

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente a mi tutora Silvana Vero por su apoyo constante durante toda la realización de la tesis, por su apoyo académico y calidez humana. A mi cotutora Alejandra Rodríguez por su ayuda y apoyo.

A los miembros del tribunal por haber accedido a ser parte del mismo y realizar sus aportes a esta tesis. A la Dra. Silvia Pereyra por el aporte de muestras de trigo y la realización de los ensayos de agresividad. A la Cooperativa COPAGRAN por el aporte de muestras. A CSIC (Uruguay) por su apoyo financiero. A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por la financiación de mi beca de maestría y de una beca de movilidad. Al United States Department of Agriculture (USDA)-Agricultural Research Service's (ARS) en especial al Dr. Todd Ward y el Dr. Kerry O'Donnell por apoyo y posibilidad de realizar una pasantía. Thomas Usgaard, Nathane Orwig y Stacy Sink por asistencia técnica. Sr. James Swezey por preparar y enviar las cepas. A La Dra. Susan McCormik por el análisis de muestras.

A todos mis compañeros de la Cátedra de Microbiología en especial a todo los que pasaron por el 14 en este tiempo y contribuyeron de alguna forma a que la realización de esta tesis y al buen ambiente de trabajo. A mis compañeros de la ORT por ayudarme a terminar y realizar a portes a la presentación de este trabajo.

A mi familia, a mis padres por apoyarme siempre. A mi esposo Nano por apoyar mi trabajo fuera de horas y fines de semana, aguantar mi humor y cansancio y por ayudarme con la corrección de la tesis.

A mi hijo Juan Martín por ser la alegría de mi vida.

RESUMEN

La fusariosis en la espiga es una de las enfermedades más destructivas en granos de trigo y cebada, causante de grandes pérdidas económicas e inconvenientes en términos de seguridad alimentaria, debido a la presencia de micotoxinas que afectan tanto animales como humanos. Varias especies del género *Fusarium* han sido reconocidos como agentes causales de esta enfermedad, siendo las especies del Complejo *Fusarium graminearum* (FGSC) las que aparecen con mayor frecuencia. El FGSC está compuesto por más de 16 especies filogenéticamente diferentes, que producen tricotecenos del tipo B (nivalenol, deoxinivalenol y derivados acetilados) y que se pueden agrupar en tres quimiotipos diferentes, dependiendo de su potencial para producir micotoxinas. En nuestro país se monitorea de forma rutinaria una sola de dichas micotoxinas: el deoxinivalenol, a pesar de que las restantes posibles toxinas tienen toxicidad similar. El presente trabajo de tesis estudia la diversidad, potencial micotoxigénico y sensibilidad a fungicidas de hongos causantes de fusariosis de la espiga de trigo en las diferentes zonas de producción de Uruguay. En primer lugar, se determinaron de forma simultánea las especies y los quimiotipos de los distintos aislamientos mediante un ensayo denominado “multilocus genotyping” (MLGT), encontrándose predominancia de la especie *F. graminearum* y del quimiotipo 15ADON. Además se encontraron aislamientos de las especies *F. cortaderiae*, *F. asiaticum* y *F. brasilicum*, del quimiotipo NIV, no reportados hasta el momento en Uruguay. Para poder diferenciar de forma rápida y sencilla, las especies del FGSC predominantes en el país, se desarrolló un método de PCR-RFLP, utilizando primers específicos para el gen del factor de elongación de la transcripción 1 alfa (TEF-1 α). Los aislamientos encontrados fueron caracterizados de acuerdo a su sensibilidad al fungicida tebuconazol, determinándose una sensibilidad significativamente menor en los aislamientos de quimiotipo NIV frente al quimiotipo 15ADON. Paralelamente se desarrolló un método de PCR en tiempo real, para la cuantificación de hongos productores de tricotecenos y en particular hongos productores de nivalenol y zearalenona. Asimismo se puso a punto un método para la determinación de micotoxinas (deoxinivalenol, nivalenol, 15acetildeoxynivalenol, 3acetildeoxynivalenol) en granos contaminados, por cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masa como detector.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	i
INDICE GENERAL.....	iii
INDICE DE TABLAS.....	vii
INDICE DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Fusariosis de la espiga del trigo: situación en Uruguay y en el mundo	1
1.1.2 Principal agente etiológico de FHB: <i>Fusarium graminearum</i>	1
1.1.3 Ciclo de vida de <i>Fusarium graminearum</i> en trigo.....	3
1.2 Micotoxinas asociadas a la fusariosis de espiga: producción, monitoreo, toxicidad y riesgos	5
1.3 Taxonomía del género <i>Fusarium</i>	9
1.3.1 Identificación molecular de hongos del género <i>Fusarium</i>	10
1.3.1.1 Identificación por análisis y comparación de secuencias de un gen o una región genómica	10
1.3.1.2 Identificación por análisis de Multilocus	13
1.3.1.3 Identificación por PCR-RFLP de un gen o región genómica.....	15
1.4 Producción de micotoxinas por hongos del FGSC y clasificación según quimiotipo	16
1.5 Cuantificación de contaminación fúngica en granos.....	19
1.5.1 Métodos de cuantificación	19
1.5.2 PCR en tiempo real: características generales.....	19
1.5.2.1 Estrategias de detección del producto amplificado	20
1.5.2.2 Análisis de desnaturalización o curvas de melting	20
1.5.2.3 Parámetros a determinar en PCR en tiempo real.....	21
1.5.3.4 Cuantificación de hongos productores de micotoxinas por PCR en tiempo real	22
1.6 Análisis y cuantificación de micotoxinas en granos de trigo	23
1.7 Control de la enfermedad: uso de fungicidas y generación de resistencia a los mismos.....	26
1.8 Situación actual y monitoreo de especies causantes de FHB en trigo en Uruguay.....	28

2. OBJETIVOS	29
Objetivo general	29
Objetivos específicos	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1 Aislamiento, identificación y caracterización de hongos pertenecientes al complejo de especies <i>Fusarium graminearum</i>	30
3.1.1 Muestras de trigo	30
3.1.2 Aislamiento de cepas de <i>Fusarium</i> a partir de muestras de granos contaminados	30
3.1.3 Extracción de ADN	32
3.1.4 Caracterización molecular de aislamientos nativos de <i>Fusarium</i> por MLGT.....	32
3.1.5 Secuenciación	34
3.1.6 Ensayo de sensibilidad al fungicida tebuconazol.....	34
3.1.7 Análisis de estructura poblacional por número variable de repetidos en tándem (VNTR)	35
3.2 Desarrollo de técnicas moleculares sencillas para identificación y tipificación	36
3.2.1. Identificación	36
3.2.1.1 Determinación de la identidad de los aislamientos como pertenecientes al FGSC, mediante PCR con primers específicos para <i>F. graminearum</i>	36
3.2.1.2 Diseño <i>in silico</i> de un método de PCR-RFLP para la diferenciación de las especies del FGSC más comúnmente encontradas en Uruguay	37
3.2.2 Ensayos de validación del método de RFLP	37
3.2.2.1 Amplificación por PCR del gen del factor de elongación de la transcripción (TEF-1 α)	37
3.2.2.2 Corte con enzimas de restricción	38
3.2.3 Tipificación.....	39
3.3 Análisis de Micotoxinas presentes en muestras de trigo	40
3.3.1 Análisis de Micotoxinas por cromatografía líquida de alta resolución y detección por espectrometría de masa tandem (HPLC-MS/MS).....	40
3.3.1.1 Estándares y solventes.....	40
3.3.1.2 Estudio de los patrones de fragmentación de los iones.....	40
3.3.1.3 Separación de toxinas por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ...	40
3.3.1.3 Extracción de micotoxinas de la matriz trigo.....	41
3.3.2 Extracción de micotoxinas a partir de muestras de granos de trigo contaminados	41
3.4 PCR en tiempo real para la cuantificación de hongos productores de micotoxinas en muestras de trigo	42

Estrategias para la identificación y caracterización de patógenos causantes de fusariosis en trigo	
3.4.1 Condiciones de amplificación por PCR en tiempo real para la cuantificación de la carga de <i>Fusarium</i> productores de tricotecenos	42
3.4.2 Condiciones de amplificación por PCR en tiempo real para la cuantificación de la carga de <i>Fusarium</i> productores de nivalenol.....	43
3.4.3 Condiciones de amplificación por PCR en tiempo real para la cuantificación de la carga de <i>Fusarium</i> productores de zearalenona.....	44
3.4.3.1 Selección de cepas productoras de zearalenona.....	45
3.4.4 Curvas estándar	45
3.4.5 Análisis del efecto matriz.....	46
3.4.5.1 Extracción de ADN a partir de granos de trigo	46
3.4.5.2 Ensayo de efecto matriz	47
3.4.6 Análisis de muestras de trigo nacional	47
3.4.6.1 Determinación del porcentaje de infección	47
3.4.6.2 Cuantificación de la contaminación por PCR en tiempo real	48
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
4.1 Aislamiento, identificación y caracterización de hongos pertenecientes al complejo de especies <i>Fusarium graminearum</i> (FGSC)	49
4.1.1 Aislamiento de hongos pertenecientes al complejo FGSC	49
4.1.2. Caracterización de aislamientos por MLGT.....	50
4.1.3 Ensayo de sensibilidad al fungicida tebuconazol	56
4.1.4 Análisis de estructura poblacional por número variable de repetidos en tándem (VNTR)	59
4.2 Desarrollo de técnicas moleculares sencillas para identificación: RFLP	59
4.3 Análisis de micotoxinas presentes en muestras de trigo	64
4.3.1 Desarrollo del método analítico MS/MS	64
4.3.1.1 Detección por espectrometría de masa tándem.....	64
4.3.1.2 Estudio de los patrones de fragmentación de los iones de micotoxinas	65
4.3.1.3 Separación cromatográfica de micotoxinas por HPLC.....	67
4.3.1.4 Extracción de micotoxinas de la matriz trigo.....	68
4.3.2 Desarrollo del método analítico con detección MS de alta resolución.....	69
4.3.3. Determinación de la presencia de micotoxinas en muestras de trigo contaminadas	70
4.4 Puesta a punto de métodos de PCR en tiempo real para la cuantificación de hongos productores de micotoxinas en muestras de trigo	74

4.4.1	Puesta a punto de un método de PCR en tiempo real para de determinación de hongos productores de tricotecenos totales en muestra de trigo	74
4.4.2	Puesta a punto de un método de PCR en tiempo real para de determinación de hongos productores de nivalenol.....	76
4.4.3	Puesta a punto de un método de PCR en tiempo real para la determinación de hongos productores de zearalenona	80
4.4.4	Análisis de muestras de trigo por PCR en tiempo real	83
5.	CONCLUSIONES	87
	REFERENCIAS	88
	ANEXOS	103
	<i>Anexo 1: Soluciones, buffers y medios de cultivo</i>	<i>103</i>
	Soluciones y Buffers.....	103
	Buffer CTAB.....	103
	Solución de precipitación con CTAB	103
	Solución NaCl 1.2M.....	103
	Solución de ARNasa	103
	Buffer TBE 5x.....	103
	Medios de cultivo	104
	Agar Papa Dextrosa (PDA)	104
	Medio líquido extracto de levadura-sacarosa (YES)	104
	Solución de pentacloronitrobenzeno (PCNB) 100x	104
	Solución de Cloranfenicol 1000x	104
	<i>Anexo 2: Oligonucleótidos</i>	<i>105</i>
	Identificación de FGSC.....	105
	Pimers Fg11F/Fg11R (Nicholson et al, 1998).....	105
	PCR Multiplex para quimiotipos (Starkey et al, 2007).....	105
	TRI3 multiplex.....	105
	TRI12 multiplex.....	105
	Primers para PCR en tiempo real.....	105
	<i>Anexo 3: Marcadores de peso molecular</i>	<i>106</i>
	<i>Anexo 4: Aislamientos de Fusarium en muestras de trigo</i>	<i>107</i>
	<i>Anexo 5: Publicaciones</i>	<i>111</i>

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies del complejo FGSC, quimiotipos asociados y origen geográfico putativo. 3	
Tabla 2. Principales iones formados durante la ionización para las micotoxinas importantes en muestras de trigo 65	
Tabla 3. Muestras de trigo nacional analizadas por la presencia de micotoxinas 71	
Tabla 4. Resultados del ensayo de efecto matriz para la amplificación del gen TRI5, para dos matrices de trigo..... 76	
Tabla 5. Resultados del ensayo de efecto matriz para la amplificación del gen TRI12, para dos matrices de trigo..... 79	
Tabla 6. Resultados del ensayo de efecto matriz para la amplificación del gen PKS4, para dos matrices de trigo..... 83	
Tabla 7. Análisis de muestras de trigo por PCR en tiempo real con primers específicos para productores de tricotecenos..... 84	
Tabla 8. Análisis de muestras de trigo por PCR en tiempo real con primers específicos para productores de nivalenol. 84	
Tabla 9. Análisis de muestras de trigo por PCR en tiempo real con primers específicos para productores de zearalenona 85	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Espigas infectadas con hongos pertenecientes al FGSC, tomadas de campos de productores del departamento de Cerro Largo 4	
Figura 2. Ciclo de infección de plantas de trigo por <i>Fusarium graminearum</i> 5	
Figura 3. Estructura química de las micotoxinas más importantes producidas por hongos del género de <i>Fusarium</i> : Tricotecenos B y zearalenona. 7	
Figura 4. Cluster de genes involucrados en la biosíntesis de zearalenona. 9	
Figura 5. Mapa de región del gen TEF-1 α de <i>Fusarium</i> usada para identificación de especies..... 12	
Figura 6. Vía de síntesis de tricotecenos mostrando algunas de las enzimas más importantes y segmento del cluster TRI. 17	
Figura 7. Curvas de amplificación de ADN (Intensidad de Fluorescencia vs. ciclo) durante la reacción de PCR, escala lineal. 22	

Figura 8. Esquema del proceso de aislamiento de <i>Fusarium graminearum</i> a partir de muestras de trigo.	31
Figura 9. Esquema de los pasos necesarios para la realización del ensayo de MLGT.....	33
Figura 10. Esquema de la partícula fluorescente xMAP con sonda de hibridación y amplicón biotinilado.	33
Figura 11. Caracterización macro y microscópica de <i>Fusarium graminearum</i>	50
Figura 12. Imagen de una placa de PDA con fungicida PCNB, donde se sembraron granos de trigo contaminados, previa desinfección superficial.	50
Figura 13. Distribución geográfica de las especies y quimiotipos de FGSC aislados de trigo en Uruguay en las zafas estudiadas (2002, 2009, 2011 y 2012).	51
Figura 14. Comparación de composición de especies y quimiotipos entre los aislamientos de los departamentos del oeste del país en los años 2002 y 2009.....	52
Figura 15. Composición de especies y quimiotipos del total de aislamientos obtenidos en las zafas analizadas.	53
Figura 16. Frecuencia (en porcentaje) para distintos rangos de valores de CE50 promedio para diferentes aislamientos.....	57
Figura 17. Amplificación específica para especies de FGSC utilizando primers Fg11.	60
Figura 18. Patrones de bandas obtenidos en un gel de agarosa 1,5 %, luego de la digestión con las enzimas BsaHI (superior, identificación de <i>F. graminearum</i>) y Tru1I (inferior, identificación de <i>F. cortaderiae</i>) para especies de colección pertenecientes a FGSC.	62
Figura 19. Patrones de bandas obtenidos en un gel de agarosa 1,5 %, luego de la digestión con las enzimas Tru1I (panel izquierdo, identificación de <i>F. cortaderiae</i>) y BsaHI (derecho, identificación de <i>F. graminearum</i>) para aislamientos de especies pertenecientes a FGSC aisladas de trigo en Uruguay.....	62
Figura 20. Patrón obtenido con cepas de referencia en el ensayo de PCR multiplex del gen TRI3 para la determinación de quimiotipos de tricotecenos.....	63
Figura 21. Intensidades relativas (I%) en función de la energía para los distintos iones estudiados (NIV, DON, 15ADON, 3ADON y ZON).....	66
Figura 22. Separación por HPLC y análisis por MS/MS de las distintas especies en una mezcla de estándares de micotoxinas a una concentración de 1ppm.	67
Figura 23. Separación por HPLC y análisis por MS/MS de extractos de trigo contaminado y trigo sin contaminación por <i>Fusarium</i> (blanco).	68
Figura 24. Separación por HPLC y análisis por MS de un mix de triotecenos de concentración 10ppm.	70
Figura 25. Separación por HPLC y análisis por MS de extractos de trigo contaminado muestra CL1.....	71

Estrategias para la identificación y caracterización de patógenos causantes de fusariosis en trigo

Figura 26. Separación por HPLC y análisis por MS de extractos de trigo contaminado muestra CL2.....	72
Figura 27. Separación por HPLC y análisis por MS de extractos de trigo contaminado muestra Young1.	72
Figura 28. Curvas de desnaturalización o melting (dF/dT vs. Temperatura (°C)) para distintas diluciones de ADN de <i>F. graminearum</i> en el ensayo de real time PCR del gen TRI5. ..	74
Figura 29. Curva de calibración (Ct vs. log [ADN]) para un estándar de ADN de <i>Fusarium</i> portador del gen TRI5.	75
Figura 30. Ensayo preliminar donde se muestra la amplificación diferencial del ADN de micelio del quimiotipo NIV respecto a otros quimiotipos.	77
Figura 31. Curvas de desnaturalización o melting (dF/dT vs. Temperatura °C) para distintas diluciones de ADN de <i>F. graminearum</i> de la cepa F-117 en el ensayo de real time PCR del gen TRI12.....	78
Figura 32. Curva de calibración para un estándar de ADN (Ct vs. Log [ADN]) de <i>Fusarium</i> del quimiotipo NIV..	78
Figura 33. Curvas de desnaturalización (dF/dT vs. Temperatura (°C)) para distintas diluciones de ADN de <i>F. graminearum</i> en el ensayo de real time PCR del gen <i>PKS4</i>	81
Figura 34. Curva de calibración para un estándar (Ct vs. Log [ADN]) de ADN de <i>Fusarium</i> productor de zearalenona.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS

15ADON	15-acetil deoxinivelenol
3ADON	3-acetil deoxinivalenol
ACN	Acetonitrilo
ADN	Acido desoxiribonucleico
AN	Ácido Nucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARS	Agriculture Research Service
ASPE	Allele-specific Primer Extension
AUDPC	Área bajo la curva del progreso de la enfermedad
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CE ₅₀	Concentración Efectiva 50
COPAGRAN	Cooperativa Agraria Nacional
Ct	Ciclo Umbral
CTAB	bromuro de cetiltrimetilamonio
DMSO	dimetilsulfóxido
DON	deoxinivalenol
dpi	días post inoculación
EtOH	Etanol
Fg	<i>Fusarium graminearum</i>
FGSC	Complejo de especies <i>Fusarium graminearum</i>
FHB	Fusariosis o Golpe Blanco de la espiga del trigo
F _{ST}	Índice o coeficiente de fijación
GCPSR	Concordancia de Genealogías de Secuencias de ADN de múltiples genes
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
INIA	Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
ITS	Espaciador Transcrito Interno (Internal Transcribe Spacer)
MGAP	Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca
MeOH	Metanol
MLGT	Multilocusgenotyping

Estrategias para la identificación y caracterización de patógenos causantes de fusariosis en trigo

MLST	Multilocus sequencing typing
MS	Espectrometría de Masas
NIV	nivalenol
NRRL	Northern Regional Research Laboratory (hoy National Center for Agricultural Utilization Research)
PCNB	Pentacloronitrobenceno
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Agar Papa Dextrosa
PKS4	Poliquetidosintaza-4
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
SRM	Selected Reaction Monitoring
ST	Clasificación de Secuencia (Sequence Type)
TEF-1 α	Factor de elongación de la transcripción 1 alfa
TLC	Cromatografía en capa fina
T _m	Temperatura de desnaturalización o melting
TRI	Cluster de genes de la vía de síntesis de tricotecenos
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
VNTR	Número variable de repetidos en tandem
YES	Medio líquido Sacarosa- Extracto de levadura
ZON	zearalenona

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Fusariosis de la espiga del trigo: situación en Uruguay y en el mundo

La fusariosis de la espiga (FHB) es una de las enfermedades más devastadoras y la que causa, a nivel mundial, mayores pérdidas económicas en trigo (*Triticum aestivum*), cebada (*Hordeum vulgare*), y otros granos (Ward et al., 2008). En los últimos años se han constatado brotes de esta enfermedad en América del Norte, Asia, Europa y América del Sur, por lo cual se la ha considerado una amenaza al suministro mundial de alimentos (Goswani and Kistler, 2004). Nuestro país no ha sido la excepción a este problema. En realidad, en la década pasada, un año de cada dos, en promedio, se han registrado epidemias moderadas o severas de la misma (Díaz de Ackermann and Kohli, 1997b; Perea and Díaz, 1980; Pereyra, 2003b). Es así que en la zafra 2002, esta enfermedad tuvo una muy alta incidencia en nuestro país, comprometiendo los rendimientos de grano y la comercialización (Pereyra, 2003a; Pereyra, 2006). En años posteriores, en particular en las zafras 2009 y 2012, se registró la mayor incidencia de fusariosis de la última década (Plan Nacional de Silos y Dirección General de Servicios Agrícolas, 2010; web Grupo Trigo <http://www.grupotrigo.com.uy/1608/datos-zafra-2011-12-mesa-de-trigo>, 2013).

Dada la creciente incidencia de FHB en la región en la última década, la gran importancia que han cobrado de los cultivos de trigo y cebada para el país y la apuesta a productos de calidad libres de toxinas, el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) considera la investigación en esta enfermedad como una prioridad desde hace algunos años (Díaz de Ackermann et al., 2002).

1.1.2 Principal agente etiológico de FHB: *Fusarium graminearum*

Se han descrito varias especies de hongos pertenecientes al género *Fusarium* como posibles agentes etiológicos de FHB, entre las que se encuentran el *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. pseudograminearum*, *F. crookwellense*,

F. poae, *F. acuminatum* y *F. sporotrichioides* (Demeke et al., 2005). Sin embargo, el principal agente etiológico de esta enfermedad en Uruguay y a nivel mundial, lo constituyen los hongos pertenecientes al complejo de especies *Fusarium graminearum* (FGSC) (Pereyra, 2006). Dentro de éste, se han reconocido 16 especies filogenéticamente diferentes (O'Donnell et al., 2008; O'Donnell, Ward, et al., 2004; Sarver et al., 2011b; Starkey et al., 2007; Yli-Mattila et al., 2009) capaces de producir micotoxinas, en particular tricotecenos del tipo B y zearalenona (Jansen et al., 2005; Proctor et al., 1995), lo cual los vuelve una amenaza para la salud humana y animal (Schlatter, 2004). Es por ello que la importancia de la fusariosis de la espiga no sólo radica en la reducción en el rendimiento y la calidad de los granos, sino además en el riesgo de contaminación de los mismos con micotoxinas. Se ha demostrado además, que los tricotecenos se mantienen estables en productos derivados tales como la malta de la cebada y la harina de trigo e incluso en productos terminados sometidos a tratamientos térmicos, razón por la cual los niveles de estas toxinas en los granos utilizados como materia prima deben controlarse, evitando así riesgos para la salud de los consumidores (Champeil et al., 2004).

Las diferentes especies que forman el FGSC han mostrado diferencias en cuanto a la preferencia de huésped (Boutigny et al., 2011; Lee et al., 2009; Nielsen et al., 2011; Nielsen et al., 2012; Sampietro et al., 2011), además de una importante variación en la distribución geográfica y en el quimiotipo asociado, el cual involucra el potencial de producción de diferentes tricotecenos (ver más adelante) (Miller, 2002; Monds et al., 2005; Nielsen et al., 2012; O'Donnell et al., 2000; Suga et al., 2008; Ward et al., 2008; Yli-Mattila et al., 2009) (**Tabla 1**).

Estrategias para la identificación y caracterización de patógenos causantes de fusariosis en trigo

Tabla 1. Especies del complejo FGSC, quimiotipos asociados y origen geográfico putativo. Modificado de Aoki et al. (2012).

Especie FGSC	Quimiotipo asociado			Origen geográfico
	NIV	3ADON	15ADON	
<i>F. graminearum</i>	+	+	+	América del Norte
<i>F. gerlachii</i>	+	-	-	
<i>F. louisianense</i>	+	-	-	
<i>F. asiaticum</i>	+	+	+	Asia
<i>F. ussurianum</i>	-	+	-	
<i>F. nepalense</i>	-	-	+	
<i>F. verosii</i>	-	-	+	
<i>F. acaciae-maensii</i>	+	+	-	Hemisferio Sur (África y Oceanía)
<i>Fusarium sp. (nueva especie filogenética del FGSC aún no nombrada)</i>	-	+	-	
<i>F. aethiopicum</i>	-	-	+	
<i>F. boothii</i>	-	-	+	América Central
<i>F. mesoamericanum</i>	+	+	-	
<i>F. austroamericanum</i>	+	+	-	América del Sur
<i>F. cortaderiae</i>	+	+	-	
<i>F. brasilicum</i>	+	+	-	
<i>F. meridionale</i>	+	-	-	

1.1.3 Ciclo de vida de *Fusarium graminearum* en trigo

Giberella zeae (anamorfo *F. graminearum*) se reproduce asexualmente vía macroconidias y sexualmente vía ascosporas (Sutton, 1982). Su ciclo de vida comprende una fase saprofítica y una patogénica (Parry et al., 1995).

El primer síntoma observable de FHB es la decoloración de una o más espiguillas por espiga, la cual puede avanzar hasta que la espiga se decolora completamente. Esto constituye una característica típica de FHB. En la **Figura 1** se observan espigas infectadas con hongos pertenecientes al FGSC.



Figura 1. Espigas infectadas con hongos pertenecientes al FGSC, tomadas de campos de productores del departamento de Cerro Largo.

Con flechas negras se señalan algunas espiguillas infectadas que presentan coloración rosada típica.

El ciclo de vida de este patógeno se ilustra en la **Figura 2**. El hongo puede sobrevivir durante el invierno en el suelo o en residuos de cultivos anteriores (rastrojo) en forma de clamidosporas o de micelio (Dill-Macky, 2010). El inóculo primario de FHB consiste principalmente en ascosporas producidas en peritecios, los que se forman sobre los rastros en la primavera, cuando el clima es más cálido (en el hemisferio norte) (Dill-Macky and Jones, 2000; Wegulo et al., 2013) o luego de la cosecha (diciembre) o incluso inmediatamente antes de la cosecha (en años epidémicos), para el caso del Hemisferio Sur (Pereyra & Dill-Macky, 2008). Si bien las espigas de trigo son susceptibles a la infección desde su emergencia hasta la cosecha, la infección ocurre generalmente durante la antesis, siendo esta última la más dañina (Dill-Macky, 2010). Los síntomas se manifiestan de forma repentina, entre 2 a 4 días post infección. Lluvias abundantes, entre una a tres semanas pre antesis, pueden conducir a brotes severos de la enfermedad (Wegulo et al., 2013). Las ascosporas y/o conidias son livianas y se dispersan ayudadas por el viento y la lluvia, incluso grandes distancias. Una vez en la planta, las paredes pegajosas de las ascosporas de *F. graminearum* favorecen su adhesión a la pared celular de plantas, evitando su desplazamiento (Trail, 2009). El modelo de colonización se basa en la entrada del patógeno a través de anteras expuestas, seguido por la penetración del ovario y las infecciones sucesivas de las brácteas florales (Pritsch et al., 2000). Luego de la entrada, las hifas del patógeno crecen subcuticularmente e intracelularmente colonizando rápidamente el tejido. Esto causa alteraciones que llevan a la muerte de las células (Jansen et al., 2005). A medida que *F. graminearum* esporula en las espiguillas infectadas, lo que se ve favorecido por clima cálido y húmedo, produce masas de esporas (macroconidias) de color rosa-anaranjado,

Estrategias para la identificación y caracterización de patógenos causantes de fusariosis en trigo

cambiando la coloración de las espiguillas. A su vez puede ocurrir la infección de la base de la espiga (pedúnculo), lo que provoca una decoloración marrón-rojiza y lleva a la esterilidad de la espiga en su totalidad. Las espiguillas infectadas son estériles, y contienen granos color rosado. Sin embargo, los granos visualmente sanos también pueden estar infectados, especialmente si la infección ocurrió en etapas tardías del desarrollo del grano (Wegulo et al., 2013).

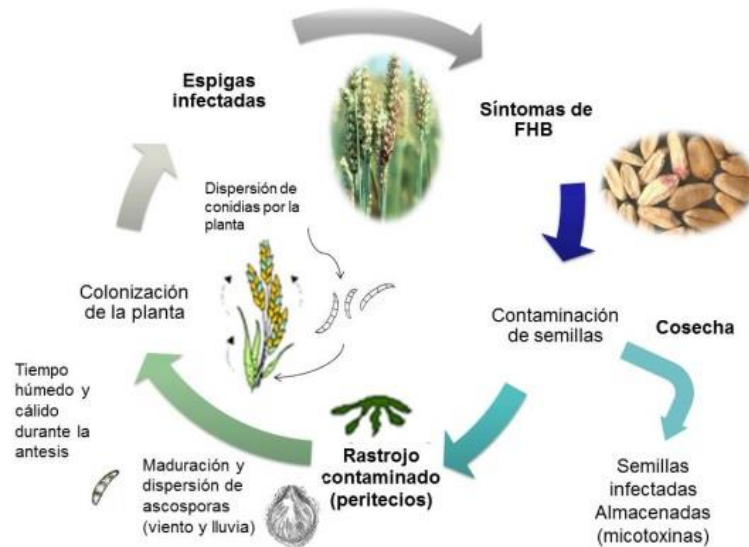


Figura 2. Ciclo de infección de plantas de trigo por *Fusarium graminearum*.
Tomado y modificado de Trail (2009).

La acumulación en los granos de micotoxinas del grupo de los tricotecenos como el deoxinivalenol, producidos por los patógenos mencionados, contribuye al daño de membrana plasmática, cloroplastos y ribosomas vegetales (Proctor et al., 1995), además de desencadenar la producción de peróxido de hidrógeno, lo que causa muerte celular y necrosis del tejido (Bushnell et al., 2003; Desmond et al., 2008).

1.2 Micotoxinas asociadas a la fusariosis de espiga: producción, monitoreo, toxicidad y riesgos

Las micotoxinas producidas por los hongos del género *Fusarium* son un grupo diverso, dentro del cual se incluyen más de 140 metabolitos secundarios (Sobrova et al., 2010). Dada su toxicidad y la alta frecuencia de aparición de hongos productores de las mismas, principalmente en cereales y productos derivados de éstos (Yazar and

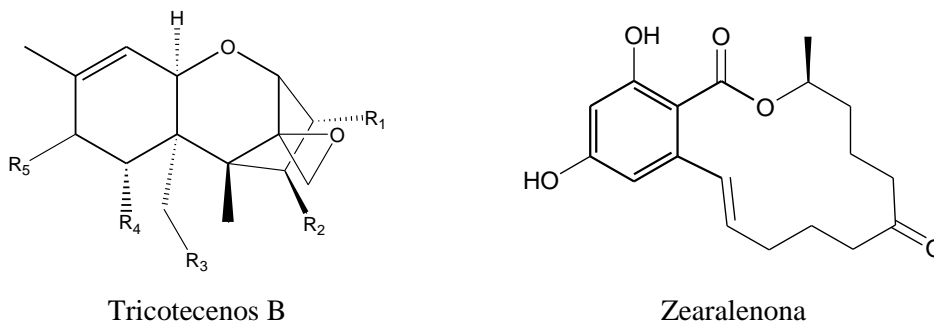
Omurtag, 2008), son consideradas un riesgo importante para la salud tanto animal como humana (Sobrova et al., 2010).

Dentro de las micotoxinas producidas por hongos de este género, se destacan los tricotecenos, por su frecuencia de aparición en trigo y otros cereales de consumo masivo. Este grupo de toxinas se puede dividir en cuatro subgrupos (A, B, C y D) según su estructura química, de los cuales los de mayor toxicidad y frecuencia de aparición pertenecen a los grupos A y B. Los tricotecenos se caracterizan por ser inmunosupresores y citotóxicos (FAO/WHO, 2007). Los efectos tóxicos en animales y humanos dependen de la vía de administración y del tipo de exposición, distinguiéndose efectos agudos y crónicos. En general, los síntomas de intoxicación aguda por ingestión de alimento contaminado en animales de granja incluyen rechazo a alimentos, pérdida de peso, vómitos y diarrea (Eriksen & Pettersson, 2004). En el caso de humanos los síntomas son similares con aparición de cuadros de gastroenteritis con náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal y fiebre (Pestka, 2010). A su vez, la ingesta crónica de pequeñas cantidades de tricotecenos puede llevar a inmunodepresión, anemia, anorexia y trastornos nerviosos y endócrinos (Pestka, 2007). En humanos la ingesta crónica ha provocado la aparición del síndrome llamado aleukia tóxica alimentaria, que se caracteriza por una leucopenia que puede llevar a la muerte (Wannemacher & Wiener, 1997). Los tricotecenos han demostrado además, efectos tóxicos a nivel dérmico pudiendo causar inflamación y necrosis cutánea y a nivel ocular pudiendo provocar daño en la córnea (Wannemacher & Wiener, 1997). Se ha constatado que a nivel celular su efecto tóxico se basa en la inhibición de la síntesis proteica y de ácidos nucleicos, y en la alteración estructural a nivel de membrana celular y mitocondria (Arunachalam & Doohan, 2012), así como su rol en la inducción de apoptosis celular (Yang et al., 2000). Como grupo, la toxicidad aguda de los tricotecenos A es mayor que las de los tricotecenos B, sin embargo la concentración de tricotecenos B hallada en cereales contaminados es generalmente mayor que la correspondiente a tricotecenos A (Visconti et al., 2004).

En particular los hongos pertenecientes al FGSC producen tricotecenos B, dentro de los cuales se encuentran el deoxinivalenol (DON), el nivalenol (NIV) y los derivados acetilados 3-acetil deoxinivalenol (3ADON), 15-acetil deoxinivalenol (15ADON) y 4-acetil nivalenol (fusarenol, FUS-X) (**Figura 3**), siendo el DON la micotoxina más frecuentemente encontrada en granos contaminados por estos hongos (Meneely et al., 2011) en niveles del orden de partes por millón (ppm) (Pestka, 2007). Desde el punto de

Estrategias para la identificación y caracterización de patógenos causantes de fusariosis en trigo

vista químico, esta toxina es un compuesto orgánico polar sesquiterpeno y posee un esqueleto tetracíclico 12,13-epoxitricotec-9-eno con 3 grupos hidroxilo, los cuales están asociados a su toxicidad (**Figura 3**) (Sobrova et al., 2010). Una de las propiedades fisicoquímicas más importantes del DON es su resistencia a temperaturas elevadas de entre 170°C a 350°C, no observándose reducción en su nivel luego de 30 minutos a 170°C. Esto supone un gran riesgo para la industria alimentaria, impidiendo el uso de materia prima contaminada (Hughes et al., 1999). Debido a los brotes de síndromes eméticos y anorexia en el ganado, ocasionados por la presencia de DON en los piensos, esta micotoxina se conoce vulgarmente como vomitoxina (Sobrova et al., 2010). Por resolución ministerial del MGAP en nuestro país, se estableció un límite máximo de DON de 10mg/kg (10 ppm) para las materias primas destinadas a la elaboración de alimentos para animales (granos y sus subproductos). La misma resolución establece un límite máximo en alimentos para bovinos de carne, ovinos y aves de 5 mg/kg (5 ppm), para bovinos de leche de 2 mg/kg (2 ppm), para cerdos y equinos de 1 mg/kg (1 ppm) y para otros animales de 2 mg/kg (2 ppm) (Ministerio de Ganadería, 2001). Asimismo, a partir del año 2001, el Ministerio de Salud Pública de nuestro país, estableció un máximo permitido de 1mg/kg (1 ppm) de deoxinivalenol en subproductos de trigo para consumo humano (Decreto Poder Ejecutivo N° 533/01).



Tricotecenos	Fórmula	PM	R1	R2	R3	R4	R5
NIV	C ₁₅ H ₂₀ O ₇	312	-OH	-OH	-OH	-OH	=O
DON	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	296	-OH	-H	-OH	-OH	=O
3ADON	C ₁₇ H ₂₂ O ₇	338	-OAc	-H	-OH	-OH	=O
15ADON	C ₁₇ H ₂₂ O ₇	338	-OH	-H	-OAc	-OH	=O
FUS-X	C ₁₇ H ₂₂ O ₈	354	-OH	-OAc	-OH	-OH	=O

Figura 3. Estructura química de las micotoxinas más importantes producidas por hongos del género de *Fusarium*: Tricotecenos B y zearalenona.

En la tabla se detallan los grupos funcionales para los distintos tricotecenos.

