



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DE HONGOS DEL
GRUPO *Flavii* POR MÉTODOS MOLECULARES”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

ALEJANDRO LADRÓN DE GUEVARA FERNÁNDEZ

DIRIGIDA POR

DR. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, OCTUBRE DEL 2015.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DE HONGOS DEL
GRUPO *Flavii* POR MÉTODOS MOLECULARES”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

ALEJANDRO LADRÓN DE GUEVARA FERNÁNDEZ

DIRIGIDA POR

DR. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ

SINODALES

DR. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ

DIRECTOR

DR. JUAN CAMPOS GUILLÉN

SINODAL

DRA. SILVIA LORENA AMAYA LLANO

SINODAL

DR. ANDRÉS CRUZ HERNÁNDEZ

SINODAL

INDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Aflatoxinas	1
1.1.1 Importancia de las aflatoxinas	1
1.1.2 Actividad biológica	2
1.1.3 Organismos y condiciones de producción	4
1.1.4 Dificultad para eliminar las aflatoxinas en los alimentos	5
1.1.5 Regulación legal de las aflatoxinas	6
1.2 Taxonomía de los hongos del grupo <i>Flavii</i>	6
1.2.1 Hongos que forman parte y características del grupo	6
1.2.2 <i>Aspergillus flavus</i>	9
1.2.3 Aflatoxinas sintetizadas por hongos filamentosos	10
1.2.4 Antecedentes de la identificación molecular	11
2. HIPÓTESIS	13
3. OBJETIVOS	14
3.1 General	14
3.2 Específicos	14
4. METODOLOGÍA	15
4.1 Materiales	15
4.2 Métodos	16
5. Resultados	19
5.1 Crecimiento en PDA	19
5.2 Crecimiento en Sabouraud líquido	23

5.3 Extracciones de DNA por CTAB modificado	24
5.4 PCRs	26
6. Discusiones	29
7. Conclusiones	37
8. REFERENCIAS	38
Anexo	40

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Características físicas de las aflatoxinas	5
2	Límites permitidos en alimentos de aflatoxinas establecidos por la NOM-247-SSA1-2008	6
3	Color de las colonias en varias especies de <i>Aspergillus</i>	9
4	Micotoxinas producidas por <i>Aspergillus</i> spp.	11
5	Preparaciones de reacciones de PCR	18
6	Resultados de PCR's simplificados.	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura de las aflatoxinas	2
2	Biotransformación de la AFB1	4
3	Desarrollo de <i>A. niger</i>	8
4	Diferentes conidias de hongos del género <i>Aspergillus</i> .	10
5	Diagrama de la vía de biosíntesis de la aflatoxina B1	12
6	Crecimiento de <i>A. flavus</i> CGCT 2687	19
7	Crecimiento de <i>A. flavus</i> NRRL 6541	20
8	Crecimiento de <i>A. oryzae</i>	20
9	Crecimiento de <i>Penicillium</i> spp.	21
10	Crecimiento de <i>A. niger</i> N402	22
11	Crecimiento de <i>A. sojae</i>	23
12	Crecimiento a 3 días de inoculación en Sabouraud líquido	24
13	Extracciones de DNA por CTAB modificado de las diferentes cepas trabajadas	25
14	Extracción de DNA por CTAB de <i>A. sojae</i>	25
15	PCR de <i>A. flavus</i> CGCT 2687, <i>A. flavus</i> NRRL 6541, <i>A. oryzae</i> , <i>Penicillium</i> spp. y <i>A. sojae</i> .	27

RESUMEN

Las aflatoxinas son producidas por los hongos del género *Aspergillus* grupo *Flavii*, se desarrollan sobre una gran variedad de cereales en cultivo y en almacenaje, especialmente en maíz. Se ha demostrado que estas micotoxinas tienen efecto mutagénico, teratogénico, oncogénico e inmunosupresivo en animales y en humanos. El género *Aspergillus* incluye más de 185 especies, las características de la morfología básica microscópica es parecida en todas las especies. Se han reportado 30 genes involucrados en la biosíntesis de las aflatoxinas, los genes *aflD*, *aflJ*, *aflO*, *aflP*, *aflR*, *aflM* y *aflQ*, codifican las enzimas necesarias para la síntesis de las aflatoxinas o regulan su síntesis. Basados en la presencia de estos genes se espera poder diferenciar entre los hongos del grupo *Flavii*, el género *Aspergillus* y otros hongos filamentosos. En las cepas de *Aspergillus* se logran observar dos tipos de micelio uno alargado y otro pellet, el micelio alargado crece en la pared del matraz y cuando no soporta su peso cae en el medio; *Penicillium* fue el hongo de crecimiento más lento y formó pellets compactos. En las cepas no aflatoxénicas del grupo *Flavii*, como es el caso de *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus sojae*, se asume que han perdido la capacidad de generar estas toxinas al ejercer sobre ellas una evolución dirigida para mejorar la velocidad de producción y/o sabor en la industria alimenticia. El método de PCR puede distinguir entre cepas aflatoxénicas y no aflatoxénicas con relación a los genes que hay en el genoma, siendo *A. flavus* CGCT 2687 y *A. sojae* las cepas positivas para todos los genes aflatoxénicos utilizados, *A. oryzae* presentó algunos genes y *A. flavus* NRRL 6541 no amplificó para ningún gen aflatoxénico; *Penicillium* generó algunos amplicones que parecen ser de genes aflatoxénicos. Este método no puede distinguir si el hongo pertenece al grupo *Flavii*.

1. ANTECEDENTES

1.1 Aflatoxinas

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios producidos por los hongos del género *Aspergillus* grupo *Flavii*, principalmente *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius* durante su crecimiento, en una gran variedad de materiales vegetales. Se ha demostrado que estas micotoxinas tienen efecto mutagénico, teratogénico, oncogénico e inmunosupresivo en animales y en humanos (Abbas y col., 2004).

La aflatoxina principal es la B1 (AFB1), habiendo cuatro en total producidas por los hongos del grupo *Flavii*, aflatoxina B1, B2, G1 y G2 (Figura 1), siendo B por la fluorescencia azul que emite bajo luz UV y G por la fluorescencia verde bajo luz UV (Santini y Ritieni, 2013).

1.1.1. Importancia de las aflatoxinas

Las aflatoxinas en general son consideradas moléculas cancerígenas del grupo 1A por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC); la aflatoxina B1 es considerada por médicos y toxicólogos la molécula más hepatocarcinógena de origen natural (Pasonne y col., 2010; Santini y Ritieni, 2013). Además de los efectos producidos por las aflatoxinas a largo plazo, el consumir productos contaminados con *A. fumigatus* y *A. flavus* puede causar aspergillosis tanto en animales como en humanos (Godey y Munuat, 2010).

Las aflatoxinas generalmente aparecen antes de la cosecha a diferencia de otras micotoxinas, de igual manera los cereales se pueden contaminar después de la cosecha, durante el secado, si este no se hace inmediatamente, o si el lugar donde se almacena contiene la cantidad adecuada de humedad para el crecimiento del hongo; la presencia de insectos o roedores puede facilitar la contaminación de la cosecha (Santini y Ritieni, 2013).

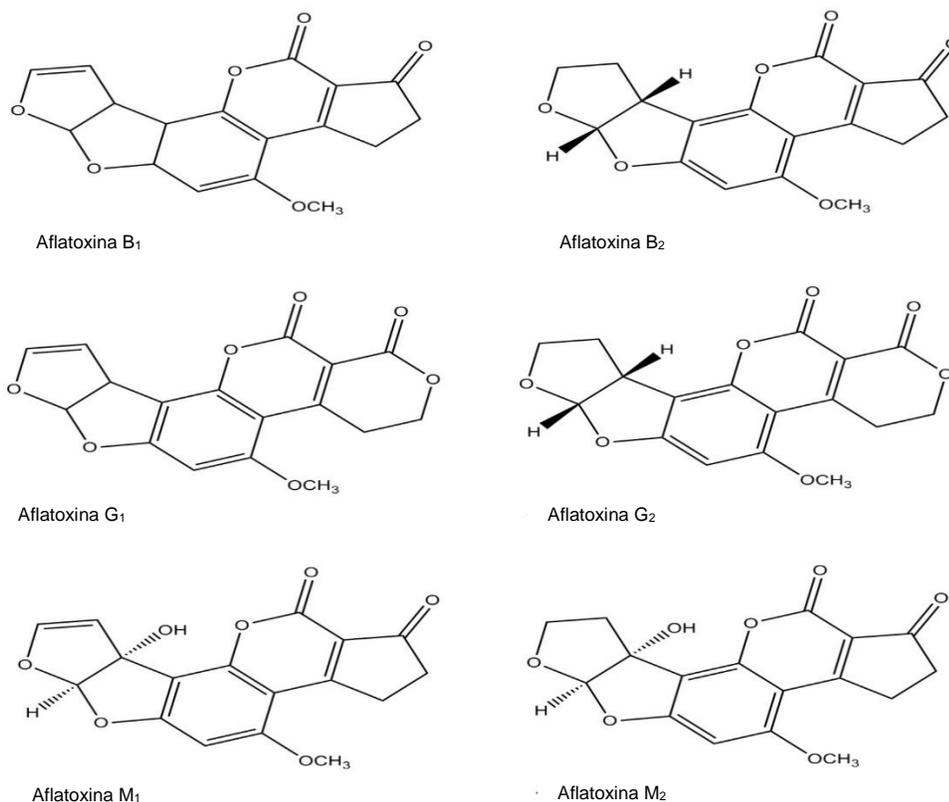


Figura 1. Estructura de las aflatoxinas (Santini y Ritieni, 2013).

1.1.2 Actividad biológica

Los hongos filamentosos del género *Aspergillus* pueden ser peligrosos de dos maneras; directamente pueden ser patógenos oportunistas causando aspergillosis e indirectamente por la producción de aflatoxinas en los alimentos, llevando a una aflatoxicosis. El blanco principal de estas moléculas es el hígado, siendo más tóxica la molécula modificada (Abdin y col., 2010).

La aflatoxina B₁ es un compuesto genotóxico y es considerado uno de los mutágenos más potentes de la naturaleza. El principal efecto de la exposición continua a las aflatoxinas es cáncer hepático. La toxicidad de la AFB₁ ha sido demostrada en muchas especies de animales incluyendo peces, aves, roedores, animales carnívoros y primates.

La biotransformación es el proceso por el cual el cuerpo transforma sustancias ajenas (xenobióticos) en un nuevo compuesto, este compuesto inicial es modificado para ser eliminado por los sistemas biológicos. Después de la ingesta oral, la AFB1 es absorbida eficientemente y para evitar afectar el equilibrio funcional del organismo es biotransformada antes de la excreción en orina y en heces fecales. Si no se llevara a cabo la biotransformación de sustancias xenobióticas, se podrían perder funciones de las biomoléculas pudiendo alterar el correcto funcionamiento de un órgano, tejido o sistema. (Figura 2).

