

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECURSOS ALTERNATIVOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Aspergillus* spp. Y
LA DETERMINACIÓN DE SU POTENCIALIDAD EN LA PRODUCCIÓN DE
AFLATOXINAS.

Por

SUSANA LOZANO MUÑIZ

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS
con especialidad en biotecnología

Diciembre 22, 2005.

APROBACIÓN DE TESIS DOCTORAL POR COMITÉ DE TESIS

RECURSOS ALTERNATIVOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Aspergillus* spp. Y LA DETERMINACIÓN DE SU POTENCIALIDAD EN LA PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS.

Comité de Tesis:

Dr. José Santos García Alvarado
Director interno

Dr. Alberto Morales Loredo
Director externo

Dra. Norma Laura Heredia Rojas
Asesor

Dr. Carlos Hernández Luna
Asesor

Dra. Julia Verde Star
Jefe de la División de Estudios de Postgrado

APROBACIÓN DE TESIS POR COMITÉ ACADÉMICO

RECURSOS ALTERNATIVOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Aspergillus* spp. Y
LA DETERMINACIÓN DE SU POTENCIALIDAD EN LA PRODUCCIÓN DE
AFLATOXINAS.

Comité Académico de Doctorado

Subdirector de Estudios de Posgrado

Dra. Julia Verde Star

APROBACIÓN DE TESIS POR COMISIÓN DE EXAMEN

RECURSOS ALTERNATIVOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Aspergillus* spp. Y
LA DETERMINACIÓN DE SU POTENCIALIDAD EN LA PRODUCCIÓN DE
AFLATOXINAS.

Comisión de examen de Doctorado

Dr. José Santos García Alvarado
Presidente

Dra. Norma Laura Heredia Rojas
Secretario

Dr. Carlos Hernández Luna
Vocal

Dra. Julia Verde Star
Suplente

Dr. Alberto Morales Loredo
Asesor Externo

LUGAR DE TRABAJO

RECURSOS ALTERNATIVOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Aspergillus* spp. Y LA DETERMINACIÓN DE SU POTENCIALIDAD EN LA PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS.

La presente investigación se realizó en la Unidad de Investigación en Biología Molecular y Celular ubicada en la Unidad A, laboratorio A1-223, 3er Piso de la Facultad de Ciencias Biológicas, por convenio del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias y la Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, así como en el laboratorio de Biología Molecular del CFPPNL, terrenos de la exposición ganadera, Guadalupe Nuevo León. El director interno fue el Dr. José Santos García Alvarado de la FCB UANL, y el director externo el Dr. Alberto Morales Loredó del INIFAP, la asesoría interna por la Dra. Norma Laura Heredia Rojas de la FCB UANL y la asesoría externa y amplio apoyo en la investigación por el Dr. Deepak Bhatnagar del Southern Regional Research Center, de Nueva Orleans Louisiana, USDA ARS.

DEDICADO A...

Murciélagos. Si, esos que andan por la noche, vagando en busca de su presa mas deseada, mas necesitada, mas indispensable, para mantener su muerte en vida o vida en muerte, es igual, para ellos no importa, no saben cuando murieron o cuando comenzaron a vivir, pero así es, y así será, hasta que un buen día, una fuerza tan grande e inimaginable igual a ellos, les arrebató su ultimo suspiro, como la suscitada al momento de llegar a este mundo, un evento tan grande, como enviado por una fuerza superior que al dejarlo llegar aquí, dejara caer su furia por su inevitable perdida, porque es un ser tan grande y poderoso, que nadie, pero nadie desea separarse de el ni un solo segundo, aunque solo las fuerzas superiores puedan reconocerlo, y por su condición, este destinado a vivir en compañía de si mismo, de su sabiduría, de la oscuridad, y de la coincidencia de encontrar algún aliado que se sume a combatir por la superación de este mundo, aunque los que juran conocerle la mayoría de las veces se equivocan, frustrando su vida y la de los demás. Un buen día, mas de uno lo verán de lejos, ahí, en lo alto, donde es su lugar, y querrán alcanzarlo, aprender de el, o verlo al menos, pero no podrán, por ser inalcanzable. Es invencible, llega a caer, pero se levanta, con una fuerza superior, conspirando el universo a que cumpla su cometido, a lo que fue enviado. Y así cada día, luchando por la vida del indefenso, por mejorar la vida de esos, los que necesitan que vean por ellos, seguirá, aunque tenga que vivir en oscuridad, saliendo a desafiar al mundo, con la certeza de el éxito..To Batman...y para todos los superhéroes,

Rosendo, Pilar, Alejandro, Amado, Juany, Iris, Paco, Rigoberto, Michel, Paquito, LuisArmando, Uriel, Ricardito, Susanita, Marisela, Candi, Maria, HéctorMario, Alex, Adriana, Hiram², Miriam, Robin, FematJr, Diana, Miguel, Gaby, Bibiana, Fermín, Carlos, Daniela, América, Verónica, Gerardo, Cesar, Pepe, Viviana, Adrián, Esmeralda, Rubén, Fabiola, Genoveva, Luisa, Lupita, Cesar, Eduardo, Mirna, Itsa, Irma, Felipe, Felipín, Danae, Montse, Alberto², Rosalba, Adriana, Julia, Carmelita, Nancy², Mirtrala, Mónica, Nora, Alma, Luli, Doris, Isela, Miriam, Humberto, Magda, Rocha, Benito, Carlos, JuanFrancisco, Roberto, Ricardo, Amada, Cecilia, Hugo, Raquel, Norma, Santos, Irene, Ann, Deepak, Jiujiang, Montserat, Andrés, Jiuangua, Jampin, Raúl, Carlos, Juanita†, Martín, Toña, Jacinto, Juanita, Francisco, Javier, Gisela, Luis², Miguel, Lupe, Julio, Karina, Brenda, Chela, Raquel, Lolis, Perlita, Edgar, Pepe, Inés, Marlla, LuiSergio, Fedra, Miguel, Verónica, Dulce†, Lupita, Estela, Sergio, Claudia, Jesús, Alfonso, Julio, Ricardo, Manuel, Pulido, Roberto, Yoli, Uva, Verónica, Dulce†, Mamichi, Papichi, Sam, Irlanda, Juliana, Andrea, Rebeca, Alejandra, Janeth, Niño, Niña, Martín, Micaela†, Chepe†, Porfirio, Lolita, Roberto, Beto, Miki, Amada, Vicente, Josué, Jesús, Gabriel, Maria, Uriel, José, Rafael, Cande, Tere.

AGRADECIMIENTOS



Esta investigación fue financiada por el **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACyT) con el convenio 29130B, beca de estudios de postgrado bajo el convenio 113525.



A la **Universidad Autónoma de Nuevo León**, Facultad Ciencias Biológicas. Por permitir el formar parte de esta máxima casa de estudios, para la formación moral y académica tanto en los estudios de maestría en ciencias con especialidad en microbiología como ahora en la culminación de los estudios de doctorado con especialidad en biotecnología, gracias al Dr. Luis J. Galán Wong, Dra. Julia Verde Star, Dr. Ricardo Gómez Flores, Dra Norma L. Heredia Rojas, Dr. Carlos Hernández Luna, Dr. José Santos García Alvarado. Gracias también a la M.C. Irma Olivia Martínez Vázquez por su amplia colaboración en la realización de esta investigación así como a Claudio Moreno Rocha del Departamento de Biología Celular y Genética, y a la Biólogo Gabriela Hernández Mora e Ivonne L. Martínez Carlín.



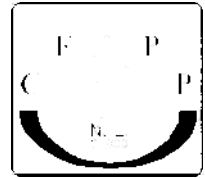
A el **Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias**

Por su amplia colaboración, constante dedicación, apoyo brindado en todos y cada uno de los momentos de asesoría y por permitir el formar parte de su equipo de trabajo, en la Unidad de Investigación y Desarrollo en Biología Celular y Molecular, doy gracias al Dr. Alberto Morales Loredo, Dra. Genoveva A. Ojeda, M.C. Cesar Reyes, el M.C. Jorge Cantú Vega y el Dr. Luis Ángel Rodríguez del Bosque.



A la **Unión Ganadera Regional de Nuevo León**

Por su amplia colaboración y apoyo brindado para la formación académica y de equipos de trabajo, gracias al Ing. Antonio Manuel García Garza.



A el **Comité para el Fomento y Protección Pecuaria del Estado de N L, A. C.**, Laboratorio de Biología Molecular por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo como analista químico en el laboratorio de residuos tóxicos y contaminantes y por su amplia colaboración para el uso de las instalaciones, equipo y material de laboratorio para la realización de esta investigación, así como por todo el apoyo incondicional brindado en todo momento para la constante actualización en técnicas moleculares, formación académica y de equipos de trabajo, gracias a el Ing. José G. Muraira Gutiérrez en coordinación con Gerardo Mendoza y su equipo de trabajo en el laboratorio de Biología Molecular.



Al **Centro de Investigación Biomédicas del Noreste, de Instituto Mexicano del Seguro Social**, especialmente gracias Amada Torres Salazar y al Dr. Ricardo Martín Cerda Flores por su amplia disposición en todo momento, por sus sabias enseñanzas, y sincera amistad.



A la **Universidad Autónoma de San Luis Potosí**

Facultad de Ciencias Químicas, por la donación de cepas de *Aspergillus* spp.



A **Texas A&M University**

Gracias al Dr. Andrés de la Concha y Dr. Jianhua Guo por la asesoría y donación de plásmidos y enzimas para sub-clonación.



A Louisiana State University

Gracias al Dr. Zhi-Yuan Chen por la donación de el anticuerpo de la proteína inhibidora de tripsina, 14 kDa como control positivo.

NC STATE UNIVERSITY

A North Carolina State University

Gracias al Dr. Gary A. Payne por la donación del clon recombinante de *omt-A*, y el anticuerpo para detección mediante Western blot de la proteína recombinante OMTA.

A United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service,

National Center for Agricultural Utilization Research

Gracias al Dr. S. W. Peterson por la donación de cepas de *Aspergillus* spp



Souther Regional Research Center

Al Dr. Jiujiang Yu por la donación de cepas recombinantes de *ord-A*.

Dr. Robert L. Brown por la donación de la proteína IT de 14 kDa.

Dr. Kenneth Ehrlich por la donación del cDNA de *aflR* y sus primers.

y al Dr. Deepak Bhatnagar por su apoyo en todo momento, amplia asesoría, colaboración.

TABLA DE CONTENIDO

Contenido	Pág.
PÁGINA DE TITULO	i
APROBACIÓN DE TESIS DOCTORAL POR COMITÉ DE TESIS	ii
APROBACIÓN DE TESIS POR COMITÉ ACADEMICO	iii
APROBACIÓN DE TESIS POR COMISION DE EXAMEN	iv
LUGAR DE TRABAJO	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
TABLA DE CONTENIDO	x
LISTA DE FIGURAS	xiii
APENDICES	xiv
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA	xv
Sección	Pág.
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. JUSTIFICACIÓN	5
5. IMPORTANCIA	6
6. HIPÓTESIS	7
7. OBJETIVOS	8
8. ANTECEDENTES	9
9. MATERIAL Y METODOS	25
9.1 Identificación de especies de <i>Aspergillus</i> spp mediante el análisis de rDNA.	25
9.1.1. Diseño experimental	25
9.1.2. Iniciadores utilizados para amplificar rDNA de <i>Aspergillus</i> spp	26
9.1.3. Cepas de <i>Aspergillus</i> spp utilizadas para análisis de rDNA	27
9.1.4. Extracción de DNA de <i>Aspergillus</i> spp	27
9.1.5. Condiciones de PCR utilizadas para amplificar las regiones ITS	29

TABLA DE CONTENIDO

(Continuación)

Sección	Pág.
9.1.6. Digestión de los productos de PCR-ITS	29
9.1.7. Análisis filogenético de <i>Aspergillus</i> spp	30
9.2. Subclonación de los genes <i>omt-A</i> y <i>ord-A</i> de <i>Aspergillus flavus</i> Link Ex Fries y <i>Aspergillus parasiticus</i> Speare en <i>E. coli</i> .	31
9.2.1. Diseño experimental	32
9.2.2. Material biológico utilizado para subclonar el gen <i>omt-A</i>	33
9.2.3. Material biológico utilizado para subclonar el gen <i>ord-A</i>	34
9.2.4. Diseño de iniciadores para subclonación el gen <i>omt-A</i>	34
9.2.5. Diseño de iniciadores para amplificación del gen <i>ord-A</i>	35
9.2.6. Construcción del plásmido que exprese el gen <i>omt-A</i>	36
9.2.7. Construcción del plásmido que exprese el gen <i>ord-A</i>	37
9.2.8. Preparación de células hospedero de <i>E. coli</i> calcio competentes	38
9.2.9. Transformación de la cepa de <i>E. coli</i> DH5 α con los plásmidos subclonados.	38
9.2.10. Transformación de la cepa de <i>E. coli</i> BL21(DE ₃)	39
9.2.11. Verificación y/o confirmación de plásmido recombinante en células hospedero.	39
9.2.12. Expresión de proteínas recombinantes OMTA y ORDA	40
9.2.13. Electroforesis de proteínas	40
9.2.14. Western blot	40
10 RESULTADOS	42

TABLA DE CONTENIDO

(Continuación)

Sección	Pág.
DISCUSIONES	55
CONCLUSIONES	59
LITERATURA CITADA	60
APENDICES	69
RESUMEN CURRICULAR	74
PUBLICACIONES	75

LISTA DE FIGURAS

Figura	Nombre	Pagina
1	Producción global de maíz	17
2	Distribución de maíz y teosinte en México	17
3	Genes que codifican para la vía biosintética de producción de AF y ST.	24
4	Estrategia general para el análisis filogenético de <i>Aspergillus</i> spp.	25
5	Análisis de secuencias de DNA para PCR con el programa computacional Amplify.	26
6	Estrategia general para sub-clonar los genes <i>omt-A</i> y <i>ord-A</i>	31
7	Análisis de secuencias de DNA para PCR con el programa computacional Amplify.	34
8	Análisis de secuencias de DNA para PCR con el programa computacional Amplify.	35
9	Gel de agarosa al 0.8 % con 2 µl de extracción de DNA método CTAB de <i>Aspergillus</i> spp.	42
10	Gel de agarosa al 1.5% con 3 µl de PCR-ITS de <i>Aspergillus</i> spp.	42
11	Gel de poliacrilamida 10% con 3 µl de PCR-ITS de <i>Aspergillus</i> spp	43
12	Gel de poliacrilamida al 10% con 10 µl de productos de PCR-ITS de <i>Aspergillus</i> spp. digeridos con la enzima <i>DdeI</i>	43
13	Análisis de grupos de <i>Aspergillus</i> spp.	44
14	Extracción de DNA plásmido de pBluescript con el gen <i>omt-A</i>	45
15	Talla molecular del plasmido de pBluescriptOMTA	45
16	Plásmido pBluescriptOMTA.	46
17	Amplificación del gen <i>omt-A</i> , mediante PCR	46
18	Corte a partir de gel de los fragmentos pET22b y gen <i>omt-A</i> digeridos	47

Figura	Nombre (continuación)	Página
19	Colonias de <i>E. coli</i> DH5 α transformadas con el plásmido pET22bOMTA	48
20	Confirmación de subclonación de <i>E. coli</i> BL21(DE ₃) con el plásmido pET22bOMTA mediante PCR.	48
21	Colonias de <i>E. coli</i> BL21(DE ₃) transformadas con el plásmido pET22bOMTA	49
22	SDSPAGE de BL21(DE ₃) pET22bOMTA	49
23	Western blot	50
24	Caracterización del plásmido pCR 2.1TAORDA.	50
25	Plásmido pCR 2.1TAORDA y pET30c digeridos	51
26	Colonias de de <i>E. coli</i> DH5 α transformadas con el plásmido pET30cORDA	51
27	Purificación de DNA plásmido de <i>E. coli</i> DH5 α pET30c y <i>E. coli</i> DH5 α pET30cORDA	52
28	Confirmación de subclonación de <i>E. coli</i> DH5 α con pET30cORDA mediante PCR	52
29	Colonias de de <i>E. coli</i> BL21(DE ₃) pET30cORDA	53
30	SDS PAGE de <i>E. coli</i> BL21(DE ₃) pET30cORDA	53
31	SDS PAGE de <i>E. coli</i> BL21(DE ₃) pET30cORDA	54
32	Western blot	54

APÉNDICES

A	Determinación de la proteína inhibidora de tripsina de 14 kDa en variedades maíz de México mediante Western Blot	67
B	Implementación de una sonda tipo Northern del gen regulador de biosíntesis de aflatoxinas en <i>Aspergillus</i> spp <i>afl-R</i>	71

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

Abreviatura o símbolo	Significado o descripción
HAVN	5`-hidroxiaverantina
A	Absorbancia
A ₆₀₀	Absorbancia 600 nm
MOPS	Ácido 3-[N-Morfin] propansulfónico
ADN	Ácido desoxiribonucleico
cDNA	Ácido desoxiribonucleico complementario
rDNA	Ácido desoxiribonucleico ribosomal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
NA	Ácido norsolorinico
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
18S	Ácido ribonucleico ribosomal 18S
28S	Ácido ribonucleico ribosomal 28S
5.8S	Ácido ribonucleico ribosomal 5.8S
A _w	Actividad de agua
A	Adenina
ATP	Adenostintrifosfato
FDA	Administración de drogas y alimentos
AFB ₁	Aflatoxina B ₁
AFB ₂	Aflatoxina B ₂
AF	Aflatixina
PDA	Agar Papa Dextrosa
AVN	Averantina
AVNN	Averufanina
AVF	Averufina
CTAB	Bromuro de cetil-trimetil-amonio

Abreviatura o símbolo	Significado o descripción (continuación)
CD	Caldo czapeck dox
cm	Centímetros
CIBIN	Centro de Investigación Biomédicas del Noreste
CIRNE	Centro de Investigaciones Regional del Noreste
BL21DE ₃	Cepa <i>Escherichia coli</i> de expresión con genotipo: F ⁻ <i>ompThsdS</i> B(<i>rB⁻mB⁻</i>) <i>galdcm</i> (DE ₃)
BL21DE ₃ PLys	Cepa <i>Escherichia coli</i> de expresión con genotipo: F ⁻ <i>ompThsdS</i> B(<i>rB⁻mB⁻</i>) <i>galdcm</i> (DE ₃) pLys
BL21	Cepa <i>Escherichia coli</i> de no clonación, de no expresión con genotipo: F ⁻ <i>ompThsdS</i> B(<i>rB⁻mB⁻</i>) <i>galdcm</i>
C	Citosina
CoA	Coenzima A
Cols.	Colaboradores
M	Concentración molar
TLC	Cromatografía en capa fina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
OD ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
USDA	Departamento de Agricultura de Estados Unidos
dNTPs	Desoxinucleósidos trifosfatados
LSD	Dietilamida del ácido lisérgico
DEPC	Dietilen-pirocarbonato
DHST	Dihidro-esterigmatocistina
DH5 α	Cepa <i>Escherichia coli</i> de clonación
DHOMST	Dihidro-Orto-metilesterigmatocistina
DMDHST	Dimetildihidroesterigmatocistina (ST)
DMST	Dimetilesterigmatocistina
CO ₂	Dióxido de carbono
SDS	Dodecil sulfato de sodio

