

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>