

# ÍNDICE DE MATERIAS

---



ÍNDICE DE MATERIAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS	XIII
RESUMEN	XV
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1. REVISIÓN HISTÓRICA DE <i>Fusarium</i> spp.	3
1.1. Situación taxonomía actual del género <i>Fusarium</i>	7
1.2. El concepto de especie en hongos	11
1.3. Especies de <i>Fusarium</i>	12
1.3.1. <i>Fusarium graminearum</i> Schwabe (Telemorfo <i>Gibberella zeae</i> )	12
1.3.2. <i>Fusarium verticillioides</i> (Saccardo) Nirenberg. (Telemorfo <i>Gibberella moniliformis</i> (Wineland))	13
1.3.3. <i>Fusarium equiseti</i> (Corda) Saccardo	15
1.3.4. <i>Fusarium proliferatum</i> (Matsushima) Nirenberg. (Telemorfo <i>Gibberella intermedia</i> (Kuhlman))	15
1.3.5. <i>Fusarium culmorum</i> (W.G. Smith) Saccardo	16
1.3.6. <i>Fusarium oxysporum</i> Schlechtendahl emend. Snyder and Hansen	16
2. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN	17
2.1. Identificación y caracterización de las especies del género <i>Fusarium</i>	17
2.2. Estructuras que se tienen en cuenta para la identificación morfológica en especies del género <i>Fusarium</i>	18
2.3. Técnicas fisiológicas y bioquímicas	21
2.3.1. Metabolitos secundarios	21
2.3.2. Ubiquinonas (coenzima Q)	22
2.3.3. Composición de ácidos grasos	22
2.3.4. Composición de la pared de celular	23
2.3.5. Composición proteica	23

## Índice de materias

---

3. TÉCNICAS MOLECULARES	23
3.1. ADN ribosómico	24
3.1.1. Región Espaciadora Transcriptora Interna (ITS) y Región Espaciadora Intergénica IGS	25
3.1.2. Análisis de polimorfismos de longitud en los fragmentos de restricción amplificados por PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP))	27
3.1.3. Secuenciación de nucleótidos	29
4. MICOTOXINAS	30
4.1. Historia de la Micotoxicosis	30
5. MICOTOXINAS MÁS FRECUENTES PRODUCIDAS POR <i>Fusarium</i> spp.	32
5.1. Tricotecenos	32
5.1.1. Estructura química de los tricotecenos	34
5.1.2. Propiedades físico-químicas de los tricotecenos	35
5.1.3. Toxicidad de los Tricotecenos	36
5.1.4. Deoxinivalenol (DON)	36
5.1.5. Nivalenol (NIV)	39
5.1.6. 3-Acetildeoxinivalenol (3-AcDON)	40
5.1.7. 15-Acetildeoxinivalenol (15-AcDON)	41
5.1.8. Fusarenon X (FUS X)	41
5.1.9. Neosolaniol (NEO)	41
6. BIOSÍNTESIS DE TRICOTECENOS	42
6.1. Genes involucrados en la biosíntesis de tricotecenos (Genes <i>Tri</i> )	43
6.2. Especies micotoxigénicas de <i>Fusarium</i>	45
7. FACTORES DETERMINANTES EN LA PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS POR HONGOS DEL GÉNERO <i>Fusarium</i>	48
7.1. Actividad del agua ( $a_w$ ) y contenido de agua	48
7.2. Temperatura	49
7.3. pH	49
7.4. Niveles de oxígeno (O <sub>2</sub> ) y dióxido de carbono (CO <sub>2</sub> )	50
7.5. Composición del sustrato	50
7.6. Interacción con otros microorganismos	51
7.7. Insectos	51

8. ANÁLISIS DE MICOTOXINAS	52
8.1. Métodos químicos	52
8.1.1. Muestreo	52
8.1.2. Extracción	53
8.1.3. Purificación	53
8.1.4. Técnicas cromatográficas	54
8.1.5. Detección y cuantificación	54
8.1.6. Métodos cromatográficos	54
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>59</b>
<b>III. MATERIAL Y METODOS</b>	<b>63</b>
1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Fusarium</i> spp., PROCEDENTES DE MAÍZ	63
1.1. Procedencia de las Muestras de maíz	63
1.2. Medios de cultivo	64
1.3. Obtención de aislados de <i>Fusarium</i> spp.	64
1.4. Cultivo puro de hongos pertenecientes al género <i>Fusarium</i> , identificación y conservación	66
1.4.1. Nomenclatura de las placas	66
1.5. Cepas de referencia	67
2. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DEL ADN DE <i>Fusarium</i> .: Método CTAB	68
2.1. Preparación de los aislados para la extracción de ADN	68
2.1.1. Procedimiento	68
2.1.2. Detección del ADN por electroforesis y visualización del producto de PCR	69
2.1.3. Conservación del ADN	70
3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA ( PCR)	70
3.1. Preparación del ADN	70
3.2. Oligonucleótidos sintéticos	70
3.3. PCR para el género <i>Fusarium</i>	70
3.4. PCR para <i>F. graminearum</i>	71
3.5. PCR para <i>F. verticillioides</i>	72
3.6. PCR para <i>F. culmorum</i>	73
3.7. PCR para <i>F. oxysporum</i>	73
3.8. PCR múltiple para <i>Fusarium</i> spp.	74
3.9. PCR para detección de aislados productores de tricotecenos	74