Las madres que amamantan, pueden pasar los metabolitos en su leche materna cuando consumen alimentos contaminados con aflatoxinas. Se ha demostrado en estudios en animales, que en condiciones normales, el 50 % de la dosis consumida de AFB1 es absorbida rápidamente en el duodeno y alcanza el hígado por el sistema venoso porta. La AFB1 se concentra en el hígado, y en menor cantidad en los riñones. También puede ser encontrado en sangre venosa como AFB1 libre o como metabolitos solubles en agua. Enzimas de la familia del citocromo p450 (CYP), CYP1A2, CYP3A4 y CYP2A6 son responsables de la biotransformación de las aflatoxinas absorbidas. Estas enzimas convierten a las AFB1 en la forma activa, AFB-8-9-epóxido, la cual se une covalentemente al DNA y a la albúmina sérica, produciendo AFB1-N7-guanina y aductos de lisina. La unión entre AFB1y el DNA modifica la estructura y la actividad biológica del DNA, llevando a los mecanismos de acción mutagénica y oncogénica de la toxina. Estudios con hígados de rata, mostraron que los aductos AFB1-N7-guanina pueden eliminar bases en el DNA, dejando sitiosapurínicos en la molécula de DNA. Estos sitios son reparados con adenina, provocando una transversión de guanina a timina, generando así una mutación significativa. La AFB1 ejerce su efecto después de la biotransformación por las enzimas de la familia del citocromo p450. Este epóxido puede formar aductos con macromoléculas celulares como proteínas, RNA y DNA. La reacción con el DNA ocurre con la guanina en el codón 249 del gen supresor de tumores p53. Las mutaciones en p53 tienen una relación importante en la patogénesis del carcinoma hepatocelular (HCC) (Vincenzi y col., 2011)

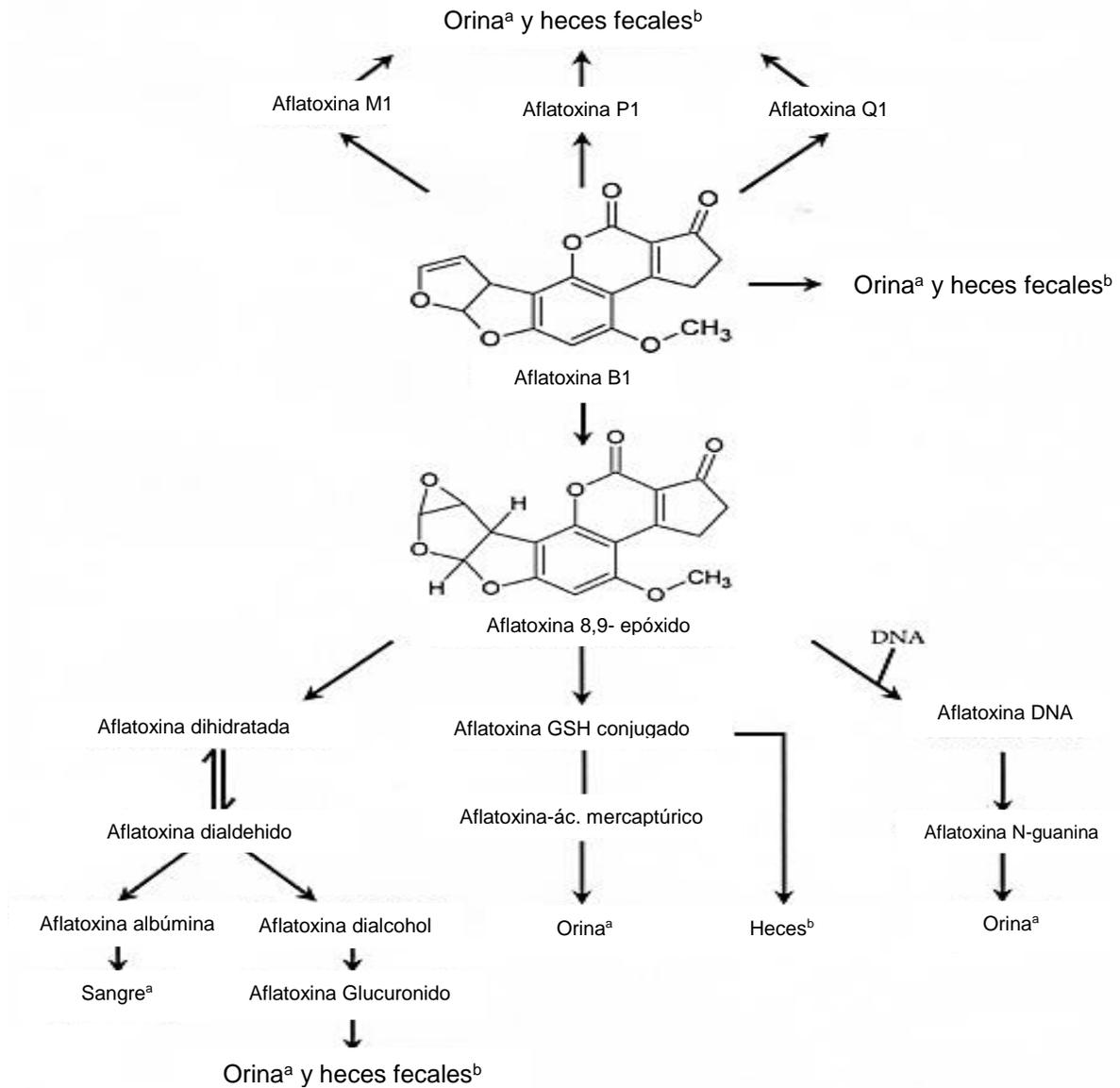


Figura 2. Biotransformación de la AFB1 (Vicenzi y col., 2011).

1.1.3 Organismos y condiciones de producción

En la naturaleza se encuentran varios tipos de hongos que producen y secretan micotoxinas, al día de hoy se conocen entre 300 y 400 tipos de micotoxinas, pero no todas están presentes en altas concentraciones o no tienen un impacto significativo para la salud y/o económicamente y por ello no necesitan ser determinadas en diferentes matrices (Cigić y Prosen, 2009).

Los hongos productores de aflatoxinas son principalmente *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius* y en menor frecuencia hongos del género *Fusarium* y *Penicillium* (Abbas y col., 2004; Cigić y Prosen, 2009).

Estos hongos crecen en PDA a temperaturas entre 20 °C y 40 °C, pero esto no significa que produzcan aflatoxinas; se necesita cultivar los hongos en condiciones de estrés para producir aflatoxinas, para generar estas condiciones se utiliza medio YES y se ajusta la actividad de agua a 0.95 a una temperatura de 37 °C y se analizan las muestras durante 7 días para observar la producción de las aflatoxinas (Abdel-Hali y col., 2012).

1.1.4 Dificultad para eliminar las aflatoxinas en los alimentos

Se estima que el 25% de los cultivos a nivel mundial se encuentran contaminados con algún tipo de micotoxina (Mosiello y Lamberti, 2011). Debido a su actividad biológica se han desarrollado métodos de detección de aflatoxinas y se han buscado tratamientos efectivos para reducir la concentración de aflatoxinas en los alimentos, pero la estabilidad de estas moléculas las hace resistentes a altas temperaturas y un amplio rango de pH, lo que hace muy difícil de eliminar en los alimentos (Cuadro 1) (Cigić y Prosen, 2009).

Cuadro 1. Características físicas de las aflatoxinas (Wogan, 1966)

Aflatoxina	Fórmula molecular	Peso molecular	Punto de fusión (°C)
B1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268-269*
B2	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289*
G1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246*
G2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240*

Se ha reportado que la AFB1 reacciona con los grupos hidroxilo en presencia de ácidos fuertes como los tratamientos con ácido fórmico-cloruro de tionilo, ácido acético-cloruro de tionilo o ácido trifluoroacético. La ozonólisis produce la fragmentación de la AFB1 dejando como productos ácido levulínico, ácido succínico, ácido malónico y ácido glutárico. La presencia de los aros de lactona hace que el compuesto sea frágil a la hidrólisis alcalina y posteriormente su reciclización después de una acidificación (Wogan, 1966).

1.1.5 Regulación legal de las aflatoxinas

Ya que estas moléculas afectan tanto a humanos como animales, se han establecido límites permisibles para consumo humano y de ganado; más de 100 países tienen regulaciones sobre la cantidad permitida de aflatoxinas totales en sus alimentos tanto para humanos como para animales (Wu, 2012): En México la NOM-247-SSA1-2008 estableció el límite máximo permitido de aflatoxinas en 20 µg/kg para humanos y animales, inhabilitando la norma NOM-188-SSA1-2002, la cual permitía hasta 300 µg/kg de aflatoxinas en alimentos para ganado (Cuadro 2).

Cuadro 2. Límites permitidos en alimentos de aflatoxinas por la NOM-247-SSA1-2008

Determinación	Límite máximo µg/kg
Aflatoxinas	20
Aflatoxinas para harina de maíz nixtamalizado	12

1.2 Taxonomía de los hongos del grupo *Flavii*

1.2.1 Hongos que forman parte y características del grupo

Clasificación taxonómica; Reino: Fungi; Filo: Ascomycota; Orden: Eurotiales; Familia: Trichocomaceae; Género: *Aspergillus*

Los hongos del género *Aspergillus* se encuentran en la naturaleza, se aíslan comúnmente del suelo, de desechos de plantas y de conductos de aire. Aunque algunas especies de *Aspergillus* han sido descritas en un estado teleomórfico, otros han sido aceptados como mitoespóricos (Krijgsheld y col., 2012), sin ninguna producción conocida de esporas sexuales (Figura 3). El género *Aspergillus* incluye más de 185 especies. Alrededor de 20 especies han sido reportadas como agentes causantes de infecciones oportunistas en el hombre. Entre éstas, *Aspergillus fumigatus* es la especie comúnmente más aislada, seguido por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger*, *Aspergillus clavatus*, el grupo de *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus ustus* y *Aspergillus versicolor* están entre las especies menos aisladas como patógenos oportunistas.

Las características macroscópicas más importantes en la identificación de especies es la tasa de crecimiento, el color de la colonia (Cuadro 3) y la termotolerancia. Exceptuando a *A. nidulans* y *A. glaucus*, la tasa de crecimiento es de rápida a moderadamente rápida. Mientras que *A. nidulans* y *A. glaucus* son lentos y alcanzan un tamaño de colonia de entre 0.5 y 1 cm en incubación a 25 °C por 7 días en agar Czapek-Dox, el resto de las especies alcanzan un diámetro de entre 1 y 9 cm.

Estas variaciones en el tamaño de las colonias ayudan a su identificación. Las colonias de *Aspergillus* tienen una textura vellosa. El color de la superficie puede variar entre especies, mientras que el reverso no tiene color o es amarillo pálido. Sin embargo el color del reverso puede ser morado u oliva en algunas cepas de *A. nidulans* y de naranja a morado en *A. versicolor*. *A. fumigatus* es un hongo termorresistente que crece bien a temperaturas arriba de 40 °C. Esta propiedad es única entre las especies de *Aspergillus*.

La morfología básica microscópica es la misma para todas las especies. Sin embargo, otras estructuras microscópicas son únicas para ciertas especies y constituyen características clave para la identificación junto con el color de la colonia. Comúnmente para todas las especies: las hifas son septadas. Los

conidióforos se originan de la célula basal localizada en el soporte de la hifa y termina en la vesícula del ápice. La vesícula es la formación típica para *Aspergillus*. La morfología y el color de los conidióforos varían entre especies; cubriendo la superficie de la vesícula están los fiálides que son uniseriados y están adheridos a la vesícula directamente o biseriados y adheridos a la vesícula por medio de una célula de soporte. Sobre los fiálides está la conidia formando cadenas radiales.

Otras características incluyen la esclerotia, cleistotecia, aleuriconidia y las células de Hulle. Estas estructuras son clave para la identificación de algunas especies de *Aspergillus*. El cleistotecio es una estructura redonda y cerrada que encierra al ascii que guarda las ascoesporas. Éstas son esparcidas en los alrededores cuando el cleistotecio estalla. El cleistotecio es producido durante las etapas de reproducción sexual de ciertas especies de *Aspergillus*.