Se han descrito niveles similares de toxicidad entre los tricotecenos B (Minervini et al., 2004). Sin embargo hasta el momento el Comité Científico de Alimentación de la Unión Europea (SCF), ha fijado solamente valores máximos aceptables para la ingesta diaria (Ingesta diaria tolerable, IDT) de DON y NIV, pero no para los derivados acetilados, por considerar la información al respecto insuficiente. Es así que la IDT fijada para DON es de 1 µg/kg de peso corporal y de 0.7 µg/kg de peso corporal para NIV (European Commission, 2006). A pesar de la similitud en toxicidad, en Uruguay, así como en la mayoría de los países, la concentración de NIV en alimentos de consumo humano y animal no está regulada. Recientemente, Del Ponte et al. (2012) demostraron la presencia de ambas toxinas, en concentraciones similares, en la mayoría de las muestras de trigo analizadas provenientes del Sur de Brasil. Estos resultados alertan sobre el riesgo, por lo menos en esta región, de estar minimizando la contaminación del trigo y los potenciales efectos tóxicos, al analizar solamente la concentración de DON.

Otra toxina de importancia alimentaria producida por hongos del género *Fusarium* es la zearalenona. Del punto de vista químico, es la lactona del ácido resorcílico (6-(10-hidroxi-6-oxo-trans-1-undecenilo)-b-resorcílico) (**Figura 3**). Esta toxina se encuentra principalmente en el maíz, pero también en concentraciones menores en el arroz, el trigo y la cebada (Codex Alimentarius, 1999). La zearalenona es producida por especies del FGSC y otras especies del género entre las que se encuentran *F. acuminatum*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. sporotrichioides* y *F. semitectum* (Codex Alimentarius, 1999; Jimenez et al., 1996). Tiene una potente actividad estrogénica y provoca desórdenes reproductivos en animales de granja e hiperestrogenemia en humanos, siendo los cerdos los animales más sensibles. Además tiene potencial mutagénico, hemotóxico y hepatotóxico, a pesar de que el mecanismo de esta toxicidad no se conoce totalmente (Zinedine et al., 2007).

La síntesis de esta toxina se da por acción combinada de dos poliquétido sintasas (PKS 13 y PSK4) y dos proteínas de síntesis de zearalenona (ZEB), una isoamil alcohol oxidasa (ZEB1) y una proteína con dominio cremallera de leucina (ZEB2). Los cuatro genes involucrados se encuentran en un cluster de 39 kb de longitud (Gaffoor & Trail, 2006; Kim et al., 2005) (**Figura 4**).

Si bien los límites máximos establecidos internacionalmente para esta toxina en alimentos son sumamente variables, (de entre 30 a 1000 ppb) (WHO, 1998), la

European Food Safety Authority (EFSA) estableció una IDT para la zearalenona de 0.25 µg/kg de peso corporal (CONTAM, 2011), cinco veces menor que para el DON. Asimismo, el límite máximo permitido de esta toxina en alimentos de consumo infantil, según el Comité Científico de Seguridad Alimentaria de la Unión europea (SCF), es de 20 ppb, mientras que para DON dicho límite es diez veces mayor (European Commission, 2006).

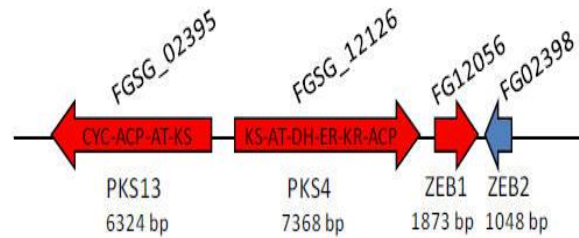


Figura 4. Cluster de genes involucrados en la biosíntesis de zearalenona.
Tomado y modificado de <http://www.rasmusfrandsen.dk/zealenone.htm>.

1.3 Taxonomía del género *Fusarium*

La falta de caracteres morfológicos característicos, fácilmente observables, que claramente separen especies dentro del género *Fusarium*, ha llevado a lo largo de la historia a la incorrecta delimitación de especies, generándose conjuntos muy amplios que subestiman la diversidad del grupo (Geiser et al., 2001; O'Donnell et al., 1998; O'Donnell et al., 2000). Esto ha conducido a la incorrecta asignación de nombre a especies toxigénicas y patogénicas. Las técnicas filogenéticas de análisis simultáneo de múltiples loci (multilocus), han permitido refinar la clasificación de especies, haciéndola más objetiva (Taylor et al., 2000a). Los resultados obtenidos con esta nueva metodología han mostrado que, en base a caracteres morfológicos, se han subestimado las especies de hongos pertenecientes al género *Fusarium* (Aoki & O'Donnell, 1999; Geiser et al., 2001; O'Donnell et al., 1998; O'Donnell et al., 1998; Ward et al., 2002). Asimismo, las especies definidas por métodos de filogenética molecular son, en general, difícilmente identificables usando métodos morfológicos convencionales (Aoki et al., 2003). Exhaustivos análisis morfológicos fueron llevados a cabo comparando cepas de FGSC de una amplia colección mundial. Estos análisis incluyeron el estudio detallado de morfología de conidias en agar nutriente pobre (SNA) (tamaño, curvatura, presencia o ausencia de pie apical), así como tasa de crecimiento y morfología de colonia en agar

papa dextrosa (PDA). Basado en estas técnicas, sólo se resolvieron 6 especies y 3 grupos de especies dentro de FGSC, lo que refleja la dificultad de discriminar entre caracteres morfológicos muy similares (O'Donnell, Ward, et al., 2004; Sarver et al., 2011b; Starkey et al., 2007). Esta evidencia demuestra la necesidad de usar métodos moleculares para lograr una identificación objetiva, rápida y sencilla (Geiser et al., 2004).

1.3.1 Identificación molecular de hongos del género *Fusarium*

Clásicamente, la identificación de hongos se ha realizado en base a una serie de criterios morfológicos. Sin embargo esto puede ser laborioso y requiere un conocimiento taxonómico sumamente amplio. La introducción de técnicas moleculares de identificación basadas en ADN, ha superado las limitaciones de los métodos tradicionales de identificación. En general estas técnicas son más específicas, objetivas, sensibles y rápidas que los métodos tradicionales (Gherbawy & Voigt, 2010). Se basan en comparación de secuencias de ADN del hongo a identificar, con secuencias de especies conocidas.

1.3.1.1 Identificación por análisis y comparación de secuencias de un gen o una región genómica

En muchos casos, la identificación de un aislamiento fúngico, se puede lograr por comparación de secuencias de parte de un solo gen o región genómica. Se trata de un método sencillo, rápido y seguro, que en pocos pasos permite determinar identidad a nivel de especie (Gherbawy & Voigt, 2010). Dependiendo del gen estudiado, puede además hacer posible la determinación de su relación filogenética con otras especies (Nei & Kumar, 2000).

El método se basa en la amplificación diferencial del gen o región genómica seleccionada y continúa con la secuenciación de la región amplificada. La secuencia obtenida es comparada (mediante el algoritmo de búsqueda "Basic Local Alignment Search Tool", BLAST) con secuencias de cepas de colección almacenadas en bases de datos. De dicho análisis surgen las secuencias más similares a la secuencia problema y el grado de similitud ente ellas (Gherbawy & Voigt, 2010).

Las regiones elegidas para identificar especie y poder establecer relaciones filogenéticas, son conocidas como cronómetros moleculares o evolutivos. Estos genes o

Estrategias para la identificación y caracterización de patógenos causantes de fusariosis en trigo

regiones génicas deben tener determinadas características para ser considerados como tales (Panza, 2012):

- Deben tener una distribución universal (estar presentes en todos los organismos estudiados)
- No deben ser transferidos horizontalmente, es decir, no pueden transmitirse de una especie a otra.
- Han de poseer una constancia funcional, de modo que la presión selectiva que actúe sobre la molécula sea mínima.
- Deben tener un tamaño suficientemente grande para que las estimaciones de semejanza tengan validez estadística.
- Desde el punto de vista metodológico interesa que no sean excesivamente largas para poder aplicar técnicas de secuenciación.
- Deben presentar zonas conservadas que permitan el anclaje de primers específicos para su amplificación y zonas variables que permitan detectar diferencias entre especies.
- La tasa de cambio, al menos en una parte de la molécula, debe ser lo suficientemente baja como para permitir la detección de las relaciones evolutivas lejanas.

Además, cuando se elige un gen para utilizarlo en identificación, se debe tener en cuenta que existan secuencias de ese gen ya depositadas en bancos de datos, de forma tal que sea posible la comparación. A su vez, para el caso de especies relacionadas, es importante determinar que los genes a utilizar en la identificación sean suficientemente diferentes (Panza, 2012).

Dependiendo de los géneros de hongos, se han determinado las mejores secuencias para ser usadas en la identificación de las diferentes especies. Algunos marcadores muy utilizados en la identificación de hongos son las regiones del espaciador interno transcrito (ITS) del ARN ribosomal, regiones de espaciadores intergénicos (IGS) del ARN ribosomal, el gen de la beta-tubulina, el gen de la calmodulina, el gen de la subunidad menor del ARN ribosomal mitocondrial (mtSSU) y el gen del factor de elongación de la transcripción TEF-1 α (Gherbawy & Voigt, 2010). En general las zonas ricas en intrones de genes que codifican para proteínas tienden a evolucionar a una tasa mayor que lo que se observa a nivel de especies en marcadores como la región ITS, por lo que son muy utilizadas para análisis filogenéticos a este nivel (Geiser, 2003).

El gen del factor de elongación de la transcripción (TEF-1 α), el cual codifica una parte esencial de la maquinaria de traducción proteica, es uno de los marcadores más utilizados para la determinación de especies dentro del género *Fusarium*. Dicho gen tiene gran utilidad filogenética dado que: (i) proporciona información a nivel de especies del género, dado su elevado grado de polimorfismo, (ii) no se han detectado copias no-ortólogas del gen dentro del género, y (iii) se han diseñado primers universales que funcionan para toda la amplitud filogenética del género (Geiser et al., 2004).

Este gen fue inicialmente utilizado como marcador filogenético para inferir relaciones a nivel de especie y género dentro de *Lepidoptera* (Mitchell et al., 1997), siendo empleado por primera vez en hongos para investigar linajes dentro del complejo *F. oxysporum* (O'Donnell et al., 1998). Se han diseñado varios primers específicos para amplificar regiones de dicho gen. Los primers específicos EF1 y EF2 amplifican una región del gen TEF-1 α , que incluye tres intrones correspondientes a más de la mitad de la longitud del amplicón. Estos primers pueden ser aplicados a una amplia variedad de hongos ascomicetes filamentosos (Geiser et al., 2004). En particular dicha región es amplificable en todas las especies de *Fusarium* conocidas, obteniéndose un amplicón de aproximadamente 700pb (**Figura 5**). Este gen parece ser de copia única en el género *Fusarium* y muestra un elevado grado de polimorfismo de secuencia para especies muy relacionadas, incluso mayor que porciones ricas en intrones de genes que codifican proteínas como la calmodulina, beta-tubulina e histona H3. Sin embargo no presenta variaciones intraespecíficas (Kristensen et al., 2005). Por esta razón el gen TEF-1 α se ha convertido en un marcador de elección como herramienta “single-locus” de identificación de *Fusarium* (Geiser et al., 2004).

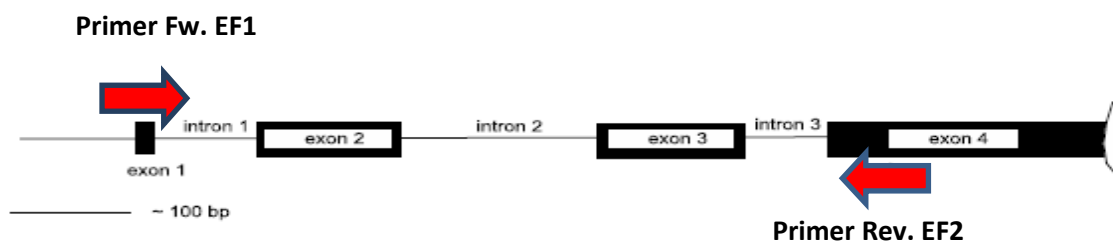


Figura 5. Mapa de región del gen TEF-1 α de *Fusarium* usada para identificación de especies. Con flechas rojas se marca la zona de hibridación de los primers específicos forward (Fw.) EF1 y reverso (Rev.) EF2. Tomada y modificada de Geiser et al. (2004).

Las bases de datos a utilizar en la identificación de hongos comprenden las bases generales como el Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), que contienen información de numerosos genes de diversos organismos y bases específicas de género como por ejemplo el Fusarium-ID (<http://isolate.fusariumdb.org/welcome.php?a=intro>). Esta base de datos fue lanzada en el año 2004 (Geiser et al., 2004) basada en secuencias del gen TEF-1 α . En los últimos años se han añadido secuencias de múltiples marcadores que permiten identificar a prácticamente todas las especies actualmente conocidas del género *Fusarium*. Las secuencias depositadas en esta base de datos corresponden a cepas de una colección de más de 35000 ejemplares provenientes de distintas partes del mundo, depositadas en el *Fusarium* Research Center (FRC) de la Universidad de Penn State y en la colección NRRL de la USDA-ARS, Peoria (Illinois).

En general, no existen valores establecidos de similitud de secuencias para decidir que un aislamiento de un hongo filamentoso pertenece o no a una especie. Es por ello que, en algunos casos, para asegurar la identificación se analiza más de un gen y se espera que los resultados sean concordantes entre sí, o bien se utiliza identificación polifásica.

1.3.1.2 Identificación por análisis de Multilocus

Si bien la identificación de especies basada en el análisis de un único marcador muchas veces es suficiente para lograr la identificación de un aislamiento, los métodos de análisis de secuencias de múltiples loci (multilocus) han demostrado muchas veces ser esenciales para determinar de forma precisa, los límites entre especies dentro de varios géneros de hongos, incluido el género *Fusarium*, además de ser útiles para identificar haplotipos multilocus usados en estudios de variabilidad genética entre poblaciones (O'Donnell, Sutton, et al., 2004; O'Donnell et al., 2010). Este tipo de análisis es especialmente útil cuando los datos de un solo marcador sugieren que el aislamiento a identificar podría corresponder a una nueva especie no representada en las bases de datos. En estos casos, se sugiere seguir un esquema apropiado de análisis para lograr el reconocimiento de concordancia de genealogías de secuencias de ADN de múltiples genes utilizando el concepto filogenético de especie (Genealogical concordance phylogenetic species recognition o GCPSR) (Geiser et al., 2004; Taylor et al., 2000b). Según este concepto, una especie es un grupo monofilético que evolucionó independientemente de otros, por lo cual se reconoce una especie cuando sus integrantes

se agrupan en conjunto y separadamente de otros, al analizar secuencias de múltiples genes. A este procedimiento de análisis molecular se lo denomina Multilocus Sequence Typing (MLST) y es una técnica de clasificación genética de alta resolución para la identificación de especies, la cual, dependiendo del grado de resolución empleado, posibilita también la detección de diferencias intraespecíficas en procariontas y eucariotas. En este sentido, ha sido ampliamente utilizada en la caracterización de patógenos importantes para la salud humana, agrícola y bioseguridad (Pérez-Losada et al., 2013).

La técnica de MLST involucra un primer paso de amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de los genes seleccionados (aproximadamente 400-700 bp de cada uno), seguida de la secuenciación del ADN de dichos amplicones. Este tamaño no sólo garantiza que puedan ser secuenciados bidireccionalmente de forma precisa, sino que además proporciona una cantidad de datos (combinado entre todos los genes analizados) suficiente para alcanzar un alto grado de discriminación (Vázquez & Berrón, 2004). Generalmente, se eligen genes de expresión constitutiva, esenciales para mantener las funciones celulares (genes housekeeping), no sometidos a presión selectiva, lo que hace posible detectar variaciones neutras, que definen genotipos altamente relacionados (Vázquez & Berrón, 2004). Las diferencias nucleotídicas entre individuos son analizadas en un número variable de genes, dependiendo del grado de discriminación que se desea alcanzar. Dichos datos de secuenciación son analizados y a cada secuencia única se le asigna un número de alelo. Se combinan los perfiles alélicos de cada individuo y se les asigna una clasificación de secuencia (“Sequence Type “, ST). Por último se comparan los perfiles alélicos obtenidos, de modo de establecer las relaciones filogenéticas de los aislamientos analizados (Vázquez & Berrón, 2004). Si se encuentran nuevos alelos y nuevos ST, éstos son verificados y guardados en bases de datos.

Existen dos grandes bases de datos de MLST, una localizada en el Imperial College de Londres (www.mlst.net) y la segunda en la Universidad de Oxford (www.pubmlst.org), además de otras más pequeñas en el Environmental Research Institute de Cork Irlanda (mlst.ucc.ie) y en el Instituto Pasteur de Paris (www.pasteur.fr/mlst). Estas bases proveen información sobre perfiles alélicos y ST, además de programas adecuados para el análisis de datos (Pérez-Losada et al., 2013).

El método de MLST se ha utilizado exitosamente en la caracterización de especies de hongos del género *Fusarium*, en particular especies dentro de los complejos *Fusarium*

oxysporum (O'Donnell, Sutton, et al., 2004), *F. incarnatum-F.equiseti* y *F. chlamydosporum* (O'Donnell et al., 2009). Asimismo, se han desarrollado numerosas variantes del método MLST. Una de ellas, muy importante a la hora de la caracterización de especies de *Fusarium*, en particular especies dentro del FGSC, es el Multilocus Genotyping (MLGT), desarrollado por Ward et al. (2008). Dicho método se basa en la amplificación por PCR multiplex (amplificación simultánea) de seis genes, seguida de la extensión alelo específica (ASPE) de dichos productos, con 45 sondas que permiten diferenciar especies y quimiotipos (Yli-Mattila et al., 2009). Los productos de la extensión se hibridan posteriormente con microesferas de poliestireno marcadas con una combinación de fluoróforos que tiene acopladas secuencias blanco específicas para los alelos amplificados (**Figura 10**). La detección de los productos se realiza utilizando un citómetro de flujo, lo que sustituye a la secuenciación del método de MLST tradicional.

1.3.1.3 Identificación por PCR-RFLP de un gen o región genómica

Las técnicas que involucran marcadores polimórficos como la PCR-RFLP, han sido ampliamente utilizadas en la identificación de hongos (Diguta et al., 2011; Viaud et al., 2000), en particular en la diferenciación de especies del género *Fusarium* como el complejo *F. oxysporum* (González et al., 2005) y FGSC (Suga et al., 2004).

Este método combina la amplificación diferencial de uno más fragmentos por PCR (Reacción en Cadena de la polimerasa) con la digestión diferencial con enzimas de restricción del amplicón. Este último método denominado RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), se basa en que variaciones en las secuencias nucleotídicas (polimorfismos) pueden o no ser reconocidos como sitios blanco de enzimas de restricción (Olive & Bean, 1999). Las enzimas de restricción seleccionadas para el análisis, reconocen estos sitios y digieren diferencialmente el ADN de las distintas especies o cepas, generando fragmentos de diferente tamaño según la ubicación de los sitios de reconocimiento de las enzimas en la secuencia blanco. El patrón de fragmentos es posteriormente visualizado en geles de agarosa de alta resolución (Metaphore) y teñidos con una agente intercalante de ADN (Olive & Bean, 1999).

Conociendo previamente el patrón de bandas obtenido con cepas de referencia, se puede determinar mediante este análisis, la especie a la cual pertenece el aislamiento. Sin embargo, es necesario realizar un paso previo de identificación que permita determinar

que dicho aislamiento a identificar pertenece al conjunto de especies seleccionado. A su vez, secuencias de estas regiones o genes depositadas en bancos de datos son utilizadas previamente para el análisis *in silico*, mediante programas que permiten predecir los sitios de corte y el tamaño de los fragmentos resultantes, y así poder definir las enzimas adecuadas para la búsqueda de diferencias interespecíficas.

Este método se utiliza para la identificación a nivel de especie, sustituyendo a la secuenciación. Presenta como limitante la necesidad contar con cepas de colección de identidad conocida, de forma de generar patrones de comparación con las cepas a identificar (Gardes & Bruns, 1996).

1.4 Producción de micotoxinas por hongos del FGSC y clasificación según quimiotipo

Como ya se mencionó, los hongos pertenecientes a FGSC tienen la capacidad de producir, entre otras micotoxinas, tricotecenos del tipo B. Dependiendo del perfil de tricotecenos B que produzcan estos hongos se pueden agrupar en tres quimiotipos diferentes: quimiotipo NIV, (productores de nivalenol y derivados acetilados), quimiotipo 3ADON (productores de deoxinivalenol y 3-acetil-deoxinivalenol) y quimiotipo 15ADON (productores de deoxinivalenol y 15-acetil-deoxinivalenol) (Miller & Greenhalgh, 1991).

En la actualidad se han desarrollado técnicas basadas en PCR que permiten diferenciar quimiotipos mediante el análisis de genes que codifican para enzimas específicas de la vía de producción de los tricotecenos (genes TRI) (Ward et al., 2002; Ward et al., 2008; Zhang et al., 2007). Estos análisis permiten reemplazar estudios más laboriosos, en los cuales se determina el quimiotipo de los aislamientos identificando las micotoxinas producidas en cultivo en el laboratorio.

Algunos de estos métodos involucran a los genes TRI7 y TRI13 (Chandler et al., 2003) y los genes TRI3 y TRI12 (Ward et al., 2002) (**Figura 6**).

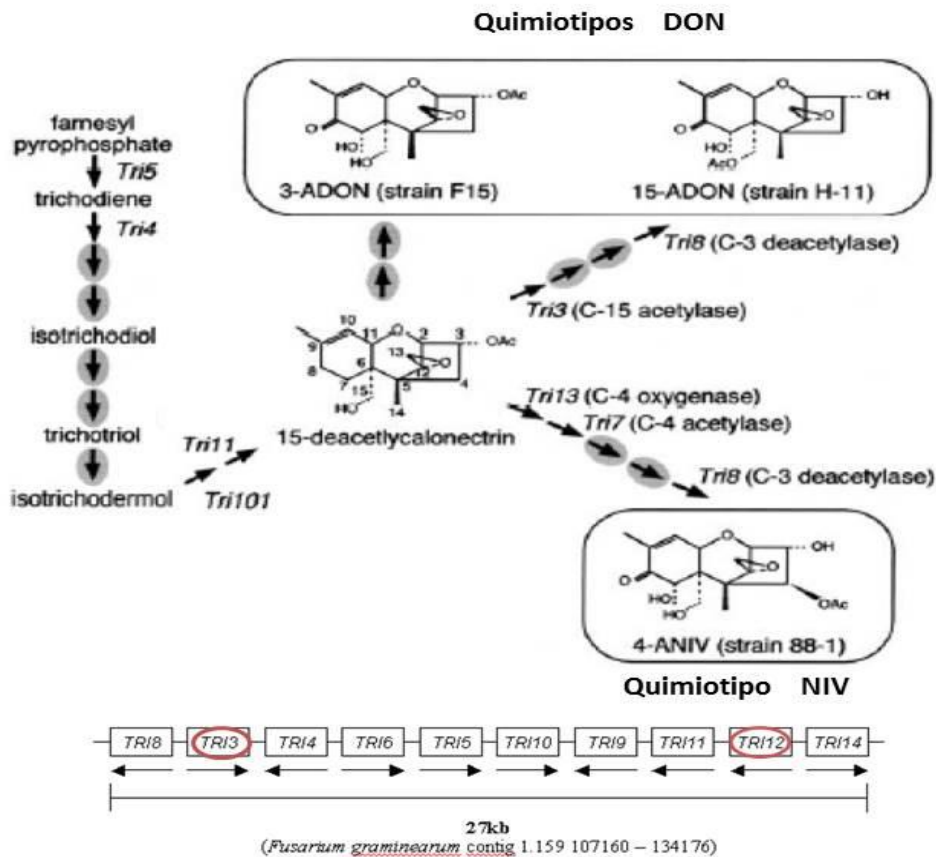


Figura 6. Vía de síntesis de tricotecenos mostrando algunas de las enzimas más importantes y segmento del cluster TRI. En rojo se marcan los genes utilizados en la clasificación de quimiotipos de especies de *Fusarium graminearum*. Tomado y modificado de Hammond-Kosack et al. (2004).

En *F. graminearum* los genes conocidos involucrados en la síntesis de tricotecenos se encuentran en tres loci. El primero es el cluster TRI que incluye siete genes (TRI8, TRI7, TRI3, TRI4, TRI11, TRI13) que catalizan diez reacciones de la vía, dos genes (TRI6 y TRI10) que codifican factores de regulación transcripcional, un gen (TRI12) que codifica una proteína transportadora y dos genes (TRI9 y TRI4) con función desconocida (**Figura 6**). Además, fuera de este cluster se encuentra el gen que codifica para la 3-O-acetiltransferasa (TRI101) y el cluster TRI1-TRI16 (Alexander et al., 2009; Cardoza et al., 2011).

La biosíntesis de tricotecenos consta de varios pasos que incluyen hidroxilaciones, acetilaciones e isomerizaciones. La enzima tricodieno sintasa codificada por el gen TRI5, cataliza la formación de tricodieno, primer intermediario metabólico de la biosíntesis de tricotecenos. El tricodieno sufre posteriormente una serie de

hidroxilaciones catalizadas por la enzima citocromo P450 monooxigenasa codificada por el gen TRI4, para dar lugar a la formación de isotricodermol. Esta molécula es convertida en isotricodermina por la acetiltransferasa codificada por el gen TRI101. Esto es seguido de una hidroxilación C-15 (controlada por TRI11) y una acetilación (controlada por TRI3). Un tercer hidroxilo es agregado en posición C-4 (controlado por TRI13) seguido de una acetilación subsecuente bajo el control de TRI7. En *Fusarium* productores de tricotecenos del tipo B, el gen TRI1 controla la adición de grupos hidroxilo en posiciones C-7 y C-8. El paso final de biosíntesis es la remoción del grupo acetilo C-3 o C-15 por una estearasa codificada por TRI8. La actividad diferencial de esta estearasa determina los quimiotipos 3ADON y 15ADON en *F. graminearum* (Alexander et al., 2011; Alexander et al., 2009; McCormick et al., 2011) (**Figura 6**).

Las diferencias de quimiotipo tienen una distribución polifilética dentro del FGSC (Ward et al., 2002). Dichos polimorfismos trans-especies, con niveles sorprendentemente elevados de variación (Ward et al., 2002), han persistido durante múltiples eventos de especiación, y se presume que son mantenidos por una nueva forma de selección balanceadora que actúa sobre las diferencias de quimiotipo (Aoki, 2012). Estos genes han evolucionado de forma paralela e independiente al resto del genoma (Ward et al., 2002) y han sido utilizados para inferir la estructuras poblacionales en campos infectados (Lee et al., 2009). Sin embargo no pueden ser utilizados para inferir relaciones evolutivas dentro de FGSC (Aoki et al., 2012). Esto concuerda con el hecho de que si bien el quimiotipo está en algunos casos asociado a la especie a la cual pertenece el hongo, en la mayoría de los casos es característico de la cepa, por lo que sólo caracterizando la especie, no puede inferirse *a priori* su quimiotipo (**Tabla 1**).

Sin embargo, en algunos casos se han observado evidencias de evolución adaptativa en los genes de tricotecenos (Ward et al., 2002). Ward et al. (2008) plantean que en general los aislamientos que presentan un quimiotipo 3ADON producen mayores niveles de tricotecenos y tienen una velocidad de crecimiento mayor que los pertenecientes al quimiotipo 15ADON. Los mismos autores afirman que recientemente han detectado un cambio en la población de América del Norte de patógenos causantes de la fusariosis de espiga, apareciendo en número importante cepas más toxigénicas, pertenecientes al quimiotipo 3ADON. Todo esto remarca la necesidad de monitorear rutinariamente no sólo las especies de FGSC sino también los quimiotipos asociados a FHB en una determinada región.

1.5 Cuantificación de contaminación fúngica en granos.

1.5.1 Métodos de cuantificación

La cuantificación de la carga de *Fusarium* spp. en granos de trigo puede realizarse mediante métodos dependientes o independientes del cultivo.

Tradicionalmente los métodos dependientes de cultivo, se han utilizado para determinar la contaminación fúngica en granos. La siembra directa de granos, determinando el porcentaje de contaminación, o la realización de diluciones decimales de una suspensión homogeneizada de granos, contabilizando las unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de muestra, han sido los métodos más comúnmente empleados (Kikot, 2012; Martin et al., 1990). Es así que el trabajo presentado por la Mesa Nacional de trigo de nuestro país, sobre la caracterización de la zafra 2011-2012 (Bogliacini et al., 2012) incluye el porcentaje de granos contaminados con *Fusarium* spp., el cual se toma como valor predictivo de la posible contaminación con DON. Estos métodos son laboriosos e insumen tiempo de análisis relativamente prolongado, el cual incluye el tiempo de cultivo y estudios posteriores si se pretende aislar e identificar los contaminantes. Además estos métodos sirven solamente para detectar hongos cultivables.

Otros métodos independientes del cultivo se han utilizado para determinar los niveles de contaminación fúngica en granos. Entre ellos se puede citar la determinación de marcadores químicos específicos para hongos tales como el ergosterol o la quitina (Ekblad et al., 1998; Martin et al., 1990; Rao et al., 1989). Últimamente se han incorporado los métodos moleculares que involucran la cuantificación de ADN fúngico para determinar la contaminación en granos. El uso de PCR en tiempo real utilizando primers específicos, acoplados o no a sondas, ha prosperado en los últimos años como método de cuantificación de determinadas especies o quimiotipos en granos (Stark, 2010). Incluso se han realizado estudios que asocian el nivel de contaminación con determinado tipo de hongos, medido por PCR en tiempo real, con la concentración de micotoxinas presentes en una muestra (Burlakoti et al., 2007)

1.5.2 PCR en tiempo real: características generales

De forma de poder cuantificar la cantidad de ADN presente en una muestra, se desarrolló el método de PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR). Dicha técnica se basa en la recolección continua de señales de fluorescencia de una o más reacciones de PCR, a lo largo de un cierto rango de ciclos de amplificación (usualmente 30 a 40 ciclos). Estas señales de fluorescencia serán convertidas posteriormente en un valor numérico para cada muestra, de modo de poder correlacionarlo con la cantidad de ácido nucleico (AN) de una secuencia específica presente en la misma (Dorak, 2007).

1.5.2.1 Estrategias de detección del producto amplificado

Existe una amplia gama de reactivos que pueden ser usados para la detección de los productos de PCR que se forman durante la reacción. Estos incluyen agentes intercalantes que se unen al ADN doble hebra (dsADN) de manera independiente de la secuencia como lo es el SYBR Green y sondas de oligonucleótidos marcadas con fluoróforos, que se unen a secuencias de forma específica (ej. Sondas Taqman, molecular Beacons). En el caso del uso de agentes intercalantes de dsADN, éstos emiten fluorescencia sólo al unirse a la doble hebra, por lo que la intensidad de fluorescencia aumentará proporcionalmente con la concentración del amplicón. La desventaja de este tipo de agentes es que se unen a cualquier producto de dsADN sin discriminar si se trata del amplicón esperado, de un producto inespecífico o de dímeros de primers. Por este motivo, y de forma de asegurar la especificidad de la amplificación, generalmente este tipo de análisis se combina con el estudio de las curvas de desnaturalización o melting (Dorak, 2007).

1.5.2.2 Análisis de desnaturalización o curvas de melting

Cada secuencia de dsADN tiene una temperatura de desnaturalización o melting (T_m) a la cual el 50% del ADN se encuentra en forma de monohebra. Esta temperatura depende del largo del ADN, la secuencia y el contenido en guaninas y citosinas (contenido en GC). Cuando se usan agentes intercalantes fluorescentes y el dsADN es calentado, puede observarse un repentino descenso en la fluorescencia al alcanzarse la T_m (debido a la disociación de las hebras de ADN y la liberación del agente intercalante). Este punto se determina a partir del punto de inflexión de la curva de melting (Intensidad de fluorescencia vs. temperatura) o del pico de la curva generada graficando el opuesto de la derivada primera de la Intensidad de fluorescencia respecto a la temperatura en

función de la temperatura (dF/dT vs. T). Si el producto amplificado es único, se observará un solo pico en dicha curva, el cual corresponderá a la T_m del producto específico amplificado (Dorak, 2007).

1.5.2.3 Parámetros a determinar en PCR en tiempo real

Existen algunos parámetros que deben determinarse a la hora de realizar la cuantificación de ADN o ARN en una muestra por PCR en tiempo real.

El Ciclo umbral (C_t) marca el número de ciclo en el cual la fluorescencia generada por la reacción supera un valor umbral, es decir refleja el punto durante la reacción en el cual se acumuló un número significativo de amplicones (Dorak, 2007). Dicho valor se correlaciona inversamente con el logaritmo del número de copias de ácido nucleico inicial en dicho tubo de reacción. Por tanto, el C_t de una reacción particular, será menor cuanto mayor sea el contenido de AN de partida en la muestra. El umbral se fija en la región asociada al crecimiento exponencial del producto de PCR. Usualmente corresponde a 10 veces la desviación estándar de la línea de base para los primeros ciclos de PCR (Dorak, 2007). Dicho valor se determina para cada corrida (set de reacciones de PCR) en particular y no debe extrapolarse a otros experimentos. El punto de corte del umbral con la curva de amplificación determinará el C_t de cada reacción de amplificación (**Figura 7**) (Dorak, 2007).

Para determinar la concentración de ADN presente en una muestra, el valor de C_t obtenido debe interpolarse en una curva denominada curva estándar, construida graficando los valores de C_t adquiridos para diferentes concentraciones conocidas de ADN molde, en función del logaritmo de dichas concentraciones. Una vez construida la curva, se determina el intervalo de concentraciones de ADN molde dentro del que se obtiene una respuesta lineal, al cual se le denomina rango dinámico. Asimismo, utilizando la pendiente de la curva estándar se calcula la eficiencia de la reacción, la cual es un parámetro crítico a la hora de poner a punto un método de PCR en tiempo real. La misma puede calcularse empleando la fórmula $\text{Eficiencia} = [10^{(-1/\text{pendiente})}] - 1$ (Rasmussen, 2001). La eficiencia de la reacción de PCR debe ser idealmente del 100% pero se consideran aceptables eficiencias entre 90–110%, lo que significa que la cantidad de amplicón se duplica en cada ciclo (cantidad de moléculas luego de n ciclos = número inicial de moléculas * 2^n). Esto corresponde a pendientes de la curva estándar de C_t vs. logaritmo de concentración de molde de entre 3.1 y 3.6 (Rebrikov & Trofimov, 2006). Numerosas variables pueden afectar la eficiencia de la PCR. Estas

incluyen el largo del amplicón, presencia de inhibidores, formación de estructuras secundarias y el diseño de los cebadores (primers) (Bustin, 2004; Dorak, 2007).

Cabe destacar que dentro del rango dinámico pueden interpolarse valores de Ct, de modo de determinar la concentración inicial de AN en una muestra, pero fuera de este rango no deben extrapolarse valores.

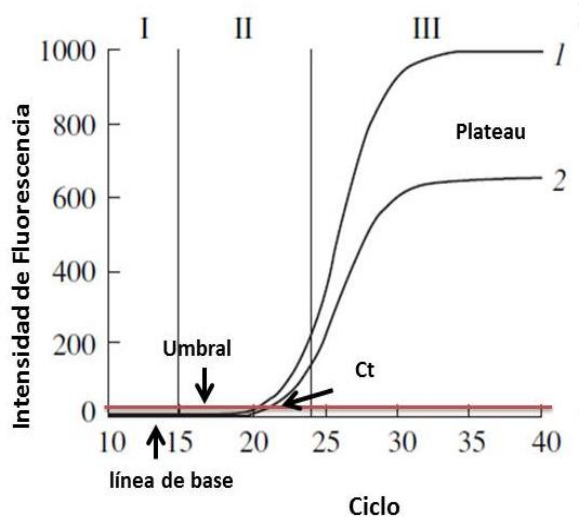


Figura 7. Curvas de amplificación de ADN (Intensidad de Fluorescencia vs. ciclo) durante la reacción de PCR, escala lineal.

I, II y III representan las fases, lag, exponencial y plateau respectivamente. 1 y 2 representan curvas de amplificación para la misma cantidad de AN de partida. Nótese que si bien los valores de Ct son similares, los niveles de fluorescencia finales (plateau) son diferentes. Tomado y modificado de Rebrikov & Trofimov (2006).

1.5.3.4 Cuantificación de hongos productores de micotoxinas por PCR en tiempo real

El uso de las técnicas de PCR en tiempo real tanto en el área de la investigación como en el área de diagnóstico, ha tenido gran aceptación dada su gran rapidez, sensibilidad y reproducibilidad (Mackay, 2004). En el área de la microbiología, se han desarrollado numerosos métodos de PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de virus, bacterias, hongos y protozoarios (Mackay, 2004). En particular, se han desarrollado métodos de PCR en tiempo real para la cuantificación de hongos del género *Fusarium* productores de micotoxinas en cereales. Esto se logra través de la amplificación específica de uno o más genes que codifican para enzimas imprescindibles en la vía de producción de micotoxinas (Burlakoti et al., 2007; Meng et al., 2010; Nicolaisen et al.,

2009; Nielsen et al., 2012; Sarlin et al., 2006). Estos métodos demostraron ser sensibles y específicos, además de ser una herramienta poderosa en la cuantificación de la biomasa fúngica en diferentes matrices vegetales, asistiendo al monitoreo epidemiológico y permitiendo predecir los efectos de medidas preventivas de enfermedades, en menor tiempo y de forma más sencilla, sin la necesidad de procedimientos laboriosos como el cultivo, aislamiento e identificación individual de especies (Nicolaisen et al., 2009).