Abreviatura o símbolo	Significado o descripción (continuación)
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima
OMT-A	Enzima orto-metiltransferasa
ORD1	Enzima oxidoreductasa
<i>Taq</i>	Enzima que polimerasa DNA proviene de <i>Thermus aquaticus</i>
<i>HinD</i> III	Enzima que reconoce la secuencia 5'-A√AGCTT-3'
<i>Dde</i> I	Enzima que reconoce la secuencia 5'C√TNAG-3'
<i>Sma</i> I	Enzima que reconoce la secuencia 5'-CCC√GGG-3'
<i>BamH</i> I	Enzima que reconoce la secuencia 5'-G√GATC-3'
<i>Not</i> I	Enzima que reconoce la secuencia 5'-GC√GGCCGC-3'
sp	Especie
spp	Especies
USA	Estados Unidos de América
ST	Esterigmatocistina
RFLP	Fragmentos polimórficos de restricción
<i>omt-A</i>	Gen que codifica para la enzima orto-metiltransferasa
<i>ord-A</i>	Gen que codifica para la enzima oxidoreductasa
<i>afl-R</i>	Gen regulador de la ruta biosintética de AF
°C	Grados Celsius
g	gramos
G	Guanina
NaOH	Hidróxido de sodio
h	horas
IS	Índice de similitud
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias
kb	Kilo bases
kDa	Kilo daltons

Abreviatura o símbolo	Significado o descripción (continuación)
Kpb	Kilo pares de bases
L	Litro
UV	Luz ultravioleta
m	Marcador de peso molecular
A&M	Medio Adie y Metals
LB	Medio Luria Bertoni
SEVAG	Mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 v/v.
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µl	Microlitros
MEB	Microscopia electrónica de barrido
mA	Mili Amperios
mg	Miligramos
ml	Mililitro
mm	Milímetro
min	Minutos
ng	Nanogramos
NCBi	National Center Biotechnological Information
NL	Nuevo León
No	Número
X	Numero de veces la concentración con respecto a la de trabajo
O-MST	Orto-metilesterigmatocistina
Pag	Página
pb	Pares de base
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
pmol	Picomoles
RAPD	Polimorfismo de ADN amplificado al azar

Abreviatura o símbolo	Significado o descripción (continuación)
AFLP	Polimorfismo de tramos de fragmentos amplificados
RFLP	Polimorfismo de tramos de fragmentos de restricción
SSCP	Polimorfismos conformacionales de cadena sencilla
%	Por ciento
pH	Potencial de hidrógeno
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ITS	Secuencias de transcripción intergénica
Rf	Relación de frentes
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
TBE	Solución amortiguadora tris-boratos-EDTA
TE	Solución amortiguadora tris-EDTA
SRRC	Southern Regional Research Center
ST	Sterigmatocistina
OsO ₄	Tetraóxido de osmio
T	Timina
RT-PCR	Transcriptasa reversa-reacción en cadena de la polimerasa
Tris-NaCl	Tris[hidroximetil]aminometano-cloruro de sodio
Tris	TRIZMA® Base. Tris[Hidroximetil]aminometano
U	Unidades de actividad enzimática
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
VERA	Versicolorina A
VERB	Versicolorina B
VAL	Versiconal
VHA	Versiconal hemiacetal acetato
V	Voltios
Vol	Volumen
v/v	Volumen / volumen
<i>et al</i>	Y colaboradores

1. RESUMEN

Los mohos del género *Aspergillus* causan el deterioro de muchos productos alimenticios, debido a su crecimiento y/o a los productos metabólicos de la invasión fúngica, los cuales suelen ser muy tóxicos tanto para el hombre como para otros animales. Es por esto que la detección e identificación tanto de los hongos como de las toxinas son muy importantes para poder proponer medidas para su control y/o eliminación. Tradicionalmente la identificación de estos hongos se hace en base a las características macro y micromorfológicas, pero actualmente se han desarrollado métodos inmunológicos rápidos para su identificación y técnicas moleculares en base al polimorfismo del DNA nuclear, ribosomal o mitocondrial, para estudios a nivel intra- e inter-específico. El objetivo de este trabajo fue el de poder identificar a *A. flavus* de otros *Aspergillus* spp de importancia médica y económica a partir de cultivos microbiológicos, amplificando mediante PCR, las secuencias íntergénicas de los *Aspergillus* spp y mediante digestión enzimática ver los patrones electroforéticos en un análisis de PAGE, así como subclonar intermediarios de la ruta biosintética de aflatoxinas en *E. coli* como sistema de expresión de proteínas recombinantes, con objeto de que en investigaciones futuras se puedan generar anticuerpos policlonales y con esto, una técnica de detección de intermediarios de la ruta biosintética de aflatoxinas tipo ELISA. Se utilizaron 9 especies de *Aspergillus* (*A. orizae*, *A. tamarisii*, *A. pseudotamarisii*, *A. sojae*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. terreus*, *Eurotium chevalieri*) cuya digestión de productos amplificados del rDNA por PCR-ITS fueron analizadas mediante PAGE y fue posible detectar un patrón electroforético característico con el que se puede identificar 6 de ellas (*A. flavus*, *A. terreus*, *Eurotium chevalieri*, *A. ochraceus*, *A. orizae* y *A. niger*), y otras 3 especies de *Aspergillus* (*A. sojae*, *A. pseudotamarisii* y *A. tamarisii*), obtuvieron el mismo patrón electroforético con el que se puede diferenciar de las otras 6 pero no entre ellas. Además, se sub-clonaron o los genes intermediarios de la ruta *omt-A* y *ord-A* de la biosíntesis de aflatoxinas, para que en futuras investigaciones sea posible el desarrollo de un método diagnóstico tipo ELISA y de esta manera evitar el uso de estándares de aflatoxinas en los métodos convencionales y de una manera indirecta inferir que está activa esta ruta de biosíntesis.

2. ABSTRACT

Species of *Aspergillus* can grow on many food products, and some of their metabolic products could be toxic for man and animals. The traditional identification process for these fungi is based on macro and micro morphological characteristics, but currently new immunological rapid methods and molecular techniques based on nucleotide sequence polymorphism from nuclear, ribosomal or mitochondrial DNA for studies at intra or inter specific level, have been developed. The objectives of this investigation were 1) identify *A. flavus* from other *Aspergillus* species that are important in health or industry, using amplification of intergenic ribosomal sequence and its electrophoretic analysis by PAGE. 2) to subclone two intermediate enzymes before of the aflatoxin biosynthetic pathway on an *E. coli* system to obtain recombinant protein as a source for future studies on the potentiality of strains to produce aflatoxins. The isolates of *Aspergillus* spp (*A. orizae*, *A. tamarii*, *A. pseudotamarii*, *A. sojae*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. terreus*, *Eurotium chevalieri*) were analyzed by restriction analysis of PCR-ITS amplification from rDNA. Six species were differentiated using this technique (*A. flavus*, *A. terreus*, *Eurotium chevalieri*, *A. ochraceus*, *A. orizae* y *A. niger*). The other (*A. sojae*, *A. pseudotamarii* y *A. tamarii*) have the same electrophoretic pattern. The *omt-A* and *ord-A* genes were sub-cloned on *E. coli* and the protein product expressed. These procedures are alternative methods to those previously established and open new field of research.

3. INTRODUCCIÓN

En México, el maíz es ampliamente cultivado e incluso es importado a fin de abastecer las necesidades de consumo, debido a que es la base nutricional de los mexicanos. Este grano frecuentemente es atacado por especies de hongos del genero *Aspergillus*, que presentan una gran diversidad y variabilidad en la naturaleza. La contaminación del maíz puede presentarse en los diferentes procesos a los que esta sujeto, como precosecha, cosecha, almacenamiento, manejo, distribución o consumo (en los refrigeradores de los consumidores como subproductos del maíz). Para determinar la calidad del maíz para uso alimenticio, uno de los parámetros a medir es el nivel de aflatoxinas (AF) presentes en el grano. Estas toxinas son metabolitos secundarios producidos por los hongos imperfectos *Aspergillus flavus* y *A parasiticus*, los cuales son carcinogénicos potentes producidos naturalmente y pueden contaminar sustratos ricos, como oleaginosas, cereales y sus derivados, cacahuete, nueces y harinas. Por otra parte si estos sustratos se usan ya contaminados como alimento para ganado entonces se pueden encontrar AF en su leche y productos lácteos derivados, convirtiéndose en una amenaza potencial para la salud (Lillehoj, 1986).

La contaminación por AF ha sido reportada prácticamente en todo el mundo. La Administración de Alimentos y Drogas (FDA-USA) prohíbe el comercio de granos para alimento que contengan más de 20 partes por billón (ppb) de esta toxina, pero en México la contaminación en maíz frecuentemente supera los niveles de 20 ppb. Los principales estados mexicanos que reportan contaminaciones en maíces son Tamaulipas, Chiapas, Morelos y Oaxaca, en donde en el noreste de México, se reportó el 98% de la producción de maíz con más de 20 ppb durante 1989, en 1991 la contaminación del hongo fue de un 23%, y fue reducido hasta menos de 1% en 1992 mediante un plan regional de medidas preventivas (Rodríguez, 1992). No es sencillo prevenir el crecimiento fúngico en los granos, aunque, hay genotipos de maíz que son resistentes y otros que son susceptibles al ataque de hongos y contaminación por AF, directamente proporcional a la expresión de una proteína inhibidora de tripsina de 14 kDa (IT-14kDa), con alta, baja o nula expresión de ella. En México se cuenta con variedades de maíz que expresan dicha proteína (APENDICE A, datos no publicados aún).

Se han desarrollado métodos alternativos de detección de AF con el objeto de evaluar el grado de contaminación de los productos vegetales y por ende permitir la toma de decisiones con respecto al manejo posterior de ellos. Entre ellos sobresalen las cromatografías líquidas de alta resolución y la de capa fina, ensayos inmunoenzimáticos como la ELISA y la basada en fluorometría (Aflatest®). Todos ellos son eficientes en su detección, aunque varían en complejidad, sensibilidad, manejo y costo. Sin embargo, en los últimos años se ha simplificado la detección de micotoxinas, debido al reconocimiento oficial de los métodos inmunológicos. La ruta biosintética de la producción de AF involucra varios pasos enzimáticos en donde el gen regulador de dicha biosíntesis *afl-R* codifica para una proteína de unión al DNA (Chang *et al.*, 1993). Se ha determinado que es importante la determinación de la expresión mediante una sonda tipo Northern en un cultivo de *Aspergillus* spp, para indicar que dicha biosíntesis esta activa (APENDICE B, datos no publicados aún). Debido a esto la subclonación de los genes que codifican a otras enzimas previo a la biosíntesis de AF *ord-A* y *omt-A* es de suma importancia, ya que pudiera representar un preámbulo para realizar investigaciones futuras con el fin de purificar las proteínas recombinantes ORD1 y OMTA e inducir anticuerpos policlonales para la implementación de un método diagnóstico tipo ELISA que permita determinar la presencia de estos intermediarios de la ruta biosintética de AF, sin requerir de los estándares de AF, que son difícil de conseguir y de manejo peligroso, en los protocolos utilizados de rutina en los laboratorio. Las cuentas de hongos son aún incluidas en los requerimientos de control de calidad para muchos alimentos. Los métodos tradicionales que han sido usados para determinar la presencia de AF son trabajosos, tardados, caros, requieren de micólogos expertos, y sobre todo no permiten la especificación de las cepas micotoxigénicas. La clasificación del género *Aspergillus* esta basada principalmente en las características morfológicas, y para ello se requiere de micólogos expertos en el cultivo e identificación de hongos, por lo que recientemente se han utilizado técnicas basadas en el análisis de DNA para estudios taxonómicos y filogenéticos, como la digestión de productos amplificados de genes ribosomales (rDNA) mediante PCR-ITS, los cuales han sido utilizados para los estudios filogenéticos e identificación de *Aspergillus* spp (Kumeda y Asao, 1996)

4. JUSTIFICACION

En México, el maíz es ampliamente cultivado e importado para abastecer las necesidades de consumo y éste, frecuentemente es contaminado con micotoxinas de *Aspergillus*, debido a la invasión del hongo saprobio oportunista sin capacidad patogénica, así las cepas de *A. flavus* suelen infectar antes de la cosecha a semillas de algodón, cacahuete nuez o granos de maíz en crecimiento, durante el almacenamiento, manejo, distribución y consumo. Las toxinas se producen poco después de la infección de las mazorcas a la temperatura ambiente y en dos días se puede alcanzar una concentración de 200 ng/g, llegando a 2,000 ng/g luego de nueve días a 26-34°C, causando un grave problema económico y de salud. En México se han reportado brotes de intoxicaciones por ingesta de maíz contaminado causados por malas condiciones de almacenaje, combinado con factores ambientales favorables. Los insectos también podrían favorecer la transmisión del hongo, por el daño físico que le hacen al grano, y con ello el hongo pueda entrar fácilmente al grano, o porque el insecto mismo lleve las esporas del hongo entre los granos de una misma mazorca y entre las mazorcas de un mismo cultivo. Otro factor que favorece la contaminación del maíz por aflatoxinas es el estrés hídrico de la planta asociado con altas temperaturas, así como, una escasa disponibilidad de fuente nitrogenada en el suelo, o un exceso de la misma. Es difícil evitar la exposición a las AF porque no es sencillo prevenir el crecimiento fúngico en los granos y otros productos. La aplicación de insecticidas limita el daño por insectos, pero no suele eliminarlos ni evita la infección fúngica de los granos. La aplicación de un paquete tecnológico para el manejo agronómico del maíz minimiza los riesgos de aflatoxinas en campo, el cual incluye la determinación y/o identificación de hongos micotoxigénicos en los diferentes procesos de producción, así como de la determinación de micotoxinas incluyendo las aflatoxinas. El realizar un diagnóstico rápido de contaminación de hongos micotoxigénicos y/o de intermediarios de la ruta biosintética de aflatoxinas, ayudaría a una oportuna toma de decisión en las medidas preventivas de contaminación y/o control.

5. IMPORTANCIA

La clasificación del género *Aspergillus* esta basada principalmente en las características morfológicas. Para esto se requiere de micólogos expertos en el cultivo e identificación de hongos. Sin embargo existen nuevas alternativas usando técnicas genéticas. Las secuencias ITS (Genes del espacio I, II y de RNAr 5.8) son variables en su composición nucleotídica y puede ser usado para diferenciar especies o poblaciones. Las técnicas basadas en el análisis de secuencias de genes ribosomales (rDNA) para estudios taxonómicos y filogenéticos, mediante la digestión de productos amplificados por PCR, nos permiten establecer patrones electroforéticos específicos de los fragmentos para especies de *Aspergillus* de importancia biotecnológica, clínica y alimentaria, como un método alternativo en la identificación y diferenciación de especies.

La utilización de los anticuerpos de productos de genes involucrados en la biosíntesis de AF combinados con técnicas de PCR podría conferir la posibilidad de detectar la contaminación con base a un metabolito intermediario pero específico de la ruta para la producción de AF que estuviera presente en alimentos y granos. Esto facilitaría en mucho la detección del hongo y la potencialidad de contaminación del alimento, evitando el uso y manejo de la aflatoxina por el peligro que representa. Es de suma importancia el subclonar los intermediarios de la ruta biosintética de aflatoxinas, previos a su producción, como lo es el subclonar los genes *omt-A* y *ord-A*. En investigaciones futuras podrían ser utilizados en la producción y purificación de las proteínas recombinantes OMTA y ORDA, para inducir la producción de anticuerpos policlonales y con ello generar una técnica tipo ELISA.

6. HIPOTESIS

Es posible desarrollar técnicas alternativas para la identificación de *Aspergillus* spp y la determinación de su potencialidad en la producción de aflatoxinas.

7. OBJETIVOS

- 1.- Identificación de especies de *Aspergillus* spp mediante el análisis de rDNA.
- 2.- Subclonar los genes *omt-A* y *ord-A* de *Aspergillus flavus* Link Ex Fries y *Aspergillus parasiticus* Speare en *E. coli*.

8. ANTECEDENTES

Hongos:

Los hongos son ubicuos en el medio ambiente, son saprofitos primarios, utilizando material orgánico sin vida como fuente de nutrientes y reproducción. Muchos de estos saprofitos pueden colonizar material orgánico dañado por humedad. Durante los procesos de digestión, los hongos pueden secretar enzimas para degradar los compuestos complejos en compuestos simples, los cuales son entonces asimilados y digeridos por el hongo y como resultado pueden producirse micotoxinas, las cuales se ha determinado que son producidos para competir contra otros microorganismos. Hay mas de 200 micotoxinas reconocidas, sin embargo, el estudio de las micotoxinas y sus efectos en la salud humana es una área de oportunidad de estudio, ya que hay mucho por descubrir (AMC, 2004)

Micotoxinas:

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de ciertos hongos que ejercen efectos tóxicos sobre los animales y los seres humanos. Dichos efectos sobre la salud animal y humana se conocen como micotoxicosis, cuya gravedad depende de la toxicidad de la micotoxina, del grado de exposición, de la edad y el estado nutricional del individuo, y de los posibles efectos sinérgicos de otros agentes químicos a los que esté expuesto. Las micotoxinas tienen estructuras muy diversas, pero todas son compuestos orgánicos de masa molecular relativamente baja (Peraica *et al.*, 1999).

Los efectos adversos de los mohos y los hongos se conocían ya en la antigüedad. Por ejemplo, por lo menos 10 de las plagas en el antiguo Egipto son recordadas en el *Exodo* que pudieron ser asociadas con contaminación de micotoxinas en alimentos (Schoental, 1984; Marr y Malloy 1996). La plaga de Atenas en aproximadamente 430 a. C. pudo ser atribuida a la ingesta de alimentos contaminados (Peraica *et al.*, 1999). En los siglos VIII y VII a. C. Se instauró el festival de las Rabigalia en honor del dios

Robigus, quien era responsable de proteger el grano y los árboles, se celebraba el 25 de abril, por ser la época del año en la que era más probable que las cosechas resultaran atacadas por los hongos. En la Edad Media, los brotes de ergotismo causados por alcaloides ergóticos de *Claviceps purpurea* alcanzaron proporciones de epidemia, mutilando y matando a miles de personas en Europa. El ergotismo se conocía también como *ignis sacer* (fuego sacro) o fuego de San Antonio, porque a la sazón se creía que una peregrinación al santuario de San Antonio aliviaría la intensa sensación de quemazón que padecía las personas. Las víctimas del ergotismo estaban expuestas a la dietilamida del ácido lisérgico (LSD), sustancia alucinógena que se producía durante el horneado del pan elaborado con trigo contaminado por el cornezuelo del centeno, así como a alcaloides de la belladona procedentes del fruto de la mandrágora, utilizado para tratar el ergotismo (Dongen y Groot, 1995). Aunque éste no tiene ya consecuencias tan importantes para la salud pública, informes recientes indican que hoy por hoy siguen siendo posibles los brotes de micotoxicosis humana (Peraica *et al.*,1999).

Algunas micotoxicosis han desaparecido gracias a medidas de higiene mas rigurosas. Por ejemplo desde hace varias décadas no se registra ningún caso de beriberi cardiaco agudo maligno por la citroviridina (enfermedad del arroz amarillo o *shoshin-kakke* en Japonés), tras suprimirse en los mercados la venta de arroz mohoso. La citreoviridiana es un producto metabólico de *Penicillium citreonigrum*, que crece rápidamente en el arroz almacenado tras la cosecha, sobre todo en las regiones más frías del Japón. Otra micotoxicosis de la que no se registran casos desde hace décadas es la aleucia tóxica alimentaria, frecuentemente en los decenios de 1930 y 1940 en la URSS. Se debía a la acción de los tricotecenos producidos por cepas de *Fusarium* en el grano sin cosechar (Peraica *et al.*,1999).

El interés general por las micotoxinas aumentó en 1960, cuando se declaró en animales de granja de Inglaterra una micotoxicosis transmitida por el pienso y denominada enfermedad X del pavo, de la que más tarde se comprobó que era causada por aflatoxinas. Se descubrió ulteriormente que éstas son hepatocarcinogénicas en animales y seres humanos, lo que fomentó la investigación sobre las micotoxinas. Las

micotoxinas son metabolitos secundarios de hongos que son dañinos para la salud humana y animal. Las AF, tricotecenos (Toxinas T2 y DON) y fumonosinas son de mayor importancia por contaminar cultivos de plantas y como resultado, afectar con ello la economía agrícola y la inocuidad de alimentos para consumo humano o animal (Yu *et al.*, 2004).

