

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Genética



TESIS DOCTORAL

**Control de especies de *Fusarium* productoras de fumonisinas: factores
ecofisiológicos y cambio climático**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alejandra Cruz Varona

Directores

María Teresa González Jaén
María Paz Fernández Quijada

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



**UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID**

**CONTROL DE ESPECIES DE *Fusarium*
PRODUCTORAS DE FUMONISINAS:
FACTORES ECOFISIOLÓGICOS Y
CAMBIO CLIMÁTICO**

TESIS DOCTORAL

ALEJANDRA CRUZ VARONA

MADRID, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**CONTROL DE ESPECIES DE *Fusarium*
PRODUCTORAS DE FUMONISINAS:
FACTORES ECOFISIOLÓGICOS Y CAMBIO
CLIMÁTICO**

**Tesis doctoral presentada por Alejandra Cruz Varona
para optar al grado de Doctora en Biología por la
Universidad Complutense de Madrid**

Directoras:

Dra. María Teresa González Jaén

Dra. María Paz Fernández Quijada

MADRID, 2015

*A mis padres y a mi hermana Irene.
A Alessandro.*

**El secreto de la creatividad está en dormir bien
y abrir la mente a las posibilidades infinitas.**

¿Qué es un hombre sin sueños?

Albert Einstein

**No se puede esperar a la inspiración;
hay que salir a buscarla con un bate.**

Jack London

Agradecimientos

No he querido escribir los agradecimientos y dedicatorias hasta el final del todo. Por tanto, eso significa que he terminado de escribir la tesis. En realidad no es verdad, porque cada vez que la leo cambio algo y retoco alguna frase, así que digamos que he terminado de leer y releer mi tesis, y ahora toca que la lean otros. A muchos de los que le echaréis un vistazo os debo un agradecimiento (y a algunos también una cena), así que vamos con lo primero, y de lo demás ya hablaremos.

En primer lugar me gustaría dar las gracias a la Dra. María Teresa González Jaén. Gracias a ti he llegado hasta aquí, con todo lo que eso supone. Muchas gracias por tu confianza, por tus años de conocimientos compartidos, por aceptarme en tu grupo cuando aún estaba en la carrera, por todas las oportunidades y por ayudarme tanto siempre, y en especial escribiendo esta tesis. Gracias por tus correcciones y consejos, y también por hacerme ver que el camino siempre sigue hacia delante, y que no hay que parar ni darse la vuelta. Siempre te estaré agradecida, Maite.

También tengo que dar las gracias de manera especial a la Dra. M^a Paz Fernández Quijada. Muchas gracias por compartir tantos días juntas, por enseñarme tantas cosas nuevas y confiar en mí, y por toda tu ayuda en esta tesis. Gracias por los buenos y no tan buenos momentos que hemos vivido juntas (¡de todo se aprende!) y por hablarme como una hermana mayor cuando ha sido necesario. Gracias, Paz.

Quiero dar las gracias a los que han formado parte de mi grupo de investigación durante estos años, con los que he compartido el laboratorio en genética. A Ana, Carol, Federica, Cova (perdón, la Dra. Covadonga Fernández), Alberto; a Inés, a Geli, a Eva, que realizaron estancias en nuestro laboratorio. ¡Perdón si me dejo a alguien! Todos me habéis enseñado mucho. Y quiero dar las gracias muy especialmente a la Dra. Patricia Marín García. Muchas gracias por enseñarme básicamente todo en el laboratorio, por confiar en mí desde el primer día y ayudarme a que todo fuera hacia delante. Gracias por pensar en mí y por darme responsabilidades, y por esos protocolos simplificados tan chulos que sigo utilizando. Muchas gracias, Patri.

Tengo que agradecer también a la parte de mi grupo de investigación de microbiología. A las Dras. Covadonga Vázquez y Belén Patiño, muchas gracias por vuestra ayuda siempre que lo he necesitado. Al Dr. Miguel Jurado y a la Dra. Jéssica Gil

Serna, que para mí seguiréis siendo de micro aunque os hayáis mudado. Gracias por todos los consejos y la ayuda que me habéis dado. Muchas gracias.

Gracias al Dr. Salvador Mirete por su gran ayuda con el archienemigo PAUP (que sinceramente algo de cariño le acabé cogiendo). Al Dr. Christian J. Cumagun de la Universidad de Los Baños (Filipinas) por su colaboración y el aislamiento de las cepas empleadas en el capítulo 2. Gracias a Carlos Soldevilla de la UPM, por toda su ayuda con los aislamientos del capítulo 5 de esta tesis. Gracias por estar disponible para nosotras a pesar de las placas y placas y placas. Y también gracias al Dr. Daniel Palmero de la UPM por las colaboraciones que hemos realizado y por estar siempre dispuesto a ayudarme. Gracias también a Laura por hacer el trabajo muy fácil. ¡Iré a visitaros pronto!

Tengo que agradecer a la empresa AMC Fresco España y al grupo SNFL el darme la posibilidad de disfrutar de mi beca, la cual me permitió conocer a Paz y ver un mundo totalmente diferente a la investigación. Gracias especialmente a Josep, David y Alba, con vosotros aprendí muchísimas cosas nuevas que, aunque me alejaron un poco del camino fúngico, me resultaron muy interesantes y provechosas. Gracias por esos tres años.

Y fuera de los hongos, quiero dar las gracias a todos los que formáis parte del departamento de Genética. A cada uno de los profesores, ya que con todos he compartido algo, empezando por los consejos de departamento. Gracias por vuestra ayuda, por vuestras charlas o simples sonrisas al cruzarnos por el pasillo. Gracias por todo el apoyo que he sentido de vuestra parte. A todos los que me habéis dado clase, por enseñarme infinidad de cosas, en especial al Dr. Tomás Naranjo por la buena nota de genética general que me permitió entrar en el laboratorio y por tanto, llegar hasta aquí; al Dr. Juan Luis Santos por desentrañarme la citogenética y hacérmela un poco más fácil; y a la Dra. Ana Margarita Figueiras por acercarme al mundo de la biología forense. A las directoras del departamento durante todo este tiempo, las Dras. Conchita Romero y Charo Linacero. Al Dr. Javier Gallego por su ayuda, en especial en este último mes de estrés de tesis. A mis “vecinas” de laboratorio, las Dras. Pilar Arana y Alicia de la Peña, gracias por los buenos momentos y por toda la ayuda prestada. Es muy grande el cariño que siento hacia vosotras. Y a mi “vecina” de despacho, la Dra. Carmen Callejas, por hacer más ligero el tiempo en el departamento y por tu ayuda con

los árboles filogenéticos. A todos los profesores con los que he compartido prácticas y me han ayudado, aconsejado y enseñado tantas cosas: al Dr. César Benito, al Dr. Juan Manuel Vega, a las Dras. Mónica Pradillo y Mónica González, a la Dra. Lola Ochando, al Dr. Javier Espino y a la Dra. María Jesús Puertas. Por supuesto gracias a Mónica de la Cruz, a M^a Carmen Moreno y a José Barrios, ¡qué raro me resulta escribiros con apellidos! ¡Sin vosotros no hubiera podido hacer nada de nada! Ni medios, ni ordenadores, ni papeleos... ¡Muchísimas gracias a todos!

Y por supuesto no puedo dejar de dar las gracias a mis compañeros de laboratorio, a los que siguen y a los que ya no están. Son todos doctores o casi, así que dejo los formalismos por un momento. A Bea, Ceci y Myriam, por sus charlas, sus sonrisas, sus cotilleos y también por su gran ayuda. A Javi y a Diego, por los ánimos constantes, aunque fuera por *whatsapp*. A María Cuacos (¡gracias por las instrucciones!), a Naike, a Silva (¡ánimo que terminamos!), a Keta, a Miki que me “obligó” a entrar en el departamento, a Diaa, a Gustavo por su compañía en los comienzos, a Laurita, a Pedro... Gracias a todos, ¡esto no hubiera sido lo mismo sin vosotros!

Y por último no puedo dejar de lado a los ajenos a la genética pero igual de importantes. En primer lugar quiero dar las gracias a mis padres. Siempre me habéis apoyado en todo lo que me he propuesto, ayudándome y guiándome cuando lo he necesitado y dándome libertad para elegir mi camino. Gracias a vosotros podéis leer esta tesis, gracias por hacerme sentir que puedo con todo. Y de igual manera, tengo que dar las gracias a mi hermana Irene, por estar orgullosa de mí, ¡antes de incluso de ver todo lo que he escrito! Gracias Nani por quererme tanto, y por estar ahí siempre. Os quiero mucho.

Muchas gracias a toda mi familia y a mi familia política, ¡sois tantos que tendría que usar varias páginas para nombraros a todos! Gracias por estar pendientes de mi trabajo y por estar deseando verme en acción defendiendo esta tesis. Gracias a todos mis tíos, primos y resto de familia. Gracias especiales a Inés y a Elisa, por interesaros siempre. Gracias a todos por conformaros con un simple “bien” como respuesta a “¿qué tal vas con la tesis?”. Gracias también a mis abuelos, me hubiera encantado veros apoyándome en la defensa, aunque no os preocupéis, que estoy segura de que estáis conmigo. También mi padrino Paco. Gracias a todos.

Y no puedo dejar de lado a todos mis amigos, que aún sin saber muy bien qué he estado haciendo todo este tiempo, no habéis dudado en preguntarme, darme consejos e incluso alguno de vosotros ofreceros a leer la tesis y corregirla (si eso no es amistad...). Gracias a Edurne, a Nerea y a Saúl. Creo que no puede haber mejores amigos, ¡os quiero tanto! Gracias a Tito (¡vamos, que tú también puedes!) y a Iciar, por tus ánimos en mayúsculas. A todos mis amigos de Villalba (Germán, Joni, Alejo... ¡por fin!), mis compis de equipo, amigos de baile, de Madrid y todos los que en algún momento os habéis enterado que hacía una tesis y me habéis mandado buenos deseos.

Por último y, como se suele decir, no por ello menos importante, quiero dar las gracias a Aless. Gracias por animarme, aguantarme y por tener claro que en algún momento iba a terminar la tesis. Gracias por estar a mi lado, por apagarme el ordenador cuando ya era demasiado (aunque te has jugado la vida), gracias por perdonarme todo porque “¡estoy escribiendo la tesis!” y sobre todo por hacerme reír. Gracias por confiar en mí todo este tiempo. Te quiero mucho.

Gracias a Perla por sentarte encima de mis papeles y así conseguir que me levantara de la silla un rato.

Gracias a Alvarito por poner la cara más triste que he visto nunca cuando me tenía que ir a escribir.

Y gracias a la salsa, al merengue y a la bachata por distraerme, relajarme e inspirarme a partes iguales.

Gracias a todos.

Alejandra, Noviembre 2015.

Abreviaturas

Abreviaturas

ABC: *ATP binding cassette* (transportador)

AFB₁: Aflatoxina B₁

AFLs: Aflatoxinas

ANOVA: Análisis de la Varianza

a_w: Actividad de Agua

BEA: Beauvericina

Bt: *Bacillus thuringiensis*

cDNA: DNA complementario del RNA mensajero

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

CO₂: Dióxido de carbono

C_T: *Threshold Cycle*. Ciclo umbral de la RT-PCR a tiempo real

DAS: Diacetoxiscirpenol

DEPC: Dietilpirocarbonato

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DNasa: Desoxirribonucleasa

dNTP: Deoxinucleótido Trifosfato

DON: Deoxinivalenol

DTT: Ditiotreitól

EC: *European Commission*. Comisión europea

Eds: Editores

EDTA: Ácido etilen-diamino-tetracético

EEUU: Estados Unidos de América

EF-1 α : *Elongation Factor 1 α* . Factor de elongación 1 α

EFSA: *European Food Safety Authority*. Autoridad europea de seguridad alimentaria.

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

EU: *European Union*. Unión europea.

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

FB: Fumonisinias B₁, B₂ y B₃.

FB₁: Fumonisinina B₁

FB₂: Fumonisinina B₂

FB₃: Fumonisinina B₃

FB₄: Fumonisinina B₄

Fg: *Fusarium graminearum*

FFSC: *Fusarium fujikuroi Species Complex*. Complejo de especies *Fusarium fujikuroi*.

FGCS: *Fusarium graminearum Species Complex*. Complejo de especies *Fusarium graminearum*

FHB: *Fusarium Head Blight*. Fusariosis de la espiga

FHIA: Fundación Hondureña de Investigación Agrícola

FOSC: *Fusarium oxysporum Species Complex*. Complejo de especies *Fusarium oxysporum*

FP: Fusaproliferina

Fs: *Fusarium sporotrichioides*

FSSC: *Fusarium solani Species Complex*. Complejo de especies *Fusarium solani*

FUS: Fusarina C

GB: Giberelinas

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

HSD: *Honestly Significant Difference* (Test HSD de Tukey)

HT2: Toxina HT-2

IARC: *International Agency for Research on Cancer*. Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer.

ICNafp: *International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants*. Código Internacional de Nomenclatura para algas, hongos y plantas

IFAPA: Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica

IGS: *Intergenic Spacer*. Espaciador intergénico (del DNA ribosómico)

IMA: *International Mycological Association*. Asociación Micológica Internacional.

IRTA: *Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries*. Instituto de Investigación y tecnología Agroalimentaria

ISTA: *International Seed Testing Association*. Asociación Internacional de Ensayos de Semillas

ITS: *Internal Transcribed Sequence*. Secuencia interna transcrita.

JECFA: *Joint (FAO/WHO) Expert Committee on Food Additives*. Comité mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios

Kb: Kilobases

LD: Dosis Letal

LMR: Límite Máximo de Residuo

Mb: Megabases

MDR: *Multidrug Resistance* (transportadores)

MFS: *Major Facilitator Superfamily* (transportadores)

MON: Moniliformina

MPa: Megapascales

NCBI: *National Centre for Biotechnology Information*. Centro nacional de información biotecnológica.

NIV: Nivalenol

O₂: Oxígeno

OTA: Ocratoxina A

PAUP: *Phylogenetic Analysis Using Parsimony*. Análisis filogenético mediante parsimonia.

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PDA: Agar Dextrosa Patata

PKS: Poliquétido sintasa

p/v: Peso/volumen

RAP: Red de Acción en Plaguicidas

RAP-AL: Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas en América Latina

rDNA: DNA ribosómico

RNA: Ácido Ribonucleico

rpm: Revoluciones por minuto

RT-PCR: Transcripción Inversa – Reacción en cadena de la Polimerasa

TAE: Tampón Tris-Acetato- EDTA

T2: Toxina T-2

TBR: *Tree Bisection and Reconnection*. Bisección y reconexión de árboles

tn: Toneladas

UCM: Universidad Complutense de Madrid

UE: Unión Europea

UV: Ultravioleta

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

ZEA: Zearalenona

Ψ_w : Potencial Hídrico

Índice

Índice

Resumen	1
Abstract	6
Capítulo 1. Introducción general	13
1.1. El género <i>Fusarium</i>	15
1.1.1. Un género muy variable, una taxonomía conpleja	16
1.1.2. Alelos de apareamiento en <i>Fusarium</i>	19
1.1.3. El complejo de especies <i>Fusarium fujikuroi</i> (FFSC)	21
1.1.4. Identificación de las especies del género <i>Fusarium</i>	22
1.1.5. Otros géneros fúngicos asociados a cereales	25
1.2. Toxinas producidas por <i>Fusarium</i>	28
1.2.1. Fumonisinias	31
1.2.2. Tricotecenos	35
1.2.3. Zearalenona	39
1.2.4. Moniliformina, beauvericina, fusarina C y fusaproliferina	40
1.2.5. Otras micotoxinas producidas por <i>Fusarium</i>	43
1.3. Factores que determinan el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas	43
1.3.1. Temperatura	44
1.3.2. Estrés hídrico	45
1.3.3. Sustrato	46
1.3.4. pH	46
1.3.5. Concentración de gases atmosféricos	47
1.3.6. Interacciones microbianas	48
1.3.7. Insectos	49
1.4. Cereales: medidas de control y prevención de la contaminación por hongos toxígenos	50
1.4.1. Medidas preventivas para las especies de <i>Fusarium</i>	51
1.4.2. Eliminación de las micotoxinas sintetizadas por las especies de <i>Fusarium</i> en cereales	53

1.5. Análisis del cambio climático	54
1.6. Objetivos	58
Capítulo 2. Análisis filogenético, de producción de fumonisinas y de la expresión del gen <i>FUM1</i> de cepas de <i>Fusarium fujikuroi</i> aisladas en plantaciones de arroz en Filipinas..... 59	
2.1. Introducción	61
2.2. Material y Métodos	63
2.2.1. Material biológico	63
2.2.2. Extracción de DNA. Identificación de género y tipo de apareamiento por PCR convencional	64
2.2.3. Amplificación del gen <i>EF-1α</i> y secuenciación	66
2.2.4. Análisis filogenético	67
2.2.5. Análisis de producción de fumonisinas	68
2.2.6. Extracción del RNA total	68
2.2.7. Síntesis de cDNA	69
2.2.8. RT-PCR a tiempo real	70
2.3. Resultados	73
2.3.1. Identificación de especies e idiomorfos de Apareamiento	73
2.3.2. Análisis filogenético	75
2.3.3. Análisis de la producción de fumonisinas de cepas de <i>F. fujikuroi</i> y detección de la expresión del gen <i>FUM1</i> por RT-PCR a tiempo real	76
2.4. Discusión	78
Capítulo 3. Influencia del sustrato sobre el crecimiento y la expresión del gen <i>FUM1</i> en <i>Fusarium verticillioides</i> y <i>Fusarium proliferatum</i>.....83	
3.1. Introducción	85
3.2. Material y Métodos	87
3.2.1. Material biológico	87
3.2.2. Medios de cultivo. Obtención de las distintas condiciones ambientales	88

3.2.3. Inoculación, incubación y medición del crecimiento Fúngico	88
3.2.4. Extracción del RNA total y síntesis de cDNA	89
3.2.5. RT-PCR a tiempo real y análisis cuantitativo de los datos	90
3.2.6. Análisis estadístico de los datos	92
3.3. Resultados	92
3.3.1 Efecto del sustrato sobre el crecimiento a diferentes temperaturas y potenciales hídricos	92
3.3.2 Efecto del sustrato sobre la expresión del gen <i>FUM1</i> a diferentes temperaturas y potenciales hídricos	99
3.4. Discusión	102

Capítulo 4. Efectos combinados del fungicida benomilo, del estrés hídrico y de la temperatura sobre la tasa de crecimiento fúngico y la expresión relativa de los genes *FUM1* y *FUM19* en *Fusarium verticillioides*.....107

4.1. Introducción	109
4.2. Material y Métodos	113
4.2.1. Material biológico	113
4.2.2. Medio de cultivo. Determinación de las dosis LD ₅₀ y LD ₉₀ de benomilo	113
4.2.3. Determinación de las condiciones experimentales específicas de potencial hídrico. Condiciones de inoculación, incubación y medición del crecimiento fúngico	115
4.2.4. Extracción del RNA total y síntesis de cDNA	116
4.2.5. RT-PCR a tiempo real	117
4.2.6. Análisis cuantitativo de los datos obtenidos por RT-PCR a tiempo real	118
4.2.7. Análisis estadístico de los resultados	119
4.3. Resultados	120
4.3.1. Efecto de la temperatura, el potencial hídrico y el benomilo sobre la tasa de crecimiento fúngico	120

4.3.2. Efecto de la temperatura, el potencial hídrico y el benomilo sobre la expresión relativa de los genes <i>FUM1</i> y <i>FUM19</i>	123
4.4. Discusión	128
Capítulo 5. Análisis de la microbiota toxígena asociada a trigo blando (<i>Triticum aestivum</i>) en dos regiones climatológicas españolas.....133	
5.1. Introducción	135
5.2. Material y métodos	139
5.2.1. Material biológico analizado	139
5.2.2. Diagnóstico microbiológico tradicional: aislamiento e identificación de cepas fúngicas	140
5.2.3. Diagnóstico molecular: procesamiento e Identificación de cepas fúngicas	143
5.2.4. Datos meteorológicos	146
5.3. Resultados	146
5.3.1. Análisis microbiológico tradicional de muestras de trigo blando de Córdoba y Lleida en la campaña 2011	146
5.3.2. Cálculo de los índices de riqueza específica y Biodiversidad	149
5.3.3. Análisis molecular de especies de <i>Fusarium</i> y <i>Aspergillus</i> en muestras de trigo blando de Córdoba y Lleida en la campaña 2011	150
5.3.4. Datos integrados obtenidos de ambos métodos de identificación de especies micotoxígenas	152
5.3.5. Datos climatológicos	153
5.4. Discusión	155
Capítulo 6. Discusión general.....163	
Conclusiones.....175	
Bibliografía.....181	

Resumen

Resumen

Las especies del género *Fusarium* están entre los patógenos vegetales que más pérdidas económicas causan alrededor del mundo. Se trata de un grupo de hongos que colonizan diferentes hospedadores vegetales, donde ocasionan marchitamientos, podredumbres y chancros. Son especialmente importantes en cereales, afectando a las industrias agroalimentarias y de procesado y transformación de alimentos y piensos, ya que reducen la producción y calidad de la cosecha. Además, sus especies son importantes productoras de micotoxinas, una amenaza para la salud vegetal, animal y humana, por lo que su presencia está legalmente regulada en productos agroalimentarios.

Entre las toxinas más importantes producidas por los hongos de este género destacan las fumonisinas, micotoxinas tóxicas y carcinógenas causantes de diversas enfermedades que afectan tanto a los animales como al ser humano, principalmente debido al consumo de cereales contaminados. Son producidas principalmente por las especies *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. fujikuroi*, pertenecientes al complejo de especies *Fusarium fujikuroi* (FFSC).

Estudiar el efecto que los principales factores ecofisiológicos (temperatura y potencial hídrico) presentan sobre el crecimiento fúngico y la biosíntesis de toxinas, permite conocer la distribución de las comunidades fúngicas en las diferentes regiones geográficas, así como predecir el riesgo potencial de producción de las toxinas bajo unas condiciones ambientales determinadas. Según las previsiones del cambio climático, estas condiciones sufrirán variaciones, de manera que en España aumentará la temperatura y disminuirá la disponibilidad de agua. Esto podría ocasionar una alteración de la microbiota propia de los cultivos agrícolas, de manera que ciertas especies se desplazarían o modificarían su frecuencia de aparición y dominancia, y en consecuencia, el tipo y los niveles de síntesis de micotoxinas.

El objetivo central de esta Tesis fue ampliar la información disponible sobre tres de las especies de *Fusarium* más importantes por su capacidad de contaminar cereales a nivel mundial: *F. fujikuroi*, *F. verticillioides* y *F. proliferatum*. Con este objetivo, se realizaron una serie de estudios en cada una de ellas, poniéndolas además en relación

con las nuevas condiciones atmosféricas esperadas a consecuencia del cambio climático. Estos estudios se describen en 4 capítulos.

En el caso de *F. fujikuroi*, patógeno principal del arroz, se trata de una especie menos estudiada que las otras dos, por lo que no se contaba con herramientas de análisis similares a las desarrolladas para *F. verticillioides* y *F. proliferatum*. Por ello, en el capítulo 2, se ha desarrollado, optimizado y aplicado a la caracterización de poblaciones de arroz de esta especie, un protocolo de RT-PCR a tiempo real. Los resultados de este análisis mostraron una expresión relativa del gen *FUM1* en todas las cepas productoras de fumonisinas, además de algunas cepas que no sintetizaron la toxina. Al medir la capacidad potencial de producción de esta toxina por parte de *F. fujikuroi* mediante el método ELISA, se demostró que casi la mitad de las cepas eran productoras de fumonisinas, algunas a niveles elevados, por lo que probablemente se subestima la capacidad de su síntesis de esta especie. Por último, se llevó a cabo un estudio filogenético de las cepas de *F. fujikuroi* junto con cepas de *F. proliferatum*, especie cercana. Las cepas de las distintas especies se separaron en dos grupos bien diferenciados, el de las cepas de *F. fujikuroi* que presentó una variabilidad intraespecífica muy baja, similar a la que presenta *F. verticillioides*, independientemente del hospedador o el origen geográfico; y el de cepas de *F. proliferatum*, con una variabilidad mucho mayor, sin relación con el origen o el hospedador.

El capítulo 3 aborda diversos aspectos de las especies *F. proliferatum* y *F. verticillioides*. En primer lugar, se completa el perfil ecofisiológico de ambas especies, incluyendo condiciones típicas de escenarios de futuro cambio climático en España, con la determinación de patrones de crecimiento y de biosíntesis de fumonisinas, que se estudia mediante la cuantificación de la expresión del gen *FUM1*, gen clave en su biosíntesis, mediante protocolos específicos de RT-PCR a tiempo real. Además, se determinó la influencia de otro factor importante, el sustrato (medios de cebada, maíz y trigo), sobre el crecimiento y la biosíntesis de fumonisinas, teniendo en cuenta los factores de temperatura y potencial hídrico. Y por último en el caso de *F. verticillioides* se determinó la eficacia de un agente antifúngico convencional (benomilo) sobre los mismos dos parámetros. El crecimiento fúngico de estas dos especies se dio en un amplio rango de condiciones permisivas, tanto en medio sintético, como en los medios de extracto de cereales. Aunque la tasa de crecimiento de *F. verticillioides* fue mayor, ambas especies fueron capaces de crecer a temperaturas entre 15 y 35°C y con un estrés

hídrico elevado. A 40°C no se observó crecimiento en ningún caso. El sustrato resultó también un factor significativo, siendo el medio de cebada el que reveló la mayor tasa de crecimiento, seguido de maíz y por último trigo. En cuanto a la expresión del gen *FUM1*, *F. verticillioides* presentó expresión relativa en todos los sustratos, temperaturas y potenciales hídricos probados, aunque esta expresión descendió en niveles altos de estrés hídrico. En *F. proliferatum* sólo hubo expresión en cebada y trigo a 25°C y -2,8 MPa, condiciones óptimas para ambas especies. Los escenarios previstos de cambio climático permitirían la presencia de ambas especies, pero tendrían un efecto más limitante sobre su producción de fumonisinas, reduciendo su riesgo potencial a temperaturas menores de 35°C.

En el capítulo 4 se estudia el efecto del fungicida benomilo a dos concentraciones (LD₅₀ y LD₉₀: 0,93 y 3,30 ppm respectivamente) sobre el crecimiento de *F. verticillioides* y la expresión de los genes *FUM1* y *FUM19*, gen que codifica para un transportados de fumonisinas, en distintas condiciones de estrés hídrico y temperatura. Las dosis LD₅₀ y LD₉₀ aplicadas en las condiciones óptimas del crecimiento fúngico de esta especie (25-30°C y -0,7 MPa) redujeron la tasa de crecimiento de la manera esperada, mientras que en condiciones marginales el efecto del fungicida comenzó a perder eficacia. El benomilo también redujo la expresión del gen *FUM1*, aunque la dosis LD₅₀ causó una leve pero significativa inducción a 20°C y -0,7 MPa. El gen *FUM19* mostró un patrón de expresión génica similar al del gen *FUM1*, no observándose efectos relacionados con el fungicida. Por lo tanto, para su aplicación se deben tener en cuenta las condiciones ambientales y la dosis para optimizar la eficacia del fungicida.

Por último, en el capítulo 5, se analizó la distribución de las especies toxígenas de *Fusarium* y su microbiota acompañante en trigo blando procedente de dos regiones españolas, Córdoba y Lleida. Para ello se utilizó una estrategia combinada de métodos de diagnóstico con convencionales y métodos moleculares. La distribución de las especies fúngicas toxígenas mostró diferencias geográficas, que se pueden relacionar con las características climáticas de cada región y los perfiles ecofisiológicos descritos en este y otros trabajos. La especie *F. graminearum* destacó en Lleida, mientras que en Córdoba fueron más importantes *F. verticillioides* y *F. proliferatum*. También se encontraron en ambas localidades las especies *F. equiseti* y *F. langsethiae*, además de *Aspergillus flavus* y *A. niger*. Estas tres últimas requieren un seguimiento especial en el

futuro por el elevado riesgo de las toxinas que sintetizan. La estrategia de análisis utilizada puede ser de gran ayuda en el diagnóstico, prevención y control de hongos toxígenos en las condiciones de cambio climático previstas.

Abstract

**CONTROL OF FUMONISIN-PRODUCING
Fusarium SPECIES:
ECOPHYSIOLOGICAL FACTORS AND
CLIMATE CHANGE**

Abstract

The fungal genus *Fusarium* L. includes many well-known plant pathogens that cause high economic damages in crops all over the world. *Fusarium* diseases include wilts, blights, rots, and cankers of many horticultural, field, ornamental, and forest crops in both agricultural and natural ecosystems. They are especially important phytopathogens in cereals, causing losses to crop yield and quality and the agro-feed industry. *Fusarium* species are also important mycotoxins producers causing a significant impact in human and animal health and, accordingly, its presence in agro-feed products is regulated. Fumonisins, a family of toxic and carcinogenic mycotoxins, are among the most important toxins produced by *Fusarium* species, particularly by *F. verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. fujikuroi*, all three belonging to the *Fusarium fujikuroi* species complex (FFSC). The main objective of this Thesis was to expand the knowledge and tools available on these three *Fusarium* species. For this purpose, different analyses were made, considering the scenarios for Spain predicted for a near future caused by the global climate change.

After an introductory chapter, this Thesis describes an integrated study of a collection of *F. fujikuroi* strains isolated from rice (its main host) in the Philippines, including genetic variability and phylogenetics, their fumonisin production profile and the presence and expression of *FUM1* gene, a key fumonisin-biosynthetic gene. Additionally, a rapid and sensitive real time RT-PCR assay was developed for this species. Almost 50% of the strains produced fumonisins, some of them at high levels, indicating potential risk of rice contamination by fumonisins which should not be disregarded. The *F. fujikuroi* strains in this work seemed to be genetically highly

homogeneous, showing very low genetic variability, more similar to *F. verticillioides* than to the closely related species *F. proliferatum*.

Temperature and water potential (ψ_w) are main factors affecting fungal growth and mycotoxin production, and create characteristic patterns of response depending on the fungal species considered. In chapter 3, the analysis of the effect of the substrate in *F. verticillioides* and *F. proliferatum* is presented using different agar media prepared from barley, maize and wheat, the most important cereals in Spain. All these factors are constantly interacting in field conditions, and they have been studied considering the changing climatic conditions. The significant effect of the substrate found, affecting differently fungal growth and *FUM1* expression, indicated that evaluation of toxin risk might differ depending on the cereal considered. Permissive growth conditions for both species were at temperatures between 15 and 35°C, and water potentials between -0.7 and -7.0 MPa. Optimal values were between 25 and 30 °C and -0.7 MPa. Growth was severely decreased at -7.0 MPa and no growth was observed at 40 °C. The growth rate was higher in *F. verticillioides* than in *F. proliferatum* and both species grew better on barley than on maize, and last on wheat. On the other hand, they showed differential regulation of fumonisin biosynthesis in the media and environmental conditions tested. *FUM1* gene expression was present at every temperature and Ψ_w in *F. verticillioides*, being maize the medium with higher levels of *FUM1* gene expression. In the case of *F. proliferatum*, no induction of *FUM1* gene was observed, apart from the cases of barley and wheat at 25°C and -2.8 MPa, and maize was the medium with a higher negative effect on *FUM1* gene expression. Overall, incubation of cultures of both *Fusarium* species at 35 °C and -7.0 MPa had the less favorable effect regarding *FUM1* expression. In general, this results suggest that both species will still be present in future scenarios for Mediterranean regions, but their potential risk of fumonisin production might be reduced particularly at marginal temperatures.

The study of the influence of environmental conditions and, in particular those of the predicted scenarios of climate change, on the efficiency of conventional antifungal is described in chapter 4. This study examined the interaction of the fungicide benomyl, at ED₅₀ and ED₉₀ concentrations (effective doses of benomyl to reduce growth by 50% and 90%, respectively), with a range of temperatures (20–35 °C) and water potentials (-0.7, -2.8 and -7.0 MPa) on growth and fumonisin biosynthesis of *F. verticillioides* in

in vitro assays. Expression of *FUM19* was also studied, a gene encoding an ABC-type transporter which is located also in the fumonisin biosynthetic cluster.

The ED₅₀ and ED₉₀ concentrations obtained at 25 °C were 0.93 mg/L and 3.30 mg/L, respectively. Benomyl affected growth and fumonisin gene expression differently, but it generally reduced fungal growth and fumonisin biosynthesis and both were significantly affected by temperature and water potential. However, the efficacy of benomyl decreased significantly at marginal conditions. Both fumonisin biosynthetic genes had similar expression patterns in all treatments and their correlation was positive and significant. *FUM1* gene presented induction at 20°C and -0.7 MPa, with ED₅₀. These results indicate that Mediterranean climatic scenarios might suffer an additional negative impact from the climate change by compromising the efficacy of antifungals used to control pathogens and toxigenic fungi. Additionally, more detailed and accurate information should be provided on the optimal environmental conditions and doses for the application of conventional benomyl treatments.

Finally, chapter 5 analyzed the occurrence of toxigenic *Fusarium* and other fungal species in wheat from two different agroclimatic Spanish regions (Córdoba and Lleida), and compared the results. A combined strategy of traditional and DNA-based methods was used in pre- and post-harvest samples obtained from each region. The results showed that the distribution of the main toxigenic fungal species was different in both regions, which could be related with differences in weather conditions (temperature and precipitation) and the ecophysiological studies described in this Thesis. *F. verticillioides* and *F. proliferatum* were more relevant in Córdoba, whereas *F. graminearum* was more prevalent in Lleida. Additionally, other potentially toxigenic species were identified, such as *F. equiseti*, *F. langsethiae*, *A. flavus*, *A. carbonarius* and *A. niger*. The relative importance of these species in terms of mycotoxin risk makes a further study necessary, especially in the future climatic conditions predicted.

Capítulo 1

Capítulo 1. Introducción general

1.1. El género *Fusarium*

El género *Fusarium* Link comprende un grupo muy diverso de hongos filamentosos que se encuadran en el filo *Ascomycota*, clase *Sordariomycetes*, orden *Hypocreales*, familia *Nectriaceae*. Es un grupo cosmopolita muy presente en el suelo y que puede colonizar las partes aéreas y subterráneas de las plantas, así como residuos vegetales y otros sustratos orgánicos (Desjardins, 2003). Dependiendo por tanto del contexto ecológico, las especies de este género pueden encontrarse como parásitas, endófitas o patógenas de un gran número de especies vegetales, siendo por ello un género muy conocido (Aoki *et al.*, 2014). Se consideran de gran importancia sus efectos sobre los cultivos, donde causan marchitamientos, podredumbres y chancros en una gran variedad de especies, siendo especialmente importante en cereales, donde ocasionan grandes pérdidas económicas en la agricultura y en las industrias de procesado y transformación de alimentos y piensos. Además, algunas de estas especies son capaces de producir micotoxinas, metabolitos secundarios tóxicos que contaminan los alimentos y cuya ingesta, por parte de animales o seres humanos, ocasiona enfermedades severas agudas y crónicas (Logrieco *et al.*, 2003; Marín, 2010). Además, ciertas especies de *Fusarium* pueden colonizar tejidos humanos, provocando enfermedades como la queratitis (Chang *et al.*, 2006) o diversas infecciones, además de suponer una gran amenaza para personas inmunodeprimidas (Short *et al.*, 2011; Sutton y Brandt, 2011).

Debido a todo esto, nos encontramos ante un género muy contaminante, para el que se hace importante desarrollar técnicas válidas de control y prevención. Para ello, es necesario realizar un gran número de estudios de diferentes tipos, tanto epidemiológicos y filogenéticos (incluida la determinación de la estructura poblacional y la variabilidad inter o intra-específica), así como estudios destinados a conocer los factores ecofisiológicos que condicionan los diferentes aspectos de la biología del hongo. Con todos ellos se consigue una amplia información sobre los diferentes factores que están implicados entre sí y que caracterizan al hongo, como son por ejemplo sus patrones de crecimiento o de producción de micotoxinas, las zonas geográficas o los hospedadores a

los que se asocian determinadas especies fúngicas, etc., y gracias a ello, se logra desarrollar métodos adecuados y eficaces de diagnóstico y prevención.

1.1.1. Un género muy variable, una taxonomía compleja

El hecho de que las especies del género *Fusarium* presenten una gran variabilidad en sus características morfológicas y fisiológicas, ha sido la causa de la gran controversia ocasionada por este género en cuanto a su taxonomía desde que fuera descrito por primera vez por Link en 1809 (en Mag. Ges. Naturf. Freunde, Berlin 3:10). Antes de 1997 la taxonomía de *Fusarium* se basaba exclusivamente en los caracteres fenotípicos observados en cultivos aislados de plantas, animales y seres humanos que presentaban síntomas de enfermedad, así como de muestras de suelo y agua (Booth, 1971; Gerlach y Nirenberg, 1982; Nelson *et al.* 1983; Wollenweber y Reinking, 1935), existiendo diversas clasificaciones basadas en ellos. Sin embargo, durante las dos últimas décadas, los estudios moleculares y filogenéticos sugieren que los métodos de clasificación de *Fusarium* tradicionales de diversos tratados de taxonomía (Booth, 1971; Gerlach y Nirenberg, 1982; Nelson *et al.*, 1983; Wollenweber y Reinking, 1935) eran artificiales (O'Donnell *et al.*, 2013). Estos nuevos estudios han revolucionado la comprensión de la diversidad específica y las relaciones filéticas dentro de *Fusarium*, dando lugar así a nuevas clasificaciones taxonómicas que, junto con las anteriores, suman un gran número de ellas.

Actualmente se han secuenciado completamente los genomas de cinco especies de *Fusarium*: *F. graminearum*, *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, *F. pseudograminearum*, *F. solani f. sp. pisi* y *F. verticillioides* (tabla 1). Sus genomas presentan grandes variaciones en su tamaño, desde las 36 Mb del genoma de *F. graminearum*, las 42 Mb de *F. verticillioides*, al genoma de *F. oxysporum f. sp. lycopersici* con 61 Mb, el de mayor tamaño descrito hasta el momento (Ma *et al.*, 2013).

Algunas especies de *Fusarium* son anamorfias, es decir, presentan solamente una fase asexual o imperfecta. Así mismo, existen dentro de este género especies holomorfas, que presentan además de esta fase asexual, una forma sexual o perfecta llamada teleomorfo. Estos estados teleomorfos de *Fusarium* se encuadraban tradicionalmente en cuatro géneros: *Haematonectria*, *Cosmospora*, *Albonectria* y *Gibberella*, siendo este último el que englobaba un mayor número de especies (Seifert y Lévesque, 2004). Por lo tanto, se empleaban paralelamente dos nombres, empleándose

el término *Fusarium* para referirse al estado anamorfo asexual de las especies de estos géneros.

Especie	Nº de genes	Tamaño (Mb)	Nº de cromosomas	NCBI
<i>F. verticillioides</i>	14179	42	11	AAIM
<i>F. circinatum</i>	15713	44	Desconocido	-
<i>F. fujikuroi</i>	14017	44	12	-
<i>F. oxysporum f. sp. lycopersici</i>	17735	61	15	AAXH
<i>F. graminearum</i>	13332	36	4	AACM
<i>F. pseudograminearum</i>	12488	37	Desconocido	AFNW
<i>F. solani f. sp. pisi</i>	15707	51	17	ACJF

Tabla 1: Lista de genomas publicados de especies de *Fusarium*. Se indica de cada genoma el número de genes, tamaño en Mb, número de cromosomas y nombre que recibe en la base de datos del NCBI (GenBank). Adaptada de Ma *et al.*, 2013.

Debido a los cambios producidos en el nuevo Código Internacional de Nomenclatura para algas, hongos y plantas (ICNafp, *Melbourne Code*, 2012), a partir del 1 de enero de 2013 sólo se permite la asignación de un único nombre científico para nuevos hongos holomorfos que producen teleomorfo, como es *Fusarium*, y además se apuesta por la unificación de esta doble nomenclatura preexistente (Hawksworth, 2012). Esta propuesta ha sido ampliamente aceptada por la comunidad científica, que apoya el uso del término unitario *Fusarium*, descartando así los diferentes nombres de los teleomorfos (Geiser *et al.*, 2013). En este trabajo se adoptará la nueva forma de nomenclatura aceptada, no obstante y debido a lo reciente del cambio, se indicará en cada caso el nombre del teleomorfo asociado a cada especie de *Fusarium*.

En la tabla 2 aparecen las especies de *Fusarium* más importantes desde el punto de vista de las pérdidas económicas que ocasionan. En la actualidad, se considera que existen alrededor de 300 especies dentro de este género, las cuales han sido descubiertas gracias a las técnicas de filogenética molecular. Más de la mitad de estas especies no han sido descritas formalmente hasta la fecha.

Especie de <i>Fusarium</i>	Hospedador más importante ^a	Región geográfica endémica	Micotoxinas ^b
<i>F. avenaceum</i>	Maíz, cereales de grano pequeño	Todo el mundo	MON, BEA, FUS
<i>F. crookwellense</i>	Cereales de grano pequeño	Todo el mundo	NIV, ZEA, FUS
<i>F. culmorum</i>	Maíz, cereales de grano pequeño	Todo el mundo	DON, ZEA, NIV, FUS
<i>F. fujikuroi</i> *	Arroz	Todo el mundo	GB, MON, BEA, FB
<i>F. globosum</i> *	Maíz	África	FB, BEA, FP
<i>F. graminearum</i>	Maíz, cereales de grano pequeño	Todo el mundo	DON, ZEA, NIV, FUS
<i>F. kyushuense</i>	Trigo	Japón	NIV, T2, DAS
<i>F. langsethiae</i>	Cereales de grano pequeño	Europa	DAS, T2, HT2, BEA
<i>F. napiforme</i>	Mijo, sorgo	África, Argentina	FB, MON
<i>F. nygamai</i> *	Sorgo	África, Australia	FB, MON, BEA
<i>F. poae</i>	Cereales de grano pequeño	Todo el mundo	DAS, NIV, BEA, FUS, T2, HT2
<i>F. proliferatum</i> *	Maíz	Todo el mundo	FB, MON, BEA, FP
<i>F. pseudoantophilum</i>	Maíz	África	BEA
<i>F. pseudograminearum</i>	Cereales de grano pequeño	África, Australia, Norteamérica	DON, ZEA
<i>F. pseudonygamai</i>	Mijo	África	MON, FP
<i>F. sporotrichioides</i>	Cereales de grano pequeño	Todo el mundo	T2, HT2, DAS, BEA, FUS
<i>F. subglutinans</i> *	Maíz	Todo el mundo	MON, BEA, FP
<i>F. thapsinum</i> *	Sorgo	Todo el mundo	MON
<i>F. verticillioides</i> *	Maíz	Todo el mundo	FB, FUS, MON

Tabla 2: Se detallan las 19 especies de *Fusarium* más importantes por sus efectos en los hospedadores que contaminan.

^a Se indican los hospedadores más comunes. El término “cereales de grano pequeño” se refiere principalmente a trigo, cebada y avena.

^b BEA: beauvericina; DAS: diacetoxiscirpenol; DON: deoxinivalenol o sus derivados; FB: fumonisinas B₁, B₂ y B₃; FP: fusaproliferina; FUS: fusarina C; GB: giberelinas; HT2: toxina HT-2; MON: moniliformina; NIV: nivalenol o sus derivados; T2: toxina T-2; ZEA: zearalenona.

*Especies pertenecientes al FFSC. Tabla adaptada de Glenn, 2007.

Actualmente, las especies de *Fusarium* están clasificadas en complejos de especies (*species complex*). Aunque existe un número elevado de estos complejos, los principales patógenos de plantas se agrupan en cuatro de ellos (Aoki *et al.*, 2014):

- El complejo de especies *Fusarium graminearum* (FGSC), que incluye las principales especies causantes de la fusariosis de la espiga (FHB) en cebada y trigo y que contaminan el grano con la micotoxina tricoteceno.
- El complejo de especies *Fusarium oxysporum* (FOSC), que contiene las especies causantes del marchitamiento vascular de más de 100 especies agrónomicamente importantes como el tomate, el plátano, los espárragos, etc.
- El complejo de especies *Fusarium solani* (FSSC), con especies causantes de la podredumbre del pie y la raíz de diversos hospedadores económicamente significativos.
- El complejo de especies de *Fusarium fujikuroi* (FFSC), que cuenta con el mayor número de especies, las cuales ocasionan diversas enfermedades como la enfermedad de bakanae en arroz, podredumbre en el maíz o chancro en el pino, además de contaminar diversos cultivos con la micotoxina fumonisina.

En este último complejo de especies se centrará este trabajo.

1.1.2. Alelos de apareamiento en *Fusarium*

Los hongos filamentosos, como es el caso del género *Fusarium*, presentan dos opciones de reproducción: la esporulación asexual y la esporulación sexual. Esta última está muy extendida en este tipo de hongos e incluye los sistemas homotálico y heterotálico. En el sistema homotálico los cuerpos fructíferos sexuales se forman en su gran mayoría por autofecundación, de tal manera que el apareamiento ocurre en muy contadas ocasiones. Sin embargo, en el sistema heterotálico, los talos son autoestériles, y por tanto la reproducción se lleva a cabo por la fusión de núcleos sexualmente compatibles de dos individuos diferentes. La compatibilidad reproductiva entre dos cepas reside en una pequeña región del genoma, denominada *locus MAT*, la cual define el tipo de apareamiento o *mating type* (Conde-Ferráez, 2007; Waalwijk *et al.*, 2006).

En la mayoría de los ascomicetos existe un solo *locus* definitorio del tipo de apareamiento, con dos formas alternativas. Estas dos formas son muy diferentes entre sí, aunque ocupan el mismo *locus* dentro del genoma y están flanqueadas por regiones de DNA casi idénticas (Waalwijk *et al.*, 2002). Debido a estas diferencias, que sugieren un origen evolutivo no común, las secuencias que se encuentran dentro del *locus MAT* no reciben el nombre de “alelos”, sino de “idiomorfos” (Metzenberg y Glass, 1990). Estos dos idiomorfos son designados como *MAT1-1* (también *MAT-1*) y *MAT1-2* (también *MAT-2*) (Kerenyi *et al.*, 1999, 2004). Dos cepas serán sexualmente compatibles si presentan diferentes idiomorfos del tipo de apareamiento.

En ascomicetos, los genes del tipo de apareamiento se encargan de regular la expresión de los genes implicados en la reproducción sexual por apareamiento, pero además controlan la expresión de los genes que codifican para feromonas y sus receptores (Bobrowicz *et al.*, 2002; Waalwijk *et al.*, 2006). Hay que indicar que estos genes *MAT* se encuentran, e incluso son funcionales, en hongos considerados asexuales, como por ejemplo en *Alternaria* (Berbee *et al.*, 2003), *Aspergillus fumigatus* (Dyer *et al.*, 2003; Paoletti *et al.*, 2005) y muchas especies del género *Fusarium* (Kerenyi *et al.*, 2004). Esto indicaría que estos genes regulan otros procesos biológicos además de la reproducción sexual, o bien que la fase sexual de estas especies consideradas asexuales no ha sido aún observada, siendo críptica o rara en la naturaleza (Conde-Ferrández, 2007; Waalwijk *et al.*, 2006).

Los genes *MAT* han demostrado ser una excelente herramienta para el estudio de la biología y genética de poblaciones de los hongos y son marcadores útiles para complementar análisis filogenéticos. Además, son herramientas para el estudio de los mecanismos de interacción entre células y fertilidad entre especies fúngicas. El conocimiento de la frecuencia y distribución de los genes *MAT* en poblaciones naturales es un indicador de la incidencia potencial de la reproducción sexual en dichas poblaciones, lo cual es una herramienta valiosa para el manejo adecuado de las poblaciones y su control.

1.1.3. El complejo de especies *Fusarium fujikuroi* (FFSC)

La mayoría de las especies que se agrupan en este complejo fueron identificadas previamente como *F. moniliforme* Sheldon en el sistema de clasificación de nueve especies (Snyder y Hansen, 1940), o como miembros de la sección *Liseola* según la clasificación propuesta por Wollenweber y Reinking (1935). Más adelante, el desarrollo de los estudios de tipo de apareamiento (genes *MAT*) permitió la identificación de 13 especies biológicas heterotálicas y con reproducción sexual incluidas en el FFSC, las cuales son también denominadas poblaciones de apareamiento (*mating populations*). En la tabla 3 se indican estas especies y la letra que designa su población de apareamiento correspondiente. Además de las especies representadas en la tabla 3, estudios de morfología comparativa y filogenética molecular revelaron que el FFSC está representado por más de 50 especies filogenéticamente diferentes (Geiser *et al.*, 2005; Nirenberg y O'Donnell, 1998; O'Donnell *et al.*, 1998, 2000).

Población de apareamiento	Especie de <i>Fusarium</i>	Población de apareamiento	Especie de <i>Fusarium</i>
A	<i>F. verticillioides</i>	H	<i>F. circinatum</i>
B	<i>F. sacchari</i>	I	<i>F. konzum</i>
C	<i>F. fujikuroi</i>	J	<i>F. xylarioides</i>
D	<i>F. proliferatum</i>	K	<i>F. musae</i>
E	<i>F. subglutinans</i>	L	<i>F. temperatum</i>
F	<i>F. thapsinum</i>	M	<i>F. tuiense</i>
G	<i>F. nygamai</i>		

Tabla 3: Especies de *Fusarium* y poblaciones de apareamiento a las que pertenecen. Adaptada de Aoki *et al.*, 2014; Leslie *et al.*, 2004; Waalwijk *et al.*, 2006.

Como ya se ha indicado, las especies del FFSC contaminan una gran variedad de cultivos con la micotoxina fumonisina y además ocasionan diversas enfermedades. Entre estas especies fitopatógenas, las más importantes y estudiadas aparecen en la tabla 4, junto con las enfermedades que causan.

Población de apareamiento	Especie de <i>Fusarium</i>	Enfermedad causada	Hospedador*
A	<i>F. verticillioides</i>	Pudrición	<i>Zea mays</i> – Maíz
B	<i>F. sacchari</i>	Pokkah boeng	<i>Saccharum officinarum</i> - Caña de azúcar
C	<i>F. fujikuroi</i>	Bakanae	<i>Oryza sativa</i> – Arroz
D	<i>F. proliferatum</i>	Punta negra del grano	Cereales de grano pequeño
		Punto morado	<i>Basella alba</i> - Espinaca china
H	<i>F. circinatum</i>	Chancro resinoso	<i>Pinus spp</i> - Pino
-	<i>F. fraxiflexum</i>	Punto amarillo	<i>Cymbidium spp.</i> - Címbidio (orquídea)
-	<i>F. phyllophilum</i>	Punto morado	<i>Aloe spp.</i> - Aloe
-	<i>F. guttiforme</i>	Punto negro de las hojas	<i>Odontoglossum spp.</i> - Orquídea

Tabla 4: Principales enfermedades desde el punto de vista económico causadas por las especies de *Fusarium* pertenecientes al FFSC. Se indica población de apareamiento, especie, enfermedad causada y principal hospedador en el que la ocasiona. El término “cereales de grano pequeño” se refiere principalmente a trigo, cebada y avena.

*Se indica sólo el hospedador más afectado por dicha enfermedad. Adaptada de Waalwijk *et al.*, 2006.

1.1.4. Identificación de las especies del género *Fusarium*

Como ya hemos comentado, la clasificación de las especies basándose en los caracteres fenotípicos es una tarea ardua y que ofrece resultados poco precisos. Desde las 9 especies propuestas por Snyder y Hansen (1940) a las más de 300 aceptadas hoy e identificadas gracias a la filogenética molecular, han existido otras clasificaciones, la mayoría de ellas basadas en 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, completando esta información con otros caracteres como la morfología de la colonia, la pigmentación y la presencia de peritecios, entre otros (Leslie y Summerell, 2006; Ma *et al.*, 2013; Nelson *et al.*, 1983). En la figura 1 se muestran ejemplos de la morfología de tres especies para su clasificación, obtenidos del Manual de Laboratorio de *Fusarium* de Leslie y Summerell (2006).

Diferentes tratados como por ejemplo el atlas fotográfico de Gerlach y Nirenberg (1982) y el manual de clasificación de Nelson *et al.* (1983) han sido la base de los nuevos estudios basados en la construcción de filogenias moleculares, así como de la aparición del concepto “especie filogenética”, según el cual los límites de una especie estarían determinados por la congruencia entre las filogenias derivadas de diferentes genes en un grupo de organismos (concordancia genealógica) (Taylor *et al.*,

2000). Estos estudios han permitido discernir entre especies muy próximas entre sí y por tanto casi idénticas, llegando así a la descripción y caracterización formal de casi 150 especies. Sin embargo, no existe aún ningún manual completo y disponible para abordar el tema de una manera clara y rápida.

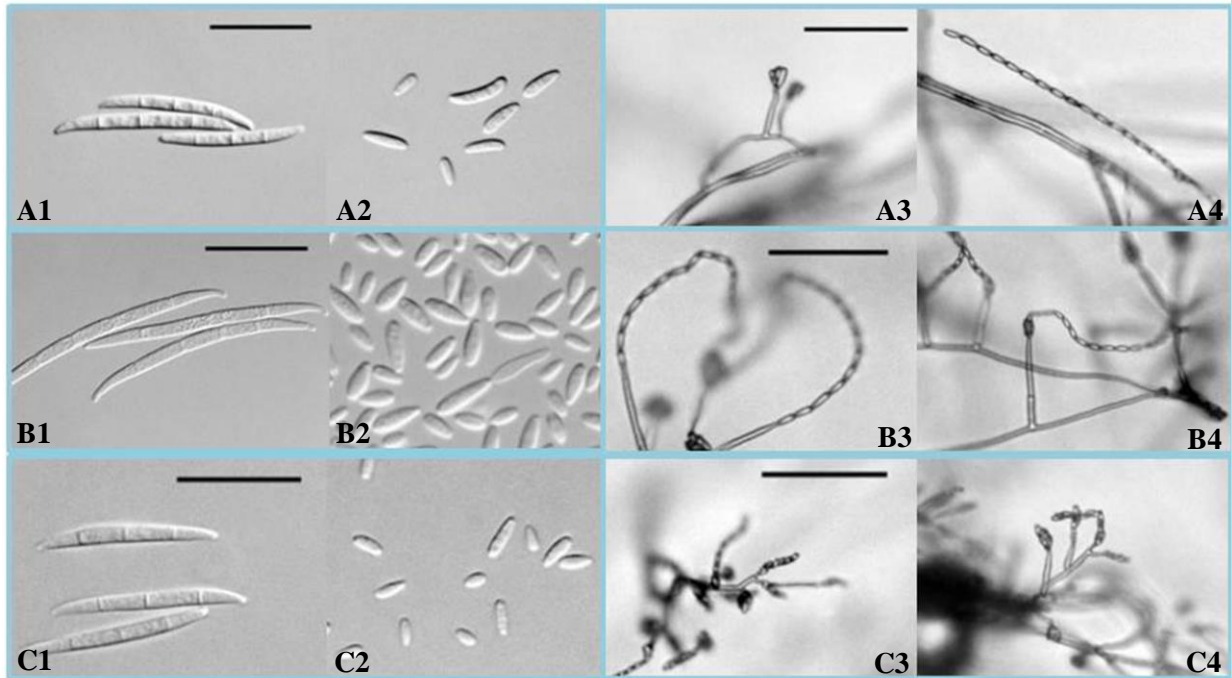


Figura 1: Macroconidios, escala 25 μ m (A1, B1 y C1); microconidios, escala 25 μ m (A2, B2 y C2); y microconidios *in situ*, escala 50 μ m (A3, A4, B3, B4, C3 y C4) de las siguientes especies de *Fusarium* de arriba abajo: *F. fujikuroi* (A), *F. verticillioides* (B) y *F. proliferatum* (C). Adaptado de Leslie y Summerell, 2006.

Los métodos de diagnóstico basados en PCR utilizan secuencias genómicas diana con niveles de variabilidad elevada para que permitan discriminar entre poblaciones o especies genéticamente muy semejantes. La unidad de rDNA que codifica para los RNA ribosómicos contiene regiones con diferentes niveles de variabilidad; en particular, las regiones ITS e IGS (espaciadores intergénicos del DNA ribosómico) son las más variables y utilizadas (Figura 2) junto con la región parcial del gen 1 α del factor de elongación (*EF-1 α*) (González-Jaén *et al.*, 2004; O'Donnell *et al.*, 2009).

La mayoría de los cebadores diseñados específicamente para la identificación y detección de las especies de *Fusarium* se basan en secuencias de DNA ribosómico nuclear (rDNA) (Seifert y Lévesque, 2004). En los hongos filamentosos el rDNA se encuentra en el genoma en múltiples copias organizadas en tándem, lo cual aumenta la

sensibilidad de los ensayos de PCR (Mirete *et al.*, 2013; Smith, 1976). Esto es especialmente útil para el diagnóstico directo, sin necesidad de obtener los aislamientos fúngicos primero, en alimentos o sustratos complejos. Las secuencias más utilizadas para desarrollar protocolos de PCR basados en rDNA que permitan realizar con éxito el diagnóstico de cepas de *Fusarium* a nivel de especie han sido las de los espaciadores intergénicos transcritos ITS1 e ITS2, localizadas entre la subunidad 18S y la 5,8S, y entre la subunidad 5,8S y 28S respectivamente; y las secuencias parciales de la región espaciadora intergénica IGS, localizada entre la subunidad 28S y la 18S (figura 2) (Jurado *et al.*, 2005; 2006a; Konstantinova e Yli-Mattila, 2004; Kulik *et al.*, 2004; Patiño *et al.*, 2004).



Figura 2: Representación esquemática de los genes del rDNA de *Fusarium* y las regiones espaciadoras ITS e IGS.

La región IGS es la región espaciadora que más rápido evoluciona en el rDNA y la que muestra una mayor variabilidad (Hillis y Dixon, 1991), por lo que permite desarrollar métodos de diagnóstico para especies o poblaciones muy cercanas filogenéticamente (González-Jaén *et al.*, 2004; Mirete *et al.*, 2003; 2004; 2013).

Por otro lado, el gen codificado del factor de elongación 1α (*EF-1 α*), de copia única, presenta una región muy útil para la identificación a nivel de especie en el género *Fusarium*. Esta región contiene un intrón y los dos cebadores están situados en los dos exones que lo flanquean (figura 3) (Geiser *et al.*, 2004; Seifert y Lévesque, 2004). Su uso es muy adecuado para la identificación de cepas previamente aisladas, realizando una amplificación por PCR con cebadores universales que amplifican todas las especies del género *Fusarium* (Seifert y Lévesque, 2004) seguida de la secuenciación del fragmento amplificado y el análisis comparativo de la secuencia obtenida, utilizando las bases de datos de secuencias parciales del gen *EF-1 α* existentes, como FUSARIUM-ID (Geiser *et al.*, 2004; O'Donnell *et al.*, 2010) o el GenBank (NCBI), base de datos internacional de secuencias nucleotídicas.

Además de las regiones ITS, IGS y la región parcial del gen *EF-1 α* , existen otras secuencias que también se tienen en consideración para este tipo de estudios, como las secuencias codificadoras de la calmodulina, la β -tubulina o la histona H3. Sin embargo, las dos que se han descrito en primer lugar son las más empleadas y las que ofrecen resultados más completos, sensibles y precisos.

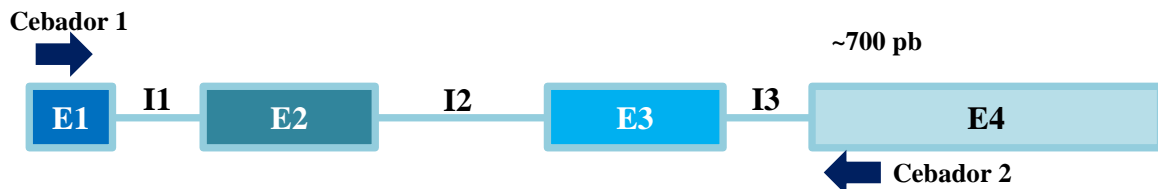


Figura 3: Representación esquemática de la secuencia parcial del gen *1 α* del factor de elongación (*EF-1 α*) en *Fusarium* (~700 pb). Las flechas indican la localización de los cebadores.

