospheres and their interaction with water activity on the radial growth and fumonisin B₁ production of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on corn. Part II: The effect of initial headspace oxygen concentration. *International Journal of Food Microbiology*, 113: 339–345.
- Samapundo, S., Devlieghere, F., De Meulenaer, B., Lamboni, Y., Osei-Nimoh, D. y Debevere, J. M.** (2007c). Interaction of water activity and bicarbonate salts in the inhibition of growth and mycotoxin production by

Fusarium and *Aspergillus* species of importance to corn. *International Journal of Food Microbiology*, 116: 266-274.

Sambrook, J. y Rusell, D. W. (2006). *The Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.

Sanchis, V., Abadias, M., Oncins, L., Sala, N., Viñas, I. y Canela, R. (1994). Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in corn-based products from the Spanish market. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 2147-2148.

Sanchis, V., Marín, S. y Ramos, A.J. (2001). Occurrence of toxigenic fungi and related mycotoxins in Spain. En: *Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in plants, food and feeds in Europe*. Logrieco, A. (Ed.). European Commission, COST Action 835. Págs. 191-199.

Sanchis, V. y Magan, N. (2004). Environmental profiles for growth and mycotoxin production. En: *Mycotoxins in food: Detection and Control*. Magan, N. y Olsen, M. (Eds.). Cambridge: Woodhead Publishing Ltd. Págs. 174-189.

Sanchis, V., Marín, S., Magan, N. y Ramos, A. J. (2006). Ecophysiology of fumonisina producers in *Fusarium* section *Liseola*. En: *Advances in Experimental Medicine and Biology. Advances in Food Mycology*. Hocking, A. D., Samson, R. A., Pitt, J. I. y Thrane, U. (Eds.). Springer US. Págs. 115-122.

SCF (2000). Opinion of the Scientific Committee on Food on *Fusarium* toxins- Part 2¹: Zearalenone (ZEA) (expressed on 22 June 2000). http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out65_en.pdf

SCF (2002). Opinion of the Scientific Committee on Food on *Fusarium* toxins. Part 6: Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol (adopted on 26 February 2002). http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out123_en.pdf

Schmidt-Heydt, M. y Geisen, R. (2007). Gene expression as an indication for ochratoxin A biosynthesis in *Penicillium nordicum*. *Mycotoxin Research*, 23: 13-21.

- Schmidt-Heydt, M., Magan, N. y Geisen, R.** (2008). Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors. *FEMS Microbiology Letters*, 284: 142-149.
- Schnerr, H., Vogel, R. F. y Niessen, L.** (2002). Correlation between DNA of trichothecene-producing *Fusarium* species and deoxynivalenol concentrations in wheat-samples. *Letters in Applied Microbiology*, 35: 121-125.
- Schollenberger, M., Müller, H.-M., Rühle, M. y Drochner, W.** (2008). Natural occurrence of 16 *Fusarium* toxins in edible oil marketed in Germany. *Food Control*, 19: 475-482.
- Schweigkofler, W., O'Donnell, K. y Garbelotto, M.** (2004). Detection and quantification of airborne conidia of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker, from two California sites by using a real-time PCR approach combined with a simple spore trapping method. *Applied and Environmental microbiology*, 70: 3512-3520.
- Scott, P. M.** (1989). The natural occurrence of trichothecenes. En: *Trichothecene mycotoxicosis: pathophysiological effects*. Beasley, V. H. (Ed.). CRC Press, Boca Raton, Fla. Págs. 1-26.
- Scott, P. M.** (2001). Analysis of agricultural commodities and food for *Alternaria* mycotoxins. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*, 84: 1809-1817.
- Seifert, K. A., Aoki, T., Baayen, R. P., Brayford, D., Burgess, L. W., Chulze, S., Gams, W., Geiser, D., De Gruyter, J., Leslie, J. F., Logrieco, A., Marasas, W. F. O., Nirenberg, H. I., O'Donnell, K., Rheeder, J., Samuels, G. J., Summerell, B. A., Thrane, U. y Waalwijk, C.** (2003). The name *Fusarium moniliforme* should no longer be used. *Mycological Research*, 107: 643-644.
- Seifert, K. A. y Lévesque, C. A.** (2004). Phylogeny and molecular diagnosis of mycotoxigenic fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 449-471.
- Seo, J., Proctor, R. H. y Plattner, R. D.** (2001). Characterization of four clustered coregulated genes associated with fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics and Biology*, 24: 155-165.