***Aspergillus*, características generales:**

Los mohos del género *Aspergillus* causan el deterioro de muchos productos alimenticios, ricos en ácidos grasos y carbohidratos, y sus productos metabólicos producidos en su invasión fúngica suelen ser tóxicos, tanto para consumo humano como de animales, aunque especies como *A. niger*, *A. sojae*, o *A. oryzae*, son de interés industrial o se emplean en la fermentación de alimentos en ciertas regiones y no producen toxinas (Kozakiewicz, 1989). El color es la principal característica microscópica para la identificación de los grupos de *Aspergillus*, los cuales poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro (Carrillo, 2003).

Métodos para la identificación de las especies:

Debido a la necesidad de verificar la presencia de estos hongos para orientar la búsqueda de micotoxinas en un producto determinado, desde hace mucho tiempo se ha utilizado la identificación tradicional la cual se basa en características macro y micro morfológicas en diversos medios de cultivo incubados a distintas temperaturas. Actualmente, se han desarrollado métodos inmunológicos rápidos para la identificación de los hongos contaminantes de granos y otros productos vegetales para estudios a nivel intra e inter específico. También se han desarrollado técnicas moleculares en base al polimorfismo de DNA nuclear, ribosomal y mitocondrial, como lo son el polimorfismo de tramos de fragmentos amplificados, el polimorfismo de tramos de fragmentos de restricción y el polimorfismo del DNA amplificado al azar, los cuales han sido utilizados para diversos estudios de filogenia y diferenciación o identificación de diversos organismos (Carrillo, 2003).

Aflatoxinas (AF):

Son metabolitos secundarios producidos por una ruta biosintética común con la esterigmatocistina (ST) a partir de un precursor policetónico, los cuales contienen un núcleo coumarina fusionado a un bifurano y a una estructura pentanona en el caso de la aflatoxina B, sustituida por lactona de seis miembros en la aflatoxina G. Las letras B y G se refieren al color de la fluorescencia (azul y verde) observada bajo luz UV y los subíndices ₁ y ₂ indican el componente mayor y menor respectivamente. Poseen altos puntos de fusión: B₁ 268-269°C, B₂ 286-289°C, G₁ 244-246°C, G₂ 237-240°C, M₁ 299°C, M₂ 330°C. En estado puro son polvos cristalinos que se descomponen al alcanzar el punto de fusión. Se han encontrado estas toxinas con más frecuencia sobre oleaginosas aunque también en cereales, especialmente en zonas cálidas (Carrillo, 2003).

Las AF M₁ y M₂ son el producto metabólico hidroxilado de las AF B₁ y B₂. Se ha determinado que 1% de AFM₁ es excretada en leche después de consumir AFB₁ con el forraje (Moss, 1991). En condiciones óptimas *A. flavus* produce a los 15 días 300 ng de AF por ml del medio de cultivo YES (15% de sacarosa y 2% de extracto de levadura), a 30 °C y actividad del agua de 0.99 (Carrillo, 2003).

No se han encontrado las AF B₂, G₁ o G₂ en ausencia de B₁ (Henry *et al.*, 1998). Se ha demostrado que el nitrato reprime la síntesis de algunos intermediarios de AF en *A. parasiticus* (Feng y Leonard 1998) y favorece la producción de esclerocios (son estructuras formadas por micelio aglomerado en forma de bolitas, que sirven de medio de conservación en toda condiciones no favorables para su crecimiento, además de servir como medio de distribución en el aire y/o insectos) por *A. flavus*. A pH 4 o menor la formación de esclerocios se reduce un 50% mientras la producción de AF esta a su máximo nivel (Calvo *et al.*, 2002).

El rango de temperatura para la producción de AF es 7.5-12 a 40-41°C según los hongos y las condiciones experimentales. Una humedad relativa menor del 85% detiene el crecimiento de los hongos productores de estas toxinas, lo que corresponde a un contenido de humedad de mas de 16 % y una actividad de agua del 0.85. *A. flavus*, *A.*

pseudotamarii y algunas cepas de *A. caelatus* producen AF B₁ y B₂ mientras que *A. parasiticus* y *A. nomius* forman además AF G₁ y G₂ (Ito *et al.*, 2001).

Las cepas africanas y argentinas de *A. flavus* var. *parvisclerotigenus* producen también AF G₁ (Cotty y Cardwell, 1999; Novas y Cabral, 2002). Hay mayor porcentaje de cepas de *A. parasiticus* que producen toxinas aflatoxicas en comparación con *A. flavus* (Widstrom, 1992). *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius* crecen moderadamente a 42°C pero *A. pseudotamarii* y *A. caelatus* no pueden desarrollarse (Ito *et al.*, 2001).

Factores biológicos que afectan la biosíntesis óptima de AF:

La producción de AF depende de la cepa y de su variabilidad. *A. flavus* produce las AF B₁ y B₂, en cambio *A. parasiticus* produce las AF B₁, B₂, G₁ y G₂. Los microorganismos que se encuentren en el lugar donde se desarrolla *Aspergillus* spp puede competir de varias maneras y afectar la producción de AF, ya que los microorganismos presentes metabolizan las AF, alteran el metabolismo de *Aspergillus* spp, por la disponibilidad de sustrato o por producir condiciones desfavorables para la producción de AF. La producción de AF también depende del tamaño del inoculo de *Aspergillus* spp. Con inóculos pequeños, existe más ramificación del micelio y por lo tanto se incrementa la síntesis de AF (Ellis *et al.*, 1991).

Factores químicos que afectan la biosíntesis óptima de AF:

La biosíntesis de AF dependerá del tipo de sustrato en que se desarrolle el hongo, y su producción óptima será cuando éste sea rico en carbohidratos y ácidos grasos los cuales favorecen la síntesis de estas toxinas, así como dependiendo de la disponibilidad de los nutrientes como glucosa, fructosa, sucrosa, glicina, glutamato, prolina, aspartato, alanina, glutamina. La disponibilidad de cadmio, magnesio y zinc, también favorecen su biosíntesis, en cambio la inhiben los agentes antifúngicos como el ácido propionico y el ácido sórbico (Ellis *etal.*, 1991).

Factores del medio ambiente que afectan la biosíntesis óptima de AF:

Las condiciones de temperatura de 25 a 30 °C, favorecen una óptima producción de AF, así como la actividad de agua (A_w) de 0.95 a 0.99. Una A_w de menos de 0.85 no es adecuada para la biosíntesis de AF. La cantidad del CO_2 presente en el sustrato también afecta su biosíntesis, más de un 10% de CO_2 inhibe la síntesis de AF. La cantidad de luz presente en el medio ambiente donde se desarrolle *Aspergillus* aflatoxigénico, es inversamente proporcional a la cantidad de AF presente en la muestra, ya que la luz degrada la AF producida. El potencial de hidrógeno (pH) afecta también la producción de AF, ya que a condiciones ácidas se inhiben su producción (Ellis *et al.*, 1991).

Actividad Biológica de las AF:

Las AF se consideran cancerígenos hepáticos humanos, de las cuales la más potente es la toxina B_1 , mientras que la M_1 tiene una potencia diez veces menor (Henry *et al.*, 1998). Se ha establecido que el consumo de AF y la infección con el virus de hepatitis B tienen una acción sinérgica en el organismo, ya que se ha reportado que cuando hay una disminución de la ingesta de AF en personas portadoras del virus de la hepatitis B, hay disminución de la probabilidad de desarrollar el cáncer de hígado (Herrman y Walker, 2000). En estudios de leche materna de 14 madres tailandesas de un total de 60, se detectó un promedio de 23 ng de AF M_1/L con un rango entre 4 y 6.372 ng/L (Carrillo, 2003). En otro estudio se detectó AF en el 38% de las muestras de sangre de cordón umbilical de neonatos con ictericia en Nigeria, así como en muestras postmortem de niños en Malasia, los cuales sufrieron encefalopatía hepática aguda (Henry *et al.*, 1998).

La exposición a las AF también se produce por el polvo suspendido en el aire generado durante la cosecha en el campo (67 ng/m³), la descarga de los granos (92 ng/m³), la limpieza de los silos (4849 ng/m³) y las operaciones de alimentación animal (421 ng/m³) (Selim *et al.*, 2002), los cuales están asociados a un aumento de la incidencia de tumores en las vías respiratorias superiores (Henry *et al.*, 1998). Los valores DL_{50} oral para perro, rata, mono y pollo son respectivamente 1, 57, 2-8 y 7-8 mg de aflatoxina B_1/kg de peso corporal (Wyatt, 1991).

Determinación de AF:

Se buscan las AF en los productos alimenticios y forrajeros con fin de conocer factores de riesgo para la salud a consecuencia de su consumo, pero muchas veces hay que comenzar por el aislamiento e identificación de los hongos para prever cuales toxinas podrían estar presentes. Un método relativamente sencillo es el ensayo conocido como ELISA, de las siglas en inglés Enzyme Linked Immunogenic Assay. El análisis cuantitativo de las AF se hace mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con detección por espectrofotometría, fluorometría o espectrometría de masas, otra técnica mas sencilla pero menos sensible es la cromatografía en capa fina (TLC) con densitometría de las manchas fluorescentes o coloreadas; y también se han desarrollado inmunoensayos los cuales son muy sensibles debido a que hay una interacción altamente específica entre el anticuerpo y la toxina. También se ha desarrollado la cromatografía de afinidad, usando una columna con anticuerpos monoclonales, la cual permite obtener un eluido con la AF pura para posteriormente hacer su determinación por fluorometría o espectrofotometría (Carrillo, 2003).

Regulación de la presencia de AF:

Se han establecido límites, establecidos sobre la concentración de AF permitidos, que varían en los países y se han establecido con el fin de proteger la salud humana y animal. Por ejemplo la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) de Estados Unidos estableció como límites máximos la concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb) para granos y otros forrajes destinados a la crianza animal y vacas lecheras. Canadá aceptó el límite de 50 ng de AF M₁/L (ppb) de leche, propuesto por la Comisión Codex sobre Contaminantes y Aditivos Alimentarios (FAO-WHO). Un ng/kg de peso corporal/día de AF B₁ o aún menos contribuye al riesgo de contraer cáncer hepático (Codex, 2001).

Límites de AF para consumo animal en México se rigen bajo la norma oficial mexicana, los cereales con una concentración mayor de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb) de AF y que se destinen para consumo directo o como parte de alimentos procesados, deberán ajustarse a lo dispuesto por especie en la etapa de producción del producto como límite máximo en $\mu\text{g}/\text{kg}$, por ejemplo, en aves excepto pollos de engorda, el límite máximo es 100

$\mu\text{g}/\text{kg}$, en cerdos de 25 a 45 kg es 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, en cerdos mayores de 45 kg es 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, en cerdos maduros destinados a reproducción es 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$; en rumiantes maduros destinados a la reproducción es 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y en rumiantes de engorda en etapa de finalización es 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (NOM-188-SSA1-2002).

Métodos de control:

Se han desarrollado estrategias para controlar el crecimiento de los hongos productores de AF. Se ha establecido que para granos de maíz enteros, una humedad del 16%, amoníaco al 2% durante 1 h a 55 atmósferas de presión y 40-45 °C, destruye hasta el 93% de las toxinas. También se ha establecido que un substrato contaminado tratado con hipoclorito de sodio al 0.5-1% a pH 4 degrada las AF B₁ y G₁ a cualquier temperatura, pero B₂ y G₂ disminuyen con calentamiento, eliminándose únicamente a 100°C. Hay poco efecto sobre AF B₁ en el tratamiento con bisulfito de sodio al 1% a 20°C, y persiste solo el 10% a 100°C. Desafortunadamente se observa igual cantidad residual después del tratamiento con persulfato de amonio al 0.1% a 20°C y con agua oxigenada al 0.1% a 60 °C (Carrillo, 2003).

En almidón de maíz, la molienda húmeda reduce la concentración de toxinas a 1% del valor que tenía en los granos de su origen y la seca a 10%. Además se ha encontrado que el contenido de AF disminuyó de un 50-80% con el tostado de los cacahuates. Sin embargo, también se ha observado que se concentra 3 a 6 veces la AF M₁ durante la elaboración de los quesos (Henry *et al.*, 1998; Carrillo, 2003).

Presencia de AF en maíz:

El maíz es el cereal mas ampliamente cultivado en todo el mundo, por su capacidad de adaptarse a un amplio rango de medios ambientes. Los países, los cuales tienen alto consumo anual de maíz *per capita* (Kg) son, Malawi (137), México (127), Zambia (113), Guatemala (103), Honduras (98), Sur África (94), El Salvador (93), Kenya (93), Zimbabwe (89), Lesotho (87), Venezuela (68), Nicaragua (56).

El principal uso del maíz en países industrializados como Canadá y Estados Unidos es para alimento para animales en forma de grano o vendido como alimento industrial para animal y como materia prima para industria de extracción como fructosa, almidón, glucosa, dextrosa, así como etanol mas usado como aditivo en gasolina, solo un porcentaje pequeño es para consumo humano como jarabe de maíz, hojuelas de maíz, harina, pan de maíz, maíz dulce y palomitas de maíz.

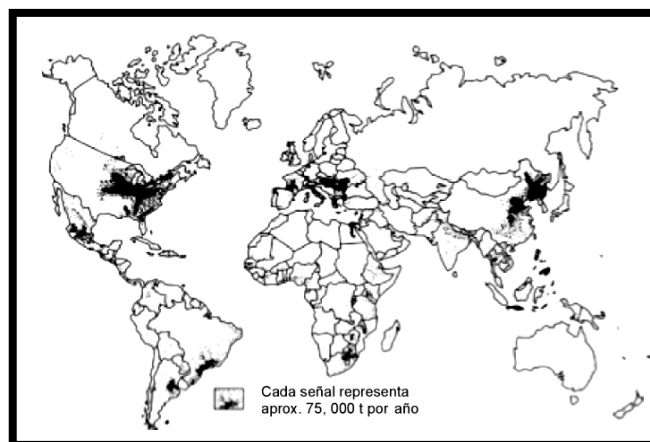


Figura 1. Producción global de maíz (ENV/JM/MONO, 2003)

A diferencia de países en desarrollo como en México, el maíz es un producto básico y un ingrediente importante en la dieta, para hacer tortillas, tamales y tostadas; en grano como pozole, pinole y pozol; en tallo para construir cercas; con *Ustilago maydis* para alimentarse. Globalmente, solo el 21 % de la producción total de grano es consumido como alimento

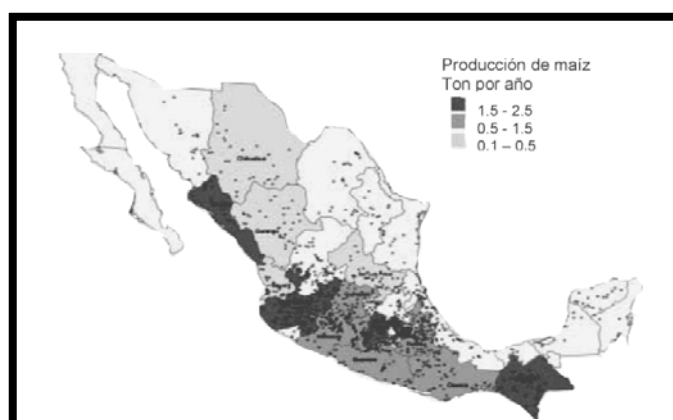


Figura 2. Distribución de maíz y teosinte en México (ENV/JM/MONO, 2003)

El maíz es frecuentemente atacado por plagas de insectos y roedores y/o por hongos toxigénicos en los diferentes procesos a los que esta sujeto como lo son precosecha, cosecha, almacenamiento, secado, transportación, manejo, distribución y consumo, causando un grave problema económico y de salud. En México se han reportado brotes por ingesta de maíz contaminado causados por malas condiciones de almacenaje, combinado con factores ambientales favorables (Brown, 2004c; Bucio-Villalobos, 2001).

La asociación entre *A. flavus* y la planta de maíz en el campo no termina con la cosecha pues se han encontrado AF en los rastrojos y esclerocios (Widstrom, 1992). Se ha establecido que la contaminación de los productos agrícolas con micotoxinas de *Aspergillus* se debe a la invasión del hongo saprobio oportunista sin capacidad patogénica, así las cepas de *A. flavus* suelen infectar antes de la cosecha a semillas de algodón, cacahuete o granos de maíz en crecimiento (Lillehoj, 1992).

La elaboración de las toxinas se produce poco después de la infección de las mazorcas a la temperatura ambiente y en dos días puede alcanzar una concentración de 200 ng/g, llegando a 2,000 ng/g luego de nueve días a 26-34°C. Se observa una gran variación de la contaminación fúngica, generalmente transmitida por insectos, entre los granos de una misma mazorca y entre las mazorcas de un mismo cultivo.

Se ha establecido que el estrés hídrico de la planta asociado con altas temperaturas, es la principal causa de contaminación. Sin embargo, también contribuyen una escasa disponibilidad de fuente nitrogenada en el suelo, así como un exceso de la misma (Widstrom, 1992). Es difícil evitar la exposición a las AF porque no es sencillo prevenir el crecimiento fúngico en los granos y otros productos, aunque algunas variedades de maíz expresan una proteína inhibidora de tripsina de 14 kDa (IT-14kDa), la cual es directamente proporcional a la resistencia de dichos genotipos de maíz al ataque de los hongos productores de AF. Por el contrario en variedades de maíz que presentan una baja o nula expresión de ella tiene una correlación directa con su susceptibilidad o nula defensa al ataque de los hongos aflatoxigenicos y como

consecuencia la inevitable producción de AF en dicho sustrato, como se muestra en estudios realizados por Chen y col. (Chen *et al.*, 1998, 1999a, 1999b). En México se cuenta con variedades de maíz que expresan dicha proteína como se explica en el APENDICE A, (datos no publicados aún). Los insectos están asociados a la presencia de AF en granos debido a que pueden actuar como vectores, pero las larvas no son inmunes al efecto tóxico. La aplicación de insecticidas limita el daño por insectos, pero no suele eliminarlos ni evita la infección fúngica de los granos (Widstrom, 1992).

Las interacciones con otros microorganismos pueden afectar la producción de micotoxinas. *Brevibacterium linens* y *Streptococcus lactis* inhiben la síntesis de AF pero la estimulan *Lactobacillus plantarum* y *Acetobacter aceti* (Moss, 1991).

Desde el punto de vista agrícola, los más importantes son *A. flavus* y *A. parasiticus*. Estos dos hongos tienen una limitada habilidad parasítica, así pueden colonizar y producir AF en tejidos en el campo, aunque *A. flavus* es el más agresivo y por mucho el más predominante de los dos en los diferentes sustratos. En el género *Aspergillus*, hay especies muy cercanas a *A. flavus* y *A. parasiticus* tales como las especies no aflatoxigénicas *A. fumigatus* que es un patógeno, *A. orizae* y *A. niger* que son usadas en la producción de enzimas, péptidos y otros compuestos orgánicos, y *A. sojae* que es usado en la fermentación de salsa de soya, la cual es base de una industria de billones de dólares por todo el mundo (Yu *et al.*, 2004a).

Las especies del género *Aspergillus* presenta una gran diversidad y variabilidad en la naturaleza. Su clasificación y/o identificación tradicional esta basada principalmente en las características morfológicas. Estudios comparativos de secuencias de nucleótidos de genes de RNA ribosomal (rRNA) pueden ser utilizados para el análisis de relaciones filogenéticas y/o identificación de especie o subespecie de hongos (Kumeda y Asao, 1996; Schmidt y Moreth, 2002).