Esta metodología posibilita además, establecer la correlación entre la cantidad hongos presentes y la contaminación de la muestra con micotoxinas (Sarlin et al., 2006; Waalwijk et al., 2004).

1.6 Análisis y cuantificación de micotoxinas en granos de trigo

De forma de garantizar la salud alimentaria tanto animal como humana, proteger al consumidor del riesgo de exposición y de cumplir con los requerimientos impuestos por las normativas, tanto nacionales como internacionales, el desarrollo de técnicas confiables, rápidas, sensibles y precisas para la cuantificación de micotoxinas, en particular tricotecenos, se ha convertido en un área de prioridad en investigación (Lattanzio et al., 2009).

En la actualidad existen trabajos que muestran varios métodos químicos que permiten, a partir de un mismo extracto purificado, determinar la contaminación con DON, 15ADON y 3ADON, NIV y zearalenona, realizando la separación de las toxinas en el extracto final por cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía de gases (GC), o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los métodos de detección utilizados incluyen espectrofotometría UV-Visible, fluorescencia (en caso de moléculas fluorescentes o con derivatización pre o post columna), captura electrónica y espectrometría de masa (Krska, 2009). Sin embargo, los nuevos métodos desarrollados para la detección y cuantificación de micotoxinas en alimentos, se basan en el uso de espectrometría de masa (MS), en particular espectrometría de masa en tándem (MS/MS o MS²) para confirmar la presencia de las moléculas de interés (Berthiller et al., 2005; Berthiller et al., 2007; Krska et al., 2007; Ren et al., 2007).

La espectrometría de masa (MS) es una técnica analítica que mide la relación masa/carga (m/z) de los iones generados a partir de los compuestos químicos a analizar. Cuando se utiliza espectrometría de masa tandem (MS/MS), una de las grandes ventajas

consiste en la posibilidad de seleccionar el ion correspondiente al analito para luego fragmentarlo y generar un patrón de fragmentación característico (huella dactilar) de la molécula (Arpino, 1992). Para estos análisis, existen varios tipos de analizadores que pueden ser usados: triple cuadrupolo, trampa de iones, y cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF). Dentro de las fuentes de ionización, el Electrospray (ESI) es la más usada en el análisis de micotoxinas. A su vez, en el caso de micotoxinas, mediante el uso de buffers agregados a la fase móvil, se puede favorecer la formación de aductos. En particular, para el caso de los tricotecenos B, se busca la formación de aductos con el ion acetato ($[M+CH_3COO]^-$), el cual se monitorea en modo de iones negativos y para el caso de tricotecenos A, la formación de aductos con amonio ($[M+NH_4]^+$), los que se monitorean en modo de iones positivos. Se ha visto que la intensidad de señal de estas especies es mucho mayor en comparación con experimentos donde no se usa buffer, llevando a aumentar sensiblemente los límites de detección (Berthiller et al., 2005).

La técnica de HPLC acoplada a MS/MS, además de poseer gran sensibilidad, provee de una elevada certeza en la identificación de los analitos, y es por tanto, el método de referencia recomendados por normas como las de la Unión Europea (EU) (European Union, 2012; Lattanzio et al., 2009). Asimismo, su elevada selectividad, permite la reducción u omisión de pasos de clean-up (remoción de posibles sustancias interferentes) de los extractos, aumentando el rendimiento de la muestra. Sin embargo, la presencia de contaminantes en la matriz del extracto puede afectar la ionización de los analitos, llevando a disminución o supresión de la señal, lo que puede afectar la medida. Por tanto los pasos de clean-up continúan siendo un paso clave para obtener resultados analíticos confiables (Lattanzio et al., 2009). Algunos de los métodos de clean up utilizados incluyen extracción en columnas de fase sólida (SPE), inmunoafinidad, intercambio iónico, y extracción líquido-líquido. Las columnas SPE son las más comunes, y se encuentran disponibles de forma comercial; los adsorbentes pueden ser sílica, carbón activado, silicato de magnesio (Florisil) u óxido de aluminio.

Se han desarrollado métodos de HPLC-MS/MS aplicables a la determinación simultánea de varias micotoxinas de diferente naturaleza química (Sulyok et al., 2007) y a la determinación de micotoxinas conjuntamente con otros contaminantes alimentarios comunes, como pesticidas, toxinas vegetales y drogas veterinarias (Berthiller et al., 2007). Estos métodos se basan en protocolos de extracción que logran obtener una gran variedad de compuestos de las muestras y presentan límites de detección del orden de 0.01 a 0.05 mg/kg (ppm) (Mol et al., 2008). Además, LC-MS/MS es una herramienta

poderosa en la detección de micotoxinas enmascaradas, es decir micotoxinas conjugadas a compuestos más polares (ej. glucosa), las cuales no se monitorean de forma rutinaria, pero representan un riesgo, ya que las toxinas pueden liberarse por hidrólisis en el tracto gastrointestinal luego de la ingesta (Berthiller et al., 2005).

Otras técnicas utilizadas para la detección y/o cuantificación de micotoxinas son los métodos inmunoquímicos. Entre ellos se encuentran el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA), los inmunoensayos de flujo lateral y los inmunoensayo por detección de fluorescencia polarizada (Flourescence Polarization ImmunoAssay, FPIA). La técnica de ELISA es ampliamente utilizada para el monitoreo de DON y otras toxinas en cereales. No requiere clean up y representa un método rápido, económico de “screening” (Schneider et al., 2004) a pesar de su falta de precisión a bajas concentraciones y de ser aplicable a un número limitado de matrices (Lattanzio et al., 2009). Los anticuerpos utilizados en el ELISA para la detección y cuantificación de DON presentan, en ensayos competitivos, reactividad cruzada con los derivados acetilados 3ADON y 15ADON, por tanto se requieren ensayos confirmatorios por métodos más robustos como HPLC en casos de niveles de contaminación cercanos a los límites regulados (Lattanzio et al., 2009). Por otro lado, los inmunoensayos de flujo lateral, utilizan el formato de ELISA competitivo, con anticuerpos específicos inmovilizados en una membrana (tirilla), permitiendo la determinación cualitativa entre muestras “positivas” y “negativas” de forma visual. Asimismo se han desarrollado lectores fotométricos portátiles para la lectura cuali y cuantitativa de las tirillas. Estos ensayos son rápidos y pueden realizarse en campo, sin necesidad de trasladar la muestra al laboratorio. Sin embargo los problemas de reproducibilidad y confiabilidad con diferentes matrices, junto con la falta de validación extensiva limitan su uso (Krska & Molinelli, 2009). El FPIA, representa una técnica rápida y sencilla, donde se mide la interacción entre un antígeno marcado con un fluoróforo y su anticuerpo específico. Su uso en el monitoreo de tricotecenos se limita al DON (Pascale et al., 2008) y presenta interferencias con algunas matrices, lo que puede llevar a la sobreestimación del contenido de micotoxina (Lattanzio et al., 2009).

Otras técnicas que se han desarrollado en los últimos años para la detección y análisis son los biosensores (ópticos y electroquímicos) y las técnicas no invasivas (preservan la muestra) como espectroscopia infrarroja y espectroscopia de transformada de Fourier (Krska, 2009; Lattanzio et al., 2009).

1.7 Manejo de la enfermedad mediante el uso de fungicidas y generación de resistencia a los mismos

La fusariosis de la espiga es una de las enfermedades de más difícil control y si bien ninguna práctica de manejo por sí sola será capaz de realizar un control efectivo de la enfermedad, la adopción en conjunto de distintas prácticas de manejo es muy importante para disminuir la carga de inóculo alta de *F. graminearum* (Díaz de Ackermann et al., 2002).

Debido a las características inherentes de este patógeno, no es posible el control después de la aparición de los síntomas (Carmona, 2008). Por este motivo, el control de la enfermedad debe ser preventivo. Las estrategias recomendadas para el manejo eficiente de la enfermedad y su prevención incluyen la selección de cultivares menos susceptibles, la diversificación de la fecha de floración, la rotación con cultivos que disminuyan la presión de inóculo, y la aplicación estratégica de fungicidas (Díaz de Ackermann et al., 2002). Sin embargo, el amplio rango de hospederos, la gran capacidad de diseminación de este patógeno junto con la falta de cultivares de trigo con resistencia genética aceptable, hacen que bajo condiciones climáticas favorables, igualmente ocurran epifitias (Mazzilli et al., 2011).

La aplicación de fungicidas ha mostrado ser una herramienta eficiente cuando se realiza en el momento óptimo, es decir en el momento cercano a la ocurrencia de la infección. (Díaz de Ackermann et al., 2002). Se recomienda la aplicación de fungicidas al inicio de la floración (antes, 61 escala Zadoks) (Díaz de Ackermann & Kohli, 1997a). Los antecedentes de control químico indican que en general, la eficiencia de control es baja a intermedia, debido principalmente al corto período para la aplicación del fungicida en el momento adecuado, ya que las condiciones de lluvia que favorecen la enfermedad limitan la oportunidad de aplicación (Blandino et al., 2006; Cromey et al., 2001). Asimismo se ha observado que los niveles de DON en granos pueden disminuir con la aplicación adecuada de fungicidas (Wegulo et al., 2011).

Los fungicidas inhibidores de la desmetilación (DMI), como el tebuconazol, procloraz, metconazol o la mezcla de prothioconazol y tebuconazol han mostrado ser efectivos contra esta enfermedad (Blandino et al., 2006; Lechoczki-Krsjak et al., 2008). Estos fungicidas han sido usados en agricultura de forma exitosa desde los años 70. Diversos estudios demuestran la efectividad del tebuconazol contra *Fusarium* spp. (Mesterhazy et al., 2003; Müllenborn et al., 2008). Sin embargo, dada la aplicación extensiva de los DMI para el control de numerosas enfermedades de los cultivos, se han evidenciado

casos de resistencia al uso en varios hongos patógenos humanos y de sensibilidad disminuida en fitopatógenos, incluyendo *F. graminearum* (Liu et al., 2010). El modo de acción de los fungicidas como el tebuconazol, es el bloqueo de la vía de síntesis del ergosterol, esterol esencial para mantener la fluidez y estabilidad de la membrana celular en hongos, por inhibición de la enzima C14- α -desmetilasa de lanosterol codificada por el gen *cyp51* (Brent & Hollomon, 1995).

Los mecanismos moleculares responsables de la resistencia o disminución de la sensibilidad a fungicidas del tipo DMI, han sido estudiados para varios hongos. Se han propuesto tres mecanismos principales. Un mecanismo posible sería la ocurrencia de mutaciones en el gen *cyp51*, lo que llevaría a alteraciones en la estructura proteica de la enzima en posiciones clave, reduciendo así la afinidad de unión por el fungicida (Luo & Schnabel, 2008). El segundo mecanismo propuesto es la sobreexpresión del gen *cyp51* (Ma et al., 2006). El tercer mecanismo de resistencia implica un aumento de eflujo dependiente de energía, de forma que la concentración intracelular del fungicida nunca llega a niveles tóxicos para el hongo (Nakaune et al., 1998). El mecanismo exacto de disminución de la sensibilidad de *F. graminearum* a los DIMs no está claro aún. Sin embargo mediante el uso de métodos de Análisis Profundo Serial de Expresión Génica (Deep SAGE) y PCR en tiempo real. Liu et al. (2010) estudiaron la respuesta de *F. graminearum* al fungicida tebuconazol. Comparando la expresión de los genes en *F. graminearum* tratados y no tratados con el fungicida, los autores identificaron 324 genes que mostraron un aumento y 155 que presentaron un decremento significativo en su expresión. Los genes identificados pertenecen a distintas familias génicas y están involucrados en diversos procesos como biosíntesis de esteroides además de genes involucrados en la respuesta al estrés oxidativo. De los genes sobreexpresados en presencia de tebuconazol sólo uno, el gen FGSG09697, se correspondió en secuencia a un transportador de eflujo putativo (Liu et al., 2010).

Más recientemente, la implementación de modelos de predicción de FHB y/o contaminación con DON, han contribuido al manejo racional de la fusariosis con fungicidas. Estos modelos consideran aspectos como cultivos previos, manejo del suelo y rastrojo, susceptibilidad de cultivares, período de antesis, combinado con factores ambientales como temperatura y humedad relativa para predecir el riesgo de ocurrencia de FHB y de acumulación de DON en los cultivos (Wegulo et al., 2011). Desde el año 2004 está disponible para Uruguay un modelo (DONcast) de predicción de niveles de DON en granos de trigo a cosecha operado por INIA (Pereyra & Dill-Macky, 2010).

Este modelo permite un uso más eficiente de los métodos químicos de control de fusariosis, reduciendo su impacto económico y ecológico (Mazzilli et al., 2011).

Por tanto, manejo integrado es sin duda la mejor estrategia para controlar FHB. Esto incluye la resistencia del huésped, la aplicación de fungicidas, la rotación de cultivos, el manejo de residuos y los modelos de predicción. La combinación de al menos dos de estas estrategias, disminuye significativamente las pérdidas por FHB (Willyerd et al., 2011).

1.8 Situación actual y monitoreo de especies causantes de FHB en trigo en Uruguay

Durante muchos años el área de producción de trigo estuvo restringida a la zona oeste del país, en especial a departamentos sobre el Río Uruguay. Sin embargo, recientemente la producción se ha extendido al este y noreste, ocupando territorios de los departamentos de Rivera, Cerro Largo y Lavalleja (Ernst, 2011). A pesar de la importancia del cultivo existen pocos datos sobre la diversidad de especies y quimiotipos del FGSC en Uruguay y en particular no existen datos sobre la diversidad de FGSC en estas nuevas zonas de producción. Dado que se ha encontrado predominancia de ciertos quimiotipos en distintas regiones y variaciones en la distribución geográfica (Aoki, 2012; Xu & Nicholson, 2009) y a nivel de especificidad de huésped de las especies del FGSC a nivel mundial (Boutigny et al., 2011; Lee et al., 2009; Sampietro et al., 2011), se plantea como necesario el estudio de dichos patógenos en las nuevas zonas de producción en comparación con zonas tradicionales.

Hasta ahora en nuestro país, la cuantificación e identificación de estos patógenos se ha basado principalmente en los métodos convencionales de aislamiento a partir de granos e identificación por características fenotípicas. Estos métodos requieren una gran experiencia y entrenamiento, e insumen mucho tiempo (Fredlund, 2008). Asimismo, la cuantificación de los niveles de DON en granos se realiza mayoritariamente mediante kits de ELISA, los cuales no sólo no contemplan la existencia de derivados acetilados sino que no cuantifican NIV (Tangni et al., 2010).

Esta tesis plantea el estudio de la diversidad de patógenos causantes de fusariosis de trigo en las diferentes zonas del país y el desarrollo de métodos que permitan realizar monitoreos periódicos para determinar la evolución de la situación.

2. OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la diversidad de hongos causantes de fusariosis en la espiga de trigo en diferentes zonas de producción en Uruguay y desarrollar herramientas de análisis para la determinación de su presencia en granos de trigo cosechados.

Objetivos específicos

- a) Aislar, identificar a nivel de especie y caracterizar según quimiotipo, cepas de *Fusarium* provenientes de granos de trigo de diferentes zonas de producción del país, utilizando métodos moleculares.
- b) Poner a punto técnicas moleculares sencillas que permitan la diferenciación de las especies del FGSC más comúnmente encontradas en Uruguay.
- c) Caracterizar los aislamientos de acuerdo a su sensibilidad al fungicida tebuconazol.
- d) Poner a punto métodos de análisis químico que permitan cuantificar en los granos, las micotoxinas (tricotecenos B: deoxinivalenol, nivalenol, 15-acetildeoxynivalenol y 3-acetildeoxynivalenol y de zearalenona) producidas por estos patógenos.
- e) Poner a punto técnicas de PCR en tiempo real para la cuantificación de hongos productores de tricotecenos en granos contaminados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Aislamiento, identificación y caracterización de hongos pertenecientes al complejo de especies *Fusarium graminearum*

3.1.1 Muestras de trigo

Todos los aislamientos fueron obtenidos a partir de muestras de trigo de distintas regiones de Uruguay. Las muestras de la cosecha 2002 (año de fusariosis severa) (Pereyra, 2003a) fueron proporcionadas por el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) y por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Las muestras correspondientes a las cosecha 2009 (año de fusariosis moderada) (Plan Nacional de Silos y Dirección General de Servicios Agrícolas, 2010) fueron tomadas por el INIA y por la Cooperativa Agraria Nacional (COPAGRAN). Las muestras de la cosecha 2011 (año de fusariosis leve) (Bogliacini et al., 2012) y 2012 (grado de fusariosis elevado) (web Grupo Trigo <http://www.grupotrigo.com.uy/1608/datos-zafra-2011-12-mesa-de-trigo>, 2013) del departamento de Cerro Largo y Lavalleja fueron obtenidos a partir de muestras de trigo de productores individuales de dicho departamento. Las muestras de trigo del departamento de Montevideo fueron cedidas por Facultad de Agronomía-UdelaR.

3.1.2 Aislamiento de cepas de *Fusarium* a partir de muestras de granos contaminados

Se realizaron aislamientos de muestras de trigo obtenidas de diferentes regiones del país, en los años 2009, 2011 y 2012. Los granos de cada muestra se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio (0,5%), se enjuagaron dos veces en agua destilada estéril y se secaron sobre toallas de papel estéril. Posteriormente se colocaron, a razón de 20 granos por placa, en placas de Petri conteniendo en medio Agar Papa Dextrosa (PDA, Oxoid) con 34 µg/ml de cloranfenicol y 1 mg/ml de pentacloronitrobenzeno (PCNB, Sigma-Aldrich) y se incubaron a 25 °C en oscuridad

Estrategias para la identificación y caracterización de patógenos causantes de fusariosis en trigo

por 4 a 6 días. Las colonias que mostraron características macro y microscópicas de *Fusarium graminearum* fueron subcultivadas en placas de PDA y se realizaron cultivos monospóricos de las mismas mediante suspensión de esporas en agua-Tween 20 al 0,1% y siembra de diluciones apropiadas en placas de PDA. Posteriormente se realizó la identificación morfológica de los aislamientos según Leslie & Summerell (2006), seguida de la identificación molecular de los mismos. En la **Figura 8** se esquematiza el proceso de aislamiento y análisis de las muestras de trigo.

Los aislamientos representativos de las cosecha 2002 y 2009 fueron ingresados a la colección del Servicio de Investigación Agrícola (ARS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), Peoria, Illinois, USA, asignándoseles números NRRL que identifican a las cepas de dicha colección.



Figura 8. Esquema del proceso de aislamiento de *Fusarium graminearum* a partir de muestras de trigo.

3.1.3 Extracción de ADN

Los aislamientos de cultivos monospóricos identificados morfológicamente como *Fusarium graminearum* fueron subcultivados en frascos de 20 ml conteniendo 5 ml de medio líquido Extracto de levadura-Sacarosa (YES) e incubados por 5 días sin agitación en oscuridad a 25°C.

La extracción del ADN genómico se realizó en base al protocolo de Voigt et al. (1999), con modificaciones. Los micelios crecidos fueron secados utilizando un embudo Büchner o papel de filtro estéril. Aproximadamente el 50% del micelio obtenido se colocó en un tubo Eppendorf. Se adicionaron 600 µl de buffer de lisis con bromuro de cetiltrimetilamonio (buffer CTAB) y se homogeneizó mediante pipeteo secuencial. La mezcla de micelio-buffer CTAB se incubó a 65°C por 30 minutos a 1 hora pipeteando varias veces. Se adicionaron 600 µl de cloroformo y se centrifugó a velocidad máxima; posteriormente se removió la fase acuosa superior conteniendo el ADN y se le adicionaron 400 µl de isopropanol frío para precipitar el ADN. Se incubó por 20 minutos en el freezer a -20°C. A continuación se centrifugó a máxima velocidad 10 minutos, se removió el sobrenadante y se lavó el pellet con 600 µl de etanol 70% (EtOH 70%). Luego de centrifugar nuevamente, se secó el pellet en estufa a 37°C aproximadamente 10 min y se resuspendió en 100µl de agua MilliQ estéril libre de DNasa.

La calidad del ADN genómico se visualizó mediante geles de agarosa 0,8% (Amresco, USA) en Buffer TBE 0,5X. con bromuro de etidio incorporado como indicador, a una concentración final de 0.5 µg/ml o tinción post corrida con GelRed™ 3x (Biotum Inc., USA). El gel se reveló bajo una lámpara UV (Sambrook et al., 1989). Las muestras se sembraron utilizando el buffer de carga Loading Dye 6x (Thermo Scientific, USA). Los geles se corrieron a un voltaje constante de 100 V. La concentración de ADN de las extracciones se determinó mediante medidas de fluorescencia realizada con el Kit de fluorescencia Quant-iT ds DNA BR (Invitrogen, California, USA) en un fluorímetro Qubit (Invitrogen, California, USA).

3.1.4 Caracterización molecular de aislamientos nativos de *Fusarium* por MLGT

La identificación a nivel de especie y quimiotipo fue realizada mediante el ensayo de multilocus genotyping (MLGT) utilizando un Citómetro de flujo Luminex 100

Estrategias para la identificación y caracterización de patógenos causantes de fusariosis en trigo

(Luminex Corporation, Austin, TX) siguiendo el protocolo descrito por Ward et al. (2008). Este ensayo consiste en la amplificación por PCR multiplex de seis genes, seguida de la extensión alelo específica (ASPE) de dichos productos, con 45 sondas que permiten diferenciar especies y quimiotipos (Yli-Mattila et al., 2009). Los productos de la extensión se hibridan posteriormente con microesferas de poliestireno marcadas con una combinación de fluoróforos (uno de emisión en el rojo y el segundo en el infrarrojo (IR)) que tiene acopladas secuencias blanco específicas para los alelos amplificados (Figuras 9 y 10).

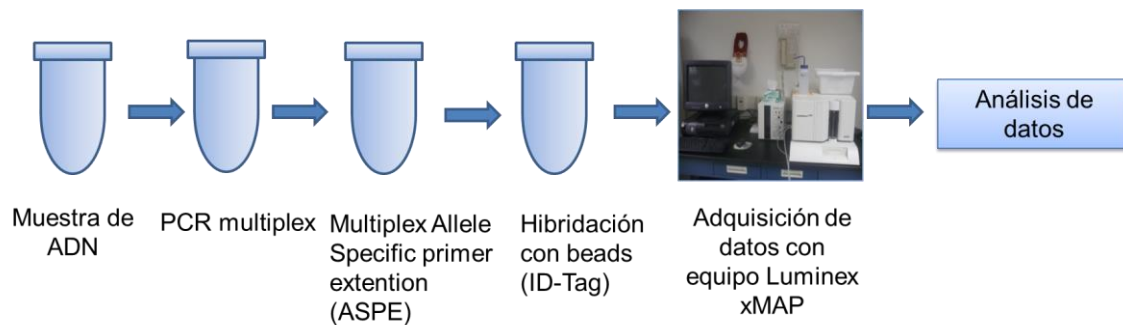


Figura 9. Esquema de los pasos necesarios para la realización del ensayo de MLGT.

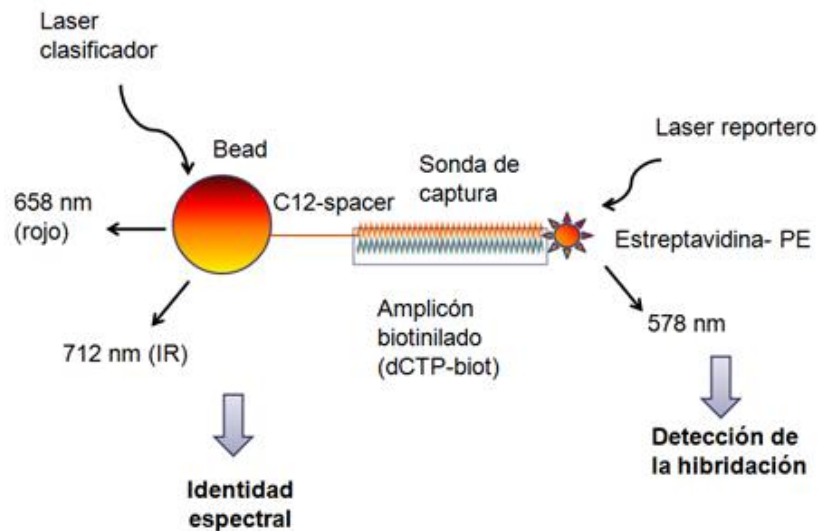


Figura 10. Esquema de la partícula fluorescente xMAP con sonda de hibridación y amplicón biotinilado (uso de dCTP-biotina durante la reacción de amplificación). Con una estrella se marca la unión a Estreptavidina-ficoeritina (Estreptavidina-PE). La identidad espectral se determina por la combinación particular de fluoróforos (mezcla de fluoróforos característicos de cada partícula específica de alelo) de emisión a 658nm (rojo) y a 712nm (IR). La hibridación se detecta a la longitud de emisión de la ficoeritina, 578 nm. Tomado y adaptado de <http://www.MiraiBio.com>.

La detección de los productos se realizó utilizando un citómetro de flujo Luminex 100 (Luminex Corporation, Austin, TX) mediante el programa Luminex Data Collection Software, versión 1.7.69-SP1 (Luminex Corporation Austin, TX).

Luego de determinada la especie y quimiotipo de cada uno de los aislamientos, se realizó el análisis estadístico de las diferencias en composición de la población de las distintas regiones y de los distintos años de aislamiento, mediante el test de contingencia de Fisher, utilizando el programa GraphPad Quickcals, disponible de forma libre en la web (<http://graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm>).

3.1.5 Secuenciación

Los aislamientos que no pudieron ser identificados a nivel de especie por el ensayo de MLGT fueron analizados por secuenciación de un fragmento del gen del factor de elongación de la transcripción 1α (TEF1- α). Las reacciones se llevaron a cabo en el laboratorio del Dr. Todd Ward del Agricultural Research Service del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Se emplearon juegos de primers específicos, de forma de obtener secuencias en ambos sentidos. La corrección y el alineamiento de secuencias se realizaron utilizando el programa Sequencher 5.1 (Gene Codes Corporation). Se determinó la identidad de los aislamientos mediante el uso de la herramienta de búsqueda BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) frente a las secuencias depositadas en la base de datos Fusarium ID (<http://isolate.fusariumdb.org/index.php>).

3.1.6 Ensayo de sensibilidad al fungicida Tebuconazol

La sensibilidad al tebuconazol fue cuantificada determinando la concentración de tebuconazol que causó la inhibición del 50% del crecimiento micelial (concentración efectiva 50: CE50) para cada aislamiento (Becher et al., 2010; Tateishi et al., 2010). Los aislamientos se crecieron en placas de Petri con el medio PDA por cinco días en oscuridad. Se tomaron discos de micelio de 5 mm de diámetro de cada aislamiento y se colocaron en el centro de placas de PDA con diferentes concentraciones (0, 0.25, 1, 2 y 4 ppm) de fungicida Folicur 25 EW (Bayer Alemania). Las placas fueron incubadas

por 5 días a 25°C. Se midieron los diámetros de crecimiento y para cada concentración de fungicida se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial respecto al control negativo sin tebuconazol. La CE50 se determinó mediante regresión lineal a partir de los gráficos de Probit de la transformada del porcentaje de inhibición en función del logaritmo de la concentración de fungicida (Becher et al., 2010). Los ensayos fueron realizados por duplicado. El análisis estadístico de datos, comparando aislamientos del quimiotipo NIV vs. aislamientos del quimiotipo 15ADON y la comparación entre especies, se realizó utilizando el test de rangos de Mann Withney Wilcoxon (MWW) (<http://elegans.som.vcu.edu/~leon/stats/utest.html>).

3.1.7 Análisis de estructura poblacional por número variable de repetidos en tándem (VNTR)

Para el análisis de la estructura poblacional de los aislamientos de FGSC, se analizaron nueve marcadores de Número Variable de Repetidos en Tandem (VNTR) descritos previamente por Suga et al. (2004). Los primers de sentido directo (“forward”) fueron sintetizados con marcadores fluorescentes (Applied Biosystems) y la amplificación fue realizada en tres reacciones multiplex, siguiendo el protocolo descrito por Ward et al. (2008). Los productos fueron analizados utilizando un analizador ABI3100 Genetic Analyzer with GENESCAN 3.7 y el software GENOTYPER 3.7 software (Applied Biosystems). Los valores de diversidad génica (Nei, 1987) y los valores de distancia genética basada en índices de fijación F_{ST} (Cockerham & Weir, 1984; Michalakis & Excoffier, 1996) fueron calculados utilizando el software ARLEQUIN 3.5 (Excoffier et al., 2005). La estimación de los valores de F_{ST} pareados fue realizada basada en el número de alelos diferentes, y la significancia estadística (Michalakis & Excoffier, 1996) de las estimaciones de F_{ST} pareados fue determinada utilizando un test de permutación con 10000 permutaciones. Además se compararon las poblaciones uruguayas con poblaciones aisladas en la provincia de Buenos Aires en el año 2003 de la colección del laboratorio de la Dra. Sofía Chulze de la Universidad de Rio Cuarto, Argentina, depositada en el Servicio de Investigación Agrícola (ARS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), Peoria, Illinois, USA.

3.2 Desarrollo de técnicas moleculares sencillas para identificación y tipificación

3.2.1. Identificación

Para determinar la pertenencia al FGSC y específicamente a la especie *F. graminearum*, de aislamientos obtenidos de granos de trigo, con características morfológicas atribuibles al FGSC, se desarrolló un método sencillo realizable en un laboratorio básico de biología molecular, consistente en varias etapas.

3.2.1.1 Determinación de la identidad de los aislamientos como pertenecientes al FGSC, mediante PCR con primers específicos para *F. graminearum*

Para las reacciones de PCR se utilizó como molde el ADN genómico obtenido según el protocolo antes descrito (sección 3.1.3). Se empleó primer directo (forward) Fg11F (5'CTCCGGATATGTTGCGTCAA 3') y como reverso Fg11R (5'GGTAGGTATCCGACATGGCAA 3') (Nicholson et al., 1998). Las reacciones se realizaron en un volumen de 25 µl, conteniendo 200 µM de una mezcla de dNTPs (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), 0.5 µM de cada primer, 1 ng de DNA molde y 2 unidades (U) de enzima DreamTaq DNA polimerasa (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) en buffer de enzima con MgCl₂. Se llevó a volumen final con agua destilada libre de DNasa/RNasa (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Se utilizó una temperatura de desnaturalización inicial de 95°C por un minuto, realizándose 40 ciclos, cada uno de 1 minuto a 94°C (desnaturalización), 30 segundos a 60°C (hibridación o annealing) y 1 minuto a 72°C (extensión). Se permitió la extensión final por 10 minutos a 72°C. Para ello se utilizó un termociclador Labnet MultiGene II Thermal Cycler (Labnet International Inc., USA). La amplificación fue corroborada mediante geles de agarosa como se explica en el apartado 3.1.3. Los tamaños de los productos de PCR obtenidos fueron estimados por comparación con un marcador de peso molecular (GeneRuler™ 1Kb Plus DNA Ladder y GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) (**Anexo 3**).

3.2.1.2 Diseño *in silico* de un método de PCR-RFLP para la diferenciación de las especies del FGSC más comúnmente encontradas en Uruguay

Se realizó el análisis *in silico* de secuencias del gen TEF-1 α correspondientes a especies del FGSC aisladas en Uruguay y en otros países de América Latina. En primer lugar, mediante el programa MEGA 5 (Tamura et al., 2011) se alinearon las secuencias correspondientes a las distintas especies, obtenidas de la base de datos FUSARIUM-ID (<http://isolate.fusariumdb.org/index.php>). Se determinaron los sitios variables y utilizando el programa Webcutter 2.0 (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>), se buscaron las enzimas que permitieran diferenciar las especies más comúnmente halladas en nuestro país.

3.2.2 Ensayos de validación del método de RFLP

El método desarrollado se validó empleando cepas de colección pertenecientes al FGSC como controles. Las cepas utilizadas forman parte de la colección del Agricultural Research Service del Departamento de Agricultura de los estados Unidos (USDA, NRRL Collection) y fueron cedidas por el Dr. Kerry O'Donnell de dicho centro. Las especies analizadas fueron las siguientes: *F. graminearum* (NRRL 31084 y autóctona), *F. austroamericanum* (NRRL 2903 y autóctona), *F. cortaderiae* (NRRL 29297 y autóctona), *F. asiaticum* (NRRL 13818 y autóctona), *F. boothii* (NRRL 26916), *F. brasiliicum* (NRRL 31281), *F. meridionale* (NRRL 28436), *F. gerlachii* (NRRL 36905), *F. louisianense* (NRRL 54196), *F. ussurianum* (NRRL 45665), *F. vorosii* (NRRL 37605), *F. nepalense* (NRRL 54220), *F. acaciae-mearnsii* (NRRL 26752), *F. mesoamericanum* (NRRL 25787), *F. aethiopicum* (NRRL 46710), *Fusarium sp.* (NRRL 34461) y como control negativo una cepa no perteneciente al FGSC, *Fusarium roseum* (NRRL 6470).

3.2.2.1 Amplificación por PCR del gen del factor de elongación de la transcripción (TEF-1 α)

Para las reacciones de PCR se utilizaron como molde el ADN genómico obtenido según el protocolo antes descrito (sección 3.1.3). Se utilizó el primer directo EF1(5'-ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC-3') y como reverso EF2 (5'-GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT-3') (Geiser et al., 2004). Las reacciones se realizaron en un volumen de 25 μ l, conteniendo 200 μ M de una mezcla de dNTPs

(Thermo Fisher Scientific Inc., USA), 0.5 μM de cada primer, 1 ng de DNA molde y 2 U de enzima DreamTaq DNA polimerasa (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) en buffer de enzima con MgCl_2 . Se llevó a volumen final con agua destilada libre de DNasa/RNasa (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). La temperatura de anillado (annealing) se optimizó previamente en un termociclador Corbett CG1_96 con gradiente de temperatura (Corbett Research, Sydney, Australia), ensayándose entre 50 y 60°C. Las condiciones óptimas de reacción fueron: desnaturalización inicial a 95°C por cuatro minutos seguido de 35 ciclos, cada uno de 1 minuto a 94°C (desnaturalización), 30 segundos a 55°C (hibridación o annealing) y 90 segundos a 72°C (extensión). Se permitió la extensión final por 10 minutos a 72°C. Se utilizó un termociclador Labnet MultiGene II Thermal Cycler (Labnet International Inc., USA). La amplificación fue corroborada mediante geles de agarosa como se explicó en el apartado 3.1.3. Los tamaños de los productos de PCR obtenidos fueron estimados por comparación con un marcador de peso molecular (GeneRuler™ 1Kb DNA Ladder y GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) (**Anexo 3**).

3.2.2.2 Corte con enzimas de restricción

Para determinar el patrón de restricción de los fragmentos del gen TEF-1 α se utilizó por un lado la enzima BsaHI (New England Biolabs Inc., USA) y por otro la enzima TruI (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). En todos los casos se siguieron las temperaturas y tiempos de incubación establecidos para cada enzima por el fabricante. Se emplearon buffers de reacción adecuados para cada enzima. Se utilizó un mínimo de 1 U de enzima por cada μg de ADN a digerir. Las incubaciones se llevaron a cabo en baño de agua termostaticado.

Los fragmentos de restricción fueron resueltos mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (Laboratorios Conda, Madrid, España) en buffer TBE 0,5x, con bromuro de etidio como indicador, a una concentración final de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El gel se reveló bajo una lámpara UV (Sambrook et al., 1989). Los tamaños de los productos de restricción obtenidos fueron estimados por comparación con un marcador de peso molecular (GeneRuler™ 1Kb DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) (**Anexo 3**).

3.2.3 Tipificación

En base al método descrito por (Ward et al., 2002) y (Starkey et al., 2007) se puso a punto un ensayo de PCR Multiplex para determinar los quimiotipos de los aislamientos de FGSC. Se utilizaron los primers específicos diseñados para diferenciar quimiotipos individuales en base al gen de la enzima 15-O-acetyltransferasa (TRI3). La reacción incluye el primer directo común a todos los quimiotipos: 3CON (5'-TGGCAAAGACTGGTTCAC-3'), y tres primers reversos específicos de quimiotipo: 3NA(5'-GTGCACAGAATATACGAGC-3') para el quimiotipo NIV, que amplifica un fragmento de 840pb, 3D15A (5'ACTGACCCAAGCTGCCATC-3') para el quimiotipo 15ADON, que amplifica un fragmento de 610 pb, y 3D3A (5'CGCATTGGCTAACACATG-3') específico para el quimiotipo 3ADON, que amplifica un fragmento de 243pb. Asimismo se realizó el ensayo de PCR multiplex para quimiotipos del gen de la bomba de eflujo de tricotecenos TRI12. Dicha reacción incluye el primer directo común a todos lo quimiotipos 12CON (5'-CATGAGCATGGTGATGTC-3') y los primers reversos específicos 12NF (5'-TCTCCTCGTTGTATCTGG-3') que amplifica un fragmento de 840 pb en el caso del quimiotipo NIV, 12-15F (5'-TACAGCGGTCGCAACTTC-3') para el quimiotipo 15ADON, que amplifica un fragmento de 670 pb y 12-3F (5'-CTTTGGCAAGCCCGTGCA-3') para el quimiotipo 3ADON, que amplifica un fragmento de 410pb. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 10 µl en buffer Ampli Taq PCR (Invitrogen, California , USA), 2 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 0.2 µM de cada primer y 0.5 U de AmpliTaqDNAPolymerasa (Invitrogen, California, USA) y 100 ng de ADN genómico. Las condiciones de amplificación fueron: 5 minutos a 94 °C, seguido de 25 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos 52°C y 1 minuto a 72°C. Los productos de amplificación fueron resueltos en geles de Agarosa al 0,8% como se explica en el apartado 3.1.3.