1.1.5. Otros géneros fúngicos asociados a cereales

Se considera que existen más de 8000 especies de hongos que producen enfermedades en plantas. La mayoría de las especies vegetales pueden ser atacadas por algún tipo de hongo (o varios) y además un mismo hongo fitopatógeno puede infectar a una o más especies de plantas. Una amplia gama de hongos han sido caracterizados como causantes del deterioro patológico en una gran variedad de productos vegetales. Las especies fúngicas más comunes en este aspecto, además de *Fusarium*, son las pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Diplodia*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Colletotrichum*, *Phomopsis*, *Rhizopus* y *Mucor* (FHIA, 2007). Los hongos constituyen un grupo de mucha importancia en la agricultura debido a su gran número y su enorme capacidad de reproducción, lo que con frecuencia dificulta su control. Específicamente en cereales, las especies fúngicas que con mayor frecuencia se encuentran contaminando los cultivos pertenecen a los géneros *Alternaria*, *Aspergillus* y *Penicillium* (Juárez-Becerra *et al.*, 2010).

Alternaria

El género *Alternaria* se encuadra en el orden *Pleosporales* y pertenece, al igual que *Fusarium*, al grupo de hongos denominados precosecha, ya que contaminan los cultivos durante su crecimiento en el campo. Causa enfermedades en cereales y otras especies vegetales. Entre las enfermedades más frecuentes destacan el ennegrecimiento

del grano producido por *Alternaria alternata*, o las manchas foliares causadas por *Alternaria triticina* (Prescott *et al.*, 1986).

Las especies de este género secretan cuatro clases de compuestos tóxicos o carcinógenos para las plantas o los animales, y ocasionan pérdidas económicas considerables en la industria alimentaria (Zur *et al.*, 2002). *A. alternata* es la especie más común en cereales y produce varias toxinas de gran capacidad toxígena en seres humanos y animales, entre ellas el ácido tenuazónico, los alternarioles y las altertoxinas (Lacey y Magan, 1991; Medina *et al.*, 2006; Soldevilla *et al.*, 2005) (figura 4).

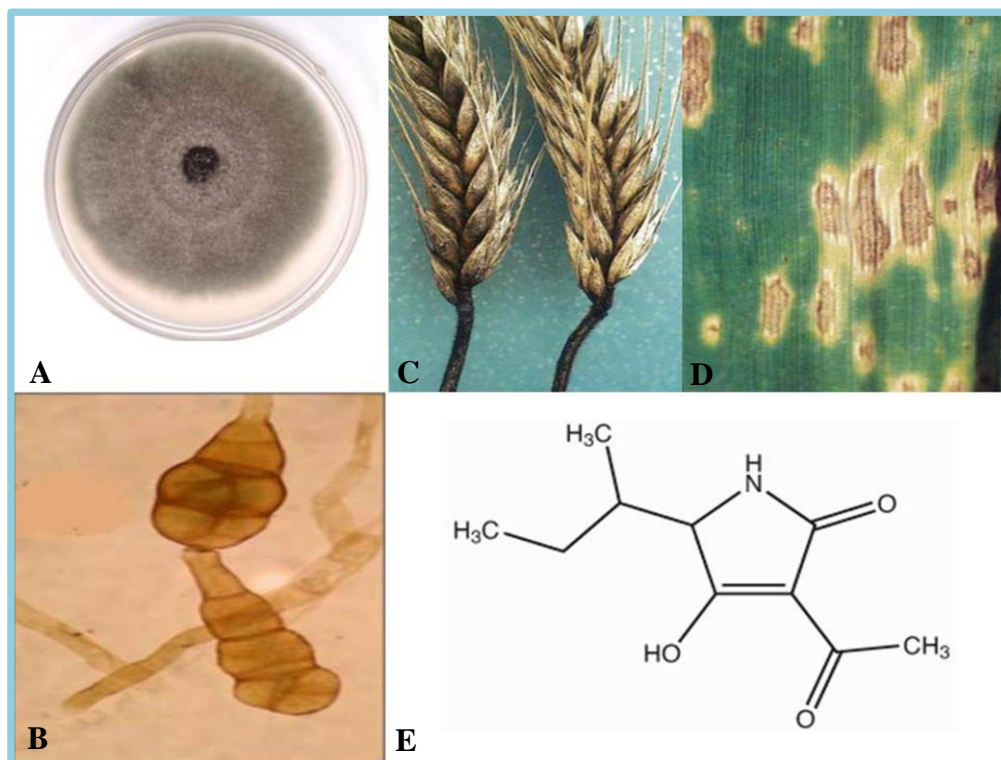


Figura 4: **A:** Placa de Petri con cultivo de *Alternaria alternata* (Muthukumar y Venkatesh, 2013). **B:** Observación al microscopio de conidio de *A. alternata* (Muthukumar y Venkatesh, 2013). **C:** Ennegrecimiento de la espiga a causa de *Alternaria spp.* (CIMMYT, 2006). **D:** Manchas foliares ocasionadas por *Alternaria triticina* (Prescott *et al.*, 1986). **E:** Fórmula química del ácido tenuazónico.

Aspergillus y Penicillium

Estos dos géneros pertenecen al orden *Eurotiales* y son considerados hongos post-cosecha, ya que proliferan principalmente durante el almacenamiento. Son muy importantes por las micotoxinas que producen, entre ellas la ocratoxina A (OTA) y las aflatoxinas (AFLs), muy tóxicas para los seres humanos.

Existen unas 20 especies reconocidas como productoras de OTA, la mayoría de ellas en el género *Aspergillus*, secciones *Circumdati* (*A. steynii*, *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*) (Frisvad *et al.*, 2004; Gil-Serna *et al.* 2011), *Nigri* (*A. niger*, *A. carbonarius* y *A. tubingensis*) y de otras secciones (*A. fumigatus*, *A. albertiensis*) (Riba *et al.*, 2008; Varga *et al.*, 1996), y tan sólo dos pertenecientes al género *Penicillium* (*P. verrucosum* y *P. nordicum*) (Cabañes *et al.*, 2010). Estas especies son contaminantes habituales de cereales y otros vegetales que además se han detectado en sus productos derivados, como en el pan, la cerveza, el café o el vino (Cabañes *et al.*, 2010). La OTA es nefrotóxica para el hombre y los animales, además de inmunosupresora, hepatotóxica, teratogénica y cancerígena (Bennet y Klich, 2003). El límite máximo permitido de esta toxina en cereales está establecido desde el 2006 en 5,0 µg/kg para cereales no elaborados y 3,0 µg/kg para productos elaborados a partir de estos cereales (Comisión Europea de Regulación N° 1881/2006) (figura 5).

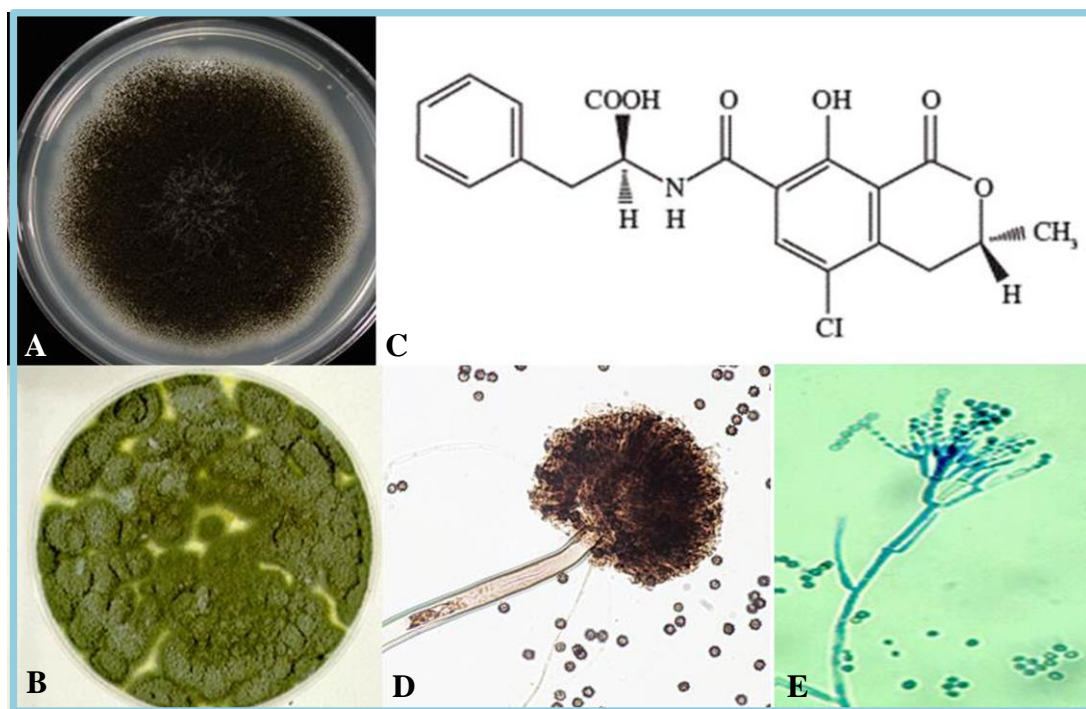


Figura 5: **A:** Placa de Petri con cultivo de *Aspergillus niger* (Nishimura, K.). **B:** Placa de Petri con cultivo de *Penicillium spp.* (Mycology Online) **C:** Fórmula química de la OTA. **D:** Observación al microscopio de *A. niger* (www.inspq.qc.ca). **E:** Observación al microscopio de *Penicillium spp.* (Mycology Online).

Las aflatoxinas (AFLs) han sido reconocidas por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) como los compuestos naturales conocidos con

mayor potencial teratogénico y cancerígeno para seres humanos. Las AFLs son toxinas producidas por el género *Aspergillus*, principalmente por las especies *A. flavus* y *A. parasiticus* (Creppy, 2002). Existen cuatro tipos naturales, conocidos como B₁, B₂, G₁ y G₂, así como dos derivados monohidroxilados de las aflatoxinas B₁ y B₂ conocidos como M₁ y M₂ respectivamente. De todas ellas, la más frecuente en cereales es la aflatoxina B₁ (AFB₁), siendo particularmente habitual en maíz. Las AFLs pueden producir la muerte por intoxicaciones agudas tras su ingesta y son potentes inmunosupresores y hepatotóxicos, asociándose principalmente al cáncer hepático (Bennet y Klich, 2003) (figura 6).

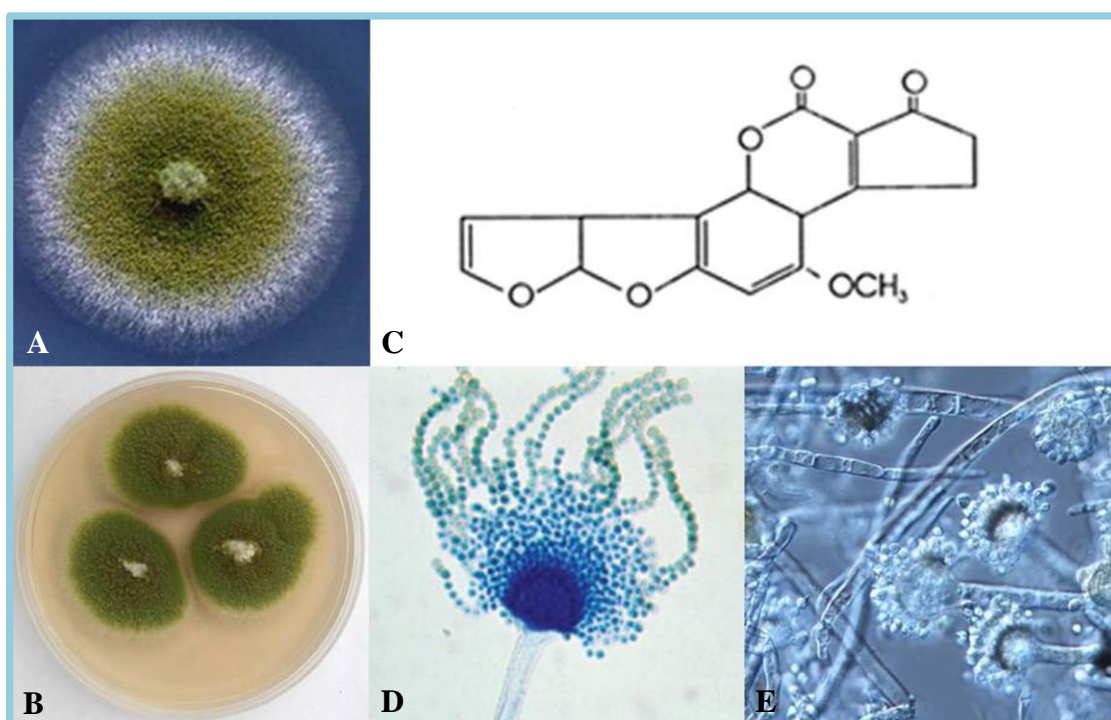


Figura 6: **A:** Placa de Petri con cultivo de *Aspergillus flavus* (Kumal, 2015). **B:** Placa de Petri con cultivo de *A. parasiticus* (<http://fungi.myspecies.info/>). **C:** Fórmula química de la AFB₁. **D:** Observación al microscopio de *A. flavus* (Hedayati *et al.*, 2007). **E:** Observación al microscopio de *A. parasiticus* (<http://escalera.bio.ucm.es/>).

1.2. Toxinas producidas por *Fusarium*

Las micotoxinas son productos naturales de bajo peso molecular producidos por los hongos filamentosos como resultado de su metabolismo secundario. Se trata de productos tóxicos, los cuales pueden causar micotoxicosis agudas o crónicas en animales y seres humanos. Ya que los hongos contaminan vegetales de diverso tipo, las micotoxinas pueden ser ingeridas a través de los alimentos y, dependiendo del tipo de

toxina, afectar al sistema nervioso central, al tracto digestivo o a los sistemas cardiovascular y pulmonar, causando enfermedades graves. Además son consideradas como agentes mutagénicos, cancerígenos, teratógenos e inmunodepresores (Bennet y Klich, 2003; Marroquín-Cardona *et al.*, 2014).

Las micotoxinas son objeto de interés a nivel mundial por afectar a la salud humana y animal, a la productividad y al comercio nacional e internacional. En 1999, la OMS estimó que alrededor de un 25% de los cultivos alimentarios mundiales están contaminados por micotoxinas (WHO, 1999). Debido a esta preocupación, existen regulaciones específicas en al menos 77 países para combatir en la mayor medida posible el riesgo ocasionado por estos agentes contaminantes (FAO, 2004; van Egmond *et al.*, 2007; Wu, 2014).

La contaminación de los cultivos no se produce sólo en el campo, sino que también puede ocurrir durante el almacenamiento post-cosecha. Los cereales, como el trigo, la cebada, el maíz, el arroz, etc., presentan en muchas ocasiones contaminación fúngica, por hongos, entre otros, del género *Fusarium*. Esto ocasiona grandes pérdidas económicas al provocar una disminución en la cantidad y calidad del grano obtenido, grano que además acumula toxinas y por tanto, las materias primas y los productos derivados de este (por ejemplo la cerveza o el aceite) presentarán riesgos al ser consumidos (Rodríguez-Carrasco *et al.*, 2015; Schollenberger *et al.*, 2008).

Un nivel alto de micotoxinas en un producto determinado representa un riesgo para la salud. Sin embargo, las micotoxicosis agudas se dan en raras ocasiones, excepto en algunos países en vías de desarrollo (Wagacha y Muthomi, 2008). De hecho, 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) considera que, tras evaluar los efectos tóxicos de diversas micotoxinas, el riesgo de intoxicación aguda es moderado-bajo. Sin embargo, como admite dicho organismo, es mucho más preocupante una ingesta en bajas dosis pero extendida en el tiempo, en especial tratándose de alimentos que se consumen diariamente (Galán y Rodríguez, 2003).

Las toxinas más importantes ya que presentan una gran toxicidad para los mamíferos son las producidas por los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*,

destacando la aflatoxina B₁ (AFB₁), la fumonisina B₁ (FB₁), los tricotecenos tipo A y B y la ocratoxina A (OTA), (Reddy *et al.*, 2010). Causan una gran variedad de efectos tóxicos entre los que se incluyen la hepatotoxicidad, teratogénesis y mutagénesis, ocasionando enfermedades como la hepatitis tóxica, hemorragias, edemas, inmunosupresión, carcinoma hepático, leucoencefalomalacia equina, cáncer esofágico y fallo renal (Altuntas *et al.*, 2003; Norred, 1993; Santos *et al.*, 2001).

En el caso de *Fusarium*, las micotoxinas se sintetizan principalmente durante la infección de la planta y por ello se pueden acumular en las diferentes partes de esta. Las especies de este género producen una gran variedad de micotoxinas, variando de unas especies a otras y, en ocasiones, también entre poblaciones de una misma especie. Las micotoxinas más frecuentes y tóxicas producidas por *Fusarium* son las fumonisinas y los tricotecenos, aunque este género también sintetiza otras importantes como la zearalenona, las eniانتinas, la moniliformina y la fusaproliferina (tabla 2).

En los hongos filamentosos, los genes de la síntesis de micotoxinas se encuentran agrupados en la misma región cromosómica, conocida como “cluster”, aunque no todos forman parte de él. Diferentes métodos moleculares han demostrado una correlación positiva entre la cantidad de toxina producida y los niveles de expresión de alguno de los genes de biosíntesis de dicha toxina. Es el caso por ejemplo de los ensayos de RT-PCR a tiempo real con el gen *FUM1* de la síntesis de fumonisinas en *F. verticillioides* (López-Errasquín *et al.*, 2007). Estas técnicas permitirían por tanto cuantificar los niveles de expresión de los genes principales en la ruta de las toxinas, y así poder estudiar su regulación o evaluar la capacidad potencial productora de una especie.

El interés aplicado que despierta el conocimiento de las rutas metabólicas de la síntesis de toxinas viene justificado por la intención de reducir el nivel de contaminación de micotoxinas en cereales. Sería muy interesante para ello estudiar la interacción de la regulación de los genes de biosíntesis de micotoxinas con los diferentes factores ambientales que actúan sobre el hongo (temperatura, estrés hídrico, hospedador...). Esta información es clave para conocer mejor el riesgo potencial de contaminación y permitir estrategias de control y prevención sobre micotoxinas (Brul *et al.*, 2006). El desarrollo de técnicas de RT-PCR a tiempo real para las especies toxígenas es un paso previo imprescindible para realizar este tipo de estudios.

1.2.1. Fumonisinias

Las fumonisinias fueron descritas y caracterizadas por primera vez en 1988, por su asociación con el cáncer esofágico en seres humanos debido al consumo de maíz contaminado con *F. verticillioides* (Bezuidenhout *et al.*, 1988; Gelderblom *et al.*, 1988). Diferentes especies de *Fusarium* son capaces de sintetizar fumonisinias (tabla 2), siendo especialmente importantes *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, considerados los principales patógenos del maíz y principales productores de fumonisinias (Creppy, 2002; Logrieco *et al.*, 2002).

Las fumonisinias son una familia de micotoxinas tóxicas y carcinógenas causantes de diversas enfermedades severas, agudas y crónicas que afectan tanto a los animales como al ser humano (Marasas *et al.*, 2004). Esto es debido a su parecido estructural con la esfinganina y la esfingosina, dos esfingolípidos intermediarios derivados del metabolismo de los ácidos grasos (Merrill *et al.*, 2001; Riley *et al.*, 2001) (figura 7b). La toxicidad de las fumonisinias 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 sintasa (Wang *et al.*, 1991). Están clasificadas como carcinógenos del grupo 2B (posibles carcinógenos humanos) por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, 2002).

Las fumonisinias son aminopolioles con una cadena lineal de 20 átomos de carbono que presenta un amino en el carbono 2, junto con grupos metilo, hidroxilo y ácido tricarbóxico en diferentes posiciones a lo largo del esqueleto carbonado (Proctor *et al.*, 2003) (figura 7a). Según los grupos químicos presentes a lo largo de la cadena lineal, las fumonisinias se clasifican en cuatro series: A, B, C y P (Musser y Plattner, 1997; Rheeder *et al.*, 2002). Las de la serie B son las más abundantes en la naturaleza y se clasifican en fumonisina B₁ (FB₁), B₂ (FB₂), B₃ (FB₃) y B₄ (FB₄) según la presencia o ausencia de grupos hidroxilo en los carbonos 5 y 10 (Proctor *et al.*, 2003) (figura 7a). De ellas, la FB₁ es la más importante ya que es la más tóxica y prevalente (Musser and Plattner, 1997; Thiel *et al.*, 1992), llegando a constituir hasta un 70% de todas las fumonisinias presentes en los alimentos, mientras que las otras aparecen a niveles más bajos (10% y 20% del contenido total de fumonisinias para FB₂ y FB₃ respectivamente) (EFSA, 2005; Nelson *et al.*, 1993).

Debido al riesgo para la salud que conlleva el consumo de alimentos contaminados con fumonisinas, la Unión Europea ha establecido mediante legislación los contenidos máximos permitidos para esta toxina (Comisión Europea de Regulación N° 1126/2007; Comisión Europea de Regulación N° 420/2011). Así por ejemplo se ha establecido una cantidad máxima de 4 mg/kg de fumonisinas en el maíz no elaborado (excepto el destinado a molienda por vía húmeda) o 1 mg/kg en alimentos a base de maíz destinados al consumo humano directo, excepto cereales y aperitivos (0,8 mg/kg) y alimentos infantiles y para lactantes (0,2 mg/kg). En 2002 el Comité Mixto FAO/WHO de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) estableció los valores de ingesta diaria máximos en 2 µg/kg de peso corporal para las fumonisinas B₁, B₂ y B₃ individualmente o en combinación (WHO, 2002).

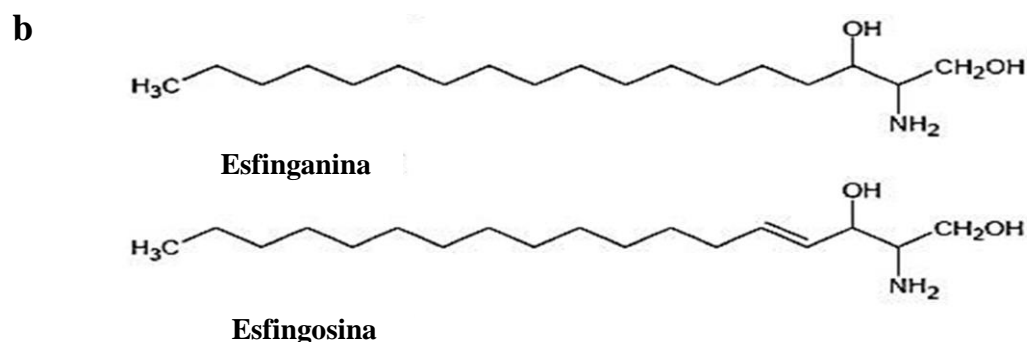
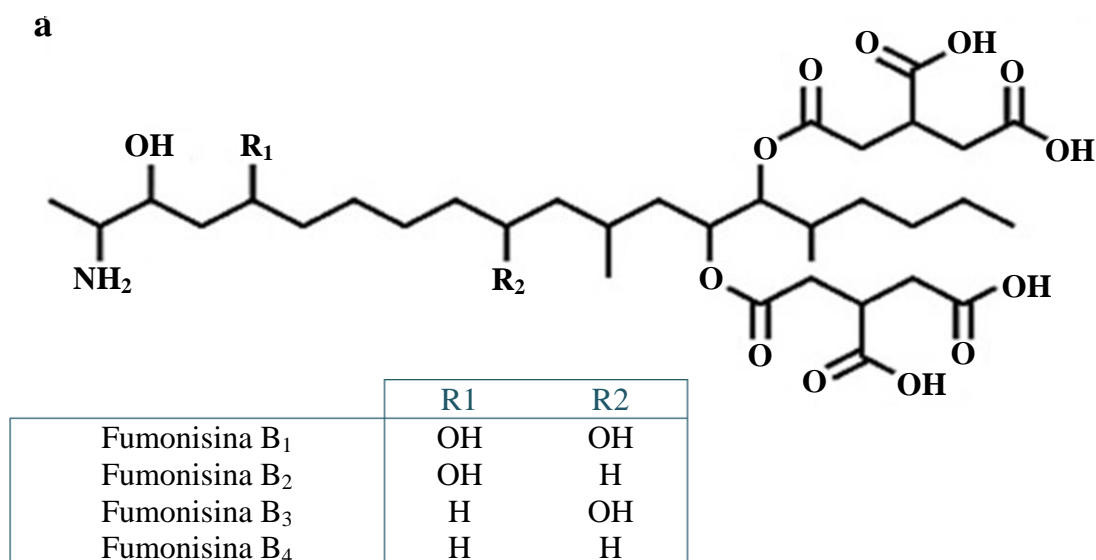


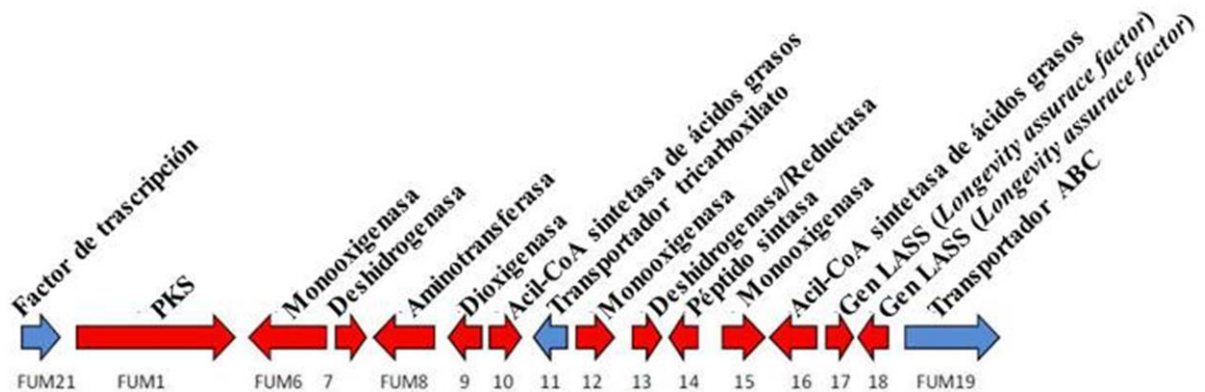
Figura 7:

7a: Estructura química de las fumonisinas de las serie B. R₁ y R₂ indican los diferentes radicales de los carbonos 5 y 10 que dan las cuatro fumonisinas de la serie B. Adaptado de Proctor *et al.*, 2003.

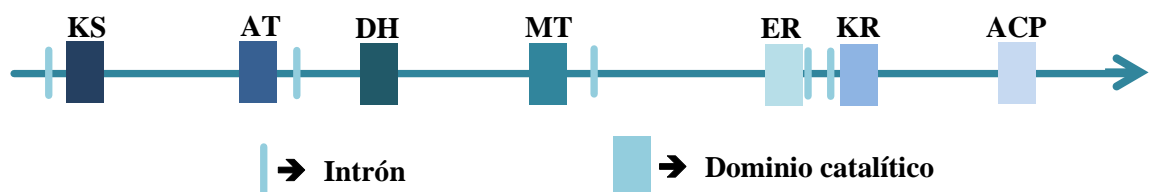
7b: Estructura de la esfinganina y la esfingosina, similar a la de la FB₁. Adaptado de Voss *et al.*, 2007.

Los genes involucrados en la síntesis de fumonisinas están ligados y organizados en un *cluster* de 42 kilobases (Kb) (Desjardins y Proctor, 2007; Keller, 2005; Proctor *et al.*, 2013) (figura 8a). Este *cluster* puede estar completo, o bien parcial o totalmente deletado en las distintas especies y cepas del género *Fusarium*, con lo cual especies muy próximas filogenéticamente difieren en su capacidad para sintetizar fumonisinas. Por tanto, la presencia del hongo en un hospedador no implica necesariamente la presencia de la toxina (González-Jaén *et al.*, 2004; Plumlee y Galey., 1994; Proctor *et al.*, 2004).

a



b



KS: β-ketoacil sintasa
AT: Acil-transferasa
DH: Dehidratasa
MT: Metil transferasa

ER: Enoil reductasa
KR: β-ketoacil reductasa
ACP: Proteína transportadora de grupos acilo

Figura 8:

8a: Cluster FUM de *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. verticillioides*. Contiene los genes de la síntesis de fumonisinas. Adaptado de Proctor *et al.*, 2013.

8b: Dominios catalíticos en el gen *FUM1*. Adaptado de Linnemannstöns *et al.*, 2002.

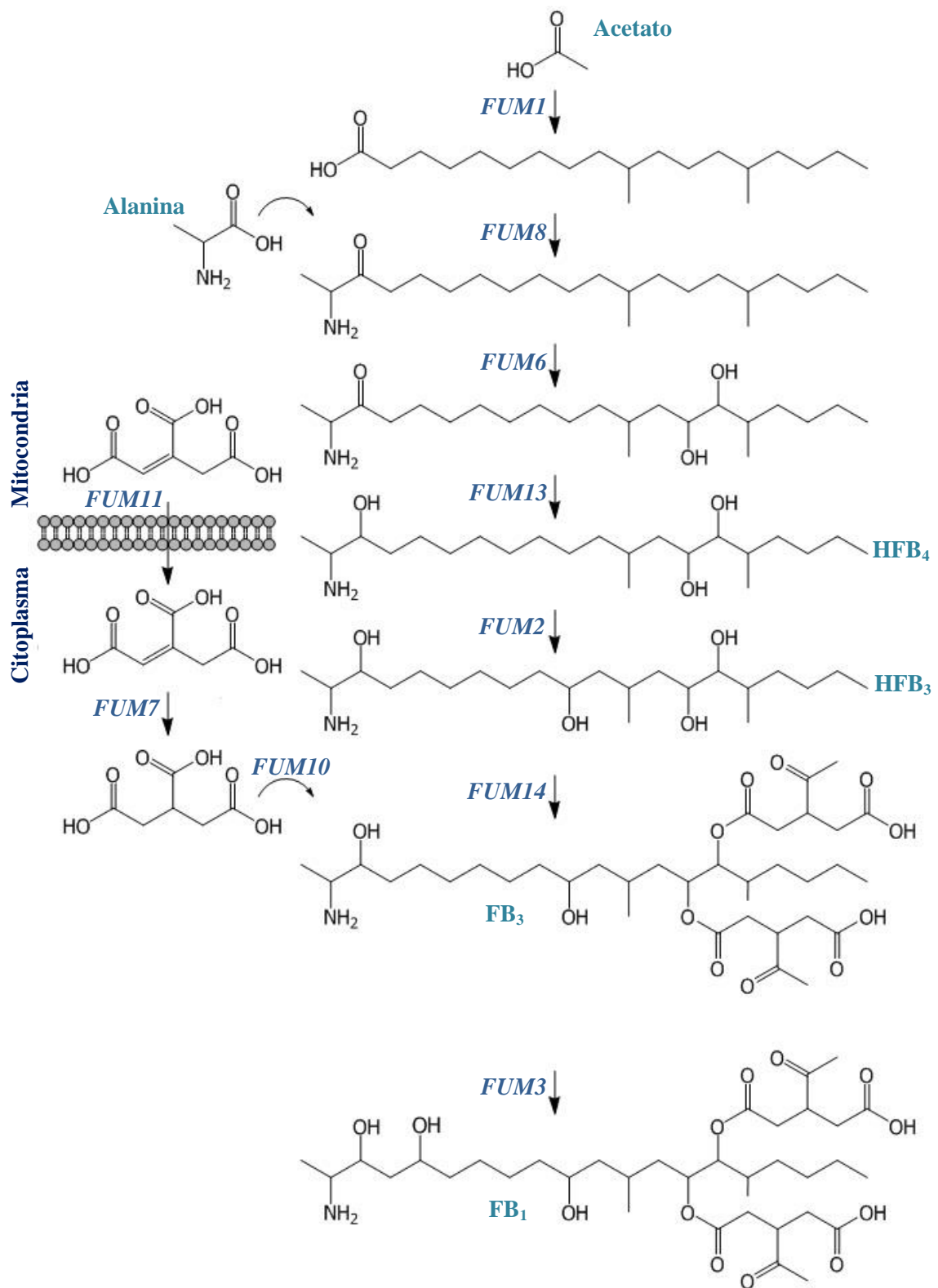


Figura 9: Esquema de la ruta de biosíntesis de fumonisinas. Adaptado de Alexander *et al.*, 2009.

Se conocen al menos 16 genes que codifican las actividades enzimáticas responsables de la síntesis de las fumonisinas, cuya expresión parece estar regulada de forma coordinada y de los cuales 11 de ellos son estrictamente necesarios para sintetizar la toxina (Desjardins y Proctor, 2007; Proctor *et al.*, 1999, 2003) (figura 8a). El primer gen de la ruta es el gen *FUM1*, que codifica para una poliquétido sintasa (PKS), la cual cataliza el primer paso: la formación de la cadena lineal desde el carbono 3 al 20 a partir de un derivado del acetato (Proctor *et al.*, 1999). A continuación, actúan diferentes genes con funciones diversas (figura 9), entre ellos *FUM8* que codifica para una aminotransferasa, *FUM2* y *FUM3* que hidroxilan la cadena, etc (Desjardins y Proctor, 2007; Linnemannstöns *et al.*, 2002; Proctor *et al.*, 1999; 2006; 2013) (figura 8a). Estos genes se han ido describiendo y demostrándose una correlación entre su expresión y la síntesis de fumonisinas (Proctor *et al.*, 2003, 2006; Seo *et al.*, 2001).

Diversos estudios realizados confirmaron que en los casos en que se interrumpió el gen *FUM1* no existía síntesis de fumonisinas. Por ello y por ser el primero, se considera a este gen el principal en la ruta de biosíntesis de estas toxinas. Se ha descrito que el gen *FUM1* tiene una región codificadora de 7,8 Kb con seis exones y cinco intrones, y la PKS que codifica presenta 7 dominios catalíticos que se encuentran en el mismo polipéptido y que aparecen detallados en la figura 8b. Debido a su importancia es el más empleado en estudios de expresión.

1.2.2. Tricotecenos

De todas las micotoxinas de *Fusarium* descritas hasta la fecha, los tricotecenos son las que más se han asociado con toxicosis crónicas y fatales en animales y seres humanos, incluyendo la Aleucia Alimentaria Tóxica en Rusia y Asia central o la enfermedad del moho rojo o Akakabi-byo en Japón. Los tricotecenos forman una gran familia de compuestos, de los cuales el diacetoxiscirpenol (DAS), la toxina T-2 (T-2), el nivalenol (NIV) y el deoxinivalenol (DON), también llamado vomitoxina, son los más importantes en cereales (Desjardins y Proctor, 2007). Los tricotecenos son un contaminante habitual de los alimentos y su consumo puede ocasionar vómitos y hemorragia alimentaria. Además, al contacto directo con la piel ocasionan dermatitis, y unos pocos miligramos de T-2 son potencialmente letales (Beasley, 1989; Bennet y Klich, 2003). Por dicha sintomatología, así como por sus efectos inmediatos tras el contacto, los tricotecenos fueron empleados como arma biológica por la Unión

Soviética en el sudeste asiático a principios de la década de los 80, en una mezcla que contenía DON, NIV y T-2, al que se dio el nombre de “lluvia amarilla” (Bennet y Klich, 2003; Marshall, 1982).

Los tricotecenos fueron identificados en primer lugar como inhibidores de la síntesis proteica en eucariotas al unirse al ribosoma e inhibir la actividad peptidil-transferasa (Bennet y Klich, 2003; Brown *et al.*, 2001). Sin embargo, posteriormente se les atribuyeron múltiples efectos sobre las células eucariotas, entre ellos inhibición de la síntesis de DNA y de RNA, interrupción de la división celular y efectos negativos sobre la estructura de las membranas y la integridad de la función mitocondrial (Rocha *et al.*, 2005); los diferentes tipos de tricotecenos presentan diferentes efectos tóxicos (Bin-Umer *et al.*, 2011).

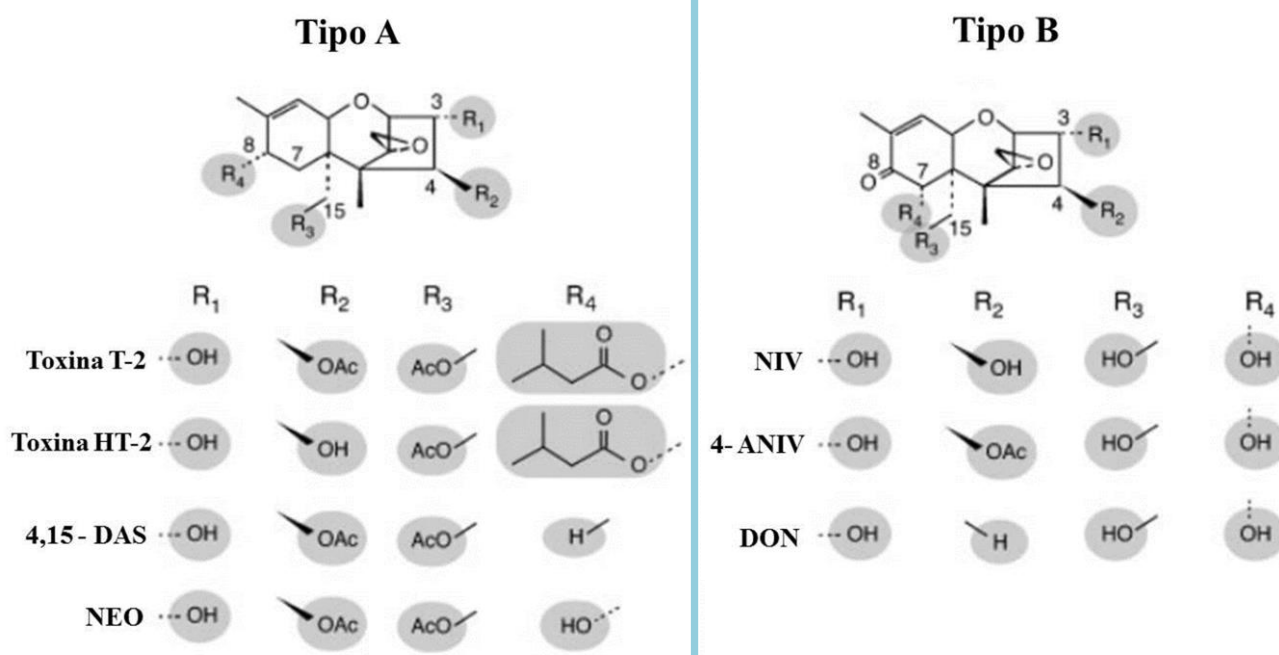


Figura 10: Estructura química general de los tricotecenos tipo A (izquierda) y tipo B (derecha). Entre los del tipo A se incluyen: las toxinas T-2 y HT-2, el 4,15-deacetoxiscirpenol (4,15 – DAS) y el neosolaniol (NEO); entre los del tipo B se incluyen el nivalenol (NIV), el 4-acetilnivalenol (4-ANIV) y el deoxinivalenol (DON). Adaptado de Kimura *et al.*, 2007.

Los tricotecenos constituyen una familia de más de 60 metabolitos sesquiterpenoides producidos por diferentes géneros fúngicos como *Fusarium*, *Myrothecium*, *Phomopsis*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Trichotecium* y otros (Cole y Cox, 1981; Scott, 1989; Ueno, 1987). Todos los tricotecenos comparten un núcleo tricíclico llamado tricodieno y caracterizado por un doble enlace en la posición 9,10 y un grupo epóxido entre los carbonos 12 y 13 (figuras 10 y 11) (Desjardins y Proctor, 2007). En el tricodieno existen cinco posiciones que pueden albergar grupos hidroxilo o acetilo, y esto otorga una gran diversidad estructural a la molécula (figura 10) (Foroud y Eudes, 2009).

En base a sus grupos funcionales, existen cuatro tipos de tricotecenos producidos por especies fúngicas: los tipos A, B, C y D, perteneciendo los sintetizados por *Fusarium* solamente a los grupos A y B (Krska *et al.*, 2001). Los del tipo A son más tóxicos que los del tipo B (Visconti *et al.*, 1991). Los primeros se caracterizan por la ausencia de un grupo ceto en el carbono 8 (figura 10). Son producidos principalmente por las especies *F. sporotrichioides* y *F. poae*, aunque también los sintetizan otras especies como *F. equiseti*, *F. sambucinum* o *F. acuminatum* (tabla 2). Tricotecenos de este tipo son las toxinas T-2 y HT-2 y el diacetoxiscirpenol (Barros *et al.*, 2012; Bottalico y Perrone, 2002; Ismail *et al.*, 2013; Mirocha *et al.*, 2003; Moss y Thrane, 2004). Al contrario de los del tipo A, los tricotecenos de tipo B sí presentan un grupo ceto en el carbono 8 (figura 10). Los más importantes son el deoxinivalenol, el nivalenol y los derivados de ambos, siendo el primero más frecuente que el NIV, aunque menos tóxico. Los principales productores de tricotecenos tipo B son las especies *F. graminearum* y *F. culmorum*, aunque también son sintetizados por otras especies como *F. equiseti*, *F. avenaceum* o *F. pseudograminearum* (tabla 2) (Barros *et al.*, 2012; Bottalico y Perrone, 2002; Mirocha *et al.*, 2003; Moss y Thrane, 2004; Yekkour *et al.*, 2015).

Aunque todavía no se conoce la ruta completa de biosíntesis de tricotecenos, muchos de los genes que participan en ella han sido aislados y estudiados (Brown *et al.*, 2001; Kimura *et al.*, 2001; Meek *et al.*, 2003). Esta ruta (figura 11) comienza con la ciclación del farnesil pirofosfato, catalizada por la enzima tricodieno sintasa, la cual está codificada por el gen *TRI5*. A continuación, una citocromo P450 monooxigenasa codificada por el gen *TRI4* cataliza los siguientes pasos, en total 8 oxigenaciones y

cuatro esterificaciones que dan lugar al isotricotriol, formando tras dos isomerizaciones no enzimáticas y una ciclación el isotricodermol, esqueleto de la estructura del tricoteceno (figura 11). Posteriormente se dan diversos cambios catalizados por diversas enzimas que darán los diferentes tipos de tricotecenos y sus derivados (McCormick *et al.*, 2011). Esta ruta de síntesis hace que las cepas de *Fusarium* puedan producir diferentes tipos de tricotecenos, lo cual confiere variabilidad a nivel específico, ya que distintas cepas de una misma especie podrán sintetizar diferentes tricotecenos; por ejemplo, en Chandler *et al.* (2003) se describen cepas de *F. culmorum* y *F. graminearum* de quimiotipo NIV o DON. Existe además la posibilidad de que una cepa produzca simultáneamente NIV y DON (Llorens *et al.*, 2004).

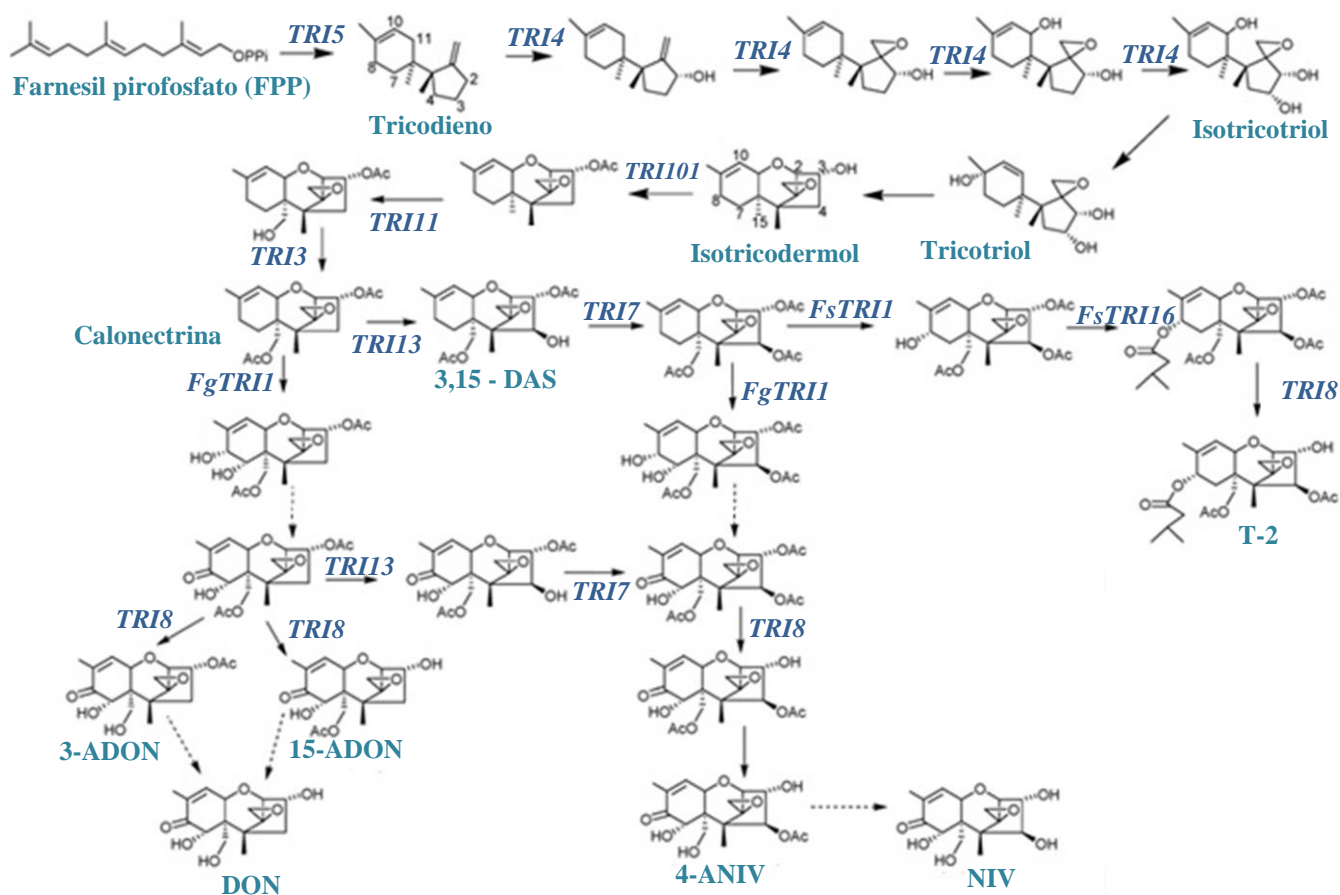


Figura 11: Esquema de la ruta de biosíntesis de los tricotecenos. Las flechas discontinuas indican otros pasos intermedios no reflejados en el esquema. Las letras “Fg” delante del gen indican la especie *F. graminearum*. Las letras *Fs* delante del gen indican la especie *F. sporotrichioides*. Adaptado de McCormick *et al.*, 2011.

En la ruta de biosíntesis de tricotecenos intervienen 12 genes corregulados que se encuentran en un *cluster* de 25 Kb (figura 12). El gen *TRI5* constituye el centro topográfico del mismo. De los 12 genes que presenta el *cluster*, 10 de ellos son estrictamente necesarios para la síntesis de estas micotoxinas, entre ellos *TRI6*, *TRI10* y *TRI5*, siendo este último el más empleado en estudios de expresión, ya que se ha descrito una correlación positiva entre la expresión de este gen y la cantidad de DON producida (Doohan *et al.*, 1999; Vegi *et al.*, 2011). Además, existen cuatro genes adicionales localizados fuera del *cluster*: *TRI1*, *TRI16*, *TRI101* y *TRI15* (Desjardins y Proctor, 2007; McCormick *et al.*, 2006).



Figura 12: *Cluster* con los genes de la síntesis de tricotecenos de *F. verticillioides*. Adaptado de Mousa y Raizada, 2015.

Las especies *F. sporotrichioides* y *F. graminearum* han sido claves a la hora de dilucidar la ruta de biosíntesis de los tricotecenos de tipo A y B respectivamente (Brown *et al.*, 2001; Kimura *et al.*, 2003; McCormick *et al.*, 2011).

1.2.3. Zearalenona

Aislada y caracterizada por primera vez por Urry *et al.* (1966) a partir de *Gibberella zeae* (= *F. graminearum*), la zearalenona es una micotoxina única tanto a nivel estructural como funcional (Glenn, 2007). Las únicas especies productoras de zearalenona son *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. pseudograminearum*, *F. equiseti* y *F. semitectum* (tabla 2). Estas especies contaminan cereales de grano pequeño por todo el mundo, variando su incidencia y niveles de contaminación según los factores ambientales en los que se encuentra el hongo (Bennet y Klich, 2003). Su estructura química se define como 6-(10-hidroxi-6-oxo-trans-1-undecenil)- β -ácido resorcíclico lactona (figura 13).

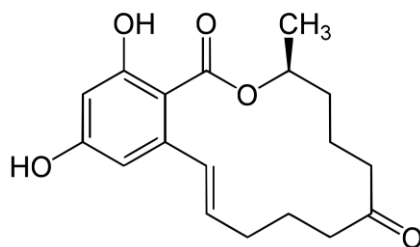


Figura 13: Estructura química de la zearalenona.

Aunque está considerada en la literatura como una micotoxina, en realidad sus efectos tóxicos para el ser humano son muy escasos. Presenta actividad estrogénica, debida a su similitud con la estructura química de los estrógenos, en particular del 17- β -estradiol, la principal hormona producida por el ovario humano (Kuiper-Goodman *et al.*, 1987). La ingestión de zearalenona no produce micotoxicosis graves y sólo a muy altas concentraciones puede producir efectos inmunosupresores o adenocarcinomas (Berek *et al.*, 2001; Creppy, 2002). En animales sí se han observado efectos más perjudiciales, de tal manera que una ingestión de solamente 1,0 mg/kg puede ocasionar síndromes hiperestrogénicos en cerdos, mientras que un consumo mayor disminuye la fertilidad, provoca abortos y lleva a otros problemas en diferentes especies de ganado bovino, ovino y porcino (Bennet y Klich, 2003; El-Nezami *et al.*, 2002).

La legislación europea establece unos límites máximos permitidos de zearalenona de 0,35 mg/kg para maíz no elaborado, 0,1 mg/kg en otros cereales no elaborados y 0,075 mg/kg para cereales destinados al consumo humano directo y harina de cereales (Comisión Europea de Regulación N° 1126/2007).

1.2.3. Moniliformina, beauvericina, fusarina C y fusaproliferina

La moniliformina fue caracterizada en 1979 por Burmeister *et al.* a partir de *F. moniliforme* (= *F. proliferatum*). Esta micotoxina la producen exclusivamente especies de *Fusarium* y aunque se ha demostrado su toxicidad para las aves de corral, no se había asociado a ninguna enfermedad crónica o aguda en animales o seres humanos (Burmeister *et al.*, 1979; Leslie *et al.*, 2005; Marasas *et al.*, 1991). No obstante, estudios recientes han demostrado una elevada toxicidad en ratas (Jonsson *et al.*, 2015). Esta micotoxina la producen las especies *F. proliferatum*, *F. avenaceum*, *F. fujikuroi*, *F. nygamai*, *F. pseudonygamai*, *F. subglutinans* y *F. thapsinum* en cantidades elevadas (tabla 2) (Desjardins *et al.*, 1997; Leslie *et al.*, 1996). Se trata de una sal sódica o potásica cuya fórmula química es 1-hidroxiciclobut-1-en-3,4-diona (Fotso *et al.*, 2002)

(figura 14). Se ha descrito una alta mortalidad en pollos por el consumo de piensos contaminados con moniliformina; su toxicidad radica en la inhibición del ciclo de Krebs produciendo hipertrofia cardíaca y desórdenes hematológicos (Convoka *et al.*, 2003; Logrieco *et al.*, 2002).

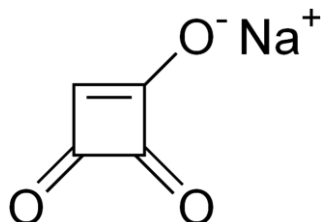


Figura 14: Estructura química de la moniliformina.

Las eniantinas, producidas principalmente por las especies *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. poae*, *F. oxysporum*, *F. avenaceum*, *F. sambucinum* y *F. tricinctum* (Bottalico y Perrone, 2002; Logrieco *et al.*, 2002; Nicholson *et al.*, 2004), son depsipéptidos hexacíclicos no ribosomales. Se han aislado hasta 10 eniantinas diferentes, siendo la más importante la beauvericina (figura 15). Esta micotoxina, es un agente quelante que presenta propiedades insecticidas y antibióticas (Glenn *et al.*, 2007; Logrieco *et al.*, 1998). La beauvericina fue aislada por primera vez del hongo *Beauveria bassana*, muy tóxico para ciertos insectos (Desjardins, 2006). Aunque esta micotoxina se acumula en el maíz y el trigo contaminados por *Fusarium*, no se asocia a enfermedades en animales, si bien se ha comprobado que induce la apoptosis en células de mamíferos (Desjardins, 2006; Logrieco *et al.*, 2002). Las especies que la producen son *F. pseudoantophilum*, *F. avenaceum*, *F. fujikuroi*, *F. globosum*, *F. nygamai*, *F. poae*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans* (tabla 2).

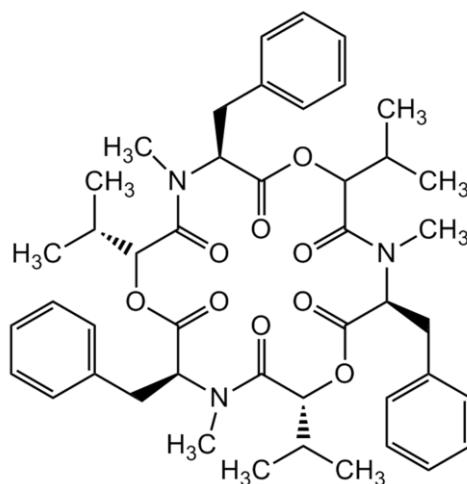


Figura 15: Estructura química de la beauvericina.

La fusarina C es una micotoxina que resulta de gran importancia debido a su carácter mutagénico (Desjardins, 2006; Gelderblom *et al.*, 1984). Todas las fusarinas presentan un poliquétido como esqueleto común, pero difieren en el resto de su estructura química. Por ejemplo, la fusarina C presenta un epóxido entre los carbonos 13 y 14 y una cadena de etanol (figura 16) (Glenn *et al.*, 2007). Las especies de *Fusarium* productoras de fusarina C son *F. avenaceum*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides* y *F. verticillioides*, entre otras (tabla 2) (Desjardins, 2006). Esta toxina no está directamente implicada en enfermedades en seres humanos o animales.

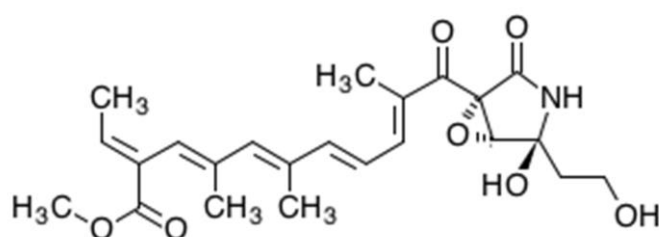


Figura 16: Estructura química de la fusarina C.

Por último, la fusaproliferina es un metabolito sesterterpeno (figura 17) sintetizado por algunas especies de *Fusarium* pertenecientes al FFSC (tabla 2). Las más importantes son *F. proliferatum* y *F. subglutinans*, ya que producen niveles elevados de esta toxina que se encuentra comúnmente en el maíz contaminado (Desjardins, 2006; Shephard *et al.*, 1999). Sin embargo, los elevados índices de contaminación no suponen un grave problema ya que la fusaproliferina no ha sido asociada a ninguna enfermedad animal o humana, aunque estudios experimentales han demostrado que es citotóxica para mamíferos e insectos (Fornelli *et al.*, 2004; Logrieco *et al.*, 1996). Además de las dos especies indicadas anteriormente, *F. globosum* y *F. pseudonygamai* también producen fusaproliferina (Fotso *et al.*, 2002; Glenn, 2007; Shephard *et al.*, 1999).

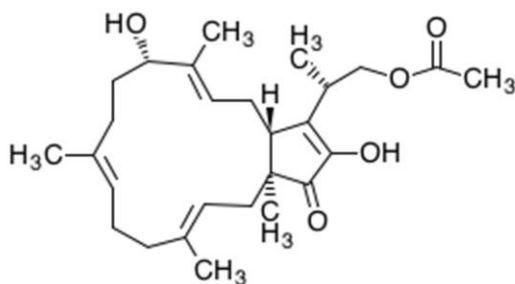


Figura 17: Estructura química de la fusaproliferina.

1.2.4. Otras micotoxinas producidas por *Fusarium*

Además de las mencionadas anteriormente, se han descrito otras toxinas que son sintetizadas por *Fusarium* como por ejemplo el butenólido, producido por *F. graminearum*; la equisetina, sintetizada por *F. equiseti* y *F. semitectum*; o el ácido fusárico, de *F. proliferatum*.

1.3. Factores que determinan el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas

Durante su ciclo vital en cereales, las especies del género *Fusarium* colonizan diferentes sustratos, como por ejemplo el suelo, diversos tejidos de sus hospedadores, y además permanecen en los residuos de la cosecha donde sobreviven de una manera muy eficaz. Las esporas se dispersan principalmente por la lluvia y el viento (figura 18), de tal manera que unas condiciones climáticas lluviosas y templadas en la etapa de floración favorecerán la infección (Jurado *et al.*, 2008; Marín *et al.*, 2010a).

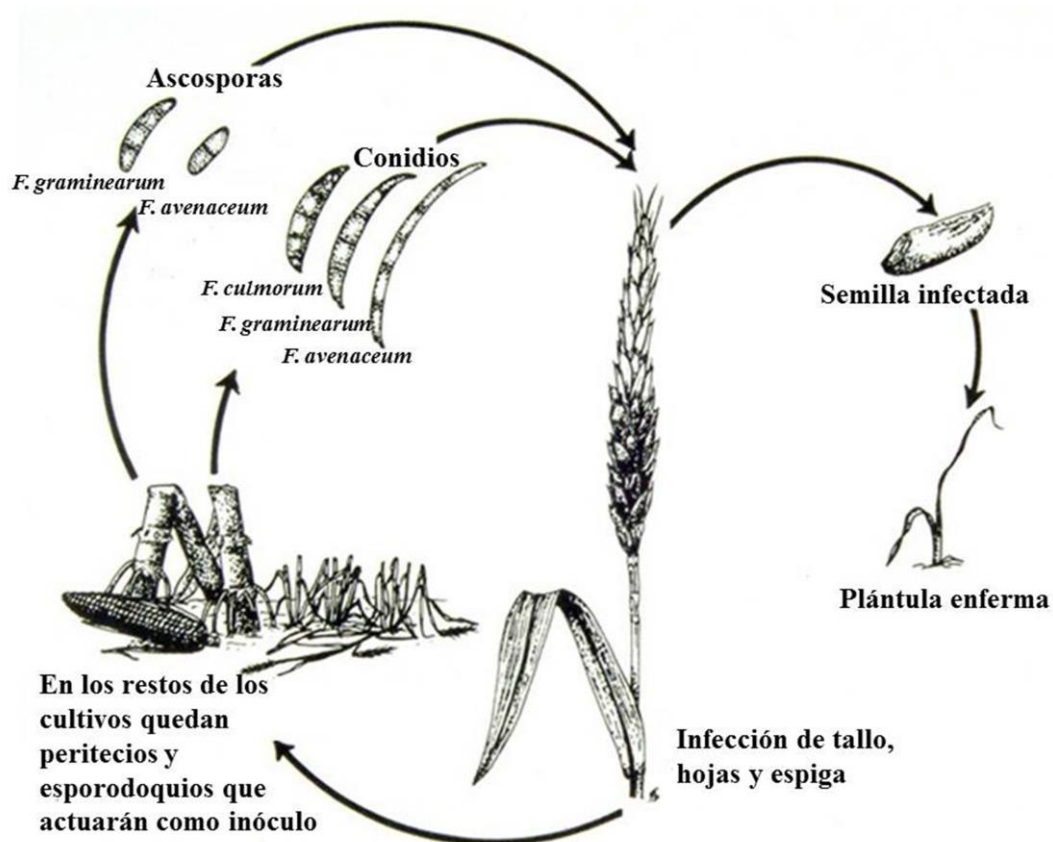


Figura 18: Ciclo de la enfermedad de *Fusarium* spp. Adaptado de Schmale y Bergstrom, 2003.

De todos los factores ambientales que influyen en el crecimiento o la síntesis de toxinas en el género *Fusarium*, los dos más importantes son la temperatura y el estrés hídrico, expresado este último en valores de potencial hídrico (ψ_w) o actividad de agua (a_w) (Munkvold, 2003). Además, otros factores como el sustrato, el pH o los niveles de gases disponibles en la atmósfera pueden influir en gran medida en el hongo (Arroyo et al., 2005; Belli *et al.*, 2004; Mitchell *et al.*, 2004; Skrinjar y Dimic, 1992; Valero *et al.*, 2006).