AF y su ruta biosintética:

Los metabolitos precursores de la biosíntesis de AF están agrupados en dos etapas, como metabolismo primario y secundario, en este último existen pasos enzimáticos específicos para la producción de las AF B₁ y B₂ que son comunes en otros hongos. La vía biosintética de AF representa una de las más estudiadas del metabolismo secundario de hongos. Las AF son un grupo de al menos 16 estructuras relacionadas a derivados policetidos de furanocoumarinas. Su elucidación resulta de 36 años de estudio por científicos de muchas disciplinas. La AF es producida principalmente por especies de *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. parasiticus*, y algunas cepas de *A. nomius*, *A. tamarii* (Goto *et al.*, 1996) y *A. ochraceoroseus* (Frisvad y Samson, 1999). Estos metabolitos son en primer lugar producidos por algunos aislados de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* en productos agrícolas, y en segundo, de manera mucho menos frecuente por otros *Aspergillus* spp incluyendo *A. pseudotamarii*, *A. bombycis*, *A. nomius*, de un taxón del oeste de África y de un aislado de *A. ochraceoroseus* (Bhatnagar *et al.*, 2002). Algunos aislados de *A. flavus*, *A. ochraceoroseus* y *A. pseudotamarii* producen solo el tipo B, aunque otras producen B y G.

La ruta biosintética de AF ha sido elucidada con detalle, así como el agrupamiento de los genes biosintéticos, y las funciones de estos genes (Payne y Brown, 1998; Bhatnagar *et al.*, 2002, Brown *et al.*, 2002; Yu, *et al.*, 2002a; Yu *et al.*, 2002b; Yu *et al.*, 2004c). Algunos de los hallazgos en el entendimiento de la genética y regulación de la biosíntesis de AF se han realizado en *A. nidulans* que ha servido como organismo modelo en genética y biología del desarrollo por décadas y por algunas cepas las cuales producen precursores de AF las ST.

En la biosíntesis de AF, el ácido norsolorinic (NOR) es el primer intermediario estable. NOR es sintetizado por la combinación de la síntesis específica de un ácido graso, el cual produce una unidad de hexanoato, y un policetide sintasa. A través del uso de cepas mutantes, inhibidores de la vía, e intermediarios radiactivos se determinaron la mayoría de los intermediarios de la ruta biosintética de AF: NOR – averantina – averufanina – averufina (AVF) – hidroxiversicolorona – versiconal hemiacetal acetato

(VHA) – versicolorina A – esterigmatocistina (ST) – O-metilaesterigmatocistina (OMST) – aflatoxina B₁ (AFB₁).

La conversión de ST a OMST y OMST a AF, la cual representa el paso final de la vía, es único para la producción de AF por los hongos *A. flavus* y *A. parasiticus*, donde ST es sintetizado como el intermediario final en la vía biosintética similar en otra de las especies de *Aspergillus* tal como *A. nidulans*. Una variedad de experimentos, incluyendo complementación en cepas mutantes, genética reversa, y búsqueda diferencial de librerías de cDNA, han llevado a la identificación, clonación y caracterización de los genes involucrados en la biosíntesis de AF. Los análisis de clonas recombinantes de *A. flavus* y *A. parasiticus* indican que estos genes son agrupados y que su posición relativa en los agrupamientos de ambas especies es similar.

El primer gen biosintético clonado fue *nor-1*, luego *ver-1*, *afl-R* y *omt-A*. Se determinó que los genes de la vía biosintética de AF en *A. parasiticus* y *A. flavus*, están agrupados, lo cual aceleró el descubrimiento de más genes. Hay 21 pasos enzimáticos requeridos para la biosíntesis de AF. Los genes de regulación positiva *afl-R* o *afl-J* codifican para una proteína que ha mostrado estar involucrada en la activación transcripcional de muchos de los genes estructurales (APENDICE B, datos no publicados aún) (Rosas, 2001); también es parte del grupo de 25 genes en una secuencia de DNA de 70 kb, que contiene los 25 marcos de lectura abierta (ORFs), dichos genes estructurales codifican monooxigenasas del citocromo p450, deshidrogenasas, oxidasas, metiltransferasas, una poliketido sintetasa y dos sintetisas de ácidos grasos exclusivas representando el grupo bien definido de genes de la ruta biosintética de aflatoxinas.

Los genes que codifican para una alfa sintasa de ácidos grasos mide FAS α 5.8 kb y FAS β 5.1 kb y la de síntesis de poliketidos PKS mide 6.6 kb, los otros 22 en promedio miden 2 kb, en el extremo 5' del grupo de genes hay una región no codificante de 2 kb que marca el final del grupo y su orientación. El extremo 3' de este grupo está delineado por un grupo consistente de 4 genes que codifican para la utilización de azúcares. Otras especies de *Aspergillus* como *A. nidulans*, producen precursores de

aflatoxinas tales como la esterigmatocistina (ST), la cual puede ser metabolizada por *A. flavus* y *A. parasiticus* y convertirla a aflatoxina. Su biosíntesis ocurre a través de una serie de reacciones de oxido-reducción altamente organizadas, comenzando por la conversión de malonylcoenzima-A a condensación de poliquetidos en norantrona por el producto de dos genes de síntesis de ácidos grasos (*fas-1* y *fas-2*) y uno de poliquetidos sintasa (*pksA*) (Yu *et al.*, 2004).

Para convertir norantrona a ácido norsolorinico (NOR) se requiere de una monooxigenasa codificada por el gen (*cyp-A*) y una dehidrogenasa (*norB*). La conversión de NOR a averantina (AVN) involucra una dehidrogenasa, codificada por el gen (*nor-1*), pero puede ser catalizado también por una dehidrogenasa codificada por el gen (*nor-A*). *afl-K(vbs)* involucra la conversión de versiconal (VAL) a versicolorina B (VERB). La conversión de AVR a versicolorina B (VERB) es mediada por *afl-L(verB)*. Dos genes *afl-M(ver1)* que codifica para una ketoreductasa y *afl-N(verA)* que codifica para un citocromo p450 monooxigenasa, son requeridos para la conversión de versicolorina A (VERA) a dimetilesterigmatocistina (DMST). *Afl-O(omtB, dmtA)* es involucrado en la conversión de dimetil esterigmatocistina (DMST) a esterigmatocistina (ST) y de dimetildihidroesterigmatocistina a (DMDHST) a dihidroesterigmatocistina (DHST) (Yu *et al.*, 2004).

Mediante la biblioteca de DNA complementario (cDNA) construida de RNA aislado de *A. parasiticus* SRRC 143, se clonó un inserto de cDNA (1,460) que contiene la región codificante del gen *omtA* que codifica para una O-metiltransferasa que actualmente es denominado *afl-P*, se ha reportado que se involucra en la parte final de la biosíntesis de aflatoxinas, con la actividad metiltransferasa la cual media la conversión de esterigmatocistina (ST) a O-metilesterigmatocistina (OMST) y de dihidroesterigmatocistina a dihidro-orto0metilesterigmatocistina (DHOMST) (Yu *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 2004).

El gen *ord-A* actualmente es denominado *afl-Q*. Se ha propuesto la relación biosintética entre los grupos B (AFB₁ y AFB₂) y los grupos G (AFG₁ y AFG₂) de las

AF, con estudios enzimáticos se ha demostrado la relación de la monooxigenasa dependiente de NADPH en la conversión de OMST a AFB₁ en los pasos finales de la biosíntesis de AF, el gen *ord-1* que codifica para el citocromo p450 monooxigenasa es requerido para la conversión de DHOMST a AFB₂, este gen es responsable de la conversión de OMST a AFB₁ y AFG₁ y de DHOMST a AFB₂ y AFG₂, se ha identificado que se requiere de aminoácido crítico para la actividad enzimática y la unión al grupo hemo motif para la síntesis de toxinas del grupo G (AFG₁ y AFG₂) requiriendo enzimas adicionales a las necesarias para la síntesis de aflatoxinas del grupo B (AFB₁ y AFB₂) (Yu *et al.*, 2004), y requiere del gen *afl-R*, es decir, que el producto proteico, AFLR, regula la actividad de ORDA. El cDNA (1948 pb) del gen *ord-A* obtenido por RT-PCR fue clonado mediante el vector PCR 2.1 (pTA) en células de *E. coli* DH5 α (ver Figura 3) *ord-A* media la conversión de OMST a AFB₁ y DHOMST a AFB₂ en la biosíntesis de AF en *A. flavus* y *A. parasiticus* (Prieto *et al.*, 1997). Estos dos genes (*ord-A* y *omt-A*) son responsables de la actividad enzimática específica directamente involucrados en los últimos pasos de la biosíntesis de AF, y están regulados por *afl-R*, los cuales son sumamente importantes por proveer información vital para el entendimiento de biosíntesis y regulación molecular del proceso de producción de AF.

Mediante la detección de metabolitos intermediarios de la biosíntesis de AF, con serología de las proteínas-enzimas específicas de la ruta de la biosíntesis, ayudará al diagnóstico de la contaminación en maíz por AF de una manera indirecta, lo que permite diseñar una estrategia de predicción de la contaminación precosecha de AF, de suma importancia en el manejo agronómico del cultivo, en la toma de decisiones para la comercialización y en un futuro para su control en precosecha. En esta investigación se usó el análisis de restricción de regiones de rDNA, incluyendo las regiones ITS1-5.8S-ITS2, con fin de elucidar relaciones filogenéticas para identificación de especies de algunos géneros de *Aspergillus* spp. El objetivo de estudiar también la biosíntesis de AF fue de obtener información necesaria para implementar nuevas estrategias de control, y prevenir la contaminación de AF de alimentos, permitiendo entender el metabolismo secundario de los hongos.

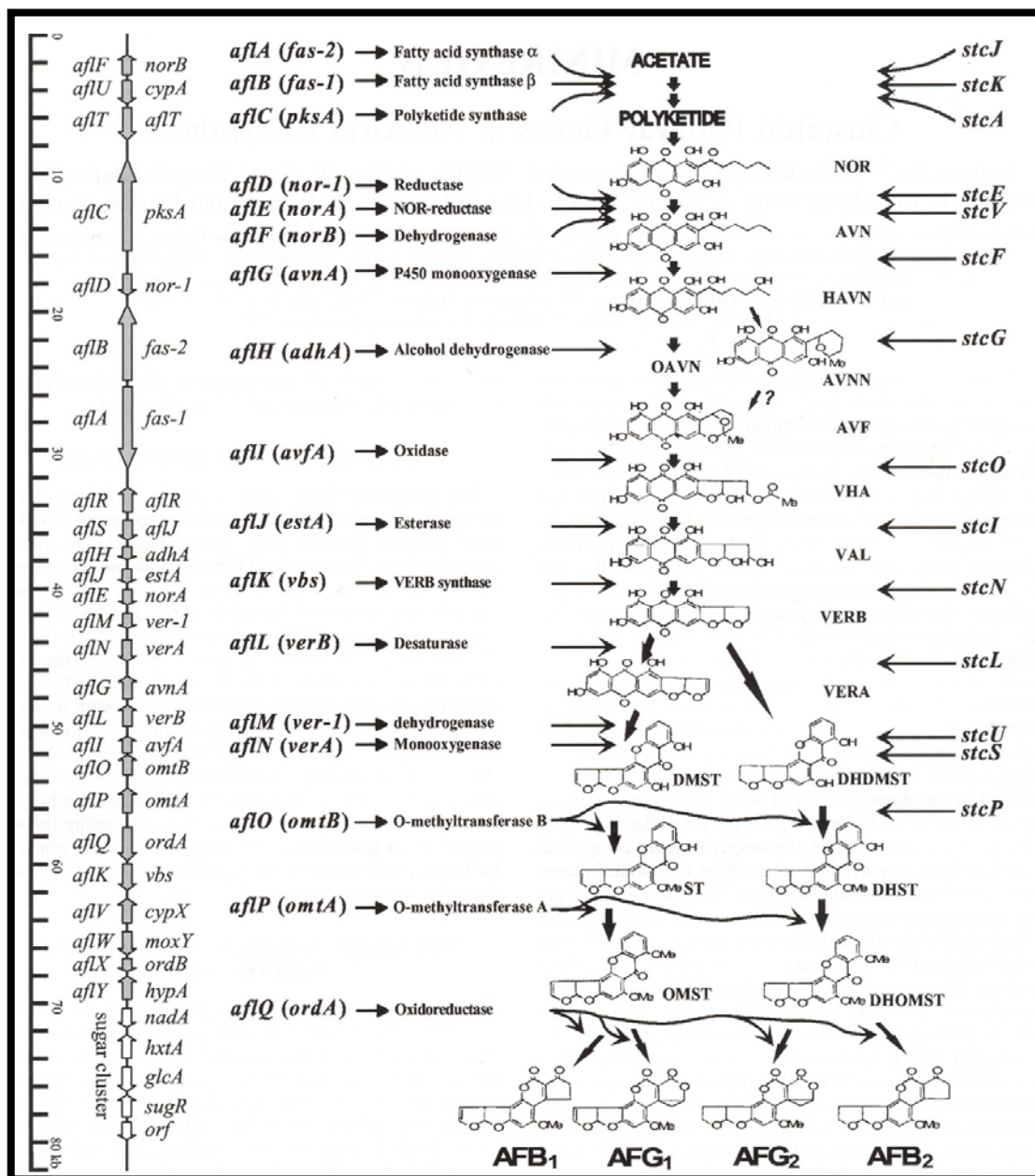


Figura 3. Genes que codifican para la vía biosintética de producción de AF y ST (Yu *et al.*, 2004b).

9. MATERIAL Y METODOS

9.1. Identificación de especies de *Aspergillus* spp mediante el análisis de rDNA.

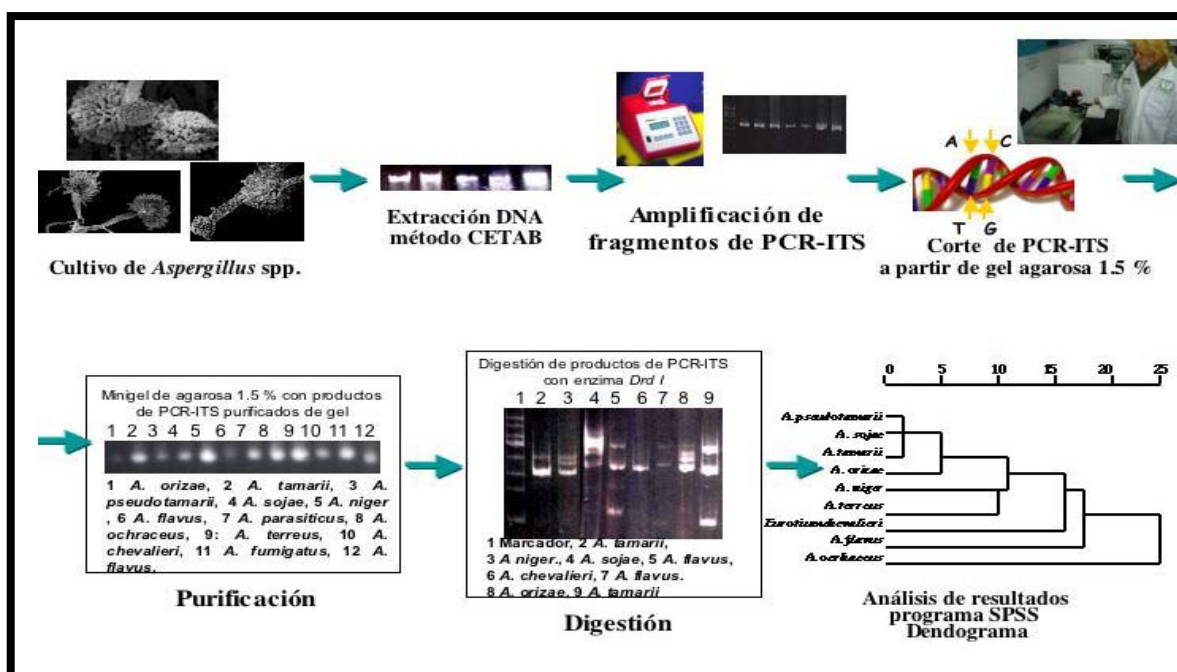


Figura 4. Estrategia general para el análisis filogenético de *Aspergillus* spp

9.1.1. Diseño experimental.

Mediante el apoyo del programa computacional Amplify para análisis de experimentos por PCR, se procedió a analizar las secuencias de los genes en estudio (rDNA) para la selección de los iniciadores de PCR, se analizaron secuencias de DNA de especies de *Aspergillus*, que codifican para el RNA ribosomal, ya que son altamente conservados. Se seleccionaron iniciadores que amplifican las regiones espaciadoras ITS1 e ITS2, las cuales flanquean la subunidad transcripcional en la que se organiza la sub-unidad pequeña 5.8S y la subunidad grande de los genes RNAr, amplificándose un fragmento de 600 pb.

Se solicitaron cepas de referencia de especies de *Aspergillus* spp de interés biotecnológico, clínico y alimentario, los cuales fueron cultivadas en medio líquido con agitación para obtener micelio vegetativo, posteriormente se realizó la extracción de DNA. Los fragmentos amplificados por PCR se purificaron a partir de geles de agarosa al 1.5%, para utilizarse en la digestión enzimática con *Dde* I y buscar patrones electroforéticos diferentes en geles de agarosa al 1.5 % y geles de poliacrilamida al 10% entre las especies de *Aspergillus*, con objeto de identificación de las especies.

9.1.2. Iniciadores utilizados para amplificar rDNA de *Aspergillus* spp

Se utilizaron iniciadores universales para eucariotes de 17 nucleótidos que amplifican secuencias de transcripción intergénica (ITS), caracterizadas por ser unidades ribosomales multicopia agrupados en tándem, de esta manera se ha establecido que casi todos los eucariotes tienen mas de 100 copias. Están localizados en regiones especializadas de los cromosomas que son asociados con los nucleolos y se encuentran en las regiones 18S y 28S (Lalev y Nazar, 1999).

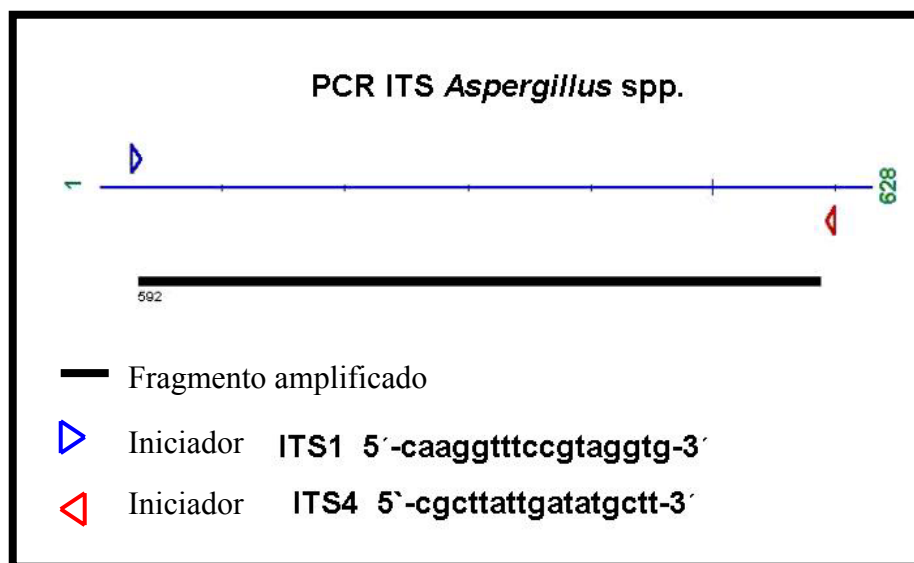


Figura 5. Análisis de secuencias de DNA para PCR con el programa computacional Amplify. Se muestra la amplificación de 628 pb de *Aspergillus* spp con los iniciadores necesarios para amplificar el fragmento ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA.