3.3 Análisis de Micotoxinas presentes en muestras de trigo

3.3.1 Análisis de Micotoxinas por cromatografía líquida de alta resolución y detección por espectrometría de masa tandem (HPLC-MS/MS)

3.3.1.1 Estándares y solventes

Para la puesta a punto del ensayo se utilizaron estándares liofilizados de micotoxinas NIV, DON, 3ADON, 15ADON y ZON (Sigma-Aldich, Munich), reconstituidas en acetonitrilo y conservadas a 4°C en oscuridad.

Los solventes utilizados como fase móvil y en la extracción fueron (metanol y acetonitrilo calidad HPLC) provistos por J.T. Baker (Deventer, The Netherlands).

3.3.1.2 Estudio de los patrones de fragmentación de los iones

Para estudiar la energía óptima de fragmentación necesaria para identificar las diferentes micotoxinas, principalmente los isómeros 3ADON y 15ADON, en base a su patrón de MS/MS, se realizaron ensayos de inyección directa de estándares en un equipo Esquire 6000 (Bruker Daltonics, Alemania). Se ensayaron soluciones de 5ppm de las micotoxinas NIV, DON, 3ADON, 15ADON y ZON en buffer conteniendo 5mM de acetato de amonio. Se graficaron las intensidades relativas de los iones fragmentos (I%) en función de la energía utilizada (“Energy-Resolved Ionization Curves”).

3.3.1.3 Separación de toxinas por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para la separación de las micotoxinas por cromatografía líquida de alta resolución se utilizaron las columnas analíticas de fase reversa Zorbax Eclipse XDB-C18 (2,1 x150 mm, 5 µm), y Zorbax Eclipse 5B-C18 (2,1x30 mm, 3.5 µm), Agilent Technologies (Palo Alto, California). Se ensayaron los estándares de micotoxinas (500 ppb) por separado y una mezcla de micotoxinas (500 ppb de cada una). Las corridas se llevaron a cabo a 30°C usando como fase móvil una mezcla 12/88 (v/v) de MeOH/acetato de amonio 5 mM.

Se utilizó también una columna Luna 3u C18 100 (100 x 3.0 mm, 3 µm) Phenomenex (Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA). Las corridas cromatográficas en este caso se llevaron a cabo con la columna a 35°C. La fase móvil consistió en ácido acético (0.1% en agua ultrapura) (A) y acetonitrilo (B). El método cromatográfico consistió en un

Estrategias para la identificación y caracterización de patógenos causantes de fusariosis en trigo

gradiente en dos etapas, primero de 30% de (B) por 7 min, seguido de una etapa isocrática de 50% de (B) por 4 min, con un flujo de 0.1 ml/min.

La detección y análisis de micotoxinas fue realizado de acuerdo a los métodos desarrollados por Berthiller y Sulyok Berthiller et al. (2005), Sulyok et al. (2007), con modificaciones. Se utilizó para la separación un equipo de HPLC 1200 Series, Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania) acoplado a un espectrómetro de masa de tipo trampa de iones, Esquire 6000, con ionización electrospray (Bruker Daltonik GmbH) o un equipo MicroQToF de alta resolución (Bruker Daltonik GmbH) como detector. Los análisis se realizaron en modo SRM (Selected Reaction Monitoring) para iones positivos o negativos, según el analito. Las condiciones generales del electrospray fueron las siguientes: “endplate off set voltaje” 500 V, “capillary voltaje” 4000 V, nebulización con nitrógeno a 40 psi, secado con nitrógeno a un flujo de 9.0 l/min y una temperatura de 350°C.

3.3.1.3 Extracción de micotoxinas de la matriz trigo

Se fortificaron muestras de trigo no contaminado con micotoxinas (500 ppb, 1 ppm y 2 ppm de cada una y de una mezcla de micotoxinas) y se realizaron extractos de los mismos siguiendo el mismo procedimiento que para muestras de trigo contaminado (apartado 3.3.2). Los extractos se corrieron en las mismas condiciones detalladas anteriormente para los estándares de micotoxinas. Asimismo se realizaron extractos de trigo no contaminado con *Fusarium* (trigo blanco), las cuales fueron analizadas de forma de descartar la presencia de interferentes en la muestra.

3.3.2 Extracción de micotoxinas a partir de muestras de granos de trigo contaminados

Para la extracción de micotoxinas a partir de granos de trigo se utilizó el método descrito por Berthiller et al. (2005) con modificaciones. Se eligieron tres muestras representativas, dos tomadas en la zafra 2011 provenientes del departamento de Cerro Largo (CL1 y CL2) y una muestra de Young, departamento de Rio Negro, de la zafra 2009 (Young 1). Para realizar la extracción se molieron 100 g de granos por muestra, hasta lograr un polvo homogéneo. Se tomaron alícuotas de 0,5 g se incubaron con 2 ml de acetonitrilo:agua 84:16 v/v por 1 hora con agitación. Posteriormente se filtró el sobrenadante con filtro de papel. Los extractos se pasaron por una columna de clean-up

Mycosep 225 Trich (Romer Labs, Tulln, Austria) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se tomaron 2 ml de extracto purificado y se llevaron a sequedad en flujo de nitrógeno. Los extractos secos se resuspendieron en 400 µl de fase móvil (mezcla de acetonitrilo: ácido acético 1%).

3.4 PCR en tiempo real para la cuantificación de hongos productores de micotoxinas en muestras de trigo

Con el fin de determinar la contaminación fúngica en muestras de trigo, se pusieron a punto métodos para la cuantificación de la carga de *Fusarium* productores de tricotecenos en general, de nivalenol y de zearalenona en muestras de trigo por PCR en tiempo real. En cada caso se establecieron las condiciones de trabajo y se determinó la especificidad del método seleccionado. Luego se realizaron curvas estándar a partir de ADN extraído de cepas productoras seleccionadas en cada caso, determinándose la linealidad, el rango dinámico, el límite de detección y la eficiencia de cada método. Por último se determinó el efecto de la matriz (trigo) en los diferentes métodos desarrollados. Dichos métodos se utilizaron para analizar muestras de trigo nacionales.

3.4.1 Condiciones de amplificación por PCR en tiempo real para la cuantificación de la carga de *Fusarium* productores de tricotecenos

Para la determinación de la incidencia de *Fusarium* productores de tricotecenos en granos de trigo se utilizó el método descrito por Burlakoti et al. (2007), con modificaciones. El estudio se basó en la amplificación de un fragmento de 193 pb del gen que codifica la enzima tricodieno sintasa (TRI 5), la cual cataliza el primer paso en la síntesis de tricotecenos. Los primers específicos utilizados Tri5-Fw (5'-TCTTAACACTAGCGTGCGCCTTCT-3') y Tri5-Rev (5'-CATGCCAACGATTGTTTGGAGGGA-3'), fueron sintetizados por SBS Genetech Co., Ltd (Beijing, China). Las reacciones de PCR en tiempo real fueron realizadas empleando un termociclador Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Venlo, Holanda) en un volumen de 10 µl conteniendo 5 µl del reactivo Rotor-Gene SyBR Green RT-PCR Master Mix (Qiagen, Venlo, Holanda), 1 µl de cada primer de concentración 1 µM, 2 µL de agua MilliQ estéril y 1 µl de ADN de concentración adecuada, determinada por medidas de fluorescencia utilizando el Kit de fluorescencia Quant-iT ds DNA BR (Invitrogen, California, USA) en un fluorímetro Qubit (Invitrogen, California, USA). El

ciclo de amplificación consistió en un paso inicial de desnaturalización por 5 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos, cada uno de 5 segundos a 95°C, un paso de anillado-extensión de 10 segundos a 58°C y un paso de 5 segundos a 80°C donde se llevó a cabo la adquisición de fluorescencia. Este último paso constituyó una modificación del protocolo original de Burlakoti et al. (2007) y se realizó para evitar la interferencia de dímeros de primers en la medida. La especificidad de la reacción se estableció mediante curvas de desnaturalización o “melting” obtenidas graficando el opuesto de la derivada primera de la intensidad de fluorescencia respecto a la temperatura, en función de la temperatura, realizadas en el mismo aparato luego de cada corrida. En cada caso, la aparición de sólo un pico a una determinada temperatura de desnaturalización se tomó como determinante de especificidad.

3.4.2 Condiciones de amplificación por PCR en tiempo real para la cuantificación de la carga de *Fusarium* productores de nivalenol

Para la determinación de la incidencia de hongos del género *Fusarium* productores de nivalenol se utilizó el método de PCR en tiempo real basado en la amplificación de una región del gen TRI12 que codifica para la bomba de eflujo de tricotecenos. El diseño de primers se llevó a cabo utilizando el programa AlleleID® (Primer Biosoft) comparando las secuencias del gen correspondientes a productores de DON y de NIV. Las secuencias del gen TRI12 utilizadas para el diseño se obtuvieron de la base de datos del Genebank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>). Las mismas fueron alienadas y utilizadas por el programa para la búsqueda segmentos diferenciales entre los distintos quimiotipos. Asimismo el programa realizó el algoritmo BLAST para comparar los primers obtenidos con las bases de datos, de modo de corroborar la especificidad de los primers generados. Los primers diseñados fueron sintetizados por SBS Genetech Co. Ltd. (Beijing, China). Las condiciones óptimas de anillado con dichos primers se determinaron previamente por PCR convencional en un termociclador Corbett CG1_96 con gradiente de temperatura (Corbett Research, Sydney, Australia) utilizando la cepa F-117 quimiotipo NIV como control positivo y las cepas F-113 quimiotipo 15ADON y NRRL 36957 quimiotipo 3ADON como controles negativos. El rango de anillado probado fue entre 54 y 60°C. Dicho rango fue establecido en base a la temperatura de anillado sugerida por el programa Allele ID (54.7°C) y a las temperaturas de desnaturalización de los primers calculadas según la fórmula $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$

(Wallace et al., 1979) las cuales fueron 53,9°C y 53,7°C para los primers directo y reverso respectivamente. Asimismo se consideró la temperatura óptima de trabajo de la polimerasa utilizada (establecida por el fabricante) la cual es de 60°C. Se seleccionó la máxima temperatura a la cual hubo amplificación a partir del ADN molde de la cepa control positivo, pero no a partir de las cepas utilizadas como controles negativos.

Con los primers diseñados, se realizaron reacciones de PCR en tiempo real empleando un termociclador Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Venlo, Holanda), en un volumen de 10 µl conteniendo 5 µl de la mezcla Rotor-Gene SyBR Green RT-PCR Master Mix (Qiagen, Venlo, Holanda), 1 µl de cada primer de concentración 1 µM, 2 µl de agua MilliQ estéril y 1 µl de ADN de concentración adecuada, determinada con el Kit de fluorescencia Quant-iT ds DNA BR (Invitrogen, California, USA) en un fluorímetro Qubit (Invitrogen, California, USA). El ciclo de amplificación consistió en un paso inicial de desnaturalización por 5 minutos a 95°C, seguido por 35 ciclos, cada uno de 5 segundos a 95°C y un paso de anillado-extensión de 10 segundos a 54°C. La adquisición de fluorescencia se llevó a cabo en el último paso del ciclo. La especificidad del método se verificó utilizando como molde el ADN de las cepas tomadas como controles positivos y negativos.

3.4.3 Condiciones de amplificación por PCR en tiempo real para la cuantificación de la carga de *Fusarium* productores de zearalenona

Para el análisis de la presencia de productores de zearalenona se realizó un protocolo de PCR en tiempo real según Meng et al. (2010), utilizando primers específicos para una zona del gen que codifica para la enzima Poliquétido Sintaza 4 (PKS4). Los primers empleados fueron ZEAfw (5'-CGTCTTCGAGAAGATGACAT-3') y ZEARv (5'-TGTTCTGCAAGCACTCCGA-3'), sintetizados por SBS Genetech Co., Ltd (Beijing, China), que amplifican un fragmento de 280pb. Las reacciones de PCR en tiempo real fueron realizadas utilizando un termociclador Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Venlo, Holanda). Las reacciones se realizaron en un volumen de 10 µl conteniendo 5 µl de mezcla Rotor-Gene SyBR Green RT-PCR Master Mix (Qiagen, Venlo, Holanda), 1 µl de cada primer de concentración 1 µM, 2 µl de agua MilliQ estéril y 1 µl de ADN de concentración adecuada, determinada con el Kit de fluorescencia Quant-iT ds DNA BR (Invitrogen, California, USA) en un fluorímetro Qubit (Invitrogen, California, USA). El ciclo de amplificación consistió en un paso inicial de desnaturalización por 5 minutos a

95°C, seguido por 40 ciclos de 5 segundos a 95°C y un paso de anillado-extensión de 10 segundos a 60°C. La adquisición de fluorescencia se llevó a cabo en el último paso del ciclo.

3.4.3.1 Selección de cepas productoras de zearalenona

La capacidad de distintos aislamientos de producir la micotoxina zearalenona, se llevó a cabo *in vitro* siguiendo el protocolo de Vaamonde et al. (1987) con modificaciones. La producción se realizó en un matraz Erlenmayer de 500 ml conteniendo 20 g de arroz parboilizado, el cual se incubó previamente con agua destilada por 1 hora a temperatura ambiente y se esterilizó en autoclave a 121°C por 30 minutos. Como inóculos se utilizaron cultivos de 7 días crecidos en placas de PDA a 25°C. De cada cultivo se realizó una suspensión de conidias de concentración 10^5 conidias/ml en 5 ml de agua/Tween20 al 0,01% v/v estéril. Los matraces fueron inoculados con 1 ml de dicha suspensión e incubados a 25°C por dos semanas, seguido de 3 semanas a 15°C. Las cepas testeadas fueron: F-99, F-113 y F-119 de la especie *F. graminearum* quimiotipo 15ADON; F-109 y F-108 de la especie *F. asiaticum* quimiotipo NIV; F-111, F-117 y R 2.1 de la especie *F. cortaderiae* quimiotipo NIV y F-105 de la especie *F. acuminatum*.

Luego de la incubación, se tomaron 10 g de muestra y se le agregaron 40 ml de una mezcla acetonitrilo:agua:ácido acético en proporciones 79:20:1 v/v/v. La extracción de zearalenona se realizó por 90 minutos con agitación orbital a 220 rpm. Los extractos se filtraron con papel de filtro Whatman grado 1 (Whatman-GE Healthcare) y se guardaron en frascos ámbar a 4°C hasta su análisis.

Para la detección de la producción de zearalenona, se corrió una cromatografía de capa fina (TLC) utilizando placas de sílica gel precubiertas Polygram (Marcherey-Nagel GmbH., Alemania). Se sembró un 1 µl de una dilución 1 mg/ml en ACN del estándar de zearalenona (Sigma-Aldrich) y 5 µl de cada extracto. La TLC se corrió utilizando como fase móvil cloroformo:acetona en proporción 90:10 v/v. La presencia de zearalenona se visualizó bajo luz UV a 254 nm.

3.4.4 Curvas estándar

Para la construcción de curvas estándar de los distintos ensayos se emplearon diluciones seriadas en base 10 del ADN extraído de micelio de la cepa F-117 quimiotipo NIV productora de zearalenona *in vitro*. En cada caso se utilizaron los primers específicos y las condiciones de ciclado detalladas previamente. Se realizaron por duplicado las

amplificaciones en tiempo real de cada dilución, determinando el ciclo umbral (Ct) en cada caso. Para cada punto, se calculó el promedio y el intervalo de confianza ($\alpha = 0,05$) de los Ct determinados y se obtuvieron las curvas estándar graficando los Ct promedio en función del logaritmo de la concentración de ADN. Se determinó la linealidad de la curva y se utilizó la pendiente de la misma para determinar la eficiencia de la reacción según la siguiente ecuación Eficiencia = $[10^{(-1/pendiente)}]-1$ (Rasmussen, 2001). En la zona lineal se definió el límite de detección y el rango dinámico.

3.4.5 Análisis del efecto matriz

3.4.5.1 Extracción de ADN a partir de granos de trigo

La extracción de ADN a partir de granos de trigo se realizó según el protocolo “Maize Seeds Sampling and DNA Extraction - Report on the Validation of a DNA Extraction Method from Maize Seeds and Grains” del “Community Reference Laboratory for GM Food and Feed, 2008” (CRL-GMFF, 2008). A 200 mg de trigo molido contenido en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, se le agregaron 300 μ l de agua MiliQ estéril, se homogeneizó y se agregó 700 μ l de buffer CTAB y 10 μ l de solución de ARNasa de concentración 10mg/ml (**Anexo 1**). Se incubó a 65°C durante 30 minutos. Se agregaron 10 μ l de Proteínasa K de concentración 20 mg/ml (Thermo Fisher Scientific Inc. USA) y se incubó nuevamente a 65°C durante 30 minutos. Se centrifugó a 12000g durante 15 minutos y se trasvasó el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf conteniendo 500 μ l de cloroformo. Se mezcló por inversión y se centrifugó a 12000g durante 15 minutos. La fase acuosa superior se trasvasó a un nuevo tubo eppendorf y se agregaron dos volúmenes de la solución de precipitación CTAB (**Anexo 1**). Se incubó a temperatura ambiente durante una hora y se centrifugó a 12000g durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se disolvió en 350 μ l NaCl 1.2M (**Anexo 1**). Se agregaron 350 μ l de cloroformo, se mezcló por inversión y se centrifugó a 12000g durante 10 minutos. La fase acuosa superior se trasvasó a un nuevo tubo eppendorf y se agregó 0.6 volúmenes de isopropanol. Se mezcló por inversión y se incubó a -20°C durante toda la noche. Se centrifugó a 12000g durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 500 μ l de EtOH 70%, se mezcló, se centrifugó a 12000g por 10 minutos. El precipitado se secó en estufa a 45°C y se resuspendió en 100 μ l de agua MilliQ estéril

libre de DNasa/Rnasa (Thermo Fisher Scientific inc, USA). Se conservó a -20°C hasta su utilización.

3.4.5.2 Ensayo de efecto matriz

El efecto de la matriz de trigo para cada ensayo se estudió determinando los Ct correspondientes a 1 ng de ADN de micelio puro de la cepa F-117, solubilizado en distintas diluciones de matriz de trigo (extracción de ADN de trigo blanco no contaminados), contrastando los resultados con los obtenidos para las mismas diluciones de ADN fúngico realizadas en agua pura. Los ensayos se realizaron por duplicado y se determinaron los Ct promedio y los intervalos de confianza ($\alpha=0,05$) en cada caso. Para cada método, se determinó la mínima dilución de la muestra necesaria para no detectar interferencias de la matriz en la cuantificación del ADN fúngico presente. Se consideraron aceptables diferencias de hasta un 0,5 Ct entre el ADN fúngico diluido en agua y el mismo diluido en matriz (Cankar et al., 2006; Community Reference Laboratory for GM Food and Feed CRL-GMFF, 2004).

3.4.6 Análisis de muestras de trigo nacional

Para el análisis de muestras de trigo nacional por PCR en tiempo real, se eligieron dos muestras provenientes del departamento de Cerro Largo de la cosecha 2011 (CL1 y CL2) y una muestra del departamento de Colonia (localidad de Conchillas) (CN1) de la zafra 2009, representativas de la diversidad de cepas y quimiotipos encontrados en Uruguay. A partir de las muestras CL1 y CL2 se aislaron previamente cepas de *Fusarium* de los quimiotipos NIV y 15ADON, sin embargo en la muestra CN1 se aislaron mayoritariamente cepas del quimiotipo 15ADON.

3.4.6.1 Determinación del porcentaje de infección

El porcentaje de infección de las muestras de trigo nacional del departamento de Cerro Largo, se determinó sembrando en placas de PDA-PCNB-cloranfenicol, 100 granos de trigo desinfectados superficialmente y contando el número de granos en los cuales se constató la infección por *F. graminearum* (caracterización morfológica). El porcentaje de infección se expresó como número de granos infectados por cada 100 granos testeados.

3.4.6.2 Cuantificación de la contaminación por PCR en tiempo real

La cuantificación de la contaminación de granos de trigo por PCR en tiempo real se realizó siguiendo los protocolos descritos en las secciones 3.4.1, 3.4.2 y 3.4.3. De acuerdo a dichos protocolos, se estableció la dilución del ADN de las muestras, necesaria para evitar el efecto matriz. Las muestras de trigo fueron analizadas por triplicado. Paralelamente se llevaron a cabo extracciones de ADN, por triplicado, de forma de determinar la cantidad de ADN que se extrae a partir de 60 mg de micelio húmedo. Asimismo se determinó por secado de micelio la biomasa fúngica (peso de micelio seco) que corresponde a dicha cantidad de ADN.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento, identificación y caracterización de hongos pertenecientes al complejo de especies *Fusarium graminearum* (FGSC)

4.1.1 Aislamiento de hongos pertenecientes al complejo FGSC

El aislamiento de los hongos pertenecientes al FGSC se realizó siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.1.2. Se observó la presencia de colonias con características de *Fusarium*. Dichas colonias se observan con abundante micelio aéreo de coloración blanca y textura algodonosa y presentan pigmentación rojiza, tal como se observa en a **Figura 11**. Dado que en algunos casos los granos se encontraban contaminados con más de un género de hongos, todas las colonias que presentaron alguna característica macroscópica de *Fusarium* fueron analizadas a nivel microscópico (frescos). Se evaluó la presencia de macroconidias típicas, además del crecimiento característico en medio PDA, donde las especies del FGSC presentan reverso de colonia de color rojo característico (**Figura 11**).

Se obtuvieron un total de 48 aislamientos de muestras del año 2009 y 41 aislamientos de muestras de los años 2011 y 2012 (17 del departamento de Cerro Largo, 11 del departamento de Lavalleja y 13 de Montevideo). Asimismo, para la caracterización y análisis posterior, se incluyeron 62 aislamientos obtenidos en la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Química, a partir de muestras provistas por INIA y MGAP en el año 2002 (**Anexo 4**).

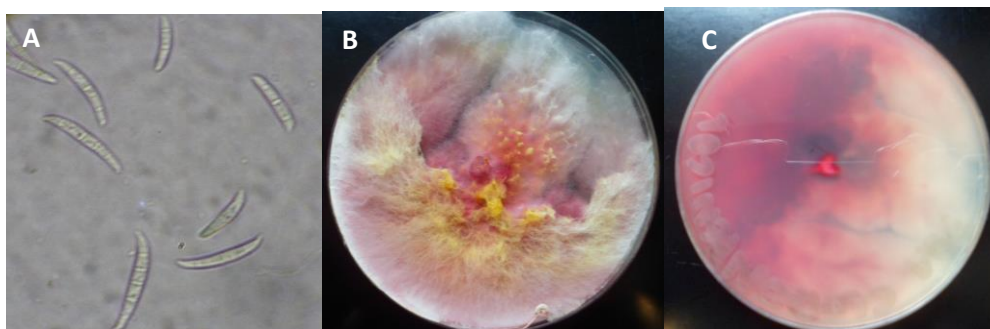


Figura 11. Caracterización macro y microscópica de *Fusarium graminearum*.
A: Micrografía de conidias de *F. graminearum* tomadas de con aumento 100x; B: colonia típica de *F. graminearum* en medio PDA derecho y (C) reverso de la placa.

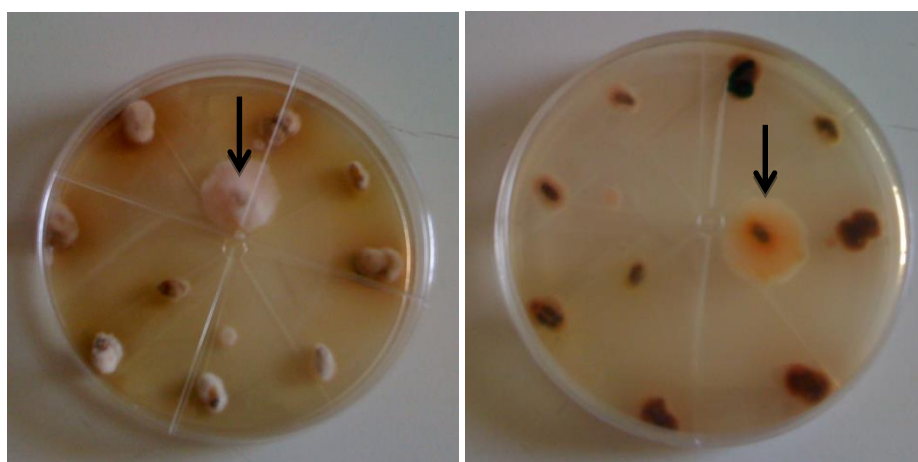


Figura 12. Imagen de una placa de PDA con fungicida PCNB, donde se sembraron granos de trigo contaminados, previa desinfección superficial.

Izquierda: Imagen superior de la placa. Derecha: reverso. Se observa crecimiento de varias colonias con características de *Fusarium*. Con una flecha se indica una colonia típica. El color oscuro del reverso de algunas colonias se corresponde a cultivos mixtos de *Fusarium* y *Alternaria sp.* o *Trichoderma sp.*

4.1.2. Caracterización de aislamientos por MLGT

Como primer etapa de trabajo se planteó la realización de un método molecular que permitiera diferenciar las especies pertenecientes al complejo *F. graminearum* asociadas a FHB en Uruguay. Para determinar las especies predominantes en nuestro territorio se realizaron aislamientos de muestras de trigo contaminadas, de distintas regiones, correspondientes a las zafra 2009, 2011 y 2012 (años de fusariosis moderada, leve y elevada respectivamente). Dichas muestras se analizaron conjuntamente con las muestras obtenidas previamente en nuestro laboratorio, en el año 2002 (62 aislamientos), zafra de fusariosis severa en Uruguay. En total se obtuvieron 151 aislamientos, los cuales fueron identificados a nivel de especie y quimiotipo por el

Estrategias para la identificación y caracterización de patógenos causantes de fusariosis en trigo

método de "Multilocus genotyping" (MLGT) (Ward et al., 2008). Los resultados mostraron una predominancia (N=130; 86%) de la especie *Fusarium graminearum*, mientras que los restantes aislamientos fueron identificados como *Fusarium asiaticum* (N=11), *Fusarium cortaderiae* (N=7), *Fusarium brasilicum* (N=2) y *Fusarium austroamericanum* (N=1). Con la excepción un único aislamiento de la especie *F. graminearum* (recolectado en el departamento de Soriano en la zafra 2002) que presentó el quimiotipo 3ADON, todos los aislamientos de dicha especie presentaron el quimiotipo 15ADON. Sin embargo todos los aislamientos de las especies *F. cortaderiae*, *F. asiaticum* y *F. brasilicum* presentaron el quimiotipo NIV. El único aislamiento de la especie *F. austroamericanum* (recolectado en el departamento de Paysandú en el año 2002) presentó el quimiotipo 3ADON. En la **Figura 13** se muestra la distribución de especies y quimiotipos aislados de trigo en Uruguay en las zafras estudiadas.

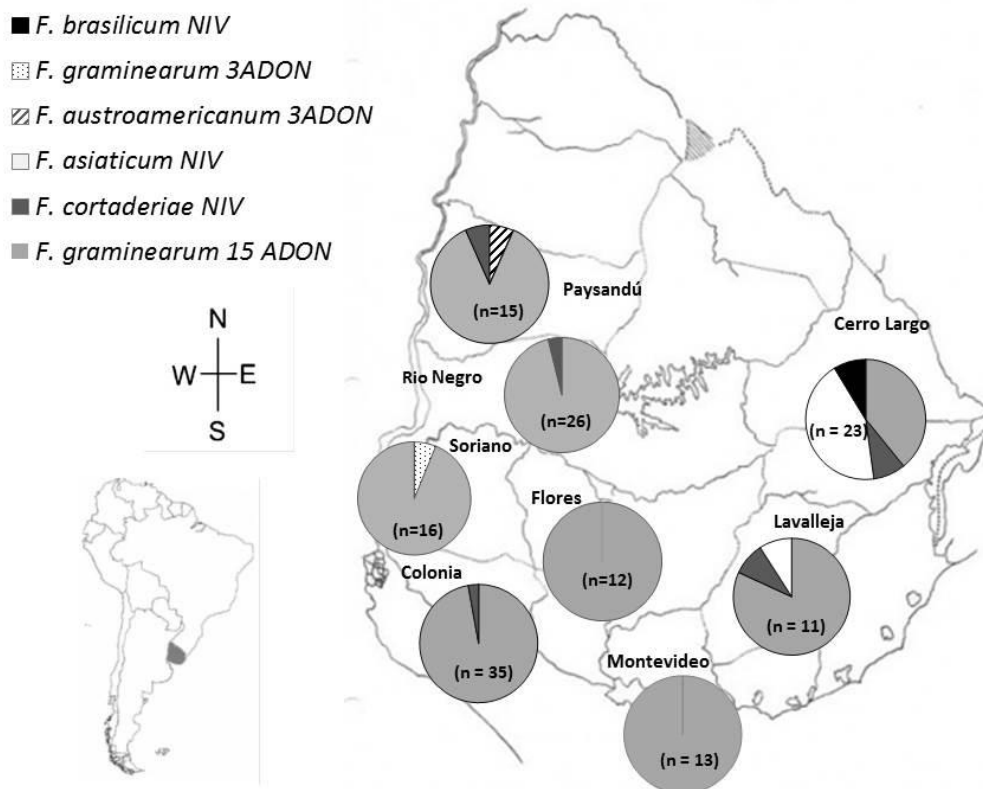


Figura 13. Distribución geográfica de las especies y quimiotipos de FGSC aislados de trigo en Uruguay en las zafras estudiadas (2002, 2009, 2011 y 2012).

Mediante el test de contingencia de Fisher, se analizaron las diferencias en composición de la población de especies y quimiotipos, comparando la región oeste del país con las nuevas áreas de producción del departamento de Cerro Largo. Asimismo, se analizó la

diferencia en composición entre los aislamientos del oeste y los del este (aislamientos de Cerro Largo sumados a aislamientos de Lavalleja). En ambos casos se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0.0001$). En los departamentos del oeste del país sumado al departamento de Montevideo, los aislamientos de la especie *F. graminearum* del quimiotipo 15ADON representan el 95% del total. Asimismo, en esta región del país se aislaron un total de cuatro *F. cortaderiae* del quimiotipo NIV, además de un único *F. austroamericanum* y un *F. graminearum*, ambos del quimiotipo 3ADON. Por otro lado, en la zona este, en concreto en el departamento de Cerro Largo, *F. asiaticum* representó un 43% de los aislamientos de esa zona y el quimiotipo NIV un 61%, siendo el predominante en dicha región. Dado que estas son nuevas zonas de producción en el país (Ernst, 2011), no contamos con aislamientos de dicho departamento previo al año 2009. Por otro lado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en composición de especies o quimiotipos entre poblaciones del oeste, comparando los años 2002 y 2009 (Test de Fisher, $P=0.3017$) (**Figura 14**).

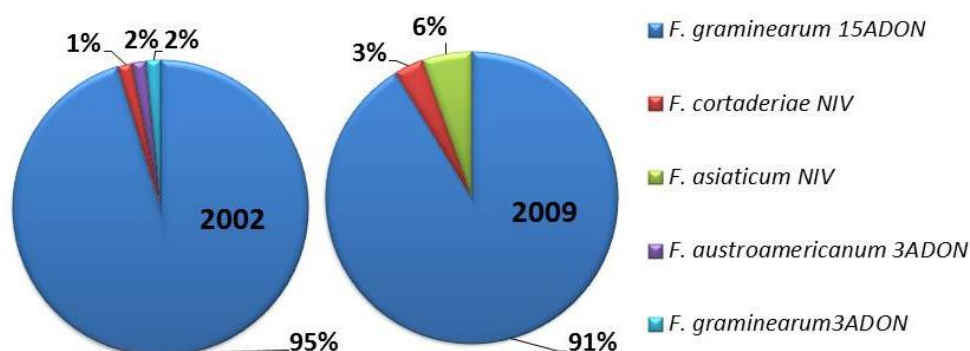


Figura 14. Comparación de composición de especies y quimiotipos entre los aislamientos de los departamentos del oeste del país en los años 2002 y 2009.

Los datos obtenidos permiten evidenciar una predominancia en Uruguay de la especie *F. graminearum* de quimiotipo 15ADON. Sin embargo, en el caso de las nuevas zonas de producción del departamento de Cerro Largo, la especie predominante fue *F. asiaticum* y el quimiotipo mayoritario NIV.

Estos datos sugieren la existencia en nuestro país de un 13% de especies posibles productoras de la micotoxina NIV (**Figura 15**), la cual no se analiza de rutina en muestras de trigo o harina.

Estrategias para la identificación y caracterización de patógenos causantes de fusariosis en trigo

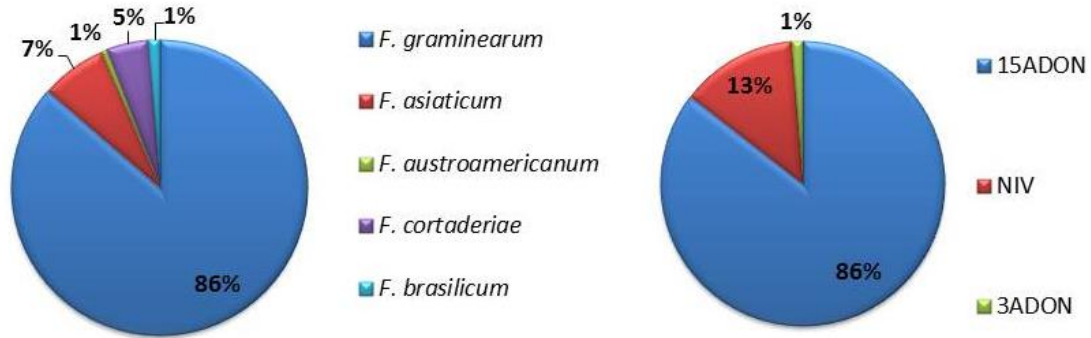


Figura 15. Composición de especies y quimiotipos del total de aislamientos obtenidos en las zafras analizadas. Panel izquierdo porcentaje de especies aisladas, panel derecho porcentaje de quimiotipos encontrados.

Fusarium graminearum y *Fusarium asiaticum* representan según Sarver et al. (2011a) las dos especies más importantes causantes de FHB a nivel mundial. Actualmente *F. graminearum* tiene una distribución panmundial (Sarver et al., 2011b) y puede presentar cualquiera de los tres quimiotipos descritos, pero se cree que se originó en América del Norte y forma parte del clado Norte-Americano, el cual incluye las especies *F. gerlachii* y *F. louisianense* (solo del quimiotipo NIV) descritas recientemente (Aoki, 2012) (**Tabla 1**). Por otro lado, la especie *F. asiaticum* ha sido reportada como agente causal de FHB en China (Gale et al., 2002; Ji et al., 2007; Qu et al., 2007; Yang et al., 2008; Zhang et al., 2007), Japón (Karugia et al., 2009; Suga et al., 2008) Nepal (Carter et al., 2000; Carter et al., 2002; Chandler et al., 2003; Desjardins & Proctor, 2010) y Corea (Lee et al., 2009), pero no ha sido descrita previamente como agente causal de FHB en América del Sur. Esta especie puede presentar cualquiera de los tres quimiotipos y pertenece al clado Asiático que incluye otras tres especies (*F. ussurianum*, *F. verosii* y *F. nepalense*), que posiblemente también se originaron en Asia (Aoki, 2012) (**Tabla 1**). Es interesante remarcar que todos los aislamientos de *F. asiaticum* reportados en esta tesis, fueron obtenidos a partir de muestras de trigo de los departamentos de Cerro Largo. Estas nuevas regiones de plantación de trigo, se encuentran cercanas a zonas arroceras en el este del país. Recientemente, Gale et al. (2011) reportaron por primera vez la presencia de *F. asiaticum* del quimiotipo NIV en los Estados Unidos. Estos autores indican que dicha especie se restringe a un área relativamente pequeña en el sur del estado de Louisiana, cercano a zonas arroceras. Manejan la hipótesis de que *F. asiaticum* pudo haber sido introducida en los Estados Unidos en arroz y que los productores de NIV (tanto *F. asiaticum* como *F. graminearum*) pasaron a trigo en dicha región en particular, debido a la proximidad con los cultivos arroceros. Esto es

consistente con lo reportado por Lee et al. (2009), quienes sostienen que *F. asiaticum* estaría mejor adaptada a agroecosistemas arroceros que otras especies de FGSC.