Conocer las condiciones ambientales que favorecen el crecimiento fúngico o la biosíntesis de micotoxinas es esencial para poder predecir el riesgo potencial que tiene un determinado cultivar de estar contaminado con un determinado hongo o su toxina. Si bien, aunque las condiciones ambientales en el campo son difíciles de controlar, sí pueden serlo durante el almacenamiento. De cualquier manera, conocer las condiciones óptimas de crecimiento y producción de toxinas es esencial para poder comprender los procesos y predecir y prevenir, con medidas de control adecuadas, la aparición de enfermedades y la acumulación de micotoxinas sobre los cereales, tanto en el campo como en su posterior almacenamiento (Charmley *et al.*, 1994).

1.3.1. Temperatura

La temperatura es uno de los principales factores que afectan al crecimiento fúngico y a la producción de toxinas. Cada especie fúngica presenta una temperatura mínima, óptima y máxima para su crecimiento (Lacey, 1989) y para la síntesis de sus toxinas. En muchas ocasiones, la temperatura óptima para la síntesis de micotoxinas no coincide con la de crecimiento, lo cual supone que tras temperaturas que pueden originar una acumulación de masa fúngica, debido a una variación de las condiciones ambientales, esta puede comenzar a sintetizar una elevada cantidad de micotoxinas.

En general, los hongos presentan un amplio rango de temperaturas que permiten su crecimiento, yendo desde los 4°C hasta los 65°C en algunas especies. No obstante, la mayoría de los hongos que crecen sobre cereales lo hacen entre 0°C y 35°C (Lacey, 1989; Marín *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2006). La temperatura influirá además sobre otros factores, como el estrés hídrico o el sustrato. Cada factor separadamente, así como sus interacciones, determinarán las especies que colonizan el cereal, estableciendo las

que son más tolerantes a según cuales condiciones ecofisiológicas (Magan y Aldred, 2007).

1.3.2. Estrés hídrico

Además de la temperatura, otro de los factores fundamentales que determinan el crecimiento y la síntesis de toxinas del hongo es la disponibilidad de agua, la cual limitará el crecimiento fúngico y la germinación de las esporas. El estrés hídrico se expresa en niveles de actividad de agua (a_w) o de potencial hídrico (Ψ_w), empleándose este último para ecosistemas terrestres. El potencial hídrico es una medida de la fracción del contenido total de agua disponible para el crecimiento microbiano o fúngico, expresado en megapascales (MPa). El potencial hídrico se descompone en tres factores: el potencial osmótico, el potencial matricial y el potencial de turgor (Magan y Aldred, 2007). Para relacionar el potencial hídrico con la actividad de agua se emplea la siguiente fórmula:

$$\Psi_w = \frac{RT}{V} \ln a_w + P$$

R = constante universal de los gases ideales
P = presión atmosférica

T = temperatura absoluta
V = volumen de un mol de agua

El valor de actividad de agua de 1,0 corresponde al agua destilada, e indica una disponibilidad de agua total. La mayoría de las especies fúngicas que crecen sobre cereales presentan una a_w de agua mínima para el desarrollo de alrededor de 0,70, mientras que el crecimiento de la masa fúngica sólo se da a partir de 0,90 (Marín *et al.*, 2004; Palmero *et al.*, 2008; Sanchís *et al.*, 2006). En la tabla 5 aparecen representadas las equivalencias entre Ψ_w y a_w empleadas en esta tesis.

Potencial hídrico (Ψ_w)		Actividad de agua (a_w)
-0,7 MPa		0,995
-2,8 MPa	=	0,982
-7,0 MPa		0,955

Tabla 5: Equivalencias de los valores de Ψ_w (expresados en MPa) con sus valores correspondientes de a_w . Aparecen los más empleados en este trabajo.

Al igual que ocurre con la temperatura, los valores de potencial hídrico permisivos para el crecimiento fúngico a menudo no coinciden con los de producción de toxinas. Además, existen interacciones entre el potencial hídrico y otros factores ecofisiológicos, como la temperatura o el sustrato (Lacey y Magan. 1991; Mateo *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2006; Schmidt-Heydt *et al.*, 2008).

1.3.3. Sustrato

El efecto que el sustrato ejerce sobre el hongo en su crecimiento y síntesis de toxinas es un factor que ha de tenerse muy en cuenta, ya que diferentes sustratos presentan diferentes características que afectarán al hongo. Parámetros físicos como la disponibilidad de oxígeno, la actividad de agua o la conductividad térmica, y químicos como el contenido en minerales y grasas, la fuente de carbono disponible o la composición en aminoácidos, influirán en la biología del hongo de forma positiva o negativa (LeBars, 1982). Por ejemplo, estudios previos han revelado una inhibición de la síntesis de micotoxinas mediante el uso de ácido ferúlico, flavonoides (tricotecenos) o bicarbonato sódico o amónico en la composición del sustrato (Boutigny *et al.*, 2009; Desjardins y Plattner, 1998; Gardiner *et al.*, 2009b; Samapundo *et al.*, 2007a). Especial interés requiere la fuente de carbono disponible en el sustrato, ya que algunos hongos toxígenos utilizan el almidón como única fuente de carbono para su crecimiento (Bluhm y Woloshuk, 2005; Roussos *et al.*, 2006), por lo que sustratos con mayor cantidad de almidón favorecerán el crecimiento de estos hongos.

Estudiar el efecto del sustrato es complicado, ya que requiere estudios en campo sobre el medio natural difíciles de llevar a cabo. La mayoría de los estudios se realizan sobre medios sintéticos, sin tener en cuenta el efecto de los diferentes sustratos. Sin embargo, trabajos realizados sobre medios con componentes naturales como extractos, harinas o granos de cereales, se consideran hasta el momento una buena aproximación a las condiciones que se dan en los sustratos naturales (Gil-Serna *et al.*, 2015; Pardo *et al.*, 2005; Stępień *et al.*, 2015), y han revelado la existencia de ciertas diferencias con los estudios realizados en medio sintético (Llorens *et al.*, 2004; Marín *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2006). En el capítulo 4 de este trabajo se amplía la información sobre el efecto del sustrato.

1.3.4. pH

El pH es una de las propiedades químicas más importantes del suelo, debido al significativo efecto que ejerce tanto sobre las características físicas, químicas y biológicas de este, como también sobre el rendimiento de los cultivos (Cepeda, 1999; Jackson, 1970; Pereira *et al.*, 2007). Este factor influye en gran medida en otros factores abióticos como la fuente de carbono, los nutrientes disponibles o la solubilidad de los metales (Aciego Pietri y Brooks, 2008; Andersson *et al.*, 2000; Kemmitt *et al.*, 2006, 2006; Rousk *et al.*, 2009), por lo que puede determinar desde el punto de vista biológico el tipo de organismo que se desarrolle sobre un sustrato, tanto en medios naturales como en cultivos (Bååth y Anderson, 2003; Frostegård *et al.*, 1993; Rousk *et al.*, 2009). El estudio del efecto del pH es una tarea complicada, ya que modificaciones en este provocarán cambios en otros factores, siendo difícil separarlos.

Los hongos se desarrollan con facilidad en pHs ácidos, siendo el pH óptimo para la mayoría de especies contaminantes de vegetales de 5,6. En general, el crecimiento fúngico se da a pHs entre 3 y 7, aunque ciertas especies pueden crecer a pHs mayores, y sobre todo menores, como por ejemplo *Aspergillus niger* y *Penicillium funiculosum*, capaces de crecer a pH 2 y menor. pHs extremos dificultan el crecimiento fúngico y activan la síntesis de metabolitos secundarios (Holmquist *et al.*, 1983). Estudios previos han demostrado que pHs ácidos causan un aumento de la síntesis de toxinas. Por ejemplo, Flaherty *et al.* (2003) observaron un aumento en la síntesis de fumonisinas por parte de *F. verticillioides* que no se producía a un pH alcalino, y Gardiner *et al.* (2009a) comprobaron un aumento de la expresión del gen *TRI5* y de la concentración de DON en *F. graminearum* a pH 3,5 que no se producía a pHs mayores.

1.3.5. Concentración de gases atmosféricos

La sensibilidad que presenta cada especie fúngica a los niveles atmosféricos de oxígeno (O₂), dióxido de carbono (CO₂) y nitrógeno es un factor a tener en cuenta, en especial durante el almacenaje. Tanto el crecimiento fúngico como la síntesis de micotoxinas se ven influidos por las cantidades disponibles de estos tres gases, particularmente de los dos primeros (Pitt y Hocking, 1985).

Los hongos del género *Fusarium* requieren una atmósfera aerobia para su crecimiento. Gunner y Alexander (1964) probaron que la especie *F. oxysporum* era

capaz de crecer en condiciones anaerobias mediante el enriquecimiento del medio con diferentes iones; sin embargo, se trata de un caso extraordinario, y no existen evidencias de que ninguna otra especie sea capaz de ello. No obstante, la cantidad de O₂ disponible puede ser muy baja, habiéndose registrado crecimiento incluso en atmósferas modificadas al 2% de O₂ (Samapundo *et al.*, 2007c).

La producción de toxinas parece ser más sensible a los niveles de gases atmosféricos que el crecimiento fúngico. Estudios previos han comprobado que para *F. proliferatum*, atmósferas del 20% de O₂ provocan una reducción en la síntesis de toxinas; este mismo efecto se consigue en la especie *F. verticillioides* con atmósferas de 70% de O₂ (Samapundo *et al.*, 2007c). En cuanto al efecto de la concentración de CO₂, atmósferas modificadas al 10% y 30-40% de CO₂ produjeron inhibición de la síntesis de FB₁ en *F. verticillioides* y *F. proliferatum* respectivamente, si bien no inhibían el crecimiento fúngico (Samapundo *et al.*, 2007b).

Por último, niveles bajos de nitrógeno son responsables de una activación de la ruta de síntesis de micotoxinas (Snoeijers *et al.*, 2000). Diversos estudios han demostrado que una concentración baja de nitrógeno aumenta en gran medida la síntesis de los genes *FUM1* y *FUM6* y la cantidad de fumonisinas en *F. proliferatum* (Kohut *et al.*, 2009), así como la cantidad de tricotecenos sintetizados por *F. graminearum* (Walkowiak y Subramaniam, 2014).

1.3.6. Interacciones microbianas

Las especies fúngicas en el campo, y sobre todo durante el almacenamiento, entran en contacto con otras especies de hongos y con el resto de la microbiota del grano. Todos estos componentes interactúan entre sí, provocando cambios en las poblaciones de organismos, de tal manera que el crecimiento y la síntesis de micotoxinas se pueden inhibir, estimular o no sufrir efecto alguno debido a estas interacciones (Azcón *et al.*, 1991; Cuero *et al.*, 1988). Estos efectos se dan normalmente por la competitividad que se crea por los nutrientes del medio (Wicklow *et al.*, 1980). Estudios realizados en los que se suplementaba el medio con azúcares o aminoácidos requeridos por los hongos, reducían la competitividad entre ellos al tener disponibles los nutrientes necesarios (Mehl y Cotty, 2013).

Existen diferentes especies que comparten nicho ecológico en la naturaleza. Los géneros *Fusarium*, *Penicillium* y *Aspergillus* colonizan los granos de cereales y en particular, coexisten en el maíz. Estudios previos han demostrado la dominancia en el crecimiento de *F. verticillioides* frente a otros géneros, como *Aspergillus flavus*, u otras especies de *Fusarium* como *F. graminearum* (Marín *et al.*, 2004). Además, determinados estudios han sugerido que la producción de toxinas se ve también influida por esta competitividad, obteniendo resultados de inhibición de la producción de fumonisinas por parte de *F. verticillioides* y *F. proliferatum* al encontrarse en presencia de *F. graminearum*, mientras que la producción de zearalenona de *F. graminearum* no se vería alterada por las otras dos (Velluti *et al.*, 2000).

De igual manera que ocurría en casos anteriores, las interacciones microbianas se ven influenciadas en gran medida por la interacción con otros factores, como las condiciones ambientales. Diversos estudios han puesto de manifiesto que en determinados escenarios de temperatura y potencial hídrico, existe una reducción del crecimiento por parte de *F. proliferatum* y *F. verticillioides* en presencia de *F. graminearum* (Marín *et al.*, 1998; Velluti *et al.*, 2000). Además, el sustrato también interfiere con las interacciones entre especies, ya que se ha determinado que *F. verticillioides* y *A. flavus* ocupan realmente nichos diferentes, ya que utilizan diferentes fuentes de carbono, y sólo ocurre una prevalencia de *F. verticillioides* sobre *A. flavus* bajo condiciones extremas (Giorni *et al.*, 2009). Se ha determinado que las especies que presentan macroconidios son más competitivas, por lo que el tipo de conidios es otro factor importante de la competitividad, además de las condiciones ambientales (Wagacha *et al.*, 2012).

1.3.7. Insectos

Tanto los hongos fitopatógenos como los insectos herbívoros interactúan en los cultivos, ocasionando importantes efectos en las poblaciones vegetales: reducen su crecimiento y reproducción, alteran su competitividad con otras especies y afectan a su mortalidad. Estas interacciones pueden ser directas o indirectas. En las primeras, el hongo y el insecto tienen efectos entre sí, como por ejemplo insectos que se alimentan de esporas fúngicas, u hongos que colonizan la planta a través de heridas producidas por los insectos. Por otro lado, las interacciones indirectas son aquellas en las que uno de los

colonizadores provoca alteraciones en el hospedador vegetal que afectan al otro (Hatcher, 1995).

En el caso de los cultivos, son muy importantes los efectos de los insectos sobre el grano que causan deterioros en este durante y tras la cosecha, de manera que dañan la parte exterior de la semilla. Esto favorece al hongo en diferentes aspectos, ya que facilita su entrada al interior del grano, crea un ambiente propicio para el crecimiento fúngico debido a su actividad metabólica y respiración y además, los insectos pueden actuar como vectores transportando esporas fúngicas (Dunkel, 1988; Sinha y Wallace, 1966).

Diferentes estudios han puesto de manifiesto una reducción del contenido de micotoxinas sobre el hospedador tras el empleo de pesticidas que disminuyen las poblaciones de insectos (Folcher *et al.*, 2009). Además, el uso de “maíz Bt”, variedad transgénica resistente a diversos insectos como el taladro del maíz (*Ostrinia nubilalis*), reduce el daño que esta especie vegetal sufre por insectos y, como consecuencia, reduce la infección por parte de especies del género *Fusarium* y finalmente, la producción de toxinas (Folcher *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2008). Esto sugeriría una relación entre el daño producido por los insectos sobre la planta, y el grado de infección fúngica de ese mismo hospedador (Cardwell *et al.*, 2000).

1.4. Cereales: medidas de control y prevención de la contaminación por hongos toxígenos

Como ya se ha comentado, los hongos toxígenos son importantes contaminantes que provocan efectos devastadores en productos agrícolas y semillas, tanto en el campo y durante su almacenaje, como en las etapas de procesado e incluso de venta, y reducen su valor nutritivo (Jimoh y Kolapo, 2008). Además, al afectar directamente al ser humano y los animales de interés agroalimentario, suponen también un importante problema de salud pública. Por lo tanto, estos hongos ocasionan grandes pérdidas económicas y aumentan además los costes de producción, que deben incluir las medidas de control y prevención para tratar de reducir su impacto. Existen diferentes estrategias que pueden ser utilizadas a la hora de controlar el crecimiento fúngico y la biosíntesis de micotoxinas en semillas y productos derivados de cereales, tales como tratamientos

químicos, el uso de conservantes alimenticios o métodos físicos o biológicos (Anjorín *et al.*, 2013).

La elección del método adecuado es un factor importante, ya que algunos de ellos requieren el uso de equipos o productos químicos que a menudo son costosos, y en ocasiones el uso de estos últimos causa contaminación ambiental, riesgos para la salud y afecta al balance ecológico natural (Yassin *et al.*, 2011). Por ello, otras medidas como la aplicación de tratamientos térmicos o el uso de productos naturales como extractos de plantas o aceites esenciales ofrecen la oportunidad de evitar conservantes químicos y el riesgo que supone el uso de fungicidas (Juárez-Becerra *et al.*, 2010; Yassin *et al.*, 2012). Sin embargo, en muchas ocasiones, se hace necesario el uso de productos químicos como los fungicidas para reducir la contaminación fúngica a niveles aceptados por la legislación.

Las medidas de prevención se centran principalmente en las buenas prácticas agrícolas e industriales, y tienen como objetivo evitar la contaminación y así garantizar la salubridad de los productos alimenticios para que lleguen en condiciones óptimas a los seres humanos y los animales que los van a consumir. Para ello, se ha desarrollado una herramienta de identificación, evaluación y control de los peligros potenciales que afectan a la seguridad de los alimentos: la HACCP, el Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico. Los Puntos de Control Crítico (CCP) son las etapas del proceso en las cuales se hace posible llevar a cabo medidas de control para prevenir, eliminar o reducir un peligro hasta niveles considerados aceptables. En el VI Programa Marco de la Unión Europea se incluyó el HACCP como prioridad en el campo de la seguridad y calidad alimentaria (Comisión *Codex Alimentarius*, 2002).

La formación de las micotoxinas puede ocurrir durante las diferentes etapas por las que pasan los cereales: la precosecha, la cosecha, el procesado y el almacenamiento (Cleveland *et al.*, 2003; Perrone *et al.*, 2007). Entre estas, las que cobran mayor importancia para el género *Fusarium* son la precosecha (especialmente durante la floración) y la cosecha (Marín *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2004). Por lo tanto, el control de las micotoxinas producidas por estas especies se centra en dos estrategias: en primer lugar la inhibición o reducción del crecimiento del hongo sobre el cereal y prevención así de la contaminación toxígena, y en segundo lugar la eliminación de las micotoxinas que hayan crecido sobre el cereal (Kabak *et al.*, 2006).

1.4.1. Medidas preventivas para las especies de *Fusarium spp.*

A la hora de evitar la contaminación en el campo, lo más importante es el empleo de buenas prácticas agrícolas. Estas pueden incluir la rotación de los cultivos, el arado en profundidad o la elección de cultivares poco susceptibles a la contaminación fúngica, entre otras (Blandino *et al.*, 2012; Chulze *et al.*, 2015). Además, para reducir este tipo de contaminación, se emplean diversos fungicidas y otras sustancias capaces de inhibir el crecimiento fúngico (Velluti *et al.*, 2003; Ramírez *et al.*, 2004). Hay que indicar que la aplicación de fungicidas viene planteando problemas en los últimos años, ya que los consumidores demandan cada vez más alimentos frescos o mínimamente procesados, que no hayan sido tratados con sustancias conservantes o antimicrobianas, por lo que se trata de reducir el uso de estos aditivos químicos (Magan, 2006); de acuerdo con ello, la normativa sobre los límites en la aplicación de fungicidas en la UE se va endureciendo de forma sistemática (Directiva 2009/128/EC). No obstante, la utilización de fungicidas es en ocasiones la única opción para el control fúngico. Los fungicidas más empleados contra el crecimiento de *Fusarium* son:

- Benzimidazoles (benomilo, carbendazima, metil tiofanato, tiabendazol, fuberidazol), cuyos componentes inhiben la formación de los microtúbulos.
- Triazoles (tebuconazol, protioconazol, ciproconazol), que afectan a la composición de la membrana celular.
- Isoxazoles (himexazol), que inhibe la síntesis de DNA.

Aunque existen límites legales de residuo de estos productos antifúngicos fijados por la EU, el estudio del uso de los fungicidas debe ampliarse para asegurar la mayor eficacia con el menor impacto tanto ambiental, como en la salud humana (Marín *et al.*, 2013). Estudios previos han demostrado que diversos compuestos antifúngicos pueden actuar en ocasiones como factores de estrés, principalmente ambientales, que pueden llegar incluso a activar la síntesis de micotoxinas en lugar de reducir la presencia de estos compuestos (Edwards y Godley, 2010; Haidukowski *et al.*, 2005; Ioos *et al.*, 2005; Mateo *et al.*, 2011; Marín *et al.*, 2013; Ramírez *et al.*, 2004). Por otro lado, existen evidencias de la aparición de resistencias frente algunos de los fungicidas más comunes empleados en agricultura, así como de variabilidad en la eficacia entre las distintas especies e incluso a nivel intraespecífico (Scherm *et al.*, 2013; Spolti *et al.*, 2014; Talas and MacDonald, 2014). Por ello, son esenciales los estudios más detallados sobre los

efectos que tienen los agentes antifúngicos en las especies diana (patógenos y toxígenos).

Durante las posteriores etapas de cosecha y almacenaje, se emplean otras medidas de control y prevención. Realizar la cosecha cuando el grano está seco y controlar las condiciones de temperatura y humedad del grano almacenado así como la presencia de insectos, son acciones importantes para evitar la síntesis de micotoxinas, las cuales pueden continuar sintetizándose ya que la presencia fúngica continúa tras la cosecha (Aldred y Magan, 2004).

1.4.2. Eliminación de las micotoxinas sintetizadas por las especies de *Fusarium spp.* en cereales

Para la eliminación de las micotoxinas una vez que están ya presentes en los cereales se emplean diferentes métodos, que pueden ser clasificados en métodos naturales, físicos, microbiológicos y químicos (Borrell y Gimeno, 2003):

- Métodos naturales: como la utilización de los ácidos tauricólico, glucurónico o sulfúrico, los cuales se conjugan con las micotoxinas dando lugar a metabolitos atóxicos que se eliminan por bilis y orina.
- Métodos físicos: como las radiaciones con rayos X o los tratamientos con calor, que rompen las moléculas de las micotoxinas.
- Métodos microbiológicos: ya que diferentes bacterias y hongos presentan la capacidad de modificar la estructura de las micotoxinas y así evitar sus efectos perjudiciales.
- Métodos químicos: como insecticidas, solventes o agentes químicos reactivos como ácidos, agentes oxidantes, carbón activo o silicatos de aluminio, entre otros.

Sin embargo, todos estos tratamientos que tienen como objetivo la eliminación de las micotoxinas ya presentes sobre el cereal presentan normalmente inconvenientes. Por ejemplo, los métodos térmicos resultan poco eficaces ya que las altas temperaturas afectan a las vitaminas y proteínas del alimento, y muchos de los métodos químicos se considera que son poco seguros para la salud pública. De todos los métodos de detoxificación expuestos anteriormente, los más empleados actualmente son los silicatos, ya que a diferencia de otros métodos no crean problemas de residuos, no

modifican las características organolépticas del producto, no producen reacciones parciales ni crean metabolitos tóxicos y no tienen un precio demasiado elevado (Borrell y Gimeno, 2003).

Es especialmente aconsejable la detección temprana de las especies micotoxigénicas de *Fusarium*. Para ello, se requieren métodos que permitan la identificación del material contaminado, con el fin de tomar medidas que eviten que ese producto contaminado pase a la cadena alimentaria o que pueda contaminar otros productos o cultivos. Los métodos más utilizados en un principio para este fin eran químicos o inmunológicos, orientados a la búsqueda de una micotoxina en particular. Sin embargo, los métodos de diagnóstico basados en el DNA de determinadas especies de *Fusarium* que se vienen desarrollando en los últimos años son mucho más eficaces y rápidos (Patiño *et al.*, 2004; Jurado *et al.*, 2005; 2006; Marín, 2010). Además, los estudios detallados sobre las especies de *Fusarium* contaminantes, que incluyan su caracterización filogenética y el estudio de los factores ecofisiológicos que determinan su crecimiento y producción de micotoxinas, aporta una información muy valiosa para poder elaborar estrategias de prevención y control adecuadas a estas especies durante la fase de campo y de almacenamiento del grano.

1.5. Análisis del cambio climático

De acuerdo a la opinión de un consenso general, el clima global está cambiando. En los últimos años, este tema ha adquirido una especial relevancia, y cada vez recibe mayor atención tanto por parte de la comunidad científica y política, como de la población en general. La Convención de las Naciones Unidas por el Cambio Climático lo define como un “cambio en las condiciones climatológicas atribuido directa o indirectamente a la actividad humana, que altera la composición global de la atmósfera y cuyos efectos se observan en el tiempo”. Además, esta Convención definió los efectos adversos del cambio climático como “cambios que presentan efectos negativos en los ecosistemas, en los sistemas socio-económicos y en el bienestar humano y animal” (Naciones Unidas, 1994). El Cuarto Informe del Panel Internacional de las Naciones Unidas por el Cambio Climático (*UN International Panel on Climate Change (IPCC)*), publicado en noviembre de 2007 (Bernstein *et al.*, 2007; Solomon *et al.*, 2007), resalta

que el clima global está cambiando más rápidamente en los últimos años, y destaca algunos efectos inminentes como el aumento global de las temperaturas y del nivel del mar, o cambios en la frecuencia y distribución de las precipitaciones (Miraglia *et al.*, 2009).

En 2007, la Comisión Europea publicó su libro verde sobre el cambio climático en Europa. En su anexo, aparecen las condiciones esperadas debidas al cambio climático en este continente, en un escenario en el que no se lleva a cabo ninguna acción para reducir los efectos de los gases invernadero. Esta predicción resultó en un aumento global de la temperatura media de aproximadamente 3,4°C, previsto para el final del presente siglo. Más concretamente, en el sur y sureste de Europa (áreas de España, Portugal, sur de Francia, Italia, Eslovenia, Grecia, Malta, Chipre, Bulgaria y el sur de Rumanía), se prevé un aumento de la temperatura media anual de 4-5°C. Además, la disponibilidad de agua en estas zonas será menor, particularmente en verano. Estos dos efectos podrían conllevar una disminución en el número de campos de cultivo (del 10-30% en muchas regiones del sur), sequías, olas de calor, degradación del suelo y los ecosistemas, y finalmente, la desertización de ciertas zonas. Además, el aumento de precipitaciones violentas podría aumentar la erosión y ocasionar la pérdida de materia orgánica del suelo (Comisión Europea, 2007).

Bajo estos escenarios previstos, se pronostica que más de la mitad de las especies vegetales estarán bajo algún tipo de riesgo. El sistema agrícola será de los más afectados, junto con el sistema marítimo y la producción ganadera. Los cambios en el clima llevarán consigo una probable modificación de la distribución de plantas cultivadas: mientras que el área disponible para el cultivo crecerá en el norte de Europa, en el sur ocurrirá lo contrario, debido a la falta de agua y los episodios frecuentes de temperaturas extremas (Maracchi *et al.*, 2005; Messerli *et al.*, 2000; Olesen y Bindi, 2002). Además de los problemas que esto conllevaría a nivel económico, la FAO también ha expresado su preocupación por el impacto del cambio climático sobre la seguridad alimentaria (FAO, 2008). En dicho informe se afirma la incertidumbre sobre estas posibles implicaciones, y se expone la necesidad de dirigir la atención al tema de la seguridad alimentaria para reaccionar de una manera adecuada en caso necesario. En este contexto, países tales como Italia han llevado a cabo estudios en estos campos en

colaboración con la OMS (WHO, 2007). Estos estudios reconocen la influencia directa e indirecta del cambio climático sobre la distribución de hongos y sus toxinas.

Los hongos toxígenos son cosmopolitas en la naturaleza y, como ya se ha comentado, aparecen frecuentemente contaminando diversos productos agrícolas, entre ellos los cereales (Murphy *et al.*, 2006). La habilidad de estos hongos para crecer y producir micotoxinas está profundamente relacionada con la influencia de los factores ambientales, especialmente de la temperatura y el estrés hídrico. Cambios en estas condiciones ambientales pueden provocar un aumento en la presencia de estos hongos: por ejemplo, lluvia intensa durante el período de floración de los cereales puede provocar una mayor dispersión de los inóculos fúngicos hacia otras partes de la planta u otras plantas (Jenkinson y Parry, 1994).

Más concretamente hablando de las especies de *Fusarium*, algunas de ellas se ven favorecidas por temperaturas más cálidas. En general, las especies de *Fusarium* presentan gran resistencia a condiciones de elevado estrés hídrico y elevada temperatura, y por tanto son altamente competitivas en el marco del cambio climático global. Sin embargo, cuando en un hospedador coexisten dos o más especies de *Fusarium*, la dominancia de una de ellas está determinada por las condiciones ambientales (Bunyavanich *et al.*, 2003). De esta manera, un cambio en estas condiciones puede desplazar ciertas especies o cambiar su frecuencia de aparición o dominancia, alterando cualitativa y cuantitativamente la microbiota presente en los cultivos agrícolas y, en consecuencia, sus interacciones, afectando así al tipo y niveles de micotoxinas presentes en los productos cosechados.

En este marco, se han planteado nuevos retos en seguridad y calidad alimentaria relacionados con hongos y micotoxinas en alimentos. Recientemente, las instituciones europeas competentes (EFSA, OMS) han alertado a la comunidad científica sobre la necesidad de nuevas investigaciones para conocer la identidad, incidencia, distribución, prevención y control sostenible de los hongos y micotoxinas más frecuentes en cereales. Estudios predictivos relacionados con el cambio climático sitúan a España como zona de riesgo en materia de hongos y micotoxinas en estos cultivos. Muchos de los conocimientos que se tenían hasta la fecha han quedado obsoletos, por lo que estudios que puedan actualizar estas informaciones son importantes a nivel europeo y mundial.

Partiendo de este marco, este trabajo se centra en el estudio y caracterización de tres de las especies de *Fusarium* más importantes por su capacidad de contaminación de cereales a nivel mundial: *F. fujikuroi*, *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, importantes patógenos de vegetales y productoras de fumonisinas. Para ello, se emplearon diferentes técnicas, entre ellas la PCR convencional, el análisis filogenético, o la RT-PCR a tiempo real. Todas estas técnicas permitieron ahondar en el conocimiento de estas tres especies y, en el caso de *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, ponerlo en relación con los factores ecofisiológicos que más afectan al crecimiento y síntesis de micotoxinas: la temperatura, el estrés hídrico y el sustrato de crecimiento. Además, se ha realizado un estudio en el que se analizó el efecto del tebuconazol, fungicida muy empleado en cultivos de cereales contra la contaminación por *Fusarium*. Los resultados se conocieron durante la realización de esta tesis. Estos señalaban la diferente respuesta de las especies fúngicas consideradas frente a dicho fungicida, así como la influencia de las condiciones ambientales sobre su eficacia y, en particular, en el contexto del cambio climático previsto. En este trabajo se incluye un trabajo similar con otro importante fungicida, el benomilo.

Todos los aspectos descritos en esta Introducción en relación a las principales especies productoras de fumonisinas del género *Fusarium* pueden considerarse clave para comprender su ecología su distribución geográfica y sus hospedadores, y la biosíntesis de sus toxinas, así como para el diseño de estrategias de reducción del riesgo que suponen para la salud humana y animal. En ese contexto se describen a continuación los objetivos concretos de esta tesis.

1.6. Objetivos

1. Identificar, caracterizar y realizar un análisis filogenético de poblaciones de *Fusarium fujikuroi* de arroz cultivado en Filipinas.
2. Obtener un protocolo de RT-PCR a tiempo real para el análisis cuantitativo de la expresión del gen *FUM1* de la biosíntesis de fumonisinas para *F. fujikuroi*.
3. Estudiar la expresión relativa del gen *FUM1* y su relación con la capacidad productora de fumonisinas en cepas de *F. fujikuroi*.
4. Estudiar la distribución de especies de *Fusarium* y otros hongos asociados a trigo blando primavera de dos regiones españolas (Córdoba y Lérída) combinando métodos microbiológicos tradicionales con métodos moleculares.
5. Evaluar el efecto de la temperatura y el estrés hídrico, a valores previstos en los escenarios de cambio climático para España, sobre el crecimiento fúngico y la biosíntesis de fumonisinas para las especies *F. verticillioides* y *F. proliferatum*.
6. Evaluar la influencia de sustratos de distintos cereales (cebada, maíz y trigo) sobre el crecimiento y la biosíntesis de fumonisinas de *F. verticillioides* y *F. proliferatum* y su interacción con los factores de temperatura y potencial hídrico.
7. Evaluar la eficacia del fungicida benomilo sobre el crecimiento y la biosíntesis de fumonisinas de *F. verticillioides* y el efecto de su interacción con los factores temperatura y potencial hídrico.

Capítulo 2

Capítulo 2. Análisis filogenético, de producción de fumonisinas y de la expresión del gen *FUM1* de cepas de *Fusarium fujikuroi* aisladas en plantaciones de arroz en Filipinas

2.1. Introducción

F. fujikuroi, Nirenberg (teleomorfo *Gibberella fujikuroi*) pertenece al complejo de especies *Gibberella fujikuroi* (O'Donnell *et al.*, 1998) y es un importante patógeno del arroz (*Oryza sativa* L.) en Asia, África, Europa y los Estados Unidos, aunque presenta también otros hospedadores como la piña o diferentes especies herbáceas e incluso se ha encontrado en piel, uña o córnea humanas (Busman *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2006; Leslie *et al.*, 2004; O'Donnell *et al.*, 2007; Stępień *et al.*, 2013). Este patógeno produce diferentes toxinas, entre ellas moniliformina, beauvericina y fumonisinas. *F. fujikuroi* causa en el arroz la enfermedad de bakanae, cuyo resultado son plantas de color amarillo pálido, hojas más delgadas y alargadas y raíces atrofiadas (figura 1). Todo esto lleva a la muerte de la planta o a la disminución de la producción de grano en un alto porcentaje, lo cual supone, en ambos casos, pérdidas económicas muy elevadas (Aoki *et al.*, 2014; Carter *et al.*, 2008; Cumagun, 2007).



Figura 1: Plantas de arroz afectadas por la enfermedad de bakanae.

1a: Comparación entre las partes aéreas de una planta enferma (izquierda) y sana (derecha) (<http://www.knowledgebank-brrri.org/>).

1b: Parte inferior del tallo y raíces de planta enferma (derecha) y sana (izquierda) (Espino, 2012).

F. fujikuroi y *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg (teleomorfo: *Gibberella intermedia*) son dos especies muy próximas genéticamente. Esta última presenta un rango de hospedadores más amplio, como por ejemplo el plátano, el espárrago, el mango, el maíz, el tabaco, el pino, el sorgo, el trigo, etc., aunque uno de sus hospedadores principales es el maíz. *F. proliferatum* está considerado altamente toxígeno, produciendo diferentes micotoxinas entre ellas beauvericina o fumonisinas. *F. proliferatum* y *F. fujikuroi* son prácticamente indistinguibles a nivel morfológico, por lo que se hace necesario aplicar estudios moleculares, filogenéticos o de cariotipo para poder identificarlas como dos especies diferentes (Leslie y Summerell, 2006). Ocasionalmente, se da el apareamiento entre ellas en el medio natural, habiéndose encontrado en campo híbridos entre las dos especies (Leslie *et al.*, 2004).

La presencia de las especies de *Fusarium*, así como la incidencia y gravedad de las enfermedades causadas por ellas, pueden variar de un año a otro en la misma región o en regiones diferentes en el mismo año, dependiendo en gran medida de las condiciones climáticas, las prácticas agrícolas o la especie hospedadora. La identificación correcta de las especies que causan la contaminación, así como el conocimiento de su estructura poblacional y su variación intraespecífica, son aspectos clave para poder predecir las toxinas que podrían estar presentes y para desarrollar estrategias de control y prevención de estos hongos. Además, la regulación de la biosíntesis de las toxinas y los factores principales implicados, fundamentalmente ambientales, contribuyen de manera importante en la determinación del riesgo potencial de una especie. Todos estos factores se encontraban poco estudiados en el caso de *F. fujikuroi*, y se disponía de pocas herramientas ya desarrolladas al comienzo de este trabajo, contando solamente con determinadas publicaciones (Amatulli *et al.*, 2010; Wulff *et al.*, 2010) hasta la publicación más reciente del análisis de su genoma (Wiemann *et al.*, 2013).

Teniendo en cuenta que el principal hospedador de esta especie fúngica es el arroz, alimento básico de la dieta de una gran parte del mundo, urge desarrollar estrategias combinadas de análisis que permitan disponer de un máximo de información en situaciones concretas. En este estudio se aplica una estrategia combinada a diferentes aislamientos de *Fusarium* de arroz cultivado en dos regiones situadas en Filipinas.

Los objetivos de este capítulo fueron:

- (1) Identificar, caracterizar y determinar 42 cepas de *Fusarium* procedentes de arroz y maíz de distintas localizaciones de Filipinas. Para ello se emplearon técnicas de PCR convencional y secuenciación parcial del gen *EF-1 α* .
- (2) Realizar el análisis filogenético de las cepas aisladas de arroz que resultaron pertenecientes a la especie *F. fujikuroi*, determinar su estructura poblacional y el idiomorfo de apareamiento de las mismas.
- (3) Estudiar la producción de fumosinas y la cuantificación de la expresión relativa del gen *FUM1* de las cepas de *F. fujikuroi* aisladas de arroz.

2.2. Material y Métodos

2.2.1. Material biológico

Para el trabajo realizado en este capítulo se estudiaron 42 cepas de *Fusarium* procedentes de tres regiones de Filipinas: Muñoz (Nueva Écija), Victoria (Laguna) e Isabela (Figura 2). 31 cepas fueron aisladas de campos de arroz de Nueva Écija y 8 de campos de arroz de Victoria; las muestras de maíz fueron aisladas de cultivos en Victoria (2) e Isabela (1). Las muestras fueron recogidas y aisladas por el Dr. Christian J. Cumagun (Escuela de Agricultura, Universidad de Los Baños, Los Baños, Laguna, Filipinas).

Tras su aislamiento, las cepas fueron enviadas al Departamento de Genética de la UCM, donde se sembraron en medio agar dextrosa patata (PDA, Scharlau Chemie, Barcelona, España) suplementado con cloranfenicol al 0,5%. Las placas se incubaron a una temperatura de 25°C durante 5-7 días hasta obtener un cultivo de *Fusarium* de cada muestra. Los cultivos se conservan en papel de filtro a 4°C en la Universidad de Los Baños (Filipinas) y a -80°C como suspensión de esporas en glicerol al 15% en el Departamento de Genética de la Facultad de Biología de la UCM. El conjunto de las cepas estudiadas aparecen posteriormente en la tabla 4.

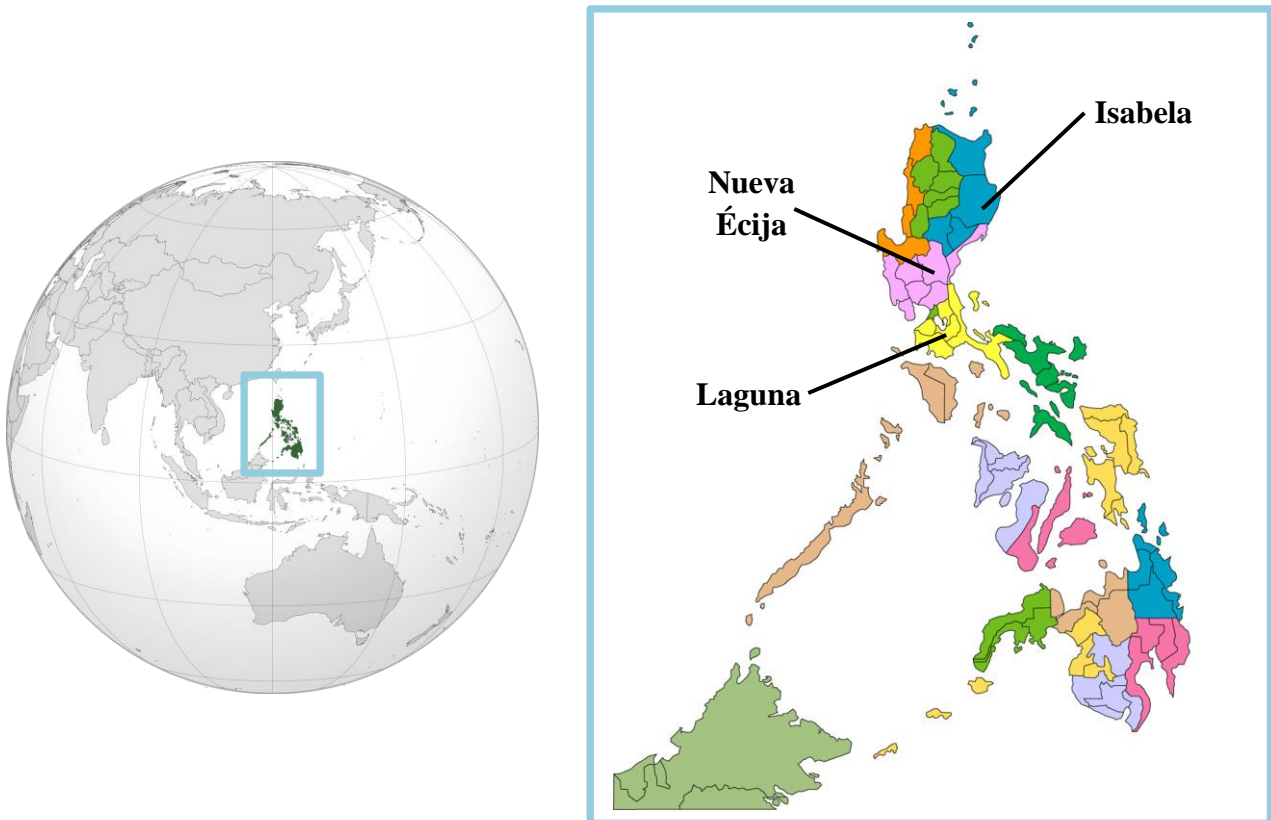


Figura 2: Localización geográfica de Filipinas. Se indican las regiones de muestreo para este estudio.

2.2.2. Extracción de DNA. Identificación de género y tipo de apareamiento por PCR convencional

Para la extracción del DNA genómico de las 42 cepas cultivadas se utilizó el *kit* de extracción DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se tomaron cuatro discos de micelio de los cultivos previamente incubados durante 5 días. La cuantificación del DNA extraído se realizó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop® ND1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, Delaware, EEUU).

En primer lugar se llevó a cabo una PCR convencional con el objetivo de comprobar que todas las cepas pertenecían al género *Fusarium*. Para ello se amplificó la secuencia parcial de la región intergénica espaciadora del rDNA (IGS), que presenta un tamaño de alrededor de 200 pb. Los cebadores utilizados fueron Fps-F y FUS-R, descritos previamente en Jurado *et al.*, 2006 (tabla 1). El programa de amplificación

consta de un paso previo de desnaturalización a 94°C durante 85 segundos, seguido de 25 ciclos de amplificación, siendo cada ciclo de 35 segundos a 95°C, 30 segundos a 67°C y 30 segundos a 72°C. Por último, tras los 25 ciclos, un ciclo final de extensión de 5 minutos a 72°C y parada a 4°C.

Una vez confirmada la pertenencia de todas las cepas al género *Fusarium*, se llevó a cabo la identificación de los tipos de apareamiento de cada cepa, clasificándolas así por su tipo de apareamiento en *MAT-1* y/o *MAT-2*. Esto se realizó mediante el método propuesto por Kerényi *et al.*, (2002), empleando los cebadores GfMAT1-F y GfMAT1-R (tabla 1) para el idiomorfo *MAT-1* (300 pb) y GfMAT2-F y GfMAT2-R (tabla 1) para el idiomorfo *MAT-2* (200 pb). En este caso, el programa de amplificación consistió en 85 segundos a 94°C para una desnaturalización previa seguida de 30 ciclos de amplificación, consistente cada uno en: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 66°C y 45 segundos a 72°C. Para finalizar, 5 minutos a 72°C y parada a 4°C.

PCR	Cebador	Secuencia (5'-3')
Género <i>Fusarium</i>	Fps-F	CGCACGTATAGATGGACAAG
	FUS-R	GGCGAAGGACGGCTTAC
Idiomorfo <i>MAT-1</i>	GfMAT1-F	GACCAACTCAAACCTCGTGGCG
	GfMAT1-R	TCATCAAAGGGCAAGCGATACC
Idiomorfo <i>MAT-2</i>	GfMAT2-F	ACCGTAAGGAGCGTCACCATT
	GfMAT2-R	GGGGTACTGTTCGGCGATGTT
Gen del factor de elongación <i>EF-1α</i>	EF1T	ATGGGTAAGGAGGACAAGAC
	EF2T	GGAAGTACCAGTGATCATGTT

Tabla 1: Secuencias de los cebadores utilizados en las reacciones de PCR convencional del presente capítulo.

En todos los casos en que se empleó la técnica de PCR convencional en este trabajo, las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen de 25 µl, que contenía 3 µl de DNA problema a una concentración de 35 ng/µl y 22 µl de la mezcla compuesta de 15,55 µl de agua miliQ, 1,25 µl de cada cebador (20 µM), 0,2 µl de la enzima Taq polimerasa (5 U/µl), 2,5 µl de tampón de PCR 10x, 1 µl de MgCl₂ (50mM) y 0,25 µl de dNTPs (100 mM) (Ecogen, Barcelona, España). Los productos

amplificados se detectaron mediante electroforesis en gel de agarosa de concentración variable según el tamaño del fragmento amplificado. Para su visualización se añadió bromuro de etidio y se utilizó un tampón 1x de 40mM tris-acetato y EDTA 1 mM.

2.2.3. Amplificación del gen *EF-1 α* y secuenciación

Para identificar las cepas del género *Fusarium* a nivel de especie se llevó a cabo la amplificación y secuenciación parcial del gen del factor de elongación *EF-1 α* , que cuenta con un tamaño aproximado de 673 pb. Para ello se utilizaron los cebadores EF1T y EF2T (O'Donnell *et al.*, 1998) (tabla 1). El programa de amplificación en este caso fue de un paso previo de desnaturalización a 95°C durante 85 segundos, seguido de 35 ciclos de amplificación, consistiendo cada uno en 35 segundos a 95°C, 55 segundos a 53°C y 60 segundos a 72°C. Por último, un paso final de 10 minutos a 72°C y parada a 8°C.

Los productos de PCR generados de esta amplificación se purificaron empleando el *kit* de limpieza UltraClean™ PCR Clean-Up™ (MoBio Laboratories Inc., Estados Unidos). Tras la purificación, se visualizaron los fragmentos en geles de agarosa al 1% y se llevó a cabo su secuenciación con ambos cebadores (EF1T y EF2T) en la Unidad de Genómica de la UCM utilizando el secuenciador ABI 3730 DNA Analyzer y el *kit* Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la corrección y limpieza de las secuencias una vez obtenidas en formato digital se empleó el programa Chromas Pro (Technelysium Pty. Ltd., Tewantin, Queensland, Australia). Para el análisis, edición y alineamiento de las secuencias por el método Clustal W, se utilizó el programa BioEdit Sequence Alignment Edition (Ibis Therapeutics, Carlsbad, California, Estados Unidos). Una vez editadas las secuencias, éstas se compararon con las disponibles en la base de datos del GenBank (NCBI), una base de datos internacional de secuencias nucleotídicas. Mediante esta comparación se pudo discernir la especie a la que pertenecía cada una de las cepas analizadas. Además, las secuencias fueron añadidas a la base de datos GenBank bajo diferentes números de acceso (*accession numbers*), los cuales aparecen en la tabla 4.

2.2.4. Análisis filogenético

Utilizando la secuencia parcial del gen *EF-1α* del factor de elongación, se realizaron los estudios filogenéticos. Las cepas de *Fusarium* empleadas para este análisis se indican en las tablas 2 y 4. Además de 28 de las cepas procedentes de Filipinas (tabla 4), se incluyeron en el análisis 16 cepas de *Fusarium* relacionadas filogenéticamente con *F. fujikuroi*: dos cepas de *F. fujikuroi* de distinto origen geográfico y 14 cepas representativas de *F. proliferatum* (tabla 2). Además, se utilizó como elemento fuera de grupo (*outgroup*) una cepa de *F. graminearum* (tabla 2).

Cepa	Especie	Hospedador	Procedencia	MAT	Número de acceso
NRRL13566 ^a	<i>F. fujikuroi</i>	<i>Oryza sativa</i>	Taiwan (Japón)	N.D.	AF160279
NRRL43470 ^b	<i>F. fujikuroi</i>	Córnea humana	EEUU	N.D.	DQ790494
MPD 4853 ^c	<i>F. proliferatum</i>	-	-	1	AM397476
ITEM4291 ^c	<i>F. proliferatum</i>	<i>Phoenix reclinata</i>	Alicante (España)	N.D.	AM404134
Fp10 ^c	<i>F. proliferatum</i>	<i>Triticum aestivum</i>	Norte de Francia	1	AM397460
ITEM4306 ^c	<i>F. proliferatum</i>	<i>Washingtonia</i>	Tarragona (España)	2	AM404128
FpB15 ^c	<i>F. proliferatum</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	Burgos (España)	2	AM397471
FpB21 ^c	<i>F. proliferatum</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	Burgos (España)	1	AM397470
ITEM 1682 ^c	<i>F. proliferatum</i>	<i>Zea mays</i>	Canadá	N.D.	AM404121
ITEM 2343 ^c	<i>F. proliferatum</i>	<i>Phoenix dactylifera</i>	Arabia Saudí	N.D.	AM404133
Gf37 ^c	<i>F. proliferatum</i>	<i>Musa sapientum</i>	Ecuador	1	AM404115
Gf33 ^c	<i>F. proliferatum</i>	<i>Pinus sp.</i>	Madrid (España)	2	AM397477
FpC3 ^c	<i>F. proliferatum</i>	<i>Zea mays</i>	Sevilla (España)	1	AM397474
ITEM 4293 ^c	<i>F. proliferatum</i>	<i>Chamaerops humilis</i>	Alicante (España)	N.D.	AM404122
ITEM 1451 ^c	<i>F. proliferatum</i>	<i>Asparagus officinalis</i>	Montescaglioso (Italia)	1	AM404131
ITEM 1456 ^c	<i>F. proliferatum</i>	<i>Asparagus officinalis</i>	Potenza (Italia)	2	AM404129
NRRL29169 ^d	<i>F. graminearum</i>	<i>Triticum aestivum</i>	Kansas (EEUU)	N.D.	AF212461

Tabla 2. Cepas de *Fusarium* no procedentes de Filipinas empleadas en el análisis filogenético de este capítulo. Se indica especie, hospedador, procedencia, idiomorfo de apareamiento (*MAT*) y número de acceso de cada una de ellas.

N.D. No disponible.

^aDatos obtenidos de O'Donnell *et al.*, 1998.

^bDatos obtenidos de Chang *et al.*, 2006.

^cDatos obtenidos de Jurado *et al.*, 2010.

^dDatos obtenido de O'Donnell *et al.*, 2000.

El análisis filogenético y los estudios de divergencia nucleotídica se llevaron a cabo utilizando el programa PAUP (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*) v. 4.0 b10 (Swofford, 2003). Los espacios se trataron como datos desconocidos y fueron excluidos de los análisis. Se utilizó la opción de búsqueda heurística de PAUP con 1.000 réplicas aleatorias de secuencia aditiva (*random addition sequence replicates*), utilizando la

permutación de ramas tipo TBR (*tree bisection and reconnection*, bisección y reconexión de árboles) para identificar todos los árboles con la misma parsimonia, realizando finalmente un árbol consenso. La estabilidad de cada nodo se aseguró mediante análisis heurísticos de *bootstrap*, los cuales se llevaron a cabo con 1.000 réplicas (Hillis y Bull, 1993).

2.2.5. Análisis de producción de fumonisinas

En la tabla 4 aparecen, identificadas con el número 2, las cepas en las cuales se determinó la capacidad para producir fumonisina B₁ mediante un método basado en el ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas). Las cepas utilizadas se cultivaron por duplicado en matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml de medio de cultivo líquido inductor de fumonisinas (López-Errasquín *et al.*, 2007). Además, el aislamiento 17b se cultivó también en medio líquido Sabouraud (Scharlau Chemie, España) para ser empleada como control, un medio no inductor de fumonisinas, en las mismas condiciones que el resto de las cepas.

Cada matraz se inoculó con 1 ml de solución a una concentración de 10⁶ esporas/ml en agua destilada, obtenidas a partir de placas cultivadas en PDA durante 7 días. Los cultivos se incubaron a 20°C durante 7 días, tras los cuales se recogió el micelio mediante filtración al vacío con papel Whatman n°1 (Whatman International Ltd, Maidstone, Reino Unido). El micelio obtenido tras la filtración se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a -80°C para la posterior extracción de RNA (ver apartado 2.2.6). El líquido resultante de la filtración se recogió y se empleó para analizar el contenido de FB₁ por ELISA, utilizando el método comercial RIDASCREEN® (RIDASCREEN® Fumonisin, R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemania) siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante. De acuerdo con éste, los límites de detección del análisis están comprendidos entre 0,025 y 2 ppm, siendo el nivel de recuperación de aproximadamente el 60%, con una media del coeficiente de variación de aproximadamente el 8%.

2.2.6. Extracción del RNA total

Para medir la expresión del gen *FUM1* mediante RT-PCR a tiempo real, se llevó a cabo la extracción del RNA a partir del micelio resultante tras el filtrado de los cultivos en medio líquido inductor o en medio Sabouraud (Scharlau Chemie, España) y

que se hallaba en conservación a -80°C (ver apartado anterior 2.2.5). Para la extracción, se trituró el micelio enfriándolo con nitrógeno líquido, y una vez obtenido un fino polvo se utilizó como punto de partida para el *kit* Total Quick RNA Cells and Tissues (Talento, Trieste, Italia), de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante. Una vez extraído el RNA se conservó a -80°C . La concentración de RNA fue medida utilizando el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, Estados Unidos) y 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 40mM y EDTA 1mM) y bromuro de etidio ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) a una concentración de $1\mu\text{l}/20\text{ml}$. Toda el agua utilizada para elaborar los tampones se trató con DEPC durante 24 horas a 37°C , a una concentración de 1ml/L de agua destilada 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 $1\mu\text{g}$ de muestra. 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 empleado fue el Ladder Plus de 100 pb (Fermentas, Lituania).

Para eliminar la posible contaminación por DNA genómico de las muestras, el RNA total se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente con la DNasa Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Invitrogen, Gran Bretaña) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2.7. Síntesis de cDNA

Las reacciones de transcripción inversa se llevaron a cabo utilizando el kit GenAmp Gold RNA PCR reagent kit (Applied Biosystems, Estados Unidos) a partir de 500 ng de RNA total libre de DNA genómico. Cada mezcla de reacción contenía $10\mu\text{l}$ del tampón de reacción de RT-PCR 5x, $0,5\mu\text{l}$ de oligo(dT)₁₆ ($50\mu\text{M}$), $2\mu\text{l}$ de MgCl_2 (25mM), $2\mu\text{l}$ de la solución de deoxinucleótidos trifosfato (dNTP) (10mM), $2\mu\text{l}$ de ditioneitol (DTT) (100mM), $0,5\mu\text{l}$ (10U) de inhibidor de la RNasa ($20\text{U}/\mu\text{l}$), $0,3\mu\text{l}$ (15U) de la transcriptasa inversa Multiscribe ($50\text{U}/\mu\text{l}$) y agua DEPC en un volumen final de reacción de $20\mu\text{l}$. La síntesis de cDNA se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf, Alemania) y el programa de la transcripción inversa consistió en un primer ciclo de 10 minutos a 25°C (hibridación), un ciclo de 12 minutos

a 42°C (transcripción inversa) y parada a 4°C. Tras el proceso de síntesis del cDNA, éste se guardó a -80°C. Se realizaron también controles negativos a los que no se añadió la enzima transcriptasa inversa.

2.2.8. RT-PCR a tiempo real

El método de RT-PCR a tiempo real se utilizó para amplificar el gen *FUM1*, así como el gen constitutivo *TUB2* de la β -tubulina, gen de control endógeno de expresión constitutiva empleado para normalizar los resultados, ambos a la vez en la misma placa de reacción. Se realizaron amplificaciones de estos dos genes en cada muestra de cDNA obtenida de las distintas cepas de *F. fujikuroi*. Además, para asegurar que las amplificaciones provenían del cDNA y no de restos de DNA genómico no eliminado por el tratamiento con DNasa I, se llevaron a cabo reacciones de PCR control en las que se amplificaron las mezclas de reacción utilizadas para la extracción de cDNA a las que no se le había añadido la enzima transcriptasa inversa.

Para la amplificación de los genes seleccionados se emplearon dos parejas de cebadores específicos descritas previamente por Jurado *et al.* (2010): PQTUBF-2 y PQTUBR-2 para la amplificación del gen *TUB2*, y FUM1P2-F y FUM1P2-R para la amplificación del gen *FUM1* (tabla 3).

Gen Amplificado	Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')
<i>FUM1</i>	FUM1P2-F	CCCCCATCATCCCGAGTAT
	FUM1P2-R	TGGGTCCGATAGTGATTTGTCA
<i>TUB2</i>	PQTUB-F2	ACATCCAGACAGCCCTTTGTG
	PQTUB-R2	AGTTTCCGATGAAGGTCGAAGA

Tabla 3: Secuencias de los cebadores utilizados en las reacciones de amplificación de RT-PCR a tiempo real en *F. fujikuroi*.

Los cebadores FUM1P2-F y FUM1P2-R (tabla 3), empleados para la amplificación del gen *FUM1*, fueron diseñados por Jurado *et al.* (2010) para la especie *Fusarium proliferatum*. Por tanto, para su uso con las cepas de *F. fujikuroi*, se confirmó previamente mediante PCR convencional su amplificación positiva del fragmento correcto de la secuencia parcial del gen *FUM1* en cada una de las cepas de esta especie,

la cual confirma la validez de los cebadores para su uso en *F. fujikuroi* (figura 3). El programa de amplificación de esta PCR convencional consistió en un paso previo de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificación, cada uno de 35 segundos a 94°C, 30 segundos a 64°C y 30 segundos a 72°C, seguidos de un paso final de 10 minutos a 72°C y parada a 4°C.

Aunque el uso de estos cebadores en PCR convencional puede ser de utilidad a la hora de detectar la presencia de este gen de la biosíntesis de fumonisinas en cepas de esta especie, la RT-PCR a tiempo real permite también la confirmación de la funcionalidad de este gen, siendo además un método mucho más sensible que la PCR convencional.

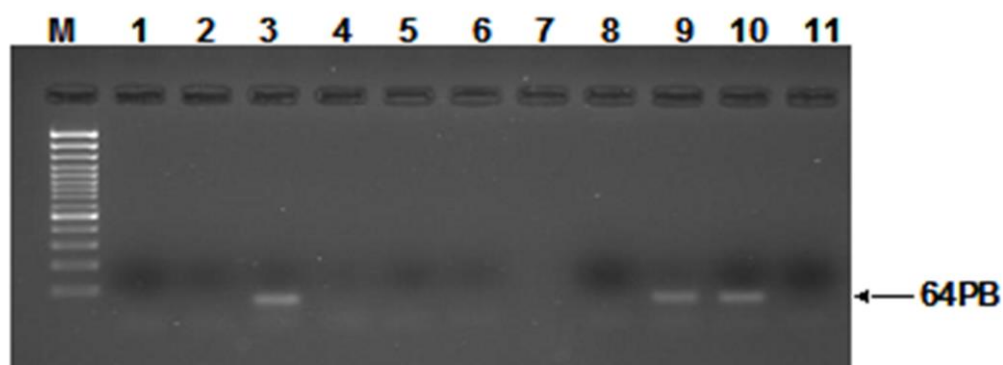


Figura 3: Amplificación por PCR convencional de diferentes cepas de *Fusarium*, utilizando los cebadores FUM1P2-F y FUM1P2-R.

1: *F. verticillioides* (ITEM 0999); **2:** *F. sacchari* (ITEM 3852); **3:** *F. fujikuroi* (ITEM 1993); **4:** *F. subglutinans* (ITEM 2192); **5:** *F. thapsinum* (ITEM 4094); **6:** *F. nygamai* (ITEM 05112); **7:** *F. circinatum*; **8:** *F. verticillioides* (cepa Gf15, no productora de fumonisinas); **9:** *F. globosum* (ITEM 6013); **10:** *F. proliferatum* (ITEM 4853); **11:** control negativo sin DNA; **M:** marcador molecular.