- Shephard, G. S., Thiel, P. G., Stockenström, S. y Sydenham, E. W.** (1996). Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*, 79: 671-687.
- Shephard, G. S., Marasas, W. F. O., Leggott, N. L., Yazdanpanah, H., Rahimian, H. y Safavi, N.** (2000). Natural occurrence of fumonisins in corn from Iran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 1860-1864.
- Shim, W.-B., Flaherty, J. E. y Woloshuk, C. P.** (2003). Comparison of fumonisin B₁ biosynthesis in maize germ and degermed kernels by *Fusarium verticillioides*. *Journal of Food Protection*, 66: 2116-2122.
- Sinha, R. N. y Wallace, H. A. H.** (1966). Ecology of an insect-induced hot spot in stored grain in Western Canada. *Researches on Population Ecology*, 8: 107-132.
- Smith, G. P.** (1976). Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science*, 141: 528-534.
- Smith, I. M., Dunez, J., Lelliot, R. A. y Phillips, D. H.** (1992). Manual de Enfermedades de las plantas. Mundi-Prensa.
- Smith, J. E., Lewis, C. W., Anderson, J. G. y Solomons, G. L.** (1994). Mycotoxins in Human Health. Report EUR 16048 EN. European Commission, Directorate General XII, Bruselas.
- Snijders, C. H. A.** (1990). *Fusarium* head blight and mycotoxin contamination of wheat, a review. *European Journal of Plant Pathology*, 96: 187-198.
- Snyder, W. C., Hansen, H. N. y Oswald, J. W.** (1956). Cultivars of the fungus, *Fusarium*. *Journal of Madras University B*, 27: 185-192.
- Soldevilla, C., Vázquez, C., Patiño, B., Jurado, M. y González-Jaén, M. T.** (2005). Hongos toxicogénicos asociados a trigos y cebadas de Castilla y León. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 31: 519-529.
- Stack, R. W.** (2003). History of *Fusarium* head blight with emphasis on North America. En: *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*. Leonard, K. L. y Bushnell, W. R. (Eds.). APS Press, St. Paul, Minnesota. Págs. 1-34.

- Stankovic, S., Levic, J., Petrovic, T., Logrieco, A. y Moretti, A.** (2007). Pathogenicity and mycotoxin production by *Fusarium proliferatum* isolated from onion and garlic in Serbia. *European Journal of Plant Pathology*, 118: 165-172.
- Starkey, D. E., Ward, T. J., Aoki, T., Gale, L. R., Kistler, H. C., Geiser, D. M., Suga, H., Tóth, B., Varga, J. y O'Donnell, K.** (2007). Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity. *Fungal Genetics and Biology*, 44: 1191-1204.
- Steuter, A. A., Mozafar, A. y Goodin, J. R.** (1981). Water potential of aqueous polyethelene glycol. *Plant Physiology*, 67: 64-67.
- Stob, M., Baldwin, R. S., Tuite, J., Andrews, F. N. y Gillete, K. G.** (1962). Isolation of an anabolic, uterotrophic compound from corn infected with *Gibberella zeae*. *Nature*, 196: 1318.
- Sutton, D. A., Fothergill, A. W. y Rinaldi, M. G.** (1998). Guide to Clinically Significant fungi. Williams & Wilkins Eds.
- Sweeney, M. J. y Dobson, A. D. W.** (1999). Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 175: 149-163.
- Tan, M.-K. y Niessen, L. M.** (2003). Analysis of rDNA ITS sequences to determinate genetic relationship among, and provide a basis for simplified diagnosis of, *Fusarium* species causing crown rot and head blight of cereals. *Mycological Research*, 107: 811-821.
- Taylor, J. W., Jacobson, D. J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D. M., Hibbett, D. S. y Fisher, M. C.** (2000). Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 31: 21-32.
- Tekauz, A., McCallum, B., Ames, N. y Fetch, J. M.** (2004). *Fusarium* head blight of oat– Current status in western Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 26: 473- 479.
- Tolleson, W. H., Couch, L. H., Melchior Jr, W. B., Jenkins, G. R., Muskhelishvili, M., Mushkhelishvili, L., McGarrity, L. J., Domon, O., Morris, S. M. y Howard, P. C.** (1999). Fumonisin B1 induces apoptosis in