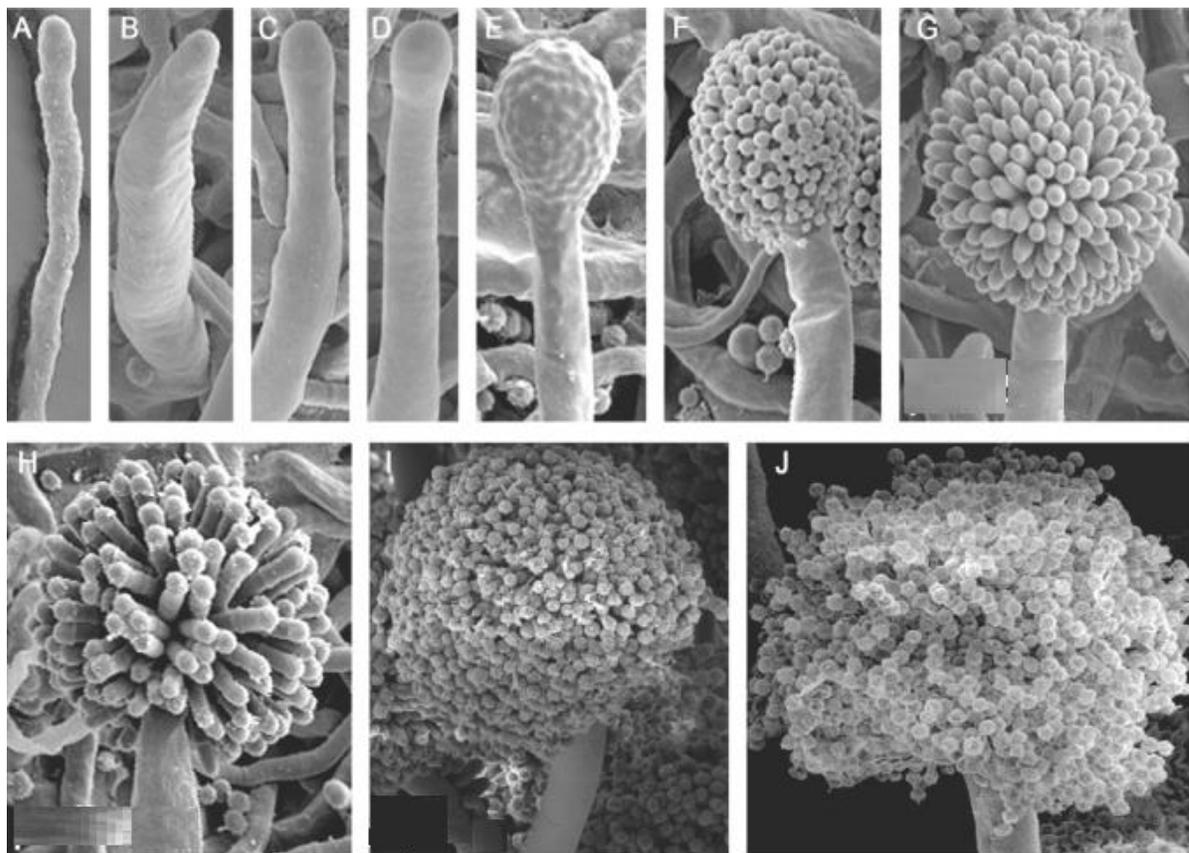


Figura 3. Desarrollo de *A. niger* (Modificado de Krijgsheld y col., 2012).

1.2.2 *Aspergillus flavus*

Morfología macroscópica: Colonias en PDA (papa dextrosa agar) a 25 °C son de color oliva a verde lima. Tienen crecimiento rápido. La textura es de suave a granular. Cuando están presentes los esclerocios son café oscuro. En algunas muestras aisladas pueden estar presentes exudados café claros.

Morfología microscópica: Las hifas son septadas. Las cabezas de las conidias son radiales y toman forma de columna al envejecer. Los conidióforos son duros, sin color, de 800 µm de largo x 15-20 µm de ancho, las vesículas son globosas a subglobosas, la métula cubre casi toda la vesícula en las especies biseriadas. Algunos aislamientos pueden ser uniseriados, produciendo sólo fiálides que cubren la vesícula. La conidia es suave, globosa con un diámetro de 3 a 6 µm. (Rex y col., 2007)

Cuadro 3. Color de las colonias en varias especies de *Aspergillus* (Rex y col., 2007).

Especie	Superficie	Reverso
<i>A. clavatus</i>	Azul-verde	Blanco, café con el tiempo
<i>A. flavus</i>	Amarillo-verde	Amarillento-rojizo
<i>A. fumigatus</i>	Azul-verde a gris	Blanco
Gpo. <i>A. glaucus</i>	Verde con zonas amarillas	Amarillo-café
<i>A. nidulans</i>	Verde-amarillo	Rojizo a olivo
<i>A. niger</i>	Negro	Blanco-amarillo
<i>A. terreus</i>	Canela-café	Blanco-café
<i>A. versicolor</i>	Blanco al principio, amarillo, verde o rosa con el tiempo	Blanco-amarillo a rojizo

Las diferencias macroscópicas entre los hongos del género *Aspergillus*, no siempre son tan obvias, los colores característicos de las cepas se ven afectados por el sustrato o medio en el que estos crecen; por otro lado las diferencias microscópicas pueden no ser obvias para un ojo inexperto (Figura 4) (Watanabe, 2002).

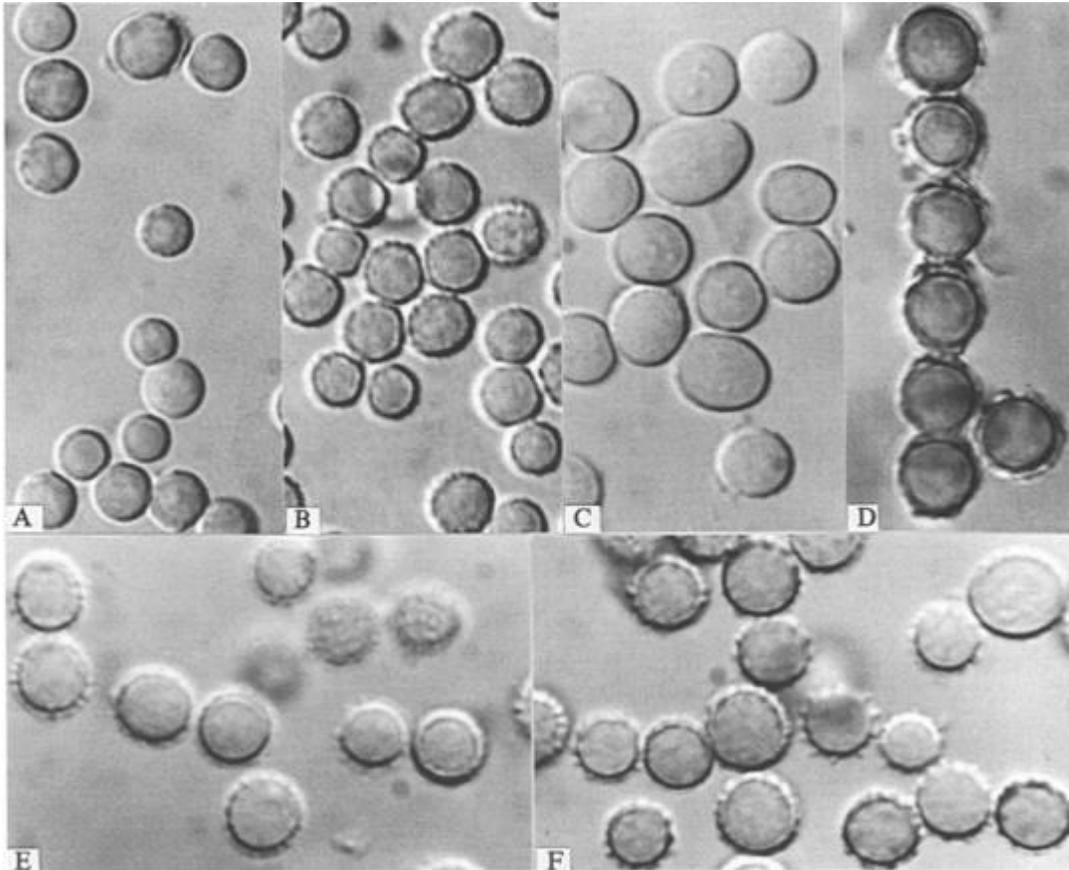


Figura 4. Diferentes conidias de hongos del género *Aspergillus*. A) *A. flavus*. (Escala de rugosidad 1-3 clasificada 1) B) *A. flavus*. (Escala de rugosidad 1-3 clasificada 1-2) C) *A. oryzae*. D) *A. tamarii*. E) *A. parasiticus*. F) *A. sojae*. (Klich y Pitt, 1988).

1.2.3 Aflatoxinas sintetizadas por hongos filamentosos.

Las aflatoxinas al ser un metabolito secundario derivado de policétidos, tienen la siguiente vía de conversión: acetato → policétido → antraquinonas → xantonas → aflatoxinas (Yu y col., 2004).

La biosíntesis de la AFB1 contiene 23 reacciones enzimáticas que comienzan con la acetil coenzima A (acetil-CoA).

Cuadro 4. Micotoxinas producidas por *Aspergillus* spp. (Modificado de Cigić y Prosen, 2009).

Micotoxinas	Especies	Efectos a la salud
Aflatoxinas: B1, B2, G1, G2	<i>Aspergillus</i> spp.	Hepatotóxico, inmunosupresivo, oncogénicos, teratogénicos, mutagénicos
Esterigmatocistina	<i>Aspergillus</i> spp.	Precursor de aflatoxinas

Se sabe que hay aproximadamente 30 genes involucrados, los cuales generan 15 precursores intermediarios reconocidos en la vía de síntesis de la AFB1; la secuencia de los genes involucrados en esta vía se mantienen altamente conservados entre las cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* (Cuadro 4). En las fases tardías de la síntesis de la AFB1 dos enzimas importantes que son una metiltransferasa codificada por el gen *aflP*, que convierte la esterigmatocistina en O-metilesterigmatocistina, posteriormente una oxidoreductasa codificada por el gen *aflQ* que convierte la O-metilesterigmatocistina en la AFB1 (Figura 5).

1.2.4 Antecedentes de la identificación molecular

Desde el descubrimiento de las aflatoxinas, se han desarrollado técnicas de control para la identificación de hongos aflatoxénicos; el descubrimiento de una cepa mutante color rojo ladrillo de *A. parasiticus*, el cual es dado por la acumulación de ácido norsolorínico (NOR), dio paso a la investigación de la biosíntesis de las aflatoxinas, siendo este, uno de los primeros metabolitos de la vía (Yu, 2012).

Habiendo cerca de 30 genes involucrados en la biosíntesis de las aflatoxinas, ciertos genes no son necesarios, pues su ausencia puede ser sustituida por otros

genes, mientras que genes como *aflD*, *aflJ*, *aflO*, *aflP*, *aflR*, *aflM* y *aflQ*, afectan significativamente la cantidad de aflatoxinas sintetizadas o inhiben la biosíntesis de las mismas (Yu y col., 2004); basado en estos genes de la biosíntesis de las aflatoxinas que pueden estar íntegros, mutados, incompletos o incluso no estar en el genoma, se puede diferenciar entre el los hongos del grupo *Flavii*, *Aspergillus* y hongos en general.

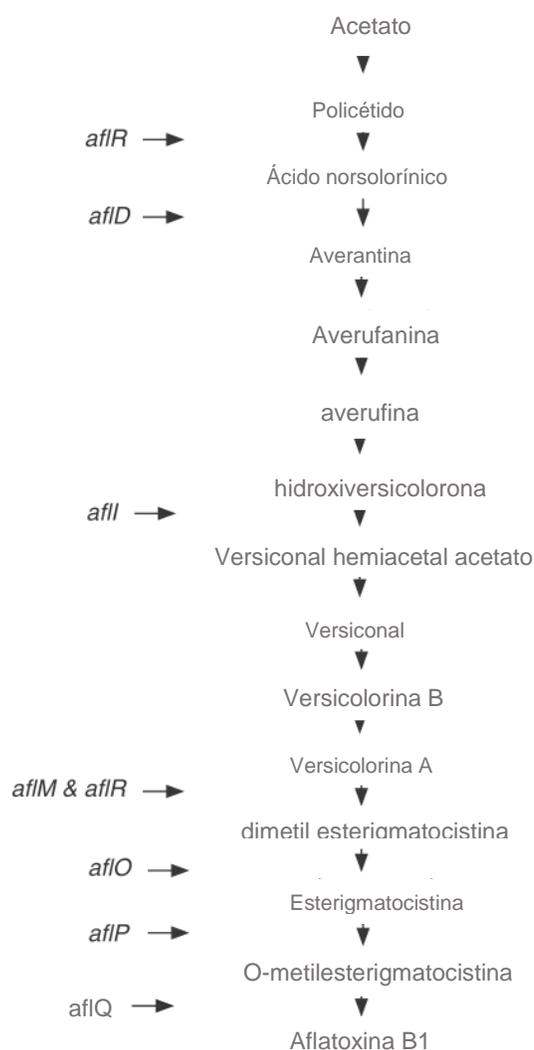


Figura 5. Diagrama de la vía de biosíntesis de la afltaoxina B1. (Modificado de Levin, 2012)

2. HIPÓTESIS

Dado que la secuencia de los genes involucrados en la síntesis de aflatoxinas del grupo *Flavii* es conocida, será posible desarrollar un método de detección de hongos aflatoxénicos basándose en la detección de estos genes por la técnica de PCR.