9.1.3. Cepas de *Aspergillus* spp utilizadas para el análisis de rDNA.

Se utilizaron las cepas *Aspergillus oryzae* NRRL 447, *Aspergillus tamaraii* NRRL 20818, *Aspergillus pseudotamaraii* NRRL 25517, *Aspergillus sojae* NRRL 5597, *Aspergillus niger* SRRC 61, *Aspergillus flavus* 1273, *Aspergillus ochraceus* MC 228, *Aspergillus terreus* MC111966, y *Eurotium chevalieri* NRRL 78, las cuales fueron donados por el Dr. Stephen W. Peterson de USDA ARS NCAUR y por la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

9.1.4. Extracción de DNA de *Aspergillus* spp

El cepario obtenido de USDA ARS NCAUR fue recibido en tubos de vidrio liofilizados y sellados al vacío, conteniendo una suspensión de esporas en leche en polvo (*A. oryzae* NRRL 447, *A. sojae* NRRL 5597, *Eurotium chevalieri* 78), así como en tubos de vidrio con medio de cultivo agar extracto de levadura (*A. tamaraii* NRRL 20818, *A. pseudotamaraii* NRRL 25517), y el resto de las cepas de *Aspergillus* spp fueron recibidas en tubos de vidrio con medio de cultivo sólido de PDA. A partir de estas cepas de referencia, se realizó un cepario de laboratorio en viales con medio de cultivo PDA, para lo cual se tomó un inóculo de esporas de cada cepa de referencia, se dejó desarrollar el micelio y posteriormente la esporulación, para lo cual, se almacenó a temperatura ambiente por 5 días. Esto se realizó periódicamente y el cepario de laboratorio es el que se utilizó para los experimentos de extracción de DNA. Para esto se tomó micelio con una punta de asa de alambre como inóculo de *Aspergillus* spp en tubos Eppendorf de 1.5 ml con 500 µl de medio líquido papa dextrosa (Difco) y se incubó 72h/25 °C con agitación a 200 rpm, con objeto de obtener micelio vegetativo. Todos los siguientes pasos de centrifugación indicados se llevaron a cabo a 14,000 rpm por 5 min. Se centrifugó y se eliminó el medio de cultivo, y se lavó el micelio con 500 µl de amortiguador TE (10 mM Tris-HCl pH 8). Se centrifugó 5 min, se eliminó el amortiguador TE. Se molió con nitrógeno líquido hasta pulverizar completamente. Se agregó 500 µl de amortiguador de lisis (400 mM Tris-HCl pH 8, 60 mM EDTA pH 8, 150 mM NaCl, 1% SDS) y se molió con un pistilo y portapistilo eléctrico, posteriormente se dejó a temperatura ambiente por 10 min. Se usó el vortex brevemente.

Se adicionaron 25 μ l de lizosima (10 mg/ml) y se mezclaron cada 10 min, esta suspensión se incubó a 37 °C durante 1 h. Se agregaron 70 μ l de SDS 10% y 10 μ l de proteinasa K (10 mg/ml). Los tubos fueron mezclados cada 5 min y se incubaron a 65°C 20 min Posteriormente se adicionaron 100 μ l de NaCl 5 M y 100 μ l de cetyltrimetilamonibromido (CTAB) precalentado a 65 °C. La suspensión se agitó hasta que alcanzó una consistencia lechosa y se incubó a 65 °C por 20 min Se hirvió para inactivar enzimas. Se adicionaron 375 μ l de cloroformo:alcohol isoamilico 24:1 y 375 μ l de fenol saturado, se mezcló por inversión y se centrifugó a 14,000 rpm 6 min Inmediatamente después se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, aproximadamente 600 μ l. Se tomaron alícuotas de 200 μ l, procurando no tocar o tomar la parte intermedia (ya que esta puede contaminar DNA). Se midió el volumen obtenido de sobrenadante y se agregó la tercera parte del volumen de solución de acetato de potasio (pH 4.5, hecho con 60 ml de 5M acetato de potasio, 11.5 ml de ácido acético glacial, y 28.5 ml de agua destilada) para precipitar impurezas, se agitó brevemente y se centrifugó a 14,000 rpm 15 min Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm por 15 min y se transfirió otra vez el sobrenadante a un nuevo tubo. Se midió el volumen de sobrenadante obtenido y se agregó 2 terceras partes del volumen de isopropanol, para precipitar los ácidos nucleicos. Se incubó a -20 °C de 30 min a 12 h. Y se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min Se decantó el sobrenadante y al precipitado se le adicionó 1 ml de etanol helado al 70 %, haciendo todo este procedimiento a -20 °C. Posteriormente se centrifugó 15 min y se decantó el sobrenadante. Se repitió el proceso de centrifugación y decantado y finalmente se dejó secar el DNA a temperatura ambiente. Este fue resuspendido en 20 μ l de TE 1X. El DNA purificado se visualizó mediante electroforesis en un mini-gel de agarosa al 0.8%, agregando 1 μ l de DNA purificado el cual fue mezclado con 2 μ l de amortiguador de carga 6X (halt) [5% SDS, 0.025% azul bromofenol, 0.025% azul bromofenol xhilocianol y 25% glicerol] en TBE 0.05% a 100 volts. 1 μ l de DNA se utilizó en una reacción de PCR de 25-50 μ l. Para visualizar el producto amplificado se analizó mediante electroforesis (2 μ l) en un gel al 0.8% de agarosa. Para esto, se pesó 0.8 g de agarosa y se disolvió en 100 ml de amortiguador TBE 0.05%.

La electroforesis se llevó a cabo a 100 V por 20-30 min a temperatura ambiente. Se comparó el patrón electroforético a fin de identificar alguna diferencia en el mismo. El gel se tiñó con bromuro de etidio (10 mg/ml) y se visualizó con luz UV.

9.1.5. Condiciones de PCR utilizadas para amplificar las regiones ITS

La reacción se realizó usando 2 μ l de DNA purificado, 2 μ l de una mezcla de dNTP 10 mM, 1.5 μ l de $MgCl_2$ 25 mM, 2 μ l del iniciador 1 y 2, 5 μ l de amortiguador Taq y 1 μ l de Taq polimerasa (IU/ μ l) y se aforó con agua miliQ estéril a un volumen de 25 μ l. Se corrieron por 35 ciclos de las siguientes condiciones: 94 °C durante 2 min para la desnaturalizar el DNA posteriormente 94 °C durante 1 min, 50 °C durante 1 min para alineación de los iniciadores, y 72 °C durante 1 min para la extensión y 10 min de extensión a 72 °C para el ciclo final.

La visualización de los productos de PCR se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y poliacrilamida 10%. Las condiciones de ésta fueron a 100 V por 20-30 min El fragmento de aproximadamente 600 pb fue cortado del gel con ayuda de una navaja y se separó del gel de agarosa mediante el kit de purificación QIAEX II. Una alícuota de 2 μ l del DNA purificado se analizó electroforéticamente en un minigel de 1.5%. El producto amplificado purificado a partir de gel se utilizó en la digestión.

9.1.6. Digestión de los productos de PCR-ITS.

Con objeto de encontrar diferencias entre los fragmentos amplificados de DNA de *Aspergillus* spp, se tomaron 6 μ l de DNA del producto del PCR-ITS purificado a partir de gel y se le agregó 1 μ l de enzima *Dde* I, se le agregaron 2 μ l de amortiguador para enzima *Dde* I [100mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM ditiotreitól (pH 7.9 a 25°C)], 0.9 μ l de BSA, 10 μ l de agua y se incubó a 37° C.

La visualización de los productos de PCR-ITS se realizó en geles de poliacrilamida (PAGE) al 10%. En el sistema de electroforesis se utilizó 100 V por 1 h y se tiñeron con bromuro de etidio (10 mg/ml) por 5 min y se visualizaron con luz UV para poder identificar alguna diferencia en el patrón electroforético.

9.1.7. Análisis filogenético de *Aspergillus* spp

Se realizó un registro del tamaño de las bandas obtenidas por digestión de la enzima *Dde* I para cada especie de *Aspergillus* spp utilizada en el estudio, formándose una matriz con 0 y 1, en donde 0 correspondió a ausencia de la banda y 1 fue presencia de ésta. Estos datos se analizaron mediante el programa de SPSS originándose un dendograma el cual se basó en el coeficiente de similitud genética, con lo cual se pudo realizar un análisis filogenético entre las especies de *Aspergillus* spp.

9.2. Subclonación de los genes *omt-A* y *ord-A* de *Aspergillus flavus* Link Ex Fries y *Aspergillus parasiticus* Speare en *E. coli*.

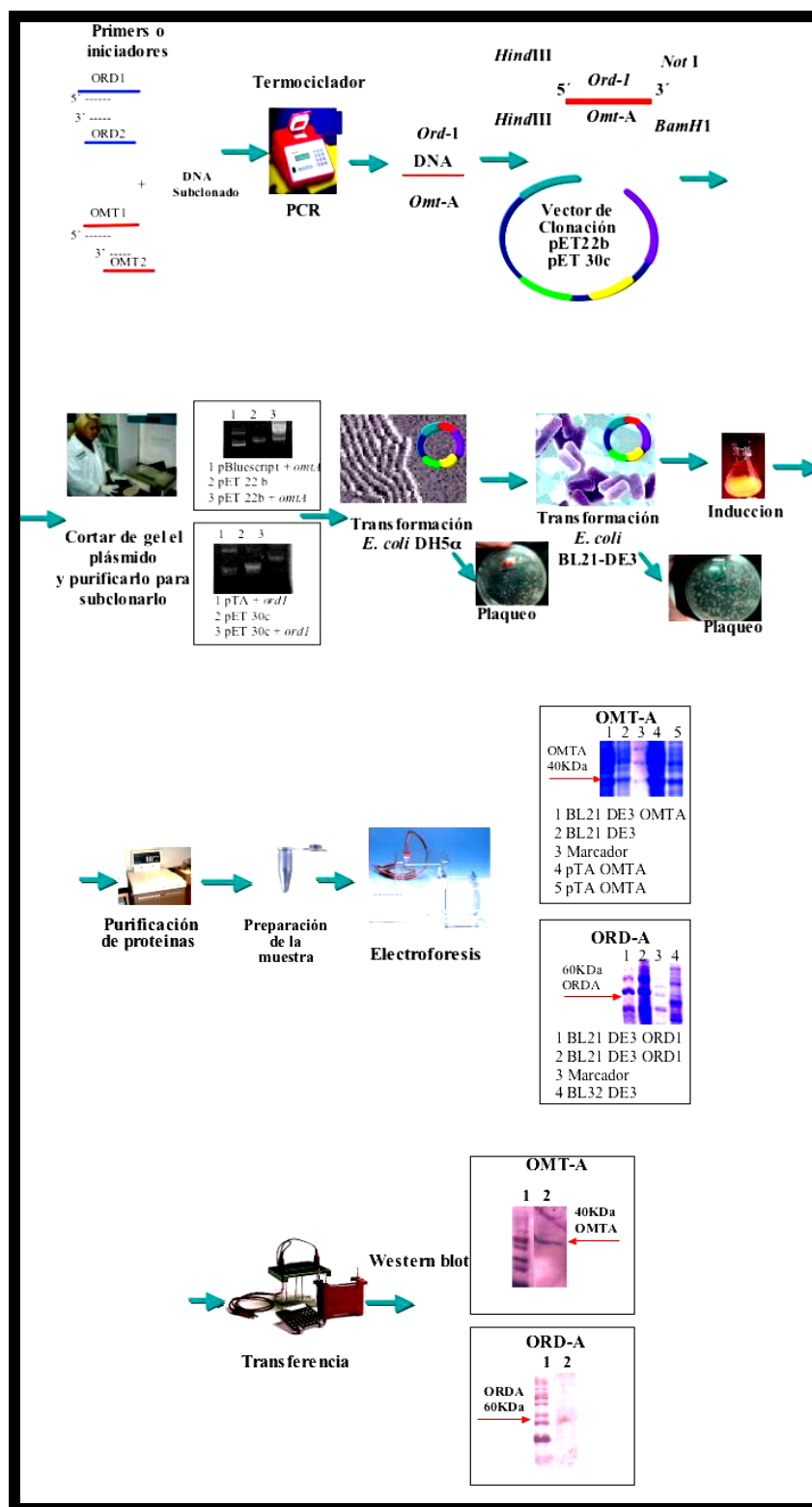


Figura 6. Estrategia general para sub-clonar los genes *omt-A* y *ord-A*

9.2.1. Diseño experimental.

El objetivo principal de la ingeniería genética utilizada en esta investigación fue lograr la correcta expresión del gen clonado en el microorganismo huésped elegido. Se procedió a elegir y diseñar vectores especializados con objeto de que este pudiera transcribirse y traducirse en el microorganismo huésped. Se procedió a analizar las secuencias de los genes en estudio (*ord-A* y *omt-A*) para el diseño de los iniciadores de PCR.

En el caso de *omt-A* los iniciadores se diseñaron para ser utilizados en una clonación sitio-dirigida conteniendo los sitios de restricción *BamH* I y *Hind* III, para subclonarse en el plásmido pET22b, los cuales sirvieron también para comprobar la subclonación. Se amplificó el gen *omt-A* mediante PCR y el fragmento amplificado del gen se purificó a partir de gel de agarosa al 1.5% y se sometió a digestión enzimática con *BamH* I y *Hind* III para ligarse al plásmido pET22b digerido con enzimas de restricción *BamH* I y *Hind* III, y utilizarse en la transformación de células de *E. coli* de clonación calcio competentes DH5 α . Se seleccionaron colonias de *E. coli* DH5 α transformadas para purificar el DNA plásmido y mediante patrones electroforeticos en geles de agarosa al 0.8% elegir a las posibles recombinantes comprobándose mediante PCR. Se purificó nuevamente DNA plásmido de las transformantes positivas conteniendo el gen *omt-A* de *E. coli* DH5 α para utilizarse en la transformación de células de *E. coli* de expresión de proteínas recombinantes calcio competentes BL21(DE₃), e inducir la producción de proteínas recombinantes mediante IPTG. Se comprobó la expresión de la proteína OMTA mediante Western blot con anticuerpos de unión a las histidinas unidas a la proteína recombinante como proteína de fusión y anticuerpos de unión a la proteína OMTA donado por el Dr. Deepak Bhatnagar del SRRC USDA ARS.

El diseño de la subclonación del gen *ord-A* fue sitio dirigida liberando el gen del plásmido pCR2.1TAORDA con las enzimas *Hind* III y *Not* I y ligándolas al plásmido pET 30c digerido previamente con las enzimas *Hind* III y *Not* I. Se diseñaron iniciadores para amplificar el gen *ord-A* y comprobar la subclonación. Posteriormente se caracterizaron los plásmidos que contenían los genes en estudio, así como los plásmidos a los que se ligarían.

Se liberó el gen *ord-A* mediante las enzimas *Hind* III y *Not* I y se purificó el fragmento del gen liberado a partir de un gel de agarosa al 1.5 %, para ligarse al plásmido pET30c digerido con enzimática de restricción *Hind* III y *Not* I y utilizarse en la transformación de células de *E. coli* de clonación calcio competentes DH5 α . Se seleccionaron colonias de *E. coli* DH5 α transformadas para purificar el DNA plásmido y mediante patrones electroforeticos en geles de agarosa al 0.8% elegir a las posibles recombinantes por diferencia de tallas del plásmido que contenía el gen y del que no lo contenía, comprobándose mediante PCR amplificando el gen en estudio. Se purificó nuevamente DNA plásmido de las transformantes positivas conteniendo el gen *ord-A* de *E. coli* DH5 α para utilizarse en la transformación de células de *E. coli* de expresión de proteínas recombinantes calcio competentes BL21(DE₃). Se indujo la producción de proteínas recombinantes mediante IPTG y se comprobó mediante Western blot con anticuerpos de unión a las histidinas unidas a la proteína recombinante como proteína de fusión.

9.2.2. Material biológico utilizado para sub-clonar el gen *omt-A*

Se utilizó *E. coli* con el plásmido pBluescript conteniendo el gen *omt-A* donado por el Dr. Gary A. Payne de North Carolina State University. El gen *omt-A*, involucrado en la biosíntesis de AF fue clonado en el plásmido pBluescript en 1993 por Yu y col., el cDNA de 1460 pb fue aislado de *A. parasiticus* (Yu *et al.*, 1993). Se utilizó para la subclonación células de *E. coli* DH5 α , BL21 (DE₃) y el plásmidos pET22b.

9.2.6. Construcción del plásmido que exprese el gen *omt-A*.

Purificación de DNA plasmidico.

El DNA plasmidico se purificó mediante el kit RPM (Bio 101). Los plásmidos que se utilizaron fueron pBluescriptOMTA y pET22b.

Caracterización del DNA plásmido pBluescript genOMTA y pET22b.

El plásmidos pBluescript con el gen *omt-A*, se caracterizó mediante enzimas de restricción *BamH I*, *Xho I*, *Hind III*. También por combinación de corte con enzimas de restricción *BamH I* y *Xho I*, *BamH I* y *Hind III*. El plásmido receptor del gen *omt-A*, pET22b, se caracterizó y preparó para la ligación mediante enzimas de restricción con *BamH I* y *Hind III*.

Amplificación del gen *omt-A* para subclonación en el plásmido pET22b.

El gen se amplificó mediante los primers diseñados con el programa Amplify *omt1R* y *omt2R* conteniendo los sitios de restricción *BamH I* y *Hind III*.

Para la amplificación del gen mediante PCR se utilizaron 2 µl de DNA, 2 µl de una mezcla de dNTP 10 mM, 1.5 µl de MgCl₂ 25 mM, 2 µl del iniciador 1 y 2, 5 µl de amortiguador taq y 1 µl de taq polimerasa (IU/µl). El volumen se ajustó a 25 µl con agua miliQ estéril. Los productos se analizaron en electroforesis con un gel de agarosa al 1.5%, las condiciones de la electroforesis fueron 100V a temperatura ambiente por 30 min, se tiñó el gel con bromuro de etidio (10mg/ml) y se visualizaron con luz ultravioleta.

Digestión enzimática del gen *omt-A* y el plásmido pET22b

El fragmento correspondiente al gen *omt-A* amplificado mediante PCR se sometió a digestión enzimática con *Hind III* y *BamH I* y se sub-clonó en el plásmido pET22b obtenido de Novagen, Inc. (Madison Wis). Para ello, el plásmido se linearizó mediante digestión enzimática con *Hind III* y *BamH I*. El plásmido linearizado y el fragmento del gen obtenidos de la digestión enzimática se purificaron a partir de un gel de agarosa utilizando el kit Quiaex I (Quiagen).

Ligación del gen *omt-A* con el plásmido pET22b.

Se ligaron usando 1 µl de fragmento de gen, 3 µl de plásmido, 1 µl de solución amortiguadora de ligasa 10X y 2 µl de enzima T4-DNA ligasa (GIBCO BRL) y 3µl de Agua MiliQ. El sistema fue incubado toda la noche a 4 °C. Sin embargo, antes de realizar la transformación, la reacción se incubó 10 min a 65 °C para desactivar la enzima y se llevó el volumen de producto de ligación a 100 µl. Es sabido que la construcción pET22b(+) más el inserto posee 6 codones de histidina en el extremo C-terminal del inserto *omt-A*, además del gen de resistencia a ampicilina y el promotor T7.

9.2.7. Construcción del plásmido que exprese el gen *ord-A*.

Purificación de DNA plasmidico.

El DNA plasmidico se purificó mediante el kit RPM (Bio 101). Los plásmidos que se utilizaron fueron pCR2.1TAORDA y pET30c.

Caracterización del DNA plásmido pCR2.1TAORDA y pET 30c.