cultured human keratinocytes through sphinganine accumulation and ceramide depletion. *International Journal of Oncology*, 14: 833-843.

Torres, M. R., Sanchis, V. y Ramos, A. J. (1998). Occurrence of fumonisins in Spanish beers analyzed by an enzyme-linked immunosorbent assay method. *International Journal of Food Microbiology*, 39: 139-143.

Trenholm, H. L., Friend, D., Hamilton, R. M. G., Prelusky, D. B. y Foster, B. C. (1989). Lethal toxicity and nonspecific effects. En: *Trichothecene mycotoxicosis: pathophysiologic effects*. Beasley, V. L. (Ed.). CRC Press, Boca Raton, Fla. Págs. 107-142.

Tuite, J., Shaner, G. y Everson, R. J. (1990). Wheat scab in soft red winter wheat in Indiana in 1986 and its relation to some quality measurements. *Plant Disease*, 74: 959-962.

Ueno, Y. (1987). Trichothecenes in food. En: *Mycotoxins in food*. Krogh, P. (Ed.). Academic Press, London.

Uhlig, S. e Ivanova, L. (2004). Determination of beauvericin and four other enniatins in grain by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1050: 173-178.

Urry, W. H., Wehrmeister, H. L., Hodge, E. B. y Hidy, P. H. (1966). The structure of zearalenone. *Tetrahedron Letters*, 27: 3109-3114.

User Bulletin N°2: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems, 1997.
(<http://dna9.intmed.uiowa.edu/RealtimePCRdocs/ComparAnalBulletin2.pdf>).

Varga, J., Kevei, E., Rinyu, E., Téren, J. y Kozakiewicz, Z. (1996). Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 4461-4464.

Varga, J., Rigó, K., Téren, J. y Mesterházy, Á. (2001). Recent advances in ochratoxin research I. Production, detection and occurrence of ochratoxins. *Cereal Research Communications*, 29: 85-100.

Velluti A., Marín, S., Bettucci, L., Ramos A. J. y Sanchis, V. (2000a). The effect of fungal competition on colonization of maize grain by *Fusarium*

moniliforme, *F. proliferatum* and *F. graminearum* and on fumonisina B₁ and zearalenona formation. *International Journal of Food Microbiology*, 59: 59-66.

Velluti, A., Marín, S., González, R., Ramos, A. J. y Sanchis, V. (2000b). Fumonisin B₁, zearalenone and deoxinivalenol production by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* in mixed cultures on irradiated maize kernels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81: 88-94.

Velluti A., Sanchis, V., Ramos, A. J., Egido, J. y Marín, S. (2003). Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B₁ production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. *International Journal of Food Microbiology*, 89: 145-154.

Vesonder, R. F., Ellis, J. J., Kwolek, W. F. y DeMarini, D. J. (1982). Production of vomitoxin on corn by *Fusarium graminearum* NRRL 5883 and *Fusarium roseum* NRRL 6101. *Applied and Environmental Microbiology*, 43: 967-970.

Visconti, A., Minervini, F., Lucivero, G. y Gambatesa, V. (1991). Cytotoxic and immunotoxic effects of *Fusarium* mycotoxins using a rapid colorimetric bioassay. *Mycopathologia*, 113: 181-186.