Tanto el protocolo como las condiciones para la RT-PCR a tiempo real fueron descritas previamente en Jurado *et al.* (2008, 2010) y Marín *et al.* (2010b). Se empleó la mezcla “SYBR® Green PCR Master Mix” de Applied Biosystems (Estados Unidos), la cual incluye, en las cantidades adecuadas, la enzima “AmpliTaq Gold® DNA Polymerase”, dNTPs, MgCl₂ y tampón de PCR, e incorpora el colorante SYBR Green I (Wittwer *et al.*, 1997). Este colorante detecta DNA de doble hélice, se intercala en éste y genera una señal fluorescente cuando la muestra es excitada por una fuente de luz. Las muestras se amplificaron por duplicado en una placa para reacciones ópticas de 96 pocillos (Applied Biosystems, Estados Unidos). Cada reacción se llevó a cabo en un

volumen de 10 μl que contenía 5 μl de la mezcla maestra SYBR® Green PCR Master Mix, 1,3 μl de agua Mili-Q estéril, 0,6 μl de cada cebador a 5 μM (siendo su concentración final de 300nM) y 2,5 μl de cDNA. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador a tiempo real ABIPRISM 7700 HT (Applied Biosystems, Estados Unidos) en la Unidad de Genómica de la UCM, siendo las condiciones térmicas utilizadas para la amplificación de los dos genes de un ciclo inicial de 10 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Para todas las muestras se incluyeron controles negativos sin cDNA, con el fin de descartar posibles contaminaciones por DNA genómico. Estos controles se procesaron de la misma manera que el resto de las muestras.

Para determinar si existía amplificación o no del gen *FUM1*, se utilizó en este estudio el método de cuantificación relativa de los niveles de expresión del gen problema (*FUM1*) respecto del gen de control endógeno o constitutivo (*TUB2*), también llamado método del $\Delta\Delta C_T$ (Ginzinger, 2002; User Bulletin N°2), método descrito previamente por Lopez-Errasquín (2005). En el análisis de resultados de la 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. Los valores de C_T del gen *TUB2* obtenidos para cada muestra se restan de la media de los valores C_T del gen problema *FUM1* de cada muestra, obteniendo así los valores ΔC_T , uno para cada muestra. Al restar a estos valores ΔC_T el valor de un calibrador (en este caso la cepa 17b en medio Sabouraud (Scharlau Chemie, España)), se obtienen los valores $\Delta\Delta C_T$ correspondientes, siendo estos los niveles relativos de expresión, que son expresados como $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

Si bien en este capítulo de la memoria los valores se interpretaron solamente como expresión/no expresión del gen *FUM1* (considerándose expresión cuando los valores fueron mayores a los del control 17b en medio Sabouraud), en los apartados 3.2.6 y 3.2.7 del siguiente capítulo se analiza más detalladamente este método de análisis de la RT-PCR a tiempo real.

2.3. Resultados

2.3.1. Identificación de especies e idiomorfos de apareamiento

En la tabla 4 aparecen los resultados de la caracterización específica de las 42 cepas estudiadas en este capítulo, obtenidos mediante la amplificación y secuenciación parcial del gen del factor de elongación *EF-1 α* (~673pb). Como puede observarse, 32 de las 39 cepas procedentes de arroz pertenecían a la especie *F. fujikuroi*, encontrándose además dos cepas de *F. proliferatum*, tres de *F. equiseti*, una de *F. subglutinans* y una de *F. oxysporum*. En la figura 4a aparecen representados los porcentajes de las diferentes especies de *Fusarium* encontradas en las muestras de arroz de Filipinas. Además se observaron diferencias a nivel geográfico, representadas en la figura 4b, ya que la presencia de *F. fujikuroi* en las muestras procedentes de la provincia de Nueva Écija fue mucho mayor que la presencia de esta especie en las muestras procedentes de la provincia de Laguna (93,4% y 33,3% respectivamente). Respecto a las cepas aisladas de maíz, todas ellas fueron identificadas como *F. verticillioides*.

También en la tabla 1 aparecen reflejados los resultados del análisis del tipo de apareamiento de cada una de las cepas, realizados por PCR convencional mediante la identificación de los idiomorfos *MAT-1* ó *MAT-2*. En las cepas de la especie *F. fujikuroi* aparecen representados los dos tipos de apareamiento, siendo más frecuente el idiomorfo *MAT-2* con una proporción *MAT-1*:*MAT-2* de 10:21 (una de las cepas presentó los dos idiomorfos de apareamiento). También en las cepas de *F. proliferatum* y *F. verticillioides* encontramos estas diferencias en la frecuencia, siendo sus proporciones *MAT-1*:*MAT-2* de 0:2 y 0:3 respectivamente. Las cepas de *F. subglutinans*, *F. oxysporum* y *F. equiseti* determinadas también presentaron el idiomorfo *MAT-2*.

Cepa	Especie	Hospedador	Procedencia	MAT	Número de Acceso
2a ^{1,2}	<i>F. fujikuroi</i>	Arroz	Muñoz, Nueva Écija	2	JF699624
2b ^{1,2}	<i>F. fujikuroi</i>	Arroz	Muñoz, Nueva Écija	2	JF699624
3a ¹	<i>F. fujikuroi</i>	Arroz	Muñoz, Nueva Écija	2	JF699624
3b	<i>F. fujikuroi</i>	Arroz	Muñoz, Nueva Écija	2	-
4a ¹	<i>F. fujikuroi</i>	Arroz	Muñoz, Nueva Écija	2	JF699612
4b ¹	<i>F. fujikuroi</i>	Arroz	Muñoz, Nueva Écija	2	JF699624
5a ²	<i>F. fujikuroi</i>	Arroz	Muñoz, Nueva Écija	1	JF699613
5b ^{1,2}	<i>F. fujikuroi</i>	Arroz	Muñoz, Nueva Écija	1	JF699623
6a ^{1,2}	<i>F. fujikuroi</i>	Arroz	Muñoz, Nueva Écija	2	JF699624
6b ^{1,2}	<i>F. fujikuroi</i>	Arroz	Muñoz, Nueva Écija	2	JF699624
7a ¹	<i>F. fujikuroi</i>	Arroz	Muñoz, Nueva Écija	1	JF699611
7b ²	<i>F. fujikuroi</i>	Arroz	Muñoz, Nueva Écija	1	JF699617
8a ^{1,2}	<i>F. fujikuroi</i>	Arroz	Muñoz, Nueva Écija	2	JF699618
8b ¹	<i>F. fujikuroi</i>	Arroz	Muñoz, Nueva Écija	1+2	JF699616
9a ¹	<i>F. fujikuroi</i>	Arroz	Muñoz, Nueva Écija	2	JF699624
9b ¹	<i>F. fujikuroi</i>	Arroz	Muñoz, Nueva Écija	2	JF699615
10a ^{1,2}	<i>F. fujikuroi</i>	Arroz	Muñoz, Nueva Écija	2	JF699624
10b ¹	<i>F. fujikuroi</i>	Arroz	Muñoz, Nueva Écija	2	JF699611
11a ^{1,2}	<i>F. fujikuroi</i>	Arroz	Muñoz, Nueva Écija	1	JF699624
13a ¹	<i>F. proliferatum</i>	Arroz	Muñoz, Nueva Écija	2	-
13b	<i>F. proliferatum</i>	Arroz	Muñoz, Nueva Écija	2	-
14a ²	<i>F. fujikuroi</i>	Arroz	Muñoz, Nueva Écija	2	JF699614
14b ¹	<i>F. fujikuroi</i>	Arroz	Muñoz, Nueva Écija	2	JF699624
17a ^{1,2}	<i>F. fujikuroi</i>	Arroz	Muñoz, Nueva Écija	2	JF699624
17b ^{1,2}	<i>F. fujikuroi</i>	Arroz	Muñoz, Nueva Écija	1	JF699624
19a ^{1,2}	<i>F. fujikuroi</i>	Arroz	Muñoz, Nueva Écija	1	JF699624
19b ^{1,2}	<i>F. fujikuroi</i>	Arroz	Muñoz, Nueva Écija	1	JF699624
20a ¹	<i>F. fujikuroi</i>	Arroz	Muñoz, Nueva Écija	2	JF699624
20b ¹	<i>F. fujikuroi</i>	Arroz	Muñoz, Nueva Écija	2	JF699624
21a ¹	<i>F. fujikuroi</i>	Arroz	Muñoz, Nueva Écija	2	JF699621
21b ²	<i>F. fujikuroi</i>	Arroz	Muñoz, Nueva Écija	2	JF699624
Va1 ¹	<i>F. fujikuroi</i>	Arroz	Victoria, Laguna	2	JF699620
Va2 ¹	<i>F. fujikuroi</i>	Arroz	Victoria, Laguna	1	JF699619
Va3 ^{1,2}	<i>F. fujikuroi</i>	Arroz	Victoria, Laguna	1	JF699624
Vb1	<i>F. subglutinans</i>	Arroz	Victoria, Laguna	2	-
Vb3	<i>F. oxysporum</i>	Arroz	Victoria, Laguna	2	-
La1	<i>F. equiseti</i>	Arroz	Victoria, Laguna	N.D.	-
Lb2	<i>F. equiseti</i>	Arroz	Victoria, Laguna	2	-
Lb4	<i>F. equiseti</i>	Arroz	Victoria, Laguna	N.D.	-
8.3	<i>F. verticillioides</i>	Maíz	Victoria, Laguna	2	-
IC6-Cat	<i>F. verticillioides</i>	Maíz	Isabela	2	-
IRR1-Lag	<i>F. verticillioides</i>	Maíz	Victoria, Laguna	2	-

Tabla 4. Cepas de *Fusarium* procedentes de Filipinas estudiadas en este capítulo. Se indica especie, hospedador, procedencia e idiomorfo de apareamiento (MAT) de cada una de ellas. Tanto la especie como el idiomorfo MAT han sido determinados en este trabajo. Además aparece el número de acceso de la base de datos GenBank de cada cepa (Cruz *et al.*, 2013).

¹ Cepas empleadas en el posterior análisis filogenético.

² Cepas empleadas para el posterior análisis de expresión del gen *FUM1*.

N.D. No determinado.

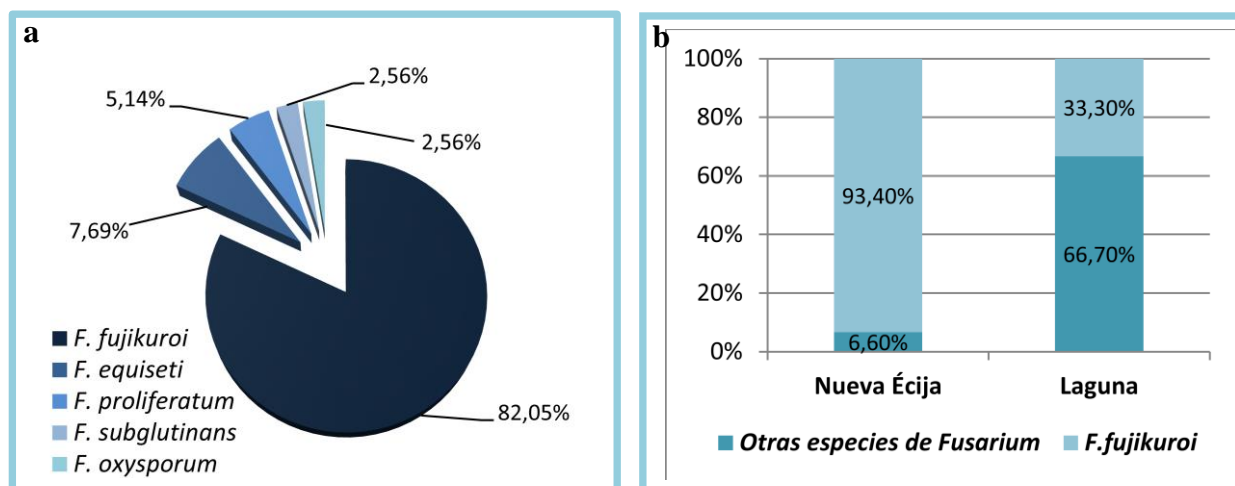


Figura 4: Presencia y distribución de las especies de *Fusarium* en las muestras de arroz procedentes de Filipinas.

4a: Gráfico de porcentajes de presencia de las diferentes especies de *Fusarium* en el total de las muestras.

4b: Se expresa en porcentajes la presencia de *F. fujikuroi* frente al resto de especies de *Fusarium* encontradas en las dos localizaciones mayoritariamente analizadas.

2.3.2. Análisis filogenético

En la figura 5 aparece el dendrograma obtenido mediante el análisis filogenético de las secuencias parciales del gen *EF-1 α* realizado con los criterios de máxima parsimonia. La secuencia tiene un total de 673 pb. Dicho dendrograma presenta dos grupos principales. El primero, representado en la parte superior del árbol, incluye todas las cepas de *F. fujikuroi*, tanto las procedentes de Filipinas, agrupadas en un subgrupo, así como las de distinto origen y hospedador, aunque éstas dos un poco más alejadas (tablas 1 y 3, figura 5). Las 27 cepas procedentes de Filipinas presentan muy baja variabilidad, aunque no podemos asegurar que no sean individuos diferentes, ya que muchas de ellas presentan diferencias en sus secuencias y tipos de apareamiento.

El segundo grupo, representado en la parte inferior del dendrograma, lo componen las cepas de la especie *F. proliferatum*, las cuales presentan mayor variabilidad dentro del grupo. En este grupo de cepas también existe mayor variabilidad de orígenes geográficos y hospedadores de procedencia. La cepa 13a, procedente de arroz de Filipinas se encuentra entre ellas.

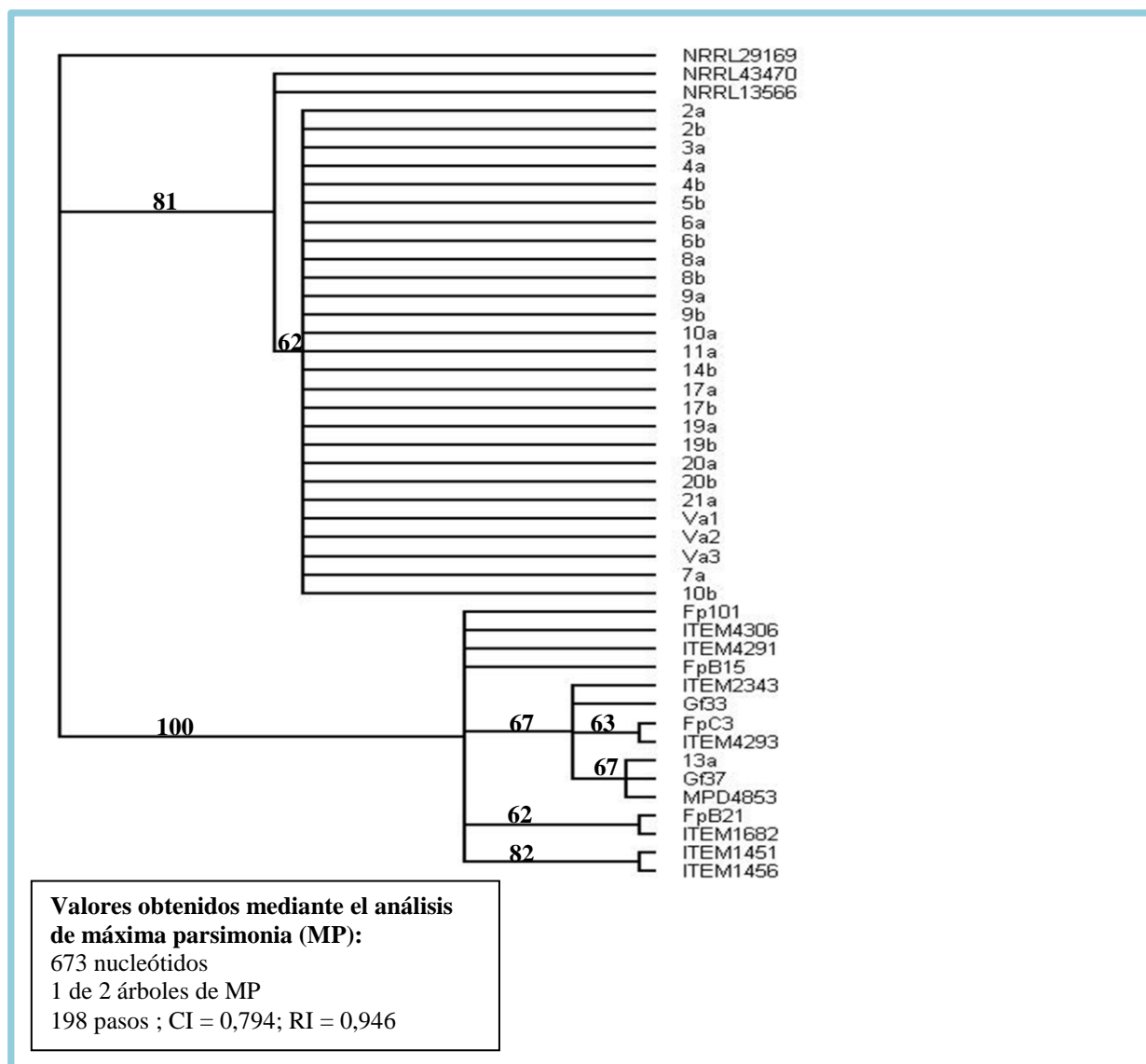


Figura 5: Dendrograma que muestra el árbol consenso obtenido por el método de máxima parsimonia del gen *EF-1a* para 45 cepas (tablas 2 y 4), utilizando el programa PAUP. Sólo se representan los valores de *bootstrap* mayores del 50%.

2.3.3. Análisis de la producción de fumonisinas de cepas de *F. fujikuroi* y detección de la expresión del gen *FUM1* por RT-PCR a tiempo real

Los datos obtenidos de los ensayos de ELISA realizados para detectar producción de fumonisina B₁ a partir del fluido extracelular de cultivos de todas las cepas de la especie *F. fujikuroi* procedentes de Filipinas incubados durante 7 días aparecen en la tabla 5. 13 de las 32 cepas de *F. fujikuroi* resultaron ser productoras de FB₁, lo cual supone un porcentaje de cepas productoras del 40,62%. Los valores de producción obtenidos varían desde 0,386 ppm a 223,83 ppm.

Cepa	Presencia del gen <i>FUMI</i> ¹	Producción de FB ₁ (ppm)	Expresión del gen <i>FUMI</i> ²
2a	+	223,830	+
2b	+	N.D.	+
3a	+	N.D.	N.A.
3b	+	N.D.	N.A.
4a	+	N.D.	N.A.
4b	+	N.D.	N.A.
5a	+	0,599	+
5b	+	10,700	+
6a	+	0,757	+
6b	+	N.D.	+
7a	+	N.D.	N.A.
7b	+	18,740	+
8a	+	N.D.	+
8b	+	N.D.	N.A.
9a	+	N.D.	N.A.
9b	+	N.D.	N.A.
10a	+	186,390	+
10b	+	N.D.	N.A.
11a	+	0,670	+
14a	+	0,386	+
14b	+	N.D.	N.A.
17a	+	N.D.	+
17b	+	21,515	+
19a	+	2,780	+
19b	+	17,220	+
20a	+	N.D.	N.A.
20b	+	N.D.	N.A.
21a	+	N.D.	N.A.
21b	+	0,476	+
Va1	+	N.D.	N.A.
Va2	+	N.D.	N.A.
Va3	+	17,82	+

Tabla 5: Resultados de los análisis de presencia del gen *FUMI*, producción de FB₁ y expresión relativa del gen *FUMI* de las cepas de *F. fujikuroi* procedentes de Filipinas.

¹Presencia (+)/ausencia (-)

²*FUMI* se expresa en cada caso comparado con la cepa de *F. fujikuroi* 17b cultivada en medio Sabouraud (no inductor de fumonisinas), a la cual se dio valor 1,00.

N.A.- No analizado; N.D.- No detectado

Una vez analizada la producción de FB₁ de todas las cepas de *F. fujikuroi*, aquellas que presentaron producción positiva se emplearon para el análisis de expresión relativa del gen *FUMI* mediante RT-PCR a tiempo real. Además se realizó este mismo análisis en 4 cepas con producción de fumonisinas negativa (2b, 6b, 8a y 17a), las cuales se emplearon como controles. En todas las cepas analizadas (con producción de fumonisinas) la expresión relativa del gen *FUMI* fue mayor que 1,00, siendo éste el valor dado a la cepa control (cepa 17b cultivada en medio Sabouraud, que presentó una

expresión basal de fumonisinas de 0,015 ppm) (tabla 5). Todos los valores de C_T fueron menores al valor C_T del control negativo sin cDNA.

2.4. Discusión

Como podemos observar en la tabla 4, al identificar a nivel de especie las cepas procedentes de las muestras de arroz, se vio una presencia mayoritaria de *F. fujikuroi*, alcanzando un 82,05% frente a otras especies del género *Fusarium*. Como ya se ha comentado, el arroz es el hospedador habitual de esta especie fúngica. En la figura 4a se observan los porcentajes de cada una de las especies de *Fusarium* encontradas, mientras que en la figura 4b aparecen representadas las especies según su origen geográfico, siendo mayor la presencia de *F. fujikuroi* en las muestras de Nueva Écija que en las procedentes de la provincia de Laguna (93,4% y 33,3% respectivamente).

Todas las cepas aisladas de maíz fueron identificadas como *F. verticillioides*. Como se comentará en capítulos posteriores, esta especie está mundialmente asociada a enfermedades en el maíz, en todas las fases del desarrollo de la planta, colonizando raíces, tallos, hojas y semillas, tanto sintomática como asintóticamente (Leslie y Summerell, 2006). Si bien las cepas procedentes de maíz y arroz de Filipinas estudiadas en este capítulo comparten localización geográfica, no se ha encontrado *F. verticillioides* en las muestras de arroz. Aunque la presencia de *F. verticillioides* se ha descrito en otros hospedadores aparte del maíz, este es su hospedador principal y no hay muestras de que el arroz sea una especie muy favorable a su colonización. La preferencia por un hospedador u otro es algo muy común en hongos fitopatógenos, ya que los mecanismos que funcionan con una especie pueden no ser válidos para otra, o las condiciones en las que se produce la interacción con una especie vegetal y que permiten su crecimiento y desarrollo serán diferentes entre los distintos hospedadores (van der Does y Rep, 2007).

Tras su caracterización, se encontraron cepas de los tipos de apareamiento 1 y 2, lo cual, como recogen Kerényi *et al.* (2002), sugiere la existencia de reproducción sexual. Aunque los ratios 1:1 de los dos idiomorfos son frecuentes en hongos con sistemas de reproducción sexual bien establecidos, también se encuentran otros ratios en especies sexuales, como en este caso un ratio *MAT1:MAT2* de aproximadamente 1:2,

aunque también podría deberse a un tamaño muestral estudiado pequeño (Conde-Ferrández, 2007; Waalwijk *et al.*, 2006).

El análisis filogenético reveló la existencia de dos grupos bien diferenciados, que separan las dos especies analizadas. Todas las cepas de *F. fujikuroi* aparecen en un único grupo, independientemente de su procedencia u hospedador de origen, presentando una variabilidad intraespecífica muy baja. Las cepas de *F. proliferatum* aparecen también agrupadas, aunque divididas a su vez en varios subgrupos, mostrando una variabilidad mucho mayor. La forma de agruparse de las cepas de *F. proliferatum* tampoco parece presentar relación alguna con la región geográfica o el hospedador de procedencia de estas cepas, lo cual ya se había descrito en estudios filogenéticos previos llevados a cabo con esta especie (Jurado *et al.*, 2010). La separación de las dos especies cercanas en dos grupos bien diferenciados y presentando valores altos de *bootstrap* fue también descrita previamente (Amatulli *et al.*, 2010; Wulff *et al.*, 2010). La descripción y el estudio del grado de variabilidad genética y de la estructura poblacional son muy importantes, ya que estos factores influyen de manera enorme en la respuesta que tendrá una especie frente a tratamientos de control (Jurado *et al.*, 2010). Será necesario por tanto tenerlos en cuenta a la hora de diseñar nuevas estrategias de control de especies toxígenas, como *F. fujikuroi* en este caso, así como para aumentar la eficacia de las ya establecidas.

El protocolo de detección y cuantificación de la expresión relativa del gen *FUMI* mediante RT-PCR a tiempo real utilizado se basa en el desarrollado originalmente para *F. proliferatum* (Jurado *et al.*, 2010). Con la puesta a punto de este método para la especie *F. fujikuroi* llevada a cabo en este trabajo, se obtiene una herramienta útil e importante a la hora de estudiar el gen *FUMI* en esta especie. Como se ha demostrado en estudios previos, la especie *F. fujikuroi* presenta los genes de biosíntesis de fumonisinas (González-Jaén *et al.*, 2004), y de acuerdo con esto todas las cepas estudiadas revelaron la presencia del primer gen de la ruta, el gen *FUMI*, como observamos en la tabla 4. Todas aquellas cepas en las que se detectó producción de FB₁ mostraron posteriormente la expresión relativa del gen *FUMI*. Además de ellas, presentaron expresión relativa de este gen otras cuatro cepas para las que no se detectó producción de fumonisinas. La expresión del primer gen de la ruta de biosíntesis de fumonisinas se opondría en un principio a la posterior ausencia de producción de FB₁ detectada. Sin embargo, esto puede ser debido a diferentes causas, como por ejemplo

falta de funcionalidad de otros genes de la ruta; una producción de fumonisinas muy baja, a niveles no detectables por el análisis; eficiencia baja en el transporte de la FB₁ hacia el exterior de la célula; o bien por la existencia de intermediarios de la ruta de síntesis de esta toxina que pudieran estar interviniendo en la síntesis de otras toxinas u otros metabolitos secundarios producidos también por esta especie. Esto último sugeriría una interconexión de rutas metabólicas secundarias (de biosíntesis de otras toxinas u otros metabolitos secundarios), muchas de las cuales aún no han sido elucidadas (Wiemann *et al.*, 2013). Por tanto, detección positiva de la expresión del gen *FUM1* en *F. fujikuroi* podría ser una buena aproximación de la potencialidad de una determinada cepa para producir fumonisinas. Serían de gran utilidad nuevos estudios que ampliaran la información sobre la regulación de la biosíntesis de fumonisinas en esta especie para poder evaluar con mejor precisión el riesgo potencial de *F. fujikuroi* e identificar los factores implicados más importantes. El protocolo de cuantificación de la expresión del gen *FUM1* mediante RT-PCR a tiempo real desarrollado en este trabajo contribuirá a facilitar futuros estudios de regulación y comparación con las otras dos especies próximas y productoras de fumonisinas.

La producción de fumonisinas a niveles detectables e incluso elevados (niveles entre 0,386 y 223,83 ppm) de las cepas de *F. fujikuroi* observada en este trabajo es similar a la observada en otros estudios realizados con *F. verticillioides* y *F. proliferatum* en condiciones similares a las utilizadas en este capítulo (Jurado *et al.*, 2010). Esto sugiere que la capacidad potencial de producción de estas micotoxinas por parte de *F. fujikuroi* está probablemente subestimada. Por tanto, el impacto que supone la producción de fumonisinas por parte de esta especie debería ser estudiado más en profundidad, con el objetivo de obtener más resultados que serán interesantes tanto para el campo de la agricultura, como para el de la salud humana y animal. La colonización por parte de *F. fujikuroi* de diferentes especies confirmaría el carácter oportunista de este hongo, hecho que ya señalaron diferentes autores (Leslie *et al.*, 2004; 2006) y por tanto, su presencia en distintos productos y materias primas indicaría una contaminación potencial por fumonisinas, la cual sería particularmente relevante en determinados cultivos que hasta ahora no han sido considerados de presentar riesgo por contaminación de estas toxinas, como puede ser el arroz, entre otros.

Por otro lado, a diferencia de lo que ocurre en otras especies del género *Fusarium*, en el caso de *F. fujikuroi* no se ha considerado que las fumonisinas pudiesen

afectar a la patogénesis de este hongo (Desjardins *et al.*, 2000). Como ya se ha comentado, el problema más importante que supone la presencia de *F. fujikuroi* en el arroz es la enfermedad de Bakanae. Las fumonisinas no son las causantes de esta enfermedad, sin embargo, proporcionarían una ayuda al hongo a la hora de colonizar el tejido de los hospedadores, así como para competir contra otras especies fúngicas durante la colonización, como se ha sugerido para especies próximas (Jurado *et al.*, 2008; Marín *et al.*, 2010b). La detección de cepas de *F. fujikuroi* productoras de fumonisinas indica que la habilidad para producir esta toxina puede considerarse como una capacidad ampliamente distribuida en esta especie, de manera similar a lo que ocurre con *F. verticillioides* o *F. proliferatum*, y refuerza el interés del estudio de esta especie.

Capítulo 3

Capítulo 3. Influencia del sustrato sobre el crecimiento y la expresión del gen *FUM1* en *Fusarium verticillioides* y *Fusarium proliferatum*

3.1. Introducción

Fusarium verticillioides (Saccardo) Nirenberg, (teleomorfo: *Gibberella moliniformis*) y *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg (teleomorfo: *Gibberella intermedia*) son dos de los principales hongos patógenos del maíz, que en muchas ocasiones se dan a la vez en un mismo hospedador. Ambas especies están muy próximas filogenéticamente, pertenecen al complejo de especies *Gibberella fujikuroi* y muestran perfiles ecofisiológicos bastante semejantes (Marín *et al.*, 2010b). Además, están ampliamente distribuidas en las regiones templadas (Aliakbari *et al.*, 2007; Cavaglieri *et al.*, 2009; Desjardins *et al.*, 2000; De Souza y Formento, 2004; Marín *et al.*, 2013).

Las cepas de *F. verticillioides* productoras de fumonisinas contaminan esencialmente el maíz, causando diversas enfermedades tales como la pudrición rosada del tallo o la pudrición de la mazorca (Figura 1). Estudios recientes han demostrado también su presencia en otros cultivos como el trigo o la cebada (Chehri *et al.*, 2010; Tančić *et al.*, 2012).

Por otra parte, *F. proliferatum* coloniza un gran número de hospedadores además del maíz, tan diversos como el pino, la palmera, los espárragos o la piña, pero es especialmente importante en cereales, por ejemplo el trigo, ya que causa la enfermedad de la punta negra del grano (Figura 1) (Conner *et al.*, 1996; Desjardins *et al.*, 2007). Estas diferencias en su rango de hospedadores podrían estar causadas por diferencias en su capacidad de colonización e infección de las distintas especies vegetales. La composición de los tejidos del hospedador, así como los mecanismos y cambios metabólicos y genéticos producidos en el curso de la interacción huésped-patógeno, podrían jugar un papel importante, aunque en este momento la información disponible para estas dos especies fúngicas es aún escasa, sobre todo en el caso de *F. proliferatum*.



Figura 1:
1a. Efectos de la pudrición rosada del tallo y de la mazorca, ambas en maíz, causada por *F. verticillioides*.
1b. Efectos de la enfermedad de la punta negra del grano en trigo, causada por *F. proliferatum*.

Ambas especies son productoras de micotoxinas, siendo las fumonisinas las más relevantes desde el punto de vista de la seguridad alimentaria. El porcentaje de cepas productoras de esta toxina es muy elevado en las dos especies, pero la regulación de su síntesis en respuesta a los factores ambientales críticos presenta diferencias que podrían ser relevantes en su medio natural (Marín *et al.*, 2010b).

El crecimiento fúngico y la producción de fumonisinas están en gran medida influidos por una compleja interacción entre diferentes factores, tanto bióticos como abióticos. El elevado número de estos factores dificulta en gran medida el estudio en condiciones naturales del metabolismo de estos patógenos (Stępień *et al.*, 2015). El potencial hídrico (Ψ_w) y la temperatura son los más relevantes (Charmley *et al.*, 1994; Magan *et al.*, 2007), aunque también debe tenerse muy en cuenta el efecto del sustrato sobre el que crece el hongo. Todos estos factores están interactuando en el medio natural.

Como vimos en el capítulo anterior, las condiciones óptimas para el crecimiento fúngico normalmente difieren de las consideradas óptimas para producción de micotoxinas (D’Mello y MacDonald, 1997; Khalesi y Khatib, 2011; Marín *et al.*, 2013), y estas condiciones dependen en gran medida del sustrato en el que crece el hongo. Dado que la mayoría de los estudios previos se han realizado sobre medios sintéticos, es probable que algunas de las toxinas estudiadas se produzcan sobre el hospedador en condiciones y cantidades diferentes a las halladas en estos estudios. Por lo tanto, los estudios realizados con medios de cultivo preparados con extracto de diferentes productos alimentarios se consideran, hasta el momento, una buena aproximación a las

condiciones que se dan en los sustratos naturales (Gil-Serna *et al.*, 2015; Pardo *et al.*, 2005; Stępień *et al.*, 2015).

Considerando todo ello, una más amplia información sobre el sustrato de crecimiento (en definitiva, el hospedador), podría ayudar a entender o explicar los diferentes resultados obtenidos en ambas especies en relación a las especies vegetales que coloniza y su interacción con las condiciones ambientales (temperatura y potencial hídrico). La dificultad de diseccionar los distintos factores en condiciones de campo obliga a diseñar experimentos que lo permitan. Numerosos trabajos en este sentido indican la idoneidad de los sistemas *in vitro* en condiciones controladas (Gil-Serna *et al.*, 2015; Pardo *et al.*, 2005; Stępień *et al.*, 2015; etc.). En este capítulo se estudia el efecto combinado de los factores ambientales críticos y el sustrato sobre el crecimiento y la biosíntesis de fumonisinas en *F. verticillioides* y *F. proliferatum*.

En particular, los objetivos de este capítulo fueron:

- (4) Evaluar el efecto de los sustratos maíz, trigo y cebada en combinación con la temperatura y el estrés hídrico, sobre el crecimiento fúngico de *F. verticillioides* y *F. proliferatum*.
- (5) Analizar el efecto de estos mismos factores sobre la expresión del gen de biosíntesis de fumonisinas *FUM1* en *F. verticillioides* y *F. proliferatum*.

3.2. Material y Métodos

3.2.1. Material biológico

Para la realización de este trabajo se emplearon las cepas FvA (FvMM7-3) y FpA (FpMM1-2) de *F. verticillioides* y *F. proliferatum* respectivamente, ambas aisladas en un campo de maíz en la provincia de Madrid (España), en septiembre de 2003. Las dos cepas se encuentran muy bien caracterizadas y se ha visto en distintos estudios previos que se trata de cepas productoras de fumonisinas (Jurado *et al.*, 2008, 2010; Marín *et al.*, 2010b). Los cultivos se mantuvieron en medio PDA (medio agar patata dextrosa, Scharlau Chemie, Barcelona, 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 (UCM).

3.2.2. Medios de cultivo. Obtención de las distintas condiciones ambientales

Los medios utilizados en este capítulo se elaboraron empleando extractos de distintos cereales: cebada (*Hordeum vulgare*), maíz (*Zea mays*) y trigo (*Triticum durum*). Se trata de extractos al 3% (p/v) de cada matriz con agar bacteriológico europeo (Pronadisa, España) (20g/L). Para su preparación se hirvieron 30 g de grano de cada uno de los cereales por separado, cada uno en 1 L de agua destilada durante 30 minutos. Seguidamente se filtró el líquido resultante a través de una doble capa de tela de muselina y se ajustó el volumen a 1 L.

El potencial hídrico de cada medio se modificó con glicerol, soluto no iónico, y las temperaturas de incubación elegidas fueron 15, 20, 25, 30, 35 y 40°C. Los potenciales hídricos empleados fueron -0,7 (medio control), -2,8 y -7,0 MPa, que corresponden a actividades de agua de 0,995, 0,982 y 0,955 respectivamente. Como se ha explicado en el anterior capítulo, al medio control no se le añadió glicerol. Todos los tratamientos y sus réplicas (3 por cada condición) se cubrieron con láminas estériles de celofán (P400, Cannings, Ltd., Bristol, Reino Unido) antes de la inoculación, para facilitar la posterior recogida de la biomasa fúngica.

3.2.3. Inoculación, incubación y medición del crecimiento fúngico

En cada una de las placas (tratamientos y sus réplicas) se inoculó un disco de agar de 3 mm de diámetro procedente de otra placa, de *F. verticillioides* o *F. proliferatum* según el caso, incubada para su crecimiento durante 5-7 días a 25°C. En total se realizaron 54 tratamientos diferentes para cada una de las dos especies: tres sustratos (cebada, maíz y trigo), tres potenciales hídricos (-0,7, -2,8 y -7,0 MPa) y 6 temperaturas distintas (15, 20, 25, 30, 35 y 40°C).

La incubación se realizó durante 10 días, evaluando diariamente el crecimiento fúngico. Para ello se midieron dos diámetros perpendiculares de las colonias en crecimiento hasta que la colonia alcanzó el borde de la placa o se cumplieron los 10 días del experimento. La tasa de crecimiento (mm/día) fue calculada mediante una regresión lineal y definida como la pendiente de la recta que se obtiene al enfrentar el radio de cada colonia en milímetros frente al tiempo en días.

3.2.4. Extracción del RNA total y síntesis de cDNA

Para llevar a cabo la amplificación del gen *FUM1* se seleccionaron determinadas condiciones de temperatura y potencial hídrico para cada especie. Las condiciones elegidas fueron: 20 y 25°C para los potenciales hídricos de -0,7 y -2,8 MPa; y 35°C para el potencial hídrico de -7,0 MPa. De esta manera quedaron representadas las condiciones óptimas de expresión (20-25°C y -2,8 MPa), permisivas (20-25°C y -0,7 MPa) y marginales (35°C y -7,0 MPa) para la expresión del gen *FUM1*, como se ha comprobado en estudios previos (Jurado *et al.*, 2008; Marín *et al.*, 2010, 2013).

Por tanto, al finalizar el periodo de incubación, se retiró el celofán de los tratamientos seleccionados para el estudio de la amplificación del gen *FUM1*, y se extrajo el RNA total de la biomasa fúngica utilizando el *kit* de extracción RNeasy® Plant Mini Kit (Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez extraído, el RNA se conservó a -80°C hasta su utilización.

Como ya se ha explicado en el capítulo 2, apartado 2.2.6, la concentración de RNA fue medida con el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (*NanoDrop Technologies*, Wilmington, Estados Unidos) y 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 40mM y EDTA 1mM) y bromuro de etidio (1µg/ml) a una concentración de 1µl/20ml. Toda el agua utilizada para elaborar los tampones se trató con DEPC durante 24 horas a 37°C a una concentración de 1ml/L de agua destilada 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 RNA total se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente con la DNasa Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Invitrogen, Gran Bretaña) siguiendo las instrucciones del fabricante para eliminar la posible contaminación con DNA genómico.

La transcripción inversa, como se ha indicado en el capítulo 2, apartado 2.2.7, se realizó con el *kit* GeneAmp Gold RNA PCR reagent kit (Applied Biosystems, Estados Unidos) a partir de 500 ng de RNA total libre de DNA genómico. Cada mezcla de reacción contenía 10 µl del tampón de reacción de RT-PCR 5x, 0,5 µl de oligo(dT)₁₆

(50 µM), 2 µl de MgCl₂ (25 mM), 2µl de la solución de deoxinucleótidos trifosfato (dNTP) (10 mM), 2 µl de ditioneitol (DTT) (100 mM), 0,5 µl (10U) de inhibidor de la RNasa (20 U/µl), 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. La síntesis de cDNA se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf, Alemania) y el programa de la transcripción inversa consistió en un primer ciclo de 10 minutos a 25°C (hibridación), un ciclo de 12 minutos a 42°C (transcripción inversa) y parada a 4°C. Tras el proceso de síntesis del cDNA, éste se guardó a -80°C. De cada una de las muestras se realizaron controles negativos a los que no se añadió la enzima transcriptasa inversa.

3.2.5. RT-PCR a tiempo real y análisis cuantitativo de los datos

La RT-PCR a tiempo real se empleó para amplificar el gen *FUM1* y el gen constitutivo *TUB2* (gen de la β-tubulina, control endógeno) de cada una de las muestras de cDNA obtenidas de los tratamientos seleccionados de las cepas FvA y FpA. Las parejas de cebadores específicos empleadas fueron: PQF5-F y PQF5-R para el gen *FUM1* de *F. verticillioides* (López-Errasquín *et al.*, 2007), FUM1P2-F y FUM1P2-R para el gen *FUM1* de *F. proliferatum* (Jurado, 2006) y PQTUB-F2 y PQTUB-R2 para una región parcial del gen *TUB2* de ambas especies (López-Errasquín *et al.*, 2007; Jurado *et al.*, 2010) (Tabla 1).

Gen Amplificado	Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')
<i>FUM1</i>	PQF5-F	GAGCCGAGTCAGCAAGGATT
<i>F. verticillioides</i>	PQF5-R	AGGGTTCGTGAGCCAAGGA
<i>FUM1</i>	FUM1P2-F	CCCCATCATCCCGAGTAT
<i>F. proliferatum</i>	FUM1P2-R	TGGGTCCGATAGTGATTTGTCA
<i>TUB2</i>	PQTUB-F2	ACATCCAGACAGCCCTTTGTG
	PQTUB-R2	AGTTTCCGATGAAGGTCGAAGA

Tabla 1: Secuencias de los cebadores utilizados en las reacciones de amplificación de RT-PCR a tiempo real en *F. verticillioides* y *F. proliferatum*.

Tanto el protocolo como las condiciones para la PCR han sido descritas previamente en Jurado *et al.* (2008, 2010) y Marín *et al.* (2010b), así como en el

capítulo 2, apartado 2.2.8 de esta memoria. Para ello se empleó la mezcla SYBR® Green PCR Master Mix de Applied Biosystems (Estados Unidos), la cual incluye, en las cantidades adecuadas, la enzima AmpliTaq Gold ® DNA Polymerase, dNTPs, MgCl₂ y tampón de PCR, e incorpora el colorante SYBR Green I (Wittwer *et al.*, 1997). Las muestras se amplificaron por duplicado en placas para reacciones ópticas de 384 pocillos (Applied Biosystems, Estados Unidos). Cada reacción se llevó a cabo en un volumen de 10 µl que contenía 5 µl de la mezcla maestra SYBR® Green PCR Master Mix, 1,3 µl de agua Mili-Q estéril, 0,6 µl de cada cebador a 5 µM (siendo su concentración final de 300 nM) y 2,5 µl de cDNA. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador a tiempo real ABIPRISM 7900 HT (Applied Biosystems, Estados Unidos) en la Unidad de Genómica de la UCM, siendo las condiciones térmicas utilizadas para la amplificación de los dos genes de 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 para comprobar la correcta eliminación de DNA genómico. Estos controles se procesaron de igual manera que el resto de las muestras.

El análisis cuantitativo de los datos se realizó como ya se ha explicado en el apartado 3.2.6 del capítulo 3, empleando el método $\Delta\Delta C_T$ ó método de la cuantificación relativa de los niveles de expresión del gen problema *FUM1* respecto del gen de control endógeno o constitutivo *TUB2* (Ginzinger, 2002; User Bulletin N°2). Para ello se realizó una RT-PCR a tiempo real para analizar la amplificación de los genes *FUM1* y *TUB2*. El gen *TUB2* se utilizó para normalizar la cantidad de mRNA del gen diana. En el análisis de resultados de la 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.

Los valores de ΔC_T , empleados para realizar los análisis estadísticos, se obtuvieron restando la media de los valores C_T del gen endógeno de la media de los valores C_T del gen diana. El cálculo del valor $\Delta\Delta C_T$ utilizado en las representaciones gráficas se calculó restando a cada ΔC_T el valor del ΔC_T de un calibrador, que es la muestra utilizada como referencia para obtener el valor relativo de las demás muestras. En este caso los calibradores empleados fueron las muestras de cada especie cultivadas

en cebada a 20°C y -0,7 MPa. La desviación del valor $\Delta\Delta C_T$ es la misma que la del ΔC_T , ya que se trata de una resta de un valor arbitrario. Finalmente, el valor del gen problema, normalizada a una referencia endógena y relativa a un calibrador se obtiene mediante la fórmula:

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

3.2.6. Análisis estadístico de los resultados

Se calculó la tasa de crecimiento para cada tratamiento y réplica como se ha descrito anteriormente. Tanto para los resultados de crecimiento, como para la expresión del gen *FUM1*, se realizaron análisis de la varianza (ANOVAs multifactoriales) de los tres factores (sustrato x temperatura x potencial hídrico) para cada una de las dos especies, así como análisis bidireccionales de la varianza (ANOVAs bidireccionales) para cada sustrato (temperatura x potencial) en los casos en que fue necesario. También se llevaron a cabo análisis *post hoc* (test HSD de Tukey de múltiples comparaciones) con un nivel de confianza del 95%. La consistencia de los valores de expresión del gen *TUB2* fue probada de igual manera que en el capítulo 3, apartado 3.2.7., resultados que confirmaron la consistencia y estabilidad de este gen constitutivo. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando los programas STATGRAPHICS CENTURION XV.II (Statistical Graphics Corp., Herndon, Virginia) y SPSS 17.0.0 (Rel, 2008. Chicago: SPSS Inc.). Como ya se ha indicado, para el análisis de la expresión del gen *FUM1* se emplearon los valores ΔC_T .

3.3. Resultados

3.3.1. Efecto del sustrato sobre el crecimiento a diferentes temperaturas y potenciales hídricos

Las figuras 2a y 2b muestran los perfiles bidimensionales de la tasas de crecimiento de las cepas FvA de *F. verticillioides* y FpA de *F. proliferatum*, respectivamente. Las figuras presentan los resultados obtenidos en los tres sustratos probados (cebada, maíz y trigo) y se observa la respuesta de las dos especies a cambios en el potencial hídrico (entre -0,7 y -7,0 MPa) y en la temperatura (entre 15 y 40°C). Como se puede observar, los patrones de crecimiento de ambas especies fueron similares, aunque la tasa de crecimiento de *F. verticillioides* mostró valores mayores

que la de *F. proliferatum*. Ambas especies crecieron en todas las temperaturas probadas excepto a 40°C, donde no se observó crecimiento en ningún caso.

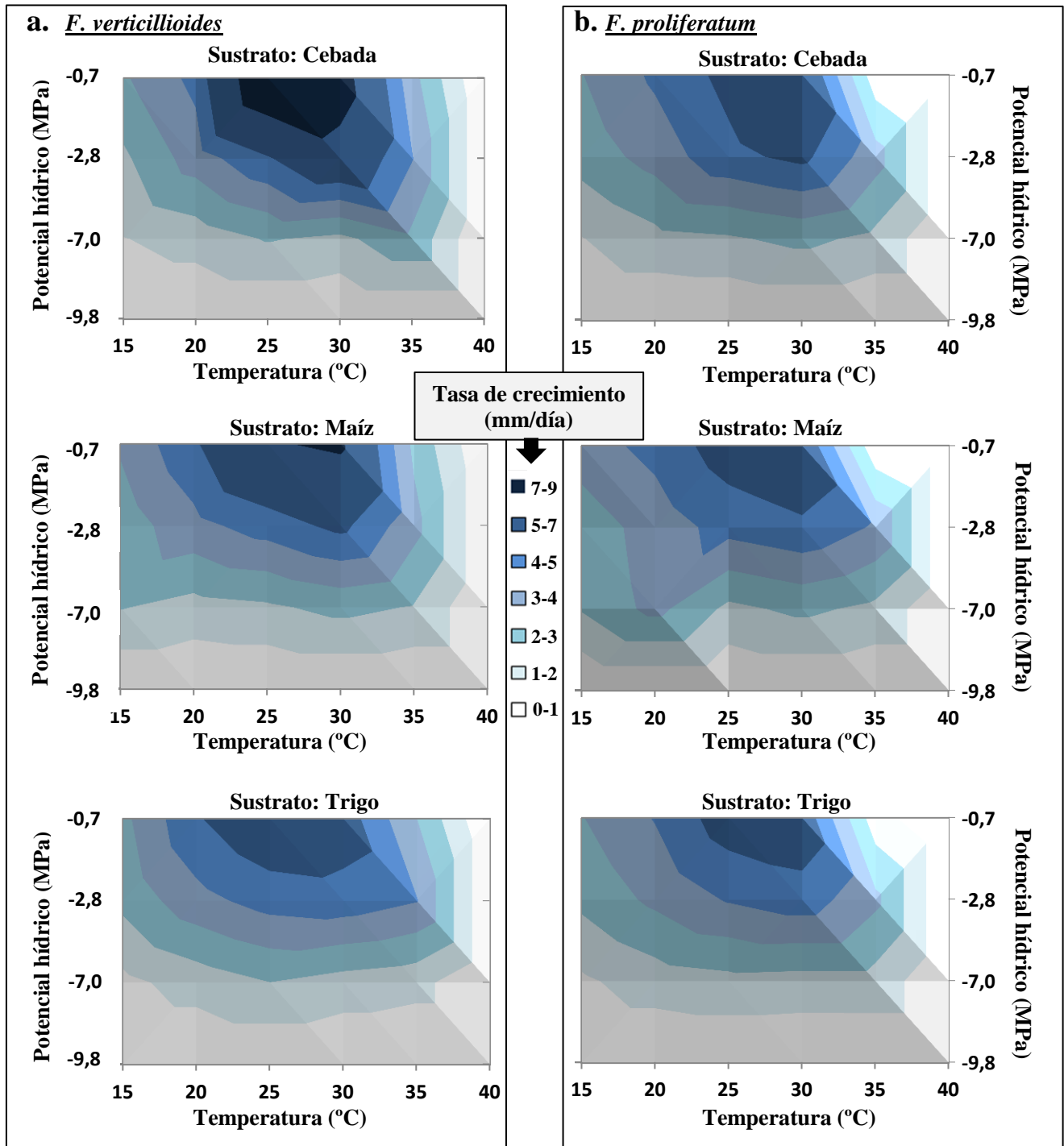


Figura 2. Perfiles bidimensionales que reflejan el efecto de la temperatura y el potencial hídrico sobre la tasa de crecimiento de la cepa FvA de *F. verticillioides* (2a) y de la cepa FpA de *F. proliferatum* (2b), cultivadas en medios elaborados con extractos de diferentes cereales (cebada, maíz y trigo) durante 10 días. La tasa de crecimiento en cada una de las condiciones está determinada por el valor medio de las tres réplicas.

<i>F. verticillioides</i>																
	Condiciones óptimas de crecimiento	Porcentaje de reducción del crecimiento comparado con el óptimo														
		15°C			20°C			25°C			30°C			35°C		
		-0,7	-2,8	-7,0	-0,7	-2,8	-7,0	-0,7	-2,8	-7,0	-0,7	-2,8	-7,0	-0,7	-2,8	-7,0
Cebada	25°C,-0,7 MPa	67,63	79,56	89,17	51,54	60,52	83,93		44,78	76,49	11,11	27,72	80,31	62,24	54,24	68,72
Maíz	30°C,-0,7 MPa	56,78	66,55	71,66	33,28	49,08	77,39	5,29	38,39	74,66		27,01	68,47	62,07	53,79	73,37
Trigo	25°C, -0,7 MPa	54,64	62,25	87,82	18,69	39,29	76,45		26,71	67,09	6,66	23,67	73,77	50,07	32,78	77,89

<i>F. proliferatum</i>																
	Condiciones óptimas de crecimiento	Porcentaje de reducción del crecimiento comparado con el óptimo														
		15°C			20°C			25°C			30°C			35°C		
		-0,7	-2,8	-7,0	-0,7	-2,8	-7,0	-0,7	-2,8	-7,0	-0,7	-2,8	-7,0	-0,7	-2,8	-7,0
Cebada	30°C,-0,7 MPa	53,47	62,04	84,95	34,16	46,73	73,39	16,49	25,65	70,59		17,28	64,37	78,40	46,22	72,90
Maíz	30°C,-0,7 MPa	41,12	60,88	65,72	28,96	42,58	45,28	7,71	27,82	70,91		20,39	63,29	79,34	35,95	71,01
Trigo	30°C, -0,7 MPa	49,21	61,26	85,75	30,11	44,46	74,34	3,59	29,56	69,49		21,52	72,07	75,75	44,33	71,83

Tabla 2: Porcentajes de reducción en la tasa de crecimiento respecto a las condiciones óptimas para las especies *F. verticillioides* (arriba) y *F. proliferatum* (abajo) en todas las temperaturas y potenciales hídricos en los que se observó crecimiento.

Respecto al sustrato, las dos especies crecieron mejor en cebada que en maíz y trigo, siendo los valores óptimos de crecimiento en cebada de 8-9 mm/día para FvA y 6-7 mm/día para FpA. El maíz presentó valores óptimos de 7-8 mm/día para FvA y 6-7 mm/día para FpA, mientras que el trigo fue el sustrato en el que se observó un menor crecimiento, con tasas de 6-7 mm/día para FvA y 5-6 mm/día para FpA.

En la figura 2a se puede observar que las condiciones óptimas para el crecimiento de *F. verticillioides* fueron de 25°C y -0,7 MPa en los medios de cebada y trigo, y 30°C y -0,7 MPa en el medio de maíz. En el caso de *F. proliferatum* (figura 2b), estas condiciones óptimas fueron de 30°C y -0,7 MPa en los tres medios probados. En la tabla 2 se detallan las reducciones en el crecimiento respecto al óptimo de cada especie para todas las condiciones del experimento. Las condiciones marginales fueron similares en las dos especies y en los tres sustratos: 15°C y 35-40°C, y -7,0 MPa, y produjeron la mayor reducción del crecimiento. Si bien, aunque exista esta reducción acusada de la tasa de crecimiento, las temperaturas de 15 y 35°C aún permitieron un crecimiento sustancial de ambas especies. A 40°C sin embargo, no se observó en ningún caso crecimiento fúngico. En la tabla 3 se comparan los resultados obtenidos con los datos de la tasa de crecimiento de estas dos especies en medio sintético (Marín *et al.*, 2010b).

	Condiciones óptimas de crecimiento	Porcentaje de reducción del crecimiento comparado con el óptimo					
		30°C			35°C		
		-0,7	-2,8	-7,0	-0,7	-2,8	-7,0
<i>F. verticillioides</i> (medio sintético)*	25°C, -0,7 MPa	7,48	2,23	50,65	30,58	17,00	55,68
<i>F. verticillioides</i> (cebada)	25°C,-0,7 MPa	11,11	27,72	80,31	62,24	54,24	68,72
<i>F. verticillioides</i> (maíz)	30°C,-0,7 MPa		27,01	68,47	62,07	53,79	73,37
<i>F. verticillioides</i> (trigo)	25°C, -0,7 MPa	6,66	23,67	73,77	50,07	32,78	77,89
<i>F. proliferatum</i> (medio sintético)*	25°C, -2,8 MPa	16,75	12,45	50,27	33,71	16,09	58,19
<i>F. proliferatum</i> (cebada)	30°C,-0,7 MPa		17,28	64,37	78,40	46,22	72,90
<i>F. proliferatum</i> (maíz)	30°C,-0,7 MPa		20,39	63,29	79,34	35,95	71,01
<i>F. proliferatum</i> (trigo)	30°C, -0,7 MPa		21,52	72,07	75,75	44,33	71,83

Tabla 3. Porcentajes de la reducción del crecimiento respecto a las condiciones de temperatura y potencial hídrico óptimas de cada especie y cada sustrato (medio sintético, cebada, maíz y trigo). Se indican las condiciones de 30°C y 35°C y potenciales hídricos de -0,7, -2,8 y -7,0 MPa.

*Datos tomados de Marín *et al.*, 2010b.

El ANOVA multifactorial llevado a cabo para estudiar el efecto de los distintos factores sobre el crecimiento mostró efectos significativos de los tres factores individualmente (sustrato, temperatura y potencial hídrico), así como de sus interacciones, en las dos especies; solamente no resultaron ser significativas las interacciones sustrato x Ψ_w y la triple interacción sustrato x Ψ_w x temperatura en *F. verticillioides* (tablas 4 y 5). A continuación se realizaron ANOVAs bidireccionales por sustrato para ambas especies (tablas 6 y 7). Los test post hoc realizados (test HSD de Tukey) que aparecen también en estas dos últimas tablas muestran diferencias significativas en la tasa de crecimiento en los tres sustratos.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Media Cuadrática	Estadístico F-Snedecor
Sustrato	2	15.956	6.198**
Potencial Hídrico	2	487.784	189.468***
Temperatura	4	132.090	51.307***
Sustrato x Potencial	4	3.401	1.321
Sustrato x Temperatura	8	6.279	2.439*
Potencial Hídrico x Temperatura	8	37.817	14.689***
Sustrato x Potencial Hídrico x Temperatura	16	2.960	1.150

Tabla 4. ANOVA multifactorial mostrando el efecto del potencial hídrico (-0,7; -2,8 y -7,0 MPa), de la temperatura (20, 25, 30 y 35°C) y del sustrato (cebada, maíz y trigo), así como sus interacciones, sobre la tasa de crecimiento de FvA. No se realizaron los análisis con la temperatura de 40°C ya que el valor de la tasa de crecimiento fue 0. Estadístico F-Snedecor: * Significativo para $p < 0,05$; ** Significativo para $p < 0,01$; *** Significativo para $p < 0,001$.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Media Cuadrática	Estadístico F-Snedecor
Sustrato	2	7.946	23.701***
Potencial Hídrico	2	265.412	791.624***
Temperatura	4	98.887	294.941***
Sustrato x Potencial	4	2.075	6.190***
Sustrato x Temperatura	8	1.694	5.053***
Potencial Hídrico x Temperatura	8	34.546	103.038***
Sustrato x Potencial Hídrico x Temperatura	16	0.963	2.873**

Tabla 5. ANOVA multifactorial mostrando el efecto del potencial hídrico (-0,7; -2,8 y -7,0 MPa), de la temperatura (20, 25, 30 y 35°C) y del sustrato (cebada, maíz y trigo), así como sus interacciones, sobre la tasa de crecimiento de FpA. No se realizaron los análisis con la temperatura de 40°C ya que el valor de la tasa de crecimiento fue 0. Estadístico F-Snedecor: * Significativo para $p < 0,05$; ** Significativo para $p < 0,01$; *** Significativo para $p < 0,001$.

Fuente de Variación Cebada	Grados de Libertad	Media Cuadrática	Estadístico F-Snedecor				
Temperatura	4	76.780	13.861***				
Potencial Hídrico	2	206.171	37.219***				
Temperatura x Potencial Hídrico	8	24.407	4.406**				
Test HSD de Tukey							
Resultados para el potencial hídrico					Resultados para la temperatura		
15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	-0.7MPa	-2.8MPa	-7.0MPa
a/b/c	a/a/b	a/b/c	a/a/a	a/b/c	a/abc/c/bc/ab	a/ab/bc/c/abc	a/ab/bc/abc/c

Fuente de Variación Maíz	Grados de Libertad	Media Cuadrática	Estadístico F-Snedecor				
Temperatura	4	38.554	22.475***				
Potencial Hídrico	2	134.008	78.121***				
Temperatura x Potencial Hídrico	8	13.976	8.147***				
Test HSD de Tukey							
Resultados para el potencial hídrico					Resultados para la temperatura		
15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	-0,7MPa	-2.8MPa	-7.0MPa
a/a/a	a/b/c	a/b/c	a/a/b	a/a/a	a/b/c/c/a	a/ab/b/b/ab	a/a/a/a/a

Fuente de Variación Trigo	Grados de Libertad	Media Cuadrática	Estadístico F-Snedecor				
Temperatura	4	29.313	62.538***				
Potencial Hídrico	2	154.408	329.422***				
Temperatura x Potencial Hídrico	8	5.354	11.423***				
Test HSD de Tukey							
Resultados para el potencial hídrico (MPa)					Resultados para la temperatura (°C)		
15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	-0,7MPa	-2.8MPa	-7.0MPa
a/a/b	a/b/c	a/b/c	a/a/b	a/b/c	a/b/b/b/a	a/a/b/b/ab	a/b/c/b/b

Tabla 6. ANOVA bidireccional de los factores temperatura, potencial hídrico y su interacción en cada uno de los medios (cebada, maíz y trigo) respecto a la tasa de crecimiento de *F. verticillioides*. F-Snedecor: * Significativo para $p < 0,05$; ** Significativo para $p < 0,01$; *** Significativo para $p < 0,001$. El test HSD de Tukey se realizó por cada sustrato, temperatura y potencial hídrico separadamente siempre que el valor P de su interacción fue significativo. Letras diferentes indican diferencias con $P < 0,05$. No se realizaron los análisis con la temperatura de 40°C ya que el valor de la tasa de crecimiento fue 0.