3. OBJETIVOS

3.1 General.

Desarrollar un método capaz de identificar molecularmente hongos aflatoxénicos del grupo *Flavii*.

3.2 Específicos

Montar una técnica de extracción de DNA de hongos que sea eficiente.

Amplificar genes relacionados con la síntesis de aflatoxinas por PCR.

Desarrollar un método que permita identificar la presencia de genes relacionados con la síntesis de aflatoxinas por hongos del grupo *Flavii*.

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales

Microorganismos: Todas las cepas se encuentran preservadas en el cepario del laboratorio de Fermentaciones de la Facultad de Química de la UAQ.

Aspergillus flavus CGCT 2687: Cepa modelo para el estudio de la producción de aflatoxinas; pertenece al grupo *Flavii*, aflatoxénica. Donada por Profesor Guillermo Huitrón del Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM.

Aspergillus flavus NRRL 6541: Cepa de colección la Unidad de Prevención de Micotoxinas y Microbiología Aplicada del Centro Nacional de Investigación de Uso de la Agricultura de USA en Peoria Illinois. Pertenece al grupo *Flavii*, no aflatoxénica; donada por Profesor Guillermo Huitrón del Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM.

Aspergillus oryzae: Cepa de colección obtenida del Cepario de la Facultad de Química de la UNAM; pertenece al grupo *Flavii*, no aflatoxénica, ampliamente usada en la industria alimenticia.

Aspergillus sojae: Cepa de colección obtenida del Cepario de la Facultad de Química de la UNAM; pertenece al grupo *Flavii*, ampliamente utilizada en la producción de alimentos, no aflatoxénica.

Aspergillus niger N402: Cepa modelo de *Aspergillus niger*, portadora de una mutación que produce conidioforos cortos, es la más utilizada para estudios de fisiología y genética. No pertenece al grupo *Flavii*, no es aflatoxénica, donada por el Profesor Guillermo Huitrón del Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM.

Penicillium spp. Cepa aislada e identificada en la UAEMx, No pertenece al género *Aspergillus* y no produce aflatoxinas.

Medios de Cultivo: PDA Papa, dextrosa Agar (SIGMA-Aldrich); Sabouraud (peptona de caseína 10 gr y glucosa 40 gr); todos los medios se ajustaron a un pH de 6.5 y se esterilizaron a 15 psi por 15 minutos.

Primers: se utilizaron primers para amplificar los siguientes genes; *afID* (3 pares de primers), *afIJ* (1 par de primers), *afIO* (1 par de primers), *afIP* (3 pares de primers), *afIR* (3 pares de primers), *afIM* (2 pares de primers) y tubulina (1 par de primers) como control positivo para todas las cepas (Anexo 1).

Reactivos: solución CTAB (CTAB 2% (W/V); TRIS-Cl, PH 8, 100 mM; EDTA, PH 8, 20 mM; NaCl 1.4 M; β -mercaptoetanol 2% (volumen final). Cloroformo, alcohol isoamílico, etanol absoluto, acetato de sodio 3 M (246.09 gr/L), todos los reactivos se prepararon con agua tridestilada estéril.

Equipo: transiluminador, termociclador (BioRad), cámara de electroforesis (BioRad, micropipetas (Rainin 1, 20, 200 y 1000 μ L).

4.2 Métodos

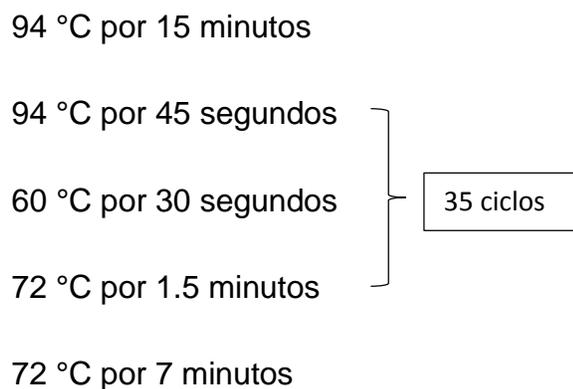
Las cepas se reactivaron en viales inclinados que contenían 10 ml de PDA, incubados por 72 horas a 30°C. Posteriormente las cepas se cultivaron Sabouraud incubando a 30°C y 150 RPM durante 3 días. La biomasa generada se filtró y secó con papel absorbente para ser congelada a -20 °C; todas las muestras se procesaron dentro de las 24 horas siguientes de su obtención.

La extracción de DNA se realizó siguiendo el protocolo modificado de CTAB tal como se muestra abajo; el DNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría UV/VIS a 260 nm. La concentración de DNA de las muestras se calculó usando la siguiente fórmula: concentración de DNA=(ABS₂₆₀)*(50 ng de DNA/ μ l)*(dil); las muestras se diluyeron a 100 ng/ μ L para ser usadas como soluciones de trabajo.

El protocolo modificado de extracción de DNA con CTAB se realizó de la siguiente manera: el micelio recolectado de los matraces fue filtrado con papel Whatman #1 y se trituró con nitrógeno líquido. El triturado se pesó a 0.1 gr de muestra, se agregó

a tubos Eppendorf de 2 ml y se homogenizó con 1 mL de CTAB usando el Vortex por 1 min. Se centrifugó por 15 min a máxima velocidad. Se recuperó la fase acuosa y se realizó una extracción con 1 mL de cloroformo-isoamílico (49:1). Se centrifugó por 10 min a máxima velocidad, se recuperó la fase acuosa y se dejó precipitando toda la noche con 1/10 del volumen de acetato de sodio 3M y un volumen de isopropanol. Al día siguiente se centrifugaron las muestras a 15 min a máxima velocidad. Se decantó el contenido y se lavó con 1 mL de etanol al 70%. Se centrifugó por 5 min a máxima velocidad, se decantó y se dejó secando. Una vez seco, se resuspendió el contenido en 50 μ L de TE.

PCR: Se realizó PCR punto final con un volumen de 25 μ L (cuadro 5) con los diferentes primers para comprobar las diferencias entre las cepas aflatoxénicas, no aflatoxénicas y las que no pertenecen al grupo *Flavii*, de acuerdo al siguiente protocolo modificado (Leema G y col., 2010):



En el cuadro 5 se especifican las cantidades y concentraciones necesarias para preparar las reacciones de PCR. Esta tabla puede ser utilizada para preparar un master mix (H₂O destilada estéril, Buffer 10X, MgCl₂, DNTP's, se pueden incluir los primers si sólo se va a probar un gen para muchas muestras diferentes).

Cuadro 5. Preparaciones de reacciones de PCR.

Reactivos	Concentración final	Volumen final (μL)
H ₂ O destilada estéril	---	18.8
Buffer 10X	1X	2.5
MgCl ₂	1.5mM	0.75
DNTP's	200 μM	0.5
Primers	0.25 μM	0.625 (c/primer)
DNA	100 ng/ μL	1
TaqPol	1U/ μL	.2
Volumen final	---	25

Geles de electroforesis: Los productos de PCR se mezclaron con GelRed como buffer de carga y se corrieron por 45 minutos a 90 V en geles de agarosa al 0.8% usando TAE 1X (formado por TRIS 242 g, ácido acético glacial 57.1 mL y 100 mL de EDTA 0.5 M a PH 8.0 para una concentración final 50X) como buffer de corrida, el tamaño de los amplicones se comparó con los resultados reportados en la bibliografía.

5. RESULTADOS

5.1 Crecimiento en PDA

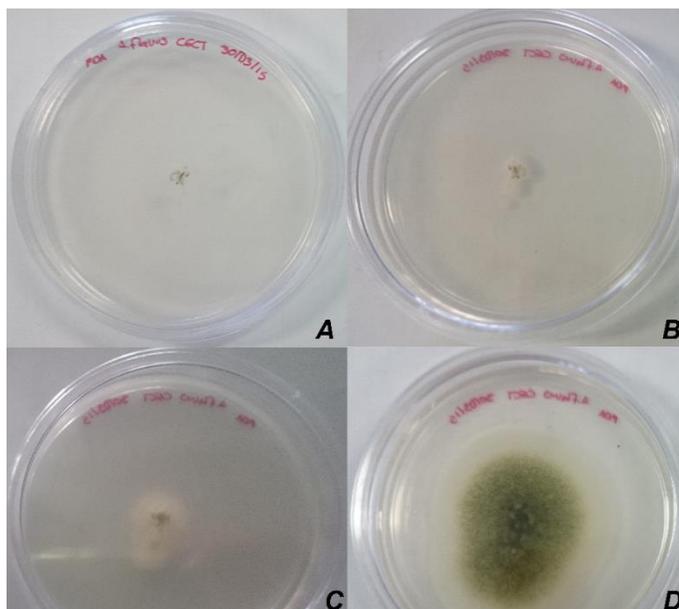


Figura 6. Crecimiento de *A. flavus* CGCT 2687. A) 0 días, B) 1 día, C) 2 días, D) 6 días

En la Figura 6, se puede apreciar, el crecimiento de *Aspergillus flavus* CGCT 2687 en caja de Petri sobre PDA, esta cepa pertenece al grupo *Flavii* y es aflatoxénico, por lo que es la muestra de mayor interés en este proyecto. El crecimiento inicial fue lento, con la formación de colonias blancas y algodonosas, el tiempo promedio de crecimiento de las colonias fue de entre 3 y 5 días, al sexto día se pudo observar la formación de conidias pulverulentas que se tornaron de color verde amarillento, en este medio las colonias que se formaron tuvieron una extensión limitada y en ningún caso cubrieron completamente la superficie de la caja; durante el tiempo de incubación se observó la formación de esclerocios que es el tipo de estructura relacionada con la reproducción sexual.

En la Figura 7 se muestra el desarrollo de la cepa *Aspergillus flavus* NRRL 6541, esta cepa es no aflatoxénica por lo que se usó como cepa control no aflatoxénica del grupo *Flavii*. El crecimiento de la cepa fue blanco y algodonoso y al igual que

para la cepa CGCT, el crecimiento tomo 5 días y al alcanzar el sexto día se produjeron conidias de color verde amarillento. Las colonias formadas fueron irregulares y discontinuas, dejando zonas vacías al interior de las mismas, pudimos observar que las conidias adquirieron un tono café después de algunos días en el refrigerador.