Por otro lado, se piensa que las otras tres especies encontradas en este trabajo, *F. austroamericanum*, *F. brasilicum* y *F. cortaderiae* se habrían originado en América del Sur, conjuntamente con *F. meridionale* (Aoki, 2012). Sin embargo *F. brasilicum* pero del quimiotipo 3ADON, fue reportado en Nueva Zelanda (Monds et al., 2005) y recientemente en Sudáfrica (Boutigny et al., 2011), indicando que se encontraría en distintos lugares en el Hemisferio Sur.

En cuanto al quimiotipo de tricotecenos encontrado en los aislamientos analizados en el transcurso de esta tesis, éstos estuvieron directamente ligados a las especies halladas. La misma situación fue reportada por Sampietro et al. (2011) para aislamientos de FGSC de maíz en Argentina, a pesar de que el polimorfismo de tricotecenos fue reportado para *F. graminearum* (15ADON, 3ADON y NIV), *F. austroamericanum* (NIV y 3ADON), *F. cortaderiae* (NIV y 3ADON), *F. asiaticum* (15ADON, 3ADON y NIV) y *F. brasilicum* (NIV y 3ADON) (Aoki, 2012). En este estudio, todos los aislamientos de *F. asiaticum*, *F. cortaderiae* y *F. brasilicum* presentaron el quimiotipo NIV, todos los *F. graminearum* presentaron el quimiotipo 15ADON (salvo en el caso del aislamiento de *F. graminearum* quimiotipo 3ADON) y el único aislamiento de *F. austroamericanum* el quimiotipo 3ADON. Estos resultados concuerdan con los reportados por Jeon et al. (2003), los que muestran que *F. asiaticum* aislado de maíz en Corea produce NIV y *F. graminearum* solo DON y los resultados de Boutigny et al. (2011) en Sudáfrica y Monds et al. (2005) en Nueva Zelanda que muestran que todos los *F. cortaderiae* presentaron el quimiotipo NIV.

Los resultados de este estudio confirman el hecho de que 15-ADON es el quimiotipo mayoritario encontrado en Uruguay, como fue reportado previamente por Piñeiro et al. (1996). Esto era esperable, dado que la presencia de FGSC del quimiotipo 15ADON ha sido encontrado en numerosos estudios, tanto en América del Sur como en el Norte (Alvarez et al., 2009; Astolfi et al., 2012; Schmale et al., 2011). Sin embargo otros quimiotipos también han sido reportados en determinadas áreas de América asociados a trigo y otros cultivos. En América del Norte, más precisamente en Canadá, se identificó, en la última década un corrimiento de la población de FGSC del quimiotipo 15ADON al 3ADON (Ward et al., 2008). Asimismo, Gale et al. (2011) evidenciaron la presencia *F. graminearum* del quimiotipo NIV en proporciones elevadas en aislamientos de una pequeña área del estado de Louisiana en los Estados Unidos. En América del Sur, el

quimiotipo NIV también ha sido detectado en la especie *F. meridionale* en Argentina y Brasil (Astolfi et al., 2012; Sampietro et al., 2011). De hecho Sampietro et al. (2011) mostró por primera vez la predominancia del quimiotipo NIV en FGSC aislados de maíz en Argentina. En nuestro país, previo a este trabajo, los estudios realizados en trigo correspondían exclusivamente a la zona oeste de producción y mostraban una predominancia absoluta del quimiotipo 15ADON, con un reporte reciente de la presencia de un solo aislamiento del quimiotipo NIV (Pan et al., 2013). Sin embargo, el presente estudio es el primero que demuestra la presencia en trigo de patógenos de los tres quimiotipos (15ADON, 3ADON y NIV), asociándolos a las diferentes zonas de producción. Además, representa el primer reporte acerca de la diversidad de especies del FGSC en el territorio nacional, y de la presencia de *F. asiaticum* asociado a trigo en América del Sur. En este trabajo se realiza una caracterización conjunta de especies y quimiotipos, que además incluye a nuevas áreas de producción en el este del país.

El encontrar aislamientos del quimiotipos NIV asociados a FHB en Uruguay, muestra que existe un riesgo potencial de contaminación por la toxina nivalenol, en particular en las nuevas regiones de producción de trigo del departamento de Cerro Largo. Esto podría tener consecuencias importantes en lo que respecta a la seguridad alimentaria, debido a que dicha toxina no sólo no se monitorea de rutina, sino que también es más citotóxica que el deoxinivalenol (Luongo et al., 2008). Estos resultados indican la necesidad de realizar muestreos periódicos para detectar la presencia de posibles productores tricotecenos diferentes al DON y de zearalenona en granos de trigo en nuestro país, además de la necesidad de contar con métodos rápidos y sencillos para dicho análisis.

Además de las especies mencionadas anteriormente se encontraron tres aislamientos no pertenecientes al FGSC: dos *F. acuminatum* y un aislamiento de la especie *F. lacertarum* (perteneciente al complejo de especies *F. equiseti*). Existen pocos datos sobre la posible producción de micotoxinas por parte de *F. lacertarum*, sin embargo para *F. acuminatum* se postula que podría ser capaz de producir toxinas del grupo de los tricotecenos A, tales como la toxina T2 y sus derivados o tricotecenos mono y poliacetilados de elevada toxicidad (Visconti et al., 1989). Este estudio debería complementarse con la búsqueda de otras especies de *Fusarium* potencialmente micotoxigénicas en cereales.

4.1.3 Ensayo de sensibilidad al fungicida tebuconazol

Para continuar con la caracterización de los aislamientos encontrados se evaluó la sensibilidad que mostraron las distintas cepas al fungicida tebuconazol. La misma fue cuantificada determinando la concentración de tebuconazol que causó la inhibición del 50% del crecimiento micelial (concentración efectiva 50: CE50) para cada aislamiento, por duplicado.

Los valores de CE50 de tebuconazol para el quimiotipo 15ADON (N = 42) se encontraron en el rango de 0.07 a 0.98 $\mu\text{g/ml}$, con una media de 0.29 $\mu\text{g/ml}$, mientras que los valores para los aislamientos del quimiotipo NIV (N = 14) fueron de 0.24 a 1.73 $\mu\text{g/ml}$, con una media de 0.61 $\mu\text{g/ml}$.

La **Figura 16** muestra la distribución de frecuencias de CE50 de tebuconazol (promedio de duplicados) para aislamientos de *Fusarium asiaticum* y *Fusarium cortaderiae* del quimiotipo NIV y *F. graminearum* quimiotipo 15ADON de distintas regiones de Uruguay. Se puede observar, para el caso de los aislamientos del quimiotipo NIV, una mayor frecuencia de cepas con sensibilidad disminuida al fungicida tebuconazol. Asimismo, la diferencia en las medianas de los valores correspondientes al grupo “NIV” respecto al grupo “15ADON” fue evaluada mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney Wilcoxon, encontrándose que los valores de CE50 de tebuconazol para los aislamientos del quimiotipo NIV fueron significativamente ($P < 0.05$) mayores que los valores para los aislamientos del quimiotipo 15ADON. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas ($P \geq 0.05$) entre especies.

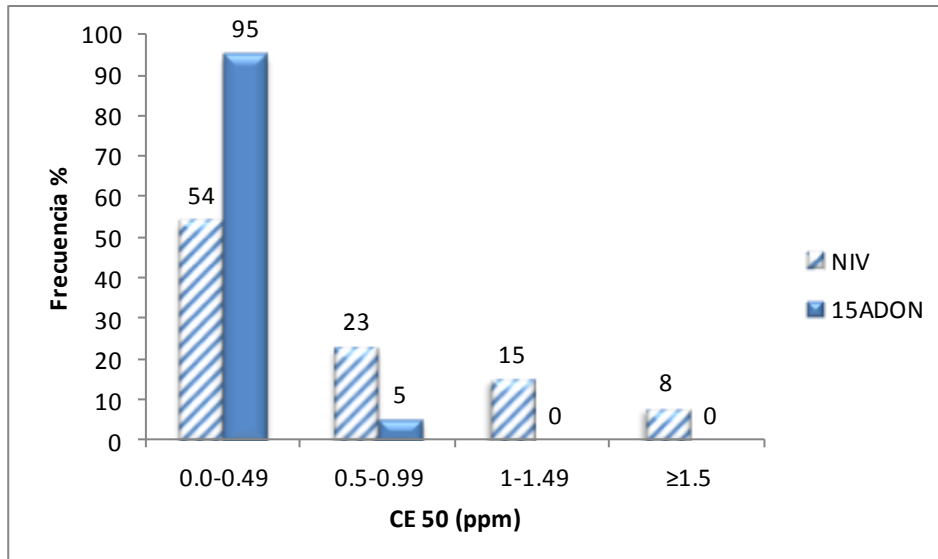


Figura 16. Frecuencia (en porcentaje) para distintos rangos de valores de CE50 (ppm) promedio de tebuconazol para diferentes aislamientos. Barras llenas: aislamientos correspondiente al quimiotipo 15ADON; Barras rayadas: aislamientos correspondientes al quimiotipo NIV.

Si bien este estudio muestra que los potenciales productores de nivalenol serían menos sensibles al tebuconazol que los aislamientos del quimiotipo 15ADON, según Yin et al. (2009), ninguno sería resistente en condiciones de campo, ya que estos autores proponen valores mayores a 4 µg/ml de CE50 de tebuconazol para aislamientos de *F. asiaticum* y *F. graminearum* resistentes. En nuestro estudio el aislamiento con mayor valor de CE50 (1.73 µg/ml) corresponde a *F. asiaticum* (CL-6), obtenido a partir de nuevas zonas de producción del departamento de Cerro Lago. Si bien no se encontraron estudios similares que incluyeran a la especie *F. cortaderiae*, los valores de CE50 para *F. graminearum* encontrados en nuestro estudio parecen ser similares a los obtenidos en China, con una media de valores de CE50 de 0.248 µg/ml (con excepción de un aislamiento con CE50 de 6,24 µg/ml), pero menores que en Croacia, donde los valores de CE50 fueron de entre 0.22 µg/ml a 2.57 µg/ml (Ivic et al., 2011; Yin et al., 2009). Sin embargo Yin et al. (2009) reportaron un valor de CE50 medio para *F. asiaticum* de 0.316 µg/ml (con la excepción de dos aislamientos con valores de EC50 de 4.152 y 4.52 µg/ml). Dicho valor es sensiblemente menor al reportado en nuestro trabajo, donde el valor medio de CE50 para *F. asiaticum* fue de 0.674 µg/ml. Asimismo, al igual que en nuestro estudio, dichos autores no observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de CE50 medios para *F. graminearum* respecto a *F. asiaticum*. Sin embargo no realizaron estudios comparativos entre quimiotipos. Los resultados

presentados en esta tesis son hasta la fecha los primeros sobre sensibilidad al fungicida tebuconazol asociado a especies de FGSC causantes de FHB en Uruguay.

Otro aspecto relevante a tener en cuenta sobre las cepas aisladas de trigo uruguayo es su agresividad en ensayos en planta.

La Dra. Silva Pereyra y su equipo, en las instalaciones del INIA la Estanzuela, Colonia, analizaron la agresividad de once aislamientos representativos de las especies y quimiotipos aislados en 2002 y 2009 (*F. graminearum* 15ADON cepas F-122, F-100, Pay 3.5 y NRRL 36970; *F. asiaticum* NIV cepas. F-110, F-108 y F-109; *F. cortaderiae* NIV cepas F-117, F-111 y F-107; *F. austroamericanum* 3ADON NRRL 36957). Se realizó la inoculación de espiguillas de trigo en siete genotipos diferentes, con reactividad diferencial frente a FHB: Buck Guarani (susceptible) e INIA Mirlo (susceptible), INIA Churrinche (moderadamente susceptible), Catbird 1073 (moderadamente susceptible a moderadamente resistente), INIA Tero y Sumai 3 (moderadamente resistentes), y Frontana (resistente). La severidad de infección fue evaluada a los 7, 14 y 21 días post inoculación (dpi) y expresada como porcentaje de espiguillas sintomáticas por espiga. Se calculó el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC). Mediante análisis de varianza de los resultados, se encontró que los aislamientos de *F. graminearum* quimiotipo 15ADON presentaron agresividades significativamente mayores que *F. cortaderiae* y *F. asiaticum* del quimiotipo NIV y que *F. austroamericanum* quimiotipo 3ADON (Umpiérrez-Failache et al., 2013). La agresividad diferencial mostrada por esta especie podría dar cuenta de la mayor prevalencia en nuestro medio de la especie *F. graminearum* 15ADON respecto a las demás. Para corroborar estos resultados deberían realizarse ensayos incluyendo cepas pertenecientes a las diferentes especies y quimiotipos encontrados en las distintas regiones del país.

Existen pocos datos bibliográficos que comparen agresividad entre especies de FGSC. Tóth et al. (2008) y Malhipour et al. (2012) mostraron que aislamientos de *F. graminearum* presentaron mayor agresividad en términos de severidad de FHB que aislamientos de otras especies como *F. boothii*, de diferentes orígenes geográficos. Asimismo concluyeron que los aislamientos con mayores niveles de agresividad pertenecían a la especie *F. graminearum* quimiotipo 15ADON, lo cual concuerda con los resultados encontrados para las cepas aisladas en nuestro país.

4.1.4 Análisis de estructura poblacional por número variable de repetidos en tándem (VNTR)

Con el fin de estudiar la variabilidad genética entre las poblaciones de FGSC encontradas, se realizó el análisis de 9 loci de Número Variable de Repetidos en Tandem (“Variable Number Tandem repeat”, VNTR). Se estimó la variabilidad genética entre las poblaciones de 2002 y 2009 se calcularon los valores de diversidad génica (Nei, 1987) y distancia genética basada índice de fijación F_{ST} (Cockerham & Weir, 1984; Michalakis & Excoffier, 1996). Asimismo se calculó la estimación de los valores de F_{ST} pareados basada en el número de alelos diferentes y se determinó la significancia estadística (Michalakis & Excoffier, 1996) de las estimaciones de F_{ST} pareados. El análisis mostró gran variabilidad genética en las poblaciones de FGSC analizadas, sin embargo, si bien el valor del índice F_{ST} fue estadísticamente significativo ($F_{ST}= 0,03$, $P < 0,001$), mostró poca divergencia entre las poblaciones de las dos áreas comparadas.

Además se compararon las poblaciones uruguayas con poblaciones aisladas en la provincia de Buenos Aires en el año 2003 de la colección del laboratorio de la Dra. Sofía Chulze. Se encontró que el índice F_{ST} fue mayor al calculado en la comparación de las poblaciones nacionales de distintos años ($F_{ST} \approx 0,1$), indicando mayor diferenciación genética entre las poblaciones uruguayas y argentinas que entre distintas zafras. Esto era esperable dada la separación geográfica. Sin embargo el coeficiente F_{ST} presenta un valor bajo, indicando que son poblaciones relativamente emparentadas.

Este estudio debe complementarse con el análisis de VNTR de las cepas aisladas de la región este del país. Dichos datos podrían contrastarse con los valores de VNTR de los aislamientos nacionales del oeste del país y eventualmente con valores para aislamientos de Brasil, los que, dada la cercanía geográfica, podrían presentar menos divergencia genética.

4.2 Desarrollo de técnicas moleculares sencillas para identificación: RFLP

Con el fin de contar con un método de identificación rápido y sencillo de las especies de FGSC predominantes en nuestro país, se desarrolló un método de PCR-RFLP, que permitió diferenciar a las especies *F. graminearum* y *F. cortaderiae* del resto de las especies del complejo.

La técnica de identificación molecular desarrollada, consiste en dos pasos. En primer lugar se determina si el aislamiento pertenece al complejo *F. graminearum* utilizando los primers específicos. Dichos primers fueron desarrollados por Nicholson et al. (1998) previo al reconocimiento de la variedad de especies que comprendía *F. graminearum* en ese momento. Por ello, fue necesario demostrar en primera instancia, que para todas las especies pertenecientes al complejo FGSC, se lograba una amplificación con el uso de dichos primers. De acuerdo a la bibliografía consultada este análisis no había sido realizado hasta el momento. Sin embargo, se planteaba como necesario, ya que otros primers que habían sido desarrollados para la especie *Fusarium graminearum* no resultaron efectivos al ser ensayados con todas las especies del complejo (Brandfass & Karlovsky, 2008; Waalwijk et al., 2003). Los resultados de la amplificación con primers específicos Fg11 se muestran en la **Figura 17**. Se realizó el análisis de 15 especies pertenecientes al FGSC. Todas las especies estudiadas mostraron un producto de amplificación de tamaño variable, que ronda los 500 pb. Sin embargo la especie *F. roseum*, no perteneciente al FGSC, no presentó producto de amplificación con estos primers. El tamaño variable del producto de amplificación obtenido para las distintas especies del complejo, podría ser tomado a su vez como un indicador primario de la especie a la que pertenecería el aislamiento a identificar.

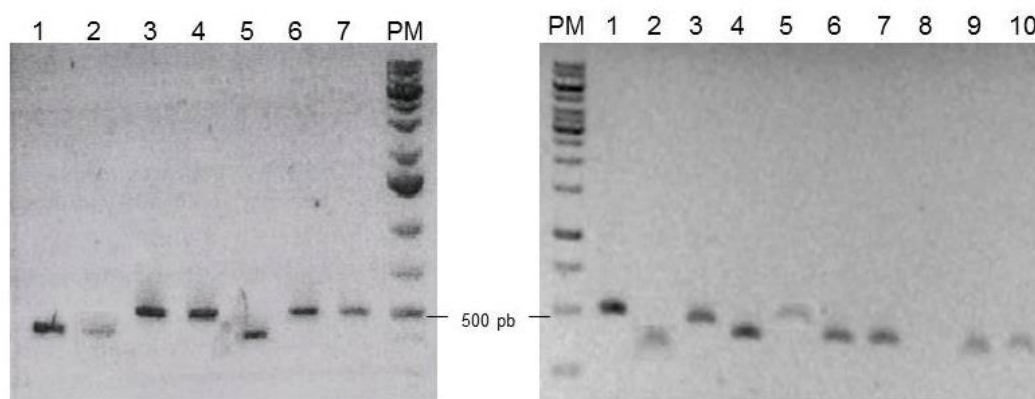


Figura 17. Amplificación específica para especies de FGSC utilizando primers Fg11. Panel izquierdo: PM: marcador de peso molecular; 1: *F. austroamericanum*; 2: *F. boothii*; 3: *F. cortaderiae*; 4: *F. brasiliicum*; 5: *F. graminearum*; 6: *F. meridionale*; 7: *F. asiaticum*. Panel derecho: 1: *F. ussurianum*; 2: *F. acaciae-maensii*; 3: *F. luisianense*; 4: *F. nepalense*; 5: *F. mesoamericanum*; 6: *F. gerlachii*; 7: *F. aethiopicum*; 8: *F. roseum* (no FGSC); 9: *F. verosii*; 10: *Fusarium sp.* (FGSC). Note que la única especie que no presenta producto de amplificación fue el control negativo de la especie *F. roseum*.

Una vez que se ha corroborado que un aislamiento pertenece al FGSC, es necesario determinar a qué especie pertenece. El método se desarrolló *in silico* por análisis de secuencias obtenidas de las bases de datos Fusarium ID, de parte del gen TEF- 1 alfa utilizando el software Webcutter 2.0 de uso libre. El análisis permitió determinar que la enzima BsaHI, permite diferenciar las cepas pertenecientes a la especie *Fusarium graminearum* del resto. Dicha enzima es capaz de cortar la secuencia del gen TEF-1 alfa amplificada por PCR, (≈ 634 pb) en la posición 356, sólo para el caso de *F. graminearum*, obteniéndose un patrón de fragmentos de 356 y 287 pb. Para corroborar los resultados obtenidos, se amplificó la región del gen TEF-1 alfa de varias especies (cepas de colección y aislamientos nativos) y se cortó con la enzima seleccionada (BsaHI), obteniéndose un perfil único para *F. graminearum*, permitiendo su diferenciación de las demás especies (**Figuras 18 y 19**), no encontrándose sitios de restricción para dicha enzima en las demás especies estudiadas.

Fue posible diferenciar también los aislamientos pertenecientes a la especie *Fusarium cortaderiae*. Se determinó que el corte de la misma región del fragmento TEF1-alfa con la enzima TruI produce fragmentos diferenciales solamente en dicha especie (**Figuras 18 y 19**). Dicha enzima corta la secuencia del TEF1-alfa de *F. cortaderiae* en las posiciones 89 y 115, obteniéndose un patrón de fragmentos de 528, 89 y 26 pb. Si bien la secuencia amplificada por PCR y sujeta a restricción presenta sitios de corte para esta enzima en las especies *F. louisianense* y *F. aethiopicum*, el patrón de bandas obtenido es diferente al de *F. cortaderiae*. Asimismo son especies que no se han encontrado en nuestro país ni en la región hasta la fecha.

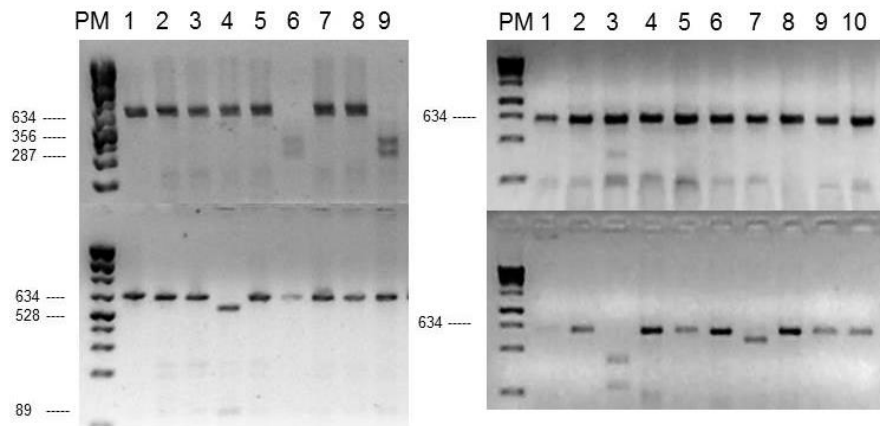


Figura 18. Patrones de bandas obtenidos en un gel de agarosa 1,5 %, luego de la digestión con las enzimas BsaHI (superior, identificación de *F. graminearum*) y TruII (inferior, identificación de *F. cortaderiae*) para especies de colección pertenecientes a FGSC. Panel izquierdo: PM: Marcador de peso molecular; 1:*F. graminearum* producto de PCR TEF1-alfa sin cortar. 2: *F. austroamericanum*; 3: *F. boothii*; 4: *F. cortaderiae*; 5: *F. brasiliicum*; 6: *F. graminearum*; 7: *F. meridionale*; 8: *F. asiaticum*, 9 *F. graminearum* (cepa nativa). Panel derecho: 1: *F. ussurianum*; 2: *F. acaciae-maensii*; 3: *F. luisianense*; 4: *F. nepalense*; 5: *F. mesoamericanum*; 6: *F. gerlachii*; 7: *F. aethiopicum*; 8: *F. roseum* (no FGSC);9: *F. verosii*;10: *Fusarium* sp. (FGSC).

Para el caso de las restantes especies del FGSC encontradas, *F. asiaticum*, *F. brasiliicum* y *F. austroamericanum* no existen enzimas con corte diferencial para el factor de elongación TEF 1-alfa. A pesar de ello, este resultado es importante, ya que al analizar los aislamientos encontrados de esta forma, solamente es necesario secuenciar aquellos cuyo perfil de restricción para la enzimas mencionadas no correspondan a *F. graminearum* o *F. cortaderiae*, minimizando así el costo y tiempo de análisis.

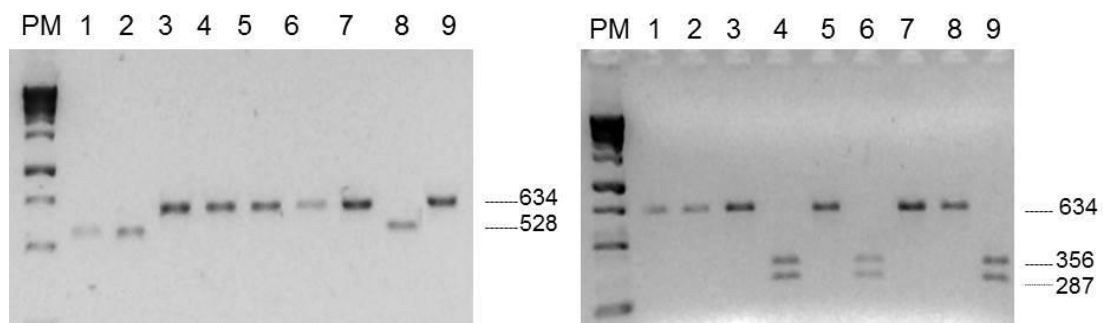


Figura 19. Patrones de bandas obtenidos en un gel de agarosa 1,5 %, luego de la digestión con las enzimas TruII (panel izquierdo, identificación de *F. cortaderiae*) y BsaHI (derecho, identificación de *F. graminearum*) para aislamientos de especies pertenecientes a FGSC aisladas de trigo en Uruguay. 1, 2 y 8: *F. cortaderiae*; 4, 6 y 9: *F. graminearum*; 3, 5 y 7: *F. asiaticum*. PM: marcador peso molecular. Las bandas de menor tamaño producto de restricción con la enzima TruII no logran visualizarse en el gel.

Para complementar la información acerca de los aislamientos causantes de FHB en trigo, se puso a punto una técnica de PCR multiplex para la diferenciación de quimiotipo de tricotecenos. Este ensayo descrito por Ward et al. (2002) y Starkey et al. (2007) se basa en la amplificación diferencial de fragmentos de distinta longitud dependiendo del quimiotipo que posea el aislamiento. En la **Figura 20** se muestra el patrón de bandas obtenido en el caso de (1) quimiotipo 3ADON (fragmento de 243pb), (2) quimiotipo 15ADON (fragmento de 610pb) y (3) quimiotipo NIV (fragmento de 840pb). Dicho ensayo, conjuntamente con el ensayo análogo para el gen TRI12 se realizó para todos los aislamientos obtenidos (no se muestra).

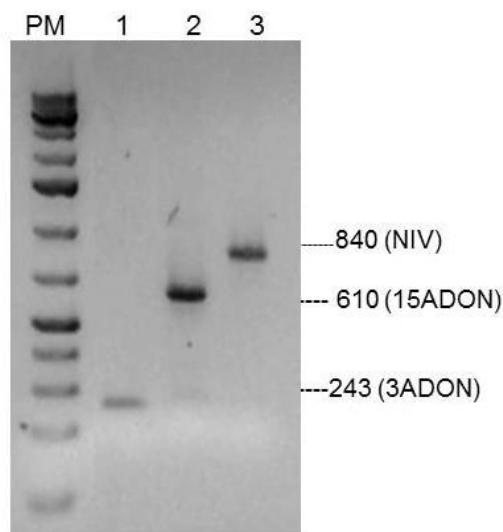


Figura 20. Patrón obtenido con cepas de referencia en el ensayo de PCR multiplex del en TRI3 para la determinación de quimiotipos de tricotecenos. Se muestra el patrón de bandas obtenido para los quimiotipos NIV (840 pb) (Carril 3), 15ADON (610pb) (Carril 2) y 3ADON (243pb) (Carril 1). PM: Marcador de peso molecular.

Los resultados de dichos ensayos fueron validados con los resultados de MLGT mostrados en el apartado 4.1.2.

Dado que en nuestro país la caracterización de los aislamientos de *F. graminearum* causantes de FHB, se realiza normalmente por métodos morfológicos, los cuales pueden ser engorrosos, y que además no se cuenta con acceso a metodologías de tipificación como es el MLGT, el método de PCR-RFLP desarrollado es una valiosa herramienta. Esta técnica permite de forma rápida y sencilla la caracterización de especies del complejo FGSC presentes en muestras de trigo nacional, reduciendo costos, ya que minimiza el número de aislamientos que deben ser secuenciados (solo aquellos que no correspondan a *F. graminearum* o *F. cortaderiae*). Además, conjuntamente con la

aplicación del ensayo PCR multiplex para quimiotipos, es posible determinar el potencial toxigénico de los aislamientos, previendo así posible contaminación de los granos con micotoxinas.

4.3 Análisis de micotoxinas presentes en muestras de trigo

Con el fin de cuantificar las micotoxinas producidas por hongos pertenecientes al complejo FGSC (tricotecenos B: deoxinivalenol, nivalenol, 15-acetildeoxynivalenol y 3-acetildeoxynivalenol y de zearalenona), presentes en muestras de trigo, se puso a punto un método de análisis químico. Dicho ensayo consistió en la separación de las toxinas de la muestra por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), seguida de la detección de las mismas por espectrometría de masas tándem (MS/MS).

4.3.1 Desarrollo del método analítico MS/MS

4.3.1.1 Detección por espectrometría de masa tándem

La formación de iones aductos es una herramienta útil a la hora de identificar micotoxinas en una muestra compleja. Dependiendo de la micotoxina analizada, se formarán diferentes iones aductos con iones presentes en la fase móvil. En la **Tabla 2** se resumen los principales iones aductos formados con las micotoxinas analizadas.

Para los tricotecenos B, la detección puede llevarse a cabo tanto en modo positivo como negativo. De forma de aumentar la sensibilidad del ensayo, se adiciona a la fase móvil acetato de amonio en baja proporción (5mM), lo que da lugar a la formación de aductos de micotoxinas con el ion acetato que se detectan en modo negativo. Para zearalenona, la adición de ácido acético mejora la detección en modo negativo (Berthiller et al., 2005; Sulyok et al., 2007).

Tabla 2. Principales iones formados durante la ionización para las micotoxinas (tricotecenos B y zearalenona) importantes en muestras de trigo

Micotoxina	Fórmula	PM	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	[M+K] ⁺	[M+ACN] ⁺	[M-H] ⁻	[M+Acetato] ⁻
NIV	C ₁₅ H ₂₀ O ₇	312	313	335	351	353	311	371
DON	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	296	297	319	335	337	295	355
3-ADON	C ₁₇ H ₂₂ O ₇	338	339	361	377	379	337	397
15-ADON	C ₁₇ H ₂₂ O ₇	338	339	361	377	337	337	397
ZON	C ₁₈ H ₂₂ O ₅	318	319	341	357	359	317	377

4.3.1.2 Estudio de los patrones de fragmentación de los iones de micotoxinas

Como paso previo de análisis, se estudió la energía óptima de fragmentación necesaria para identificar las diferentes micotoxinas (principalmente los isómeros 3ADON y 15ADON) en base a su patrón de MS/MS. Se realizaron ensayos de inyección directa de estándares de las micotoxinas NIV, DON, 3ADON, 15ADON y ZON en una trampa de iones (Bruker Esquire 6000). La **Figura 21** muestra las gráficas de intensidad relativa (I%) en función de la energía utilizada para las fragmentaciones.

Para NIV, el patrón de MS/MS obtenido empleando una energía de fragmentación de amplitud 0.55 (unidades arbitrarias) a partir del ion precursor [M+Acetato]⁻ m/z 355, permite observar los iones m/z 311 y m/z 281, con intensidades relativas entre 30 y 80%. Para el 3ADON y 15ADON, los patrones de MS/MS obtenidos empleando una energía de fragmentación de amplitud 1.4 (unidades arbitrarias), permitirían diferenciar a los dos isómeros. Para el caso del 3ADON, el ion precursor aducto [M+Acetato]⁺ m/z 397, es más lábil en la fragmentación a altas energías que en el caso del aducto con 15ADON, por lo que, el pico correspondiente a este ion es de menor intensidad. El ion m/z 277 también se observa en mayor proporción en el caso del 15ADON que para el 3ADON, mientras que los fragmentos m/z 217 y m/z 307 se observan con intensidad similar para ambas toxinas. El ion m/z 219 se observa solo para 15ADON y en baja proporción, no detectándose para 3ADON a la energía de fragmentación elegida.

La micotoxina ZON presenta un patrón de MS/MS empleando una energía de fragmentación de amplitud 1.2, que muestra al ion precursor [M-H]⁻ 317, y los productos de fragmentación 216.8, 273, 299 y 148.9.

En cada caso la energía elegida para la fragmentación óptima fue aquella que determinó un patrón de fragmentación diferencial: 0,55 para DON y NIV; 1,4 para 3ADON y 15 ADON y 1,2 para ZON.

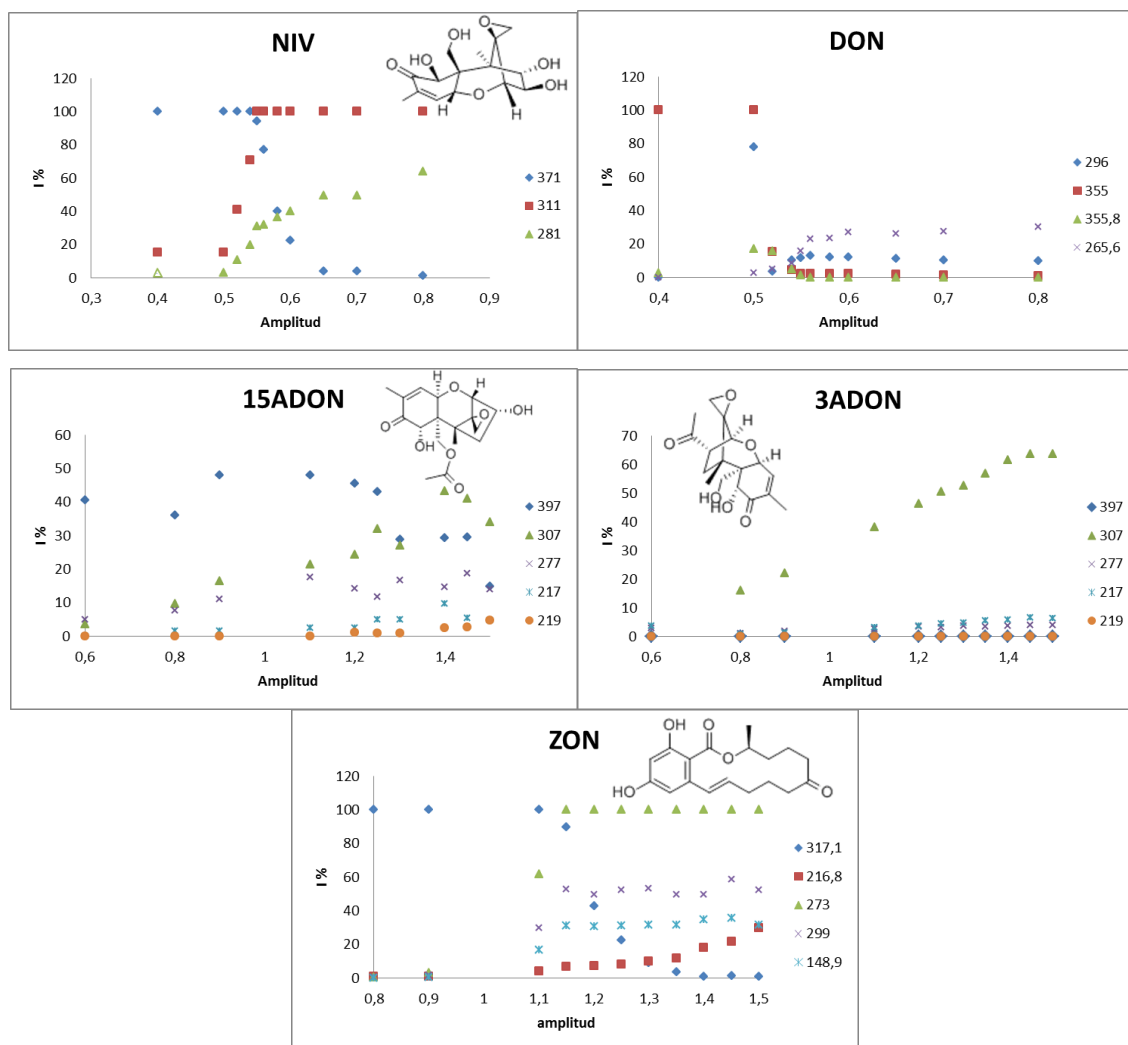


Figura 21. Intensidad relativa (I%) en función de la energía para los distintos iones estudiados (NIV, DON, 15ADON, 3ADON y ZON). Se optimizaron las energías de fragmentación para lograr diferenciar las toxinas en base a su patrón de MS/MS, principalmente los isómeros 3ADON y 15ADON. En cada caso la energía elegida para la fragmentación óptima fue aquella que determinó un patrón de fragmentación diferencial (0,55 para DON, 1,4 para 3ADON y 15 ADON y 1,2 para ZON).

4.3.1.3 Separación cromatográfica de micotoxinas por HPLC

Para evaluar la separación cromatográfica y detección de las micotoxinas, se ensayaron mezclas de estándares (500 ppb de cada una), empleándose una columna de 30 mm de largo y 3,5 μm de tamaño de partícula. El resultado de la misma se muestra en la **Figura 22**. El primer pico observado fue el correspondiente a la molécula más polar de la mezcla, el NIV, con un tiempo de elución de 1 minuto, seguido por el DON a los 1,5 min, 3ADON a los 14 min y 15ADON a los 15 min. La identidad de los picos se corroboró por MS/MS, detectándose los iones parentales (**Figura 22**), patrón de fragmentación adecuado y por coincidencia de los tiempos de elución con corridas de estándares individuales.