Fuente de Variación Cebada		Grados de Libertad	Media Cuadrática	Estadístico F-Snedecor			
Temperatura		4	44.105	97.903***			
Potencial Hídrico		2	100.992	224.182***			
Temperatura x Potencial Hídrico		8	10.147	22.523***			
Test HSD de Tukey							
Resultados para el potencial hídrico							
Resultados para la temperatura							
15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	-0.7MPa	-2.8MPa	-7.0MPa
a/b/c	a/a/b	a/a/b	a/b/c	a/b/c	a/b/bc/c/d	a/bc/d/d/c	a/b/b/c/b

Fuente de Variación Maíz		Grados de Libertad	Media Cuadrática	Estadístico F-Snedecor			
Temperatura		4	27.237	157.845***			
Potencial Hídrico		2	62.625	362.918***			
Temperatura x Potencial Hídrico		8	15.780	91.450***			
Test HSD de Tukey							
Resultados para el potencial hídrico							
Resultados para la temperatura							
15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	-0,7MPa	-2.8MPa	-7.0MPa
a/b/b	a/b/b	a/b/c	a/b/c	a/b/c	a/b/c/c/d	a/b/c/d/bc	ab/c/a/b/a

Fuente de Variación Trigo		Grados de Libertad	Media Cuadrática	Estadístico F-Snedecor			
Temperatura		4	30.932	80.811***			
Potencial Hídrico		2	105.946	276.784***			
Temperatura x Potencial Hídrico		8	10.546	27.550***			
Test HSD de Tukey							
Resultados para el potencial hídrico (MPa)							
Resultados para la temperatura (°C)							
15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	-0,7MPa	-2.8MPa	-7.0MPa
a/b/c	a/b/c	a/b/c	a/b/c	a/b/a	a/a/b/b/c	a/b/c/c/b	a/b/b/b/b

Tabla 7. ANOVA bidireccional de los factores temperatura, potencial hídrico y su interacción en cada uno de los medios (cebada, maíz y trigo) respecto a la tasa de crecimiento de *F. proliferatum*. F-Snedecor: * Significativo para $p < 0,05$; ** Significativo para $p < 0,01$; *** Significativo para $p < 0,001$. El test HSD de Tukey se realizó por cada sustrato, temperatura y potencial hídrico separadamente siempre que el valor P de su interacción fue significativo. Letras diferentes indican diferencias con $P < 0,05$. No se realizaron los análisis con la temperatura de 40°C ya que el valor de la tasa de crecimiento fue 0.

3.3.2. Efecto del sustrato sobre la expresión del gen *FUM1* a diferentes temperaturas y potenciales hídricos

En la figura 3 se observan los patrones de expresión relativa del gen *FUM1* en *F. verticillioides* (3a) y *F. proliferatum* (3b) en cebada, maíz y trigo en las condiciones de temperatura y potencial hídrico probadas (indicadas anteriormente en el apartado 4.2.4 de este capítulo).

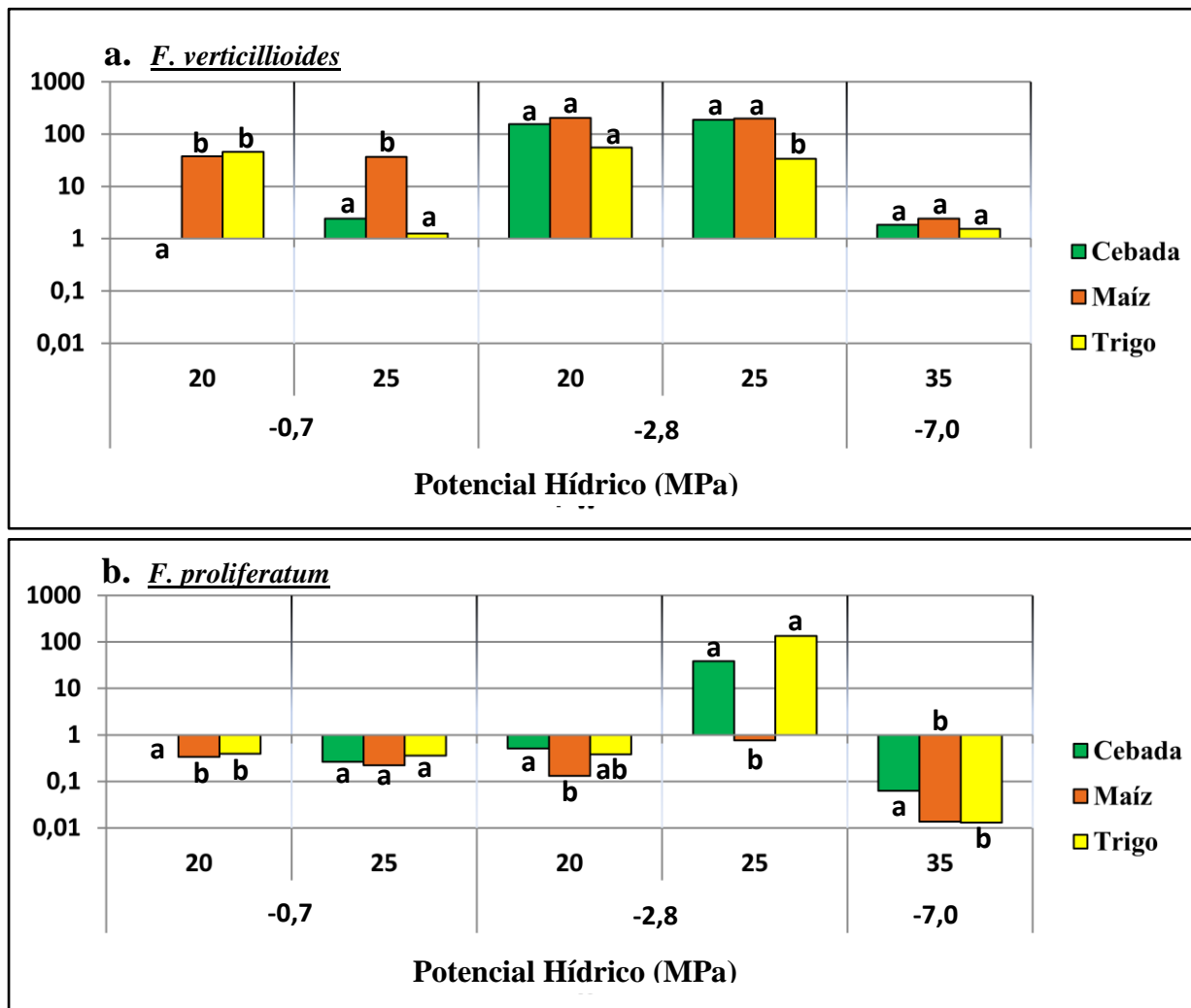


Figura 3. Expresión relativa del gen *FUM1* de las cepas FvA de *F. verticillioides* (3a) y FpA de *F. proliferatum* (3b) crecidas durante 10 días en las condiciones de 20 y 25°C y -0,7 MPa, 20 y 25°C y -2,8 MPa y 35°C y -7,0 MPa. Los valores representan el número de veces que se expresó el gen en comparación con su calibrador (cultivo de cebada, 20°C y -0,7 MPa) al cual se le dio valor 1,00. Cada especie cuenta con su calibrador propio. Cada resultado representa la media de tres réplicas independientes. Los resultados de los tests HSD de Tukey obtenidos para cada sustrato, temperatura y potencial hídrico se indican mediante letras en las barras de valor (el test en cada condición es independiente de las demás). Letras diferentes indican diferencias significativas para un valor de P<0,05.

Para cada tratamiento, los valores representan el número de veces que se expresó el gen *FUM1*, siempre de manera relativa respecto a su calibrador, es decir, al

tratamiento de *F. verticillioides* o *F. proliferatum* (según el caso) incubados en medio de cebada a 20°C y -0,7 MPa. A estos calibradores se les asignó el valor de expresión 1,00. Los resultados reflejados son la media de tres repeticiones independientes.

Como podemos observar, los resultados de expresión relativa del gen *FUM1* son diferentes en las dos especies. En *F. verticillioides* se registró inducción relativa de este gen en todos los casos de temperatura y potencial hídrico, siendo maíz el medio con niveles mayores de expresión de *FUM1*. Por el contrario, en *F. proliferatum*, sólo se observó inducción en cebada y trigo a 25°C y -2,8 MP y trigo, condiciones óptimas para la producción de fumonisinas, y el medio de maíz registró la menor expresión del gen *FUM1*. En ambas especies los tratamientos a 35°C y -7,0 MPa tuvieron el mayor efecto negativo en cuanto a la expresión del gen *FUM1*.

Los ANOVAs multifactoriales (Tablas 8 y 9) realizados para ambas especies mostraron efectos estadísticamente significativos de los tres factores (sustrato, temperatura y potencial hídrico) y sus interacciones sobre la expresión del gen *FUM1*. A continuación se realizaron ANOVAs bidireccionales (Tablas 10 y 11) y tests HSD de Tukey por sustrato (Figura 3) para cada especie. Estos análisis muestran cómo para *F. verticillioides* en el medio de trigo, tanto la temperatura como el potencial hídrico y su interacción tuvieron un efecto significativo, mientras que en los medios de cebada y maíz, el efecto significativo fue sólo para el potencial hídrico. En el caso de *F.proliferatum*, todos los análisis revelaron un efecto significativo de los dos factores y su interacción, excepto el potencial hídrico en el medio de maíz.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Media Cuadrática	Estadístico F-Snedecor
Sustrato	2	15.218	24.573***
Potencial Hídrico	1	136.539	220.472***
Temperatura	1	5.131	8.285**
Sustrato x Potencial	2	18.661	30.131***
Sustrato x Temperatura	2	11.379	18.374***
Potencial Hídrico x Temperatura	1	2.887	4.662*
Sustrato x Potencial Hídrico x Temperatura	2	2.461	6.850***

Tabla 8. ANOVA multifactorial mostrando el efecto del potencial hídrico (-0,7; -2,8 ó -7,0 MPa), de la temperatura (25, 30 ó 40°C) y del sustrato (cebada, maíz y trigo), así como sus interacciones, sobre la expresión del gen *FUM1* de FvA (*F. verticillioides*). Estadístico F-Snedecor: * Significativo para p<0,05; ** Significativo para p<0,01; *** Significativo para p<0,001.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Media Cuadrática	Estadístico F-Snedecor
Sustrato	2	20.501	35.654***
Potencial Hídrico	1	57.270	99.602***
Temperatura	1	53.344	92.774***
Sustrato x Potencial	2	13.037	22.674***
Sustrato x Temperatura	2	7.777	13.525***
Potencial Hídrico x Temperatura	1	99.289	172.681***
Sustrato x Potencial Hídrico x Temperatura	2	6.832	11.883***

Tabla 9. ANOVA multifactorial mostrando el efecto del potencial hídrico (-0,7; -2,8 ó -7,0 MPa), de la temperatura (25, 30 ó 40°C) y del sustrato (cebada, maíz y trigo), así como sus interacciones, sobre la expresión del gen *FUM1* de FpA (*F. proliferatum*). Estadístico F-Snedecor: * Significativo para $p < 0,05$; ** Significativo para $p < 0,01$; *** Significativo para $p < 0,001$.

Fuente de Variación Cebada	Grados de Libertad	Media Cuadrática	Estadístico F-Snedecor
Temperatura	1	1.799	2.769
Potencial Hídrico	1	137.667	211.908***
Temperatura x Potencial Hídrico	1	0.722	1.111

Fuente de Variación Maíz	Grados de Libertad	Media Cuadrática	Estadístico F-Snedecor
Temperatura	1	0.025	0.438
Potencial Hídrico	1	17.273	299.012***
Temperatura x Potencial Hídrico	1	0.005	0.086

Fuente de Variación Trigo	Grados de Libertad	Media Cuadrática	Estadístico F-Snedecor
Temperatura	1	26.065	22.656***
Potencial Hídrico	1	18.921	16.446**
Temperatura x Potencial Hídrico	1	14.926	12.973**

Tabla 10. ANOVA bidireccional de los factores temperatura, potencial hídrico y su interacción por cada una de los sustratos (cebada, maíz y trigo) respecto a la expresión del gen *FUM1* de FvA (*F. verticillioides*). F-Snedecor: * Significativo para $p < 0,05$; ** Significativo para $p < 0,01$; *** Significativo para $p < 0,001$.

Fuente de Variación Cebada	Grados de Libertad	Media Cuadrática	Estadístico F-Snedecor
Temperatura	1	14.059	21.954**
Potencial Hídrico	1	28.984	45.261***
Temperatura x Potencial Hídrico	1	50.049	78.155***

Fuente de Variación Maíz	Grados de Libertad	Media Cuadrática	Estadístico F-Snedecor
Temperatura	1	2.860	5.493*
Potencial Hídrico	1	0.129	0.249
Temperatura x Potencial Hídrico	1	7.520	14.440**

Fuente de Variación Trigo	Grados de Libertad	Media Cuadrática	Estadístico F-Snedecor
Temperatura	1	51.978	92.188***
Potencial Hídrico	1	54.230	96.182***
Temperatura x Potencial Hídrico	1	55.385	98.231***

Tabla 11. ANOVA bidireccional de los factores temperatura, potencial hídrico y su interacción por cada una de los sustratos (cebada, maíz y trigo) respecto a la expresión del gen *FUM1* de FpA (*F. proliferatum*). F-Snedecor: * Significativo para $p < 0,05$; ** Significativo para $p < 0,01$; *** Significativo para $p < 0,001$.

3.4. Discusión

En este capítulo se ha evaluado el efecto de tres sustratos (cebada, maíz y trigo) sobre el crecimiento y la expresión del gen *FUM1* en *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, teniendo en cuenta los factores ambientales críticos de temperatura y potencial hídrico. En los sustratos estudiados, las dos especies se presentan con diferente incidencia y desarrollan enfermedades con diverso nivel de gravedad. Dado que el efecto que tienen las condiciones ambientales sobre el crecimiento es diferente que el que presentan sobre la biosíntesis de toxinas, el efecto del sustrato ha sido analizado también de forma independiente para ambos. Estudios antiguos ya señalaban esta diferencia: aunque la composición del medio no parecía tener un gran efecto sobre el crecimiento fúngico, sí condicionaba de manera importante su capacidad de producir micotoxinas (Lai *et al.*, 1970). Nuestros resultados confirman esta observación, como también se ha podido observar en estudios más recientes llevados a cabo con especies

de los géneros *Fusarium* (Marín, S. *et al.*, 2004; Marín, P., *et al.*, 2015; Stępień *et al.*, 2015) o *Aspergillus* (Gil-Serna *et al.*, 2015).

Los resultados sobre el crecimiento fúngico de nuestro estudio revelaron un efecto significativo del sustrato, el cual no se ve alterado por las diferentes condiciones de potencial hídrico y temperatura. Las dos cepas mostraron un patrón de crecimiento similar: ambas especies crecieron mejor en cebada, maíz y trigo, por ese orden, aunque presentaron ciertas diferencias, como la tasa de crecimiento que fue mayor en *F. verticillioides* que en *F. proliferatum*, lo cual ya se había observado en estudios previos utilizando los mismos sustratos (Marín, *et al.*, 1999; 2004). Como se puede observar en la figura 2, el crecimiento se observó en un amplio rango de condiciones permisivas, lo cual concuerda con la amplia distribución de las especies por las distintas regiones agroclimáticas españolas. Esto se ha observado también en otros estudios *in vitro* llevados a cabo en medios de cultivo sintéticos, que presentaron patrones de crecimiento similares y que concuerdan con esta amplia distribución. Además, los porcentajes de reducción del crecimiento observados (tabla 2) son similares entre las dos especies estudiadas, así como con los resultados obtenidos en estudios realizados previamente (Jurado *et al.*, 2006; 2008; Marín *et al.*, 2010a; 2010b; 2013; 2015) (tabla 3).

Como ya se ha mencionado, los estudios llevados a cabo en medios elaborados con extracto de cereal son importantes a la hora de conocer el comportamiento del hongo en medios no sintéticos de diferentes composiciones. Mediante el uso de estos medios, podemos conseguir una variación en la fuente de carbono aportada por el medio, que es uno de los factores principales que afectan al crecimiento fúngico. Por ejemplo, Bluhm y Woloshuk en 2005 describieron que una cepa de *F. verticillioides* tuvo un crecimiento más rápido en mazorcas de maíz que se encontraban en un estado de desarrollo en el cual la cantidad de fuente de carbono, almidón en este caso, era alta (58%, estado de masa blanda). Diferentes estudios previos han demostrado que algunos hongos toxígenos utilizan el almidón como única fuente de carbono para su crecimiento (Bluhm y Woloshuk, 2005; Roussos *et al.*, 2006). Los niveles generales de almidón son mayores en cebada (76,38%) que en maíz (74,2%) y por último en trigo (68,3%). Esto podría causar ciertas diferencias en las tasas de crecimiento haciendo que el hongo crezca más en cebada, maíz y trigo por ese orden, como sucede en nuestro trabajo. Además, esto podría ser una explicación para los altos niveles de contaminación fúngica que se encuentran en los cultivos de cebada, mayores que los encontrados por ejemplo

en trigo como se observa en diferentes trabajos previos (Gil-Serna et al., 2013; Medina et al., 2006; Soldevilla et al., 2005).

Aunque existen numerosos estudios realizados en medios elaborados con extractos de diferentes plantas con el objetivo de analizar la cantidad de fumonisina B₁ producida por cepas de *Fusarium* (Marín et al., 1999; Bluhm y Woloshuk, 2005; Stępień et al., 2015; Gil-Serna et al., 2015), no hay hasta el momento estudios previos de la expresión del gen *FUM1* en medios con extractos de cereales. Como se ha visto anteriormente, en muchas ocasiones el patrón de expresión de este gen no se corresponde con el patrón de crecimiento del mismo hongo, además de existir patrones de expresión diferentes para especies diferentes. El potencial toxígeno de cada especie viene influido y/o limitado de diferente manera por los factores ambientales que encuentran en los hospedadores (Stępień et al., 2015). De nuevo, la fuente de carbono disponible es un factor importante y, por ejemplo, en estudios con especies de *Aspergillus* sección *Circumdati* se vio que éstas producían mayor cantidad de toxina cuando la fuente de carbono del medio era sacarosa, y menor cantidad cuando se trataba de fructosa (Medina et al., 2008; Mühlencoert et al., 2004; Gil-Serna et al., 2015).

En nuestro caso, tanto el medio como las condiciones ambientales mostraron un efecto significativo en la expresión del gen *FUM1*, que resultó diferente para *F. verticillioides*, especie en la que hubo inducción relativa del gen en todas las condiciones probadas, y en la que el medio de maíz presentó los niveles mayores de expresión génica; y para *F. proliferatum*, donde se observó inducción solamente en cebada y trigo a 25°C y -2,8 MPa, y el medio de maíz presentó los valores de menor expresión del gen *FUM1*. Estas diferencias encontradas entre ambas especies han sido descritas previamente. Por ejemplo, en Marín et al. (2004) se detalla que a 25°C y -0,7 MPa, cepas de *F. verticillioides* produjeron más FB₁ que cepas de *F. proliferatum*.

La mayor inducción del gen *FUM1* se observó a -2,8 MPa, y no a -0,7 MPa, condición que supondría un menor estrés hídrico. Las funciones fisiológicas del hongo dependen del potencial hídrico, y cambios en este afectan a la habilidad del hongo para producir micotoxinas. Respecto a las diferencias entre sustratos, en estudios previos se ha observado que cepas de *Fusarium* altamente toxígenas en maíz, resultaron serlo menos o incluso ser incapaces de producir fumonisinas en trigo y cebada bajo las mismas condiciones ambientales. Podría darse el caso de que uno o varios de los

componentes nutricionales de la cebada y el trigo actuaran en ciertos casos como inhibidores de la biosíntesis de fumonisinas, o bien que algún componente presente sólo en maíz tuviera la capacidad de causar una mayor biosíntesis de fumonisinas. Uno de estos factores hipotéticos podría ser la amilopectina, ya que se ha probado que estimula la biosíntesis de FB₁, por ejemplo en *F. verticillioides* (Marín *et al.*, 1999, 2004; Bluhm y Woloshuk, 2005; Stępień *et al.*, 2015).

Las condiciones marginales de 35°C y -7,0 MPa tuvieron los efectos menos favorables en cuanto a la expresión del gen *FUM1* en ambas especies fúngicas. Esto coincide con estudios previos en los que no se detectó producción de fumonisinas a 35°C, aunque el crecimiento de la cepa (*F. verticillioides*) continuaba (Marín *et al.*, 2004) o donde se vio una falta de inducción del gen de biosíntesis de toxina probado (*TRI5*, gen de la síntesis de tricotecenos) en *F. graminearum* en esas condiciones (Marín *et al.*, 2010a). Por otro lado, nuestro patrón resultó ser el opuesto a resultados del gen *TRI5* de *F. equiseti*, donde se observó una elevada producción de tricotecenos en condiciones consideradas como de estrés para la mayoría de especies de *Fusarium* (Marín *et al.*, 2015). Estas diferencias en cuanto a la regulación de la biosíntesis de micotoxinas por las distintas especies fúngicas podrían contribuir a mejorar su adaptación al medio, diferente según los factores ambientales o los hospedadores, así como a cambios ambientales durante su ciclo vital (Marín *et al.*, 2012, 2015).

A la vista de estos resultados, se espera que estas especies continúen presentes en futuros escenarios y además sigan suponiendo un riesgo debido a las toxinas que producen. Las condiciones climáticas esperadas como resultado del cambio climático actual supondrían cambios en sus tasas de crecimiento y en su síntesis de toxinas. Aunque el control en campo es difícil de llevar a cabo, una monitorización de las condiciones climáticas resultaría útil para prevenir altas tasas de infección. Además, como hemos observado, el hospedador podría influir sobre la producción de toxinas regulando directamente su biosíntesis, independientemente del crecimiento fúngico.

El trabajo *in vitro* descrito resulta útil en el control y el desarrollo de estrategias que reduzcan la contaminación por micotoxinas en cereales.

Capítulo 4

Capítulo 4. Efectos combinados del fungicida benomilo, del estrés hídrico y de la temperatura sobre la tasa de crecimiento fúngico y la expresión relativa de los genes *FUM1* y *FUM19* en *Fusarium verticillioides*

4.1. Introducción

Fusarium verticillioides (Saccardo) Nirenberg (teleomorfo: *Gibberella moniliformis*) pertenece al complejo de especies *Gibberella fujikuroi* (población de apareamiento A) (O'Donnell *et al.*, 1998) y es uno de los principales productores de fumonisinas. Es un hongo fitopatógeno ampliamente distribuido en zonas templadas (Cavaglieri *et al.*, 2009; Desjardins *et al.*, 2000, 2007; De Souza y Formento, 2004) y en gran medida responsable de la contaminación por fumonisinas del maíz y otros cereales en regiones Mediterráneas (Aliakbari *et al.*, 2007; Cavaglieri *et al.*, 2009; Gil-Serna *et al.*, 2013; Jurado *et al.*, 2006).

Durante el ciclo de vida de *F. verticillioides* en maíz, el patógeno coloniza el suelo y crece sobre los residuos de la cosecha. Generalmente, sus esporas se dispersan mediante el viento y las gotas de lluvia al caer sobre el cereal. El crecimiento fúngico y la producción de toxinas están influidos por la interacción de diversos factores, tanto bióticos como abióticos, siendo muy importante su conocimiento para poder comprender los procesos en su conjunto y predecir y prevenir el desarrollo fúngico y la producción de toxinas sobre el cereal (Charmley *et al.*, 1994). La temperatura y el estrés hídrico son los factores más importantes (Charmley *et al.*, 1994; Magan *et al.*, 2007; Marín *et al.*, 2004; Marín *et al.*, 2010b) y originan patrones de respuesta característicos que varían con cada especie fúngica. Las interacciones entre estos dos factores parecen haber limitado en algunos casos la capacidad de las especies fúngicas para crecer y producir FB₁ (Jurado *et al.*, 2008; Marín *et al.*, 2010b; Medina *et al.*, 2013).

Teniendo en cuenta unas condiciones climáticas en continuo cambio, estos factores pueden ser temporales o permanentes en determinadas regiones (Miraglia *et al.*, 2009). Para las regiones mediterráneas se prevén cambios en el clima y las precipitaciones, esperando temperaturas más altas y un mayor grado de sequía, las cuales llevarían consigo cambios en las poblaciones de hongos micotoxígenos y, por tanto, en las micotoxinas presentes en los productos agrícolas. Además, estos cambios

afectarían también a las estrategias de control utilizadas actualmente (Magan *et al.*, 2011).

El control de *F. verticillioides* en campo se realiza combinando diferentes estrategias, entre ellas el uso de antifúngicos para reducir la infección. Estos productos suelen ser muy efectivos a la hora de reducir la tasa de crecimiento fúngico pero cada vez se encuentran más evidencias de que su efecto en el control de la producción de toxinas podría no ser tan efectivo (Magan *et al.*, 2002; Magan and Olsen, 2004; Mamza *et al.*, 2008; Medina *et al.*, 2007; Ramírez *et al.*, 2004). De hecho, en determinadas condiciones actuarían como factores de estrés, llevando a la inducción de diferentes genes relacionados con el estrés y con ello a la biosíntesis de toxinas (Edwards and Godly, 2010; Haidukowski *et al.*, 2005; Marín *et al.*, 2013; Mateo *et al.*, 2011; Ngûyen *et al.*, 2000; Ramírez *et al.*, 2004; Schmidt-Heydt *et al.*, 2007; Tenreiro *et al.*, 2001).

El benomilo (metil 1-(butilcarbamoil) benzimidazol-2-ilcarbamato) y la carbendazima (metil benzimidazol-2-ilcarbamato), el compuesto más abundante en la degradación del primero, son fungicidas sistémicos del grupo de los benzimidazoles y juegan un importante papel en el control de enfermedades de plantas (figura 1). Dado que la vida media del benomilo en suelo es muy corta (alrededor de 19 horas, 2 horas en agua), pasando después a su degradación y conversión en carbendazima, la cual presenta una vida media bastante mayor (2 meses), en este estudio se hace referencia a ambos fungicidas.

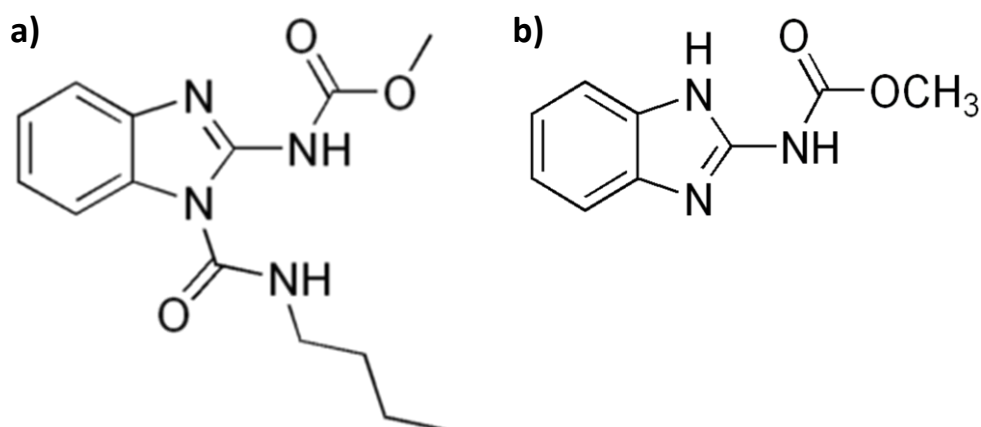


Figura 1: Estructuras químicas del benomilo (a) y de la carbendazima (b).

El benomilo es uno de los fungicidas más efectivos reduciendo el crecimiento fúngico. Actúa uniéndose a los microtúbulos, de manera que interfiere con diferentes funciones celulares como la división nuclear o el transporte intracelular (Whitehead, 1996). Actualmente se utiliza en diversos países de América del Sur para controlar el crecimiento de hongos en cereales, fruta y hortalizas (Llorent-Martínez *et al.*, 2012; RAP-AL 2008; Subhani *et al.*, 2011) y se emplea tanto en pre-cosecha como durante el almacenamiento post-cosecha (Magnucka *et al.*, 2007; Whitehead, 1996). El uso de ambos fungicidas, el benomilo y la carbendazima, están regulados por la Unión Europea (UE), estableciendo sus límites máximos de residuo (LMR) para maíz, mijo, arroz y sorgo en 0,01 mg/kg; en 0,1 mg/kg para centeno y trigo; y en 2 mg/kg para cebada y avena (Comisión Europea de Regulación No 559/2011). Estas restricciones requieren un mayor número de estudios que aseguren la eficacia máxima del fungicida con el mínimo impacto para la salud y el ambiente, por lo que es necesario comprender mejor el impacto que las diversas estrategias de control fúngico tienen sobre el crecimiento y la producción de micotoxinas bajo determinadas condiciones ambientales.

Conocer los genes involucrados en la biosíntesis de fumonisinas es muy importante a la hora de determinar cuáles son los factores que regulan la producción de esta toxina. Como se ha explicado en el capítulo 1, apartado 1.2.1, se sabe que dichos genes están organizados en un *cluster*, de igual manera que ocurre en otras toxinas producidas por hongos filamentosos. Se conocen al menos 15 genes que codifican las actividades enzimáticas responsables de la síntesis de las fumonisinas, cuya expresión parece estar regulada de forma coordinada (Proctor *et al.*, 1999, 2003). *FUM1* es uno de los genes más importantes y codifica para una enzima poliquétido sintasa (Proctor *et al.*, 1999) que cataliza el primer paso de la ruta de biosíntesis de fumonisinas (Bojja *et al.*, 2004). Su expresión parece estar positivamente relacionada con la producción de fumonisinas en *F. verticillioides* (López-Errasquín *et al.*, 2007; Medina *et al.*, 2013). *FUM19* está localizado aproximadamente 35kb aguas abajo de *FUM1* y codifica para un transportador tipo ABC (*ATP-binding cassette*) que está involucrado en el transporte de las fumonisinas hacia el exterior (Proctor *et al.*, 2003). Estos transportadores, de igual manera que los incluidos en la familia MFS (*Major Facilitator Superfamily*), se encargan de excretar al exterior de la célula diferentes compuestos tóxicos, ya sean de origen endógeno o exógeno, reduciendo así su acumulación dentro de la célula (Bauer *et*

al., 1999). El transportador *FUM19* no ha sido ampliamente caracterizado todavía, aunque los análisis filogenéticos realizados utilizando la secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia de cDNA del gen *FUM19* sugieren la relación de la proteína correspondiente con la subfamilia de transportadores MDR (*multidrug resistance*) (López-Errasquín, 2005).

Uno de los mecanismos de la resistencia a múltiples drogas implica la sobreexpresión del gen o genes que codifican las proteínas transportadoras, lo que aumenta el transporte de compuestos hacia el exterior de la célula, evitando los efectos negativos que la acumulación intracelular de dichas sustancias pueden ocasionar (Cools and Fraaije, 2012). Este grupo de proteínas transportan compuestos diversos, tanto endógenos como exógenos, participando probablemente en el transporte hacia fuera de la célula de los compuestos antifúngicos, así como de micotoxinas producidas por el mismo hongo, entre ellas las fumonisinas. Es muy probable que estos mecanismos respondan a señales tóxicas o de estrés, generales y/o específicas, influyendo sobre la expresión del gen codificador del transportador y por tanto en la producción final de las toxinas. Utilizando información de las secuencias de los genes implicados en la biosíntesis de micotoxinas, se han llevado a cabo nuevas aproximaciones basadas en el uso de RT-PCR a tiempo real, para lograr una cuantificación rápida y eficaz de la expresión génica, pudiendo así además evaluar el efecto de los factores ambientales y/o la eficacia de los compuestos antifúngicos (Jurado et al., 2008; Marín et al., 2010a, 2010b; Medina et al., 2013; Schmidt-Heydt et al., 2008). Estas estrategias permiten la evaluación del efecto de los tratamientos antifúngicos de forma simultánea sobre la tasa de crecimiento del hongo y la biosíntesis de fumonisinas, y además integrar los factores ambientales críticos.

Los objetivos de este capítulo fueron:

- (6) Determinar la dosis de benomilo necesaria para reducir el crecimiento de *F.verticillioides* en un 50% o un 90% (LD₅₀, LD₉₀).
- (7) Evaluar el efecto de diferentes condiciones de temperatura y estrés hídrico sobre el crecimiento fúngico, compatibles con los escenarios posibles de cambio climático en regiones mediterráneas.

- (8) Cuantificar la expresión relativa de los genes de biosíntesis de fumonisinas *FUM1* y *FUM19* en esas mismas condiciones de temperatura y estrés hídrico.

4.2. Material y Métodos

4.2.1. Material biológico

La cepa de *F. verticillioides* utilizada para la realización de este trabajo fue FvMM7-3 (FvA) (figura 2), que fue aislada de un campo de maíz en Madrid (España), en septiembre de 2003. Se trata de una cepa productora de fumonisinas (Jurado *et al.*, 2006) que ha sido ampliamente caracterizada en estudios previos (Jurado *et al.*, 2006, 2008; Marín *et al.*, 2010b). El cultivo se mantuvo en medio PDA (medio agar patata dextrosa, Scharlau Chemie, Barcelona, España) a 4°C y conservado como suspensión de esporas en glicerol al 15% a -80°C en el Departamento de Genética (UCM).



Figura 2: *F. verticillioides*. Cepa FvA cultivada en medio PDA a 25°C y -0,7 MPa durante 7 días.

4.2.2. Medio de cultivo. Determinación de las dosis LD₅₀ y LD₉₀ de benomilo

El medio de cultivo utilizado en este estudio fue un medio sólido inductor de la síntesis de fumonisinas descrito previamente (López-Errasquín *et al.*, 2007), cuya composición es la siguiente: extracto de malta (0,5g/l), extracto de levadura (1g/l), peptona (1g/l), KH₂PO₄ (1g/l), MgSO₄·7H₂O (0,3g/l), KCl (0,3g/l), ZnSO₄·7H₂O (0,05 g/l), CuSO₄·5H₂O (0,01g/l), fructosa (20g/l) y agar bacteriológico (15g/l). Este medio, basado en el propuesto por Jiménez *et al.* (2003), contiene como fuente de carbono fructosa, la cual favorece la síntesis de fumonisinas por parte del hongo.

A la hora de determinar las dosis de benomilo necesarias para reducir el crecimiento en un 50 y 90%, se añadió al medio el principio activo del fungicida benomilo al 50% (Benopron ®, Probelte, Murcia, España). Basándonos en la concentración de este principio activo, se añadieron en agua estéril desionizada las cantidades adecuadas de benomilo para alcanzar las concentraciones de fungicida de 0, 0,5, 1, 2, 2,5, 3,5 y 4 mg/L, las cuales se mezclaron posteriormente con el medio de cultivo una vez autoclavado y aún líquido, cuando su temperatura era de 50°C, siempre antes de poner cada medio en las placas de Petri correspondientes. Dichas concentraciones se emplearon para determinar los valores de las dosis letales LD₅₀ y LD₉₀ (concentraciones de fungicida que reducen el crecimiento en un 50% ó 90% respectivamente). Al medio control sin benomilo se le atribuyó el valor LD₀.

Cada una de estas concentraciones de fungicida fue probada en cuatro experimentos independientes, en los cuales se inoculó en el centro de cada placa de Petri un disco de agar de 3mm de diámetro obtenido del margen del cultivo puro de la cepa FvA cultivada en PDA durante 7 días a 25°C. A continuación se incubaron las placas a 25°C durante 10 días. Las mediciones del crecimiento fúngico se realizaron diariamente durante los días que duró el proceso de incubación, midiéndose dos diámetros perpendiculares por placa hasta que la masa fúngica alcanzó el extremo de la placa o se cumplió el tiempo máximo de incubación. La tasa de crecimiento (mm/día) fue calculada mediante una regresión lineal y definida como la pendiente de la recta que se obtiene al enfrentar el radio de cada colonia en milímetros frente al tiempo en días. Posteriormente se realizó la representación gráfica de la tasa de crecimiento obtenida (mm/día) frente a las diferentes concentraciones de benomilo (ppm). Interpolando el valor de la reducción de la tasa de crecimiento al 50% y 90% se obtuvieron las dosis LD₅₀ y LD₉₀. Estas concentraciones fueron de 0,93 ppm y 3,30 ppm respectivamente (figura 3).

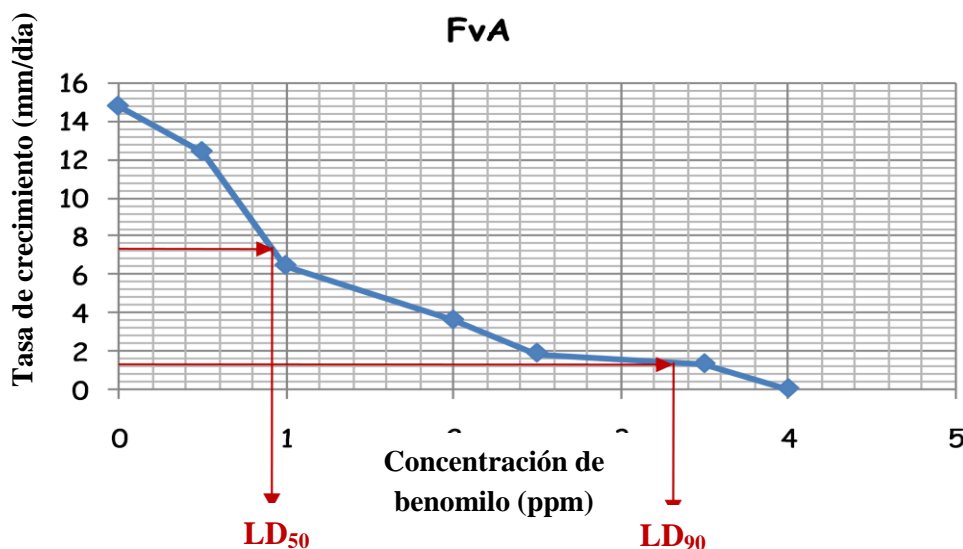


Figura 3: Representación gráfica de la obtención de los valores LD₅₀ y LD₉₀

4.2.3. Determinación de las condiciones experimentales específicas de potencial hídrico. Condiciones de inoculación, incubación y medición del crecimiento fúngico

Para obtener los niveles de potencial hídrico (Ψ_w) elegidos para este experimento (-2,8 y -7.0 MPa, correspondientes a los valores de actividad de agua (a_w) de 0,982 y 0,955 respectivamente) se modificó el medio utilizado con glicerol, soluto no iónico (Dallyn y Fox, 1980), que no se añadió al medio control (Ψ_w de -0,7 MPa que corresponde a una a_w de 0,995). Además, a este medio de cultivo con los distintos potenciales hídricos indicados, se le añadieron 0,93 ppm y 3,30 ppm de benomilo (Benopron ®) correspondientes a las dosis letales LD₅₀ y LD₉₀ descritas en el apartado anterior. Como ya hemos indicado, el medio sin fungicida se denominó LD₀.

Las placas de Petri donde se añadió el medio control o modificado fueron cubiertas con discos circulares de celofán estéril (P400; Cannings, Ltd., Bristol, Reino Unido) antes de la inoculación del material biológico, lo cual facilitó la retirada de la masa fúngica crecida tras el período de incubación. Las placas (tres réplicas de cada uno de los tratamientos biológicos) fueron incubadas a 20, 25, 30 ó 35°C durante 10 días. Se obtuvieron por tanto 36 condiciones experimentales distintas (4 temperaturas x 3 potenciales hídricos x 3 tratamientos de benomilo) y por tanto 108 placas (3 réplicas de cada condición).

La inoculación de las placas con el disco de micelio, la medición del crecimiento y el cálculo de la tasa de crecimiento (mm/día) se llevaron a cabo para todas las placas antes descritas. Se determinaron los perfiles bidimensionales de crecimiento en relación a la temperatura y el potencial hídrico para los tres tratamientos: LD₀, LD₅₀ y LD₉₀.

4.2.4. Extracción del RNA total y síntesis de cDNA

Al final del período de incubación, la masa fúngica se retiró de cada placa con la ayuda del celofán estéril y se congeló a -80°C hasta el momento de extracción del RNA. El RNA total de los micelios fue extraído de cada placa y procesado individualmente utilizando el *kit* de extracción RNeasy® Plant Mini Kit (Hilden, Alemania) y posteriormente el RNeasy® Mini Kit (Hilden, Alemania), siguiendo en ambos casos las instrucciones del fabricante. El RNA total fue guardado a -80°C.

La concentración de RNA fue medida con el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (*NanoDrop Technologies*, Wilmington, Estados Unidos) y 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 40mM y EDTA 1mM) y bromuro de etidio (1µg/ml) a una concentración de 1µl/20ml. Toda el agua utilizada para elaborar los tampones se trató con DEPC durante 24 horas a 37°C a una concentración de 1ml/L de agua destilada 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 RNA total se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente con la DNasa Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Invitrogen, Gran Bretaña) siguiendo las instrucciones del fabricante para eliminar la posible contaminación con DNA genómico.

La transcripción inversa se realizó con el *kit* GeneAmp Gold RNA PCR reagent kit (Applied Biosystems, Estados Unidos) a partir de 500 ng de RNA total libre de DNA genómico. Cada mezcla de reacción contenía 10 µl del tampón de reacción de RT-PCR 5x, 0,5 µl de oligo(dT)₁₆ (50 µM), 2 µl de MgCl₂ (25 mM), 2µl de la solución de deoxinucleótidos trifosfato (dNTP) (10 mM), 2 µl de ditioneitol (DTT) (100 mM), 0,5 µl (10U) de inhibidor de la RNasa (20 U/µl), 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. La síntesis de cDNA se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf, Alemania) y el programa de la transcripción inversa consistió en un primer ciclo de 10 minutos a 25°C (hibridación), un ciclo de 12 minutos a 42°C (transcripción inversa) y parada a 4°C. Tras el proceso de síntesis del cDNA, éste se guardó a -80°C. De cada una de las muestras se realizaron controles negativos a los que no se añadió la enzima transcriptasa inversa.

4.2.5. RT-PCR a tiempo real

La técnica de RT-PCR a tiempo real se empleó para la cuantificación relativa de la expresión de los genes *FUM1* y *FUM19* así como el gen de expresión constitutiva *TUB2* (gen de la β-tubulina, control endógeno). Se utilizó cDNA obtenido a partir de cada muestra de la cepa FvA de los distintos experimentos y las parejas de cebadores específicos para cada uno de los tres genes descritos previamente por López-Errasquín *et al.* (2007). Estas parejas de cebadores fueron PQF5-F y PQF5-R específicos para el gen *FUM1* de *F. verticillioides*, PQF19-F y PQF19-R para el gen *FUM19* de *F. verticillioides* y PQTUB-F2 y PQTUB-R2 para el gen *TUB2* de *F. verticillioides* (tabla 1).

Gen Amplificado	Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')
<i>FUM1</i>	PQF5-F	GAGCCGAGTCAGCAAGGATT
	PQF5-R	AGGGTTCGTGAGCCAAGGA
<i>FUM19</i>	PQF19-F	ATCAGCATCGGTAACGCTTATGA
	PQF19-R	CATGTAAGTTGAGGAAGCCCTTGT
<i>TUB2</i>	PQTUB-F2	ACATCCAGACAGCCCTTTGTG
	PQTUB-R2	AGTTTCCGATGAAGGTCGAAGA

Tabla 1: Secuencias de los cebadores utilizados en las reacciones de amplificación de RT-PCR a tiempo real en *F. verticillioides*.

Tanto el protocolo como las condiciones de la amplificación fueron descritas previamente en Jurado *et al.* (2008, 2010), Marín *et al.* (2010b) y en el capítulo 2, apartado 2.2.8 de esta memoria. Se empleó la mezcla SYBR® Green PCR Master Mix

de Applied Biosystems (Estados Unidos), la cual incluye, en las cantidades adecuadas, la enzima AmpliTaq Gold ® DNA Polymerase, dNTPs, MgCl₂ y tampón de PCR, e incorpora el colorante SYBR Green I (Wittwer *et al.*, 1997). Como se ha explicado en el capítulo 2.2.8, este colorante detecta DNA de doble hélice, se intercala en ésta y genera una señal fluorescente cuando la muestra es excitada por una fuente de luz. Las muestras se amplificaron por duplicado en placas para reacciones ópticas de 384 pocillos (Applied Biosystems, Estados Unidos). Cada reacción se llevó a cabo en un volumen de 10 µl que contenía 5 µl de la mezcla maestra SYBR® Green PCR Master Mix, 1,3 µl de agua Mili-Q estéril, 0,6 µl de cada cebador a 5 µM (siendo su concentración final de 300nM) y 2,5 µl de cDNA. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador a tiempo real ABIPRISM 7900 HT (Applied Biosystems, Estados Unidos) en la Unidad de Genómica de la UCM, siendo las condiciones térmicas utilizadas para la amplificación de los tres genes de 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 para comprobar la correcta eliminación de DNA genómico. Estos controles se procesaron de igual manera que el resto de las muestras.

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

El método analítico utilizado en este estudio fue el método del $\Delta\Delta C_T$ ó método de la cuantificación relativa de los niveles de expresión de los genes problema (*FUM1* o *FUM19*) respecto del gen de control endógeno o constitutivo (*TUB2*) (Ginzinger, 2002; User Bulletin N°2). Para ello se realizaron dos experimentos de RT-PCR a tiempo real de las mismas muestras, una para analizar la amplificación de los genes *FUM1* y *TUB2*, y otra para los genes *FUM19* y *TUB2*. El gen *TUB2* se utilizó en ambos casos para normalizar la cantidad de mRNA de los genes diana. En el análisis de resultados de la 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.

Los valores de ΔC_T , empleados para realizar los análisis estadísticos, se obtuvieron restando la media de los valores C_T del gen endógeno de la media de los valores C_T de cada gen diana. Su desviación típica se calcula aplicando la fórmula:

$$(S_1^2 + S_2^2)^{1/2}$$

donde S_1 y S_2 son las desviaciones típicas de la media de los valores de C_T obtenidos para el gen problema y el gen endógeno, respectivamente. El cálculo del valor $\Delta\Delta C_T$ utilizado en las representaciones gráficas se calculó restando a cada ΔC_T el valor del ΔC_T de un calibrador, que es la muestra utilizada como referencia para obtener el valor relativo de las demás muestras. La desviación del valor $\Delta\Delta C_T$ es la misma que la del ΔC_T , ya que se trata de una resta de un valor arbitrario. Finalmente, el valor del gen problema, normalizada a una referencia endógena y relativa a un calibrador se obtiene mediante la fórmula:

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

4.2.7. Análisis estadístico de los resultados

La tasa de crecimiento (mm/día) para cada tratamiento y réplica fue calculada como se ha descrito previamente en el apartado 3.2.2 de este mismo capítulo, realizando para su representación gráfica la media de las tres réplicas correspondientes a cada uno de los experimentos. Los resultados de la tasa de crecimiento así como los de las expresiones de los genes *FUMI* y *FUMI9* de cada una de las réplicas fueron tratados estadísticamente y evaluados mediante el análisis de la varianza (ANOVA multifactorial) de los tres factores (dosis x temperatura x potencial hídrico). Además se llevó a cabo el análisis bidireccional de la varianza (ANOVA bidireccional) para cada dosis (temperatura x potencial hídrico) cuando fue necesario. También se realizaron análisis *post-hoc* (Test HSD de Tukey de múltiples comparaciones) con un nivel de confianza del 95%. Los datos utilizados para los análisis de expresión fueron, como ya se ha indicado en el apartado 3.2.6, los valores ΔC_T .

Para evaluar la consistencia de los valores C_T del gen *TUB2* se realizó un ANOVA unidireccional con los datos de todos los tratamientos (LD₀, LD₅₀ y LD₉₀), indicando los resultados que este gen era estable y consistente en todos los experimentos. La correlación entre la expresión relativa de los genes *FUMI* y *FUMI9* se analizó mediante una regresión lineal. Todos los análisis estadísticos se llevaron a

cabo utilizando los programas STATGRAPHICS CENTURION XV.II (Statistical Graphics Corp., Herndon, VA) y SPSS 17.0.0 (Rel, 2008. Chicago: SPSS Inc.).

4.3. Resultados

4.3.1. Efecto de la temperatura, el potencial hídrico y el benomilo sobre la tasa de crecimiento fúngico

Las figuras 4, 5 y 6 muestran los perfiles bidimensionales de la tasa de crecimiento de la cepa FvA, cultivada durante 10 días en el medio inductor de fumonisinas empleando diferentes potenciales hídricos (entre -0,7 y -7,0 MPa) y temperaturas (entre 20 y 35°C), en los tres tratamientos: LD₀ (figura 4), LD₅₀ (figura 5) y LD₉₀ (figura 6). La tasa de crecimiento en cada una de las condiciones está determinada por el valor medio de las tres réplicas.

El análisis de la varianza (ANOVA) realizado para estudiar el efecto sobre el crecimiento de cada uno de los factores individuales del experimento (potencial hídrico, temperatura y dosis de benomilo), así como cada una de sus interacciones, mostró diferencias estadísticamente significativas de la dosis y del potencial hídrico por separado, así como de las interacciones dosis x potencial hídrico, dosis x temperatura y dosis x potencial hídrico x temperatura (tabla 2).

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Media Cuadrática	Estadístico F-Snedecor
Dosis	2	416,775	24,352*
Potencial Hídrico	2	23,826	7,719*
Temperatura	3	78,975	4,452
Dosis x Potencial	4	34,348	13,957***
Dosis x Temperatura	6	17,115	6,954*
Potencial Hídrico x Temperatura	6	3,087	1,254
Dosis x Potencial Hídrico x Temperatura	12	2,461	6,850***

Tabla 2. ANOVA multifactorial mostrando el efecto del potencial hídrico (-0,7; -2,8 y -7,0 MPa), de la temperatura (20, 25, 30 y 35°C) y de la dosis de benomilo (LD₀, LD₅₀ y LD₉₀), así como sus interacciones, sobre la tasa de crecimiento de FvA. Estadístico F-Snedecor: * Significativo para p<0,05; ** Significativo para p<0,01; *** Significativo para p<0,001.

En la tabla 3 se muestran los resultados de las pruebas *post-hoc* llevadas a cabo (Test HSD de Tukey), las cuales demostraron que existían diferencias significativas en el efecto sobre la tasa de crecimiento de las tres dosis de fungicida probadas (LD₀, LD₅₀ y LD₉₀) consideradas de forma independiente.

Fuente de Variación ED ₀				Grados de Libertad	Media Cuadrática	Estadístico F-Snedecor
Temperatura				3	55,703	92,587***
Potencial Hídrico				2	86,592	143,928***
Temperatura x Potencial Hídrico				6	5,779	9,605***
Test HSD de Tukey						
Resultados para el potencial hídrico				Resultados para la temperatura		
20°C	25°C	30°C	35°C	-0.7MPa	-2.8MPa	-7.0MPa
a/b/c	a/b/c	a/a/b	a/a/a	a/b/b/a	a/bc/c/ab	a/bc/b/c

Fuente de Variación ED ₅₀				Grados de Libertad	Media Cuadrática	Estadístico F-Snedecor
Temperatura				3	56,490	125,551***
Potencial Hídrico				2	2,050	4,555*
Temperatura x Potencial Hídrico				6	1,754	3,899**
Test HSD de Tukey						
Resultados para el potencial hídrico				Resultados para la temperatura		
20°C	25°C	30°C	35°C	-0.7MPa	-2.8MPa	-7.0MPa
a/b/b	a/a/b	a/b/a	a/a/a	a/b/bc/c	a/bc/b/c	a/bc/b/c

Fuente de Variación ED ₉₀				Grados de Libertad	Media Cuadrática	Estadístico F-Snedecor
Temperatura				3	1,011	38,622***
Potencial Hídrico				2	3,880	148,233***
Temperatura x Potencial Hídrico				6	0,475	18,152***
Test HSD de Tukey						
Resultados para el potencial hídrico				Resultados para la temperatura		
20°C	25°C	30°C	35°C	-0.7MPa	-2.8MPa	-7.0MPa
-	a/b/c	a/a/b	a/b/c	-	a/b/ab/b	a/b/b/b

Tabla 3. ANOVA bidireccional de los factores temperatura, potencial hídrico y su interacción por cada una de las dosis (LD₀, LD₅₀ y LD₉₀) respecto a la tasa de crecimiento de *F. verticillioides*. F-Snedecor: * Significativo para p<0,05; ** Significativo para p<0,01; *** Significativo para p<0,001. El test HSD de Tukey se realizó por cada dosis, temperatura y potencial hídrico separadamente siempre que el valor P de su interacción fue significativo. Letras diferentes indican diferencias con P<0,05. Los casos en que no hay dato corresponden a valores de crecimiento fúngico cero.

En ausencia de benomilo (figura 4), el rango óptimo para el crecimiento fúngico resultó estar entre 25 y 30°C de temperatura y entre -0,7 y -2,8 MPa de potencial hídrico. Las temperaturas marginales y un elevado estrés hídrico causaron la reducción de la tasa de crecimiento.

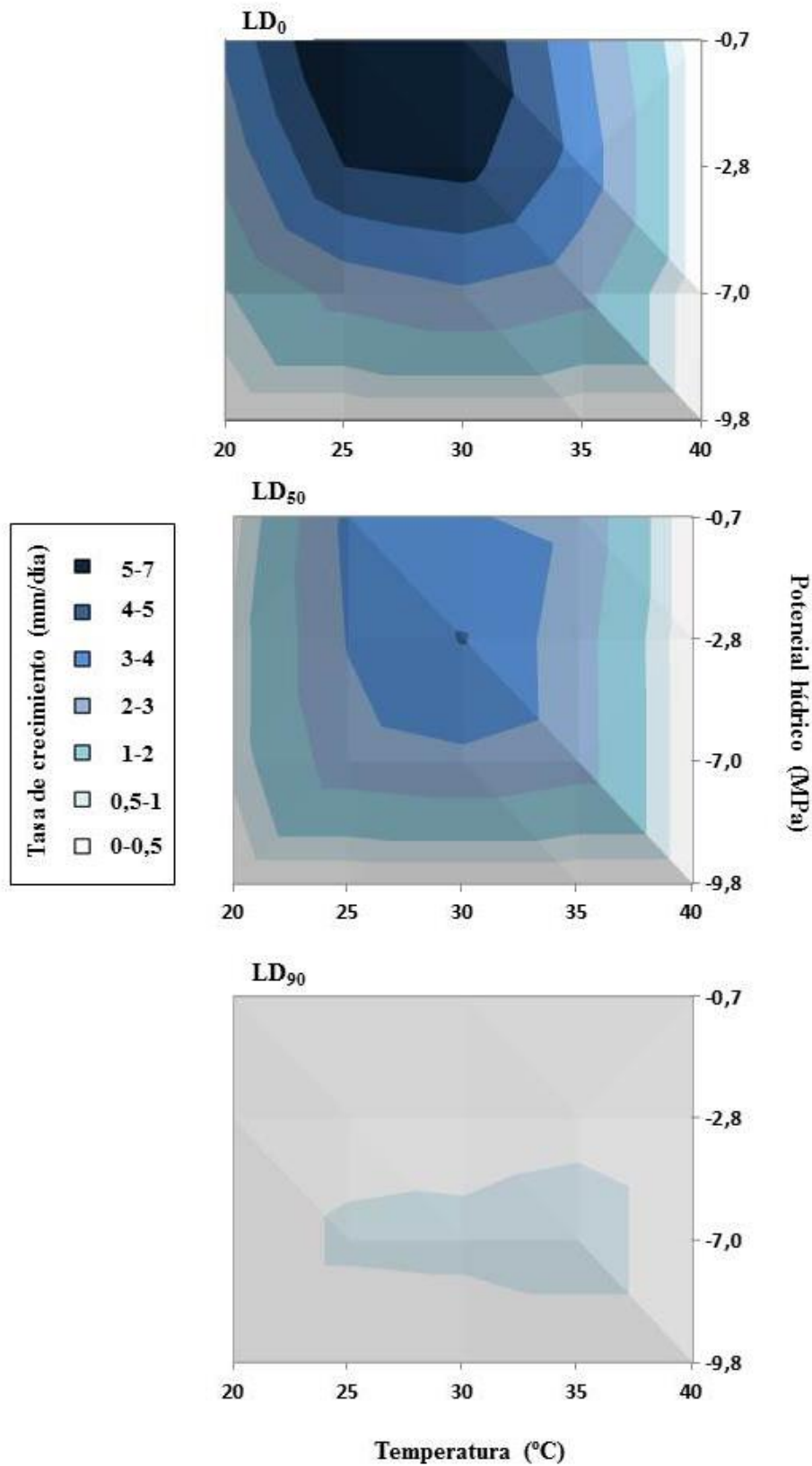


Figura 4. Perfiles bidimensionales que muestran el efecto de la temperatura y el potencial hídrico sobre la tasa de crecimiento de la cepa FvA, cultivada en medio sólido inductor de la síntesis de fumonisinas durante 10 días, en ausencia de benomilo (arriba) o con las dosis LD₅₀ (centro) y LD₉₀ (abajo). La tasa de crecimiento en cada una de las condiciones está determinada por el valor medio de las tres réplicas.

El benomilo redujo la tasa de crecimiento del hongo. Sin embargo, en los tratamientos en los que se aplicó el fungicida (figuras 5 y 6), la temperatura y particularmente el potencial hídrico, comprometieron la eficacia de éste, especialmente en los tratamientos con dosis LD₅₀ (figura 5): mientras que la dosis LD₅₀ del fungicida redujo el crecimiento a la mitad en las condiciones de 25-30°C y -0,7MPa, la eficacia del mismo tratamiento disminuyó a -2,8MPa, reduciendo el crecimiento menos del 50%. Además con esta misma dosis, no se observó reducción alguna del crecimiento a -7,0MPa (excepto a 20°C). Sin embargo, en el caso de la dosis LD₉₀, solamente el potencial hídrico menor (-7,0MPa) redujo la eficacia del fungicida causando una reducción del crecimiento con valores menores del 90% (tabla 4).

Temperatura	Potencial Hídrico				Potencial Hídrico			
	LD ₅₀	-0,7	-2,8		-7,0	LD ₉₀	-0,7	-2,8
20°C	91,2%	72,8%	30,1%		20°C	100%	100%	100%
25°C	48,7%	38,6%	0%		25°C	100%	95,6%	73,1%
30°C	51,2%	23,7%	0,7%		30°C	100%	96,8%	75,8%
35°C	14,3%	33,9%	0%		35°C	100%	92,3%	61%

Tabla 4. Reducción del crecimiento, los valores se expresan en porcentaje. El valor que aparece en cada caso se refiere a la reducción observada en los medios con fungicida partiendo del valor de ese mismo experimento sin fungicida (LD₀).

En cuanto a la temperatura, pudimos observar que en los tratamientos con benomilo, 20°C produce un efecto mayor al reducir la tasa de crecimiento que cualquier otra temperatura empleada a cualquier valor de potencial hídrico probado. No se observó crecimiento fúngico en el tratamiento con LD₉₀ a 20°C y -0,7MPa.

4.3.2. Efecto de la temperatura, el potencial hídrico y el benomilo sobre la expresión relativa de los genes *FUM1* y *FUM19*

En la figura 7 se muestran los resultados obtenidos al analizar la expresión relativa de los genes *FUM1* y *FUM19* de la cepa FvA en los distintos tratamientos (LD₀, LD₅₀ y LD₉₀) y las diferentes condiciones de temperatura y potencial hídrico.

Como indicamos en el apartado anterior, se realizaron dos experimentos de RT-PCR a tiempo real independientes, en dos placas de PCR diferentes, en los cuales se amplificaron los genes *FUM1* y *TUB2* en uno de ellos, y *FUM19* y *TUB2* en el otro. Para obtener los resultados finales de expresión de los genes, los valores de los C_T obtenidos de cada uno de los genes problema se normalizaron con los valores de los C_T del gen constitutivo *TUB2* de su misma placa. Los valores de C_T del gen *TUB2* fueron

significativamente homogéneos en todas las condiciones ensayadas, lo que confirma su validez como control endógeno.

Además, como se puede observar en la figura 7, los valores de expresión de los genes problema vienen representados en relación a un calibrador elegido. En nuestro caso se eligieron como calibradores los tres valores de expresión obtenidos en los experimentos sin benomilo (LD₀) y a 20°C, para cada potencial hídrico. A estos calibradores se les asignó el valor 1. Los resultados son la media de tres repeticiones independientes.

Los resultados obtenidos para el análisis de expresión del gen *FUM1* indicaron que, en general, el tratamiento con benomilo produce una reducción de la expresión muy marcada. Solamente hubo inducción estadísticamente significativa de la expresión del gen en el tratamiento con LD₅₀ a 20°C y -0,7MPa (figura 7). En todos los casos, la temperatura de 35°C tuvo un efecto significativamente negativo en la expresión del gen *FUM1* en *F. verticillioides*.

El ANOVA multifactorial realizado para analizar el efecto de cada factor (dosis de benomilo, potencial hídrico y temperatura) y sus interacciones sobre el gen *FUM1*, mostró efectos estadísticamente significativos para cada factor por separado, así como para las interacciones dosis x potencial hídrico y dosis x potencial hídrico x temperatura (tabla 5).