Se caracterizó el plásmido pCR2.1TAORDA mediante digestiones *Hind* III, *Xba* I, *Apa* I. Finalmente se liberó este gen mediante enzimas de restricción *Hind* III y *Not* I, las cuales también se utilizaron en el plásmido pET30c, para proceder a purificar a partir del gel y ligar el gen *ord-A* y el plásmido pET30c el cual fue utilizado en la subclonación de células de *E. coli* DH5α. La construcción pET30c(+) más el fragmento *ord-A*, posee 6 codones de histidina en el extremo N-terminal del fragmento *ord-A*, además del gen de resistencia a kanamicina y el promotor T7.

Digestión del plásmido pTA con el gen *ord-A* para liberar el gen

El fragmento correspondiente al gen *ord-A* obtenido de DNA del plásmido TA, se subclonó en el plásmido pET30c (Novagen, Inc.) Ambos plásmidos se sometieron a digestión enzimática con *Hind* III y *Not* I. El plásmido linearizado y el fragmento del gen obtenidos de la digestión enzimática se purificaron a partir de un gel de agarosa utilizando el kit Quiaex I (Quiagen).

Ligación del gen *ord-A* con el plásmido pET 30c

Se ligaron usando 1 μ l de fragmento de gen, 3 μ l de plásmido, 1 μ l de solución amortiguadora de ligasa 10X y 2 μ l de enzima T4-DNA ligasa (GIBCO BRL) y 3 μ l de Agua MiliQ. La mezcla fue incubada toda la noche a 4 °C. Sin embargo, antes de realizar la transformación, la reacción se incubó 10 min a 65 °C para inactivar la enzima y se llevó el volumen de producto de ligación a 100 μ l, y con ello optimizar la transformación de células de *E. coli* calcio competentes.

9.2.8. Preparación de células hospedero de *E. coli* calcio competentes

Se utilizaron cepas de *E. coli* de clonación DH5 α y de expresión BL21(DE₃) las cuales fueron activadas en caldo Luria Bertoni (LB Difco) a partir de cultivos congelados de reserva. Del cultivo activado de *E. coli* se tomó un inóculo y se sembró en 4 cuadrantes sobre una placa con agar LB (Difco), y se incubó a 37 °C 12 h. De este cultivo se seleccionó una colonia la cual se tocó con la punta de una asa de alambre y se colocó en un tubo conteniendo 3 ml de medio LB y se incubó de nuevo 12 h, a 37 °C con agitación a 200 rpm respectivamente. De este cultivo, se tomaron 100 μ l y se colocaron en un tubo con 3 ml de medio nuevo LB y se incubaron a 37°C con agitación a 200 rpm aproximadamente 2 h, hasta alcanzar una densidad óptica a 550 nm de 0.6. El cultivo fue enfriado con hielo por 10 min para detener el crecimiento. Se centrifugó a 7,000 rpm por 10 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Se obtuvo una pastilla celular la cual se resuspendió en 1.5 ml de cloruro de calcio 0.1 M y se incubó en hielo por 20 min, posteriormente se centrifugó a 7,000 rpm por 10 min a 4°C, y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió la pastilla en 50 μ l de CaCl₂ y de nuevo se incubó en hielo por 1 hr y se procedió a transformar las células calcio competentes obtenidas, con la construcción de plásmido.

9.2.9. Transformación de la cepa de *E. coli* DH5 α con los plásmidos subclonados.

Para la subclonación, se usaron 10 μ l del producto de la ligación para transformar las células calcio competentes. A la suspensión de células se agregaron 2 μ l de DNA (no más de 50 ng en un vol de 10 μ l), se mezcló gentilmente y se incubaron por 30 min en hielo. Como control positivo se utilizó la bacteria competente mas 2 μ l de DNA

plásmido sin linearizar, y como control negativo se utilizaron bacterias competentes sin agregar DNA plásmido. Los tubos fueron transferidos a un baño de agua a 42°C por 90 seg sin mezclar y posteriormente a hielo por 10 min. A ellos se agregaron 800 µl de medio LB enriquecido con 250 mM KCl, 2M de MgCl₂ y 1M de glucosa y se incubaron durante 45 min en baño de agua a 37 °C con agitación de 225 rpm. Esto se realizó para permitir la recuperación celular y la expresión del marcador de resistencia a antibiótico codificado por el plásmido. Las células se transfirieron a cajas con medio LB al cual se le había agregado 60 a 100 µg/ml de ampicilina y 20 mM de MgSO₄, como medida para evitar el desarrollo de colonias satélites alrededor de la colonia recombinante.

9.2.10. Transformación de cepas de *E. coli* BL21(DE₃).

Una vez identificada la clona recombinante de *E. coli* DH5α más el inserto se procedió a transformar la cepa de expresión BL21(DE₃) con DNA plásmido por el método de transformación química de CaCl₂, tal y como se especificó previamente. La cepa BL21(DE₃) contiene una copia del gen que codifica para la T7 RNA polimerasa la cual se indujo por la adición de isopropil-β-tiogalactopiranosido (IPTG).

9.2.11. Verificación y/o confirmación de plásmido recombinante en células hospedero.

Se seleccionaron colonias posibles recombinantes a las que se realizó extracción de DNA plásmido con el kit RPM (Bio 101), y éste se visualizó en geles de agarosa al 0.8% para ver su perfil electroforetico y elegir a las colonias recombinantes por diferencia de talla. La confirmación de las clonas más el inserto se realizó mediante reacciones de PCR con los iniciadores que previamente se diseñaron. Para la amplificación del gen mediante PCR se utilizaron 2µl de DNA, 2 µl de una mezcla de dNTP 10 mM, 1.5 µl de MgCl₂ 25 mM, 2 µl del iniciador 1 y 2, 5 µl de amortiguador taq y 1 µl de taq polimerasa (IU/µl). El volumen se ajustó a 25 µl con agua miliQ estéril. Los productos se analizaron en electroforesis con un gel de agarosa al 1.5%, las condiciones de la electroforesis fueron 100V a temperatura ambiente por 30min, se tiñó el gel con bromuro de etidio (10mg/ml) y se visualizaron con luz ultravioleta.

9.2.12. Expresión de proteínas recombinantes OMTA y ORDA.

Las colonias seleccionadas se resuspendieron en 50 ml de medio LB con ampicilina 100 µg/ml y a las 4 h de incubación y una O.D. de 0.6 (345 nm) se indujo la expresión de proteínas recombinantes agregando isopropyl-β-tiogalactosidasa (IPTG) a una concentración final de 1 mM. Se realizaron estudios de tiempo y curso de la inducción de producción de proteínas recombinantes, a fin de determinar el tiempo de mayor expresión de la proteína de interés. A las 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 h después de la inducción, se tomaron alícuotas de 1.5 ml del cultivo en tubos Eppendorf para obtener el extracto de células por centrifugación a 12,000 rpm por 3 min. Se eliminó el medio y el precipitado celular se guardó a -20°C. Posteriormente se resuspendió en 20 µl de amortiguador TE (10 mM Tris-HCl pH 8), se hirvió por 5 min y se les agregó 20 µl de amortiguador de muestra pH 6.8 (2% SDS, 5% β-mercaptoetanol, 0.002% azul de bromofenol, 0.0625 mM Tris-HCl, 10% glicerol) para desnaturalizar y linearizar la proteína.

9.2.13. Electroforesis de proteínas.

La electroforesis de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) utilizando un gel concentrador de 4% y un gel separador de 15%. Las condiciones de la electroforesis fueron 20 mili Amperes por 4.5h. Se comparó el patrón electroforético de proteínas totales de células de pET con y sin inserto, a fin de detectar el tiempo de mayor expresión de dicha proteína y diferencias en los patrones electroforéticos.

9.2.14. Western blot.

El Western blot se utilizó para identificar la producción de proteínas recombinantes. Se utilizó una cámara de transferencia (BIORAD), se formó un “sándwich” cuyo orden de los componentes en dirección de polo positivo a negativo fue el siguiente: un panel de fibra, papel filtro, el gel de poliacrilamida, la membrana de nitrocelulosa, papel filtro y el otro panel de fibra para proporcionar un ambiente húmedo no acuoso, todo humedecido en amortiguador de transferencia (25mM Tris, pH8.3, 192 mM glicina, 20% MeOH, 0.1% SDS). Las condiciones de la transferencia fueron de toda la noche a 4°C, con 30 Volts. Posteriormente la membrana de nitrocelulosa se tiñó con colorante rojo Ponceau S (0.2% Ponceau S, 3% ácido tricloroacético, 3% ácido sulfosalicílico) durante

5 min, para visualizar las bandas de los marcadores moleculares, luego se realizó un lavado con agua destilada para eliminar el colorante.

La membrana de nitrocelulosa se colocó en una solución TBS-TWEEN-leche descremada al 2% durante toda la noche. Se agregó el primer anticuerpo (anti-*omt-A* o anti-histidinas para el caso de *ord-A*) diluido 1:5000. Se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche. Se lavó la membrana por 10 min, en 2 ocasiones con TBS-Tween 0.05% y por último con TBS, posteriormente se incubó por 3 h con 5 μ l del conjugado anti IgG de conejo marcado con peroxidasa (1:5000 en TBS). Se lavó la membrana por 10 min, 2 veces con TBS-Tween 0.05% y una vez con TBS. Se añadió diaminobenzidina al 0.05% como sustrato hasta que aparecieron las bandas (10 min).

10. RESULTADOS

En esta investigación se implementó una técnica molecular con la que mediante digestiones de productos de PCR de las región ITS1-5.8S-ITS2, de varias especies de *Aspergillus* se pudo diferenciar entre las especies. Para esto se extrajo el DNA mediante el método CTAB (Fig. 9).

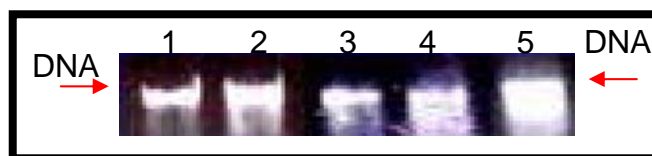


Figura 9. Gel de agarosa al 0.8 % con 2 µl de extracción de DNA método CTAB de *Aspergillus* spp, 1: *A. tamarii*, 2: *A. pseudotamarii*, 3: *A. ochraceus*, 4: *A. Terreus*, 5. *A. fumigatus*.

Posteriormente se realizó la amplificación de fragmentos de 600 pb aproximadamente de los rDNA de las especies de *Aspergillus* spp (Fig. 10 y 11)

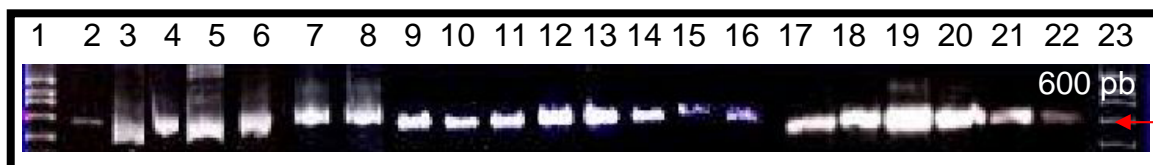


Figura 10. Gel de agarosa al 1.5% con 3 µl PCR-ITS de *Aspergillus* spp. 1: Marcador Bioline, 2: *A. orizae*, 3: *A. tamarii*, 4: *A. pseudotamarii*, 5: *A. sojae*, 6: *A. niger*, 7: *A. flavus*, 8: *A. ochraceus*, 9: *A. terreus*, 10: *Eurotium chevalieri*, 11: *A. pseudotamarii*, 12: *A. flavus*, 13: *A. flavus*. 14: *A. flavus*. 15: *A. orizae*, 16: *A. tamarii*, 17: *A. sojae*, 18: *A. niger*, 19: *A. flavus*, 20: *Eurotium. chevalieri*. 21: *A. flavus*, 22: *A. orizae*, 23: Marcador Bioline.

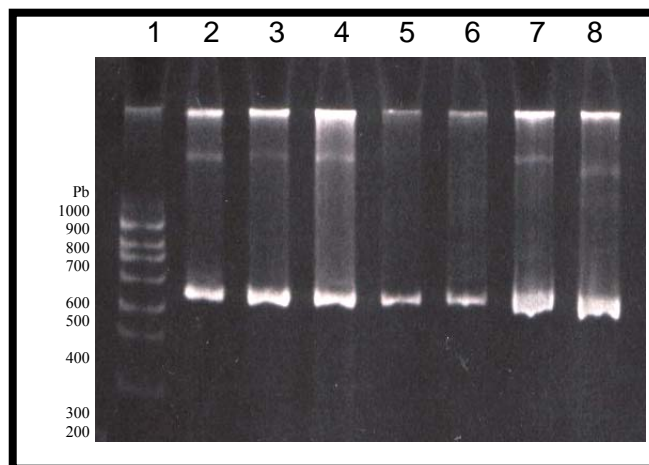


Figura 11. Gel de poliacrilamida 10% con 3 μ l de PCR-ITS de *Aspergillus* spp. 1: Marcador Bioline, 2: *A. orizae*, 3: *A. tamaraii*, 4: *A. pseudotamaraii*, 5 *A. niger*, 6: *A. flavus*, 7: *A. ochraceus*, 9: *Eurotium Chevalieri*.

Finalmente se procedió a purificar los productos de PCR a partir de gel, para proceder a la digestión con la enzima *Dde* I, y buscar diferencias entre las especies en los patrones electroforéticos. Solo las especies *A. sojae*, *A. tamaraii* y *A. pseudotamaraii*, comparten el mismo patrón electroforético (Fig. 12).

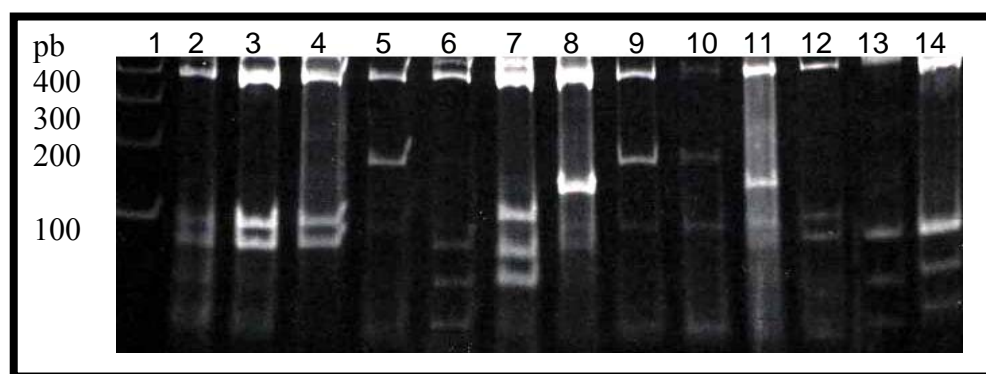


Figura 12.- Gel de poliacrilamida al 10% con 10 μ l de productos de PCR-ITS de *Aspergillus* spp digeridos con la enzima *Dde*I. 1: Marcador Bioline, 2: *A. orizae*, 3: *A. tamaraii*, 4: *A. pseudotamaraii*, 5 *A. niger*, 6: *A. flavus*, 7: *A. ochraceus*, 9: *A. niger*, 10: *A. terreus*, 11: *Eurotium. chevalieri*, 12: *A. sojae*, 13: *A. flavus*. 14: *A. flavus*.

En el análisis filogenético, *A. sojae*, *A. tamaraii* y *A. pseudotamaraii*, son las tres especies de *Aspergillus* mas cercanas filogenéticamente a diferencia de las demás, que después de estas dos se alejan en el siguiente orden, *A. orizae*, *A. niger* formando un grupo con *A. sojae*, *A. tamaraii* y *A. pseudotamaraii*, luego estos 5 en conjunto con *A. flavus* y *Eurotium chevalieri* y finalmente todos se agrupan junto con *A. ochraceus*, la especie mas alejada filogenéticamente (Fig. 13).

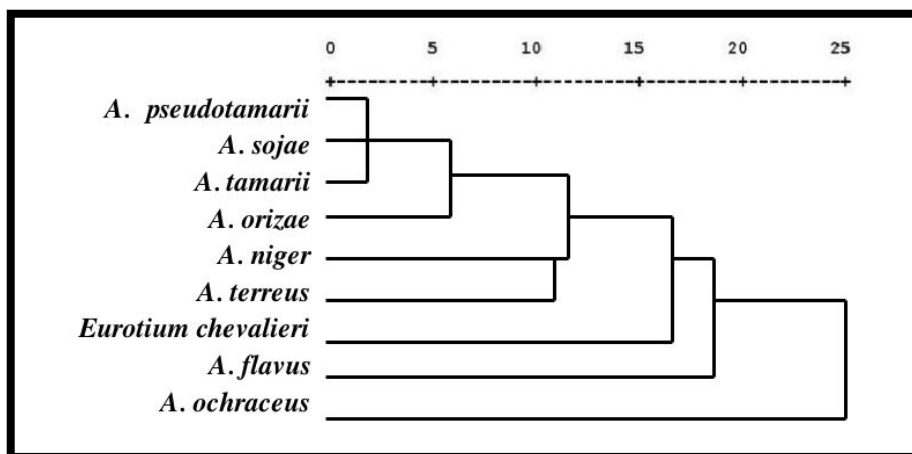


Figura 13. Análisis de grupos de *Aspergillus* spp.

El dendrograma obtenido se basó en el coeficiente de similitud genética determinada por la presencia o ausencia de los fragmentos de DNA originado por la enzima de restricción *Dde* I de las regiones ITS.

En cuanto a la subclonación de los genes intermediarios de la ruta biosintética de AF se obtuvieron los siguientes resultados.

a) Se purificó el DNA plásmido a partir de *E. coli* pBluescriptOMTA (Fig 14).

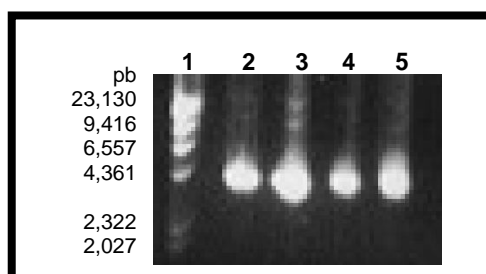


Figura 14. Extracción de DNA plásmido de pBluescriptOMTA. 1 Marcador λ *Hind* III, 2, 3, 4, y 5 plásmido pBluescriptOMTA.

Se caracterizó el plasmido pBluescriptOMTA (Fig. 15 y 16).

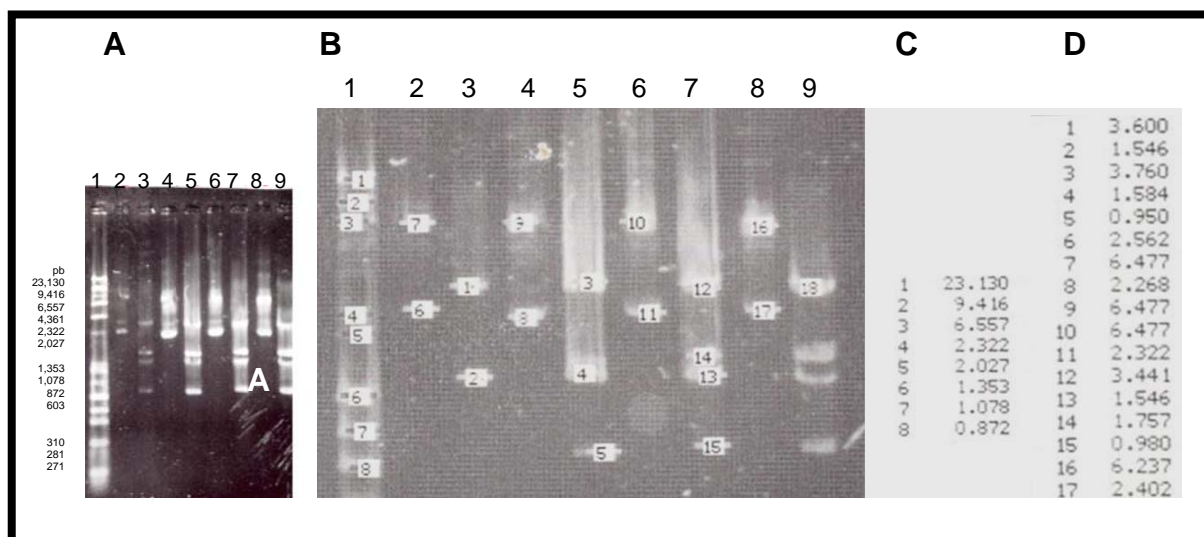


Figura 15. Talla molecular del plásmido pBluescriptOMTA. Panel A y B: 1 Marcador λ *Hind* III, X 174 *Hae* III, 2, 4, 6, 8 pBluescriptOMTA sin digerir, 3, 5, 7, 9 digerido con *Bam*H I y *Xho* I. Panel C: Talla molecular del marcador. Panel D: Talla molecular de los fragmentos de pBluescriptOMTA sin y con digestión enzimática.