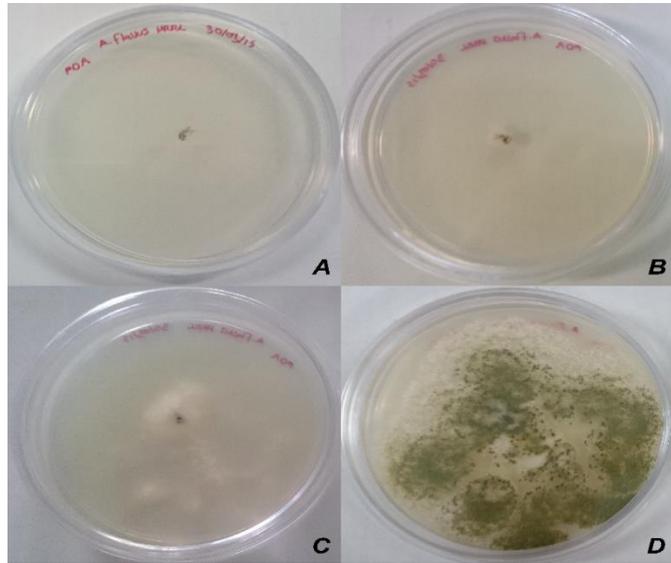


Figura 7. Crecimiento de *A. flavus* NRRL 6541. A) 0 días, B) 1 día, C) 2 días, D) 6 días

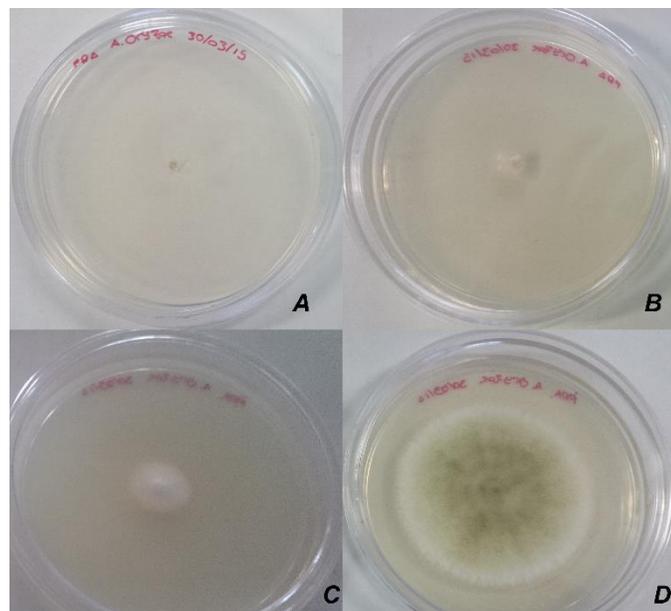


Figura 8. Crecimiento de *A. oryzae*. A) 0 días, B) 1 día, C) 2 días, D) 6 días

En la Figura 8, *Aspergillus oryzae*, el crecimiento fue de color blanco al inicio, las colonias fueron algodonosas y redondeadas, después de 6 días de crecimiento se formaron conidias son de un color verde claro y se formó un halo miceliar blanco. El tiempo de desarrollo promedio fue de entre 3 y 5 días. *Aspergillus oryzae* pertenece al grupo *Flavii* y se usa en la industria alimentaria, no es productor de aflatoxinas.

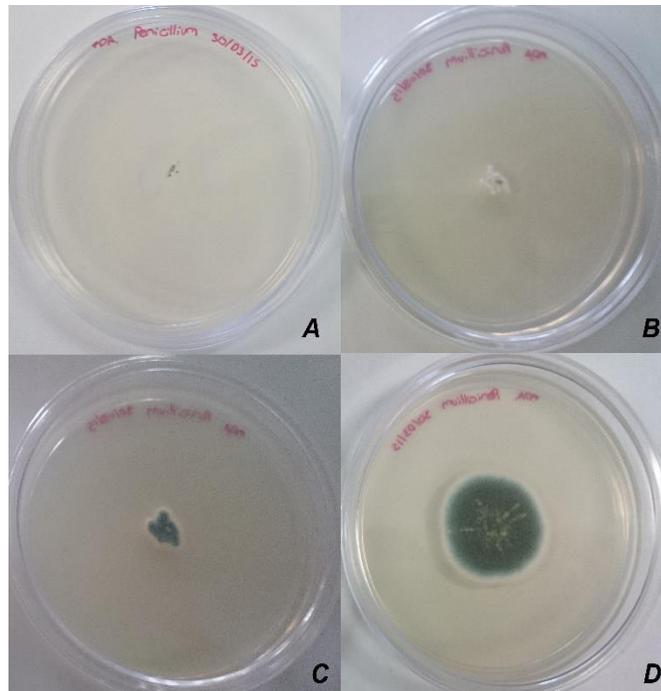


Figura 9. Crecimiento de *Penicillium* spp. A) 0 días, B) 1 día, C) 2 días, D) 6 días

En la Figura 9, *Penicillium* spp., fue la cepa con el crecimiento más lento, el color inicial fue blanco, el micelio fue de crecimiento ralo y pegado a la superficie. Se observó que desde el segundo día formaron conidias, el crecimiento fue redondeado con un halo micelial blanco con conidias de color verde oscuro que parecen cristalizadas. El tiempo de desarrollo promedio fue de entre 5 a 10 días. Este hongo no pertenece al género *Aspergillus* y no produce aflatoxinas, aunque ciertas especies de *Penicillium* llegan a producir toxinas como la ocratoxina A y la patulina, entre otras toxinas.

En la Figura 10 se muestra el crecimiento de *Aspergillus niger* N402 el micelio fue de color blanco con colonias algodonosas en intervalos bien definidos, antes de

empezar a formar las conidias el micelio se tornó color amarillo claro, posteriormente se formaron conidias de color negro. Este hongo no pertenece al grupo *Flavii* y no produce aflatoxinas.

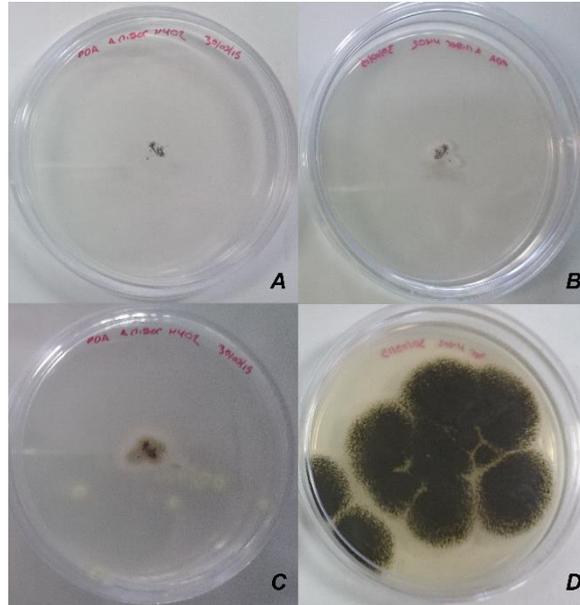


Figura 10. Crecimiento de *A. niger* N402. A) 0 días, B) 1 día, C) 2 días, D) 6 días

La Figura 11 muestra que *A. sojae* tuvo un crecimiento miceliar de color blanco que creció de forma algodonosa y redondeada, se empezaron a formar conidias a los dos días de crecimiento, por lo que podemos afirmar que este hongo tuvo el crecimiento más rápido de todas las cepas usadas en este estudio, el color de las conidias fue verde amarillento y se formó un halo color amarillo alrededor. Pertenece al grupo *Flavii* y no está considerado como aflatoxénico.

Como se puede observar en la imágenes mostradas en esta sección la identificación de las cepas basada en la morfología de crecimiento es muy complicada, se hace todavía más difícil porque algunas de la cepas muestran patrones de crecimiento y color de las hifas que son completamente diferentes al cambiar el medio de cultivo o las condiciones de crecimiento. Esto justifica la necesidad de desarrollar un método de detección de cepas del grupo *Flavii* basado en técnicas moleculares que no sólo hará más fácil la detección, sino que permitirá acortar los tiempos de detección e identificación.

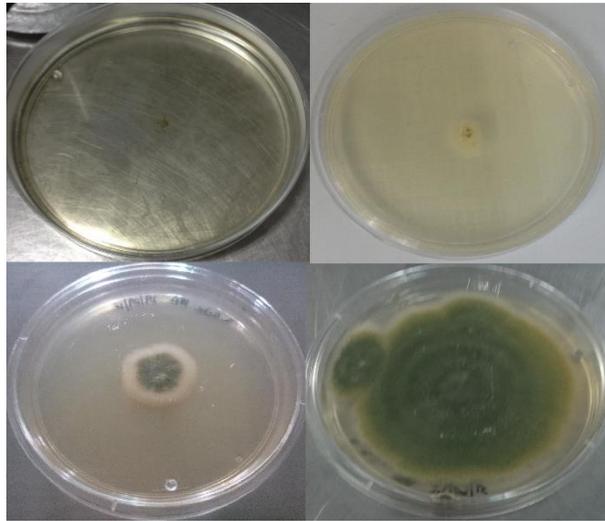


Figura 11. Crecimiento de *A. sojae*. A) 0 días, B) 1 día, C) 2 días, D) 6 días

Todas las cepas crecieron de manera vigorosa y formaron conidias que más tarde mostraron ser fértiles. Las cepas se cultivaron en matraces con PDA para cosechar conidias que fueron preservadas por la técnica de secado en leche descremada para ser usadas en las siguientes etapas de la tesis.

5.2 Crecimiento en Sabouraud líquido.

Con la finalidad de obtener micelio del cual extraer DNA las cepas fueron cultivadas en medio Sabouraud por fermentación sumergida. En la Figura 12 se muestran los cultivos después de incubarlos por 3 días a 30°C o 37°C de acuerdo con el óptimo de cada cepa. Puede observarse que todas las cepas se desarrollaron como pellets que son esferas de micelio donde el hongo crece sobre sí mismo, este tipo de crecimiento es típico de la fermentación sumergida y por lo tanto es el esperado para estos cultivos. Todas las cepas mostraron un tipo de crecimiento prácticamente igual, aún aquellas de grupos filogenéticamente diferentes; de hecho, la única que mostró un tipo de crecimiento fácilmente diferenciable es una de las que se encuentra dentro del grupo *Flavii*; lo que confirma la dificultad para identificar a los hongos de este grupo basados en su características físicas.

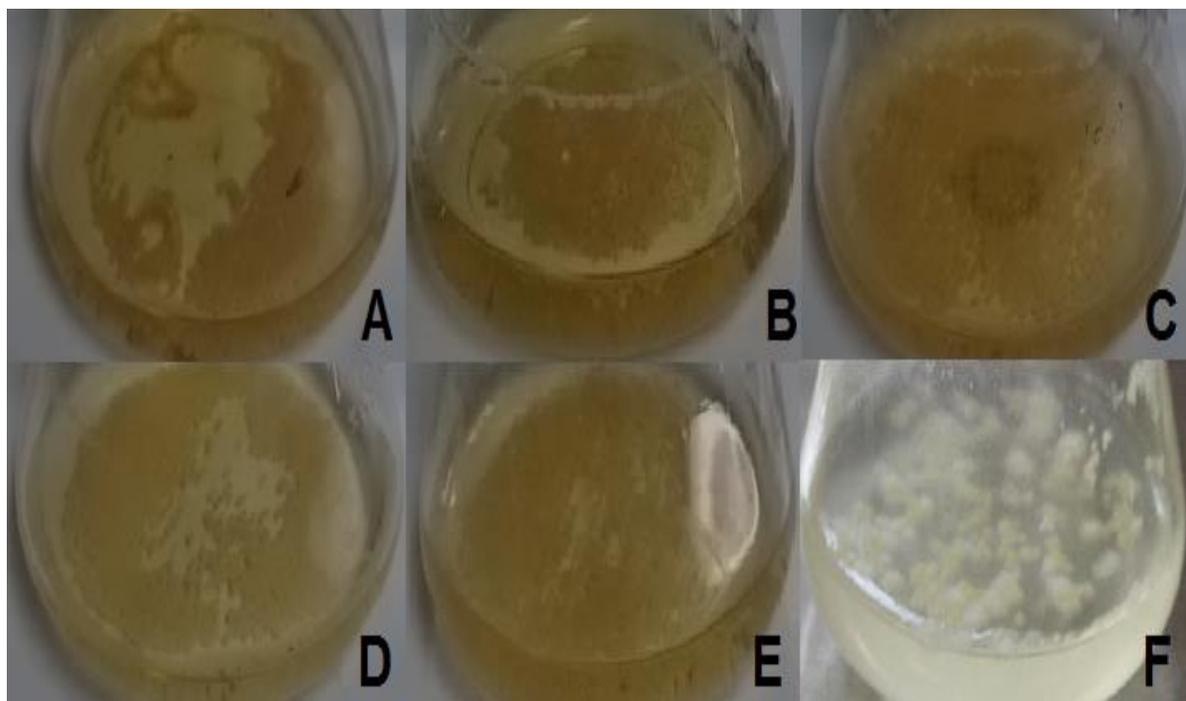


Figura 12. Crecimiento a 3 días de inoculación en Sabouraud líquido de: A) *A. flavus* CGCT 2687, B) *A. flavus* NRRL 6541, C) *A. oryzae*, D) *Penicillium* spp. E) *A. niger* N402, F) *A. sojae*.