Cabe destacar que en bibliografía no se encuentra reportada la separación cromatográfica de los isómeros acetilados 3ADON y 15ADON, dado que son isómeros de posición. Sin embargo, con este protocolo se alcanzó una pequeña separación entre ambos picos.

Con estas condiciones experimentales se logró separar de forma adecuada los tricotecenos, aunque los tiempos de elución del NIV y DON fueron bajos (cercano al de contaminantes) y cercanos entre sí.

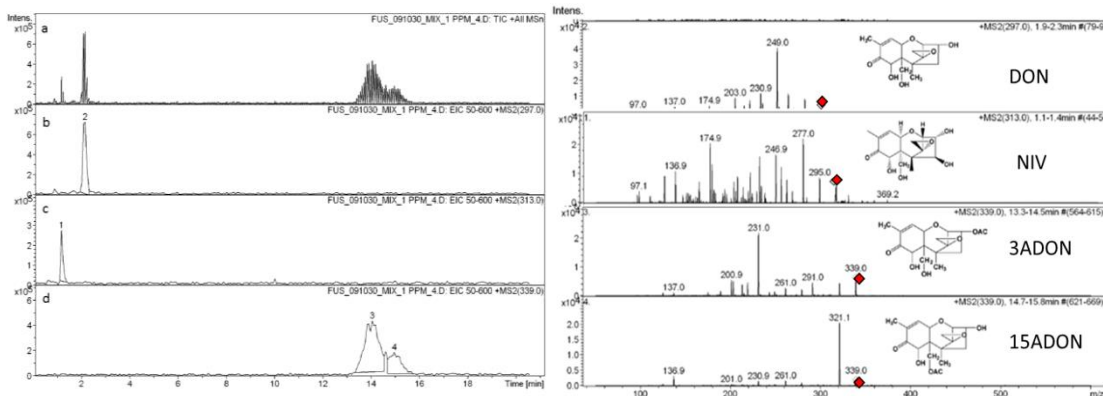


Figura 22. Separación por HPLC y análisis por MS/MS de las distintas especies en una mezcla de estándares de micotoxinas a una concentración de 1ppm. Figura izquierda: Intensidad de la señal vs. tiempo de retención en la columna. a: señal MS/MS del mix de micotoxinas. b: DON; c: NIV; d: 3ADON y 15ADON. Figura derecha: patrón de fragmentación del cada ion. Con \blacklozenge se indica el ion parental.

4.3.1.4 Extracción de micotoxinas de la matriz trigo

Se fortificaron las muestras de trigo no contaminado con micotoxinas y se realizaron extractos de los mismos siguiendo el procedimiento descrito muestras de trigo contaminado. Los resultados para una muestra fortificada con 2ppm de DON y trigo blanco sin contaminar se muestran en la **Figura 23**.

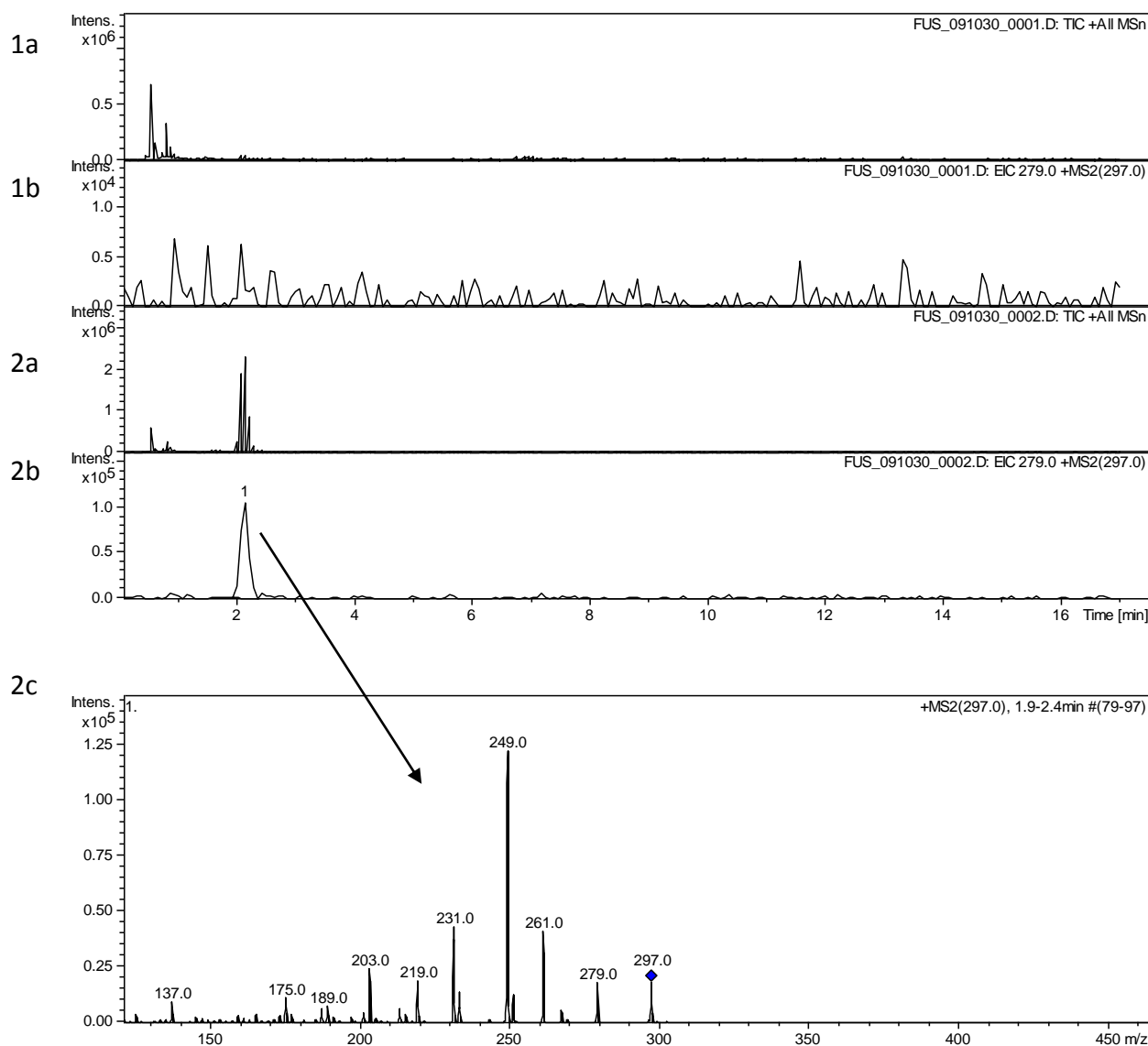


Figura 23. Separación por HPLC y análisis por MS/MS de extractos de trigo contaminado y trigo sin contaminación por *Fusarium* (blanco).

1a y 1b: Full Scan y búsqueda del ion 297 (modo MRM) en el extracto de trigo no contaminado con micotoxinas; no se detecta el ion m/z 297 de DON y sus fragmentos característicos. 2a y 2b. Full Scan y búsqueda del ion 297 (modo MRM) en muestra de trigo fortificado con DON (2ppm). 2c: Perfil de fragmentación del ion precursor m/z 297.

Este desarrollo y puesta a punto preliminar del método analítico por HPLC-MS/MS permite separar y detectar las principales micotoxinas potencialmente presentes en granos de trigo contaminados.

4.3.2 Desarrollo del método analítico con detección MS de alta resolución

Como método de detección alternativo, se utilizó un equipo QToF de alta resolución (Bruker Daltonics, Alemania). En principio, esta metodología permitiría detectar tanto las micotoxinas como micotoxinas conjugadas a otras moléculas, dado que no se buscan iones específicos en modo MRM (Multiple Reaction Monitoring) sino que se detectan los iones en modo barrido (“full scan”).

Para la separación cromatográfica se utilizó una columna de 30 mm de largo y 3 μ M de tamaño de partícula. Se corrió primeramente una muestra de estándares de tricotecenos, de forma de determinar los tiempos de elución de las micotoxinas estudiadas. Se estableció que para las condiciones del ensayo, los tiempos de elución para una mezcla de 10 ppm de toxinas fueron los siguientes: 4.4 minutos para NIV, 4,9 minutos para DON y 7,2 min para 3ADON y 15ADON. En las condiciones del ensayo se detectaron los iones aductos con acetato 371 para NIV, 337 para DON y 397 para los derivados acetilados, además de los iones negativos 295 para DON y 337 para los derivados acetilados (**Figura 24**). La presencia de dichos iones en picos que concuerden con los estándares tanto en el tiempo de elución como en la masa exacta, indicará la presencia de la micotoxina en la muestra.

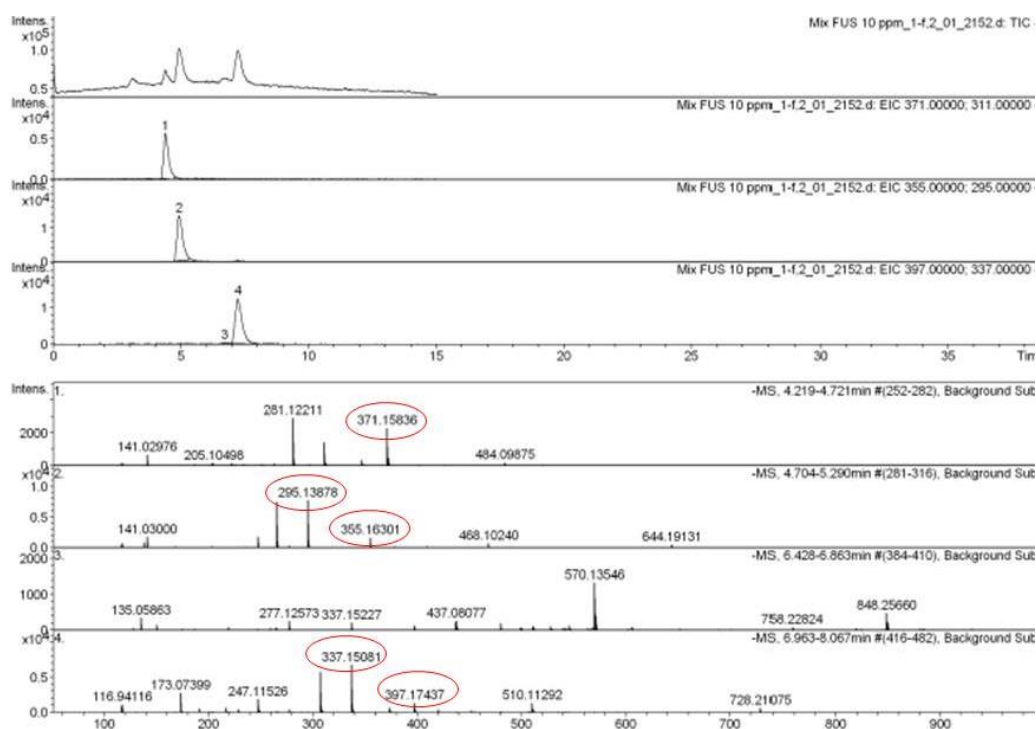


Figura 24. Separación por HPLC y análisis por MS de un mix de trioctenos de concentración 10ppm. Los picos 1, 2 y 4 representan al NIV, DON y 3ADON-15ADON respectivamente. Se detectaron los iones aductos con acetato en modo negativo.

4.3.3. Determinación de la presencia de micotoxinas en muestras de trigo contaminadas

Con el fin de determinar la presencia de micotoxinas en trigo contaminado se seleccionaron muestras de granos de las cuales se obtuvieron previamente diferentes aislamientos pertenecientes al FGSC.

Se utilizó el método de separación y detección de micotoxinas desarrollado previamente (HPLC-MS de alta resolución), analizándose la presencia de los tricotecnos del grupo B: nivalenol (NIV), deoxinivalenol (DON), 3-acetildeoxinivlenol (3-ADON), 15 acetildeoxinivalenol (15-ADON) y zeralenona (ZON). Se analizaron dos muestras del departamento de Cerro Largo, de las cuales se aislaron hongos posibles productores de NIV, DON y 15-ADON y del departamento de Rio Negro, donde sólo se aislaron posibles productores de DON y 15-ADON. En la **Tabla 3** se detallan las muestras estudiadas.

Estrategias para la identificación y caracterización de patógenos causantes de fusariosis en trigo

Tabla 3. Muestras seleccionadas de trigo nacional analizadas por la presencia de micotoxinas .

Nombre	Zafra	Lugar de cosecha	Aislamientos asociados (especies y quimiotipos)
CL1	2011	Cerro Largo	<i>F. graminearum</i> 15ADON, <i>F. asiaticum</i> NIV y <i>F. cortaderiae</i> NIV
CL2	2011	Cerro Largo	<i>F. graminearum</i> 15ADON, <i>F. asiaticum</i> NIV y <i>F. cortaderiae</i> NIV
Young1	2009	Young-Rio Negro	<i>F. graminearum</i> 15ADON

Los resultados para las muestras de trigo CL1, CL2 y Young 1 se muestran en las **Figuras 25, 26 y 27.**

Cabe destacar que en la fase móvil y en muestras de trigo no contaminado (blanco), no se encontraron los iones correspondientes a las micotoxinas analizadas.

Los resultados muestran la presencia del ion m/z 295 que indica la contaminación de la muestra con la toxina DON. No se encontraron los demás tricotecenos buscados, en particular no se detectó la presencia de nivalenol, y tampoco se constataron trazas de zearalenona.

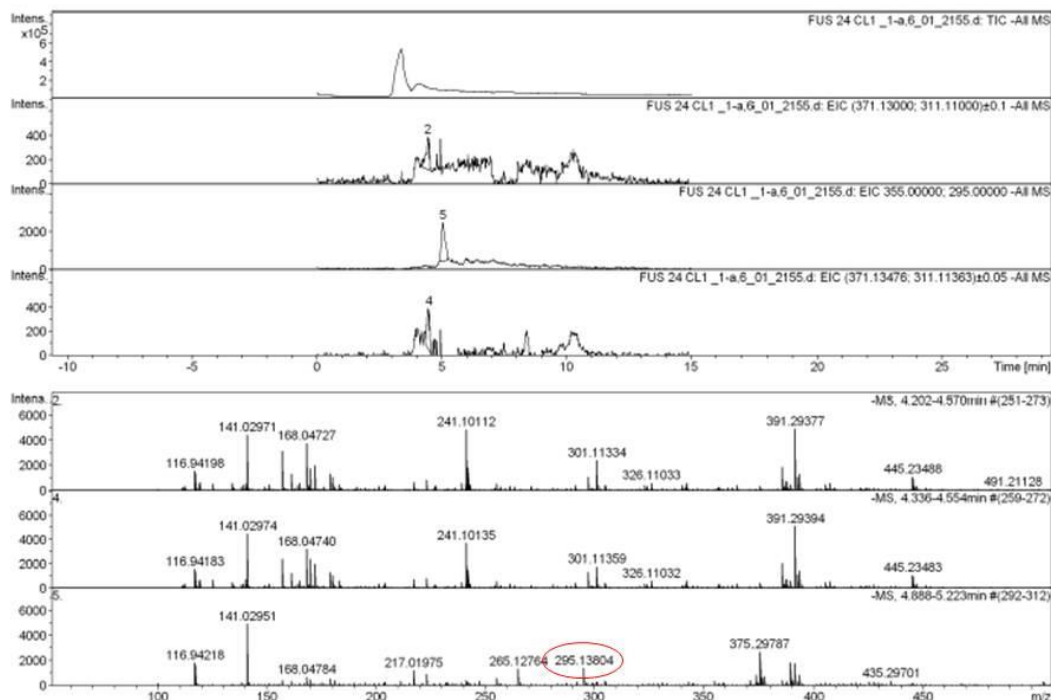


Figura 25. Separación por HPLC y análisis por MS de extractos de trigo contaminado muestra CL1. Solo el pico 5 (tiempo de elución 5 minutos), presentó trazas del ion 295 correspondiente a [DON-H].

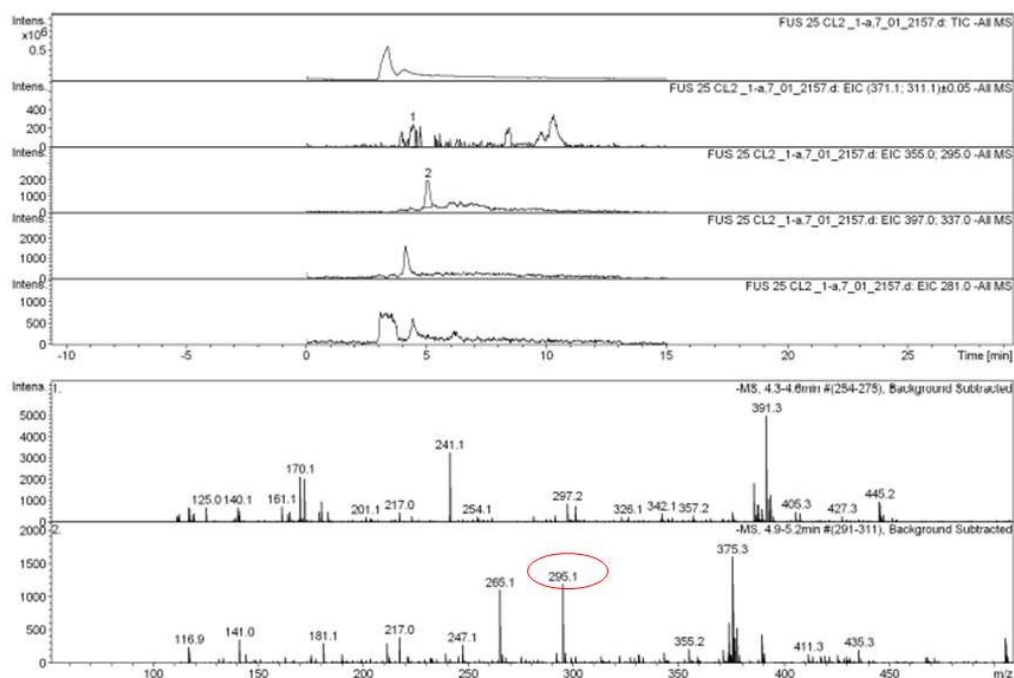


Figura 26. Separación por HPLC y análisis por MS de extractos de trigo contaminado muestra CL2. Solo el pico 2 (tiempo de elución 5 minutos), presentó el ion 295 correspondiente a [DON-H]⁺.

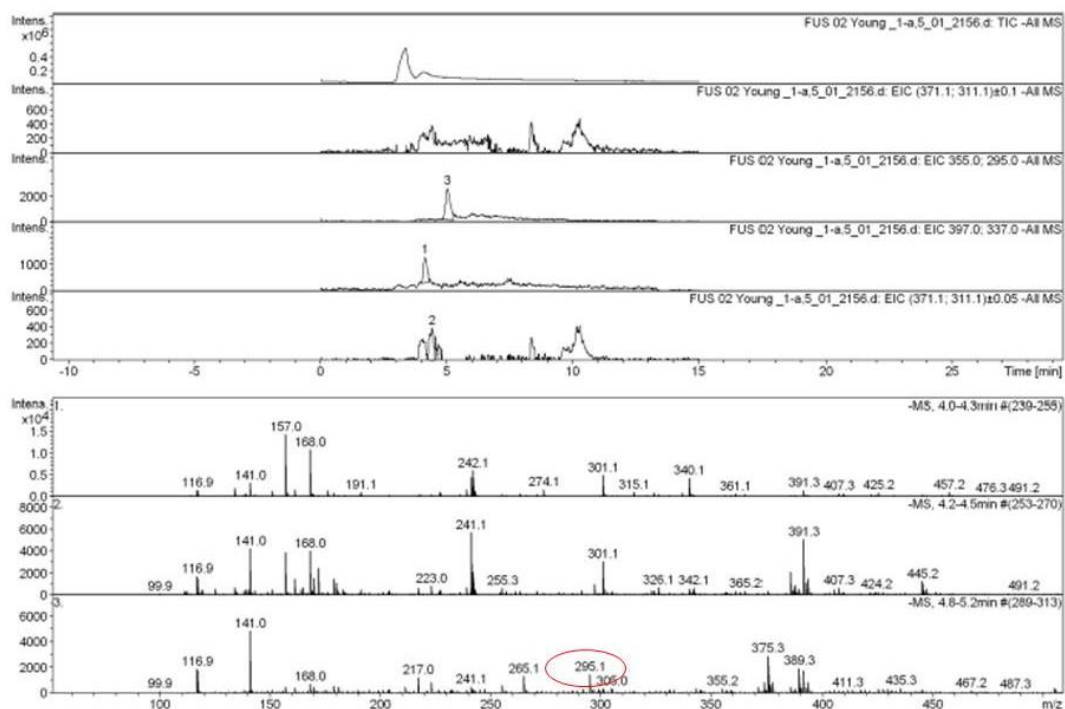


Figura 27. Separación por HPLC y análisis por MS de extractos de trigo contaminado muestra Young1. Solo el pico 3 (tiempo de elución 5 minutos), presentó trazas del ion 295 correspondiente a [DON-H]⁺.

Dados los resultados del análisis de especies y quimiotipos realizado por métodos moleculares, era de esperar la contaminación de las muestras provenientes del departamento de Cerro Largo, con la toxina nivalenol. Sin embargo, no se encontró dicha toxina en las muestras analizadas. Estas muestras fueron analizadas a su vez en un laboratorio de referencia (Laboratorio de la Dra. Susan McCormick de la USDA, Peoria, IL, USA), obteniéndose los mismos resultados (detección de DON pero no de NIV).

La presencia de nivalenol en muestras de granos de trigo contaminado de cosechas 2006, 2007 y 2008, fue reportada en el sur de Brasil, en cantidades menores (aprox. 300 ppb) al límite aceptado para la toxina DON (1ppm) (Del Ponte et al., 2012). Anteriormente, Pinto et al. (2008) también reportaron la presencia de la toxina nivalenol en muestras de trigo provenientes de distintas regiones de producción de trigo en Argentina, en los años 2001-2002, en cantidades bajas (50 y 100 ppb). Estos datos sugieren la posible presencia de la toxina nivalenol en trigo uruguayo.

Para corroborar los resultados se deberá analizar un mayor número de muestras, además de ajustar los límites de detección de la técnica y los protocolos de extracción para afirmar la ausencia o presencia de nivalenol en muestras de trigo nacional. Como alternativa a la estrategia de extracción utilizada en este trabajo, se debería ensayar el método descrito por Sulyok et al. (2007) para el análisis de múltiples micotoxinas en un mismo experimento. Dicho método consiste en una extracción líquido-líquido y omite el paso de clean-up con columna comercial. De esta forma se podría aumentar la proporción de contaminantes encontrada en las muestras crudas, evitando pérdidas sobre todo en el proceso de clean-up.

4.4 Puesta a punto de métodos de PCR en tiempo real para la cuantificación de hongos productores de micotoxinas en muestras de trigo

4.4.1 Puesta a punto de un método de PCR en tiempo real para de determinación de hongos productores de tricotecenos totales en muestra de trigo

Para la determinación de la incidencia de hongos del género *Fusarium* productores de tricotecenos en granos de trigo, se realizó un análisis por PCR en tiempo real basado en la amplificación de una zona del gen que codifica la enzima tricodieno sintasa (TRI5), común a todos los productores de esta toxinas (Maier et al., 2006). Utilizando como base los primers y el método diseñado por (Burlakoti et al., 2007), se observó en las curvas de melting obtenidas, la presencia de dos picos, uno a 78°C y otro a 85°C (Tm esperada para el producto específico), lo cual indicaba que la fluorescencia total obtenida en cada caso no se debía solamente al producto de amplificación deseado (**Figura 28**). Asimismo se corroboró la formación de dímeros de primers en la reacción, corriendo las muestras luego de culminada la reacción de PCR en tiempo real en una electroforesis en gel de agarosa al 1%, constatándose una banda de tamaño esperado para el producto específico (193 pb), además de una banda de bajo peso molecular (menor a 50 pb), correspondiente a dímeros de primers. Se decidió entonces, incluir en el ciclo un paso extra de desnaturalización (de los productos inespecíficos) y adquisición de la fluorescencia, para evitar la interferencia de dímeros de primers en el resultado. Con la inclusión de dicho paso, sólo se observó un producto de reacción con un único pico correspondiente a una temperatura de desnaturalización o melting (tm) de aproximadamente 85°C, tal como se observa en la **Figura 28**. Dicho producto fue además corroborado por PCR convencional en gel de agarosa 1% (no se muestra).

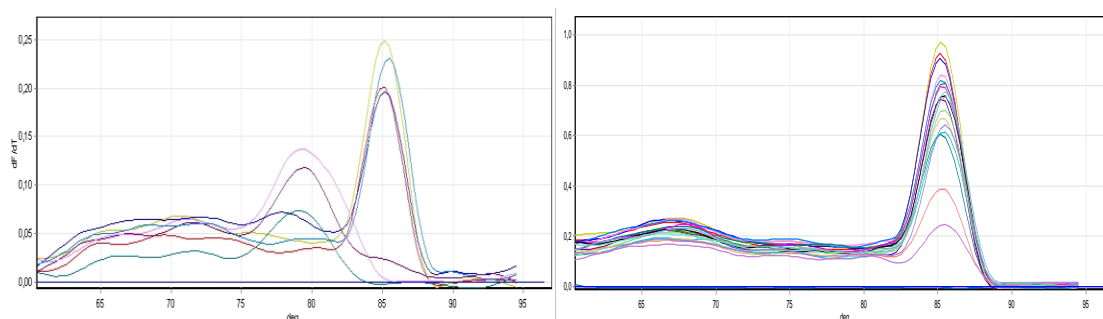


Figura 28. Curvas de desnaturalización o melting (dF/dT vs. Temperatura (°C)) para distintas diluciones de ADN de *F. graminearum* en el ensayo de real time PCR del gen TRI5. Izquierda: curvas de melting en los ensayos previos a la adición de un paso extra en el ciclo de desnaturalización y adquisición de la fluorescencia a 80°C, donde se observan dos picos. Derecha: curvas de melting en el ensayo optimizado.

Estrategias para la identificación y caracterización de patógenos causantes de fusariosis en trigo

El método desarrollado por Burlakoti *et al.* (2007), en el cual se basó este trabajo, incluía el uso de sondas TaqMan, lo cual aumenta la especificidad del ensayo. La modificación del método introducida en esta tesis permitió mantener la especificidad, realizando la amplificación en presencia de SYBRGreen sin la utilización de sondas, lo cual disminuye los costos de análisis.

Se realizaron las curvas estándar correspondientes al método. La **Figura 29** muestra la curva estándar obtenida en este estudio. Las barras de error de la curva representan los intervalos de confianza en cada punto ($\alpha = 0,05$), los cuales variaron entre un 0.8 y un 4 % del valor de Ct.

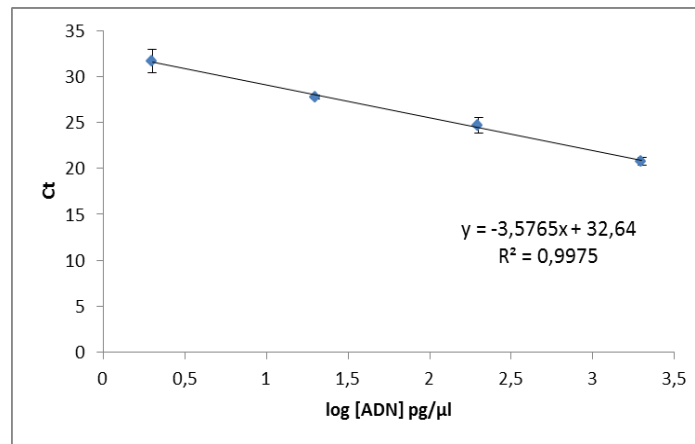


Figura 29. Curva de calibración (Ct vs. log [ADN]) para un estándar de ADN de *Fusarium* portador del gen TRI5. Utilizándose la pendiente de la recta se calculó la eficiencia de la reacción. Las reacciones se realizaron por duplicado. Las barras muestran el intervalo de confianza ($\alpha = 0,05$) para cada punto.

Con este diseño se obtuvo linealidad ($R^2 = 0,9975$) entre 2 ng y 2 pg de ADN, por lo cual el límite de detección se definió como 2 pg de ADN y el rango dinámico entre 2 ng y 2 pg de ADN. Fuera de este rango no se mantuvo la linealidad entre los valores de Ct y la concentración de ADN. El límite de detección para el ensayo fue similar al reportado por Burlakoti *et al.* (2007), el cual fue de 5 pg de ADN (rango dinámico de 50 ng a 5 pg). La eficiencia calculada a partir de la pendiente de la curva estándar fue del 103%. Este valor es aceptable, dado que para ensayos de PCR en tiempo real se esperan eficiencias de entre 90–110% ($3,6 > \text{pendiente} > 3,1$) (Rebrikov & Trofimov, 2006).

En un ensayo independiente del anterior, se determinó el efecto de la matriz de trigo en la cuantificación del ADN fúngico en la muestra. Los resultados del ensayo de efecto matriz para tres diluciones (1/5, 1/10 y 1/20), se muestran en la **Tabla 4**. Se pudo observar que diluciones menores a 1/20 (1/5 y 1/10) presentan diferencias de Ct de más

de 1 ciclo, respecto al valor obtenido para ADN en agua, observándose mayores Ct cuanto menos diluida se encuentra la matriz. Esto indica que las medidas de Ct obtenidas en matrices sin diluir o diluidas en proporciones menores a 1/20 subestiman la concentración de ADN en la muestra, debido a la presencia de inhibidores de la reacción de amplificación en la misma. El valor de Ct obtenido para la muestra de ADN fúngico solubilizada en la dilución 1/20 de la matriz presentó intervalos de confianza solapantes con el valor determinado para la misma muestra preparada en agua, siendo la diferencia entre los promedios menor de 0.5. De acuerdo a estos resultados y según Cankar *et al.*, (2006) y CRL-GMFF (2004), se estableció que la dilución óptima de las extracciones de ADN de trigo debía ser mayor o igual a 1/20 para evitar interferencias en la medida.

Tabla 4. Resultados del ensayo de efecto matriz para la amplificación del gen TRI5, para dos matrices de trigo. Se muestran los promedios de los valores de Ct obtenidos y su correspondiente intervalo de confianza ($\alpha = 0,05$).

Muestra	Ct
ADN micelio 10 ng en agua	14,4 ± 0,1
ADN micelio 10 ng en matriz dilución 1/20	14,8 ± 0,4
ADN micelio 10 ng en matriz dilución 1/10	15,1 ± 0,5
ADN micelio 10 ng en matriz dilución 1/5	15,5 ± 0,4
Blanco	30,2 ± 0,7

4.4.2 Puesta a punto de un método de PCR en tiempo real para de determinación de hongos productores de nivalenol

Para la determinación de la incidencia de *Fusarium* productores de nivalenol en granos de trigo, se utilizó el método de PCR en tiempo real, el cual utiliza una región del gen TRI12 que codifica para la bomba de eflujo de tricotecenos. En el momento en que se realizó este trabajo no fue posible encontrar en bibliografía un protocolo de PCR en tiempo real que permitiera cuantificar específicamente *Fusarium* productores de nivalenol, por lo cual se decidió diseñar un método para realizar dicha determinación. Utilizando el programa AlleleID® (Primer Biosoft), se obtuvieron los primers específicos Fw NIVT12 (5'-TACATCTATATCATCATTAGTG-3') y Rv NIVT12 (5'-GAAGATACCTATCCAGTC-3'), que amplifican un fragmento de 104pb del

mencionado gen, a partir de hongos del FGSC quimiotipo NIV. La temperatura óptima de anillado para dichos primers en presencia de ADN de *Fusarium* quimiotipo NIV, determinada en un ensayo de PCR convencional en un termociclador con gradiente de temperatura fue de 54°C. La capacidad de amplificación específica de los primers fue corroborada, ya que no se obtuvo producto de amplificación en presencia de ADN proveniente de cepas de diferente quimiotipo. En la **Figura 30** se muestran las curvas obtenidas, utilizando el método desarrollado para el análisis por PCR en tiempo real a partir de ADN de micelio de hongos pertenecientes a FGSC de los quimiotipos NIV (azul), 3ADON (amarillo) y 15ADON (rojo), con los primers específicos diseñados. En la tabla de la **Figura 30** se resumen los valores de Ct para las diferentes muestras. El valor de Ct para el micelio del hongo del quimiotipo NIV fue de 21,8, sensiblemente menor al obtenido para la misma cantidad de ADN de los quimiotipos 3ADON (Ct=32,37), 15ADON (Ct=31,73) y blanco (Ct mayor a 40, línea rosada).

La especificidad de la amplificación fue corroborada mediante curvas de desnaturalización o melting (**Figura 31**). Se obtuvo un único pico correspondiente a la Tm del producto específico (aprox. 82°C).

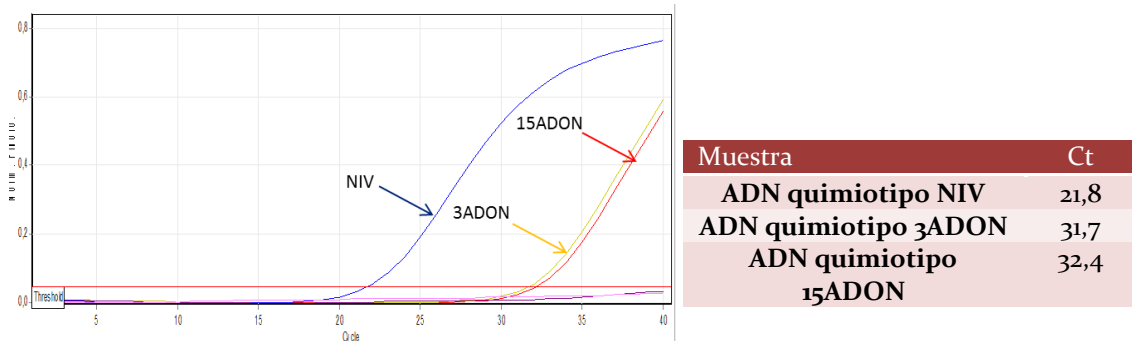


Figura 30. Ensayo preliminar donde se muestra la amplificación diferencial del ADN de micelio del quimiotipo NIV respecto a otros quimiotipos. Derecha: Gráfico de intensidad de señal vs. ciclo para los quimiotipos NIV(azul), 15 ADON (rojo) y 3ADON (amarillo). Izquierda: Tabla de valores de ciclo umbral (Ct) para los quimiotipos ensayados. Nótese que el blanco sin ADN (línea rosada) tiene un Ct mayor a 40.

Luego de corroborar la amplificación diferencial, se determinó la eficiencia de la reacción, el límite de detección y rango dinámico. Con este diseño se obtuvo linealidad ($R^2= 0.9992$) entre 2 ng y 2 pg de ADN por lo cual el límite de detección se definió como 2 pg de ADN y el rango dinámico entre 2 ng y 2 pg de ADN. Fuera de este rango no se mantuvo la linealidad entre los valores de Ct y la concentración de ADN. Las

barras de error de la curva representan los intervalos de confianza de cada punto ($\alpha = 0,05$). En ningún caso éste superó el 1,4 % del valor. Con dicho diseño se obtuvo una eficiencia del 98% (**Figura 32**), la cual es considerada aceptable según Rebrikov & Trofimov (2006).

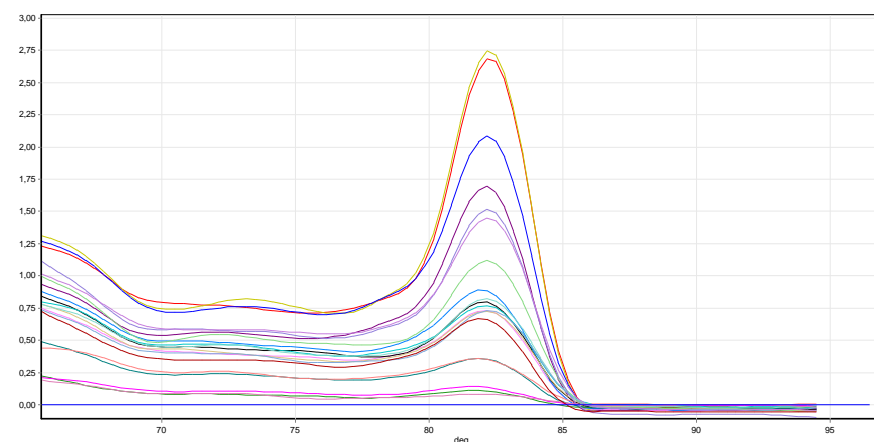


Figura 31. Curvas de desnaturalización o melting (dF/dT vs. Temperatura °C) para distintas diluciones de ADN de *F. graminearum* de la cepa F-117 en el ensayo de real time PCR del gen TRI12.