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Media Cuadrática	Estadístico F-Snedecor
Dosis	2	336,778	23,032*
Potencial Hídrico	2	268,678	20,306*
Temperatura	3	120,772	6,285*
Dosis x Potencial	4	28,565	3,308*
Dosis x Temperatura	6	1,693	0,206
Potencial Hídrico x Temperatura	6	13,231	1,532
Dosis x Potencial Hídrico x Temperatura	12	8,636	31,307***

Tabla 5. ANOVA multifactorial mostrando el efecto del potencial hídrico (-0,7; -2,8 y -7,0 MPa), de la temperatura (20, 25, 30 y 35°C) y de la dosis de benomilo (LD₀, LD₅₀ y LD₉₀), así como sus interacciones, sobre la expresión del gen *FUM1* de FvA. Estadístico F-Snedecor: * Significativo para p<0,05; ** Significativo para p<0,01; *** Significativo para p<0,001.

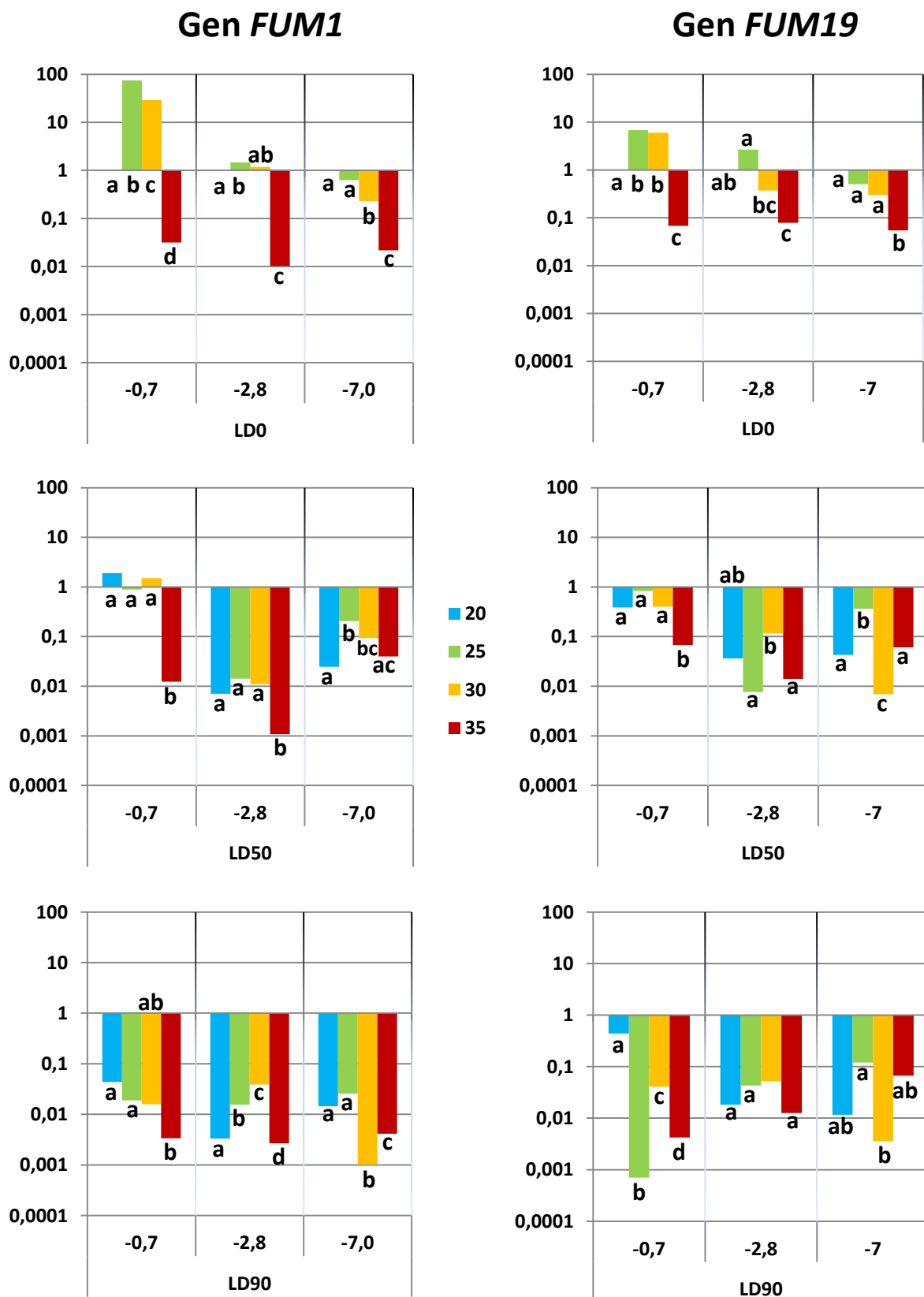


Figura 7. Expresión relativa de los genes *FUM1* (columna de la izquierda) y *FUM19* (columna de la derecha) en los tratamientos con dosis de benomilo LD₀, LD₅₀ y LD₉₀, aplicados en cultivos de *F. verticillioides* crecidos durante 10 días a 20, 25, 30, 35 °C y potencial hídrico de -0,7, -2,8 y -7,0 MPa. Los valores representan el número de veces que se expresó cada gen en comparación con su calibrador (cultivos de LD₀ y 20°C para cada valor de potencial hídrico), a los cuales se dio valor 1,00. Cada resultado representa la media de tres réplicas independientes. Los resultados de los tests HSD de Tukey obtenidos se indican mediante letras en las barras de valor (resultados para. Letras diferentes indican diferencias significativas para un valor de P<0,05).

A continuación, se realizó un ANOVA bidireccional de los factores (tabla 6) así como los tests HSD de Tukey para cada dosis (figura 7). Así se observó que en todas las dosis de fungicida, la interacción entre temperatura y potencial tuvo un efecto significativo en la expresión de *FUM1*. Hay que indicar que el test HSD de Tukey se realizó por cada dosis, temperatura y potencial hídrico separadamente siempre que el valor P de su interacción fue significativo. Letras diferentes indican diferencias con $P < 0,05$.

En el caso de la expresión del otro gen problema *FUM19*, no se observó inducción en ninguno de los tratamientos, obteniéndose un patrón similar al del gen *FUM1* (figura 7). Al igual que para el gen *FUM1*, la temperatura de 35°C tuvo también un efecto significativamente negativo en la expresión de este gen. En este caso, el ANOVA multifactorial llevado a cabo mostró efectos estadísticamente significativos para el factor dosis de benomilo, así como para la interacción entre los tres factores (tabla 7).

Fuente de Variación ED ₀	Grados de Libertad	Media Cuadrática	Estadístico F-Snedecor
Temperatura	3	107,552	1835,583***
Potencial Hídrico	2	110,958	1893,708***
Temperatura x Potencial Hídrico	6	11,973	204,344***

Fuente de Variación ED ₅₀	Grados de Libertad	Media Cuadrática	Estadístico F-Snedecor
Temperatura	3	31,770	88,783***
Potencial Hídrico	2	22,728	63,514***
Temperatura x Potencial Hídrico	6	8,728	24,390***

Fuente de Variación ED ₉₀	Grados de Libertad	Media Cuadrática	Estadístico F-Snedecor
Temperatura	3	10,694	26,011***
Potencial Hídrico	2	192,124	467,293***
Temperatura x Potencial Hídrico	6	9,803	23,844***

Tabla 6. ANOVA bidireccional de los factores temperatura, potencial hídrico y su interacción por cada una de las dosis (LD₀, LD₅₀ y LD₉₀) respecto a la expresión del gen *FUM1* de FvA.
F-Snedecor: * Significativo para $p < 0,05$; ** Significativo para $p < 0,01$; *** Significativo para $p < 0,001$.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Media Cuadrática	Estadístico F-Snedecor
Dosis	2	206,758	19,050**
Potencial Hídrico	2	46,203	2,400
Temperatura	3	28,681	1,947
Dosis x Potencial	4	16,120	1,048
Dosis x Temperatura	6	10,854	0,706
Potencial Hídrico x Temperatura	6	19,255	1,252
Dosis x Potencial Hídrico x Temperatura	12	15,376	15,229***

Tabla 7. ANOVA multifactorial mostrando el efecto del potencial hídrico (-0,7; -2,8 y -7,0 MPa), de la temperatura (20, 25, 30 y 35°C) y de la dosis de benomilo (LD0, LD50 y LD90), así como sus interacciones, sobre la expresión del gen *FUM19* de FvA. Estadístico F-Snedecor: * Significativo para $p < 0,05$; ** Significativo para $p < 0,01$; *** Significativo para $p < 0,001$.

El posterior ANOVA bidireccional de los factores realizado (tabla 8) y los test HSD de Tukey para cada dosis (figura 7), mostraron un efecto significativo en la interacción temperatura x potencial hídrico para cada una de las dosis (LD₀, LD₅₀ y LD₉₀).

Fuente de Variación ED ₀	Grados de Libertad	Media Cuadrática	Estadístico F-Snedecor
Temperatura	3	40,961	63,342***
Potencial Hídrico	2	17,590	27,201***
Temperatura x Potencial Hídrico	6	5,240	8,103***

Fuente de Variación ED ₅₀	Grados de Libertad	Media Cuadrática	Estadístico F-Snedecor
Temperatura	3	4,476	7,284***
Potencial Hídrico	2	0,474	0,771
Temperatura x Potencial Hídrico	6	13,346	21,722***

Fuente de Variación ED ₉₀	Grados de Libertad	Media Cuadrática	Estadístico F-Snedecor
Temperatura	3	4,952	2,801
Potencial Hídrico	2	60,379	34,150***
Temperatura x Potencial Hídrico	6	31,421	17,772***

Tabla 8. ANOVA bidireccional de los factores temperatura, potencial hídrico y su interacción por cada una de las dosis (LD₀, LD₅₀ y LD₉₀) respecto a la expresión del gen *FUM19* de FvA. F-Snedecor: * Significativo para $p < 0,05$; ** Significativo para $p < 0,01$; *** Significativo para $p < 0,001$.

Además, se observó una correlación positiva entre las expresiones de *FUM1* y *FUM19*, siendo la ecuación de la regresión lineal:

$$FUM19 = 3,055 + 0,618427 \times FUM1$$

con un coeficiente de correlación de 0,736185. Este resultado fue estadísticamente significativo ($p=0,000$).

4.4. Discusión

Tanto la temperatura como el estrés hídrico, son dos de los factores ambientales que más condicionan el crecimiento fúngico, así como la capacidad del hongo para producir toxinas (Marín *et al.*, 2010b). El estudio de estos factores mediante experimentos *in vitro* permite conocer y predecir la distribución de las distintas especies, así como sus respuestas frente a diferentes condiciones ambientales. Esto nos lleva a poder elaborar una predicción sobre el riesgo potencial de encontrar toxinas en los cultivos, por ejemplo, en los cereales. Además, el estudio combinado de estos factores junto con fungicidas a distintas dosis, permite predecir la eficacia de éstos, tanto en la reducción del crecimiento fúngico, como en la disminución, o aumento, de toxina producida a determinadas condiciones climáticas.

En este capítulo se ha estudiado la eficacia del benomilo sobre el crecimiento de *F. verticillioides* y la expresión relativa de los genes *FUM1* y *FUM19* a diferentes temperaturas y potenciales hídricos. Para ello en primer lugar se calcularon las dosis letales LD₅₀ y LD₉₀ de benomilo, con el objetivo de conocer las concentraciones de fungicida que afectan a esta especie en concreto. En estudios previos se ha probado este fungicida en el control de otras especies del género *Fusarium* en diferentes hospedadores (Amini y Sidovich, 2010; Mamza *et al.*, 2008; McMahan *et al.*, 2001), pero hasta el momento existen pocos datos del efecto que tiene sobre *F. verticillioides*. Todos estos estudios anteriores mostraron reducción del crecimiento de *Fusarium*, aunque con variaciones en la eficacia del fungicida dependiendo de la especie fúngica analizada. Por ejemplo, en Ivic *et al.*, (2011) se establecieron los valores de LD₅₀ para la carbendazima en 0,47-0,6 mg/L, valores algo menores aunque similares a los de nuestro trabajo (valor LD₅₀ establecido en 0,93 mg/L).

Otros estudios han sido realizados utilizando diferentes fungicidas. Así hemos podido comprobar que las concentraciones de benomilo LD₅₀ y LD₉₀ determinadas en este trabajo se encontraron en el rango de otros fungicidas, por ejemplo el tebuconazol probado sobre *F. verticillioides* y *F. proliferatum* (Marín *et al.*, 2013). En este caso, los valores de LD₅₀ no fueron muy diferentes para *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, (0,35 mg/L y 0,50 mg/L respectivamente), mientras que las concentraciones requeridas para la LD₉₀ difirieron claramente entre las dos especies (3,50mg/L y 10,00 mg/L respectivamente), lo cual sugeriría una menor susceptibilidad a este fungicida por parte de *F. proliferatum*. En otro estudio realizado, los valores de LD₅₀ y LD₉₀ encontrados para *F. langsethiae* utilizando también tebuconazol y otros azoles estaban en rangos de 0,06-0,9 mg/L y 1,3-8,2 mg/L respectivamente (Mateo *et al.*, 2011). Si bien, aunque como hemos visto existen estudios sobre la eficacia de fungicidas, hay poca información disponible sobre la interacción de éstos con los factores ambientales.

Los gráficos de crecimiento elaborados con los datos de *F. verticillioides* sometido a diferentes concentraciones de benomilo, mostraron que la eficacia de este fungicida se ve muy comprometida por las condiciones ambientales. Debemos indicar que el patrón de crecimiento obtenido en las condiciones control (sin fungicida) fue similar al de estudios previos en los que se llevaron a cabo experimentos del mismo tipo (Jurado *et al.*, 2008, Marín *et al.*, 2010a, 2013). En las figuras 4, 5 y 6 se observa que *F. verticillioides* fue capaz de crecer en un amplio rango de condiciones ambientales. La aplicación del fungicida redujo su tasa de crecimiento, aunque la eficacia de éste se vio afectada por la temperatura y sobre todo por el potencial hídrico. Además, niveles moderados de estrés hídrico (-2,8MPa) redujeron la eficacia de la dosis LD₅₀ de benomilo, observándose un efecto del fungicida menor (<50%) que el obtenido con la misma dosis en condiciones control de potencial hídrico (-0,7 MPa) y, de la misma manera, en la dosis LD₉₀, la eficacia fue menor del 90% para los niveles más altos de estrés hídrico (-7,0MPa). Estos resultados fueron similares a los descritos por Marín *et al.*, (2013) para tebuconazol en *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, donde se observan los mismos valores de reducción de la eficacia que en este experimento. Por tanto, como se puede observar, las condiciones ambientales y particularmente el estrés hídrico, afectarían negativamente a la eficacia de los fungicidas en el control del crecimiento, si bien los efectos específicos dependerían del fungicida y de la especie de *Fusarium* probada. Como se observa en la tabla 4, las dosis LD₅₀ y LD₉₀ de fungicida aplicadas en

las condiciones óptimas del crecimiento fúngico (25-30°C y -0,7 MPa) sí lograron una reducción del 50% ó 90% respectivamente, mientras que al alejarse de estos valores de crecimiento óptimos, el fungicida comenzó a perder eficacia, llegando en ocasiones a no lograr frenar el crecimiento fúngico (condiciones de LD₅₀ a 25 y 35°C y -7,0 MPa). Estos datos resaltan la importancia de elegir el fungicida adecuado frente a la especie a controlar, pero también la de tener en cuenta que su eficacia podría estar comprometida según las condiciones ambientales.

La expresión del gen *FUM1* en las condiciones control sin fungicida fue también consistente con estudios ecofisiológicos realizados anteriormente (Marín *et al.*, 2013), lo que confirma la reproducibilidad de esta estrategia experimental. El rango de condiciones permisivas en este caso fue menor que el obtenido para el crecimiento. Es interesante destacar que a temperatura elevada (35°C) existe un fuerte efecto negativo en la expresión del gen *FUM1*, que contrasta con su efecto sobre el crecimiento. Esto indicaría que la temperatura de 35°C (prevista en regiones mediterráneas en escenarios de cambio climático) permitiría el crecimiento fúngico, por lo que la distribución fúngica no se vería afectada por este cambio, pero sin embargo reducirá la síntesis de fumonisinas y, por lo tanto, su riesgo.

En general, el benomilo redujo la expresión del gen *FUM1* (figura 7), aunque el grado de esta reducción depende de las condiciones ambientales, sobre todo en los tratamientos con la dosis LD₅₀, en la que se observó una leve, aunque significativa, inducción relativa de la expresión de este gen a 20°C y -0,7 MPa. Esta inducción sin embargo se puede considerar baja en comparación con la observada para el fungicida tebuconazol en las mismas condiciones (Marín *et al.*, 2013). Esto podría ser debido a los diferentes mecanismos de acción de los dos fungicidas. El tebuconazol actúa sobre la síntesis del ergosterol (Siegel, 1981) y el benomilo se une a los microtúbulos e interfiere con diferentes funciones celulares como la división nuclear o el transporte intracelular (Whitehead, 1996), con mayores consecuencias sobre la expresión génica de estos genes menos cruciales para la supervivencia del hongo.

Otros estudios realizados con diferentes fungicidas (tebuconazol y procloraz) probados sobre la especie *F. langsethiae* mostraron también un incremento en la producción de toxina al añadir dosis bajas (Mateo *et al.*, 2011), las cuales fueron percibidas como situación de estrés e indujeron su expresión. Dosis más elevadas serían

tóxicas y, en última instancia, afectarían negativamente a la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de la toxina. Sin embargo, en el mismo artículo mencionado anteriormente, se describe siempre una reducción de las toxinas T2 y HT-2 producidas por *F. langsethiae* al aumentar la dosis de otro fungicida, el fenpropimorf, y en ningún caso un aumento de estas toxinas, indiferentemente de la dosis empleada. Estos resultados indican la importancia de incluir el análisis de esta respuesta al estrés y las condiciones ambientales para poder evaluar correctamente el efecto y el uso de los distintos fungicidas, ya que en determinadas condiciones la utilización de la cantidad correcta de fungicida puede ser especialmente importante para evitar la estimulación de la producción de micotoxinas.

En general, el gen *FUM19* mostró un patrón de expresión génica similar al del gen *FUM1* en todas las dosis de fungicida (control, LD₅₀ y LD₉₀) (figura 7). La correlación positiva hallada entre *FUM1* y *FUM19* se corresponde con estudios anteriores ya mencionados que demostraron la expresión coordinada de estos genes de la biosíntesis de fumonisinas (López-Erassquín *et al.*, 2007; Proctor *et al.*, 1999; 2003). Sin embargo, no se observó inducción de *FUM19* en ninguno de los tratamientos en que se añadió benomilo. Esto podría sugerir que este gen no está implicado en la respuesta al estrés que puede observarse en presencia del fungicida.

En conclusión, el benomilo mostró una eficacia elevada en la reducción tanto del crecimiento como de la síntesis de fumonisinas y, por tanto, puede ser empleado para el control fúngico. A pesar de ello y como indican los resultados, es importante tener en cuenta las diferentes respuestas del hongo al estrés ambiental, ya que pueden comprometer la eficacia de los fungicidas tanto sobre el crecimiento del hongo, como sobre la producción de toxinas, existiendo determinadas condiciones ambientales y de concentración del fungicida en las cuales se reduciría la presencia del hongo pero podrían favorecer la producción de la toxina. En estos casos, la aplicación del benomilo sería poco eficaz y no aconsejable desde un punto de vista ambiental. Además, con estos resultados podemos indicar que en los escenarios probados en este estudio, que corresponden a los previstos debidos al cambio climático en regiones mediterráneas (temperaturas de 30-35°C y potenciales hídricos de -2,8 MPa y menores) producirían un impacto negativo adicional en la seguridad alimentaria al reducir la eficacia de los antifúngicos utilizados contra el crecimiento de hongos patógenos y toxígenos. Por ello, serían recomendables estrategias de control que combinen adecuadamente, en función

de las características analizadas en este estudio, la aplicación de este antifúngico y otros para conseguir la máxima eficacia con dosis seguras desde el punto de vista ambiental.

Capítulo 5

Capítulo 5. Análisis de la micobiota toxígena asociada a trigo blando (*Triticum aestivum*) en dos regiones climatológicas españolas

5.1. Introducción

Los cereales suponen una parte muy importante de la dieta básica humana y animal. Su contaminación por especies toxígenas de hongos ocasiona enormes pérdidas tanto a las industrias agrícolas y de procesado de alimentos, como al sector ganadero. Además, la contaminación por micotoxinas de los productos alimenticios, por lo general estables y resistentes a los tratamientos físicos y químicos que pretenden su eliminación, deriva en un importante problema de salud pública que ha llevado a la regulación de los contenidos máximos de estas toxinas mediante diferentes legislaciones emitidas por las autoridades y organismos responsables de la Seguridad Alimentaria. Los problemas derivados del elevado coste de los análisis de toxinas y la imposibilidad de eliminarlas sin afectar a las propiedades de las materias primas de una forma eficaz y a bajo coste, ha estimulado la investigación dirigida a conocer el origen de la contaminación: la biología de los hongos productores y las condiciones y factores que determinan su proliferación y síntesis de toxinas. Estos aspectos son clave para la prevención y el diseño de estrategias básicas que reduzcan los niveles de contaminación fúngica y de toxina producida.

En las sucesivas etapas de la cadena alimentaria, la contaminación se origina por distintos hongos. En la etapa de precosecha, los géneros más importantes son *Fusarium* y *Alternaria*, encuadrados en este grupo porque contaminan principalmente a sus hospedadores durante el período en el campo. No obstante, los hongos de estos géneros pueden seguir desarrollándose después de la cosecha si las condiciones son favorables, y de igual manera, seguir sintetizando micotoxinas. El género *Fusarium* presenta una amplia distribución geográfica y afecta a numerosas especies vegetales de interés agronómico. Las especies principales de este género que contaminan los cereales se detallan en el apartado 1.1.5 del capítulo 1. En etapas posteriores (post-cosecha), durante el almacenamiento de la materia prima, la elaboración o la conservación de los alimentos, otros géneros fúngicos, por ejemplo *Aspergillus* y *Penicillium*, se consideran los principales responsables de la producción de toxinas. Estos hongos, aunque son considerados generalmente post-cosecha, son también capaces de crecer sobre el cereal

antes de su recolección. Las principales micotoxinas que suponen un riesgo en cereales se encuentran detalladas en la tabla 1. La presencia simultánea de varias toxinas puede presentar un riesgo adicional, incrementándose sus efectos negativos sobre la salud.

Micotoxina	Especie fúngica	Sustrato principal	Principales efectos tóxicos
Aflatoxina	<i>A. flavus</i>	Cereales, leche, frutos secos	Cancerígena
Citrinina	<i>Penicillium sp.</i>	Cereales y frutas	Nefrotóxica, inmunosupresora
Fumonisinias	<i>F.verticillioides, F. proliferatum</i>	Cereales (Maíz)	Carcinógena, hepatotóxica
Patulina	<i>P. expansum</i>	Cereales, frutas, quesos	Neurotóxica, afecciones pulmonares, hepatotóxica, inmunosupresora
Tricotecenos A	<i>F. poae, F. sporotrichioides, F. equiseti</i>	Cereales	Afecciones sistema digestivo, circulatorio, hematotóxicas, inmunotóxicas
Tricotecenos B	<i>F.graminearum, F. culmorum, F.equiseti</i>	Cereales	Afecciones sistema digestivo, circulatorio, nervioso y piel
Zearalenona	<i>F.graminearum, F.culmorum, F. equiseti</i>	Cereales	Afecciones del sistema reproductivo
Ocratoxina A	<i>A. ochraceus, A. niger, A. carbonarius, P verrucosum</i>	Cereales, frutos secos, cafés, vino, cerveza	Nefrotóxica, hepatotóxica, inmunosupresora, neurotóxica, teratogénica, cancerígena

Tabla 1. Principales micotoxinas asociadas a cereales. Se indican las especies que las producen, los alimentos que suelen presentar contaminación y los efectos tóxicos más representativos. Adaptada de González-Jaén *et al.*, 2008.

En la tabla 2 del capítulo 1, apartado 1.1.1 aparecen las principales especies de *Fusarium* asociadas a cereales y las toxinas que producen. De manera general, las especies *F. verticillioides* y *F. proliferatum* están comúnmente asociadas al maíz (Logrieco *et al.*, 2003), aunque también pueden afectar a otros cereales como el trigo o la cebada (Chehri *et al.*, 2010; Conner *et al.*, 1996; Desjardins *et al.*, 2007; Tančić *et al.*, 2012), teniendo importancia al ser especies productoras de fumonisinias y moniliformina. Los cereales de grano pequeño son además hospedadores habituales por todo el mundo de otras especies de *Fusarium* como *F. avenaceum*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poae* y *F. sporotrichioides* (Glenn, 2007).

En 2014 se produjeron en España un total de 18.907.558 toneladas de cereales. De ellas, la cebada, el trigo y el maíz representaron el 36,80%, 33,47% y 24,66% respectivamente (datos obtenidos de Cooperativas Agro-Alimentarias de España). En la

tabla 2 se detalla la producción de cereales por especie de los últimos años. Estas tres especies, las cuales se cultivan en grandes cantidades, son altamente susceptibles de ser contaminadas por las principales especies de hongos toxígenos. Aunque en los últimos años se han realizado estudios epidemiológicos en cereales y sus productos derivados en el sur de Europa (Araguas *et al.*, 2003; González-Jaén, 2008; Jiménez y Mateo, 2001; Jurado *et al.*, 2006a; Mateo *et al.*, 2001; Sanchís *et al.*, 2001), la información disponible sobre las especies micotoxígenas de *Fusarium* que contaminan cereales es aún escasa en España

Producción española de cereales (tn)				
	2014	2013	2012	2011
Trigo blando	5.651.733	6.924.946	4.360.019	6.100.150
Trigo duro	677.857	1.006.259	404.547	834.521
Cebada	6.958.560	9.829.015	5.662.794	8.301.583
Maíz	4.096.012	4.334.540	3.810.729	3.722.200
Avena	815.799	933.509	734.330	1.123.690
Centeno	245.075	440.185	259.271	394.177
Triticale	462.522	389.283	216.822	305.074
Total cereales	18.907.558	23.857.737	15.448.512	20.781.394

Tabla 2. Producción española de los cereales trigo, cebada, maíz, avena, centeno y *Triticale* en los años 2011-2014. Se indican las cantidades producidas de cada cereal por separado, así como del total de cada año. Fuente: Cooperativas Agro-alimentarias de España.

Las especies de *Fusarium*, así como el resto de hongos toxígenos, se distribuyen geográficamente dependiendo de los factores climáticos, de las diversas prácticas agrícolas (rotación de cultivos, arado en profundidad), o bien de los diferentes hospedadores y sus habilidades para colonizarlos (Bottalico y Perrone, 2002; Doohan *et al.*, 2003). En efecto, estudios previos en España indican distribuciones regionales distintas, variaciones anuales y, en menor medida, influencia del sustrato (Jurado *et al.*, 2006a; Soldevilla *et al.*, 2005). Los efectos de los distintos factores ambientales y del hospedador se pueden abordar de forma individualizada en el laboratorio como se ha descrito en los capítulos anteriores. Sin embargo, es imprescindible el estudio en campo o en almacén para conocer la distribución real de las especies de riesgo toxígeno y de la microbiota acompañante, cuyas interacciones pueden afectar al resultado final. Así mismo, conocer la dinámica de la microbiota en precosecha y post-cosecha para identificar puntos críticos que nos permitan predecir el riesgo potencial de contaminación, o intervenir a tiempo para reducir los niveles finales de hongos

toxígenos y de sus toxinas. Para ello, los estudios epidemiológicos constituyen un enfoque fundamental. La compleja taxonomía de los géneros fúngicos implicados y el tiempo y laboriosidad que requiere el aislamiento y la identificación de las distintas especies mediante los medios microbiológicos convencionales hacen inviable su utilización a gran escala en escrutinios rutinarios en campo o almacén. La utilización de técnicas moleculares permite alcanzar niveles de sensibilidad, especificidad, reproducibilidad y rapidez muy elevados, además de permitir el manejo de gran cantidad de muestras en poco tiempo. La integración de ambos procedimientos ha resultado ser una estrategia muy eficaz (Gil-Serna *et al.*, 2013; González-Jaén *et al.*, 2008).

Estudios previos en nuestro laboratorio permitieron desarrollar protocolos específicos de diagnóstico basados en la PCR de las principales especies toxígenas de los géneros *Fusarium* y *Aspergillus* que se resumen en la tabla 3. Estos métodos permiten el procesado directo de un gran número de muestras, sin ser necesario el aislamiento previo de la especie fúngica contaminante. La sensibilidad de estos protocolos resultó ser del 85-100% en contaminaciones superiores a 6,5 ppm y del 50% en contaminaciones inferiores a 2,9 ppm. Además, se comprobó su valor estimado, así como sus limitaciones, para predecir el riesgo de micotoxinas presentes (Jurado *et al.*, 2006b).

El objetivo del presente capítulo es el conocimiento de la distribución y dinámica las especies fúngicas, incluidas las toxígenas, en un conjunto de variedades cultivadas en dos regiones climáticas distintas en las mismas condiciones agronómicas y conociendo el registro de parámetros ambientales. El experimento se realizó en colaboración con las Dras Fanny Álvaro y Josefina Sillero, en las estaciones experimentales el Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (IRTA) de Cataluña y el Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA), respectivamente. Este objetivo se detalla en los siguientes:

1. Análisis de semillas en precosecha y poscosecha de la micobiota total presente mediante métodos convencionales y determinación de los índices de riqueza específica y biodiversidad.

2. Análisis directo de especies toxígenas mediante métodos específicos de PCR en las mismas muestras e integración de resultados de ambos objetivos.
3. Obtención de parámetros ambientales (pluviosidad y temperatura) desde la floración al momento de la cosecha.

5.2. Material y Métodos

5.2.1. Material biológico analizado

Las semillas analizadas en este capítulo proceden del Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (IRTA) de Cataluña y el Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA). Se trata de 80 muestras de trigo blando primavera (*Triticum aestivum* L.) que proceden de las estaciones experimentales de Gimenells, en la provincia de Lleida (Cataluña) y Santaella, en la provincia de Córdoba (Andalucía) (figura 1).



Figura 1. Regiones de procedencia de las semillas analizadas en este capítulo.

En total fueron 20 muestras recogidas de 20 parcelas experimentales. Son muestras de 7 variedades distintas (07THES, 08THES, 09THES, 05THES, T2004, Califa Sur y Arthur Nick), que fueron sembradas en diferentes parcelas de ambas localidades (figura 2). Se recogieron espigas al azar en los momentos de precosecha y post-cosecha, y finalmente se enviaron 200 gramos de espigas por cada variedad, momento de recogida y lugar de procedencia. Los cultivos de de Gimenells y Santaella

fueron sembrados el 25 y el 23 de noviembre de 2010 respectivamente. Todas las muestras se cosecharon en el año 2011 y se cultivaron en las mismas condiciones.

Todas las muestras analizadas fueron recogidas en sus respectivos centros de procedencia, y almacenadas en cámara frigorífica a 15°C hasta su envío al departamento de Genética de la UCM. Las muestras se enviaron en sobres bien identificados y a su llegada, las espigas se almacenaron a -80°C en bolsas de plástico estériles. Al comenzar el análisis, las espigas se desecaron a 65°C durante 7 días. Cumplido este tiempo se separó el grano de la espiga y cada muestra se dividió, recogiendo las semillas en dos sobres: el primero, con 10 g de semillas, se conservó a -80°C para los posteriores análisis moleculares; el segundo sobre, con el resto de la muestra (~180 g de semillas) se destinó al análisis microbiológico tradicional y se conservó a 4°C en cámara frigorífica.

5.2.2. Diagnóstico microbiológico tradicional: aislamiento e identificación de cepas fúngicas. Cálculo de los índices de biodiversidad

Las muestras destinadas al diagnóstico microbiológico tradicional fueron enviadas al profesor Carlos Soldevilla del Departamento de Zoología y Patología Forestal de la Escuela de Ingeniería Forestal y del Medio Natural de la Universidad Politécnica de Madrid, donde se llevó a cabo su análisis. Para ello, se tomó como referencia el método recomendado por las Reglas Internacionales para Ensayos de Semillas adoptado por el Congreso de la Asociación Internacional de Ensayos de Semillas (ISTA, 1999; 2013), aunque con menor número de estas ya que el objetivo no era un verdadero test de germinación si no conseguir colonias miceliarias. En total se analizaron unas 150 semillas por muestra, sembradas en tres medios de cultivo diferentes (50 semillas en cada medio). Los medios de cultivo elegidos fueron el agar PDA (medio agar patata dextrosa), el agar czapeck y el agar verde malaquita, estos dos últimos modificados según las recomendaciones del Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Lleida. Estos medios de cultivo garantizan la formación de micelios y estructuras de reconocimiento de un amplio espectro de especies fúngicas. Se analizaron 3000 semillas por lugar de procedencia y momento de recogida, lo que hace un total de 12000 semillas empleadas en el ensayo (figura 2).

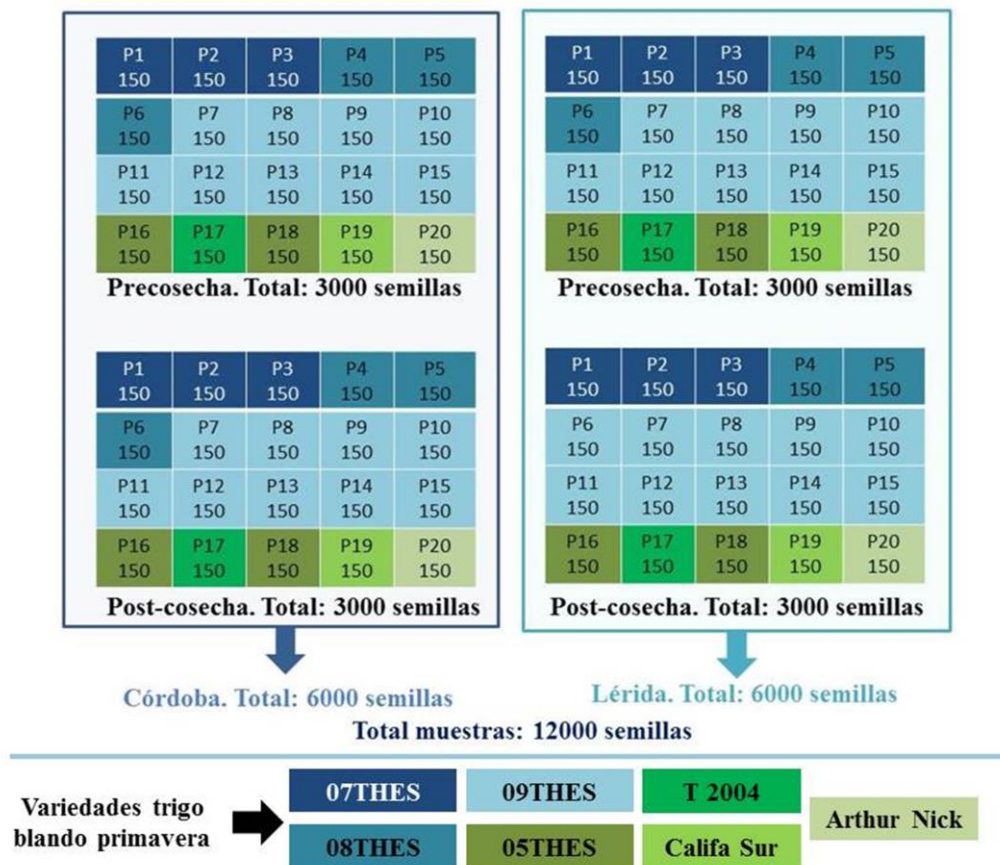


Figura 2. Diagrama de las semillas analizadas en este capítulo. 150 semillas por cada parcela analizada tanto de precosecha como de post-cosecha. En total fueron 6000 semillas por localidad, que suman finalmente 12000 semillas. Colores diferentes indican variedades de trigo blando primavera distintas. En la parte inferior del diagrama aparecen los nombres de las variedades.

Las semillas se desinfectaron previamente a su siembra, para lo cual se lavaron 2 minutos en hipoclorito sódico al 3% y a continuación se les realizó dos lavados de 2 minutos en agua bidestilada. Posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente. El sembrado se realizó en campana de flujo laminar, colocándose entre 5 y 10 semillas en cada placa petri y, a continuación, se incubaron las placas a temperatura ambiente. Se realizaron lecturas del estado de las placas cada 7 días, a lo largo de 21 días. Las colonias fúngicas y bacterianas halladas durante este tiempo se repicaron a nuevas placas petri con medio PDA para su aislamiento e identificación. Para la identificación morfológica de las diferentes especies fúngicas presentes se utilizaron diversas obras generales (Barnett y Hunter, 1998; Carmichael *et al.*, 1980; Kiffer y Morelet, 1997; Smith *et al.*, 1992; Sutton *et al.*, 1998; Von Arx, 1981; Watanabe, 1994). Para la determinación de géneros con especies toxígenas se consultaron además textos más

específicos (Klich y Pitt, 1998; Nelson *et al.*, 1983; Pitt, 2000; Ramírez, 1982). Posteriormente, para comprobar que la identificación de los aislamientos pertenecientes al género *Fusarium* era correcta, se emplearon los protocolos moleculares de PCR convencional descritos anteriormente en Patiño *et al.* (2004), Jurado *et al.*, (2005, 2006b) y Wilson *et al.* (2004) para confirmar la identificación (tabla 3).

Por último, se realizó una estimación de la diversidad específica. Esta propiedad de las comunidades biológicas se relaciona con la variedad dentro de ellas. Se trata de la expresión de dos componentes: el número de especies presentes en la comunidad (riqueza de especies) y la manera en que se distribuyen esas especies que integran la comunidad (equitabilidad). Existen diversos índices de riqueza y de equitabilidad; los que combinan los dos parámetros se denominan índices de diversidad. En este trabajo se calcularon el índice de riqueza específica de Margalef (1958) y el índice de diversidad de Simpson (1949).

El índice de Margalef (R_1) mide la riqueza de especies de una comunidad, basándose en la relación entre el número total de especies (S) y el número de individuos de la muestra (n). Se calcula mediante la fórmula

$$R_1 = \frac{S - 1}{\ln(n)}$$

El índice de Simpson (D_{Si}) fue el primer índice de diversidad utilizado en ecología. Incorpora en un solo valor la riqueza específica y la equitabilidad, y se calcula mediante la ecuación:

$$D_{Si} = \sum_{i=1}^S p_i^2$$

Donde p_i es la abundancia proporcional de la especie i y representa la probabilidad de que un individuo de la especie i esté presente en la muestra. p_i se expresa como:

$$p_i = \frac{n_i}{N}$$

Siendo n_i el número de individuos de la especie i , y N el número total de individuos de todas las especies (S) de la comunidad. Este índice mide la probabilidad de encontrar dos individuos de la misma especie en dos “extracciones” sucesivas al azar sin reposición. En principio, esto constituye una propiedad opuesta a la diversidad, por lo

que se transforma mediante la siguiente ecuación para obtener una cifra correlacionada positivamente con la diversidad:

$$Si_D = 1 - D_{Si}$$

De manera que el índice de diversidad de Simpson (Si_D) indica la probabilidad de encontrar dos individuos de especies diferentes en dos “extracciones” sucesivas al azar sin reposición.

5.2.3. Diagnóstico molecular: procesamiento e identificación de cepas fúngicas

Los 10 g de cada muestra destinados al análisis molecular se trituraron hasta ser reducidos a polvo en un mortero utilizando nitrógeno líquido. A continuación se incubó 1g de cada una de estas muestras en matraces de 500 ml de medio líquido Sabouraud suplementado con cloranfenicol al 0,5% (Pronadisa, Madrid) durante 24 horas a 37°C en agitación (120 rpm). Tras la incubación, el contenido de los matraces se filtró con una bomba de vacío a través de papel Whatman nº1. La parte sólida se retiró y se conservó a -80°C hasta el momento de su análisis.

El material resultante del filtrado se trituró de nuevo en mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. A continuación se extrajo el DNA de cada muestra empleando 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 cuantificación del DNA extraído se realizó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop® ND1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, Delaware, EEUU).

El DNA total de cada muestra (200 ng) se sometió a las correspondientes reacciones de PCR para la identificación de las diferentes especies de *Fusarium* y *Aspergillus*. Para ello se llevaron a cabo todas las PCRs descritas en las tablas 3 y 4. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen de 25 µl, que contenía 3 µl de DNA problema a una concentración de 35 ng/µl y 22 µl de la mezcla compuesta de 15,55 µl de agua miliQ, 1,25 µl de cada cebador (20 µM), 0,2 µl de la enzima Taq polimerasa (5 U/µl), 2,5 µl de tampón de PCR 10x, 1 µl de MgCl₂ (50mM) y 0,25 µl de dNTPs (100 mM) (Ecogen, Barcelona, España).

Espece fúngica	Cebadores	Tamaño	Condiciones de amplificación
<i>F. proliferatum</i> ¹	Fp3-F: CGGCCACCAGAGGATGTG Fp4-R: CAACACGAATCGCTTCCTGAC	~230 pb	-1 ciclo de 85s a 94°C -25 ciclos de 35s a 95°C, 30s a 69°C y 30s a 72°C -1 ciclo de 5 min a 72°C
<i>F. verticillioides</i> ^{1,2}	Fps-F: CGCACGTATAGATGGACAAG VERT-2: CACCCGCAGCAATCCATCAG	~700 pb	-1 ciclo de 85s a 94°C -25 ciclos de 35s a 95°C, 30s a 65°C y 30s a 72°C -1 ciclo de 5 min a 72°C
<i>F. graminearum</i> ³	Fgr-F: GTTGATGGGTA AAAAGTGTG Fgc-R: CTCTCATATACCCTCCG	~500 pb	-1 ciclo de 85s a 94°C -25 ciclos de 35s a 95°C, 30s a 53°C y 30s a 72°C -1 ciclo de 5 min a 72°C
<i>F. equiseti</i> ³	Feq-F: GGCCTGCCGATGCGTC Feq-R: CGATACTGAAACCGACCTC	~990 pb	-1 ciclo de 85s a 94°C -30 ciclos de 35s a 95°C, 30s a 66°C y 30s a 72°C -1 ciclo de 5 min a 72°C
<i>F. culmorum</i> ³	Fcu-F: GACTATCATTATGCTTGCGAGAG Fgc-R: CTCTCATATACCCTCCG	~200 pb	-1 ciclo de 85s a 94°C -20 ciclos de 35s a 95°C, 30s a 54°C y 30s a 72°C -1 ciclo de 5 min a 72°C
<i>F. sporotrichioides</i> ³	Fps-F: CGCACGTATAGATGGACAAG Fsp-R: GTCAGAAGAGACGCATCCGCC	~400 pb	-1 ciclo de 85s a 94°C -25 ciclos de 35s a 95°C, 30s a 69°C y 30s a 72°C -1 ciclo de 5 min a 72°C
<i>F. poae</i> ³	Fps-F: CGCACGTATAGATGGACAAG Fpo-R: CAGCGCACCCCTCAGAGC	~400 pb	-1 ciclo de 85s a 94°C -25 ciclos de 35s a 95°C, 30s a 64°C y 30s a 72°C -1 ciclo de 5 min a 72°C
<i>F. langsethiae</i> ⁴	FlangF3: CAAAGTTCAGGGCGAAA ACT LanspoR1: TACAAGAAGACGTGGCGATAT	~310 pb	-1 ciclo de 85s a 95°C -5 ciclos de 30s a 95°C, 20s a 66°C y 45s a 72°C -5 ciclos de 30s a 95°C, 20s a 64°C y 45s a 72°C -25 ciclos de 30s a 95°C, 20s a 62°C y 45s a 72°C

Tabla 3. Protocolos de PCR molecular para identificar las especies de *Fusarium* que se indican. Se detallan los cebadores, el tamaño de la región amplificada y las condiciones de PCR necesarias. Todas las secuencias amplifican regiones IGS excepto la de la especie *F. langsethiae*, en la que se amplifica la región ITS.

¹Datos obtenidos de Jurado *et al.*, 2006b. ²Datos obtenidos de Patiño *et al.*, 2004. ³Datos obtenidos de Jurado *et al.*, 2005. ⁴Datos obtenidos de Wilson *et al.*, 2004.

Espece fúngica	Cebadores	Tamaño	Condiciones de amplificación
<i>A. carbonarius</i> ¹	CAR1: GCATCTCTGCCCTCGG CAR2: GGTTGGAGTTGTCCGGCAG	~420 pb	-1 ciclo de 4 min 30s a 95°C -25 ciclos de 30s a 95°C, 25s a 59°C y 40s a 72°C -1 ciclo de 5 min a 72°C
<i>A. parasiticus</i> ²	PAR1: GTCATGGCCGCCGGGGCGTC PAR2: CCTGGAAAAAATGGTTGTTTTGCG	~430 pb	-1 ciclo de 85s a 94°C -25 ciclos de 35s a 95°C, 30s a 65°C y 30s a 72°C -1 ciclo de 5 min a 72°C
<i>A. flavus</i> ³	FLA1: GTAGGGTTCCTAGCGAGCC FLA2: GGAAAAAGATTGATTTGCGTTC	~500 pb	-1 ciclo de 85s a 94°C -25 ciclos de 35s a 95°C, 30s a 53°C y 30s a 72°C -1 ciclo de 5 min a 72°C
<i>A. niger</i> ¹	ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG NIG2: GAAAGAATGGTTGGAAAACGTC	~400 pb	-1 ciclo de 85s a 94°C -30 ciclos de 35s a 95°C, 30s a 66°C y 30s a 72°C -1 ciclo de 5 min a 72°C
<i>A. steynii</i> ⁴	STEYF: CCACGCGGCCCGGGGGGAG STEYR: CGGGGGGACGAGGACCCAAC	~315 pb	-1 ciclo de 85s a 94°C -20 ciclos de 35s a 95°C, 30s a 54°C y 30s a 72°C -1 ciclo de 5 min a 72°C
<i>A. ochraceus</i> ⁴	OCRAF: CTTTTCTTTTAGGGGGCACAG OCRAR: CAACCTGGAAAAATAGTTGGTTG	~430 pb	-1 ciclo de 85s a 94°C -25 ciclos de 35s a 95°C, 30s a 69°C y 30s a 72°C -1 ciclo de 5 min a 72°C
<i>A. westerdijkiae</i> ⁴	WESTF: CTCCTTAGGGGTGGCACAG WESTR: CAACCTGATGAAATAGATTGGTTG	~430 pb	-1 ciclo de 85s a 94°C -25 ciclos de 35s a 95°C, 30s a 64°C y 30s a 72°C -1 ciclo de 5 min a 72°C

Tabla 4. Protocolos de PCR molecular para identificar las especies de *Aspergillus* que se indican. Se detallan los cebadores, el tamaño de la región amplificada y las condiciones de PCR necesarias. Todas las secuencias amplifican regiones ITS. ¹Datos obtenidos de Patiño *et al.*, 2004. ²Datos obtenidos de Sardiñas *et al.*, 2010. ³Datos obtenidos de González-Salgado *et al.*, 2008. ⁴Datos obtenidos de Gil-Serna *et al.*, 2009.

Los productos amplificados se detectaron mediante electroforesis en gel de agarosa de concentración variable según el tamaño del fragmento amplificado (tablas 3 y 4). Para su visualización se añadió bromuro de etidio y se utilizó un tampón 1x de 40mM tris-acetato y EDTA 1 mM. De esta manera se amplificaron todas las especies fúngicas presentes.

5.2.4. Datos meteorológicos

Los datos meteorológicos del año 2011 de las dos regiones estudiadas fueron consultados en las páginas web de la Consejería de Agricultura, Pesca y del Medio Rural (Junta de Andalucía) para la estación climática de Santaella (Córdoba), y en Ruralcat (Generalitat de Catalunya) para la estación de Gimennells (Lleida). Se tomaron los datos de temperatura media, humedad relativa media y pluviosidad de los meses de marzo, abril, mayo, junio y julio, meses en los que el trigo florece y desarrolla el grano hasta su recogida (10 y 15 de julio de 2011 para Córdoba y Lleida respectivamente).

5.3. Resultados

5.3.1. Análisis microbiológico tradicional de muestras de trigo blando de Córdoba y Lleida en la campaña 2011

En total se analizaron 80 muestras de trigo blando, 40 procedentes de Santaella (Córdoba) y 40 procedentes de Gimennells (Lleida). De cada localidad, 20 muestras procedían directamente del campo (precosecha) mientras que otras 20 procedían de etapas posteriores a la cosecha. A razón de 150 semillas por muestra, el volumen total analizado fue de 12000 semillas.

En la tabla 5 aparecen los porcentajes de contaminación de las semillas según su localidad de procedencia y momento de recogida. Así, en precosecha, los niveles de contaminación son mucho menores que en post-cosecha, tanto en número de especies identificadas como en los valores absolutos de contaminación (Unidades formadoras de colonias, UFCs). La proporción de semillas contaminadas fue mayor en Gimennells que en Santaella, sobre todo en precosecha. De las 3000 semillas correspondientes a precosecha de cada localidad, resultaron contaminadas 108 de las procedentes de Santaella (Córdoba) y 538 de las procedentes de Gimennells (Lleida). El resultado en las

semillas procedentes del momento post-cosecha fue completamente diferente, ya que presentaron contaminación microbiológica 2805 semillas procedentes de Santaella y 2950 de Gimennells, de las 3000 estudiadas. La mayoría de estas semillas aparecieron contaminadas por hongos, limitándose la contaminación bacteriana a 8 y 3 semillas en precosecha y post-cosecha respectivamente en Gimennells, y 0 y 17 semillas en precosecha y post-cosecha respectivamente en Santaella.

Aunque las muestras de ambas localidades comparten un elevado número de especies comunes, algunas son específicas de localidad. En particular, estas diferencias se observan también en el caso de las principales especies toxígenas presentes, *F. proliferatum*, *F. graminearum*, *A. niger* y *A. flavus*. En el estudio detallado de las especies fúngicas presentes en las semillas los resultados se cuantifican en unidades formadoras de colonias (UFC), y así vienen expresados. Del total de semillas analizadas se aislaron e identificaron 17 especies fúngicas en las muestras procedentes de Córdoba y 14 en las procedentes de Lleida. En las tablas 6 y 7 aparecen detalladas las especies identificadas y el número de UFC de cada una de ellas.

Muestra	Semillas no contaminadas	Contaminación fúngica	Contaminación bacteriana
Santaella (Córdoba) Precosecha	97,37%	2,63%	0%
Gimennells (Lleida) Precosecha	81,44%	18,29%	0,26%
Santaella (Córdoba) Post-cosecha	2,59%	96,82%	0,59%
Gimennells (Lleida) Post-cosecha	1,67%	98,24%	0,10%

Tabla 5. Porcentajes de semillas limpias y contaminadas de las diferentes muestras. Se indican las contaminaciones fúngica y bacteriana separadamente.

De las especies fúngicas identificadas en las muestras de Córdoba, *Alternaria alternata* fue la más representada con un 78,42%, seguida de *Fusarium proliferatum* (8,37%) y *Penicillium italicum* (3,93%). Al observar las muestras de esta localidad separadas en precosecha y post-cosecha, observamos que *Aspergillus niger* es la especie más abundante en precosecha (38,47%), seguida de *Alternaria alternata* (21,81%) y *Penicillium italicum* (19,23%); mientras que en post-cosecha las más representadas fueron *Alternaria alternata* (80,00%), *Fusarium proliferatum* (8,41%) y *Penicillium italicum* (3,95%). También hubo presencia de otras especies, entre ellas *Fusarium*

graminearum y *Fusarium spp.* en las muestras de post-cosecha (tabla 6). Es interesante destacar además que en las semillas de precosecha sólo se identificaron 5 especies diferentes de hongos, frente a las 15 identificadas en las semillas de post-cosecha.

Agente fúngico	Santaella Total		Santaella Precosecha		Santaella Postcosecha	
	UFC	Porcentaje	UFC	Porcentaje	UFC	Porcentaje
<i>Acremonium spp.</i>	1	0,04%	-	-	1	0,04%
<i>Alternaria alternata</i>	2261	78,42%	17	21,81%	2244	80,00%
<i>Arthrinium spp.</i>	9	0,31%	-	-	9	0,32%
<i>Aspergillus niger</i>	30	1,04%	30	38,47%	-	-
<i>Aureobasidium pullulans</i>	4	0,14%	-	-	4	0,14%
<i>Cladosporium herbarum</i>	59	2,05%	12	15,35%	47	1,68%
<i>Epicoccum nigrum</i>	9	0,31%	4	5,14%	5	0,19%
<i>Fusarium graminearum</i>	3	0,10%	-	-	3	0,11%
<i>Fusarium proliferatum</i>	236	8,19%	-	-	236	8,41%
<i>Fusarium spp.</i>	2	0,07%	-	-	2	0,07%
<i>Penicillium italicum</i>	126	4,37%	15	19,23%	111	3,95%
<i>Penicillium spp.</i>	7	0,24%	-	-	7	0,25%
<i>Rhizopus stolonifer</i>	23	0,80%	-	-	23	0,81%
<i>Sporothrix spp.</i>	52	1,80%	-	-	52	1,85%
<i>Stemphylium botryosum</i>	1	0,04%	-	-	1	0,04%
<i>Trichoderma viride</i>	53	1,84%	-	-	53	1,89%
<i>Trichothecium roseum</i>	7	0,24%	-	-	7	0,25%

Tabla 6. UFCs de las especies fúngicas encontradas en las semillas de trigo blando de Santaella (Córdoba). Se indica también el porcentaje respecto al total de UFCs para cada momento de recogida.

Agente fúngico	Gimenells Total		Gimenells Precosecha		Gimenells Postcosecha	
	UFC	Porcentaje	UFC	Porcentaje	UFC	Porcentaje
<i>Alternaria alternata</i>	2610	74,51%	283	51,17%	2327	78,88%
<i>Aspergillus flavus</i>	5	0,14%	-	-	5	0,17%
<i>Aspergillus niger</i>	130	3,71%	2	0,36%	128	4,34%
<i>Cladosporium herbarum</i>	55	1,57%	40	7,23%	15	0,51%
<i>Epicoccum nigrum</i>	117	3,34%	61	11,03%	56	1,90%
<i>Fusarium graminearum</i>	326	9,31%	-	-	326	11,05%
<i>Fusarium spp.</i>	6	0,17%	-	-	6	0,20%
<i>Penicillium italicum</i>	85	2,43%	48	8,68%	37	1,25%
<i>Penicillium spp.</i>	26	0,74%	18	3,25%	8	0,27%
<i>Phoma spp.</i>	10	0,28%	10	1,82%	-	-
<i>Rhizopus stolonifer</i>	5	0,14%	5	0,90%	-	-
<i>Stemphylium botryosum</i>	76	2,17%	76	13,74%	-	-
<i>Trichoderma viride</i>	50	1,43%	10	1,82%	40	1,36%
<i>Ulocladium consortiale</i>	2	0,06%	-	-	2	0,07%

Tabla 7. UFCs de las especies fúngicas encontradas en las semillas de trigo blando de Giménells (Lleida). Se indica también el porcentaje respecto al total de UFCs para cada momento de recogida.

De las semillas procedentes de Gimenezs (Lleida), la mayor representada fue *Alternaria alternata* (74,51%), y a continuación *Fusarium graminearum* (9,31%) y *Aspergillus niger* (3,71%). El análisis de las especies separado según el momento de recogida de las muestras ofreció como resultados una mayor representación de *Alternaria alternata* en todos los casos (pre cosecha 51,17%; post-cosecha 78,88%), seguida de *Stemphylium botryosum* (13,74%) y *Epicoccum nigrum* (11,03%) en pre cosecha, y *Fusarium graminearum* (11,05%) y *Aspergillus niger* (4,34%) en post-cosecha. Además se identificaron otras especies, entre ellas *Fusarium spp.* y *Aspergillus flavus*. En este caso la variedad de especies fue alta en ambos momentos de recogida, encontrándose 10 y 11 especies diferentes en pre cosecha y post-cosecha respectivamente (tabla 7).

5.3.2. Cálculo de los índices de riqueza específica y biodiversidad

A partir de los datos obtenidos del análisis microbiológico tradicional de las muestras se calcularon el índice de riqueza específica de Margalef (1958) y el índice de Simpson (1949). El número total de especies diferentes halladas en las muestras analizadas fue de 20, determinándose en Córdoba 17 especies y en Lleida 14 especies. 11 de estas especies son comunes a ambas procedencias. Las especies encontradas aparecen detalladas en las tablas 6 y 7. El número total de UFC fúngicas es de 2883 UFC en Córdoba y 3503 UFC en Lleida.

Tras realizar el cálculo de los índices de riqueza de Margalef (R), los resultados fueron los siguientes:

$$\begin{array}{ll}
 R_{(\text{Córdoba pre})} = 0,92 & \\
 R_{(\text{Córdoba})} = 2,01 & R_{(\text{Córdoba post})} = 1,89 \\
 R_{(\text{Lleida})} = 1,59 & R_{(\text{Lleida pre})} = 1,43 \\
 & R_{(\text{Lleida post})} = 1,25
 \end{array}$$

Lo cual indica una mayor riqueza de especies en Córdoba que en Lleida, y teniendo en cuenta el momento de toma de la muestra la riqueza fue mayor en Córdoba post-cosecha, Lleida pre cosecha, Lleida post-cosecha y Córdoba pre cosecha por ese orden.

Los resultados del índice de Simpson (D_{Si}) fueron los siguientes:

$$D_{Si(\text{Córdoba})} = 0,625$$

$$D_{Si(\text{Lleida})} = 0,568$$

$$D_{Si(\text{Córdoba pre})} = 0,259$$

$$D_{Si(\text{Córdoba post})} = 0,650$$

$$D_{Si(\text{Lleida pre})} = 0,308$$

$$D_{Si(\text{Lleida post})} = 0,637$$

Y por tanto, los resultados del índice de diversidad de Simpson fueron los siguientes:

$$Si_{D(\text{Córdoba})} = 0,375$$

$$Si_{D(\text{Lleida})} = 0,432$$

$$Si_{D(\text{Córdoba pre})} = 0,741$$

$$Si_{D(\text{Córdoba post})} = 0,350$$

$$Si_{D(\text{Lleida pre})} = 0,692$$

$$Si_{D(\text{Lleida post})} = 0,363$$

Lo cual indica que la probabilidad de encontrar dos individuos diferentes en dos extracciones sucesivas sin reposición es mayor en Lleida que en Córdoba, y teniendo en cuenta el momento de muestreo es mayor en Córdoba precosecha, Lleida precosecha, Lleida post-cosecha y Córdoba post-cosecha en ese orden.

5.3.3. Análisis molecular de especies de *Fusarium* y *Aspergillus* en muestras de trigo blando de Córdoba y Lleida en la campaña 2011

Se analizaron 80 muestras mediante los ensayos de PCR específicos descritos en las tablas 3 y 4, procedentes como ya se ha indicado de distintas parcelas de dos localizaciones diferentes de Córdoba y Lleida, recogidas en dos momentos separados, precosecha y post-cosecha. Tras dichos análisis, las especies representadas fueron las siguientes: *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. graminearum*, *F. equiseti*, *F. langsethiae*, *Aspergillus carbonarius*, *A. flavus* y *A. niger*. Respecto a las especies de *Fusarium*, en las muestras de Córdoba precosecha sólo se encontraron *F. verticillioides* y *F. equiseti*, en ambos casos en un bajo número de muestras (15% y 5% respectivamente). En Córdoba post-cosecha *F. proliferatum* fue la especie con mayor representación (60%), aunque también se detectaron las otras cuatro especies de *Fusarium*. En cuanto a las muestras de Lleida, *F. graminearum* fue la especie más abundante tanto en precosecha (55%) como en post-cosecha (95%), seguida por *F.*

langsethiae y *F. equiseti* en ambos casos, así como *F. proliferatum* en post-cosecha. En cuanto a la contaminación por especies del género *Aspergillus*, la especie *A. flavus* fue la más representada en todos los casos. *A. carbonarius* apareció solamente en las muestras de Córdoba precosecha, y *A. niger* solamente en Lleida precosecha, en ambos casos en un porcentaje bajo de las muestras (10%). En la figura 3 aparecen representados estos resultados.

Como se puede observar en la figura 3, la contaminación general es mayor en las muestras post-cosecha que en las muestras precosecha. En ninguna de las muestras se detectaron otras especies de *Fusarium* para las que también se realizaron los análisis de PCR: *F. culmorum*, *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *A. parasiticus*, *A. steynii*, *A. ochraceus* y *A. westerdijkiae*.