5.3 Extracciones de DNA por CTAB modificado

Las extracciones de DNA se hicieron en el tercer día de cultivo cuando había suficiente micelio de donde extraer DNA. Para la extracción de DNA se utilizó el protocolo con CTAB modificado. La primera modificación se hizo en la preparación de la muestra al triturarla con nitrógeno líquido; se pesaron 0.1 gr de muestra debido a que este es el peso óptimo para la extracción. Una vez pesada, la muestra se agregó a tubos Eppendorf e inmediatamente se volvió a congelar en nitrógeno líquido. Las muestras se homogenizaron con solución de CTAB usando el Vórtex. Otro cambio realizado en el protocolo de extracción de DNA fue el tiempo de centrifugación que se aumentó a 15 min después de la homogenización con CTAB, 10 min después del lavado con cloroformo isoamílico y 5 min con el lavado de etanol. Todas las centrifugaciones se hicieron a máxima velocidad y a 4°C. Se modificó el tiempo de precipitación con isopropanol y acetato de sodio de dos horas a toda la noche.

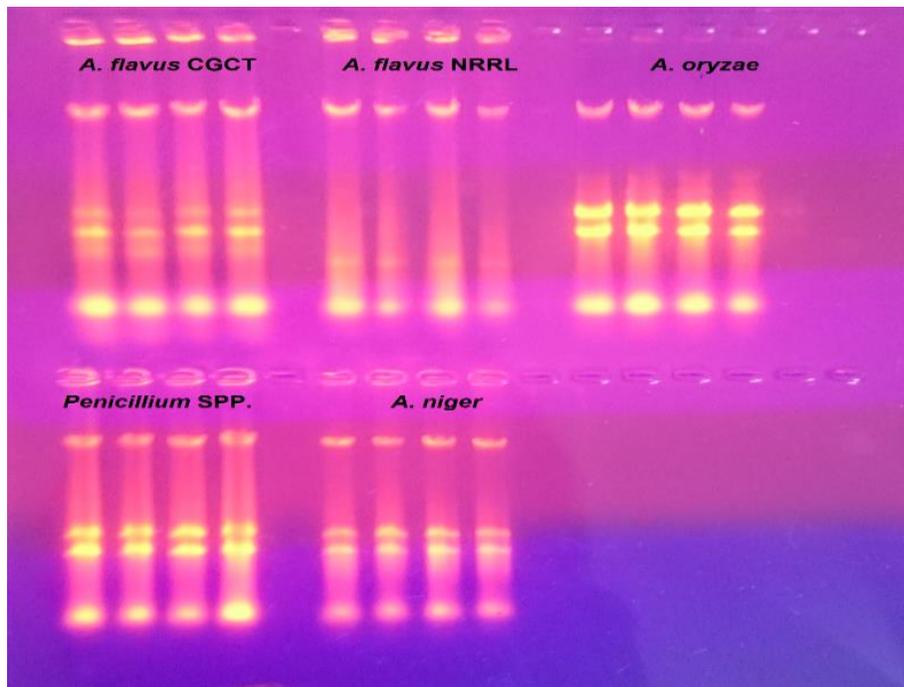


Figura 13. Extracciones de DNA por CTAB modificado de las diferentes cepas trabajadas

En las Figuras 13 y 14 se muestran las extracciones de DNA de *Aspergillus flavus* CGCT 2687, *Aspergillus flavus* NRRL 6541, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium* spp., *Aspergillus niger* N402 y *Aspergillus sojae* con el método de CTAB modificado. En la Figura 13 se muestran las extracciones de DNA donde se coprecipitó RNA, en cambio después de varias extracciones y mejorando la técnica se consiguió que la extracción de DNA de *A. sojae* quedara libre de RNA como se observa en la Figura 14.

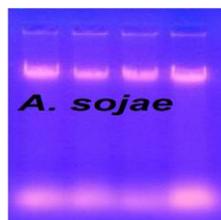


Figura 14. Extracción de DNA por CTAB de *A. sojae*

Las extracciones de DNA se realizaron siempre un día antes de cada PCR para que el DNA estuviera íntegro. La concentración de DNA de las muestras se obtuvo con el espectrofotómetro a una densidad óptica de 260 nm. Para saber la

concentración en ng/ μ L se utilizó la fórmula del coeficiente de extinción ($Abs \times 50 \times 500$). Todas las concentraciones de DNA de las muestras extraídas se encontraban arriba de los 1000 ng/ μ L.

5.4 PCRs

Una vez hechas las extracciones de DNA de todas las muestras, se corrió un PCR utilizando sólo el primer de tubulina para verificar que el DNA fuera de utilidad. Debido a que con *A. niger* sólo se logró la amplificación de tubulina una vez y no se pudieron conseguir réplicas, se eliminó del análisis y se sustituyó con *A. sojae*, con la cual si se pudieron hacer réplicas de la amplificación de tubulina.

Los tiempos y la temperatura de los PCRs se hicieron a base de los resultados con la amplificación de tubulina, siendo el protocolo de la siguiente forma: se realizó una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C y a continuación se iniciaron los ciclos que fueron en total 35; estos consistieron de una desnaturalización por 45 segundos a 94°C, el alineamiento por 30 segundos a 60°C y la extensión se realizó en 1.5 minutos a 72°C, por último se dejó un tiempo final de 7 minutos a 72°C para terminar cualquier extensión final.

En la Figura 15 se muestran los PCRs de todas los hongos, en orden descendente se encuentra *A. flavus* CGCT 2687, *Aspergillus flavus* NRRL 6541, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium* spp. y *Aspergillus sojae*. En el caso de *Aspergillus flavus* NRRL 6541 y *Penicillium* spp. se puede ver que no hubo amplificación para ningún gen excepto para tubulina.

Se puede observar que el gen de la tubulina (#12 en la Figura 15) amplificó para todas las muestras mientras que el control negativo (CN) no amplificó en ninguna, corroborando el ensayo. El gen *afID* con número 1 en la Figura 15, sólo amplifica para *A. flavus* CGCT 2687 y *Aspergillus sojae*, los cuales tienen los mismos genes amplificados. *A. oryzae* amplifica para los genes *afIO* (#3), *afIP* (#4, #10 y #11), *afIM* (#13 y #14).

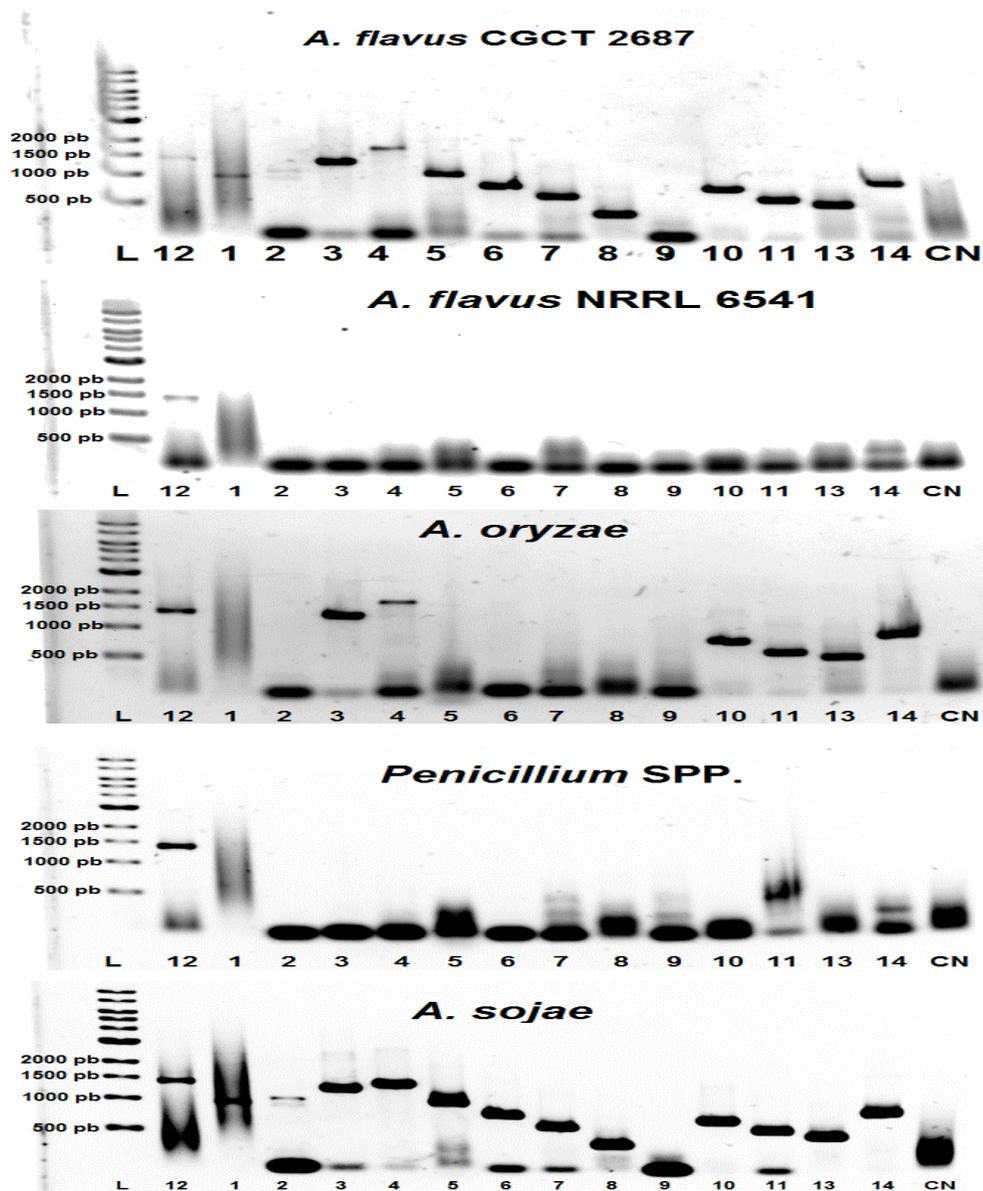


Figura 15. PCR de *A. flavus* CGCT 2687, *A. flavus* NRRL 6541, *A. oryzae*, *Penicillium* spp., *A. sojae*. L) ladder 1kb, 12) tubulina, 1) *aflD*, 2) *aflJ*, 3) *aflO*, 4) *aflP*, 5) *aflR*, 6) *aflR*, 7) *aflR*, 8) *aflD*, 9) *aflD*, 10) *aflP*, 11) *aflP*, 13) *aflM*, 14) *aflM*, CN) control negativo.

En el Cuadro 6, se indica la amplificación de los genes según los datos obtenidos de los geles de electroforesis. En la primera columna se señala el gen y el número que aparece en el gel. Las palomitas (✓) indican que el gen se amplificó, mientras que la tache (X) significa que no hubo amplificación en ese gen, con los primers utilizados.

Cuadro 6. Resultados de PCR's simplificados.