Von Arx, J. A. (1981). The Genera of fungi sporulating in pure culture. J. Cramer.

Voss, K. A., Smith, G. W. y Haschek, W. M. (2007). Fumonisin: Toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. *Animal Feed Science and Technology*, 137: 299-325.

Waalwijk, C., Van der Lee, T., De Vries, I., Hesselink, T., Arts, J. y Kema, G. (2004a). Synteny in toxigenic *Fusarium* species: The fumonisin gene cluster and the mating type region as examples. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 533-544.

Waalwijk, C., Van der Heide, R., De Vries, I., Van der Lee, T., Schoen, C., Costrel-de Corainville, G., Häuser-Hahn, I., Kastelein, P., Köhl, J., Lonnet, P., Demarquet, T. y Kema, G. H. J. (2004b). Quantitative detection of *Fusarium* species in wheat using TaqMan. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 481-494.

- Waalwijk, C., De Vries, P. M., Köhl, J., Xu, X., Van Der Lee, T. A. J. y Kema, G. H. J.** (2008). Development of quantitative detection methods for *Fusarium* in cereals and their application. En: *Mycotoxins: Detection, Methods, Management, Public Health and Agricultural Trade*. Leslie, J., Banbyopadhyay, R. y Visconti, A. (Eds.). CABI Publish. Págs, 197-207.
- Wagacha, J. M. y Muthomi, J. W.** (2008). Mycotoxin problem in Africa: current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *International Journal of Food Microbiology*, 124: 1-12.
- WHO** (1999). Basic Food Safety for Health Workers.
- WHO** (2002). Fifty-six report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series, 906. Organización Mundial de la Salud, Geneva.
- Walter, S., Brennan, J. M., Arunachalam, C., Ansari, K. I., Hu, X., Khan, M. R., Trognitz, F., Trognitz, B., Leonard, G., Egan, D. y Doohan, F. M.** (2008). Components of the gene network associated with genotype-dependent response of wheat to the *Fusarium* mycotoxin deoxinivalenol. *Functional and Integrative Genomics*, 8: 421-427.
- Walter, S., Nicholson, P. y Doohan, F. M.** (2009). Action and reaction of host and pathogen during *Fusarium* head blight disease. *New Phytologist*, 185: 54-66.
- Wang, E., Norred, W. P., Bacon, C. W., Riley, R. T. y Merrill, A. H.** (1991). Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins: implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *Journal of Biological Chemistry*, 226: 14486-14490.
- Wang, Q., Wang, J., Yu, F., Zhu, X., Zaleta-Rivera, K. y Du, L.** (2006). Mycotoxin fumonisins: Health impacts and biosynthetic mechanism. *Progress in Natural Science*, 16: 7-15.
- Ward, T. J., Bielawski, J. P., Kistler, H. C., Sullivan, E. y 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*, 99: 9278-9283.

- Ward, T. J., Clear, R. M., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Gaba, D., Patrick, S., Starkey, D. E., Gilbert, J., Geiser, D. M. y Nowicki, T. W.** (2008). An adaptive evolutionary shift in *Fusarium* Head Blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America. *Fungal Genetics and Biology*, 45: 473-483.
- Watanabe, T.** (1994). Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi. Lewis Publishers, USA.
- White, D. G.** (1999). Compendium of Corn Diseases, Third Edition. White, D. G. (Ed.). APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Wicklowsky, D. T., Hesseltine, C. W., Shotwell, O. L. y Adams, G. L.** (1980). Interference competition and aflatoxin levels in corn. *Phytopathology*, 70: 761-764.
- Wilbur, W. J. y Lipman, D. J.** (1983). Rapid similarity searches of nucleic acid and protein data Banks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80: 726-730.
- Wilson, M. y Lindow, S. E.** (1994). Ecological similarity and coexistence of epiphytic ice-nucleating (Ice+) *Pseudomonas syringae* strains and a non-ice-nucleating (Ice-) biological control agent. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 3128-3137.
- Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A. y Rasmussen, A. P.** (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, 22: 130-131, 134-138.
- Wollenweber, H. W. y Reinking, O. A.** (1935). Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung. Paul Parey, Berlin Germany.
- Wright, V. F., De las Casas, E. y Harein, P. K.** (1976). The response of *Tribolium confusum* to the mycotoxin zearalenone (F-2) and T-2 toxin. *Environmental Entomology*, 5: 371- 374.
- Xu, X.** (2003). Effects of environmental conditions on the development of *Fusarium* ear blight. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 683-689.