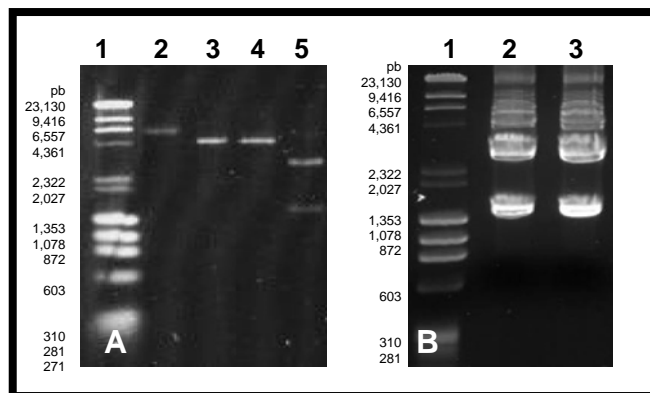


Figura 16. Plásmido pBluescriptOMTA. Panel A. 1 Marcador λ *Hind* III, X 174 *Hae* III, 2 pBluescriptOMTA sin digerir, 3 digerido con *Bam*H I, 4 digerido con *Hind* III, 5 digerido con *Bam*H I y *Hind* III. Panel B. 1 Marcador λ *Hind* III, X 174 *Hae* III, 2 y 3 pBluescriptOMTA digerido con *Bam*H I y *Hind* III.

El gen *omt-A* se amplificó mediante los iniciadores conteniendo los sitios de restricción *Bam*H I y *Hind* III como lo indica la (Fig. 17) .

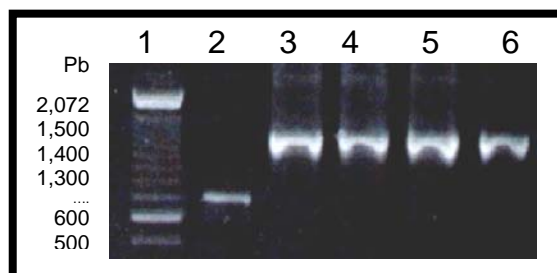


Figura 17. Amplificación del gen *omt-A*, mediante PCR. 1 marcador gibco 100 pb, 2 Amplificación inespecífica del gen *omt-A*. 3, 4, 5, 6 Amplificación adecuada del gen *omt-A*, se purificó la banda amplificada a partir del gel para someterse a digestión enzimática con *Bam*H I y *Hind* III y posteriormente ligarse con el plasmido pET 22b. Se logró amplificación de un fragmento de 1490 pb.

El producto de PCR del gen *omt-A* amplificado y el plásmido pET22b, fueron digeridos con las enzimas de restricción *BamH* I y *Hind* III y los fragmentos digeridos se purificaron a partir de un gel de agarosa al 0.8% (Fig. 18).

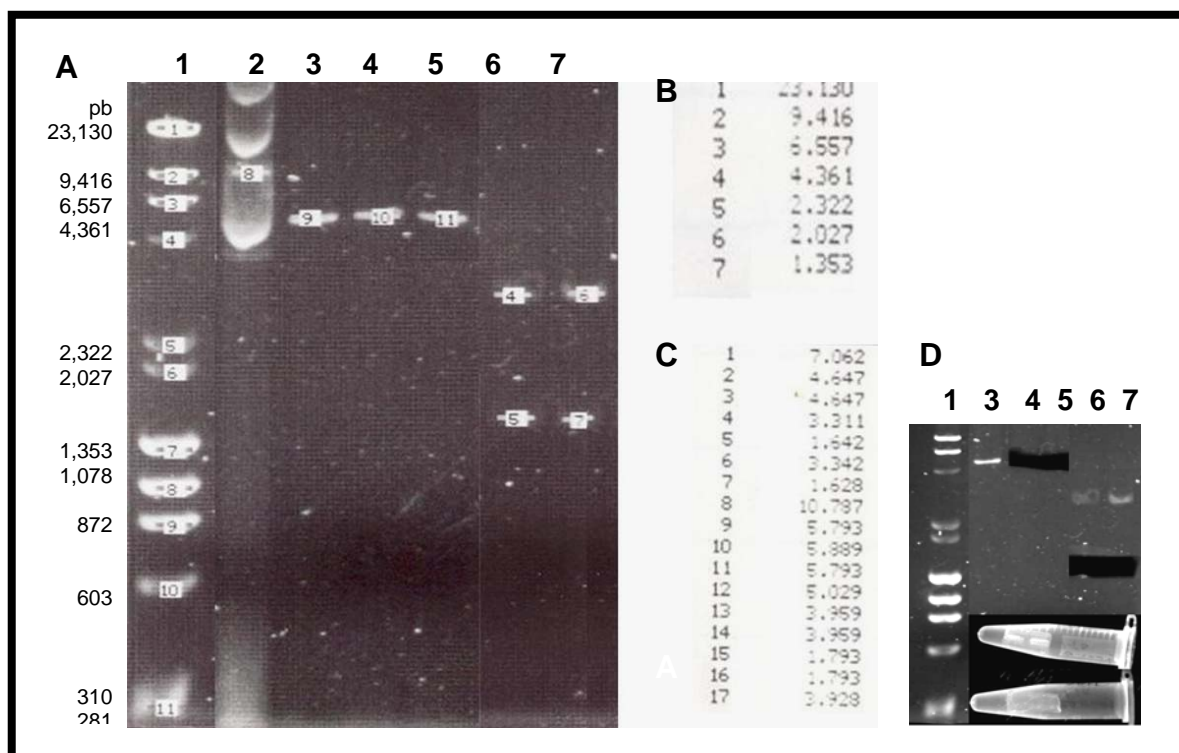


Figura 18. Corte a partir de gel de los fragmentos pET22b y gen *omt-A* digeridos. Panel A y D: 1 Marcador λ *Hind* III, X 174 *Hae* III, 2 plasmido pET22b sin linearizar, 3 digerido con *Bam* H I, 4 y 5 digerido con *Bam*H I y *Hind* III, 6 y 7 pBluescript *omt-A* digerido con *Bam*H I y *Hind* III. Panel B: Talla molecular del marcador. Panel C: Talla molecular de los fragmentos, Panel D: Corte de las bandas de plasmado pET22b y *omt-A* digeridos con *Bam*H I y *Hind* III.

Una vez construido el plásmido pET22bOMTA, se utilizó para subclonarse en cepas de *E. coli* de clonación DH5 α (Fig 19).

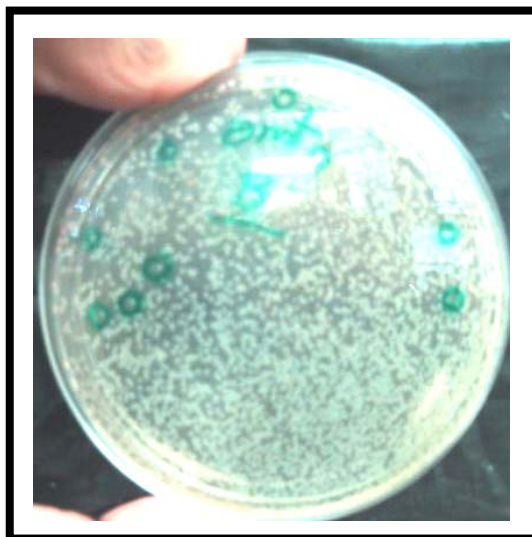


Figura 19. Colonias de *E. coli* DH5 α transformadas con el plásmido pET22bOMTA.

Se seleccionaron colonias para purificación del DNA plásmido, el cual fue utilizado en un PCR para verificar la construcción del plasmido pET22bOMTA (Fig 20).

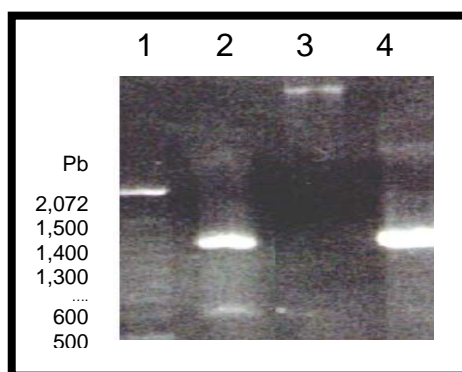


Figura 20. Confirmación de subclonación de *E. coli* BL21(DE₃) con el plásmido pET22bOMTA, mediante PCR. 1 Marcador gibco 100 pb, 2 *E. coli* con pBluescript *omt-A*, 3 *E. coli* BL21 DE3 no recombinante, 4 *E. coli* BL21(DE₃) recombinante con pET22bOMTA. Se logró amplificación de un fragmento de 1490 pb.

Se purificó mayor cantidad de plásmido pET22bOMTA, para subclonarse en células de *E. coli* de expresión BL21(DE₃) (Fig 21).

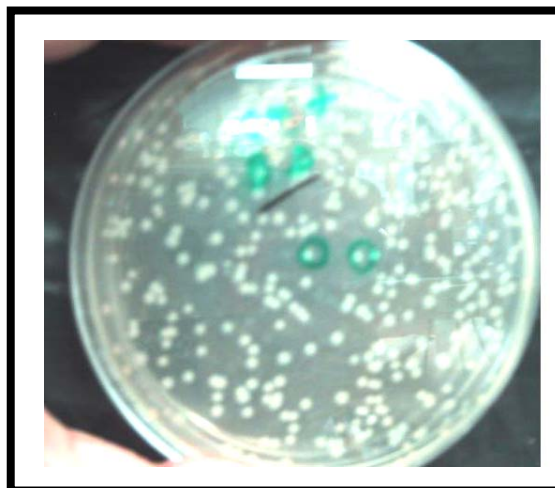


Figura 21. Colonias de *E. coli* BL21(DE₃) transformadas con el plásmido pET22bOMTA.

Se seleccionaron varias colonias de *E. coli* BL21(DE₃) para cultivarlas e inducir la producción de proteínas recombinantes mediante IPTG durante 1 a 7 h (Fig. 22)

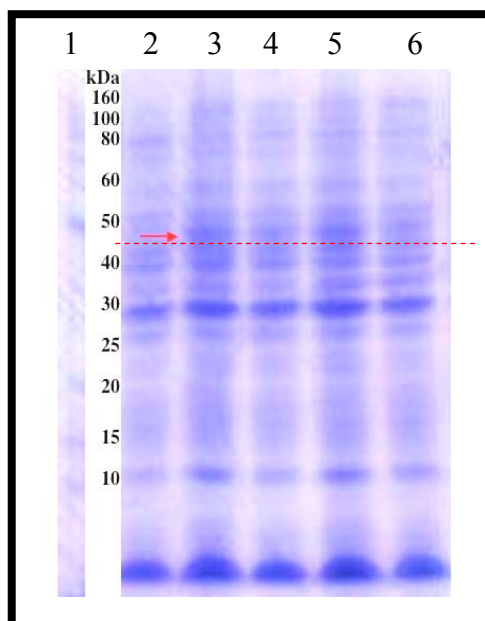


Figura 22. SDS PAGE de BL21(DE₃) pET22bOMTA. Se muestran tiempos de inducción de producción de proteínas recombinantes mediante IPTG de 2.5 y 5 h. 1. Marcador de proteínas BenchMarck. 2. BL21(DE₃) pET22b 5 h, 3. BL21(DE₃) pET22bOMTA 5 hr, 4. BL21(DE₃) pET22bOMTA 2.5 hr, 5. BL21(DE₃) pET22bOMTA 5 hr, 6. BL21(DE₃) pET22bOMTA 2.5 hr.

Se seleccionaron cepas de *E. coli* BL21(DE₃) con el plásmido pET22bOMTA mediante SDS PAGE para analizarlas mediante Western blot (Fig. 23).

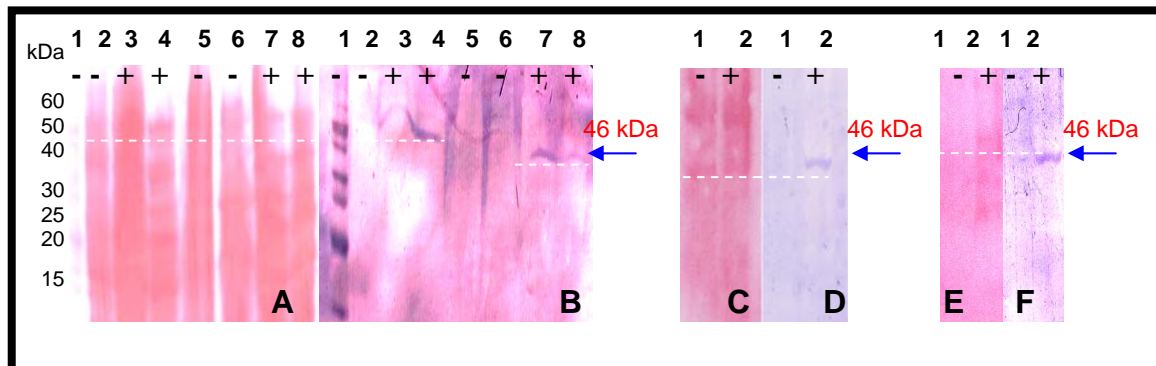


Figura 23. Western blot. Panel A. Membrana de nitrocelulosa teñida con Ponceau S, 1 Marcador Gibco 10 kDa, 2, 5 y 6 BL21(DE₃)pET22b, 3, 4, 7 y 8 BL21(DE₃)pET22bOMTA. Panel B. Western blot con anti histidinas de Panel A. Panel C Membrana teñida con Ponceau S, 1 BL21(DE₃)pET22b, 2 BL21(DE₃)pET22bOMTA. Panel D. Western blot con anti-OMTA de Panel C. Panel E. Membrana teñida con Ponceau S, 1 BL21(DE₃)pET22b, 2 BL21(DE₃)pET22bOMTA. Panel F. Western blot de Panel E.

b) Se caracterizó el plásmido pCR2.1TAORDA mediante digestiones *Hind* III, *Xba* I, *Apa* I (Fig. 24).

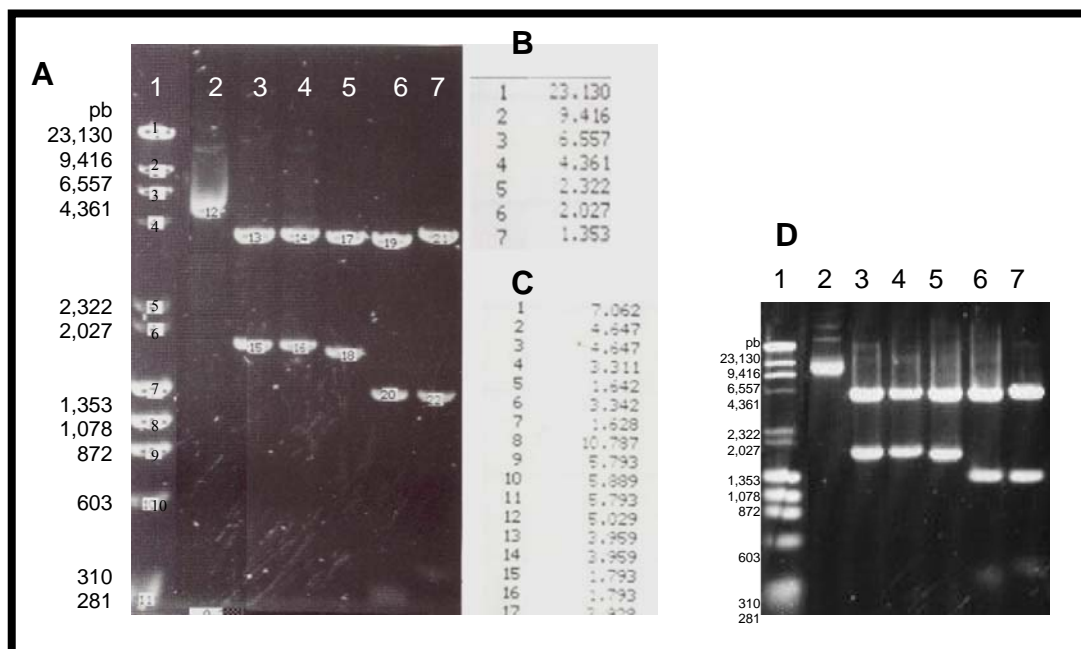


Figura 24. Caracterización del plásmido pCR2.1TAORDA. Panel A y D: 1 Marcador Marcador λ *Hind* III, X 174 *Hae* III. 2 pCR2.1TAORDA sin digerir, 3 pCR2.1TAORDA digerido con *Xba* I, 4 digerido con *Hind* III, 5 digerido con *Hind* III y *Xba* I, 6 digerido con *Apa* I, 7 digerido con *Hind* III y *Apa* I. Panel B: Talla molecular del marcador. Panel C: Talla molecular de los fragmentos.

El gen *ord-A* fue liberado del plásmido pCR2.1TAORDA mediante las enzimas de restricción *Hind* III y *Not* I, las cuales también se utilizaron en el plásmido pET30c (Fig. 25).

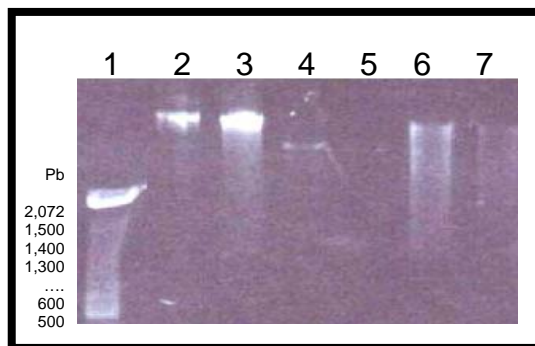


Figura 25. Plásmido pCR2.1TAORDA y pET30c digeridos. 1 Marcador Gibco 100 pb, 2 plásmido pET30c(+), 3 plásmido pCR2.1TAORDA 4 pET 30c(+) digerido con *Hind* III y *Not* I, 5 plásmido pET30c(+) digerido con *Hind* III, 6 plásmido pCR2.1TAORDA digerido con *Hind* III y *Not* I 7 plásmido pCR2.1TAORDA *ord-A* digerido con *Hind* III.

Los fragmentos digeridos del plásmido pCR2.1TAORDA y pET30c fueron purificados a partir del gel para ligarse para construir el plásmido pET30cORDA y transformar células de *E. coli* de clonación DH5 α (Fig.26).