## Índice de materias

---

3.10. PCR para detección de aislados de <i>Fusarium</i> spp., productores de deoxinivalenol (DON) y nivalenol (NIV)	77
3.11. PCR para amplificación de la región IGS	77
3.12. PCR para amplificación de la región ITS1- 5.8S – ITS2 y posterior secuenciación	78
3.13. Análisis de polimorfismos de longitud en los fragmentos de restricción amplificados por PCR (PCR-RFLP) de la región IGS.	78
4. PURIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL FRAGMENTO AMPLIFICADO DE LA REGIÓN ITS1- 5.8S – ITS2	79
5. MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETECCIÓN DE LAS MICOTOXINAS: Deoxinivalenol, 3-Acetildeoxinivalenol, 15-Acetildeoxinivalenol, Fusarenon X y Nivalenol	80
5.1. Extracción y purificación	82
5.2. Derivatización de las micotoxinas	82
5.3. Determinación de Deoxinivalenol, 3-Acetildeoxinivalenol, Fusarenon X, 15-Acetildeoxinivalenol y Nivalenol, por cromatografía de gases con detector de masas	83
5.3.1. Condiciones del cromatógrafo y del detector de masas	83
5.3.2. Cuantificación de Deoxinivalenol, 3-Acetildeoxinivalenol, Fusarenon X, 15-Acetildeoxinivalenol y Nivalenol por patrón interno	84
5.4. Estudio de los parámetros analíticos del método	85
5.4.1. Intervalo de linealidad	85
5.4.2. Límite de cuantificación o determinación	86
5.4.3. Exactitud y precisión del método: ensayos de fortificación y recuperación de micotoxina	87
<b>IV. RESULTADOS</b>	93
1. CONTAMINACIÓN FÚNGICA DE LOS GRANOS DE MAÍZ	93
1.1. Maíz almacén	93
1.2. Maíz campo	96
1.3. Maíz experimental	103
1.3.1. Comparación de <i>Fusarium</i> spp. respecto a la microbiota fúngica total, según la variedad de maíz	104
1.3.2. Comparación de <i>Fusarium</i> spp. respecto a la microbiota fúngica total, según los medios de cultivo	108
2. AISLADOS DE HONGOS DEL GÉNERO <i>Fusarium</i> DE GRANOS DE MAÍZ	109

3. IDENTIFICACIÓN POR PCR	109
3.1. Identificación del género <i>Fusarium</i>	109
3.2. Identificación a nivel de especie	110
3.2.1. PCR para <i>F. graminearum</i>	110
3.2.2. PCR para <i>F. verticillioides</i>	111
3.2.3. PCR para <i>F. culmorum</i>	112
3.2.4. PCR para <i>F. oxysporum</i>	112
3.2.5. PCR múltiple	113
4. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS POR SECUENCIACIÓN	114
5. ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE LONGITUD EN LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN AMPLIFICADOS POR PCR (PCR-RFLP) DE AISLADOS DE <i>Fusarium</i> spp., DE GRANOS DE MAÍZ	120
6. IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS DE <i>Fusarium</i> spp., PRODUCTORES DE TRICOTECENOS	131
7. COMPROBACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE Deoxinivalenol, 3-Acetildeoxinivalenol, Fusarenon X, 15-Acetildeoxinivalenol Y Nivalenol EN AISLADOS DEL COMPLEJO <i>F. graminearum</i> POR CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECTOR DE MASAS.	135
7.1. Presencia de Deoxinivalenol, 3-Acetildeoxinivalenol, Fusarenon X, 15-Acetildeoxinivalenol y Nivalenol, en los medios de cultivo PDA, Czapeck y YES	136
<b>V. DISCUSIÓN</b>	149
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	165
<b>VII. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA</b>	169
<b>ANEJOS</b>	189