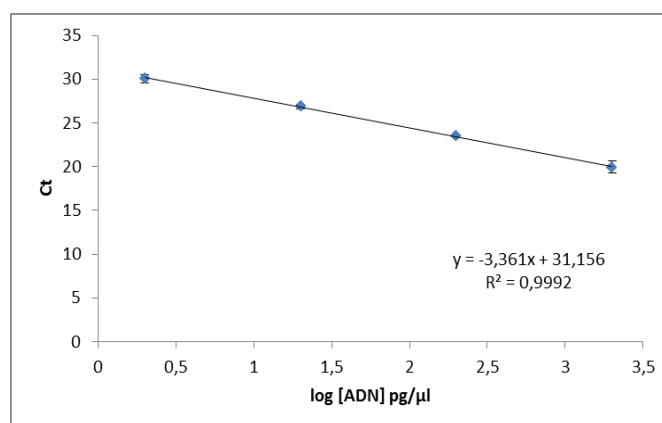


Figura 32. Curva de calibración para un estándar de ADN (Ct vs. Log [ADN]) de *Fusarium* del quimiotipo NIV. Utilizándose la pendiente de la recta se calculó la eficiencia de la reacción. Las reacciones se realizaron por duplicado. Las barras muestran el intervalo de confianza ($\alpha = 0,05$) para cada punto.

Asimismo, se realizó un ensayo independiente para evaluar el efecto de la matriz de trigo en la reacción. Para ello se probaron diferentes diluciones de extracciones de ADN de una muestra de trigo no contaminadas con *Fusarium*. Los resultados del ensayo de efecto matriz para dos diluciones (1/40 y 1/50), se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Resultados del ensayo de efecto matriz para la amplificación del gen TRI12, para dos matrices de trigo. Se muestran los promedios de los valores de Ct obtenidos y su correspondiente intervalo de confianza ($\alpha=0,05$).

Muestra	Ct
ADN micelio 10 ng	18,3 ± 0,4
ADN micelio 10 ng en matriz dilución 1/40	19,1 ± 0,3
ADN micelio 10 ng en matriz dilución 1/50	18,7 ± 0,2
Blanco	27,8 ± 0,5

Cuando el ADN fúngico se encontró solubilizado en diluciones de la matriz menores a 1/40 (1/10, 1/20 y 1/30) los valores de Ct obtenidos difirieron hasta 1,5 con respecto al valor de Ct obtenido para ADN fúngico en agua (no se muestra). Incluso cuando se utilizó la dilución 1/40 de la matriz, la diferencia de Ct resultó de 0,8, siendo esta diferencia de 0,4 en el caso de la dilución 1/50. Dado que según (Cankar et al., 2006; Community Reference Laboratory for GM Food and Feed CRL-GMFF, 2004) se consideraron no significativas diferencias entre los valores de Ct del ADN en agua y el ADN en matriz de hasta 0,5, se determinó en este caso, que para evitar el efecto matriz de las muestras de trigo, era necesario diluir la misma un factor mayor o igual a 1/50. Asimismo, el valor de Ct obtenido para la muestra de ADN fúngico solubilizada en la dilución 1/50 de la matriz presentó intervalos de confianza solapantes con el valor determinado para la misma solubilizada en agua. Las medidas de Ct obtenidas en matrices sin diluir o diluidas en proporciones menores a 1/50 subestimaban la concentración de ADN en la muestra, debido a la presencia de inhibidores de la reacción de amplificación en la misma. Por tanto, para evitar interferencias al utilizar este método, se determinó que las muestras de trigo a ser analizadas deberían ser diluidas al menos 50 veces.

Este método fue desarrollado en 2011-2012. En junio de 2012 se publicó el trabajo de Nielsen et al. (2012) presentando el desarrollo de un método con el mismo fin. Dicho trabajo se basó también en la amplificación de una región del gen TRI12, utilizando diferentes primers, con los cuales se lograba la amplificación de un fragmento de 60 pares de bases del gen. La eficiencia del ensayo reportada por estos autores fue de 91% y el límite de detección para ADN de hongo de quimiotipo NIV fue de 1 pg, con un rango dinámico de 1pg a 3 ng, similar a lo encontrado en esta tesis. A su vez, fue necesario diluir el ADN extraído del trigo en un factor de 10 para evitar el efecto matriz.

En el caso del método desarrollado en esta tesis fue necesaria una dilución mayor (1/50) para lograr el mismo efecto. Sin embargo, debe considerarse que en el trabajo de Nielsen et al. (2012) las extracciones se realizaron utilizando la mitad de muestra, por lo cual la diferencia de sensibilidad entre métodos es de 2.5 veces. Dado que la técnica de extracción utilizada en esta tesis fue específicamente diseñada para maíz (CRL-GMFF, 2008), sería fundamental ensayar la técnica de extracción planteada por Nielsen et al. (2012), con el fin de aumentar la sensibilidad del método.

Dados los resultados obtenidos en cuanto a la caracterización de los quimiotipos de especies pertenecientes al FGSC en Uruguay (apartado 4.1.2), donde se encontró un porcentaje mayoritario de aislamientos del quimiotipo NIV, en nuevas zonas de producción de trigo en el este del país, se considera de vital importancia contar con un método rápido, sencillo y sensible de monitoreo de la contaminación por hongos con este potencial micotoxigénico. La confirmación de la prevalencia de este tipo de patógenos asociado a diferentes zonas de producción del país, permitiría predecir una posible contaminación con la toxina nivalenol en trigo y productos derivados. La determinación de niveles de esta toxina, en especial en muestras provenientes de dichas zonas, se convertiría en una necesidad para asegurar la inocuidad de los productos derivados.

4.4.3 Puesta a punto de un método de PCR en tiempo real para la determinación de hongos productores de zearalenona

La zearalenona es una toxina con actividad estrogénica en mamíferos, que causa problemas reproductivos en cerdos de granja, animales de experimentación y humanos (Gaffoor & Trail, 2006; Toppari et al., 1996). Es producida por varias especies de hongos, entre ellos los pertenecientes al FGSC y su presencia en trigo ha sido demostrada en numerosos trabajos (Marasas et al., 1984; Vaamonde et al., 1987; Yazar & Omurtag, 2008; Zinedine et al., 2007). En nuestro país, su presencia en trigo no está regulada ni se monitorea de forma rutinaria, sin embargo el Reglamento Bromatológico Nacional establece un límite máximo admisible de 200 ppb en maíz o cebada en grano (Reglamento Bromatológico Nacional, 1994).

Para el análisis de la presencia de hongos productores de zearalenona en trigo se optimizó un método de PCR en tiempo real utilizando primers específicos para una región del gen que codifica para la enzima Poliquétido Sintaza 4 (*PKS4*), esencial para la síntesis de dicha micotoxina (Meng et al., 2010). Para la optimización del ensayo se

Estrategias para la identificación y caracterización de patógenos causantes de fusariosis en trigo

utilizó ADN de micelio purificado de la cepa F-117 de nuestra colección, la cual fue identificada como productora de zearalenona *in vitro*. En realidad la producción de zearalenona fue verificada en todas las cepas ensayadas, las cuales habían sido aisladas de muestras de trigo nacional. Estos resultados determinan el riesgo de la presencia de dicha toxina en muestras de trigo nacional, por lo cual sería importante realizar análisis para evaluar la posible contaminación.

La especificidad de la amplificación del método seleccionado fue corroborada mediante curvas de desnaturalización o melting (**Figura 33**). En todos los casos se obtuvo un único pico correspondiente a la T_m del producto específico (aprox. 85°C). Asimismo se corroboró la amplificación de un único fragmento de 280pb por electroforesis en gel de agarosa 1% (no se muestra),

Luego se determinó la eficiencia de la reacción, el límite de detección y rango dinámico. Con este diseño se obtuvo linealidad ($R^2= 0.9916$) entre 2 ng y 4 pg de ADN, por lo cual el límite de detección se definió como 4 pg de ADN y el rango dinámico entre 2 ng y 4 pg de ADN. Fuera de este rango no se mantuvo la linealidad entre los valores de C_t y la concentración de ADN. Las barras de error de la curva representan los intervalos de confianza de cada punto ($\alpha = 0,05$). En ningún caso éste superó el 3,4% del valor. Con dicho diseño se obtuvo una eficiencia del 105% (**Figura 34**), la cual es considerada aceptable según Rebrikov & Trofimov (2006).

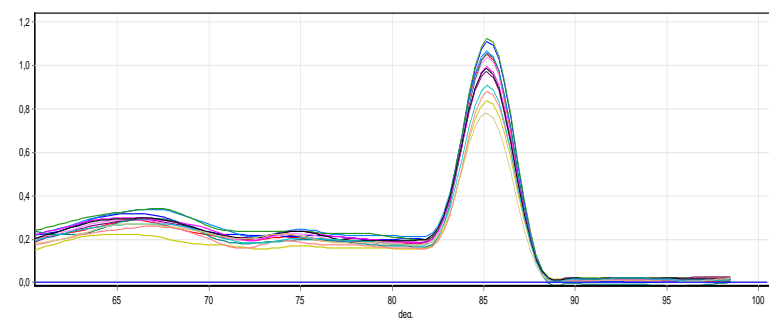


Figura 33. Curvas de desnaturalización (dF/dT vs. Temperatura (°C)) para distintas diluciones de ADN de *F. graminearum* en el ensayo de real time PCR del gen *PKS4*.

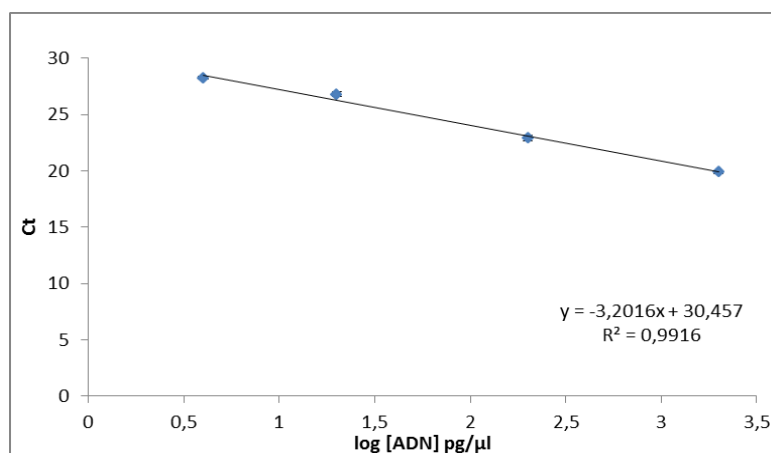


Figura 34. Curva de calibración para un estándar (Ct vs. Log [ADN]) de ADN de *Fusarium* productor de zearalenona. Utilizándose la pendiente de la recta se calculó la eficiencia de la reacción. Las reacciones se realizaron por duplicado. Las barras muestran el intervalo de confianza ($\alpha = 0,05$) para cada punto.

Asimismo, en un ensayo independiente se evaluó el efecto de la matriz de trigo en la reacción. Los resultados del ensayo de efecto matriz para dos diluciones (1/30 y 1/40), se muestran en la **Tabla 6**. Se determinó el efecto matriz de las muestras de trigo, debiéndose diluir la muestra en un factor mayor o igual a 1/40 para evitar interferencias en la medida. Se consideró como óptima la mínima dilución, la cual presentó un intervalo de confianza de Ct solapante con el valor de la misma cantidad de ADN diluido en agua. Se consideraron aceptables diferencias entre Ct de ADN en agua y ADN en matriz de hasta un 0,5 Ct (Cankar et al., 2006; Community Reference Laboratory for GM Food and Feed CRL-GMFF, 2004). Diluciones menores a 1/40 (se ensayaron diluciones 1/10, 1/20 y 1/30) presentan diferencias de hasta 1,5 Ct respecto al valor de ADN en agua. Esto indica que las medidas de Ct obtenidas en matrices sin diluir o diluidas en proporciones menores a 1/40 subestiman la concentración de ADN en la muestra, debido a la presencia de inhibidores de la reacción de amplificación en la misma. Por tanto, para evitar interferencias, las muestras de trigo a ser ensayadas debieron ser diluidas al menos 40 veces.

Tabla 6. Resultados del ensayo de efecto matriz para la amplificación del gen PKS4, para dos matrices de trigo. Se muestran los promedios de los valores de Ct obtenidos y su correspondiente intervalo de confianza ($\alpha = 0,05$).

Muestra	Ct
ADN micelio 10 ng	19,8 ± 0,1
ADN micelio 10 ng en matriz 1/10	22,1 ± 0,2
ADN micelio 10 ng en matriz 1/20	20,4 ± 0,6
ADN micelio 10 ng en matriz 1/40	19,8 ± 0,4
Blanco	27,1 ± 0,5

Los autores del artículo original, Meng et al. (2010), obtuvieron un límite de detección del ensayo de 10 copias del gen por reacción. Dado que este gen presenta una copia por núcleo y cada macroconidia presenta al menos dos núcleos, esto sería al menos 5 conidias por reacción de PCR en tiempo real. Estimando una cantidad de ADN de 1 pg por cada 10 conidias (Schweigkofler et al., 2004), el límite de detección reportado sería de 0,5 pg de ADN por reacción. Este límite es menor al alcanzado por nuestro método (4 pg de ADN). Es importante destacar que en el método descrito por Meng et al. (2010) la cantidad de ADN utilizado en las reacciones de PCR en tiempo real fue el doble de la utilizada en este trabajo. El cambio en el volumen de muestra podría aumentar la sensibilidad del método utilizado en esta tesis. Sin embargo ese valor está limitado por la interferencia generada por la matriz. Meng et al (2010) no encontraron interferencias de la matriz en la amplificación. Se debe tener en cuenta que su método fue desarrollado para el estudio de hongos productores de zearalenona en maíz, no en trigo como en el caso de esta tesis.

4.4.4 Análisis de muestras de trigo por PCR en tiempo real

Con la metodología de análisis ajustada, se analizaron muestras de ADN extraído de granos de trigo contaminados con hongos del FGSC, provenientes de dos localidades del departamento de Cerro Largo y una de Conchillas en el departamento de Colonia. Las muestras provenientes del departamento de Cerro Largo corresponden al año 2011 y presentan un porcentaje de infección por FGSC del 57% para la muestra CL1 y 44% para la muestra CL2, con predominio de aislamientos del quimiotipo NIV sobre los del quimiotipo 15ADON (75% y 50% respectivamente). En la muestra del departamento de

Colonia, en cambio, sólo un porcentaje menor de los aislamientos presentaron el quimiotipo NIV (6%).

Previamente se determinó por triplicado, la cantidad de ADN por mg de micelio húmedo y por mg de micelio seco (biomasa fúngica). Se realizaron tres extracciones de ADN a partir de 60 mg de micelio húmedo obteniéndose en promedio $2,8 \pm 0,4$ μg de ADN por extracción. A su vez se determinó que en promedio $1,006 \pm 0,001$ g de micelio húmedo se corresponden con $0,25 \pm 0,01$ g de micelio seco (biomasa fúngica). Teniendo en cuenta estos valores, se calculó, a partir de la concentración de ADN en cada muestra analizada, el porcentaje de biomasa fúngica en trigo.

La **Tabla 7** muestra los resultados obtenidos en cada caso, expresados como microgramos de ADN de hongo productor de tricotecenos por miligramo de trigo y como porcentaje de biomasa fúngica en trigo.

Tabla 7. Análisis de muestras de trigo por PCR en tiempo real con primers específicos para productores de tricotecenos.

Muestra de trigo	Ct promedio	ADN(μg)/mg de trigo	Biomasa fúngica en trigo %
Cerro Largo 1	$25,6 \pm 0,2$	$0,95 \pm 0,09$	$0,50 \pm 0,05$
Cerro Largo 2	$26,8 \pm 0,2$	$0,43 \pm 0,06$	$0,23 \pm 0,03$
Conchillas Colonia	$22,4 \pm 0,3$	$7,5 \pm 0,6$	$3,9 \pm 0,9$
Trigo no contaminado	$33,7 \pm 0,2$	-----	-----

Se determinaron a su vez, los microgramos de ADN de hongos del quimiotipo NIV por miligramo de trigo y el porcentaje de biomasa fúngica. Los resultados se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Análisis de muestras de trigo por PCR en tiempo real con primers específicos para productores de nivalenol.

Muestra de trigo	Ct promedio	ADN(μg)/mg de trigo	Biomasa fúngica en trigo %
Cerro Largo 1	$27,4 \pm 0,2$	$0,26 \pm 0,03$	$0,14 \pm 0,02$
Cerro Largo 2	$27,2 \pm 0,1$	$0,27 \pm 0,06$	$0,16 \pm 0,01$
Conchillas Colonia	$25,3 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,1$
Trigo no contaminado	$31,3 \pm 0,1$	-----	-----

Asimismo se establecieron los microgramos de ADN de hongo productor de zearalenona por miligramo de trigo y el porcentaje de biomasa fúngica. Los resultados se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Análisis de muestras de trigo por PCR en tiempo real con primers específicos para productores de zearalenona

Muestra de trigo	Ct promedio	ADN(μ g)/mg de trigo	Biomasa fúngica en trigo %
Cerro Largo 1	24,9 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1
Cerro Largo 2	23,9 \pm 0,2	2,3 \pm 0,2	1,2 \pm 0,1
Conchillas Colonia	22,6 \pm 0,1	5,7 \pm 0,1	3,0 \pm 0,1
Trigo no contaminado	29,5 \pm 0,3	-----	-----

El valor obtenido de ADN de hongo por milígramo de trigo y el porcentaje de biomasa fúngica en granos de trigo, para el caso de los hongos productores de tricotecenos, condice con los porcentajes de infección de los trigos analizados, siendo éstos mayores para el caso de la muestra “Cerro Largo 1” que para “Cerro Largo 2” (Tabla 7). Sería importante continuar este trabajo analizando un mayor número de muestras y realizando un posterior análisis de datos para determinar si es posible establecer una relación cuantitativa entre los resultados de PCR en tiempo real y porcentaje de infección. El porcentaje biomasa fúngica de productores de nivalenol, en todos los casos, fue menor al de los productores de tricotecenos (Tablas 7 y 8), lo cual es coherente con el hecho de que los productores de nivalenol son un subgrupo de los productores de tricotecenos en general. Sin embargo, para el caso de los productores de zearalenona, los porcentajes obtenidos son mayores que para los productores de tricotecenos en la muestra 2 (Tabla 9), lo cual puede deberse a que los productores de zearalenona incluirían a otros hongos de especies fuera del FGSC también presentes en trigo, como el complejo de especies *F. equiseti* (Stępień et al., 2012). Asimismo los primers utilizados son específicos no solo para productores de zearalenona pertenecientes al FGSC sino para otros *Fusarium* como *F. crookwellense* y *F. culmorum* (Burlakoti et al., 2007).

Cabe destacar que Burlakoti et al. (2007) encontraron una correlación positiva entre el contenido de ADN de FGSC estimado mediante PCR en tiempo real con primers específicos para el gen TRI5 (productores de tricotecenos) y la severidad de la enfermedad y con el contenido de DON en trigo. De forma similar Nielsen et al. (2012) encontraron una correlación positiva entre el porcentaje de hongos del quimiotipo NIV (estimado por PCR en tiempo real con primers específicos para el gen TRI12) y el contenido de nivalenol en muestras de trigo. Asimismo Atoui et al. (2012) encontraron una correlación positiva entre el contenido de ADN de *Fusarium* spp. productores de zearalenona (estimado por PCR en tiempo real con primers específicos para el gen PKS13) y el contenido de zearalenona en muestras de maíz. Esto da cuenta de la

efectividad de los métodos de PCR en tiempo real para la estimación de potencial contaminación con micotoxinas.

Si bien aún se requiere ajustar los métodos propuestos, analizando un mayor número de muestras de trigo contaminado y correlacionar los resultados con los porcentajes de infección y grado de contaminación con micotoxinas, el uso de esta técnica podría permitir predecir de forma rápida el grado de contaminación de muestras de trigo con tricotecenos, en particular nivalenol y zearalenona.

5. CONCLUSIONES

Los resultados presentados en esta Tesis muestran por primera vez la diversidad de hongos dentro del complejo de especies *Fusarium graminearum* (FGSC) asociados a FHB en trigo en Uruguay. Este es el primer reporte de la especie *F. asiaticum*, *F. cortaderiae* y *F. brasiliicum* del quimiotipo NIV en el país. La predominancia del quimiotipo NIV entre los aislamientos de las nuevas zonas de producción en el departamento de Cerro Largo cercano a la frontera con Brasil y a zonas arroceras, es de gran importancia en materia de seguridad alimentaria y producción animal, dado la mayor toxicidad del nivalenol respecto al deoxinivalenol. Asimismo, si bien dichos aislamientos resultaron ser menos agresivos que los del quimiotipo 15ADON, también resultaron menos sensibles al fungicida tebuconazol.

En este trabajo se logró desarrollar un método rápido y sencillo de identificación de las especies principales encontradas en nuestro país, reduciendo el número de muestras a ser analizadas por secuenciación. Asimismo se desarrollaron métodos de PCR en tiempo real para el monitoreo de la contaminación fúngica en granos de trigo contaminados.

No se constató presencia de la micotoxina nivalenol en granos de trigo contaminado, sin embargo, se requieren estudios adicionales de tipo y niveles de micotoxinas en muestras de trigo, para determinar la implicancia de las especies encontradas en nuestro país en la posible contaminación de los granos.

REFERENCIAS

Alexander NJ, McCormick SP, Waalwijk C, van der Lee T, Proctor RH (2011) The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium*. *Fungal Genetics and Biology* **48**: 485-495

Alexander NJ, Proctor RH, McCormick SP (2009) Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. *Toxin Reviews (formerly Journal of Toxicology: Toxin Reviews)* **28**: 198-215

Alvarez CL, Azcarate MP, Pinto VF (2009) Toxigenic potential of *Fusarium graminearum* sensu stricto isolates from wheat in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* **135**: 131-135

Aoki T, O'Donnell K, Homma Y, Lattanzi AR (2003) Sudden-death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex--*F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America. *Mycologia* **95**: 660-684

Aoki T, O'Donnell K (1999) Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp nov., formerly recognized as the Group 1 population of *F. graminearum*. *Mycologia* **40**: 443-453

Aoki T, Ward TJ, Kistler HC, O'Donnell K (2012) The *Fusarium graminearum* species complex comprises at least 16 phylogenetically distinct head blight pathogens. *Meeting Abstract*

Aoki T, Ward, T.J., Kistler, H.C., O'Donnell, K. (2012) Systematics, Phylogeny and Trichothecene Mycotoxin Potential of *Fusarium* Head Blight Cereal Pathogens *Mycotoxins* **62**: 91-102

Arpino P (1992) Combined liquid chromatography mass spectrometry. Part III. Applications of thermospray. *Mass Spectrometry Reviews* **11**: 3-40

Arunachalam C, Doohan FM (2012) Trichothecene toxicity in eukaryotes: Cellular and molecular mechanisms in plants and animals. *Toxicology letters* **217**: 149-158

Astolfi P, Reynoso MM, Ramirez ML, Chulze SN, Alves TCA, Tessmann DJ, Del Ponte EM (2012) Genetic population structure and trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat in southern Brazil *Plant Pathology* **61**: 289-295

Atoui A, El Khoury A, Kallassy M, Lebrihi A (2012) Quantification of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* by real-time PCR system and zearalenone assessment in maize. *International journal of food microbiology* **154**: 59-65

Becher R, Hettwer U, Karlovsky P, Deising HB, Wirsig SG (2010) Adaptation of *Fusarium graminearum* to tebuconazole yielded descendants diverging for levels of fitness, fungicide resistance, virulence, and mycotoxin production. *Phytopathology* **100**: 444-453

Estrategias para la identificación y caracterización de patógenos causantes de fusariosis en trigo

Berthiller F, Schuhmacher R, Buttinger G, Krska R (2005) Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1062**: 209-216

Berthiller F, Sulyok M, Krska R, Schuhmacher R (2007) Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. *International Journal of Food Microbiology* **119**: 33-37

Blandino M, Minelli L, Reyneri A (2006) Strategies for the chemical control of Fusarium head blight: effect on yield, allelopathic parameters and deoxynivalenol contamination in winter wheat grain. *European Journal of Agronomy* **25**: 193-201

Bogliacini A, Aguiá L, Vázquez D, Tihista H, Suburú G, Cadenazzi M, Cea J, Moriyama C, Godiño M. (2012) CARACTERIZACIÓN DE LA ZAFRA DE TRIGO 2011-2012. En: MGAP Mesa Nacional de Trigo: www.mgap.gub.uy/dgssaa/PlanNacSilos/enero/caracterizacion%20Trigo%20zafra%2011_12.pdf, consultado mayo 2013

Boutigny AL, Ward TJ, Van Coller GJ, Flett B, Lamprecht SC, O'Donnell K, Viljoen A (2011) Analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat, barley and maize in South Africa provides evidence of species-specific differences in host preference. *Fungal Genetics and Biology* **48**: 914-920

Brandfass C, Karlovsky P (2008) Upscaled CTAB-based DNA extraction and real-time PCR assays for *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* DNA in plant material with reduced sampling error. *International Journal of Molecular Sciences* **9**: 2306-2321

Brent, K. J., & Hollomon, D. W. (1995). Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed? GIFAP, Bruselas

Burlakoti RR, Estrada R, Rivera VV, Boddada A, Secor GA, Adhikari TB (2007) Real-time PCR Quantification and Mycotoxin Production of *Fusarium graminearum* in Wheat Inoculated with Isolates Collected from Potato, Sugar Beet, and Wheat. *Phytopathology* **97**: 835-841

Bushnell WR, Hazen BE, Pritsch C (2003) Histology and physiology of Fusarium head blight. In *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*, Leonard WB (ed), Vol. St. Paul, MN, pp 44-83. APS Press

Bustin, S. A., & Nolan, T. (2004). AZ of quantitative PCR. La Jolla. CA: International University Line pp: 910

Cankar K, Stebih D, Dreo T, Zel J, Gruden K (2006) Critical points of DNA quantification by real-time PCR--effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnology* **6**: 37

Cardoza RE, Malmierca MG, Hermosa MR, Alexander NJ, McCormick SP, Proctor RH, Tijerino AM, Rumbero A, Monte E, Gutiérrez S (2011) Identification of Loci and Functional Characterization of Trichothecene Biosynthesis Genes in Filamentous Fungi of the Genus *Trichoderma*. *Applied and environmental microbiology* **77**: 4867-4877

Carmona M., (2008) *Manual para el manejo Integrado de enfermedades en el cultivo de trigo*, Buenos Aires pp: 32

- Carter JP, Rezanoor HN, Desjardins AE, Nicholson P (2000) Variation in *Fusarium graminearum* isolates from Nepal associated with their host of origin. *Plant Pathology* **49**: 452-460.
- Carter JP, Rezanoor HN, Holden D, Desjardins AE, Plattner RD, Nicholson P (2002) Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of *Fusarium graminearum*. *European Journal of Plant Pathology* **108**: 573-583
- Cockerham CC, Weir BS (1984) Covariances of relatives stemming from a population undergoing mixed self and random mating. *Biometrics* **40**: 157-164
- Codex Alimentarius. (1999) Documento de posición sobre la zearalenona. In Unidas OdIN, Salud OMpladl (eds.), *Comité del Codex sobre aditivos alimentarios y contaminantes de los alimntos, C.C.F.A.C.*, La Haya, Países Bajos, Vol. 2013.
- Community Reference Laboratory for GM Food and Feed CRL-GMFF. (2004) Seeds Sampling and DNA Extraction of Oilseed Rape. In Centre ByGUIfHaCPDJR (ed.), *Report on the Validation of an Oilseed Rape DNA Extraction Method from Seeds* Europea Comission, Italy, Vol. CRLVL14/04XP, pp. 1-15.
- CONTAM EPoCitFC (2011) Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food *EFSA Journal* **9**: 124
- CRL-GMFF CRLfGFaF. (2008) Maize Seeds Sampling and DNA Extraction - Report on the Validation of a DNA Extraction Method from Maize Seeds and Grains.
- Cromey M, Lauren D, Parkes R, Sinclair K, Shorter S, Wallace A (2001) Control of *Fusarium* head blight of wheat with fungicides. *Australasian Plant Pathology* **30**: 301-308
- Champeil A, Fourbet JF, Dore T (2004) Effects of grain sampling procedures on *Fusarium* mycotoxin assays in wheat grains. *Journal of agricultural and food chemistry* **52**: 6049-6054
- Chandler EA, Simpson DR, Thomsett MA, Nicholson P (2003) Development of PCR assays to Tri7 and Tri13 trichothecene biosynthetic genes, and characterization of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **62**: 355-367
- Del Ponte EM, Garda-Bufferon J, Badiale-Furlong E (2012) Deoxynivalenol and nivalenol in commercial wheat grain related to *Fusarium* head blight epidemics in southern Brazil. *Food Chemistry* **132**: 1087-1091
- Demeke T, Clear RM, Patrick SK, Gaba D (2005) Species-specific PCR-based assays for the detection of *Fusarium* species and a comparison with the whole seed agar plate method and trichothecene analysis. *International journal of food microbiology* **103**: 271-284
- Desjardins AE, Proctor RH (2010) Genetic diversity and trichothecene chemotypes of the *Fusarium graminearum* clade isolated from maize in Nepal and identification of a putative new lineage. *Fungal biology* **115**: 38-48
- Desmond OJ, Manners JM, Stephens AE, Maclean DJ, Schenk PM, Gardiner DM, Munn AL, Kazan K (2008) The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production,

Estrategias para la identificación y caracterización de patógenos causantes de fusariosis en trigo

programmed cell death and defence responses in wheat. *Molecular Plant Pathology* **9**: 435-445

Díaz de Ackermann M, Kohli M (1997a) Research on Fusarium head blight in Uruguay. In *Fusarium head scab: Global status and future prospects.*, Dubin HJ, Gilchrist L, Reeves J, McNab A (eds), pp 13-18 DF, Mexico: CIMMYT

Díaz de Ackermann M, Kohli MM (1997b) Research on Fusarium head blight of wheat in Uruguay. In *Fusarium head scab: Global status and prospects CIMMYT*, pp 13-18. DF, México

Díaz de Ackermann M, Pereyra S, Stewart S (2002) Antecedentes y perspectivas de control de fusariosis de la espiga de trigo. In *Jornada Técnica Cultivos de Invierno (Actividades de Difusión; 282)*, pp 1-9.

Diguta C, Vincent B, Guilloux-Benatier M, Alexandre H, Rousseaux S (2011) PCR ITS-RFLP: A useful method for identifying filamentous fungi isolates on grapes. *Food microbiology* **28**: 1145-1154

Dill-Macky, R. (2010). Fusarium Head Blight (Scab), pp. 34-36. In: *Compendium of Wheat Diseases and Pests*, 3rd ed.; Bockus, W.W., Bowden, R.L., Hunger, R.M., Morrill, W.L., Murray, T.D., and Smiley, R.W. Eds.; The American Phytopathological Society, St. Paul, MN; 171 p.

Dill-Macky R, Jones R (2000) The effect of previous crop residues and tillage on Fusarium head blight of wheat. *Plant Disease* **84**: 71-76

Dorak MT (2007) *Real-time PCR*: Taylor & Francis pp: 333

Ekblad A, Wallander H, Näsholm T (1998) Chitin and ergosterol combined to measure total and living fungal biomass in ectomycorrhizas. *New Phytologist* **138**: 143-149

Eriksen GS, Pettersson H (2004) Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Animal Feed Science and Technology* **114**: 205-239

Ernst O, (2011) Cambios en la agricultura, situación actual y demandas de investigación In: *Limitaciones para la productividad de trigo y cebada*: Departamento de Publicaciones de la Facultad de Agronomía, Montevideo.

European Commission E. (2006) Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, pp. 5-24.

European Union EU (2012) COMMISSION REGULATION (EU) No 594/2012 of 5 July 2012 amending Regulation (EC) 1881/2006 as regards the maximum levels of the contaminants ochratoxin A, non dioxin-like PCBs and melamine in foodstuffs. *Official Journal of the European Union* **L218**

Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) ARLEQUIN ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform* **1**: 47-50

FAO/WHO ECoFAJ (2007) *Evaluation of certain food additives and contaminants: sixty-eighth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*, Vol. 947: World Health Organization.

Fredlund EG, A.; Olsen, M.; Börjesson, T.; Spliid, N.H.H.; Simonsson, M. (2008) Method evaluation of *Fusarium* DNA extraction from mycelia and wheat for down-stream real-time PCR quantification and correlation to mycotoxin levels. *Journal of Microbiological Methods* **73**: 33-40

Gaffoor I, Trail F (2006) Characterization of Two Polyketide Synthase Genes Involved in Zearalenone Biosynthesis in *Gibberella zeae*. *Applied and environmental microbiology* **72**: 1793-1799

Gale LR, Chen LF, Hernick CA, Takamura K, Kistler HC (2002) Population Analysis of *Fusarium graminearum* from Wheat Fields in Eastern China. *Phytopathology* **92**: 1315-1322

Gale LR, Harrison SA, Ward TJ, O'Donnell K, Milus EA, Gale SW, Kistler HC (2011) Nivalenol-type populations of *Fusarium graminearum* and *F. asiaticum* are prevalent on wheat in southern Louisiana. *Phytopathology* **101**: 124-134

Gardes M, Bruns TD (1996) ITS-RFLP matching for identification of fungi. In *Species Diagnostics Protocols*, pp 177-186. Springer

Geiser DM (2003) Practical molecular taxonomy of fungi. En: Lange L and Tkacz J (eds) *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Medicine and Agriculture*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Geiser DM, Jimenez-Gasco MM, Kang S, Makalowska I, Veeraraghavan N, Ward TJ, Zhang N, Kuldau GA, 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 DM, Juba JH, Wang B, Jeffers SN (2001) *Fusarium hostae* sp. nov., a relative of *F. redolens* with a *Gibberella* teleomorph. *Mycologia* **93**: 670-678

Gherbawy Y, Voigt K (2010) *Molecular identification of fungi*: Springer, Berlin.

González FJ, Walls S, Mancilla M (2005) Detection by PCR-RFLP of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* causal agent of fusariosis in strawberry. *Bol micol* **20**: 63-72

Goswani RS, Kistler HC (2004) Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology* **5**: 515-525

Hammond-Kosack K, Urban M, Baldwin T, Daudi A, Rudd J, Keon J, Lucas J, Maguire K, Kornyukhin D, Jing H (2004) Plant pathogens: how can molecular genetic information on plant pathogens assist in breeding disease resistant crops. In *4th International Crop Science Congress*. Disponible en: http://www.cropscience.org.au/icsc2004/pdf/2138_hammond-kosack.pdf.

Hughes DM, Gahl MJ, Graham CH, Grieb SL (1999) Overt signs of toxicity to dogs and cats of dietary deoxynivalenol. *Journal of Animal Science* **77**: 693-700

Ivic D, Sever Z, 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**: 35-42

Estrategias para la identificación y caracterización de patógenos causantes de fusariosis en trigo

Jansen C, von Wettstein D, Schafer W, Kogel KH, Felk A, Maier FJ (2005) Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 16892-16897

Jeon J-J, Kim H, Kim H-S, Zeller KA, Lee T, Yun S-H, Bowden RL, Leslie JF, Lee Y-W (2003) Genetic diversity of *Fusarium graminearum* from maize in Korea. *Fungal Genetics Newsletter* **50**: 142

Ji L, Cao K, Wang S (2007) Determination of deoxynivalenol and nivalenol chemotypes of *Fusarium graminearum* from China by PCR assay. *J Phytopathol* **155**: 505-512

Jimenez M, Manez M, Hernandez E (1996) Influence of water activity and temperature on the production of zearalenone in corn by three *Fusarium* species. *International journal of food microbiology* **29**: 417-421

Karugia GW, Suga H, Gale LR, Nakajima T, Tomimura K, Hyakumachi M (2009) Population structure of the *Fusarium graminearum* species complex from a single Japanese wheat field sampled in two consecutive years. *Plant Disease* **93**: 170-174

Kikot G (2012) Caracterización bioquímica, fenotípica y molecular de aislamientos de *Fusarium graminearum* provenientes de la región pampeana en relación a la patogenicidad. Facultad de Ciencias Exactas, La Plata.