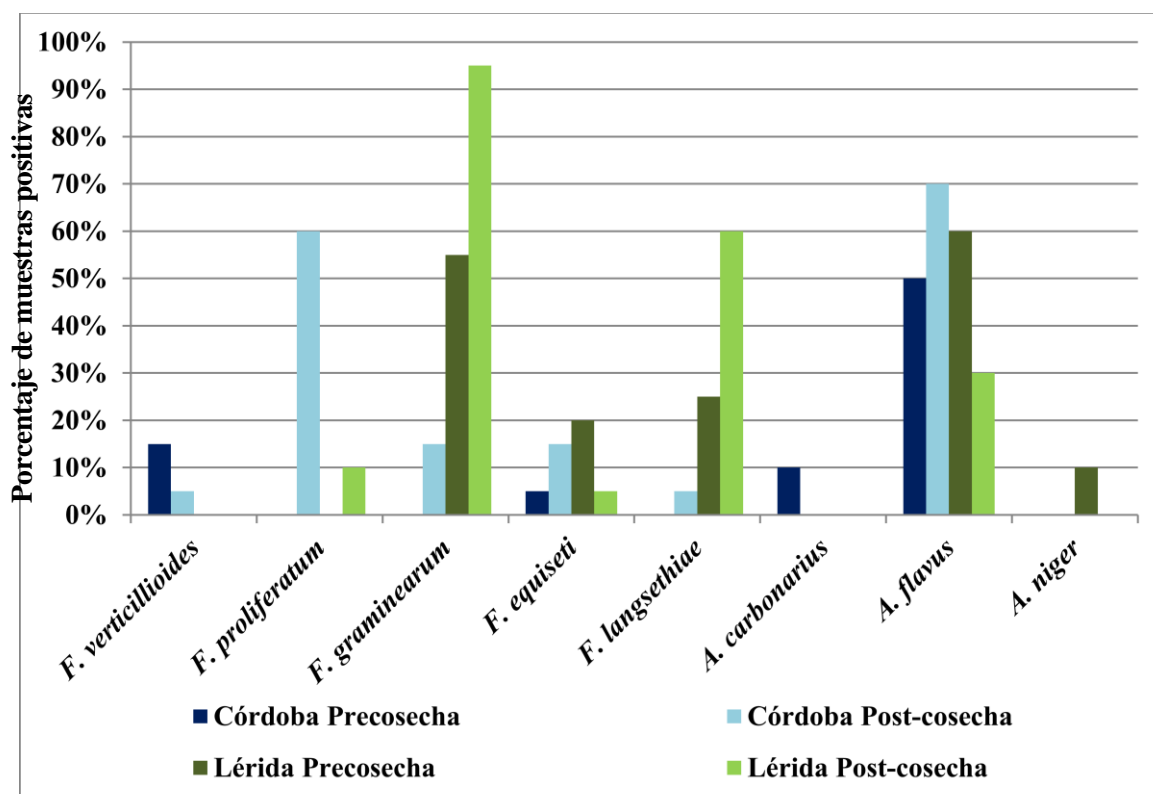


Figura 3. Porcentaje de muestras de trigo blando positivas a contaminación fúngica procedentes de Córdoba y Lleida de los dos momentos estudiados mediante métodos moleculares: precosecha y post-cosecha. No se indican el resto de especies estudiadas que no aparecieron representadas en las muestras.

5.3.4. Datos integrados obtenidos de ambos métodos de identificación de especies micotoxígenas

Los resultados obtenidos mediante el método molecular y el método de aislamiento tradicional, referentes al porcentaje de muestras de cereal positivas para algunas 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 ambas regiones y momentos de recogida mostró valores mayores por el método molecular, detectando especies que no pudieron ser recuperadas por el método tradicional, como *F. verticillioides*, *F. equiseti* y *F. langsethiae* en el caso de Córdoba (figura 4) y *F. equiseti* y *F. langsethiae* en las muestras de Lleida (figura 5). Esto podría indicar la alta capacidad germinativa o de crecimiento miceliar que determinadas especies podrían presentar frente a otras y la ventaja que supone la estrategia combinada de ambas metodologías.

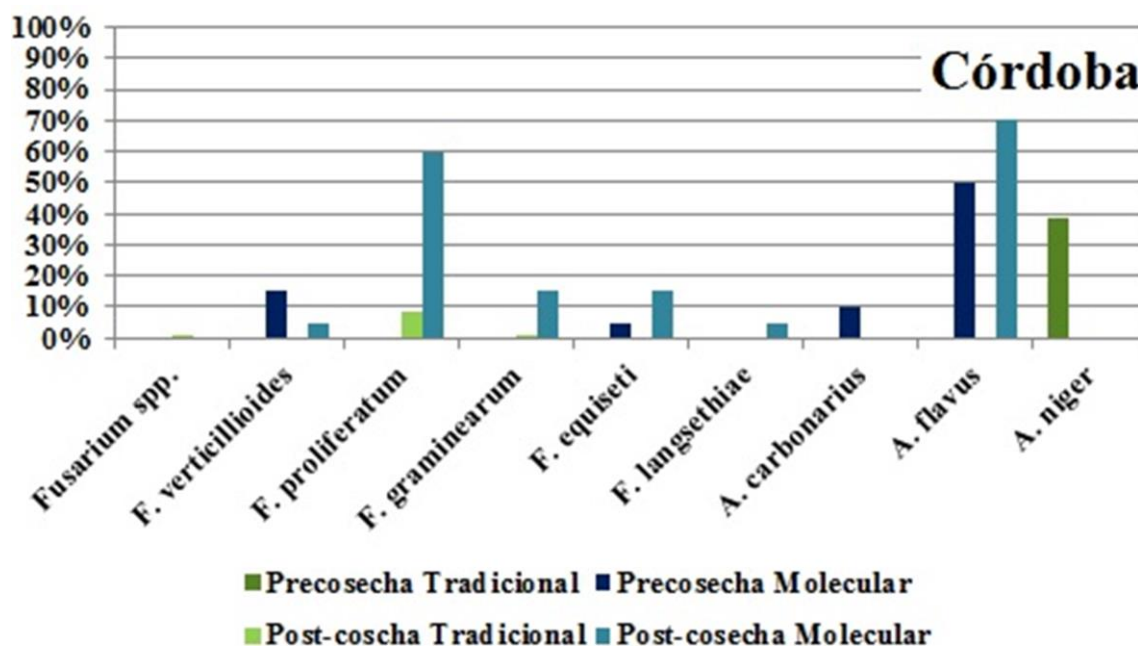


Figura 4. Porcentaje de muestras de trigo blando positivas a contaminación fúngica procedentes de Córdoba precosecha y post-cosecha identificadas mediante los análisis microbiológicos tradicionales (color verde) y los análisis moleculares de PCR (color azul). Se indican las especies identificadas de los géneros *Fusarium* y *Aspergillus*.

En cuanto a las especies del género *Aspergillus*, el análisis molecular fue mejor a la hora de detectar la especie altamente toxígena *A. flavus*, así como *A. carbonarius*. Sin embargo, por este método sólo se detectó *A. niger* en las muestras de precosecha de Lleida, mientras que los análisis microbiológicos tradicionales evidenciaron su presencia también post-cosecha de Lleida y en precosecha de Córdoba, esta última en un alto porcentaje (38,47%) (figuras 4 y 5, tablas 6 y 7).

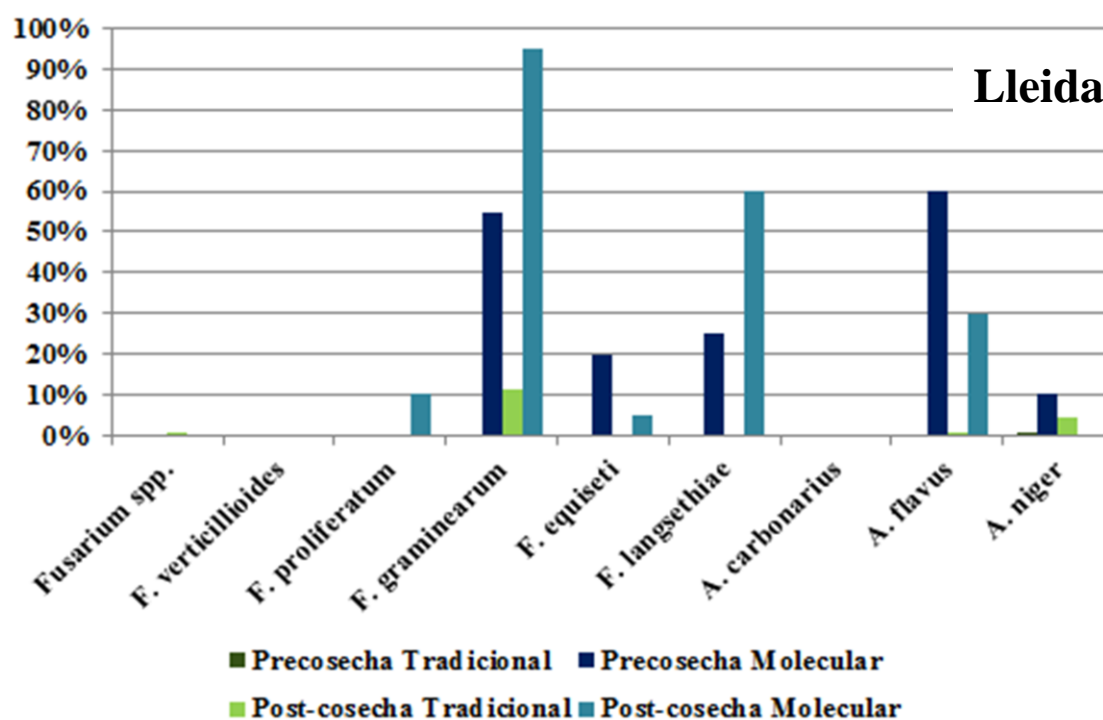


Figura 5. Porcentaje de muestras de trigo blando positivas a contaminación fúngica procedentes de Lleida precosecha y post-cosecha identificadas mediante los análisis microbiológicos tradicionales (color verde) y los análisis moleculares de PCR (color azul). Se indican las especies identificadas de los géneros *Fusarium* y *Aspergillus*.

5.3.5. Datos climatológicos

Los datos de temperatura media y humedad relativa media diaria, así como los datos de precipitación (mm) de las estaciones de Santaella (Córdoba) y Gimenezs (Lleida) aparecen en las figuras 6, 7 y 8.

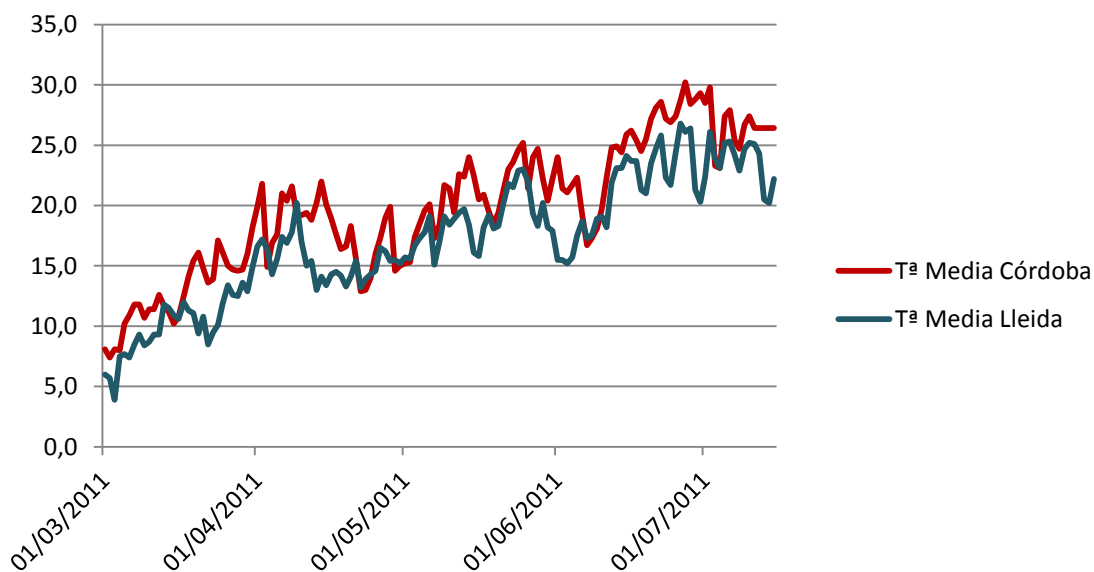


Figura 6. Datos de temperatura media diaria de Córdoba y Lleida desde el 1 de marzo hasta el momento de la recogida del cereal (10 y 15 de julio respectivamente) de 2011.

Como se observa en la figura 6, la temperatura media diaria de Córdoba osciló entre el 1 de marzo y el 10 de julio de 2011 entre los 7,4 y los 30,2°C, siendo la media de 19,8°C. Por otro lado, la temperatura media diaria de Lleida osciló entre los 3,9 y los 26,8°C, siendo la temperatura media en este período de 17,1°C.

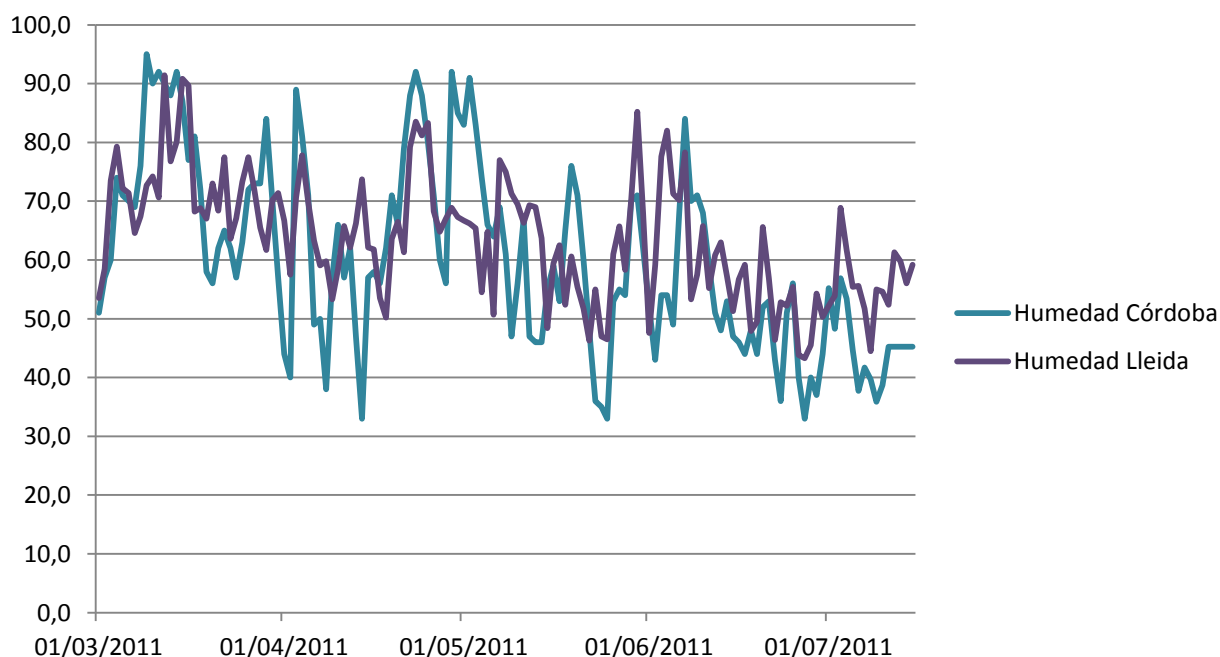


Figura 7. Datos de humedad relativa media diaria (en porcentaje) de Córdoba y Lleida desde el 1 de marzo hasta el momento de la recogida del cereal (10 y 15 de julio respectivamente) de 2011.

La humedad relativa diaria (figura 7) en Córdoba osciló entre el 33 y el 95%. La humedad relativa media en este período fue de 60,3 %. En Lleida, los datos de humedad relativa diaria oscilaron entre el 43,8 y el 91,4%, siendo la media de 63,6%.

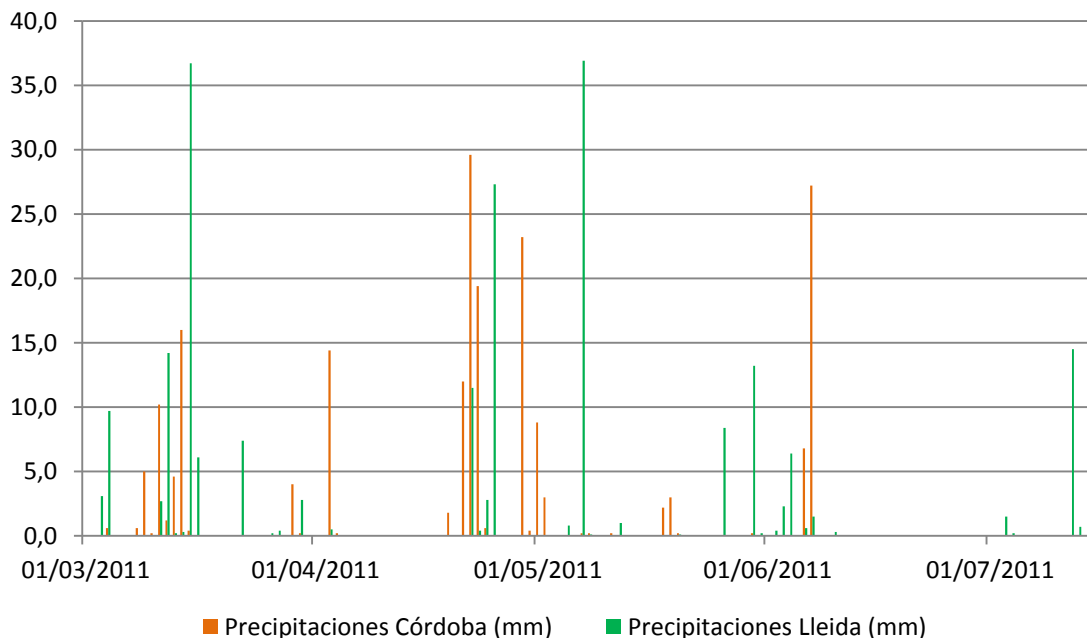


Figura 8. Datos de precipitación diaria (mm) de Córdoba y Lleida desde el 1 de marzo hasta el momento de la recogida del cereal (10 y 15 de julio respectivamente) de 2011.

La figura 8 muestra la precipitación diaria en las dos regiones españolas. En Córdoba se registraron como máximo 29,6 mm, mientras que en Lleida el máximo fue de 36,9 mm.

5.4. Discusión

Las semillas son el punto de partida de la producción. En todo cultivo es imprescindible tener en cuenta la calidad de la semilla, y así poder predecir el futuro éxito de la cosecha. Para ello, será necesario garantizar su óptima respuesta en campo para que se produzcan plantas vigorosas que alcancen el máximo rendimiento. Una de las principales características a cuidar es la salud de estas semillas y la ausencia de cualquier tipo de agente que impida su germinación o que disminuya su desarrollo. Las especies fúngicas y bacterianas que contaminan los cultivos perjudican en gran medida el crecimiento y desarrollo de estos, así como su productividad.

Desde el punto de vista de contaminación bacteriana, en todos los casos se pudo considerar despreciable, ya que en ningún momento superó valores de contaminación del 0,59% en el total de semillas analizadas. Sin embargo, la contaminación por especies fúngicas presentó grandes diferencias, especialmente según el momento de recogida de las semillas. Las muestras recogidas directamente del campo (precosecha), presentaron baja contaminación fúngica. En Lleida las semillas contaminadas por hongos supusieron el 18,29% del total de las muestras estudiadas, mientras que en Córdoba no superaron el 3%. Además, las semillas no mostraron en ningún caso síntomas externos, por lo que desde el punto de vista fitopatológico, se podría considerar que su salud es buena y que la semilla en campo germinará óptimamente. En cambio, las muestras de ambas procedencias que fueron recogidas en momentos posteriores a la cosecha, presentaron unos porcentajes de contaminación fúngica muy elevados, superiores al 95% (Lleida 98,24%; Córdoba 96,82%), lo cual indicaría un posible problema en el almacenaje del grano.

El diagnóstico microbiológico tradicional permitió estudiar la flora microbiológica asociada al trigo blando. La mayoría de las especies fúngicas detectadas formando parte de la micoflora de las semillas analizadas son consideradas parásitos oportunistas habituales en post-cosecha y almacenaje (Agrios, 1997). Sin embargo, algunas de ellas son productoras de micotoxinas, y por tanto su presencia tiene una mayor importancia. La distribución de las especies contaminantes fue diferente según la procedencia y el momento de recogida, tanto en las especies fúngicas en general, como en las especies del género *Fusarium* en particular.

La especie más abundante en las semillas analizadas por el método microbiológico tradicional fue *Alternaria alternata* en todos los casos, excepto en las muestras de precosecha de Córdoba, donde supuso también un porcentaje apreciable (21,81%), pero este fue superado por la especie *Aspergillus niger*, cuyo porcentaje fue del 38,47% sobre el total de las especies fúngicas detectadas. *A. alternata* se encuentra normalmente en el aire, siendo considerado como uno de los hongos alérgenos respiratorios más importantes (Achatz *et al.*, 1995). Además, se trata de una especie que contamina frecuentemente los cereales ya que coloniza muy rápidamente la testa de la semilla, ocasionado su ennegrecimiento y un ahogo que afecta a la germinación. Además disminuye la calidad de la semilla y de sus productos derivados, principalmente la harina (Jurado, 2006; Mateo *et al.*, 2004; Medina *et al.*, 2006;

Ramírez, 1982). Su rápida colonización puede reducir o impedir la contaminación por parte de otras especies de hongos, enmascarando los resultados de presencia fúngica. Además, como ya se ha comentado en el capítulo 1.1.5 de la introducción, produce varios metabolitos de gran capacidad toxígena para humanos y animales, como el ácido tenuazónico, los alternarioles o las altertoxinas (Lacey y Magan, 1991; Medina *et al.*, 2006; Soldevilla *et al.*, 2005). Su presencia es muy elevada en el sur de Europa y por ello sería necesario elaborar normativas sobre los límites permitidos de estas toxinas, ya que en la actualidad no se dispone de ellos (Bottalico y Logrieco, 1998).

Otro género detectado en abundancia por los métodos tradicionales fue *Penicillium*, y más concretamente *P. italicum*, que fue la tercera especie más contaminante en las muestras de Córdoba (3,93% del total de las muestras contaminadas de esta localidad) y la quinta en las de Lleida (2,43% del total de muestras contaminadas). Esta especie fúngica, conocida como el moho azul, es un agente post-cosecha importante, si bien determinadas condiciones de almacenaje pueden favorecer su desarrollo directamente sobre la planta en el siguiente año de cultivo (Plaza *et al.*, 2003; Tuset, 1987). Entre el resto de especies con presencia típica en almacenaje y detectadas gracias al análisis microbiológico tradicional destacan *Cladosporium herbarum*, *Stemphylium botryosum*, *Trichoderma viride*, *Sporothrix spp.*, *Aureobasidium pullulans*, *Trichotecium reseau* o *Epicoccum nigrum* entre otras. Estas especies sólo representan un problema en casos de cantidades de micelio suficientes para contaminar grandes lotes de semillas. Sin embargo, este no es el caso, ya que en las muestras estudiadas aparecen en porcentajes reducidos. La capacidad de estos hongos de soportar las temperaturas y actividades de agua propias del almacenaje les confiere la capacidad de llegar a ser problemáticos por la contaminación que producen en el grano (Palazón y Palazón, 1996).

Los diagnósticos moleculares junto con los microbiológicos tradicionales, permitieron la detección e identificación de una serie de especies de *Fusarium* y *Aspergillus* toxígenas asociadas al trigo. Sin embargo, si comparamos los resultados obtenidos mediante los dos métodos observamos que el molecular fue de manera general más informativo. Gracias a este método se detectaron especies que no pudieron ser recuperadas por el método tradicional como *F. verticillioides*, *F. equiseti*, *F. langsethiae*, *A. flavus* y *A. carbonarius* (figuras 4 y 5). Sin embargo, la especie *A. niger* sólo pudo ser detectada en los casos de Córdoba precosecha y Lleida post-cosecha

mediante los métodos de siembra tradicionales. Estas diferencias en la detección de especies por los dos métodos podrían deberse a una presencia mínima de la especie en las muestras de partida que las hace indetectables, o bien que determinadas condiciones favorezcan la germinación de ciertas especies antes que otras, las cuales pueden ser enmascaradas.

En el caso del género *Aspergillus* y conjugando los resultados ofrecidos por ambos métodos, las especies más representadas fueron *A. flavus*, *A. niger* y *A. carbonarius*. La contaminación de cereales por especies del género *Aspergillus* está muy extendida, y se da principalmente durante el almacenamiento del cereal y durante el procesado de este (Comisión Europea, 2003; Ozay *et al.*, 2008; Riba *et al.*, 2008). Se trata de especies productoras de micotoxinas: *A. flavus* sintetiza aflatoxinas y *A. niger* y *A. carbonarius* sintetizan OTA. La contaminación de los cereales por estas dos toxinas es un serio problema mundial, ya que presentan un amplio rango de efectos tóxicos. Los porcentajes de presencia detectados en los análisis, los cuales llegan a alcanzar el 38%, denotan la importancia de realizar controles fitopatológicos más exhaustivos. Además de estas especies, algunas otras del género *Penicillium* también pueden sintetizar OTA, como por ejemplo *P. verrucosum*, y esta podría estar incluida en las muestras detectadas como *Penicillium spp.* La presencia de *A. flavus* y *A. carbonarius* ya había sido detectada en estudios previos en precosecha (González-Jaén *et al.*, 2008). Por otra parte, en post-cosecha, también se había detectado en cebada la presencia de *A. steynii* (Mateo *et al.* 2004). Estas tres especies de *Aspergillus* contienen cepas muy productoras de toxinas, de modo que aunque su presencia no sea muy destacable en términos comparativos con otras especies, pueden ser responsables de niveles elevados de toxina en muestras en las que su masa fúngica es escasa.

Las condiciones ambientales, principalmente la temperatura y la humedad (tablas de climas), son factores clave del crecimiento y la producción de toxinas de las especies fúngicas. Los datos climatológicos de las estaciones de Santaella (Consejería de Agricultura, Pesca y del Medio Rural; Junta de Andalucía) y de Gimenezells (Ruralcat; Generalitat de Catalunya) difieren en estos dos aspectos. Durante el período de floración del cereal en el campo hasta su recogida (Marzo 2011-Julio de 2011) las temperaturas medias oscilaron entre los 7,4°C y los 30,2°C en Córdoba (temperaturas mínima y máxima en este período de 0,4°C y 38,8°C respectivamente), mientras que en Lleida estuvieron entre los 3,9°C y los 26,8°C (temperaturas mínima y máxima de este período

de -1,3°C y 37,3°C respectivamente) (figura 6). En ambos casos, durante los meses de abril y mayo se alcanzaron temperaturas de 20-25°C, óptimas para el crecimiento fúngico. Sin embargo, en cuanto a la disponibilidad de agua, los valores de humedad relativa en Lleida son mucho más estables que en Córdoba, donde la humedad relativa varía en mayor medida (figura 7). Teniendo en cuenta estos datos, las condiciones de Córdoba serían más extremas en cuanto a temperatura y a actividad de agua que las de Lleida, favoreciendo en este último caso en mayor medida la presencia fúngica. Esto se refleja en los datos de contaminación general, donde el porcentaje de semillas precosecha contaminadas por hongos es mayor en Lleida que en Córdoba (tabla 5).

Las especies del género *Fusarium* aparecen muy representadas en los análisis realizados. Una de las principales especies detectadas fue *F. graminearum*, apareciendo en un 60% de las muestras analizadas de Córdoba post-cosecha por los métodos moleculares, y en un 55% y 95% de las muestras de Lleida pre y post-cosecha respectivamente. Se trata de un patógeno característico de las regiones mediterráneas con temperaturas templadas y humedad elevada. Como hemos comentado, estos requerimientos ambientales pueden ser los responsables de las diferencias en la distribución de este patógeno en las muestras de Córdoba y Lleida precosecha, ya que en Córdoba, con condiciones más extremas, esta especie aparece en un porcentaje bajo (15%). Además, *F. graminearum* puede coexistir con otras especies de *Fusarium* productoras de fumonisinas, debido a que comparten hospedador. La tasa de crecimiento de *F. graminearum* es mucho mayor que la de especies como *F. verticillioides* o *F. proliferatum* con las que coexiste, por lo que su crecimiento será más acusado excepto en condiciones ecofisiológicas que favorezcan en mayor medida a las otras especies, es decir temperaturas extremas y menos disponibilidad de agua, como se ha descrito en el capítulo 2.

F. proliferatum, y en mucha menor medida *F. verticillioides*, presentan como hospedador principal el maíz. Sin embargo, la contaminación por parte de estas dos especies productoras de fumonisinas puede ser considerada como algo característico de los cereales de grano pequeño españoles (Jurado *et al.*, 2006a). Estas especies están adaptadas a temperaturas cálidas y a niveles bajos de humedad. Por ello, su presencia en las muestras cordobesas es mucho mayor que en las procedentes de Lleida, donde *F. verticillioides* no ha sido detectado y la contaminación por *F. proliferatum* supone sólo un 10%. En este caso, el clima leridano con temperaturas menos extremas y humedad

más alta favorecería la colonización por *F. graminearum* como hemos comentado anteriormente. Aunque el porcentaje de presencia de estas especies en las muestras de Córdoba puede considerarse elevado, sobre todo de *F. proliferatum* que alcanza un 60%, estudios previos han descrito que su capacidad productora de fumonisinas es menor en trigo que en su hospedador principal, el maíz, por lo que el riesgo de contaminación por estas toxinas sería menos preocupante en trigo (Logrieco *et al.*, 2003; 2007; Marín *et al.*, 1999).

Las otras dos especies tóxicas detectadas fueron *F. equiseti* y *F. langsethiae*, principalmente en las muestras de Lleida, alcanzando *F. langsethiae* un 25% y un 60% en las muestras de Lleida pre y post-cosecha respectivamente. Estas dos especies son patógenos comunes en Europa, de regiones del norte y sur, con perfiles ecofisiológicos amplios (Marín *et al.*, 2015; Medina *et al.*, 2004), más compatibles con las condiciones típicas de *F. graminearum*. En el caso de *F. equiseti*, correspondería a una población o especie típica del sur de Europa y bien caracterizada (Marín *et al.*, 2012). La población de *F. equiseti* es capaz de producir varias toxinas, entre las que destacan los tricotecenos tipo A y B (Marín *et al.*, 2012). *F. langsethiae* ha sido aislado de diferentes cereales contaminados del norte y el centro de Europa (Torp y Adler, 2004; Torp y Nirenberg, 2004) y su presencia en el sur de Europa está siendo estudiada actualmente, habiéndose descrito en Italia (Infantino *et al.*, 2007). Presenta las características morfológicas de *F. poae* y el perfil metabólico de *F. sporothrichioides* (Torp y Nirenberg, 2004; Schmidt *et al.*, 2004; Thrane *et al.*, 2004; Wilson *et al.*, 2004; Yli-Mattila *et al.*, 2004; 2008) y no causa ningún síntoma visible en las plantas contaminadas, por lo que su detección se hace complicada, aunque se trata de una especie a tener en cuenta ya que produce altos niveles de tricotecenos tipo A, en particular T-2 y HT-2.

Considerando todos estos resultados, cabe concluir que los factores climáticos y ambientales contribuyen de forma esencial al patrón de micobiota que presenta el trigo, y que este patrón presenta diferencias marcadas entre el momento de la floración y cosecha. Esa micobiota acompañante, no tóxica, puede estar influyendo sobre el crecimiento de la micobiota tóxica y producción de toxinas, aspecto que no ha sido aún bien estudiado. Es destacable la diferencia en valores de biodiversidad de la micobiota que puede reflejar o incluso jugar un papel importante en el control de las especies patógenas más agresivas. El método de identificación por PCR sin duda pone de manifiesto la amplia distribución de las principales especies tóxicas, algunas de

ellas apenas descritas en cereales, que aunque con diferente incidencia, coincide con las condiciones halladas en los estudios *in vitro*. Además, permite su detección en momentos tempranos (precosecha) que no consiguen los métodos tradicionales. Especial atención merece el incremento de *A. flavus*, señalado por distintos autores (Miraglia et al., 2009) que se atribuye en gran medida a que sus condiciones óptimas son compatibles con las previstas para los escenarios de cambio climático en el sur de Europa (aumento de las temperaturas y estrés hídrico). Los resultados obtenidos podrían apoyar que se está produciendo un desplazamiento de las especies y diferencias en la capacidad de competir entre ellas. La estrategia de análisis utilizada puede ser de gran ayuda en el diagnóstico, prevención y control de hongos toxígenos en las condiciones de cambio climático previstas.

Capítulo 6

Capítulo 6. Discusión general

Las especies del género *Fusarium* están entre los patógenos vegetales que más pérdidas económicas causan alrededor del mundo. En particular, afectan a especies agroalimentarias cruciales, como es el caso de los cereales, en los que reducen la producción y la calidad de la cosecha. También ponen en riesgo la seguridad alimentaria, amenazando la salud humana y animal debido a su contenido en micotoxinas. Por estos motivos se producen enormes pérdidas económicas, como por ejemplo, en EEUU, donde estas pérdidas se traducen en miles de millones de dólares anuales (Wu, 2007).

La identificación, caracterización y el estudio en profundidad de la biología de las especies de este género y de la biosíntesis de las toxinas que producen, se convierte en un factor clave para disminuir los efectos perjudiciales descritos (Wu, 2014). Para ello, se hacen necesarias diversas técnicas que proporcionen la máxima información posible sobre las especies estudiadas. Los análisis epidemiológicos, filogenéticos y el estudio de los factores ecofisiológicos que determinan el crecimiento y la síntesis de micotoxinas por parte de estas especies, son elementos clave a la hora de elaborar las estrategias de prevención y control adecuadas para cada una de ellas.

Este proyecto de Tesis Doctoral se ha centrado en las principales especies productoras de fumonisinas del FFSC: *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. fujikuroi*. Estas tres especies son importantes patógenos de los cultivos de cereales de nuestro país, destacando el trigo y la cebada, el maíz y el arroz, en orden decreciente de importancia. En el caso de *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, existen herramientas de diagnóstico específico y de análisis de la regulación de la biosíntesis de fumonisinas disponibles. Sin embargo, para *F. fujikuroi* no se contaba con las herramientas equivalentes. En esta Tesis se analizaron por primera vez en profundidad diversas cepas de esta especie, llevando a cabo su caracterización y desarrollando las herramientas necesarias para estudiar la expresión relativa del primer gen de la ruta de síntesis de fumonisinas de esta especie (*FUM1*). Además, se midió la capacidad potencial de producción de esta toxina por parte de *F. fujikuroi*, que se pensaba baja, demostrando que probablemente se subestima y que debería ser tomada más en cuenta y estudiada en profundidad.

El protocolo de detección y cuantificación de la expresión relativa del gen *FUM1* de *F. fujikuroi* mediante RT-PCR a tiempo real desarrollado en esta Tesis, se basa en el elaborado para *F. proliferatum* (Jurado *et al.*, 2010). Con la puesta a punto de este método se obtiene una herramienta útil e importante a la hora de estudiar el gen *FUM1* en esta especie. Los resultados mostraron la expresión relativa de dicho gen en todas las cepas productoras de fumonisinas, además de otras que no sintetizaron la toxina. Esto puede deberse a distintas causas, como por ejemplo una producción de fumonisinas muy baja, un mal transporte de la toxina hacia el exterior de la célula, falta de funcionalidad de otros genes de la ruta o la desviación de intermediarios de la síntesis de fumonisinas hacia otras rutas de síntesis de diferentes metabolitos secundarios producidos también por esta especie (Proctor *et al.*, 2010; Stankovic *et al.*, 2007; Wiemann *et al.*, 2013).

El estudio filogenético separó en dos grupos las cepas de *F. fujikuroi* y las de *F. proliferatum*, especies muy próximas genéticamente y prácticamente indistinguibles a nivel morfológico (Leslie y Summerell, 2006). *F. fujikuroi* presentó una variabilidad intraespecífica muy baja, independientemente del hospedador o el origen geográfico. Esta escasa variabilidad contrasta con *F. proliferatum*, donde los valores son mucho mayores. Aunque algunos autores defienden la relación de ciertos grupos de cepas con el hospedador, otras evidencias no lo apoyan (Jurado *et al.*, 2010; Stepien *et al.*, 2013). Los resultados de variabilidad intraespecífica reducida de *F. fujikuroi* serían más semejantes a lo que sucede con *F. verticillioides*, especie que también aparece muy ligada a un hospedador: el arroz en el caso de *F. fujikuroi*, el maíz para *F. verticillioides*. En ambos casos, la presencia de los dos idiomorfos de apareamiento permitiría justificar la existencia de reproducción sexual en las poblaciones naturales (Mirete *et al.*, 2004). La variabilidad genética y la estructura poblacional son dos aspectos esenciales en la respuesta a los tratamientos de control (Jurado *et al.*, 2010). Además, se ha observado que la capacidad de producir fumonisinas por *F. fujikuroi* no es nada despreciable, y ello justificaría un seguimiento futuro. Las herramientas desarrolladas en este trabajo basadas en RT-PCR a tiempo real serían de gran ayuda.

F. verticillioides y *F. proliferatum* son especies características de regiones templadas y están descritas como los principales patógenos del maíz, productores de fumonisinas (Desjardins *et al.*, 2007). Existe abundante información sobre estas dos especies, sin embargo en este trabajo de Tesis se ha tratado de completar el perfil

ecofisiológico de *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, determinando patrones de crecimiento y de expresión de los genes de biosíntesis de fumonisinas en condiciones típicas de escenarios de cambio climático futuro (valores de temperatura y estrés hídrico elevados). Además, se ha determinado la influencia del sustrato (cebada, maíz y trigo) sobre ambos parámetros, crecimiento y biosíntesis de fumonisinas, teniendo en cuenta la temperatura y el estrés hídrico, ya que son los factores que se consideran más importantes. Como ya se ha comentado, *F. proliferatum* tiene un rango mucho más amplio de hospedadores que *F. verticillioides*, si bien ambas especies pueden colonizar otros cereales de grano pequeño como el trigo o la cebada (Chehri *et al.*, 2010; Desjardins *et al.*, 2000; Tančić *et al.*, 2012). Las dos especies presentan una distribución muy amplia en los cereales de la geografía española (Jurado *et al.*, 2006b; 2010), lo cual coincide con los resultados obtenidos en este trabajo en los cuales el crecimiento fúngico de estas dos especies se dio en un amplio rango de condiciones permisivas, tanto en medio sintético, como en los medios de extracto de cereales.

Tanto *F. verticillioides* como *F. proliferatum* fueron capaces de crecer a temperaturas entre 15 y 35°C y con un estrés hídrico elevado. Esta permisividad a un amplio rango de condiciones ambientales explicaría la incidencia de estas especies sobre cereales que soportan condiciones climáticas con períodos alternos de lluvia y sequía con altas temperaturas (Cavaglieri *et al.*, 2009; Desjardins *et al.*, 2000; 2007; De Souza y Fomento, 2004). Las fases finales del cultivo se dan durante los meses de abril-junio, los cuales se caracterizan por temperaturas templadas y lluvias, condiciones óptimas que favorecen el establecimiento de estas especies de *Fusarium*.

Además de la temperatura y el potencial hídrico, el hospedador es otro de los factores importantes que influyen en el establecimiento de una determinada especie fúngica sobre un cereal concreto, así como sobre su crecimiento y la síntesis de toxinas. En esta Tesis se ha comprobado el efecto significativo de estos tres factores. El estudio de ellos y sus interacciones permite estimar la distribución de estas especies de *Fusarium* a nivel geográfico, y de esa manera prever también el riesgo asociado a las micotoxinas que producen. Las cepas estudiadas de *F. verticillioides* y *F. proliferatum* crecieron mejor en el medio de cebada, seguidas del medio de maíz y trigo, lo cual pudo ser debido a la fuente de carbono, en este caso el almidón, disponible para el hongo. Los niveles de almidón son mayores en cebada, maíz y por último en trigo (Bluhm y Woloshuk, 2005; Roussos *et al.*, 2006). Hay que tener en cuenta la fuente de carbono

que ofrece el hospedador a la hora de evaluar el crecimiento del hongo en el campo, con el fin de tener una estimación lo más correcta posible de la presencia fúngica.

En cuanto a la capacidad productora de toxinas de estas dos especies, esta se analizó mediante el análisis de expresión del gen *FUM1*, primer gen de la ruta de biosíntesis de fumonisinas, ya que se ha demostrado una correlación positiva entre la cantidad de toxina producida y los niveles de expresión de dicho gen (López-Errasquín *et al.*, 2007). El patrón de expresión de este gen resultó diferente entre las dos especies: mientras que *F. verticillioides* presentó expresión relativa del gen en todas las condiciones probadas, *F. proliferatum* mostró expresión solamente en las condiciones consideradas óptimas (25°C y -2,8 MPa). Esto demuestra diferencias en el patrón de micotoxinas de las dos especies, las cuales ya habían sido observadas con anterioridad. Por ejemplo, Marín *et al.* (2010b) describieron también un mayor efecto represor de la expresión del gen *FUM1* al aumentar el del estrés hídrico en *F. proliferatum* que en *F. verticillioides*. Estas diferencias que deberán ser tenidas en cuenta a la hora de evaluar la posibilidad de contaminación por fumonisinas de los cultivos. Temperaturas medias y un ligero estrés hídrico provocan la mayor expresión del gen *FUM1* en las dos especies. Estas condiciones además permiten un aumento constante de la tasa de crecimiento, por lo que se esperaría una acumulación de toxinas. Al aumentar el estrés hídrico a valores de -7,0 MPa disminuirían tanto el crecimiento como la síntesis de toxinas en ambas especies. En estos casos, la biomasa fúngica sería un indicativo de contaminación por fumonisinas.

En el capítulo 4 de este trabajo se determinó la eficacia de un componente antifúngico convencional, el benomilo, sobre los mismos dos parámetros en *F. verticillioides*, siguiendo una estrategia similar a la anterior e incluyendo los dos factores ambientales habituales ya mencionados. Tradicionalmente, la eficacia de los antifúngicos se ha medido sólo por su capacidad reductora del crecimiento del hongo; sin embargo, es necesario evaluar su efecto también sobre la síntesis de fumonisinas de las especies fúngicas, evaluando también el efecto de los factores analizados de temperatura y potencial hídrico. El benomilo es un fungicida muy empleado en campo en algunos países, que pertenece al grupo de los azoles. En primer lugar se calcularon las dosis letales LD₅₀ y LD₉₀ de benomilo, con el objetivo de conocer las concentraciones de fungicida que afectan a *F. verticillioides* en concreto. Estas concentraciones fueron 0,93 y 3,30 ppm respectivamente. A continuación, se evaluó el

efecto de estas dosis de benomilo sobre el crecimiento de *F. verticillioides* y sobre la expresión del gen *FUM1* y, en este caso, se estudió también el gen *FUM19*, el cual codifica para un transportador tipo ABC (*ATP-binding cassette*) involucrado en el transporte de las fumonisinas hacia el exterior (Proctor *et al.*, 2003).

Los gráficos de crecimiento mostraron que la eficacia de este fungicida se vio muy comprometida por las condiciones ambientales. La aplicación del fungicida redujo la tasa de crecimiento de *F. verticillioides*, aunque la eficacia de éste se vio afectada por la temperatura y sobre todo por el potencial hídrico. Las dosis LD₅₀ y LD₉₀ de fungicida aplicadas en las condiciones óptimas del crecimiento fúngico (25-30°C y -0,7 MPa) sí lograron la reducción esperada, mientras que al alejarse de estos valores de crecimiento óptimos, el fungicida comenzó a perder eficacia, llegando a perder su eficacia en las condiciones menos favorables de crecimiento fúngico. Resultaría recomendable por tanto reducir la aplicación del fungicida en las condiciones de mayor eficacia, reduciendo así el daño al entorno y disminuyendo el coste económico.

En general, el benomilo redujo la expresión del gen *FUM1*, aunque dependiendo en gran medida de las condiciones ambientales. Por ejemplo, a 20°C y -0,7 MPa se observó una leve, aunque significativa, inducción relativa de la expresión de este gen al añadirsele la dosis de LD₅₀. Marín *et al.*, (2013) llevaron a cabo un estudio en las mismas condiciones con el fungicida tebuconazol. Este agente antifúngico reveló efectos diferentes en cuanto a la expresión del gen *FUM1*, ya que produjo su inducción a -2,8 MPa y 25-35°C al añadir la dosis de LD₅₀, y a -2,8 MPa y 25-30°C con la dosis de LD₉₀. En este sentido, la eficacia del benomilo sería mayor, ya que el tebuconazol induciría la síntesis de fumonisinas en una mayor variedad de condiciones ambientales. El segundo gen estudiado, el gen *FUM19*, mostró un patrón de expresión génica similar al del gen *FUM1*, y se observó una correlación positiva entre los dos genes que ya había sido observada en estudios anteriores (López-Errasquín *et al.*, 2007; Proctor *et al.*, 1999; 2003). No se observó inducción de *FUM19* en ninguno de los tratamientos en que se añadió benomilo, lo cual podría sugerir que este gen no está implicado en la respuesta al estrés que se da en presencia del fungicida.

El benomilo mostró una eficacia elevada en la reducción tanto del crecimiento como de la síntesis de fumonisinas y, por tanto, estos resultados lo consideran efectivo para el control fúngico, siempre teniendo en cuenta las diferentes respuestas del hongo

al estrés ambiental. Como hemos comentado, existen determinadas condiciones ambientales y de concentración del fungicida en las cuales se favorecería la producción de la toxina. El aumento de la toxina acompañada de una reducción en la tasa de crecimiento fúngica daría lugar a una acumulación de fumonisinas sin aumento de la masa fúngica, tendiendo la cantidad de fumonisinas acumuladas a ser superior que la biomasa del hongo. En estos casos, la aplicación del benomilo sería poco eficaz y no aconsejable desde un punto de vista ambiental. Estos datos resaltan la importancia de elegir el fungicida adecuado frente a la especie a controlar, pero también la de tener en cuenta que su eficacia podría estar comprometida según las condiciones ambientales.

Por último, en el capítulo 5, se ha realizado un estudio de la distribución de la micobiota toxígena y acompañante en trigo blando, análisis que forma parte de un estudio más amplio que se lleva realizando en cereales por nuestro grupo de investigación desde hace tiempo, orientado a hacer un seguimiento en el contexto del cambio climático. Los estudios epidemiológicos ofrecen información interesante acerca de la distribución real de las especies que contaminan los cultivos; combinando el uso de métodos microbiológicos tradicionales y técnicas moleculares se obtiene información valiosa sobre la micobiota que presenta un cultivo en una zona geográfica concreta. En esta Tesis se han analizado las mismas variedades de trigo blando, cultivadas en las mismas condiciones, en dos localidades de regiones climatológicas diferentes, Santaella (Córdoba) y Gimeneils (Lleida). La contribución de las técnicas de diagnóstico molecular permitieron la identificación precisa de las especies fitopatógenas de *Fusarium* presentes, completando así los resultados obtenidos por métodos tradicionales de una manera rápida y específica, ya que algunas de ellas no fueron detectadas por el cultivo tradicional de especies fúngicas. Los análisis detectaron que la distribución de especies fue diferente en cada zona geográfica y según el momento de recogida del grano. Las muestras de precosecha presentaron niveles muy bajos de contaminación fúngica, mientras que más de un 95% de las muestras post-cosecha de ambas localidades resultaron contaminadas, lo cual puede señalar un grave problema en el almacenaje de las muestras, donde se producirían condiciones ambientales óptimas para la proliferación de hongos. Estos niveles elevados de contaminación fúngica fueron ya descritos en trigo cultivado en Andalucía en 2004 (Jurado *et al.*, 2006a), donde el porcentaje de muestras contaminadas fue del 72,85%, o en trigo de Castilla y León de la campaña de 2006 que presentó un 100% de las muestras contaminadas.

Existen diferencias entre las dos localidades españolas, tanto en la composición como en la diversidad de las especies contaminantes. La riqueza específica es mayor en Córdoba que en Lleida (2,01 y 1,59 respectivamente), siendo 11 las especies comunes encontradas en las dos localidades. Las muestras de Córdoba post-cosecha presentan la riqueza específica más alta (1,89), mientras que la más baja es la de las muestras de Córdoba precosecha (0,92). Sin embargo en cuanto a la diversidad, esta es inversamente proporcional, presentando mayor diversidad las muestras precosecha de las dos localidades (0,741 y 0,692 Córdoba y Lleida respectivamente), las cuales si bien presentan menor riqueza específica, ninguna de sus especies muestra una dominancia clara. En el caso de las muestras post-cosecha, *Alternaria alternata* es la especie dominante, lo cual coincide con estudios previos (Soldevilla *et al.*, 2005). Esta especie debe ser tenida en cuenta ya que es ampliamente toxígena, y el alto grado de contaminación por su parte puede suponer problemas en los productos derivados de estos cereales contaminados.

La composición de la micobiota es dinámica y varía teniendo en cuenta factores como la temperatura y la humedad ambiental, y otros propios de la semilla como la actividad de agua disponible o la cantidad de ciertos nutrientes, que van disminuyendo y aumentando respectivamente durante el proceso de maduración de la semilla. Así, en el hospedador, la cantidad de almidón varía según la fase de maduración de este. Por ejemplo, en el maíz, los niveles de almidón en la semilla son diferentes según la fase en que se encuentre el grano: presenta un 12% de almidón en la fase de ampolla, un 20% en la fase de grano lechoso, un 58% en grano pastoso y un 70% en grano dentado. Estudios previos demostraron que el crecimiento de *F. verticillioides* fue más rápido en la fase de grano pastoso, donde el contenido de almidón es elevado (Bluhm y Woloshuk, 2005). En fases más tardías, la disminución de la actividad de agua disponible en la semilla junto con la disminución de la humedad característica de los veranos que acompaña la maduración, favorece especies fúngicas más xerófilas. En este caso, especies de *Aspergillus*.

La fase de precosecha elegida para el análisis es aún una fase temprana, de grano lechoso, pero en la que ya se detectan mediante el análisis por PCR algunas especies que sólo alcanzan cantidad suficiente para su aislamiento en las muestras post-cosecha. Por otro lado, resulta interesante cómo otras especies detectadas del mismo modo no se aislaron en semillas post-cosecha. Dos hipótesis alternativas podrían

explicar este hecho. La primera sería de tipo metodológico, pues las tasas de crecimiento de las distintas especies en los medios de cultivo y condiciones utilizados pueden favorecer a unas especies frente a otras, produciendo valores relativos que no reflejan la situación de contaminación real de las semillas. La segunda hipótesis se basa en la capacidad de la micobiota presente para modular el crecimiento (y la producción de toxinas) mediante las interacciones entre sí y la competencia por los nutrientes. La diferente composición de la micobiota entre las dos localidades podría ser indicativo de la existencia de interacciones distintas en ese complejo micobiota-hospedador en ambas regiones.

Las condiciones favorables de alguna de las especies toxígenas más virulentas o dominantes (como es el caso de *F. graminearum* y *A. flavus*) pueden desequilibrar las interacciones del complejo y, si se mantienen, derivar en un aumento significativo del riesgo a niveles inadmisibles. En términos de riesgo, las principales especies toxígenas detectadas en función de su mayor presencia y gravedad son *A. flavus*, *A. niger* y *F. graminearum*, esta última especie es característica de las regiones mediterráneas con humedad elevada, y estuvo muy presente en las muestras de Lleida. En Córdoba sin embargo las especies más abundantes fueron *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, productoras de fumonisinas y capaces de soportar temperaturas más elevadas y menor disponibilidad de agua. Entre las especies encontradas, algunas requieren una mayor vigilancia, como por ejemplo *F. langsethiae* o *A. carbonarius*. Esta última ha sido detectada solamente en un 10% de las muestras de Córdoba precosecha, mediante métodos moleculares. Sin embargo, se trata de una especie peligrosa por su producción de OTA, llevada a cabo casi por el 100% de las cepas de esta especie (Perrone *et al.*, 2006). En estudios previos también se detectó *A. carbonarius* en porcentajes no muy elevados (20% en cebada y trigo blando de Castilla y León, campaña 2006) (González – Jaén *et al.*, 2008). Otras especies como la ya mencionada *Alternaria alternata*, o *Penicillium italicum*, deberían también ser objeto de atención por su elevada proporción. La región de Lleida presentaría, de acuerdo con nuestro estudio, un mayor riesgo y por lo tanto, requeriría una mayor vigilancia y control.

En resumen, teniendo en cuenta el cambio climático y los escenarios previstos en las regiones mediterráneas (temperaturas elevadas y niveles de estrés hídrico altos, especialmente en verano) se puede predecir que, a la vista de los resultados de esta Tesis, se espera que las especies objeto de estudio continúen presentes en futuros

escenarios, si bien es posible que se esté produciendo un desplazamiento de las especies toxígenas y la flora acompañante. Las condiciones esperadas como resultado del cambio climático actual supondrían cambios en las tasas de crecimiento y en su síntesis de toxinas, y por tanto su desplazamiento y en consecuencia, un cambio en su distribución (Miraglia *et al.*, 2009). Las temperaturas más elevadas (35 y 40°C) no supondrían un riesgo, ya que el crecimiento fúngico se reduce en gran medida y no hay síntesis de toxinas. Sin embargo, una fase previa con temperaturas y niveles de estrés hídrico más moderados, estimularían el crecimiento, así como la síntesis de fumonisinas. Además, este cambio en las condiciones climáticas podría reducir la eficacia de los antifúngicos utilizados contra el crecimiento de hongos patógenos y toxígenos, ocasionando un impacto negativo adicional en la seguridad alimentaria especialmente al suministrar dosis menores de las letales.

Conclusiones

Conclusiones

1. En el estudio de las cepas de *Fusarium* aisladas de arroz de Filipinas se vio una presencia mayoritaria de la especie *F. fujikuroi* (82,05%). Estas cepas presentaron ambos tipos de apareamiento, en una relación aproximada de los idiomorfos *MAT1-MAT2* de 1:2, sugiriendo la posibilidad de reproducción sexual.
2. El análisis filogenético de las poblaciones de *F. fujikuroi* analizadas demuestra una variabilidad intraespecífica muy baja por parte de estas cepas. Todas las cepas de esta especie se incluyeron en un grupo, independientemente de su origen geográfico o de su hospedador.
3. El porcentaje de cepas de *F. fujikuroi* capaces de producir fumonisinas fue del 40,62%. Este valor, sumado a los niveles elevados de síntesis de algunas de las cepas, indica que la capacidad potencial de producción de estas toxinas por parte de esta especie está, probablemente, subestimada, y debería ser revisada.
4. El protocolo de RT-PCR a tiempo real para detección y cuantificación de la expresión relativa del gen *FUM1* en *F. fujikuroi* desarrollado se relaciona positivamente con la producción de fumonisinas, y podría ser utilizado eficazmente en la determinación del riesgo potencial de cepas de esta especie, así como en estudios de regulación y evaluación de tratamientos de control.
5. Las especies productoras de fumonisinas *F. verticillioides* y *F. proliferatum* presentaron crecimiento fúngico en un amplio rango de temperaturas y potenciales hídricos. Las condiciones óptimas de crecimiento fueron 25-30°C y -0,7 MPa. Temperaturas y niveles de estrés hídrico más extremos (35°C y -7,0 MPa) redujeron la tasa de crecimiento. A 40°C no se detectó crecimiento de ninguna de las dos especies.
6. La influencia del sustrato en *F. verticillioides* y *F. proliferatum* fue similar. Las dos especies estudiadas presentaron una tasa de crecimiento mayor en el medio de extracto de cebada, seguido del medio de extracto de maíz y por

último el de trigo. *F. verticillioides* presentó una tasa de crecimiento algo mayor que *F. proliferatum* en las mismas condiciones.

7. Sin embargo, el sustrato influyó de manera diferente en las dos especies en cuanto a síntesis de toxina. *F. verticillioides* presentó expresión significativa del gen *FUM1* en todas las condiciones probadas, siendo el medio de extracto de maíz el que mostró los niveles mayores de expresión génica. Sin embargo, *F. proliferatum*, presentó expresión de este gen solamente en cebada y trigo a 25°C y -2,8 MPa, siendo el medio de maíz el que mostró los valores de menor expresión del gen *FUM1*.
8. El benomilo mostró una eficacia elevada en la reducción del crecimiento fúngico. Las dosis letales LD₅₀ y LD₉₀ de benomilo para *F. verticillioides* fueron de 0,93 y 3,30 ppm respectivamente. La aplicación del fungicida redujo la tasa de crecimiento cuando se aplicó en condiciones óptimas de crecimiento fúngico (25-30°C y -0,7 MPa). En condiciones ambientales marginales, especialmente de estrés hídrico elevado, la eficacia de este se redujo drásticamente.
9. El benomilo fue también eficaz en la reducción de la síntesis de fumonisinas. Este fungicida redujo la expresión del gen *FUM1* en general, aunque a 20°C y -0,7 MPa se observó expresión de este gen al ser añadida la dosis LD₅₀. Estas dosis subletales de fungicida suponen por tanto un riesgo, ya que no reducen por completo el crecimiento fúngico y además estimulan la síntesis de toxinas.
10. El gen *FUM19* mostró un patrón de expresión génica similar al del gen *FUM1* en todas las dosis de fungicida. No se observó inducción de este gen a ninguna de las dosis de aplicación del fungicida, por lo que se concluye que el gen *FUM19* transportaría sólo fumonisinas, sin intervenir en el transporte del fungicida.
11. La microbiota asociada a trigo primavera en Córdoba y Lleida presentó una distribución diferente en precosecha y post-cosecha. Los índices de riqueza específica fueron mayores en Córdoba post-cosecha, Lleida precosecha, Lleida post-cosecha y por último Córdoba precosecha. Sin embargo, debido a

la gran dominancia que mostraron ciertas especies, la diversidad fue mayor en las muestras de Córdoba y Lleida precosecha (0,741 y 0,692 respectivamente), alrededor de dos veces la diversidad de las muestras de Lleida y Córdoba post-cosecha (0,363 y 0,350 respectivamente).

12. El patrón de distribución de las especies toxígenas de riesgo detectadas, y con ellas las toxinas de riesgo, presentó diferencias en ambas regiones. En Córdoba, las especies más representadas fueron *A. niger*, *Alternaria alternata* y *P. italicum* en las muestras precosecha, y *A. alternata*, *F. proliferatum* y *Penicillium italicum* en las muestras post-cosecha. Las especies de *Fusarium* más importantes en esta región fueron *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, especies productoras de fumonisinas. Además, mediante el uso de métodos moleculares, se detectaron especies como *F. langsethiae* en las muestras post-cosecha, o *F. equiseti*, *A. carbonarius* o *A. flavus*.
13. Por otro lado, en Lleida destacaron *A. alternata*, *Stemphylium botryosum* y *Epicoccum nigrum* en las muestras de precosecha, y *A. alternata*, *F. graminearum* y *A. niger* en post-cosecha. En esta región *F. graminearum* fue la especie más representada de este género, la cual se detectó en Córdoba en porcentaje muy bajo. También en Lleida se detectaron *F. langsethiae*, *F. equisei* y *A. flavus*. Estas especies menos estudiadas deberían ser consideradas y estudiadas, tanto su perfil toxígeno real, como su incidencia en España.
14. Bajo los escenarios previstos en las regiones mediterráneas por el cambio climático las especies de *Fusarium* estudiadas continuarán presentes y seguirán representando riesgo por la producción de toxinas. Es probable que se dé un cambio en la distribución de las especies fúngicas debido a los cambios en temperatura y disponibilidad de agua, aunque las especies estudiadas presentan tolerancia al crecimiento en estas condiciones de temperatura y estrés hídrico elevados.
15. Las temperaturas más altas esperadas (35-40°C) no supondrán un riesgo directo por parte de las especies estudiadas, ya que reducen el crecimiento fúngico y no estimulan la síntesis de toxinas. Sin embargo, a niveles de estrés hídrico moderados y temperaturas menores, como las que se dan en las épocas

previas a la cosecha, el crecimiento fúngico es elevado y se produce un aumento en la síntesis de toxinas. Además, este cambio en las condiciones podría disminuir la eficacia de los fungicidas empleados, por lo que sería necesaria una evaluación de su efectividad en las nuevas condiciones.

Bibliografía

Bibliografía

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 (3): 213-227.