- Xu, X. M., Nicholson, P., Thomsett, M. A., Simpson, D., Cooke, B. M., Doohan, F. M., Brennan, J., Monaghan, S., Moretti, A., Mulé, G., Hornok, L., Beki, E., Tatnell, J., Ritini, A. y Edwards, S. G.** (2008). Relationship between the fungal complex causing *Fusarium* head blight of wheat and environmental conditions. *Phytopathology*, 98: 69-78.
- Yan, k., Dickman, M. B., Xu, J. R. y Leslie, J. F.** (1993). Sensitivity of field strains of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*) to benomyl and higromicin B. *Mycologia*, 85: 206-213.
- Yazar, S. y Omurtag, G. Z.** (2008). Fumonisin, trichothecenes and zearalenone in cereals. *International Journal of Molecular Sciences*, 9: 2062-2090.
- Yli-Mattila, T., Paavanen-Huhtala, S., Bulat, S. A., Alekhina, I. A. y Nirenberg, H. I.** (2002). Molecular, morphological and phylogenetic analysis of the *Fusarium avenaceum*/*F. arthrosporioides*/*F. tricinctum* species complex- a polyphasic approach. *Mycological Research*, 106: 655-669.
- Yoder, O. C., Valent, B. y Chumley, F.** (1986). Genetic nomenclature and practice for plant pathogenic fungi. *Phytopathology*, 76: 383-385.
- Zeller, K. A., Summerell, B. A., Bullock, S. y Leslie, J. F.** (2003). *Gibberella konza* (*Fusarium konzum*) sp. nov. from prairie grasses, a new species in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 95: 943-954.
- Zimo, N. y Scott, G. E.** (1992). Interaction of *Fusarium moniliforme* and *Aspergillus flavus* on kernel infection and aflatoxin contamination in maize ears. *Plant Disease*, 76: 771-773.

ARTÍCULOS.

ARTÍCULOS.

Los resultados mostrados en esta tesis han sido incluidos en las siguientes publicaciones:

Jurado M, Marín P, Magan N, González-Jaén MT. 2008. Relationship between Solute and Matric Potential Stress, Temperature, Growth, and *FUM1* Gene Expression in Two *Fusarium verticillioides* Strains from Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 2032-2036.

González-Jaén MT, Marín P, González-Salgado A, Vázquez C, Aparicio N, Patiño B, Fernández C, Esteban MM. 2008. Detección de Especies Fúngicas Productoras de Toxinas en Cereales Españoles. Utilidad de los Métodos Basados en el ADN para Predecir el Riesgo de Micotoxinas en Cereales. *Innovación y Tecnología Agroalimentaria*, 336- 43.

Jurado M, Marín P, Callejas C, Moretti A, Vázquez C, González-Jaén MT. 2010. Genetic variability and Fumonisin production by *Fusarium proliferatum*. *Food Microbiology*, 27: 50- 57.

Marín P, Magan N, Vázquez C, González-Jaén MT. Differential effect of environmental conditions on growth and regulation of the fumonisin biosynthetic gene *FUM1* in the maize pathogens and fumonisin producers *F. verticillioides* and *F. proliferatum*. Enviado para publicación. *FEMS Microbiology Ecology*.

Marín P, Jurado M, Magan N, Vázquez C, González-Jaén MT. Effect of Solute Stress and Temperature on Growth Rate and *TRI5* Gene expression using real time RT-PCR in *Fusarium graminearum* from Spanish wheat. Enviado para publicación. *International Journal of Food Microbiology*.