Kim YT, Lee YR, Jin J, Han KH, Kim H, Kim JC, Lee T, Yun SH, Lee YW (2005) Two different polyketide synthase genes are required for synthesis of zearalenone in *Gibberella zeae*. *Molecular Microbiology* **58**: 1102-1113

Kristensen R, Torp M, Kosiak B, Holst-Jensen A (2005) Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. *Mycological Research* **109**: 173-186

Krska R (2009) Mycotoxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **395**: 1203-1204

Krska R, Molinelli A (2009) Rapid test strips for analysis of mycotoxins in food and feed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **393**: 67-71

Krska R, Schubert-Ullrich P, Josephs RD, Emteborg H, Buttinger G, Pettersson H, van Egmond HP, Schothorst RC, Macdonald S, Chan D (2007) Determination of molar absorptivity coefficients for major type-B trichothecenes and certification of calibrators for deoxynivalenol and nivalenol. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **388**: 1215-1226

Lattanzio VMT, Pascale M, Visconti A (2009) Current analytical methods for trichothecene mycotoxins in cereals. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **28**: 758-768

Lechoczki-Krsjak S, Tóth B, Kótai C, Martonosi I, Farády L, Kondrák L, Szabó-Hevér Á, Mesterházy Á (2008) Chemical control of FHB in wheat with different nozzle types and fungicides. *Cereal Research Communications* **36**: 677-681

Lee J, Chang IY, Kim H, Yun SH, Leslie JF, Lee YW (2009) Genetic diversity and fitness of *Fusarium graminearum* populations from rice in Korea. *Applied and environmental microbiology* **75**: 3289-3295

- Leslie JF, Summerell BA (2006) *The Fusarium Laboratory Manual*, Ames, IA, USA: Blackwell Publishing Professional.
- Liu X, Yin Y, Wu J, Jiang J, Ma Z (2010) Identification and Characterization of Carbendazim-Resistant Isolates of *Gibberella zeae*. *Plant Disease* **94**: 1137-1142
- Luo CX, Schnabel G (2008) The cytochrome P450 lanosterol 14 α -demethylase gene is a demethylation inhibitor fungicide resistance determinant in *Monilinia fructicola* field isolates from Georgia. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 359-366
- Luongo D, De Luna R, Russo R, Severino L (2008) Effects of four Fusarium toxins (fumonisin B(1), alpha-zearalenol, nivalenol and deoxynivalenol) on porcine whole-blood cellular proliferation. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* **52**: 156-162
- Luque Lara A, Borrego JJ. Sistemática bacteriana: el cronómetro molecular <http://www.encuentros.uma.es/encuentros47/cronometro.html> consultada Julio 2013.
- Ma Z, Proffer TJ, Jacobs JL, Sundin GW (2006) Overexpression of the 14 α -demethylase target gene (CYP51) mediates fungicide resistance in *Blumeriella jaapii*. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 2581-2585
- Mackay IM (2004) Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection* **10**: 190-212
- Maier FJ, Miedaner T, Hadel B, Felk A, Salomon S, Lemmens M, Kassner H, Schafer W (2006) Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (Tri5) gene in three field isolates of different chemotype and virulence. *Molecular Plant Pathology* **7**: 449-461
- Malihipour A, Gilbert J, Piercey-Normore M, Cloutier S (2012) Molecular phylogenetic analysis, trichothecene chemotype patterns, and variation in aggressiveness of *Fusarium* isolates causing Fusarium head blight in wheat. *Plant Disease* **96**: 1016-1025
- Marasas WFO, Nelson PE, Toussoun TA (1984) *Toxigenic Fusarium species. Identity and mycotoxicology*: Pennsylvania State University, Pennsylvania pp:328
- Martin F, Delaruelle C, Hilbert J-L (1990) An improved ergosterol assay to estimate fungal biomass in ectomycorrhizas. *Mycological Research* **94**: 1059-1064
- Mazzilli S, Pérez C, Ernst O (2011) Una alternativa para optimizar el uso de fungicidas para controlar fusariosis de espiga en trigo. *Agrociencia Uruguay* **15**: 60-68
- McCormick SP, Stanley AM, Stover NA, Alexander NJ (2011) Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins* **3**: 802-814
- Meneely JP, Ricci F, van Egmond HP, Elliott CT (2011) Current methods of analysis for the determination of trichothecene mycotoxins in food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **30**: 192-203
- Meng K, Wang Y, Yang P, Luo H, Bai Y, Shi P, Yuan T, Ma R, Yao B (2010) Rapid detection and quantification of zearalenone-producing *Fusarium* species by targeting the zearalenone synthase gene PKS4. *Food Control* **21**: 207-211

Estrategias para la identificación y caracterización de patógenos causantes de fusariosis en trigo

Mesterhazy A, Bartok T, Lamper C (2003) Influence of wheat cultivar, species of *Fusarium*, and isolate aggressiveness on the efficacy of fungicides for control of Fusarium head blight. *Plant Disease* **87**: 1107-1115

Michalakis Y, Excoffier L (1996) A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics* **142**: 1061-1064

Miller JD (2002) Aspects of the ecology of *Fusarium* toxins in cereals. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **504**: 19-27

Miller JD, Greenhalgh R (1991) Trichothecene chemotypes of three *Fusarium* species. *Mycologia* **83**: 121-130

Minervini F, Fornelli F, Flynn KM (2004) Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and fumonisin B 1 in a human erythroleukemia cell line. *Toxicology in Vitro* **18**: 21-28

Ministerio de Ganadería AyPM. (2001) Resolución ministerial sobre límites máximos de DON (toxina de *Fusarium*) en alimentos para animales. MGAP, Montevideo, Vol. 2012.

Mitchell A, Cho S, Regier JC, Mitter C, Poole RW, Matthews M (1997) Phylogenetic utility of elongation factor-1 alpha in Noctuoidea (Insecta: Lepidoptera): The limits of synonymous substitution. *Molecular Biology and Evolution* **14**: 381-390

Mol HG, Plaza-Bolanos P, Zomer P, de Rijk TC, Stolker AA, Mulder PP (2008) Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrixes. *Analytical Chemistry* **80**: 9450-9459

Monds RD, Cromey MG, Lauren DR, di Menna M, Marshall J (2005) *Fusarium graminearum*, *F. cortaderiae* and *F. pseudograminearum* in New Zealand: molecular phylogenetic analysis, mycotoxin chemotypes and co-existence of species. *Mycological Research* **109**: 410-420

Müllenborn C, Steiner U, Ludwig M, Oerke E-C (2008) Effect of fungicides on the complex of *Fusarium* species and saprophytic fungi colonizing wheat kernels. *European Journal of Plant Pathology* **120**: 157-166

Nakaune R, Adachi K, Nawata O, Tomiyama M, Akutsu K, Hibi T (1998) A novel ATP-binding cassette transporter involved in multidrug resistance in the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*. *Applied and environmental microbiology* **64**: 3983-3988

Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York, pp: 512

Nei M, Kumar S (2000) *Molecular evolution and phylogenetics*: Oxford University Press, Oxford, pp: 333

Nicolaisen M, Suproniene S, Nielsen LK, Lazzaro I, Spliid NH, Justesen AF (2009) Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. *Journal of Microbiological Methods* **76**: 234-240

Nicholson P, DR. S, G. W, HN. R, AK. L, DW. P, D. J (1998) Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. *Physiol Mol Plant* **53**: 17-37

Nielsen LK, Jensen JD, Nielsen GC, Jensen JE, Spliid NH, Thomsen IK, Justesen AF, Collinge DB, Jørgensen LN (2011) *Fusarium* head blight of cereals in Denmark: species complex and related mycotoxins. *Phytopathology* **101**: 960-969

Nielsen LK, Jensen JD, Rodríguez A, Jørgensen LN, Justesen AF (2012) TRI12 based quantitative real-time PCR assays reveal the distribution of trichothecene genotypes of *F. graminearum* and *F. culmorum* isolates in Danish small grain cereals. *International journal of food microbiology* **157**: 384-392

O'Donnell K, Cigelnik E, Casper HH (1998) Molecular phylogenetic, morphological, and mycotoxin data support reidentification of the Quorn mycoprotein fungus as *Fusarium venenatum*. *Fungal Genetics and Biology* **23**: 57-67

O'Donnell K, Kistler HC, Tacke BK, Casper HH (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 Sciences of the United States of America* **97**: 7905-7910

O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, Gueidan C, Crous PW, Geiser DM (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 DA, Rinaldi MG, Magnon KC, Cox PA, Revankar SG, Sanche S, Geiser DM, Juba JH, van Burik J-AH (2004a) Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus DNA sequence data and amplified fragment length polymorphism analyses: evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage and nosocomial origin. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 5109-5120

O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, Sarver BA, Balajee SA, Schroers H-J, Summerbell RC, Robert VA, Crous PW, Zhang N (2010) Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. *Journal of Clinical Microbiology* **48**: 3708-3718

O'Donnell K, Ward TJ, Aberra D, Kistler HC, Aoki T, Orwig N, Kimura M, Bjørnstad Å, Klemsdal SS (2008) Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. *Fungal Genetics and Biology* **45**: 1514-1522

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

O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC (1998) Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene

Estrategias para la identificación y caracterización de patógenos causantes de fusariosis en trigo

genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 2044–2049.

Olive DM, Bean P (1999) Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology* **37**: 1661-1669

Pan D, Calero N, Mionetto A, Bettucci L (2013) Trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* from wheat in Uruguay. *International Journal of Food Microbiology* **162**: 120-123

Panza VH (2012) Herramientas Moleculares utilizadas en estudios filogenéticos. *María del Carmen Banús* **3**(8): 4

Parry DW, Jenkinson P, McLeod L (1995) *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals—a review. *Plant Pathology* **44**: 207-238

Pascale M, Lippolis V, Maragos CM, Visconti A (2008) Recent Developments in Trichothecene Analysis. Symposium In *American Chemical Society Symposium Series* Sianta DP, Trucksess MW, Scott PM, Hermann EM (eds), Vol. 1001, pp 192-210. Washington DC, USA: American Chemical Society

Perea C, Díaz M (1980) Relevamiento de enfermedades de trigo en el Uruguay 1968-1979. *Investigaciones Agronómicas* **2**: 42-51

Pereyra S (2003) Prácticas culturales para el manejo de la fusariosis de la espiga. In *Jornada Técnica de cultivos de invierno*, Actividades de difusión 312: 1-9. INIA Mercedes

Pereyra S, Dill-Macky R (2010) Especies de *Fusarium* recuperadas de granos de trigo y cebada en Uruguay, patogenicidad y contenido de deoxinivalenol. *Agrociencia Uruguay* **14**: 33-44

Pereyra SA, Vero, S, Garmendia, G, Cabrera, M., Pianzolla, MJ. (2006) *Diversity of Fungal Populations Associated with Fusarium Head Blight in Uruguay*, En: Ban, T, Lewis, JM, Phipps, EE, (Eds.) *The Global Fusarium Initiative for International Collaboration: A Strategic Planning Workshop held at CIMMYT, El Batán, Mexico*. CIMMYT, D.F., Mexico, pp. 35-41.

Pérez-Losada M, Cabezas P, Castro-Nallar E, Crandall KA (2013) Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution* **16**:38-53

Pestka JJ (2007) Deoxynivalenol :toxicity, mechanisms and animal health risks. *Animal Feed Science and Technology* **137**: 283-298

Pestka JJ (2010) Toxicological mechanisms and potential health effects of deoxynivalenol and nivalenol. *World Mycotoxin Journal* **3**: 323-347

Pinto VEF, Terminiello LA, Basílico JC, Ritieni A (2008) Natural occurrence of nivalenol and mycotoxigenic potential of *Fusarium graminearum* strains in wheat affected by head blight in Argentina. *Brazilian Journal of Microbiology* **39**: 157-162

Piñeiro MS, Scott PM, Kanhere SR (1996) Mycotoxin producing potential of *Fusarium graminearum* isolates from Uruguayan barley. *Mycopathologia* **132**: 167-172

Plan Nacional de Silos y Dirección General de Servicios Agrícolas. (2010) Caracterización de la zafra 2009/2010. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP), Uruguay, pp. 1-14.

Pritsch C, Muehlbauer GJ, Bushnell WR, Somers DA, Vance CP (2000) Fungal development and induction of defense response genes during early infection of wheat spikes by *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* : **MPMI 13**: 159-169

Proctor RH, Hohn TM, McCormick SP (1995) Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**: 593-601

Qu B, Li HP, Zhang JB, Xu YB, Huang T, Wu AB, Zhao CS, Carter J, Nicholson P, Liao YC (2007) Geographic distribution and genetic diversity of *Fusarium graminearum* and *F. asiaticum* on wheat spikes throughout China. *Plant Pathology* **57**: 15-24

Reglamento Bromatológico Nacional (1994) Decreto Nº 315/994. Dirección Nacional de Impresiones y Publicaciones Oficiales (IMPO), Uruguay, p. 454.

Rao BS, Rao VS, Ramakrishna Y, Bhat RV (1989) Rapid and specific method for screening ergosterol as an index of fungal contamination in cereal grains. *Food chemistry* **31**: 51-56

Rasmussen R (2001) Quantification on the LightCycler. In *Rapid cycle real-time PCR*, pp 21-34. Springer

Rebrikov DV, Trofimov D (2006) [Real-time PCR: approaches to data analysis (a review)]. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiya* **42**: 520-528

Ren Y, Zhang Y, Shao S, Cai Z, Feng L, Pan H, Wang Z (2007) Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A* **1143**: 48-64

Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual.*, Cold Spring Harbor, New York.

Sampietro DA, Diaz CG, Gonzalez V, Vattuone MA, Ploper LD, Catalan CA, Ward TJ (2011) Species diversity and toxigenic potential of *Fusarium graminearum* complex isolates from maize fields in northwest Argentina. *International Journal of Food Microbiology* **145**: 359-364

Sarlin T, Yli-Mattila T, Jestoi M, Rizzo A, Paavanen-Huhtala S, Haikara A (2006) Real-time PCR for Quantification of Toxigenic *Fusarium* Species in Barley and Malt. *European Journal of Plant Pathology* **114**: 371-380

Sarver BA, Ward TJ, Gale LR, Broz K, Kistler HC, Aoki T, Nicholson P, Carter J, O'Donnell K (2011) Novel *Fusarium* head blight pathogens from Nepal and Louisiana revealed by multilocus genealogical concordance. *Fungal Genetics and Biology* **48**: 1096-1107

Schlatter J (2004) Toxicity data relevant for hazard characterization. *Toxicology letters* **153**: 83-89

Schmale DG, Wood-Jones AK, Cowger C, Bergstrom GC, Arrellano C (2011) Trichothecene genotypes of *Gibberella zeae* from winter wheat fields in the eastern United States. *Plant Pathology* **60**: 909-917

Estrategias para la identificación y caracterización de patógenos causantes de fusariosis en trigo

- Schneider E, Curtui V, Seidler C, Dietrich R, Usleber E, Martlbauer E (2004) Rapid methods for deoxynivalenol and other trichothecenes. *Toxicology letters* **153**: 113-121
- Schweigkofler W, O'Donnell K, Garbelotto M (2004) Detection and Quantification of Airborne Conidia of *Fusarium circinatum*, the Causal Agent of Pine Pitch Canker, from Two California Sites by Using a Real-Time PCR Approach Combined with a Simple Spore Trapping Method. *Applied and environmental microbiology* **70**: 3512-3520
- Sobrova P, Adam V, Vasatkova A, Beklova M, Zeman L, Kizek R. (2010) Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdisciplinary Toxicology*, Vol. 3, p. 94.
- Stark A-A (2010) Molecular Mechanism of Detection of Aflatoxins and Other Mycotoxins. In *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons*, pp 21-37. Springer
- Starkey DE, Ward TJ, Aoki T, Gale LR, Kistler HC, Geiser DM, Suga H, Toth B, Varga J, O'Donnell K (2007) Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity. *Fungal genetics and biology* **44**: 1191-1204
- Stępień L, Gromadzka K, Chełkowski C (2012) Polymorphism of mycotoxin biosynthetic genes among *Fusarium equiseti* isolates from Italy and Poland. *J Appl Genetics* **53**: 227-236
- Suga H, Gale LR, Kistler HC (2004) Development of vntr markers for two *Fusarium graminearum* clade species. *Molecular Ecology Notes*: 468-470
- Suga H, Karugia GW, Ward T, Gale LR, Tomimura K, Nakajima T, Miyasaka A, Koizumi S, Kageyama K, Hyakumachi M (2008) Molecular characterization of the *Fusarium graminearum* species complex in Japan. *Phytopathology* **98**: 159-166
- Sulyok M, Krska R, Schuhmacher R (2007) Application of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method to multi-mycotoxin determination in raw cereals and evaluation of matrix effects. *Food Additives and Contaminants* **24**: 1184-1195
- Sutton JC (1982) Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **4**: 195-209
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**: 2731-2739
- Tangni EK, Motte J-C, Callebaut A, Pussemier L (2010) Cross-Reactivity of Antibodies in Some Commercial Deoxynivalenol Test Kits against Some Fusariotoxins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**: 12625-12633
- Tateishi H, Miyake T, Mori M, Kimura R, Sakuma Y, Saishoji T (2010) Sensitivity of Japanese *Fusarium graminearum* species complex isolates to metconazole. *Journal of Pesticide Science* **35**: 419-430
- Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC (2000a) Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* **31**: 21-32

- Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillette LJ, Jr., Jegou B, Jensen TK, Jouannet P, Keiding N, Leffers H, McLachlan JA, Meyer O, Muller J, Rajpert-De Meyts E, Scheike T, Sharpe R, Sumpter J, Skakkebaek NE (1996) Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environmental Health Perspectives* **104 Suppl 4**: 741-803
- Tóth B, Kaszonyi G, Bartok T, Varga J, Mesterhazy A (2008) Common resistance of wheat to members of the *Fusarium graminearum* species complex and *F. culmorum*. *Plant Breeding* **127**: 1-8
- Trail F (2009) For Blighted Waves of Grain: *Fusarium graminearum* in the Postgenomics Era. *Plant physiology* **149**: 103-110
- Umpiérrez-Failache M, Garmendia G, Pereyra S, Rodríguez-Haralambides A, Ward TJ, Vero S (2013) Regional differences in species composition and toxigenic potential among *Fusarium* head blight isolates from Uruguay indicate a risk of nivalenol contamination in new wheat production areas. *International journal of food microbiology* **166**: 135-140
- Vaamonde G, Scarmato G, Bonera N (1987) Zearalenone production by *Fusarium* species isolated from soybeans. *International journal of food microbiology* **4**: 129-133
- Vázquez JA, Berrón S (2004) Multilocus sequence typing: el marcador molecular de la era de Internet. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* **22**: 113-120
- Viaud M, Pasquier A, Brygoo Y (2000) Diversity of soil fungi studied by PCR-RFLP of ITS. *Mycological research* **104**: 1027-1032
- Visconti A, Haidukowski EM, Pascale M, Silvestri M (2004) Reduction of deoxynivalenol during durum wheat processing and spaghetti cooking. *Toxicology letters* **153**: 181-189
- Visconti A, Mirocha CJ, Logrieco A, Bottalico A, Solfrizzo M (1989) Mycotoxins produced by *Fusarium acuminatum*. Isolation and characterization of acuminatin: a new trichothecene. *Journal of agricultural and food chemistry* **37**: 1348-1351
- Voigt K, Cigelnik E, O'Donnell K (1999) Phylogeny and PCR identification of clinically important Zygomycetes based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *Journal of clinical microbiology* **37**: 3957-3964
- Waalwijk C, Kastelein P, de Vries I, Kerényi Z, van der Lee T, Hesselink T, Köhl J, Kema G (2003) Major changes in *Fusarium spp.* in wheat in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology* **109**: 743-754
- Waalwijk C, van der Heide R, de Vries I, van der Lee T, Schoen C, Costrel-de Corainville G, Häuser-Hahn I, Kastelein P, Köhl J, Lonnet P (2004) Quantitative detection of *Fusarium* species in wheat using TaqMan. In *Molecular Diversity and PCR-detection of Toxigenic Fusarium Species and Ochratoxigenic Fungi*, pp 481-494. Springer Netherlands
- Wallace RB, Shaffer J, Murphy RF, Bonner J, Hirose T, Itakura K (1979) Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic acids research* **6**: 3543-3557
- Wannemacher, RW and Weiner, SL (1997). Trichothecene mycotoxins. In: Textbook of Military Medicine, Part I Warfare, Weaponry, and the Casualty, Medical Aspects of Chemical and

Estrategias para la identificación y caracterización de patógenos causantes de fusariosis en trigo

Biological Warfare. Sidell, F.R., Takafugi, ET, and Franz, DR (eds), Office of the Surgeon General, Department of the Army, Washington, D.C., pp. 655–676.

Ward TJ, Bielawski JP, Kistler HC, Sullivan E, O'Donnell K (2002) Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 9278-9283

Ward TJ, Clear RM, Rooney AP, O'Donnell K, Gaba D, Patrick S, Starkey DE, Gilbert J, Geiser DM, Nowicki TW (2008) An adaptive evolutionary shift in *Fusarium* head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America. *Fungal Genetics and Biology* **45**: 473-484

Grupo Trigo (2013) <http://www.grupotrigo.com.uy/1608/datos-zafra-2011-12-mesa-de-trigo>. (2013) Datos de la zafra 2011-12 Mesa de Trigo. Consultado Julio 2013.

Wegulo SN, Bockus WW, Nopsa J, De Wolf ED, Eskridge KM, Peiris K, Dowell FE (2011) Effects of integrating cultivar resistance and fungicide application on fusarium head blight and deoxynivalenol in winter wheat. *Plant Disease* **95**: 16

Wegulo, S., Bockus, W., Hernandez Nopsa, J., Peiris, K. H., & Dowell, F. (2013). Integration of Fungicide Application and Cultivar Resistance to Manage Fusarium Head Blight in Wheat. Book Chapter, 35-54.

World Health Organization (WHO) (1998) Codex committee on food additives and contaminants Position paper on zearalenone. Draft Report CX/FAC 98/18.

Willyerd KT, Li C, Madden LV, Bradley CA, Bergstrom GC, Sweets LE, McMullen M, Ransom JK, Grybauskas A, Osborne L, Wegulo SN, Hershman DE, Wise K, Bockus WW, Groth D, Dill-Macky R, Milus E, Esker PD, Waxman KD, Adee EA, Ebelhar SE, Young BG, Paul PA (2011) Efficacy and Stability of Integrating Fungicide and Cultivar Resistance to Manage Fusarium Head Blight and Deoxynivalenol in Wheat. *Plant Disease* **96**: 957-967

Xu X, Nicholson P (2009) Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annual review of phytopathology* **47**: 83-103

Yang G-H, Li S, Pestka JJ (2000) Down-regulation of the endoplasmic reticulum chaperone GRP78/BiP by vomitoxin (Deoxynivalenol). *Toxicology and applied pharmacology* **162**: 207-217

Yang L, Van der Lee T, Yang X, Yu D, Waalwijk C (2008) *Fusarium* populations on Chinese barley show a dramatic gradient in mycotoxin profiles. *Phytopathology* **98**: 719-727

Yazar S, Omurtag G (2008) Fumonisin, Trichothecenes and Zearalenone in Cereals. *International journal of molecular sciences* **9**: 2062-2090

Yin Y, Liu X, Li B, Ma Z (2009) Characterization of sterol demethylation inhibitor-resistant isolates of *Fusarium asiaticum* and *F. graminearum* collected from wheat in China. *Phytopathology* **99**: 487-497

Yli-Mattila T, Gagkaeva T, Ward TJ, Aoki T, Kistler HC, O'Donnell K (2009) A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East. *Mycologia* **101**: 841-852

Zhang JB, Li HP, Dang FJ, Qu B, Xu YB, Zhao CS, Liao YC (2007) Determination of the trichothecene mycotoxin chemotypes and associated geographical distribution and phylogenetic species of the *Fusarium graminearum* clade from China. *Mycological research* **111**: 967-975

Zinedine A, Soriano JM, Molto JC, Manes J (2007) Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food and chemical toxicology : An international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **45**: 1-18

ANEXOS

Anexo 1: Soluciones, buffers y medios de cultivo

Soluciones y Buffers

Buffer CTAB

Mezclar:

10 ml 1M Tris-HCL pH8.4

8.18g NaCl

5ml 0,5M EDTA pH 8.0

2g CTAB

H₂O.....c.s.p.100ml

Autoclavar

Solución de precipitación con CTAB

Pesar:

1g CTAB

0.5g NaCl

Agregar 100 mL de agua destilada

Ajustar pH a 8.0 con NaOH 1M

Completar el volumen hasta 200mL

Autoclavar

Solución NaCl 1.2M

Disolver 7g de NaCl en 100mL de agua destilada

Autoclavar

Almacenar a temperatura ambiente

Solución de ARNasa

Disolver la ARNasa hasta una concentración final de 10mg/mL en agua destilada libre Dnasa.

Buffer TBE 5x

Pesar:

54 g of Tris base

27.5 g de ácido bórico

Agregar 20 ml of 0.5 M EDTA (pH 8.0)

Ajustar el volumen con agua destilada a 1L

Autoclavar

Diluir antes de utilizar a una concentración 0,5X

Medios de cultivo

Agar Papa Dextrosa (PDA)

Agar.....15g

Medio de cultivo PDA (Oxoid)....39g

Agua.....c.s.p 1L

Autoclavar

Medio líquido extracto de levadura-sacarosa (YES)

Extracto de Levadura.....15g

Sacarosa.....39g

Agua.....c.s.p 1L

Autoclavar

Solución de pentacloronitrobenzeno (PCNB) 100x

100 mg de 1 mg/ml PCNB

1ml de dimetilsulfóxido (DMSO)

Agitar hasta disolución.

Solución de Cloranfenicol 1000x

Disolver 340 mg de cloranfenicol en 10ml de EtOH absoluto.

Anexo 2: Oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados por SBS Genetech (Beijing, China)

Identificación de FGSC

Primers Fg11F/Fg11R (Nicholson et al., 1998)

Fg11F 5'CTCCGGATATGTTGCGTCAA 3'

Fg11R 5'GGTAGGTATCCGACATGGCAA 3'

PCR Multiplex para quimiotipos (Starkey et al., 2007)

TRI3 multiplex

3CON 5'-TGGCAAAGACTGGTTCAC-3', común a todos los quimiotipos

3NA 5'-GTGCACAGAATATACGAGC-3' quimiotipo NIV producto de 840 pb

3D15A 5'-ACTGACCCAAGCTGCCATC-3' quimiotipos 15ADON, producto 610 pb

3D3A 5'-CGCATTGGCTAACACATG-3' quimiotipos 3 ADON producto 243 pb

TRI12 multiplex

12CON 5'-CATGAGCATGGTGATGTC-3', común a todos los quimiotipos

12NF 5'-TCTCCTCGTTGTATCTGG-3', quimiotipo NIV producto de 840 pb

12-15F 5'-TACAGCGGTCGCAACTTC-3', quimiotipo 15ADON producto de 670 pb

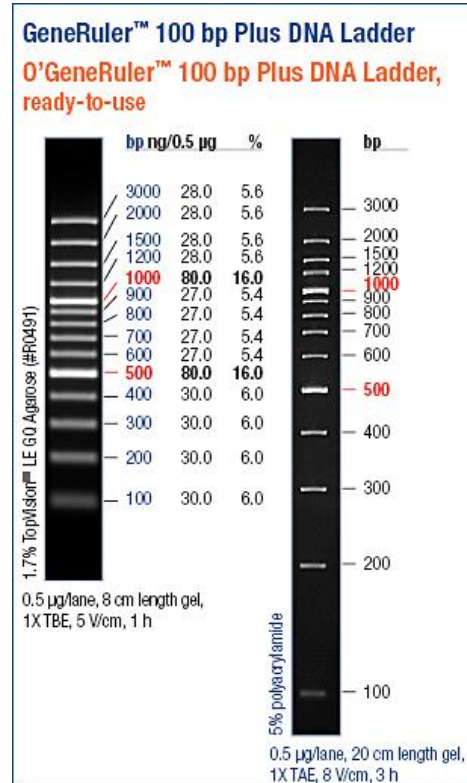
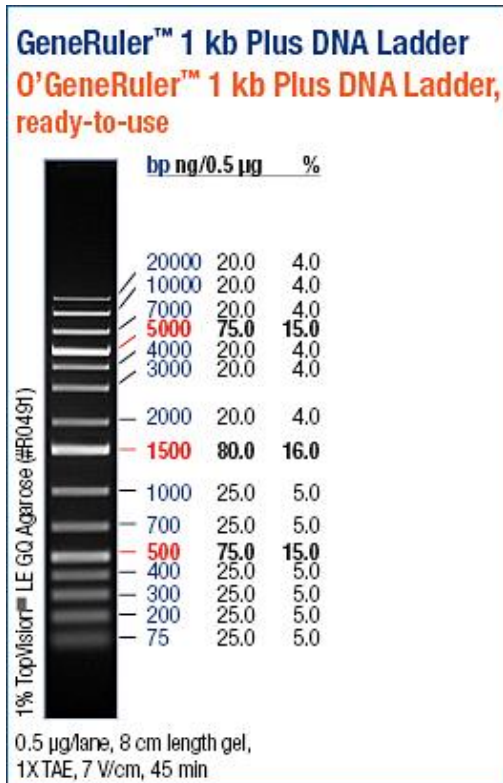
12-3F 5'-CTTTGGCAAGCCCGTGCA-3', quimiotipo 3ADON producto de 410 pb

Primers para PCR en tiempo Real

Nombre	Secuencia	Gen blanco
Fw NIVT12	5' TACATCTATATCATCATTAGTG 3'	TRI 12 (Diseño Allele ID)
Rv NIVT12	5' GAAGATACCTATCCAGTC 3'	
ZEAFw	5'CGTCTTCGAGAAGATGACAT 3'	PKS4 (Meng et al., 2010)
ZEARv	5'TGTTCTGCAAGCACTCCGA 3'	
Tri5-Fw	5'TCTTAAACTAGCGTGCGCCTTCT 3'	TRI5 (Burlakoti et al., 2007)
Tri5-Rv	5'CATGCCAACGATTGTTTGGAGGGA	

Anexo 3: Marcadores de peso molecular

Marcadores de peso molecular de ADN utilizados (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)



Anexo 4: Aislamientos de *Fusarium* en muestras de trigo

Tabla 1- Tabla de aislamientos del grupo FGSC: Identidad, quimiotipos, origen geográfico y año de aislamiento de cepas recolectadas de trigo de Uruguay en diversas zafras

Nombre del aislamiento	FGSC Identidad	Quimiotipo de tricotecenos	Origen geográfico	Año de aislamiento
36951	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Soriano	2002
36952	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Soriano	2002
36953	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Soriano	2002
36954	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Soriano	2002
36955	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Soriano	2002
36956	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Paysandú	2002
36957	<i>F. austroamericanum</i>	3ADON	Paysandú	2002
36958	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Paysandú	2002
36959	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Río Negro	2002
36960	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Río Negro	2002
36961	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Río Negro	2002
36963	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Flores	2002
36964	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Paysandú	2002
36965	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Paysandú	2002
36966	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Flores	2002
36967	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Río Negro	2002
36968	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Río Negro	2002
36969	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Río Negro	2002
36970	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Soriano	2002
36971	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Soriano	2002
36972	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Soriano	2002
36973	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Soriano	2002
36974	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Soriano	2002
36975	<i>F. graminearum</i>	3ADON	Soriano	2002
36976	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Soriano	2002
36978	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Soriano	2002
36979	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Soriano	2002
36980	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Soriano	2002
36981	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Soriano	2002
37545	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Colonia	2002
37546	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Colonia	2002
37548	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Río Negro	2002
37549	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Colonia	2002

37550	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Colonia	2002
37551	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Rio Negro	2002
37552	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Flores	2002
37553	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Flores	2002
37554	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Rio Negro	2002
37555	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Rio Negro	2002
37556	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Flores	2002
37557	<i>F. cortaderiae</i>	NIV	Colonia	2002
37558	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Colonia	2002
37559	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Colonia	2002
37560	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Flores	2002
37561	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Colonia	2002
37562	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Flores	2002
37563	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Colonia	2002
37564	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Colonia	2002
37565	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Colonia	2002
37568	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Colonia	2002
37569	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Colonia	2002
37570	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Flores	2002
37571	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Colonia	2002
37572	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Flores	2002
37573	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Flores	2002
37574	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Flores	2002
37575	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Colonia	2002
37576	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Flores	2002
37577	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Colonia	2002
37578	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Colonia	2002
37579	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Colonia	2002
37580	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Colonia	2002
F-94	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Colonia	2009
F-95	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Colonia	2009
F-96	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Colonia	2009
F-97	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Colonia	2009
F-98	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Colonia	2009
F-99	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Colonia	2009
F-100	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Colonia	2009
F-101	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Colonia	2009
F-102	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Colonia	2009
F-103	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Colonia	2009
F-104	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Colonia	2009
F-107	<i>F. cortaderiae</i>	NIV	Colonia	2009
F-108	<i>F. asiaticum</i>	NIV	Cerro Largo	2009

Estrategias para la identificación y caracterización de patógenos causantes de fusariosis en trigo

F-109	<i>F. asiaticum</i>	NIV	Cerro Largo	2009
F-110	<i>F. asiaticum</i>	NIV	Cerro Largo	2009
F-111	<i>F. cortaderiae</i>	NIV	Cerro Largo	2009
F-113	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Colonia	2009
F-114	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Colonia	2009
F-115	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Colonia	2009
F-116	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Colonia	2009
F-117	<i>F. cortaderiae</i>	NIV	Paysandú	2009
F-118	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Paysandú	2009
F-119	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Paysandú	2009
F-120	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Paysandú	2009
F-121	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Young- Rio Negro	2009
F-122	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Young- Rio Negro	2009
F-123	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Young- Rio Negro	2009
F-124	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Young- Rio Negro	2009
F-125	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Young- Rio Negro	2009
F-126	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Young- Rio Negro	2009
F-127	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Young- Rio Negro	2009
F-128	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Young- Rio Negro	2009
F-129	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Young- Rio Negro	2009
F-130	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Young- Rio Negro	2009
F-131	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Young- Rio Negro	2009
F-133	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Young- Rio Negro	2009
F-134	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Young- Rio Negro	2009
F-135	<i>F. cortaderiae</i>	NIV	Young- Rio Negro	2009
Pay 3.1	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Paysandú	2009
Pay 3.2	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Paysandú	2009
Pay 3.3	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Paysandú	2009
Pay 3.5	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Paysandú	2009
Pay 3.6	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Paysandú	2009
Pay 3.7	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Paysandú	2009
Y8	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Young- Rio Negro	2009
Y15	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Young- Rio Negro	2009
CR3	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Cerro Largo	2009
R2.1	<i>F. cortaderiae</i>	NIV	Cerro Largo	2009
CL1	<i>F. asiaticum</i>	NIV	Cerro Largo	2011
CL2	<i>F. asiaticum</i>	NIV	Cerro Largo	2011
CL3	<i>F. asiaticum</i>	NIV	Cerro Largo	2011
CL4	<i>F. asiaticum</i>	NIV	Cerro Largo	2011
CL5	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Cerro Largo	2011
CL6	<i>F. asiaticum</i>	NIV	Cerro Largo	2011
CL7	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Cerro Largo	2011
CL8	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Cerro Largo	2011
CL2-1	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Cerro Largo	2012
CL2-2	<i>F. brasiliicum</i>	NIV	Cerro Largo	2012
CL2-3	<i>F. asiaticum</i>	NIV	Cerro Largo	2012
CL2-4	<i>F. brasiliicum</i>	NIV	Cerro Largo	2012

CL2-5	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Cerro Largo	2012
CL2-6	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Cerro Largo	2012
CL2-7	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Cerro Largo	2012
CL2-8	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Cerro Largo	2012
CL2-10	<i>F. asiaticum</i>	NIV	Cerro Largo	2012
LV1	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Lavalleja	2012
LV2	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Lavalleja	2012
LV3	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Lavalleja	2012
LV4	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Lavalleja	2012
LV5	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Lavalleja	2012
LV6	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Lavalleja	2012
LV7	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Lavalleja	2012
LV8	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Lavalleja	2012
LV10	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Lavalleja	2012
LV11	<i>F. asiaticum</i>	NIV	Lavalleja	2012
LV12	<i>F. cortaderiae</i>	NIV	Lavalleja	2012
M1	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Montevideo-Fagro	2012
M2	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Montevideo-Fagro	2012
M3	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Montevideo-Fagro	2012
M4	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Montevideo-Fagro	2012
M5	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Montevideo-Fagro	2012
M6	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Montevideo-Fagro	2012
M7	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Montevideo-Fagro	2012
M8	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Montevideo-Fagro	2012
M9	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Montevideo-Fagro	2012
M10	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Montevideo-Fagro	2012
M11	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Montevideo-Fagro	2012
M12	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Montevideo-Fagro	2012
M13	<i>F. graminearum</i>	15ADON	Montevideo-Fagro	2012

Tabla 2- Otras especies de *Fusarium* no FGSC encontradas en trigo nacional en la zafra 2009

Nombre del aislamiento	Identidad	Origen geográfico	Año de aislamiento
F-105	<i>F. acuminatum</i>	Conchillas -Colonia	2009
F-106	<i>F. acuminatum</i>	Conchillas-Colonia	2009
F-112	<i>F. lacertarum</i>	INIA la Estanzuela.Colonia	2009

Anexo 5: Publicaciones

Artículos

- Umpiérrez-Failache, M; Garmendia, G; Pereyra, S.A.; Rodríguez A; Ward, TJ; Vero, S. Regional differences in species composition and toxigenic potential among *Fusarium* head blight isolates from Uruguay indicate a risk of nivalenol contamination in new wheat production areas. *International Journal of Food Microbiology*, v.: 166 1, p.: 135 - 140, 2013
- Umpiérrez-Failache M; Garmendia, G; Pereyra, S.A.; Vero, S. Las técnicas moleculares en el estudio de los patógenos: ejemplos en patógenos de trigo. *Serie Técnica INIA*, v.: 189, p.: 41 - 48, 2011

Capítulo de Libro

- Umpiérrez-Failache M; Garmendia G; Cabrera, M; Pereyra, S.A.; Vero S. Diversity of Pathogen Populations Causing *Fusarium* Head Blight of Wheat in Uruguay, 2013, en *Fusarium Head Blight in Latin America Fusarium Head Blight in Latin America*. Alconada Magliano, Teresa M.; Chulze, Sofia Noemi, Eds. Springer. v.: 1, p.: 1 - 350.
ISSN/ISBN: 9789400770904