Aciego Pietri, J. C. y Brookes, P. C. (2008). Nitrogen mineralisation along a pH gradient of a silty loam UK soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 797–802.

Agrios, G. N. (1997). Plant Pathology. 4^a Ed. *Fitopatología*. Academic Press, S. Diego, EEUU.

Aldred, D. y Magan, N. (2004). Prevention strategies for trichothecenes. *Toxicology Letters*, 153: 165–171.

Alexander, N. J., Proctor, R. H. y McCormick, S. P. (2009). Genes, gene clusters and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. *Toxin Reviews*, 28 (2-3): 198-215.

Aliakbari, F., Mirabolfathy, M., Emami, M., Mazhar, S. F. y Karami-Osboo, R. (2007). Natural occurrence of *Fusarium* species in maize kernels at Gholestan province in North Iran. *Asian Journal of Plant Sciences*, 6 (8): 1276-1281.

Altuntas, H. D., Hamurcu, Z., İmamoglu, N. y Liman, B. C. (2003). Effects of ochratoxin A on micronucleus frequency in human lymphocytes. *Nahrung/Food*. 47 (1): 33–35.

Amatulli, M. T., Spadaro, D., Gullino, M. L. y Garibaldi, A. (2010). Molecular identification of *Fusarium spp.* associated with bakanae disease of rice in Italy and assessment of their pathogenicity. *Plant Pathology*, 59: 839-844.

Amini, J. y Sidovich, D.F. (2010). The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* associated with *Fusarium* wilt of tomato. *Journal of Plant Protection Research*, 50 (2): 172–178.

- Andersson, S., Nilsson, I. y Saetre, P.** (2000). Leaching of dissolved organic carbon (DOC) and dissolved organic nitrogen (DON) in moor humus as affected by temperature and pH. *Soil Biology and Biochemistry*, 32: 1–10.
- Anjorin, T. S., Salako, E. A. y Makun, H. A.** (2013). Control of toxigenic fungi and micotoxinas with phytochemicals: potentials and challenges. *Mycotoxin and Food Safety in Developing Countries*, 2013: 181-202.
- Aoki, T., O' Donnell, K. Y Geiser, D. M.** (2014). Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *Journal of General Plant Pathology*, 80: 189-201.
- Araguas, C., González-Peñas, E., López de Cerain, A. y Bello, J.** (2003). Acerca de la posible contaminación por ocratoxina en alimentos. I. Cereales cultivados en diversas zonas geográficas de la Comunidad Foral de Navarra. *Alimentaria*: 23-29.
- Arroyo, M., Aldred, D. y Magan, N.** (2005). Environmental factors and weak organic acid interactions have differential effects on control of growth and ochratoxin A production by *Penicillium verrucosum*. *International Journal of Food Microbiology*, 98: 223–231.
- Azcón, R., Rubio, R. y Barea, J. M.** (1991). Selective interactions between different species of mycorrhizal fungi and *Rhizobium meliloti* strains, and their effects on growth, N₂- fixation (¹⁵N) and nutrition of *Medicago sativa* L. *New Phytologist*, 117: 399-404.
- Barros, G., Alaniz Zanon, M. S., Palazzini, J. M., Haidukowski, M., Pascale, M. y Chulze, S.** (2012). Trichothecenes and zearalenone production by *Fusarium equiseti* and *Fusarium semitectum* species isolated from Argentinean soybean. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 29: 1436-1442.
- Bååth, E. y Anderson, T. H.** (2003). Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques. *Soil Biology & Biochemistry*, 35: 955-963.
- Barnett, H. L. y Hunter, B. A.** (1998). Illustrated genera of imperfecti fungi. 4a Ed., APS Press, *The American Phytopathological Society*, St. Paul, Minnesota, EEUU. Pág. 218.

- Bauer, B. E., Wolfger, H. y Kuchler, K.** (1999). Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochemical and Biophysical Acta*, 1461: 217–236.
- Beasley, V. R.** (1989). Trichothecene mycotoxicosis, pathophysiologic effects. Vols. 1 y 2. *CRC Press*, Florida, Boca Raton.
- Belli, N., Marin, S., Sanchis, V. y Ramos, A. J.** (2004). Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* obtained from grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 96: 19–27.
- Bennet, J. W. y Klich, M.** (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16: 497-516.
- Berbee, M. L., Payne, B. P., Zhang, G., Roberts, R. G. y Turgeon, B. G.** (2003) Shared ITS DNA substitutions in isolates of opposite mating type reveal a recombining history for three presumed asexual species in the filamentous ascomycete genus *Alternaria*. *Mycology Research*, 107: 169-182.
- Berek, L., Petri, I. B., Mesterházy, A., Téren, J. Y Molnár, J.** (2001). Effects of mycotoxins on human immune functions *in vitro*. *Toxicology in Vitro*, 15 (1): 25-30.
- Bernstein, L., Bosch, P., Canziani, O., Chen, Z., Christ, R., Davidson, O., Hare, W., Huq, S., Karoly, D., Kattsov, V., Kundzewicz, Z., Liu, J., Lohmann, U., Manning, M., Matsuno, T., Menne, B., Metz, B., Mirza, M., Nicholls, N., Nurse, L., Pachauri, R., Palutikof, J., Parry, M., Qin, D., Ravindranath, N., Reisinger, A., Ren, J., Riahi, K., Rosenzweig, C., Rusticucci, M., Schneider, S., Sokona, Y., Solomon, S., Stott, P., Stouffer, R., Sugiyama, T., Swart, R., Tirpak, D., Vogel, C. y Yohe, G.** (2007). IPCC, 2007: Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. *Intergovernmental Panel on Climate Change*, Ginebra. <<http://www.ipcc.ch/ipccreports/ar4-syr.htm>>.
- 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 fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1988: 743-745.

- Bin-Umer, M. A., McLaughlin, J. E., Basu, D., McCormick, S. y Tumer, N. E.** (2011). Trichothecene mycotoxins inhibit mitochondrial translation – Implication for the mechanism of toxicity. *Toxins*, 3: 1484-1501.
- Blandino, M., Haidukowski, M., Pascale, M., Plizzari, L., Scudellari, D. y Reyneri, A. N.** (2012). Integrated strategies for the control of *Fusarium* Head Blight and deoxynivalenol contamination in winter wheat. *Field Crops Research*, 133: 139-149.
- Bluhm, B. y Woloshuk, C.** (2005). Starch influences fumonisin production by *Fusarium verticillioides* during colonization of maize kernels. *Phytopathology*, 95: 1333-1339.
- Bobrowicz, P., Pawlak, R., Correa, A., Bel-Pedersen, D. y Ebbole, D. J.** (2002). The *Neurospora crassa* pheromone precursor genes are regulated by the mating type locus and the circadian clock. *Molecular Microbiology*, 45: 795-804.
- Bojja, R.S., Cerny, R.L., Proctor, R.H. y Du, L.** (2004). Determining the biosynthetic sequence in the early steps of the fumonisin pathway by use of three gene-disruption mutants of *Fusarium verticillioides*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 2855–2860.
- Booth, C.** (1971). The genus *Fusarium*. *Commonwealth Agricultural Bureau*, Bucks. Coen.
- Borrell, J. y Gimeno, G.** (2003). Micotoxinas en los alimentos: medidas de prevención y detoxificación. *Selecciones Avícolas*, 2003: 567-572.
- 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., Nueva 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., Atanosova-Penichon, V., Verdal-Bonnin, M. N., Pinson-Gadais, L. y Richard-Forget, F.** (2009). Ferulic acid, an efficient inhibitor of

type B trichlorothecene biosynthesis and *Tri* gene expression in *Fusarium* liquid cultures. *Mycology Research*, 113: 746-753.

Brown, D. W., McCormick, S. P. Alexander, N. J., Proctor, R. H. y Desjardins, A.E. (2001). Genetic and biochemical approach to study trichothecenes diversity in *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics Biology*, 32: 121-133.

Brul, S., Schuren, F., Montijn, R., Keijser, B. J. F., van der Speck, 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.

Bunyavanich, S., Landrigan, C. P., McMichael, A. J. y Epstein, P. R. (2003). The impact of climate change on child health. *Ambulatory Pediatrics*, 3: 44–52.

Burmeister, H. R., Ciegler, A. y Vesonder, R. F. (1979). Moniliformin, a metabolite of *Fusarium moniliforme* NRRL 6322: purification and toxicity. *Applied and Environmental Microbiology*, 37: 11–13.

Busman, M., Desjardins, A. E. y Proctor, R. H. (2012). Analysis of fumonisin contamination and the presence of *Fusarium* in wheat with kernel black point disease in the United States. *Food Additives and Contaminants. Part A*, 29 (7): 1092-1100.

Cabañes, F. J., Bragulat, M. R. y Castellá, G. (2010). Ochratoxin A producing species in the genus *Penicillium*. *Toxins*, 2 (5): 1111-1120.

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, Canada. Pág. 386.

Carter, L. L. A., Leslie, J. F. y Webster, R. K. (2008). Population structure of *Fusarium fujikuroi* from California rice and water grass. *Phytopathology*, 98: 992-998.

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.

Cepeda J. (1999). Química de suelos. *Editorial Trillas*, México. Pág. 167.

Chang, D. C., Grant, G. B., O'Donnell, K., Wannemuehler, K. A., Noble-Wang, J., Rao, C. Y., Jacobson, L. M., Crowell, C.S., Sneed, R., Lewis, F. M. T., Schaffzin, J. K., Kainer, M., Genese, C. A., Alfonso, E. C., Jones, D. B., Srinivasan, A., Fridkin, S. K. y Park B.J. (2006). A multistate outbreak of *Fusarium* keratitis associated with use of a new contact lens solution. *Journal of the American Medical Association*, 296: 953–963.

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 aflatoxins*. Miller, J. D. y Trenholm, H. L. (Eds.). Eagan Press, St Paul, Minnesota, EEUU. Págs. 471-486.

Chehri, K., Jahromi, S. T., Reddy, K. R. N., Abbasi, S. y Salleh, B. (2010). Occurrence of *Fusarium* spp. and fumonisins in stored wheat grains marketed in Iran. *Toxins*, 2: 2816–2823.

Chulze, S. N., Palazzini, J. M., Torres, A. M., Barros, G., Ponsone, M. L., Geisen, R., Schmidt-Heydt, M. y Köhl, J. (2015). Biological control as a strategy to reduce the impact of mycotoxins in oeanuts, grapes and cereals in Argentina. *Food Additives and Contaminants. Part A*, 32 (4): 471-479.

CIMMYT. (2006). International Maize and Wheat Improvement Center. <https://www.flickr.com/photos/cimmyt/5072214514/in/photostream/>

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: 629-42.

Cole, R. J. y Cox, R. H. (1981). Handbook of Toxic Fungal Metabolites. Nueva York, *Academic Press*, 67–93.

Comisión Codex Alimentarius. (2002). Proposed draft code for practice for the prevention (reduction) of micotoxina contamination in cereals, including annexes on ochratoxin A, zearalenone, fumonisinas and Trichothecenes, CX/FAC 02/21. Joint FAO/WHO Food standars Programme, Rotterdam, Países Bajos.

Comisión Europea (2003). Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states. *Reports on tasks for scientific cooperation*. Bruselas, Bélgica.

Comisión Europea de Regulación (2006). Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards *Fusarium* toxins in maize and maize products. *Official Journal of the European Union*.

Comisión Europea. (2007). European Commission, Green Paper of 29 of June 2007 on adapting to climate change in Europe – options for EU action [COM (2007) 354].

Comisión Europea de Regulación (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*.

Comisión Europea de Regulación (2011). Commission Regulation (EU) No 420/2011 of 29 April 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*.

Comisión Europea de Regulación (2011). Commision Regulation (EU) No 559/2011 of 7 June 2011 amending Annexes II and III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for captan, carbendazim, cyromazine, ethephon, fenamiphos, tiophanate-methyl, triasulfuron and triticonazole in or on certain products. *Official Journal of the European Union*.

- Conde-Ferrández, L.** (2007). El *locus MAT* (*mating type*) de los ascomicetos: su evolución, estructura y regulación. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24: 95-99.
- Conner, R. L., Hwang, S. F. y Stevens, R. R.** (1996). *Fusarium proliferatum*: a new causal agent of black point in wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 18: 419–423.
- Convoka, E., Laciaková, A., Kovác, G. y Seidel, H.** (2003). Fusarial toxins and their role in animal diseases. *The Veterinary Journal*, 165: 214-220.
- Cools, H.J. y Fraaije, B.A.** (2012). Update on mechanisms of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola* and implications for future control. *Pesticide Management Science*, 69 (2): 150–155.
- Creppy, E. E.** (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127: 19-28.
- Cruz, A., Marín, P., González-Jaén, M. T., Aguilar, K. G. I. y Cumagun, C. J. R.** (2013). Phylogenetic analysis, fumonisin production and pathogenicity of *Fusarium fujikuroi* strains isolated from rice in the Philippines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93 (12): 3032-3039.
- Cuero, R. G., J. E. Smith y Lacey, J.** (1988). Mycotoxin production by *Aspergillus flavus* and *Fusarium graminearum* in irradiated maize grains in the presence of other fungi. *Journal of Food Protection*, 51: 452– 456.
- Cumagun, C. J. R.** (2007) Population genetics of plant pathogenic fungi with emphasis on *Fusarium* species. *The Philippine Agricultural Scientist*, 90: 244-256.
- Dallyn, H. y Fox, A.** (1980). Spoilage of material of reduced water activity by xerophilic fungi. En: Gould, G.H., Corry, J.E.L. (Eds.), *Microbial Growth and Survival in Extremes of Environment*. Academic Press, Londres. Págs. 129-139.
- 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. y Plattner, R. D. N.** (1998). Distribution of fumonisins in maize ears infected with strains of *Fusarium moniliforme* that differ in fumonisin production. *Plant Disease*, 82: 953–958.
- 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 (*venaceae*) to Z (*eae*). *Annual Review of Phytopathology*, 41: 177-198.
- Desjardins, A. E.** (2006). *Fusarium*, mycotoxins, chemistry. *Genetical Biology*, APS, St Paul, EEUU. Pág. 259.
- Desjardins, A. E., Busman, M., Muhitch, M. J. y Proctor, R. H.** (2007). Complementary host-pathogen genetic analyses of the role of fumonisines in the *Zea mays*- *Gibberella moniliformis* seedling interaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 70: 149-160.
- Desjardins, A. E. y Proctor, R. H.** (2007). Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 47-50.
- De Souza, J. C. y Formento, A. N.** (2004). Estudio de anthesis en trigo y su relación con la fusariosis. En: *Congreso Nacional de trigo. IV Simposio Nacional de Cultivos de Siembra Otoño-Invernal*. INTA (Eds.). Buenos Aires. Pág. 221.
- Directiva 2009/128/EC** (2009). Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides. *Official Journal of the European Union*, 309/71.
- D'Mello, J. P. C. y MacDonald, A. M. C.** (1997). Mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 69: 155-166.
- 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.

Dyer, P. S., Paoletti, M. y Archer, D. B. (2003) Genomics reveals sexual secrets of *Aspergillus*. *Microbiology*, 149: 2301-2303.

Edwards, S. G. y Godley, N. P. (2010). Reduction of *Fusarium* head blight and deoxynivalenol in wheat with early fungicide applications of prothioconazole. *Food Additives and Contaminants, Part A*, 27: 629:635.

EFSA (2005). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from the Commission related to fumonisins as undesirable substances in animal feed. *EFSA J.* 235,1–32.

El-Nezami, H., Polychronaki, N., Salminen, S. y Mykkanen, H. (2002). Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative zearalenol. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 3545–3549.

Espino, L. (2012). <http://ucanr.edu/>

FAO (2004). Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. *FAO Food and Nutrition Paper n.º. 81*. Roma: Food and Agriculture Organization, págs. 1–180.

FAO (2008). Global information and early warning system on food and agriculture (GIEWS). *Food and Agriculture Organization*, Roma.

FHIA. (2007). Deterioro poscosecha de las frutas y hortalizas frescas por hongos y bacterias. 4: 2-5. <http://fhia.org.hk/downloads/fhiainfdic2007.pdf>, Accesada 02/11/10.

- Flaherty, J. E., Pirttila, A. M., Bluhm, B. H., and Woloshuk, C. P.** (2003). *PAC1*, a pH regulatory gene from *Fusarium verticillioides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 5222-5227.
- Folcher L., Jarry, M., Weissenberger, A., G erault, F., Eychenne, N., Delos, M. y Regnault-Roger, C.** (2009). Comparative activity of agrochemical treatments on mycotoxin level with regard to corn borers and *Fusarium mycoflora* in maize (*Zea mays* L.) fields. *Crop Protection*, 28: 302–308.
- Food and Agriculture Organization.** (2004). Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. *FAO Food and Nutrition Paper N  81. Roma: Food and Agriculture Organization*, p ags. 1–180.
- Foroud, N. A. y Eudes, F.** (2009). Trichothecenes in cereal grains. *International Journal of Molecular Science*, 10: 147–173.
- Fotso, J., Leslie, J. F. y Smith, S.** (2002) Production of beauvericin, moniliformin, fusaproliferin, and fumonisins B1, B2 , and B3 by fifteen ex-type strains of *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 5195–5197.
- Frisvad, J. C., Frank, J. M., Houbraeken, 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.
- Frosteg ard,  ., Bååth, E. y Tunlid, A.** (1993). Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forest as revealed by phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 25: 723–730.
- Galán, L. C. y Rodríguez, J. J.** (2003). La contaminación por micotoxinas. En: *Observatori de la Seguretat Alimentaria*. Universidad Autónoma 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 trichithecene biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology*, 46: 604-613.

Geiser, D. M., Jiménez-Gasco, M. 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.

Geiser, D. G., Lewis-Ivey, M. L., Hazika, G., Juba, J. H. y Miller, S. A. (2005). *Gibberella xylarioides* (anamorph: *Fusarium xylarioides*), a causative agent of coffee wilt disease in Africa, is a previously unidentified member of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 97: 191–201.

Geiser, D. M., Aoki, T., Bacon, C. W., Baker, S. E. Bhattacharyya, M. K., Brandt, M. E., Brown, D. W., Burgess, L. W., Chulze, S., Coleman, J. J., Correll, J. C., Covert, S. F., Crous, P. W., Cuomo, C. A., de Hoog, G. S., di Pietro, A., Elmer, W. H., Epstein, L., Frandsen, R. J. N., Freeman, S., Gagkaeva, T., Glenn, A. E., Gordon, T. R., Gregory, N. F., Hammond-Kosack, K. E., Hanson, L. E., Jiménez-Gasco, M. M., Kang, S., Kistler, H. C., Kuldau, G. A., Leslie, J. F., Logrieco, A. Lu, G., Lysøe, E., Ma, Li-Jun, McCormick, S. P., Migheli, Q., Moretti, A., Munaut, F., O'Donnell, K., Pfenning, L., Ploetz, R. C., Proctor, R. H., Rehner, S. A., Robert, V. A. R. G., Rooney, A. P., bin Salleh, B., Scandiani, M. M., Scauflaire, J., Short, D. P. G., Steenkamp, E., Suga, H., Summerell, B. A., Sutton, D. A., Thrane, U., Trail, F., van Diepeningen, A., van Etten, H. D., Viljoen, A., Waalwijk, C., Ward, T. J., Wingfield, M. J., Xu, J. R., yang, X. B., Yli-Mattila, T. y Zhang, N. (2013). Letter to the editor: One fungus, one name: defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. *Phytopathology*, 103 (5): 400-408.

Gelderblom, W. C., Thiel, P. G. y van der Merwe, K. J. (1984). Metabolic activation and deactivation of fusarin C, a mutagen produced by *Fusarium moniliforme*. *Biochemical Pharmacology*, 33 (10): 1601-1603.

Gelderblom, W. C. A., Jaskiewicz, K., Marasas, W. F. O., Thiel, P. G., Horak, R. M., Vlegaar, R. y Kriek, N. P. J. (1988). Fumonisin-novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 1806-1811.

- 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.
- Gil-Serna, J., González-Salgado, A., González-Jaén, M. T., Vázquez, C. y Patiño, B.** (2009). ITS-based detection and quantification of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus westerdijkiae* in grapes and green coffee beans by real-time quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 131: 162-167.
- Gil-Serna, J., Vázquez, C., Sardiñas, N., González-Jaén, M. T. y Patiño, B.** (2011). Revision of ochratoxin A production capacity by the main species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Aspergillus steynii* revealed as the main risk of OTA contamination. *Food Control*, 22: 343-345.
- Gil-Serna, J., Mateo, E. M., González-Jaén, M. T., Jiménez, M., Vázquez, C. y Patiño, B.** (2013). Contamination of barley sedes with *Fusarium* species and their toxins in Spain: an integrated approach. *Food Additives and Contaminants, Part A*. 30 (2): 372-380.
- Gil-Serna, J., Patiño, B., Cortes, L., González-Jaén, M. T. y Vázquez, C.** (2015). *Aspergillus steynii* and *Aspergillus westerdijkiae* as potential risk of OTA contamination in food products in warm climates. *Food Microbiology*, 46: 168-175.
- Ginzinger, D. G.** (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30: 503-512.
- 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 (3): 213-218.
- Glenn, A.** (2007). Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, 137: 213-240.
- 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-Jaén, M. T., Marín, P., González-Salgado, A., Vázquez, C., Aparicio, N., Patiño, B., Fernández-Hevia, C. y Esteban, M. M. (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*, 3: 36-43.

González-Salgado, A., González-Jaén, M. T., Vázquez, C. y Patiño, B. (2008). Highly sensitive PCR-based detection method specific to *Aspergillus flavus* in wheat flour. *Food Additives and Contaminants*, 25 (06): 758-764.

Gunner, H. B. y Alexander, M. (1964). Anaerobic growth of *Fusarium oxysporum*. *Journal of bacteriology*, 87 (6): 1309-1316.

Haidukowski, M., Pascale, M., Perrone, G., Pancaldi, D., Campagna, C. y Visconti, A. (2005). Effect of fungicide in the development of *Fusarium* head blight, yield and deoxynivalenol accumulation in wheat inoculated under field conditions with *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 85: 191-198.

Hatcher, P. E. (1995). Three-way interactions between plant pathogenic fungi, herbivorous insects and their host plants. *Biology Reviews*, 70: 639-694.

Hawksworth, D. L. (2012) Managing and coping with names of pleomorphic fungi in a period of transition. *IMA Fungus* 3:15–24.

Hedayati, M. T., Pasqualotto, A. C., Warn, P. A., Bowyer, P. y Denning, D. W. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*, 153: 1677-1692.

Hillis, D. M. y Bull, J. J. (1993) An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, 42: 182-192.

Holmquist, G. U., Walker, H. W. y Stahr, H. M. (1983). Influence of temperature, pH, water activity and antifungal agents on growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Journal of Food Science*, 48 (3): 778-782.

- 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.
- Infantino, A., Pucci, N., Conca, G. y Santori, A.** (2007). First report of *Fusarium langsethiae* on durum wheat kernels in Italy. *Plant Disease*, 91 (10): 1362.
- Ioos, R., Belhadj, M., Menez, M. y Faure, A.** (2005). The effects of fungicides on *Fusarium spp.* and *Microdochium nivale* and their associated trichothecene mycotoxins in French naturally-infected cereal grains. *Crop Protection*, 24: 894–902.
- ISTA** (1999). International rules for seed testing. *Seed Science and Technology*, 27: Supplement, Rules.
- ISTA** (2013). International Rules for Seed Testing. Rules Proposals for the International Rules for Seed Testing 2013 Edition.
- Ismail, Y., McCormick, S. y e Hijri, M.** (2012). The arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus irregulare*, controls the mycotoxin production of *Fusarium sambucinum* in the pathogenesis of potato. *FEMS Microbiology Letters*, 314 (1): 46-51.
- Ivic, D., Sever, Z. y Kuzmanovska, B.** (2011). In vitro sensitivity of *Fusarium graminearum*, *F. avenaceum* and *F. verticillioides* to carbendazim, tebuconazole, flutriafol, metconazole and prochloraz. *Pesticidi i Fitomedicina*, 26 (1): 35–42.
- Jackson, M. L.** (1970). Análisis químico de suelos. *Editorial Omega*, Barcelona, España. Pág. 662.
- Jenkinson, P. y Parry, D.W.** (1994). Splash dispersal of conidia of *Fusarium culmorum* and *Fusarium avenaceum*. *Mycological Research*, 98: 506–510.
- 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.
- Jiménez, M., Mateo, J.M., Hinojo, M.J. y Mateo, R.** (2003). Sugars and amino- acids as factors affecting the synthesis of fumonisins in liquid cultures of isolates of the

Gibberella fujikuroi complex. *International Journal of Food Microbiology*, 89: 185–193.

Jimoh, K.O. y Kolapo, A.L. (2008) Mycoflora and aflatoxin production in market samples of some selected Nigerian foodstuffs. *Research Journal of Microbiology*, 3: 169-174.

Jonsson, M., Atosuo, J., Jestoi, M., Nathanail, A. V., Kokkonen, U. M., Anttila, M., Koivisto, P., Lilius, E. M. y Peltonen, K. (2015). Repeated dose 28-day oral toxicity study of moniliformin in rats. *Toxicology Letters*, 233 (1): 38-44.

Juárez-Becerra, G. P., Sosa-Morales, M. E. y López-Malo, A. (2010). Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 4-2: 14-23.

Jurado, M., Vázquez, C., Patiño, B., González-Jaén, M.T. (2005). PCR detection assays 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. UCM, Madrid.

Jurado, M., Vázquez, C., Callejas, C. y González-Jaén, M. T. (2006a). Occurrence and variability of mycotoxigenic *Fusarium* species associated to wheat and maize in the south west of Spain. *Mycological Research*. 22: 87-91.

Jurado, M., Vázquez, C., Marín, S., Sanchís, V. y González-Jaén, M. T. (2006b). PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in maize. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 681-689.

Jurado, M., Marín, P., Magan, N. y González-Jaén, M.T. (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.

- Jurado, M., Marín, P., Callejas, C., Moretti, A., Vázquez, C. y González-Jaén, M.T.** (2010). Genetic variability and fumonisin production by *Fusarium proliferatum*. *Food Microbiology*, 27: 50–57.
- Kabak, B., Dobson, A.D.W. y Var, I.** (2006). Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 4:, 593-619.
- Keller, N.P., Turner, G., y Bennett, J.W.** (2005) Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 937–947.
- Kemmitt, S. J., Wright, D., Goulding, K. W. T. y Jones, D. L.** (2006). pH regulation of carbon and nitrogen dynamics in two agricultural soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 38: 898-911.
- Kerényi, Z., Zeller, K., Hornok, L., y Leslie, J.F.** (1999). Molecular standardization of mating type terminology in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (9): 4071–4076.
- Kerényi, Z., Mulè, G., Moretti, A., Waalwijk, C. y Hornok, L.** (2002). Fertility and mating type assessment within *Fusarium proliferatum* isolates from different host plants. *Journal of Applied Genetics*, 43: 55–68.
- Kerényi, 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.
- Khalesi, M. y Khatib, N.** (2011). The effects of different ecophysiological factors on ochratoxin A production. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32: 113-121.
- Kiffer, E. y Morelet, M.** (1997). Les *Deuteromycetes*. Classification et clés d'identification générique. INRA Editions, Paris. Pág. 306.
- Kimura, M., Anzai, H. y Yamaguchi, I.** (2001). Microbial toxins in plant-pathogen interactions: biosynthesis, resistance mechanisms and significance. *Journal of General and Applied Microbiology*, 47: 149–60.

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.

Kimura, M., Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Ohsato, S. y Fujimura, M. (2007) Molecular and genetic studies of *Fusarium trichothecene* biosynthesis: pathways, genes, and evolution. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71: 2105–2123.

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. Pág. 116.

Kohut, G., Adám, 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. e 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.

Krska, R., Baumgartner, S. y Josephs, 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.

Kuiper-Goodman, T., Scott, P. M. y Watanabe, H. (1987). Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 7: 253–306.

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.

Kumal, V. (2015). Lab and field techniques for aflatoxin research in peanut. www.biotecharticles.com

- Kumar, V., Basu, M.S., 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, Holanda. 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*. Chelkowsky, J. (Ed.). Elsevier, Amsterdam. Págs. 77-118.
- Lai, M., Semeniuk, G. y Hesseltine, C.W.** (1970). Conditions for production of ochratoxin A by *Aspergillus* species in a synthetic medium. *Applied Microbiology*, 19: 542-544.
- 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 Publishing, Nueva York. Págs. 347-366.
- Leslie, J. F., Marasas, W. F., Shephard, G. S., Sydenham, E. W., Stockenström, S. y Thiel, P. G.** (1996). Duckling toxicity and the production of fumonisin and moniliformin by isolates in the A and E mating populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*). *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (4): 1182-1187.
- 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*. EEUU.

- Link, H. F.** (1809). Observaciones in ordines plantarum naturales. Dissertatio I. *Magazin der Gesellschaft Naturforschenden Freunde Berlin*, 3:10.
- Linnemannstöns, P., Schulte, J., del Mar Prado, M., Proctor, R. H., Avalos, J. y Tudzynski, B.** (2002). The polyketide synthase gene PKS4 from *Gibberella fujikuroi* encodes a key enzyme in the biosynthesis of the red pigments bikaverine. *Fungal Genetics and Biology*, 37: 134-148.
- Llorens, A., Mateo, R., Hinojo, M., Logrieco, A. y Jiménez, M.** (2004). 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.
- Llorent-Martínez, E. J., Fernández de Córdoba, M. I., Ruiz-Medina, A. y Ortega-Barrales, P.** (2012). Fluorimetric determination of thiabendazole residues in mushrooms using sequential injection analysis. *Talanta*, 96: 190-194.
- Logrieco, A., Moretti, A., Castella, G., KostECKI, M., Golinski, P., Ritieni, A. y Chelkowski, J.** (1998). Beauvericin production by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3084–3088.
- 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., Mulè, 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 (1-2): 11-16.
- 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. UCM, 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.
- Ma, L.J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F., Gardiner, D. M., Manners, J. M. y Kazan, K.** (2013). *Fusarium* pathogenomics. *Annual Review of Microbiology*, 67 (1): 399-416.
- Magan, N., Hope, R., Colleate, A. y Baxter, E. S.** (2002). Relationship between growth and mycotoxin production by *Fusarium* species, biocides and environment. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 685-690.
- Magan, N. y Olsen, M.** (2004). *Mycotoxins in Food: detection and control*. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, Reino Unido.
- 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 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, Holanda. Págs. 19-35.
- Magan, N., Medina, A. y Aldred, D.** (2011). Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and post-harvest. *Plant Pathology*, 60: 150-163.
- Magnucka, E. G., Suzuki, Y., Pietr, S. J., Kozubek, A. y Zarnowski, R.** (2007). Action of benzimidazole fungicides on resorcinolic lipid metabolism in rye seedlings depends on thermal and light growth conditions. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88: 219-225.
- Mamza, W. S., Zafari, A. B. y Alabi, O.** (2008). *IN vitro* evaluation of six fungicides on radial mycelial growth and regrowth of *Fusarium pallidoroseum* isolated from castor (*Ricinus communis*) in Samaru, Nigeria. *African Journal of General Agriculture*, 4 (2): 65-71.

- Maracchi, G., Sirotenko, O. y Bindi, M.** (2005). Impacts of present and future climate variability on agriculture and forestry in the temperate regions: Europe. *Climatic Change*, 70: 117–135.
- Marasas, W. F., Thiel, P. G., Sydenham, E. W., Rabiem C. J., Lübben, A. y Nelson, P. E.** (1991). Toxicity and moniliformin production by four recently described species of *Fusarium* and two uncertain taxa. *Mycopathologia*, 113 (3): 191-197.
- Marasas, W. F. O., Riley, R. T., Hendricks, K. A., Stevens, V. L., Sadler, T. W., Gelineau-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 potencial risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *The Journal of Nutrition*, 134: 711-716.
- Margalef, D. R.** (1958). Information theory in Ecology. *General Systematics*, 3: 36-71.
- Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A. J., Vinais, 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., Magan, N., Ramos, A. J. y Sanchis, V.** (2004). Fumonisin-producing strains of *Fusarium*: a review of their ecophysiology. *Journal of Food Protection*, 67 (8): 1792-1805.
- Marín, P.** (2010). Análisis de factores ecofisiológicos que influyen en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de toxinas en especies de *Fusarium*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

- Marín, P., Jurado, M., Magan, N., Vázquez, C. y González-Jaén, M.T.** (2010a). Effect of solute stress and temperature on growth rate and *TRI5* gene expression using real time RT-PCR in *Fusarium graminearum* from Spanish wheat. *International Journal of Food Microbiology*, 140: 169–174.
- Marín, P., Magan, N., Vázquez, C. y González-Jaén, M. T.** (2010b). Differential effect of environmental conditions on the growth and regulation of the fumonisin biosynthetic gene *FUM1* in the maize pathogens and fumonisin producers *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*. *FEMS Microbiology Ecology*, 73: 303-311.
- Marin, P., Moretti, A., Ritienic, A., Jurado, M., Vázquez, C. y González-Jaén, M. T.** (2012). Phylogenetic analyses and toxigenic profiles of *Fusarium equiseti* and *Fusarium acuminatum* isolated from cereals from Southern Europe. *Food Microbiology*, 31 (2): 229-237.
- Marín, P., de Ory, A., Cruz, A., Magan, N y González-Jaén, M. T.** (2013). Potential effects of environmental conditions on the efficiency of the antifungal tebuconazole controlling *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* growth rate and fumonisin biosynthesis. *International Journal of Food Microbiology*, 165 (3): 251-258.
- Marín, P., Jurado, M. y González-Jaén, M. T.** (2015). Growth rate and *TRI5* gene expression profiles of *Fusarium equiseti* strains isolated from Spanish cereals cultivated on wheat and barley media at different environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 195: 40-47.
- Marroquín-Cardona, A. G., Johnson, N. M., Phillips, T. D. y Hayes, A. W.** (2014). Mycotoxins in a changing global environment – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 69: 220-230.
- Marshall, E.** (1982). Yellow rain: feeling in the gaps. *Science*, 2017: 31-38.
- Mateo, J. J., Mateo, R. y Jiménez, M.** (2001). Determination of fumonisins B1 and B2 produced by isolates of *Gibberella fujikuroi* complex in corn and rice. *Food Science and Technology International*: 7, 231–236.
- 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.). Págs. 219-235.

Mateo, E. M., Valle-Algarra, F. M., Mateo, R., Jiménez, M. y Magan, N. (2011). Effect of fenpropimorph, prochloraz and tebuconazole on growth and production of T-2 and HT-2 toxins by *Fusarium langsethiae* in oat-based medium. *International Journal of Food Microbiology*, 151: 289-298.

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.

McCormick, S. P., Stanley, A. M., Stover, N. A. y Alexander, N. J. (2011). Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. *Toxins*, 3 (7): 802-814.

McMahan, G., Yeh, W., Marshall, M.N., Olsen, M., Sananikone, S., Wu, J.Y., Block, D.E. y Van der Gheynst, J.S. (2001). Characterizing the production of a wild-type and benomyl-resistant *Fusarium lateritium* for biocontrol of *Eutypa lata* on grapevine. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26: 151–155.

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*, 108: 196-203.

Medina, A., Mateo, R., Valle-Algarra, F. M., Mateo, E. M. y Jiménez, M. (2007). Effect of carbendazim and physicochemical factors in the growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius* isolated from grapes. *Internal Journal of Food Microbiology*, 119: 230-235.

Medina, A., Mateo, E.M., Valle-Algarra, F.M., Mateo, F., Mateo, R., Jiménez, M. (2008). Influence of nitrogen and carbon sources on the production of ochratoxin A by ochratoxigenic strains of *Aspergillus* spp. isolated from grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 122: 93-99.

Medina, A., Schmidt-Heydt, M., Cárdenas-Chávez, D. L., Parra, R., Geisen, R. y Magan, N. (2013). Integrating toxin gene expression, growth and fumonisin B₁ and B₂

production by a strain of *Fusarium verticillioides* under different environmental factors. *Journal of the Royal Society Interface*, 10: 20130320.

Meek, I. B., Peplow, A. W., Ake, C., Phillips, T. D. y Beremand, M. N. (2003). *TriI* encodes the cytochrome P450 monooxygenase for c-8 hydroxylation during trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides* and resides upstream of another new *Tri* gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 1607–13.

Mehl, H. L. y Cotty, P. J. (2013). Nutrient environments influence competition among *Aspergillus flavus* genotypes. *Applied Environmental Microbiology*, 79 (5): 1473-1480.

Melbourne Code. (2012). International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants. *International Association for Plant Taxonomy*, Julio 2011.

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 fumonisinas. *Environmental Health Perspectives*, 109: 283-289.

Messerli, B., Grosjean, M., Hofer, T., Núñez, L. y Pfister, C. (2000). From nature-dominated to human-dominated environmental changes. *Quaternary Science Review*, 19 (1-5): 459–479.

Metzenberg, R. L. y Glass, N. L. (1990) Mating type and mating strategies in *Neurospora*. *BioEssays* 12: 53-59.

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 Verpermann, 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., Hinojo, 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.

- Mirete, S., Patiño, B., Jurado, M., Vázquez, C. y González-Jaén, M. T.** (2013). *Genome*, 56: 205-213.
- 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.
- Mitchell, D., Parra, R., Aldred, D. y Magan, N.** (2004). Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 439-445.
- Moss, M. O. y Thrane, U.** (2004). *Fusarium* taxonomy with relation to trichothecene formation. *Toxicology Letters*, 153: 23-28.
- Mousa, W. K. y Raizada, M. N.** (2015) Biodiversity of genes encoding antimicrobial traits within plant associated microbes. *Frontiers in Plant Science*, 6: 231.
- Mühlencoert, E., Mayer, I., Zapf, M. W., Vogel, R. F. y Niessen, L.** (2004). Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 651-659.
- Munkvold, G. P.** (2003). Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annual Reviews of Phytopathology*, 41: 99–116.
- Murphy, P.A., Hendrich, S., Landgren, C. y Bryant, C.M.** (2006). Food mycotoxins: an update. *Journal of Food Science*, 71: R51–R65.
- 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.
- Muthukumar, A y Venkatesh, A.** (2013). Exploitation of fungal and endophytic bacteria management of leaf blight of ribbon plant. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 4: 209.
- Naciones Unidas.** (1994). United Nations Framework Convention on Climate Change. *United Nations*, Nueva York. <http://www.unfccc.int/essential_background/convention/items/2627.php>.

- 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., 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.
- Ngũyen, A. N., Lee, A., Place, W. y Shiozaki, K.** (2000). Multistep phosphorelay proteins transmit oxidative stress signals to the fission yeast stress-activated protein kinase. *Molecular Biology of the Cell*, 11: 1169-1181.
- 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.
- Nirenberg, H. y O'Donnell, K.** (1998). New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90, 434–458.
- Norred, W. P.** (1993). Fumonisin-mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 38: 309–328.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E. y Nirenberg, H. I.** (1998). Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90 (3): 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 of the United States of America*, 97 (14): 7905-7910.
- 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 (7): 2235-2248.

O'Donnell, K., Sutton, D. A., Rinaldi, M. G., Gueidan, C., Crous, O. W. & Geiser, D. M. (2009). Novel multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium incarnatum-F. equiseti* and *F. chlamydosporum* species complexes within the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 47: 3851-3861.

O'Donnell, K., Sutton, D. A., Rinaldi, M. G., Sarver, B. A. J., Balajee, S. A., Schroers, H-J., Summerbell, R. C., Robert, V. A. R. G., Crous, P. W., Zhang, N., Aoki, T., Jung, K., Park, J., Lee, Y-H., Kang, S., Park, B. y Geiser, D. M. (2010). Internet-accessible DNA sequence database for identifying *Fusaria* from human and animal infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 48 (10): 3708-3718.

O'Donnell, K., Rooney, A. P., Proctor, R. H., Brown, D. W., McCormick, S. P., Ward, T. J., Frandsen, R. J. N., Lysøe, E., Rehner, S. A., Aoki, T., Robert, V. A. R. G., Crous, P. W., Groenewald, Z., Kang, S. y Geiser, D. M. (2013). Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal Genetics and Biology*, 52 : 20-31.

Olesen, J.E. y Bindi, M. (2002). Consequences of climate change for European agricultural productivity, land use and policy. *European Journal of Agronomy*, 16: 239–262.

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, Part A*, 25 (2): 209-218.

Palazón, I. y Palazón, C. F. (1996). Micosis de los productos cosechados. En: *Patología Vegetal*. Llácer, G., López, M. M., Trapero, A. y Bello, A. (Eds.). SEF. Madrid. Págs: 967-994.

Palmero, D., de Cara, M., Iglesias, C., Ruíz, G. y Tello, J. C. Effects of water potential on spore germination and viability of *Fusarium* species. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35 (11): 1411-1418.

- Paoletti, M., Rydholm, C., Schwier, E. U., Anderson, M. J., Szakacs, G., Lutzoni, F., Debeaupuis, J. P., Latgé, J. P., Denning, D. W. y Dyer PS.** (2005). Evidence for sexuality in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Current Biology*, 15: 1242-1248.
- Pardo, E., Ramos, A. J. , Sanchis, V. y Marín, S.** (2005). Modelling of effects of water activity and temperature on germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* on a green coffee-based medium. *International Journal of Food Microbiology*, 98: 1-9.
- Patiño, B., Mirete, S., Gonzalez-Jaén, M. T., Mulè, G., Rodríguez, M. T. y Vázquez, C.** (2004). PCR detection assay of fumonisin-producing *Fusarium verticillioides* strains. *Journal of Food Protection*, 67: 1278- 1283.
- Pereira G., Herrera, J., Machuca, S. y Sánchez, M.** (2007). Efecto del pH sobre el crecimiento *in vitro* de hongos ectomicorrícicos recolectados de plantaciones de *Pinus radiata*. *Bosque*, 28 (3): 215-219.
- Perrone, G., Mulè, G., Susca, A., Battilani, P., Pietri, A. Y Logrieco, A.** (2006). Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis os *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubigenensis*, and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (1): 680-685.
- 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 Mycology*, 59: 53–66.
- Petersen, L. M., Hoeck, C., Frisvad, J. C., Gottfredsen, C. H. y Larsen, T. O.** (2014). Dereplication guided discovery of secondary metabolites of mixed biosynthetic origin from *Aspergillus aculeatus*. *Molecules*, 19 (8): 10898-10921.
- 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.

- Plaza, P., Usall, J., Teixidó, N. y Viñas, I.** (2003). Effect of water activity and temperature on germination and growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum* and *Geotrichum candidum*. *Journal of Applied microbiology*, 94 (4): 549-554.
- Plumlee, K. H. y Galey, F. D.** (1994). Neurotoxic mycotoxins: A review of fungal toxins that cause neurological disease in large animals. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 8: 49–54.
- Prescott, J. M., Burnett, P. A., Saari, E. E., Ransom, J., Bowman, J., de Milliano, W., Singh, R. P. y Bekele, G.** (1986). Enfermedades y plagas del trigo: una guía para su identificación en el campo. *CIMMYT*. México, D.F., México.
- Proctor, R.H., Desjardins, A.E., Plattner, R.D. y Hohn, 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., Brown, D.W., Plattner, R.D. y 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., Plattner, R. D., Desjardins, A. E., Busman, M. y Butchko, R. A. E.** (2006). Fumonisin production in the maize pathogen *Fusarium verticillioides*: genetic basis of naturally occurring chemical variation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54: 2424–2430.
- 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*. Strange, R. N. y Gullino, M. L (Eds). Dordrecht: Springer. Págs. 97–111.
- Proctor, R. H., van Hove, F., Susca, A., Stea, G., Busman, M., van der Lee, T., Waalwijk, C., Moretti, A. y Ward, T. J.** (2013). Birth, death and horizontal transfer of

the fumonisin biosynthetic gene cluster during the evolutionary diversification of *Fusarium*, *Molecular Microbiology*, 90 (2): 290-306.

Ramírez, C. (1982). Manual and atlas of the *Penicillia*. *Elsevier Biomedical Press*, Amsterdam, Holanda.

Ramírez, M. L., Chulze, S. y Magan, N. (2004). Impact of environmental factors and fungicides on growth and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentinian wheat. *Crop Protection*, 23: 117-125.

Ramírez, L., Chulze, S. y Magan, N. (2006). Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain. *International Journal of Food Microbiology*, 106: 291–296.

RAP-AL, Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas de América Latina. (2008). Pesticides Action Network and Alternatives of Latin America [Página web] http://www.rap-al.org/articulos_files/Benomil_Enlace_81.pdf

Reddy, K. R. N., Salleh, B., Saad, B. Abbas, H. K., Abel, C. A. y Shier, W. T. (2010). An overview of micotoxin contamination in foods and its implications for human health. *Toxin Reviews*, 29 (1): 3-26.

Rheeder, J. P., Marasas, W. F. O. y Vismer, H. F. (2002). Production of fumonisin analogues 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.

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). Sphingolipids perturbation as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 109: 301-308.

Rodríguez-Carrasco, Y., Fattore, M., Albrizio, S., Berrada, H. Y Mañes, J. (2015). Occurrence of *Fusarium* mycotoxins and their dietary intake through beer consumption by the European population. *Food Chemistry*, 178: 149-155.

Rocha, O., Ansari, K. y Doohan, F. M. (2005). Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. *Food Additives & Contaminants*, 22 (4): 369-378.

Rousk, J., Brookes, P. C. y Bååth, E. (2009). Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (6): 1589-1596.

Roussos, S., Zaouia, N., Salih, G., Tantaoui-Elaraki, A., Lamrani, K., Cheheb, M., Hassouni, H., Verhé, F., Perraud-Gaime, I., Augur, C. e Ismaili-Alaoui, M. (2006). Characterization of filamentous fungi isolated from Moroccan olive and olive cake: toxinogenic potential of *Aspergillus* strains. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50: 500-506.

Samapundo, S., Devlieghere, F., De Meulenaer, B., Lamboni, Y., Osei-Nimoh, D. y Debevere, J. M. (2007a) 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.

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 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. (2007c). 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.

Sambrook, J. y Russell, D. W. (2006). The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.

Sanchís, 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.

Sanchís, V., Marín, S., Magan, N. y Ramos, J. (2006). Ecophysiology of fumonisin producers in *Fusarium* section *Liseola*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 571: 115-122.

Santos, C. C. M., Lopes, M. R. V. y Kosseki, S. Y. (2001). Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de São José de Rio Preto/SP. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 60 (2): 153–157.

Sardiñas, N., Vázquez, C. Gil-Serna, J., González-Jaén, M. T. y Patiño, B. Specific detection of *Aspergillus parasiticus* in wheat flour by a highly sensitive PCR assay. *Food Additives and Contaminants*, 27 (06): 853-858.

Scherm, B., Balmas, V., Spanu, F., Pani, G., Delogu, G., Pasquali, M. y Migheli, Q. (2013). *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Molecular Plant Pathology*, 14: 323-341.

Schmidt, H., Niessen, L. y Vogel, R. F. (2004). AFLP analysis of *Fusarium* species in the section *Sporotrichiella*— evidence for *Fusarium langsethiae* as a new species. *International Journal of Food Microbiology*, 95: 297–304.

Schmidt-Heydt, M., Baxter, E. S., Geisen, R. y Magan, N. (2007). Physiological relationship between food preservatives, environmental factors, ochratoxin and *otapksPv* gene expression by *Penicillium verrucosum*. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 277-283.

Schmidt-Heydt, M., Magan, N. y Geisen, R. (2008). Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors. *FEMS Microbiology Letters*, 284: 142–149.

Schmale, D. G. y Bergstrom, G. C. (2003). *Fusarium* Head Blight in wheat. *The Plant Health Instructor*.

- 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.
- Scott, P.** (1989). The natural occurrence of trichothecenes. En: *Trichothecene mycotoxicosis: pathophysiological effects*. Beasley, V. H. (Ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida. Págs. 1-26.
- Seifert, K. A. y Lévesque, C. A.** (2004). Phylogeny and molecular diagnosis of micotoxigenic 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., Sewram, V., Nieuwoudt, T. W., Marasas, W. F. O. y Ritieni, A.** (1999). Production of the mycotoxins fusaproliferin and beauvericin by South African isolates in the *Fusarium* section *Liseola*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47: 5111–5115.
- Short, D. P. G., O'Donnell, K., Zhang, N., Juba, J. H. y Geiser, D. M.** (2011). Widespread occurrence of diverse human pathogenic types of the fungus *Fusarium detedtec* in plumbing drains. *Journal of Clinical Microbiology*, 49 (12): 4264-4272.
- Siegel, M.R.** (1981). Sterol-inhibiting fungicides: effects on sterol biosynthesis and sites of action. *Plant Disease*, 65: 986–989.
- Simpson, E. H.** (1949). Measurement of Diversity. *Nature*, 163: 688.
- Sinha, R. N. y Wallace, H. A. H.** (1966). Ecology of insect-induced hot spots in stored grain in western Canada. *Researches on Population Ecology*, 3: 107–132.
- Skrinjar, M. y Dimic, G.** (1992) Ochratoxigenicity of *Aspergillus ochraceus* group and *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* strains on various media. *Acta Microbiologica Hungarica*, 39: 257–261.
- 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*. Pág. 671.

Snoeijers, S. S., Pérez-García, A., Joosten, M. H. y De Wit, P. J. (2000). The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 106: 493-506.

Snyder, W. C. y Hansen, H. N. (1940). The species concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany*, 27: 64-67.

Snyder, W. C. y Hansen, H. N. (1945). The species concept in *Fusarium* with reference to *Discolor* and other sections. *American Journal of Botany*, 32: 657–666.

Soldevilla, C., Vázquez, C., Patiño, B., Jurado, M. y González-Jaén, M. T. (2005) Hongos toxigénicos asociados a trigos y cebadas de Castilla y León. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 31: 519–529.

Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Alley, R.B., Berntsen, T., Bindoff, N.L., Chen, Z., Chidthaisong, A., Gregory, J.M., Hegerl, G.C., Heimann, M., Hewitson, B., Hoskins, B.J., Joos, F., Jouzel, J., Kattsov, V., Lohmann, U., Matsuno, T., Molina, M., Nicholls, N., Overpeck, J., Raga, G., Ramaswamy, V., Ren, J., Rusticucci, M., Somerville, R., Stocker, T.F., Whetton, P., Wood, R.A. y Wratt, D. (2007). Technical summary. In: Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K.B., Tignor, M., Miller, H.L. (Eds), *Climate Change 2007: The Physical Science Basis*. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge y Nueva York. <<http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar4/wg1/ar4-wg1-ts.pdf>>.

Spadoni,

Spolti, P., del Ponte, E. M., Dong, Y., Cummings, J. A. y Bergstrom, G. C. (2014). Triazole sensitivity in a contemporary population of *Fusarium graminearum* from New York wheat and competitiveness of a tebuconazole-resistant isolate. *Plant Disease*, 98: 607-613.

- 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.
- Stępień, L., Koczyk, G. y Waśkiewicz, A.** (2013). Diversity of *Fusarium* species and mycotoxins contaminating pineapple. *Journal of Applied Genetics*, 54: 367-380.
- Stępień, L., Waśkiewicz, A. y Wilman, K.** (2015). Host extract modulates metabolism and fumonisin biosynthesis by the plant-pathogenic fungus *Fusarium proliferatum*. *International Journal of Food Microbiology*, 193: 74-81.
- Subhani, M. N., Sahi, S. T., Hussain, S., Ali, A., Iqbal, J. y Hameed, K.** (2011). Evaluation of various fungicides for the control of gram wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *African Journal of Agricultural Research*, 6: 4555-4559.
- Sutton, D. A., Fothergill, A. W. y Rinaldi, M. G.** (1998). Guide to clinically significant fungi. Williams & Wilkins (Eds.). Pág. 471.
- Sutton, D. A. y Brandt, M. E.** (2011). *Fusarium* and other opportunistic hyaline fungi. En: *Manual of Clinical Microbiology, 10th edition*. Versalovic, J., Carroll, K., Funke, G., Jorgensen, J. H. y Landry M. L., editores. ASM Press, Washington, DC. Págs. 1853–1879.
- Swofford, D.** (2003). PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Talas, F. y McDonald, B. A.** (2014). Significant variation in sensitivity to a DMI fungicide in field populations of *Fusarium graminearum*. *Plant Pathology*, 64 (3): 664-670.
- Tančić, S., Stanković, S., Lević, J., Krnjaja, V. y Vukojević, J.** (2012). Diversity of the *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* isolates according to their fumonisin B1 production potential and origin. *Genetika* 44 (1): 163–176.
- 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.

- Tenreiro, S., Fernandes, A. R. y Sa-Correia, I.** (2001). Transcriptional activation of FLR1 gene during *Saccharomyces cerevisiae* adaptation to growth with benomyl: role of Yap1p and Pdr3p. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 280 (1): 216-222.
- Thiel, P. G., Marasas, W. F. O., Sydenham, E. W., Shephard, G. S. y Gelderblom, W. C. A.** (1992) The implications of naturally occurring levels of fumonisin in corn for human and animal health. *Mycopathology*, 117: 3-9.
- Thrane, U., Adler, A., Clasen, P. E., Galvano, F., Langseth, W., Lew, H., Logrieco, A., Nielsen, K. F. y Ritieni, A.** (2004). Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides*. *International Journal of Food Microbiology*, 95: 257–266.
- Torp, M. y Adler, A.** (2004). The European *Sporotrichiella* project: a polyphasic approach to the biology of new *Fusarium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 95: 257–266.
- Torp, M. y Nirenberg, H. I.** (2004). *Fusarium langsethiae* sp. nov. on cereals in Europe. *International Journal of Food Microbiology*, 95: 247–256.
- Tuset, J. J.** (1987). Podredumbre de los frutos cítricos. Generalitat Valenciana, España: Conselleria d'Agricultura i Pesca.
- Ueno, Y.** (1987). Trichothecenes in food. En: *Mycotoxins in Food*. Krogh, P. (Ed.). Academic Press, Londres.
- Urry, W. H., Wehrmeister, H. L., Hodge, E. B. y Hidy, P. H.** (1966). The structure of zearalenone. *Tetrahedron Letters*, 27: 3109–3114.
- Valero, A., Farré, J. R., Sanchis, V., Ramos, A. J. y Marín, S.** (2006). Effects of fungal interaction on ochratoxin A production by *A. carbonarius* at different temperatures and aw. *International Journal of Food Microbiology*, 110: 160–164.
- Van der Does, H. C. y Rep, M.** (2007). Virulence genes and evolution of host specificity in plant-pathogenic fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20 (10): 1175-1182.

- Van Egmond, H. P., Schothorst, R. C. y Jonker, M. A.** (2007). Regulations relating to mycotoxins in food perspectives in a global and European context. *Annals of Bioanalytical Chemistry*, 389: 147–157.
- Varga, J., Kevei, E., Rinyu, E., Téren, J. y Kozakiewicz, Z.** (1996). Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 4461-4464.
- Vegi, A., Schwarz, P. y Wolf-Hall, C.E.** (2011). Quantification of *TRI5* gene, expression and deoxynivalenol production during the malting of barley. *International Journal of Food Microbiology*, 150(2-3): 150-156.
- Velluti, A., Marín, S., Bettucci, L., Ramos, A. J. y Sanchís, V.** (2000). The effect of fungal competition on colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* and on fumonisin B₁ and zearalenone formation. *International Journal of Food Microbiology*, 59: 59-66.
- 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 (2-3): 145-154.
- Visconti, A., Minervi, 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*. Pág. 424.
- 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., Keszthelyi, A., van der Lee, T., Jeney, A., de Vries, I., Kerényi, Z., Mendes, O. y Hornok, L.** (2006). Mating type loci in *Fusarium*: structure and function. *Mycotoxin Research*, 22 (1): 54-60.

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.

Wagacha, J. M., Oerke, E. C., Dehne, H. W. y Steiner, U. (2012). Interactions of *Fusarium* species during prepenetration development. *Fungal Biology*, 116 (7): 836-847.

Walkowiak, S. y Subramaniam, R. (2014). A nitrogen-responsive gene affects virulence in *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 36(2): 224-234.

Waalwijk, C., Mendes, O., Verstappen, E., de Waard, M. y Kema, G. H. J. (2002). Isolation and characterization of the mating-type idiomorphs from the wheat septoria leaf blotch fungus *Mycosphaerella gaminicola*. *Fungal Genetics and Biology*, 35: 277-286.

Waalwijk, C., Keszthelyi, A., van der Lee, T., Jeney, A., de Vries, I., Kerényi, Z., Mendes, O. y Hornok, L. (2006). Mating type loci in *Fusarium*: structure and function. *Mycotoxin Research*, 22 (1): 54-60.

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*. *The Journal of Biological Chemistry*, 266 (22): 14486-14490.

Watanabe, T. (1994). Pictorial atlas of soil and seed fungi. *Lewis Publishers*, EEUU. Pág. 411.

Whitehead, R. (1996). The UK Pesticide Guide. *British Crop Protection Council/CAB International*.

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, Ginebra.

- WHO** (2007). Environment and health risks from climate change and variability in Italy. WHO Regional Office for Europe. Roma.
- Wicklow, D. T., Hesseltine, C. W., Shotwell, O. L. y Adams, G. L.** (1980). Interference competition and aflatoxin levels in corn. *Phytopathology*, 70: 761-764.
- Wiemann, P., Sieber, C. M. K., von Bargaen, K. W., Studt, L., Niehaus, E. M., Espino, J. J., Huß, K., Michielse, C. B., Albermann, S., Wagner, D., Bergner, S. V., Connolly, L. R., Fischer, A., Reuter, G., Kleigrewe, K., Bald, T., Wingfield, B. D., Ophir, R., Freeman, S., Hippler, M., Smith, K. M., Brown, D. W., Proctor, R. H., Münsterkötter, M., Freitag, M., Humpf, H. U., Guldener, U. y Tudzynski, B.** (2013). Deciphering the cryptic genome: genome-wide analysis of the rice pathogen *Fusarium fujikuroi* reveal complex regulation of secondary metabolism and novel metabolites. *PLoS Pathogens*, 9 (6).
- Wilson, A., Simpson, D., Chandler, E., Jennings, P., Nicholson, P.** (2004). Development of PCR assays for the detection and differentiation of *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 233: 69–76.
- 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, Berlín, Alemania.
- Wu, F.** (2007). Measuring the economic impacts of *Fusarium* toxins in animal feeds. *Animal and Feed Science Technology*, 137: 363–374.
- Wu, F.** (2014). Perspective: time to face the fungal threat. *Nature*, 516 (7529): S7.
- Wulff, E. G., Sørensen, J. L., Lübeck, M., Nielsen, K. F., Thrane, U. y Torp, J.** (2010). *Fusarium spp.* Associated with rice Bakanae: ecology, genetic diversity, pathogenicity and toxigenicity. *Environmental Microbiology*, 12 (3): 649-657.
- Yassin, M. A., El-Samawaty, A.M.A., Moslem, M., Bahkali, A. y Abd-Elsalam, K.A.** (2011). Fungal biota and occurrence of aflatoxigenic *Aspergillus* in postharvest corn grains. *Fresenius Environmental Bulletin*, 20: 903-909.

Yassin, M. A., Moslem, M. A. y El-Samawaty, A.M.A. (2012) Mycotoxins and Non-fungicidal Control of Corn Grain Rotting Fungi. *Journal of Plant Sciences*, 7: 96-104.

Yekkour, A., Toumatia, O., Meklat, A., Verheecke, C., Sabaou, N., Zitouni, A. y Mathieu, F. (2015). Deoxynivalenol-producing ability of *Fusarium culmorum* strains and their impact on infecting barley in Algeria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31 (6): 875-881.

Yli-Mattila, T., Mach, R. L., Alekhina, I. A., Bulat, S. A., Koskinen, S., Kullnig-Gradinger, C. M., Kubicek, C. P. y Klemsdal, S. S. (2004). Phylogenetic relationship of *Fusarium langsethiae* to *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* as inferred by IGS, ITS, beta-tubulin sequences and UP-PCR hybridization analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 95: 267–285.

Yli-Mattila, T., Paavanen-Huhtala, S., Parikka, P., Hietaniemi, V., Jestoi, M., Gagkaeva, T., Sarlin, T., Haikara, A., Laaksonen, S. y Rizzo, A. (2008). Real time PCR detection and quantification of *Fusarium poae*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae* as compared to mycotoxin production in grains in Finland and Russia. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 41: 243–260.

Zur, G., Shimoni, E., Hallerman, E. y Kashi, Y. (2002). Detection of *Alternaria* fungal contamination in cereal grains by a polymerase chain reaction-based assay. *Journal of Food Protection*, 65 (9): 1433-1440.