Carril/ gen	<i>A. flavus</i> CGCT 2687	<i>A. flavus</i> NRRL 6541	<i>A. oryzae</i>	<i>Penicillium</i> spp.	<i>A. sojae</i>
L /1KB	✓	✓	✓	✓	✓
12 / Tub	✓	✓	✓	✓	✓
1 / <i>aflD</i>	✓	✗	✗	✗	✓
2 / <i>aflJ</i>	✓	✗	✗	✗	✓
3 / <i>aflO</i>	✓	✗	✓	✗	✓
4 / <i>aflP</i>	✓	✗	✓	✗	✓
5 / <i>aflR</i>	✓	✗	✗	✗	✓
6 / <i>aflR</i>	✓	✗	✗	✗	✓
7 / <i>aflR</i>	✓	✗	✗	✓	✓
8 / <i>aflD</i>	✓	✗	✗	✗	✓
9 / <i>aflD</i>	✗	✗	✗	✓	✗
10 / <i>aflP</i>	✓	✗	✓	✗	✓
11 / <i>aflP</i>	✓	✗	✓	✓	✓
13 / <i>aflM</i>	✓	✗	✓	✗	✓
14 / <i>aflM</i>	✓	✓	✓	✓	✓
CN	✗	✗	✗	✗	✗

6. DISCUSIONES

Se pudo observar que durante los primeros días de cultivo todas las cepas de hongos utilizadas fueron de color blanco y tuvieron un crecimiento similar sobre PDA. El crecimiento de las colonias fue redondeado, algodonoso y pulverulento una vez iniciada la conidiación para todos los *Aspergillus*; esto confirma que la identificación entre las cepas es compleja, difícil y requiere de un conocimiento muy amplio de los hongos, el único hongo diferenciable fue *Penicillium* spp., que crece en forma compacta y forma conidióforos que se observan firmes, aun así coincide con los *Aspergillus* en que se observa un crecimiento de colonias redondeadas y después de la formación de conidias, sigue creciendo generando un halo micelial como lo hacen *A. sojae*, *A. oryzae*, y *A. flavus* CGCT 2687. Después de la formación de conidias, todas las colonias de *Aspergillus* tienen un color similar (diferentes tonalidades de verde), que con el tiempo tienden a hacerse de un color más oscuro y formarse cuerpos escleróticos en las zonas más viejas del cultivo. Otros factores que influyen en la forma del crecimiento de los hongos y el color de las conidias son el medio de cultivo, agitación y temperatura de incubación; ya que al cambiar las condiciones de cultivo la morfología de las colonias se vuelve diferente (Watanabe, 2002; Rex, 2007; Krijgheld, 2012).

En el crecimiento líquido se observó el mismo fenómeno donde las cepas son indistinguibles a simple vista para un ojo inexperto, las cepas de *Aspergillus* presentaron dos tipos de micelio, uno alargado y otro tipo pellet, el micelio alargado se forma porque el hongo crece en la pared del matraz y cuando no soporta su propio peso cae al medio; mientras que los pellets se presentan cuando el hongo se mantiene en fermentación sumergida y se forman cuando el micelio crece sobre sí mismo formando una esfera; el único micelio que mostró un crecimiento diferente fue el de *A. sojae* que creció en forma de cúmulos algodonosos muy laxos, esto es interesante porque este hongo pertenece al grupo *Flavii* y hubiéramos esperado que mostrara una morfología parecida al resto del grupo. La cantidad de biomasa producida a las 72 horas fue suficiente para realizar 8 extracciones de DNA de

cada cepa de *Aspergillus*, bajo las mismas condiciones. La cepa de *Penicillium* formó pellets compactos y al ser el hongo de crecimiento más lento, la biomasa generada alcanzó para realizar solo 4 extracciones de DNA.

Durante el proceso de extracción de DNA se tuvieron varios problemas al inicio, pues los protocolos no estaban optimizados, el primer problema a resolver fue la lisis de los hongos ya que el protocolo se encontraba optimizado para bacterias y/o células sin pared celular; por lo que la pared celular de los hongos impidió las primeras extracciones de DNA. Para solucionar ese problema se agregó el paso de lisis con nitrógeno líquido. Una vez obtenido un polvo blanco se resuspendió con la solución de CTAB, y se continuó con el protocolo normal; dado que las primeras muestras salieron muy contaminadas con restos del hongo, se modificó el protocolo nuevamente aumentando el tiempo de cada centrifugación en búsqueda de una mejor separación de las partículas precipitadas. El resultado fue un DNA más limpio, por lo cual la tercera y última modificación fue aumentar la velocidad de centrifugación a 14 g's (máxima velocidad de la centrífuga), con lo que se consiguieron muestras de mejor calidad para realizar los PCR's correspondientes. En el caso de las muestras que salieron con RNA en el momento de la extracción se atribuye a la falta de experiencia en la extracción de DNA al momento de obtener esas muestras.

Los problemas que se presentaron durante los PCR's fueron con el manejo de pipetas y reactivos. El protocolo que se utilizó no requirió de modificaciones, las temperaturas de alineamiento que venían con los primers variaban entre los 58 °C y los 62 °C por lo que se trabajaron en 60 °C y se obtuvieron amplificaciones de manera adecuada. Por ser tantos genes a trabajar y tantas muestras, si se modificaba la temperatura de alineamiento, generalmente no amplificaban algunas muestras, entre ellas, la tubulina, que fue el control positivo, por lo cual no se pudo lograr generar imágenes sin barridos. Estos barridos se pueden deber a diferentes motivos: la concentración de los reactivos, no tener la temperatura óptima de alineamiento que genera que los primers se peguen a zonas que no corresponden

(generación de bandas espurias), las probabilidades de los primers para hacer dímeros ya que se alcanzan a ver en bandas de menos de 100 pares de bases (Lorenz, 2012).

Los primers utilizados fueron usados en trabajos anteriores en las cepas de hongos utilizados (Yu, 2004; Pasonne, 2010; Santini, 2013). Los genes que se amplificaron pertenecen a la ruta de síntesis de aflatoxinas y en todos los casos los pesos moleculares obtenidos en los amplicones son similares a los reportados en la bibliografía. El gen *aflR*, también conocido como afl-2, apa-2, es un factor de transcripción que contiene un sitio de unión al DNA por un clúster de zinc, regula de manera positiva la síntesis de aflatoxinas B1 y B2. *aflD*, también conocido como nor-1, es una ácido norsolorínico reductasa, la cual convierte de ácido norsolorínico a averantina. *aflM*, también conocido como ver-1, es una versicolorina A deshidrogenasa que convierte de versicolorina A a dimetilesterigmatocistina. *aflO*, también conocida como omtB es una O-metiltransferasa y convierte de dimetilesterigmatocistina a esterigmatocistina. *aflP*, también conocida como omtA o omt-1, es una O-metiltransferasa, convierte de esterigmatocistina a O-metilesterigmatocistina. *aflJ*, también conocido como *aflS*, es un factor de transcripción que coactiva a *aflR*, y es un regulador positivo para la síntesis de aflatoxinas B2 necesario para la conversión de ácido norsolorínico, esterigmatocistina y O-metilesterigmatocistina a aflatoxinas. (Yu, 2004; ; Pasonne, 2010; Levin, 2012; Santini, 2013). Como se puede ver en la Figura 15, en el caso de *Aspergillus Flavus* CGCT 2685 y *Aspergillus sojae*, todos los genes amplifican en ambas muestras, lo que puede ser debido al parecido filogenético de *A. sojae* con *Aspergillus parasiticus* el cual es un hongo perteneciente al grupo *Flavii* (Pasonne, 2010).

En la muestra 1, para el gen *aflD* con los primers nor1-F y NoR1-R, *Aspergillus flavus* CGCT 2687 y *Aspergillus sojae* generaron un amplicón de 1000 pares de bases aproximadamente, siendo que la bibliografía reporta un amplicón de 990

pares de bases. Ninguna de las otras cepas amplificó para este gen en estas condiciones (Yu, 2004; Levin, 2012).

En la muestra 2, para el gen *aflJ* (primers únicos), *Aspergillus flavus* CGCT 2687 y *Aspergillus sojae* generaron un amplicón de 1000 pares de bases aproximadamente, siendo reportado en la bibliografía un amplicón de 840. Ninguna de las otras cepas amplificó para este gen en estas condiciones (Yu, 2004; Levin, 2012).

En la muestra 3, para el gen *aflO* con los primers omtB(F)-F y omtB(F)-R, *Aspergillus flavus* CGCT 2687, *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus sojae* generaron un amplicón de 1500 pares de bases aproximadamente, siendo que la bibliografía se reporta un amplicón de 1333 pares de bases. Ninguna de las otras cepas amplificó para este gen en estas condiciones (Yu, 2004; Levin, 2012).

En la muestra 4, para el gen *aflP* con los primers omt1-F y omt1-R, *Aspergillus flavus* CGCT 2687, *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus sojae*, generando un amplicón de 1500 pares de bases aproximadamente, siendo que en la bibliografía se reporta un amplicón de 1490 pares de bases. Ninguna de las otras cepas amplificó para este gen en estas condiciones (Yu, 2004; Levin, 2012).

En la muestra 5, para el gen *aflR* con los primers APA-450 y APA-1482, *Aspergillus flavus* CGCT 2687 y *Aspergillus sojae*, generan un amplicón de 1000 pares de bases, siendo que en la bibliografía se reporta un amplicón de 1032 pares de bases. Ninguna de las otras cepas amplificó para este gen en estas condiciones (Yu, 2004; Levin, 2012).

En la muestra 6, para el gen *aflR* con los primers aflR1-F y aflR1-R, *Aspergillus flavus* CGCT 2687 y *Aspergillus sojae*, generaron un amplicón de 900 y 750 pares de bases aproximadamente respectivamente, siendo que la bibliografía se reporta un amplicón de 798 pares de bases. Ninguna de las otras cepas amplificó para este gen en estas condiciones (Yu, 2004; Levin, 2012).

En la muestra 7, para el gen *afIR* con los primers *afIR-F* y *afIR-R*, *Aspergillus flavus* CGCT 2687, *Penicillium* spp. y *Aspergillus sojae*, generaron un amplicón de 550, 450 y 550 pares de bases aproximadamente y respectivamente, siendo que la bibliografía reporta un amplicón de 630 pares de bases. Ninguna de las otras cepas amplificó para este gen en estas condiciones (Yu, 2004; Levin, 2012).

En la muestra 8, para el gen *afID* con los primers *nor1* y *nor2*, *Aspergillus flavus* CGCT 2687 y *Aspergillus sojae*, generaron un amplicón de 300 pares de bases aproximadamente, siendo que la bibliografía reporta un amplicón de 400 pares de bases. Ninguna de las otras cepas amplificó para este gen en estas condiciones (Yu, 2004; Levin, 2012).

En la muestra 9, para el gen *afID* con los primers *nortaq-1* y *nortaq-2*, *Penicillium* spp. generó un amplicón de 450 pares de bases aproximadamente, siendo que la bibliografía reporta un amplicón de 66 pares de bases. Ninguna de las otras cepas amplificó para este gen en estas condiciones (Yu, 2004; Levin, 2012).

En la muestra 10, para el gen *afIP* con los primers *omt1* y *omt2*, *Aspergillus flavus* CGCT 2687, *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus sojae*, generaron un amplicón de 600, 750 y 500 pares de bases aproximadamente y respectivamente, siendo que la bibliografía reporta un amplicón de 797 pares de bases. Ninguna de las otras cepas amplificó para este gen en estas condiciones (Yu, 2004; Levin, 2012).

En la muestra 11, para el gen *afIP* con los primers *omtBII-F* y *omtBII-R*, *Aspergillus flavus* CGCT 2687, *Aspergillus oryzae* y *Penicillium* spp. (aunque se ve degradado tiene el tamaño aproximado) y *Aspergillus sojae*, generaron amplicones de 500 pares de bases aproximadamente, siendo que la bibliografía reporta un amplicón de 611 pares de bases. Ninguna de las otras cepas amplificó para este gen en estas condiciones (Yu, 2004; Levin, 2012).

En la muestra 12, para el gen de tubulina (primers únicos), todas las cepas generaron un amplicón de 1500 pares de bases aproximadamente, siendo que la bibliografía reporta un amplicón de 1498 (Levin, 2012).

En la muestra 13, para el gen *aflM* con los primers ver1 y ver2, *Aspergillus flavus* CGCT 2687, *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus sojae* generaron un amplicón de 500, siendo que la bibliografía reporta un amplicón de 537 pares de bases. Ninguna de las otras cepas amplificó para este gen en estas condiciones (Yu, 2004; Levin, 2012).

En la muestra 14, para el gen *aflM* con los primers ver-496 y ver-1391, *Aspergillus flavus* CGCT 2687, *Aspergillus flavus* NRRL 6541, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium spp.* y *Aspergillus sojae*, generaron amplicones de 900, 500, 800,300 y 750 pares de bases aproximadamente y respectivamente , siendo que la bibliografía reporta amplicones de 895 pares de bases, siendo poco confiable para *A. flavus* NRRL 6541 y para *Penicillium spp.* (Yu, 2004; Levin, 2012).

En las muestras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13 y 14 *Aspergillus flavus* CGCT 2687 amplificó como se esperaba los genes dado que es la cepa aflatoxénica, *Aspergillus sojae* al ser un organismo ligado a *Aspergillus parasiticus*, que pertenece al grupo *Flavii* y es productor de aflatoxinas, se podría esperar que su genoma tuviera la información para producir aflatoxinas; dado su uso en la industria alimenticia se esperaba que no hubiera expresión de los genes aflatoxinas, es probable que a pesar de tener los genes para la producción de aflatoxinas no tenga los controles para activarlos o que necesite condiciones de mucho estrés para expresarlos (Yu, 2004; Pasonne, 2010; Levin, 2012; Santini, 2013).

En las muestras 3, 4, 10, 11, 13 y 14 *Aspergillus oryzae*, expresa algunos genes para la conversión de los metabolitos pero los genes *aflR* y *aflJ* que son los reguladores positivos para la conversión a aflatoxinas B1 y aflatoxinas B2, lo que impide la producción de las mismas y hace que sea seguro el hacer alimentos con este hongo (Yu, 2004; Levin, 2012).

En las muestras 7, 9 y 14 *Penicillium spp.* contiene el gen *aflR* que es un regulador positivo para la síntesis de aflatoxinas B1 y B2, aunque parece ser unas 100 pares

de bases más corto que el gen reportado en la bibliografía y no se logra distinguir bien la banda, este resultado es poco confiable (Levin, 2012).

Aspergillus flavus NRRL 6541, amplificó únicamente para el gen *afIM* que es para la conversión de metabolitos intermediarios en la vía de síntesis de aflatoxinas, pero el tamaño del amplicón fue de 500 pares de bases, comparado con la bibliografía que es de 895 pares de bases. Por lo que se puede atribuir esta disminución de bases a una pérdida de bases durante la evolución de la cepa (Pasonne, 2010).

Hasta esta etapa en el proyecto, diferenciar si el hongo es aflatoxénico o no, sea por métodos sencillos como microscopia y crecimiento en placas o por métodos moleculares como PCR, no es posible, pues a nivel genómico pueden contener los genes para producir aflatoxinas, pero no se sabe la integridad que estos tienen así como los controles para regularlos. Se requieren hacer experimentos más exhaustivos, como crecimiento en condiciones específicas para la síntesis de aflatoxinas (37 °C, control de humedad, suplementar el medio con los cereales que infectan los hongos aflatoxénicos).

Posteriormente, si el genoma muestra tener los genes aflatoxénicos y se cultiva con las condiciones adecuadas para su síntesis, y se utiliza luz UV para comprobar la presencia de aflatoxinas, se podría proseguir con RT-PCR para ver realmente cuáles son los genes que se expresan en la síntesis de aflatoxinas y poder determinar cuáles son los genes que se encargan de la regulación positiva de la producción de aflatoxinas.

Para aquellos organismos que no producen aflatoxinas pero que tienen el genoma para hacerlo, se podría comparar el tamaño de los genes a nivel genómico para buscar diferencias significativas entre genes y posteriormente realizar RT-PCR para observar si los genes se están transcribiendo o no.

En las cepas no aflatoxénicas del grupo *Flavii*, como es el caso de *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus sojae*, se puede asumir que han perdido la capacidad de

generar estas toxinas al ejercer sobre ellas una evolución dirigida para mejorar la velocidad de producción y/o sabor en la industria alimenticia.

Aspergillus NRRL se consiguió como una cepa no aflatoxénica y en su genoma parece no haber ningún gen relacionado con la vía de síntesis de aflatoxinas lo cual concuerda con lo esperado y con lo descrito en la literatura. La cepa fue donada por el Doctor Guillermo Aguilar Osorio y no se sabe si la los genes fueron eliminados en un laboratorio o la cepa los perdió de manera evolutiva.

7. CONCLUSIONES

En este trabajo demostramos que es posible identificar la presencia de algunos hongos del grupo *Flavii* por el método de PCR.

Este método no permite distinguir entre cepas aflatoxénicas y no aflatoxénicas con relación a los genes que hay en el genoma, por lo tanto no puede distinguir si el hongo pertenece o no al grupo *Flavii*, y sin estudios más profundos no podemos saber si las cepas que suponemos no son aflatoxénicas realmente no sean aflatoxénicas.

Recomendamos el uso de la técnica de RT-PCR que al estar basada en la amplificación de RNA debe dar información no solo de la presencia de los genes en la cepa si no de su expresión lo que haría el método de detección mucho más interesante y certero.

8. REFERENCIAS

- Abbas** HK, Shier WT, Horn WB, Weaver MA. Cultural methods for aflatoxin detection. *Journal of Toxicology* **2004**; 23:295-315,
- Abdel-Hadi** A, Schmidt-Heydt M, Parra R, Geisen R, Magan N. A systems approach to model the relationship between aflatoxin gene cluster expression, environmental factors, growth and toxin production by *Aspergillus flavus*. *J. R. Soc. Interface* **2012**; 9: 757–767
- Abdin** MZ, Ahmad MM, Javed S. Advances in molecular detection of *Aspergillus*: an update. *Arch Microbiol* **2010**; 192:409–425
- Cigić** K, Prosen H. An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins. *Int. J. Mol. Sci.* **2009**; 10: 62-115
- Godet** M, Munaut F. Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section *Flavi*. *FEMS Microbiol Lett* **2010**; 304:157–168
- Klich** M, Pitt J. Differentiation on *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **1988**; 91: 99-108
- Krijgheld** P, Bleichrodt R, Veluw G, Wang F, Müller W, Dijksterhuis J, Wösten H. Development in *Aspergillus*. *Studies in mycology* **2012**; 74:1-29
- Leema** G, Kaliyamurthy J, Pitchairaj G, Philip A. Keratitis due to *Aspergillus flavus*: clinical profile, molecular identification of fungal strains and detection of aflatoxin production. *Molecular Vision* **2010**; 16:843-854
- Leema** G, Duen-Suey C, Christadoss A, Pitchairaj G, Philip A. Expression of the genes of the aflatoxin biosynthetic pathway in *Aspergillus flavus* isolates from keratitis. *Molecular Vision* **2011**; 17:2889-2897
- Levin** R. PCR detection of aflatoxin producing fungi and its limitations. *International Journal of Food Microbiology* **2012**; 156:1-6
- Lorenz** T. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *JOVE* **2012**; 63:e3998. doi:10.3791/3998
- Mosiello** L, Lamberti I. Biosensors for Aflatoxins Detection. En: Torres-Pacheco I, Ed. *Aflatoxins - Detection, Measurement and Control*. Rijeka: Intech, **2011**; 147-160
- NORMA Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008

- Pasonne** MA, Rosso LC, Ciancio A, Etcheverry M. Detection and quantification of *Aspergillus* section *Flavi* spp. in stored peanuts by real-time PCR of nor-1 gene, and effects of storage conditions on aflatoxin production. *International Journal of Food Microbiology*, **2010**; 138:276-281
- Rex** J, McGinnis M, Arikian S, Rodríguez-Adrián L, Kirsch M. The fungi [Monografía en internet]. California. Doctorfungus, **2007** [consultado 2014 septiembre 25]. Disponible en: <http://www.doctorfungus.org//thefunghi/index.php>.
- Santini** A, Ritieni A. Aflatoxins – recent advances and future prospects. Nápoles: InTech, **2013**; 406:345-375.
- Vincenzi** A, Ramalho F, Zambelli LN, Fernandes CA. Biomarkers of Aflatoxin Exposure and Its Relationship with the Hepatocellular Carcinoma. En: Guevara-Gonzalez R, Ed. *Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology*. Rijeka: Intech, **2011**:107-128
- Watanabe** T. Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. 2a. edición. Boca Ranton: CRC PRESS. **2002**; 190-195
- Wogan** GN. Chemical nature and biological effects of the aflatoxins. *Bacteriological Reviews* **1966**; 30(3):460-471
- Yu** J. Current understanding of aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination. *Toxins*, **2012**;4: 1024-1057
- Yu** J, Perng-Kuang C, Ehrlich C, Jeffrey W, Deepak B, Cleveland E, Payne A, Linz E, Charles P, Bennett W, Bennett J. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied and environmental microbiology*, **2004**; 70(3):1253-1262
- Zheng** MZ, Richard JL, Binder J. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia*. **2006**; 161:261–273.

Anexo

Anexo 1. Primers utilizados y los genes que amplifican (Levin, 2012)

Gen	Primers	Secuencia 5' - 3'	Especie
aflD	nor1-F	ACggATCACTTAgCCAGCAC	<i>Aspergillus</i> spp.
	NoR1-R	CTACCAggggAgTTgAgATCC	
aflJ	aflj-F	AgTCAAaggTTgAATACC	<i>Aspergillus</i> spp.
	aflj-R	gCTCAgCCATgACCTTGACTg	
aflO	omtB(F)-F	gCCTTgACATggAAACCATC	<i>Aspergillus</i> spp.
	omtB(F)-R	CCAAgATggCCTgCTCTTTA	
aflP	omt1-F	gCCTTgCAAACACACTTTCA	<i>Aspergillus</i> spp.
	omt1R	AgTTgTTgAACgCCCCAgT	
aflR	APA-450	TATCTCCCCCgggCATCTCCCgg	<i>Aspergillus</i> spp.
	APA-1482	CCgTCAgACAgCCACTggACACgg	
aflR	aflR1-F	AACCgCATCCACAATCTCAT	<i>Aspergillus</i> spp.
	aflR1-R	AgTgCAgTTCgCTCAgAACA	
aflR	aflR-F	CgCgCTCCCAgTCCCCTTgATT	<i>Aspergillus</i> spp.
	aflR-R	CTTgTTCCCCgAgATgACCA	
aflD	nor1	ACCgCTACgCCggCACTCTCggCAC	<i>Aspergillus</i> spp.
	nor2	gTTggCCgCCAgCTTCgACACTCCg	
aflD	nortaq-1	gTCCAAgCAACAggCCAAGT	<i>Aspergillus</i> spp.
	nortaq-2	TCgTgCATgTTggTgATggT	
aflP	omt1	gTggACggACCTAgTCCgACATCAC	<i>Aspergillus</i> spp.
	omt2	gTCggCgCCACgCACTgggTTggg	
aflP	omtBII-F	ATgTgCTTggCITgCTgTgg	<i>Aspergillus</i> spp.
	omtBII-R	ggATgTggTCTATgCgATTgAg	
TUB	TUB1-F	gCTTTCTggCAAACCATCTC	Todos los hongos
	TUB1-R	ggTCgTTCATgTTgCTCTCA	
aflM	ver1	gCCgCAggCCgCggAgAAAgTggT	<i>Aspergillus</i> spp.
	ver2	ggggATATACTCCCgCgACACAgCC	
aflM	ver-496	ATgTCggATAATCACCGTTTAgATggC	<i>Aspergillus</i> spp.
	ver-1391	CgAAAAgCgCCACCATCCACCCCAATg	