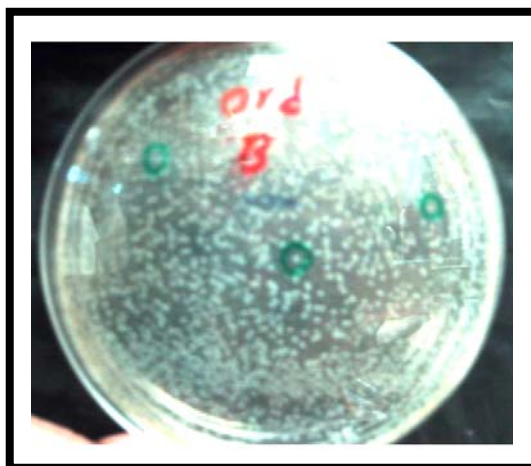


Figura 26. Colonias de *E. coli* DH5 α transformadas con el plásmido pET30cORDA.

Se seleccionaron colonias de *E. coli* DH5 α para purificación del DNA plásmido el cual se analizó en un gel de agarosa al 0.8% (Fig. 27) en busca de las que contuvieran el plásmido pET30cORDA.

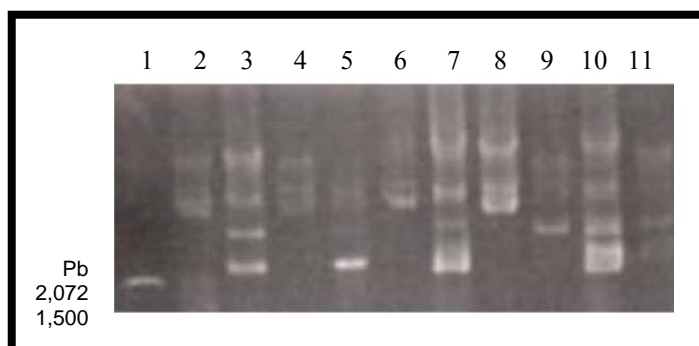


Figura 27. Purificación de DNA plásmido de *E. coli* DH5 α pET30c y *E. coli* DH5 α pET30cORDA. 1 Marcador Gibco 100 pb, 2, 4, 6, 8, *E. coli* DH5 α pET30cORDA, 3, 5, 7, 9, 10 y 11 *E. coli* DH5 α pET30c.

El DNA plásmido de las colonias de *E. coli* DH5 α seleccionadas se utilizó para amplificación del gen *ord-A* mediante PCR y así confirmar la construcción del plásmido pET30cORDA (Fig. 28).

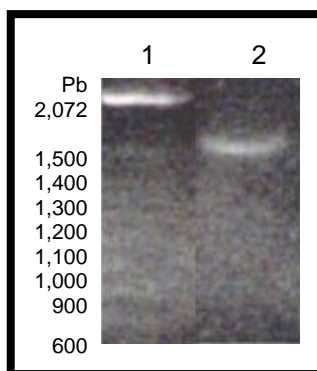


Figura 28. Confirmación de subclonación de *E. coli* DH5 α con el plásmido pET30cORDA, mediante PCR. 1 Marcador Gibco 100 pb, 2 *E. coli* DH5 α pET30cORDA.

Se purificó mayor cantidad del DNA plásmido pET30cORDA a partir de la colonia de *E. coli* DH5 α seleccionada por PCR, para transformar *E. coli* de expresión de proteínas recombinantes BL21(DE₃) (Fig. 29)

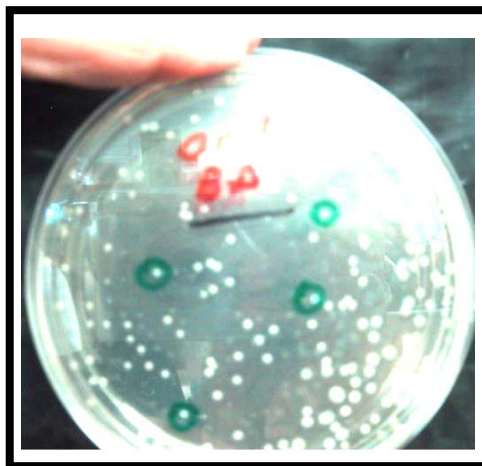


Figura 29. Colonias de *E. coli* BL21(DE₃) pET30cORDA.

Se seleccionaron colonias de *E. coli* BL21(DE₃) pET30cORDA para cultivarse e inducir la producción de proteínas recombinantes con adición de IPTG tomándose muestras de 1 a 7 h, después de la inducción (Fig. 30).

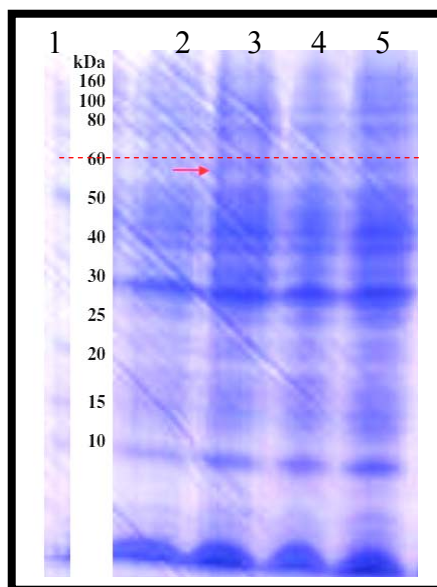


Figura 30. SDS PAGE de *E. coli* BL21(DE₃) pET30cORDA. Muestras tomadas a 2.5 y 5 h después de la inducción de producción de proteínas recombinantes mediante IPTG. 1. Marcador de proteínas BenchMarck. 2. BL21(DE₃) pET30c 5 h, 3.y 5 BL21(DE₃) pET30cORDA 5 h, 4. BL21(DE₃) pET30cORDA 2.5 h.

Se obtuvieron proteínas totales para visualizar el patrón electroforético en SDS PAGE con objeto de identificar las posibles colonias recombinantes (Fig. 31).

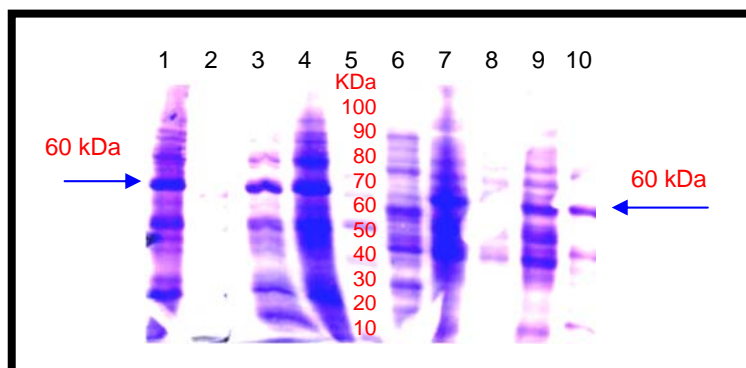


Figura 31. SDS PAGE de *E. coli* BL21(DE₃) pET30cORDA. Muestras tomadas a 2.5 y 5 h después de la inducción de producción de proteínas recombinantes mediante IPTG. 5. Marcador Gibco 10 kDa, 2 y 6 *E. coli* BL21(DE₃) pET30c, 1, 3, 4, 7, 8, 9 y 10 *E. coli* BL21(DE₃) pET30cORDA.

La expresión de producción de proteína recombinante por *E. coli* BL21(DE₃) pET30cORDA, se verificó mediante Western blot, con anticuerpos de unión a las proteína de fusión histidinas (Fig. 32).

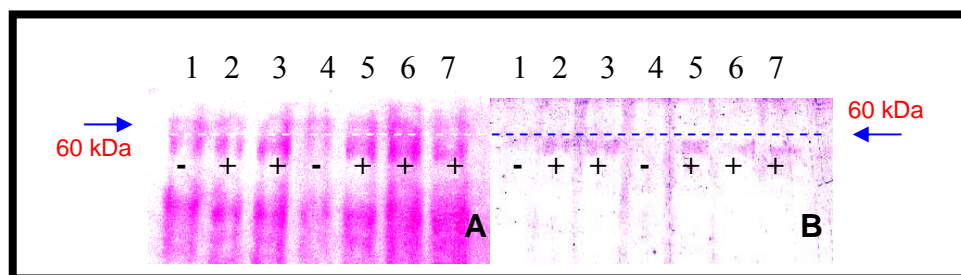


Figura 32. Confirmación de subclonación de *E. coli* BL21(DE₃) con el plásmido pET30cORDA a 5h de inducción con IPTG, mediante Western blot con anticuerpo para detección de 6 histidinas unido a la proteína recombinante como proteína de fusión. 1, 4, Colonias de *E. coli* BL21(DE₃) sin plásmido pET30cORDA, 2, 3, 5, 6, 7 Colonias de *E. coli* BL21(DE₃) con plásmido pET30Corda

DISCUSION

Las especies del género *Aspergillus* tienen una amplia distribución en el medio ambiente, sus conidios son de los más ubicuos en el aire, si éstos son inhalados por individuos inmunocompetentes, por lo general no tienen un efecto adverso, ya que son eliminados con relativa eficiencia por los mecanismos de inmunidad innata (Latgé, 1999). Sin embargo en pacientes inmunocomprometidos, puede ocasionar infecciones invasivas que en algunos casos pueden ser fatales. A nivel diagnóstico, la ausencia de sintomatología específica así como de ensayos diagnósticos rápidos que detecten estas infecciones, han constituido uno de los mayores problemas en el tratamiento de pacientes con aspergilosis. De tal manera que un reconocimiento rápido y exacto de la infección invasiva fúngica, permitirá una terapia antifúngica apropiada, clave para reducir la mortalidad asociada con esta enfermedad (Von *et al.*, 1995). Desgraciadamente, la identificación de los *Aspergillus* basándonos en métodos morfológicos requieren de un tiempo de incubación largo (5 días ó más) a fin de poder evaluar las características, tanto macro como microscópicas. En estos casos se requieren conocimientos taxonómicos del género *Aspergillus*, el cual comprende más de 130 especies, de las cuales, solo tres: *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus* y *A. terreus* provocan la mayoría de las aspergilosis invasiva (AI) (Henry *et al.*, 2000). En base a esto, se hace necesario la búsqueda de nuevas técnicas que nos permita la detección de *Aspergillus* spp a partir de muestras ambientales y clínicas (Bretagne S, *et al.*, 1995; Einsele *et al.*, 1997; Yamakami *et al.*, 1996).

Durante los últimos años se han desarrollado una gran variedad de sistemas moleculares para facilitar el análisis de genomas complejos; entre éstos destacan, los basados en la tecnología de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Este tipo de tecnologías se emplean en el mapeo genético, la selección asistida por marcadores, en la obtención de la huella genética (fingerprinting) y para investigar las relaciones genéticas. Cada sistema difiere en su principio, aplicación, tipo y cantidad de polimorfismos detectados, así como en el costo y tiempo requerido (Pecina-Quintero, 2001).

La organización de los genes de RNA ribosomal son altamente conservados dentro de la clasificación microbiológica de los hongos, y se utiliza para estudiar distancias de organismos relacionados a nivel taxonómico. Las regiones ITS son tal vez las regiones del DNA mas ampliamente secuenciadas, son variables en su composición nucleotídica y puede ser utilizadas típicamente para sistemática molecular a nivel de especies, y aún entre especies, para identificar razas geográficas, por su alto grado de variación que otras regiones genéticas del rDNA [subunidad pequeña del rDNA (SSU) y subunidad grande del RNA (LSU)], las variaciones entre repeticiones de rDNA pueden algunas veces ser observadas tanto en las regiones del espacio interno transcrito (ITS) como espacios intergenicos (IGS). Además de los iniciadores estandar ITS1 e ITS4 utilizados por la mayoría de los laboratorios, hay primers específicos de taxón descritos, los que permiten la amplificación selectiva de secuencias de hongos (Gardes y Bruns, 1993) que amplifican las secuencias ITS de basidiomicetos de muestras de minorizas.

Se han hecho estudios de relaciones evolutivas entre especies que se involucran en la producción de micotoxinas (*Aspergillus* seccion *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri*, *Fumigati* y *Clavati*) utilizando análisis filogenético de secuencias de los genes del RNAr (Varga 2003), basado en lo observado, la capacidad de producir micotoxinas de estos asilados, se perdió o se ganó, varias veces durante la evolución del genero. Estudios previos revelaron que los genes biosintéticos de algunas micotoxinas son agrupados en el genoma, permitiendo la idea de que estos agrupamientos pueden ser transferidos horizontalmente como una unidad en especies no relacionadas, permitiendo la biosíntesis de las mismas micotoxinas en hongos no relacionados filogenéticamente. Aunque no todas las cepas de hongos son capaces de producir micotoxinas y la amplificación de estas regiones no esta ligado a que tengan la capacidad de producirlas (Geisen, 1998).

Anteriormente, se realizó un estudio de digestión enzimática de las regiones ITS de los hongos *Aspergillus* sección *Flavi*: *Aspergillus flavus*, *A. orizae*, *A. parasiticus*, *A. sojae*, *A. tamarii*, y *A. nomius* (Kumeda y Asao, 1996), en donde se utilizaron varias enzimas de restricción determinándose que la *Dde* I originó un patrón electroforético característico de las especies aflatoxicas de las que no lo son, por lo que en nuestro estudio, incluimos además otras especies de *Aspergillus* spp importantes desde el punto de vista biotecnológico, clínico y alimentario, obteniéndose patrones electroforéticos diferentes para 6 de las especies de *Aspergillus* spp estudiadas (*A. flavus*, *A. terreus*, *Eurotium chevalieri*, *A. ochraceus*, *A. orizae* y *A. niger*), y tres patrones iguales para otras tres especies de *Aspergillus* spp por lo que estas no podrían diferenciarse entre ellas (*A. tamarii*, *A. sojae*, y *A. pseudotamarii*) pero si del resto anteriormente estudiados. En promedio todas las especies amplificaron una banda de 600 pb, se estudio el patrón electroforético de la digestión enzimática con *Dde* I de este fragmento mediante PAGE y se hizo un registro de tallas de bandas obtenidas, en donde, *A. tamarii*, *A. sojae*, y *A. pseudotamarii* son las especies mas relacionadas filogenéticamente y así en el orden siguiente *A. orizae*, *A niger*, *A. terreus*, *Eurotium chevalieri*, *A. flavus* y *A. ochraceus*. Habría que ampliar el estudio a mas cepas tanto de las mismas especies como de diferentes para verificación de especificidad y sensibilidad (Varga, 2003; Zhao, 2001; Binder, 2002).

El gen *ord-A* codifica para una monooxigenasa P-450 que media la conversión de OMST a AFB₁, requiere del gen *afl-R*, es decir, que el producto proteico, AFLR, regula la actividad de ORDA. El cDNA (1948 pb) del gen *ord-A* obtenido por RT-PCR fue clonado mediante el vector PCR 2.1 (pTA) en células de *E. coli* DH5 α (ver Figura 3) *ord-A* media la conversión de OMST a AFB₁ y DHOMST a AFB₂ en la biosíntesis de AF en *A. flavus* y *A. parasiticus* (Prieto *et al.*, 1997).

Mediante la biblioteca de DNA complementario (cDNA) construida de RNA aislado de *A. parasiticus* SRRC 143, se clonó un inserto de cDNA (1,460) que contiene la región codificante del gen *omt-A* que codifica para una O-metiltransferasa, la cual media la conversión de ST a OMST y DHST a DHOMST (Yu *et al.*, 1993). Estos dos genes son responsables de la actividad enzimática específica directamente involucrados en los últimos pasos de la biosíntesis de AF, y están regulados por *afl-R*, los cuales son sumamente importantes por proveer información vital para el entendimiento de biosíntesis y regulación molecular del proceso de producción de AF.

En esta investigación se subclonaron los intermediarios de la ruta biosintética de aflatoxinas previo a su biosíntesis, *omt-A* y *ord-A*, con el objeto de que en futuras investigaciones se produzcan anticuerpos contra las proteínas recombinantes OMTA y ORDA, e implementar una técnica tipo ELISA para la determinación de estos intermediarios e inferir que la ruta biosintética de AF esta activa en la muestra a analizar, esto es de suma importancia ya que se evitaría la utilización de estándares de AF en el análisis, ya que su introducción al país se dificulta, así como de todo lo que implica el uso de los métodos convencionales para su determinación, como infraestructura, solventes, y demás requerimientos, además de micólogos expertos.

CONCLUSIONES

Se extrajo el DNA de micelio vegetativo de *Aspergillus orizae*, *A. tamaraii*, *A. pseudotamaraii*, *A. sojae*, *A. níger*, *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. terreus* y *Eurotium chevalieri* y se amplificó los fragmentos ITS-PCR, los cuales presentaron un tamaño promedio de 600 pb, sin variación notoria entre las diferentes especies, que al digerirse con la enzima *Dde I*, y analizarlos electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 10% se logro la diferenciación 6 especies de *Aspergillus* spp (*A. flavus*, *A. terreus*, *Eurotium chevaliery*, *A. ochraceus*, *A. orizae* y *A. niger*) las cuales fueron a la vez diferentes a *A. sojae*, *A. pseudotamaraii* y *A. tamaraii*.

Se analizaron las secuencias de los genes *omt-A* y *ord-A* de la ruta biosintética de aflatoxinas, para diseñar por ingeniería genética los plásmidos pET22bOMTA y pET30cORDA, éstos plásmidos se subclonaron en *E. coli* DH5 α para obtener mayor cantidad de DNA plasmídico y posteriormente en *E. coli* BL21(DE₃) para expresión de proteínas recombinantes. La clonación se comprobó mediante PCR, análisis de perfiles electroforéticos mediante SDS PAGE, y Western blot con anticuerpos de unión a la proteína de fusión histidinas y mediante anticuerpos de unión a la proteína OMTA. Se logró la subclonación de los genes *omt-A* y *ord-A* en *E. coli* BL21(DE₃).

LITERATURA CITADA

- AMC. 2004. Alternative Maintenance Corporation products. 56 Carleton Avenue, Islip Terrance, NY 11752. <http://www.amc-corp.com/mycotoxins-org.htm>
- Banks WA, Niehoff ML, Brown RL, Chen Z-Y, TE Cleveland. 2002. Transport across the blood-brain barrier of an antifungal trypsin inhibitor isolated from corn. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46:2633-2635.
- Bart-Delabesse, E, Humbert JF, Delabesse E, Bretagne S. 1998. Microsatellite markers for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Clin Microbiol.* 36: 2413-2418.
- Bhatnagar D, J Yu, KC Ehrlich. 2002. Toxins of filamentous fungi. In : M Breitenbach, R Cramer, and S. Lehrer, eds. *Fungal Allergy and Pathogenicity*. *Chem Immunol.* Vol 81, Basel, Karger, pp167-206.
- Bhatnagar D, KC Ehrlich, TE Cleveland 2003. Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 61:83-93.
- Binder M and D Hibbett, 2002. Higher-Level Phylogenetic Relationships of Homobasidiomycetes (Mushroom-Forming Fungi) Inferred from four rDNA regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 22 (1) 76-90.
- Bilgrami KS, Sinha KK. 1992. Aflatoxins: their biological effects and ecological significance. pp. 59-86 in: *Mycotoxins in Ecological Systems*. Bhatnagar D et al., editores. Marcel Dekker, New York.
- Brenier-Pinchart MP, H Pelloux, B Lebeau, C Pinel, P Ambroise-Thomas, R Grillot. 1999. Towards a molecular diagnosis of invasive aspergillosis. *J Mycol Méd.* 9: 16-23
- Bretagne S, JM Costa, A MarmoratKhuong. 1995. Detection of *Aspergillus* species DNA in bronchoalveolar lavage samples by competitive PCR. *J Clin Microbiol.* 33: 1164-1168.
- Brown RL, TE Cleveland, GA Payne, CP Woloshuck, KW Campbell, DG White. 1995. Determination of Resistance to Aflatoxin Production in Maize Kernels and Detection of Fungal Colonization Using *Aspergillus flavus* Transformant Expressing *Escherichia coli*- β -Glucuronidase. *Phytopathology* 85:983-989.

- Brown DW, SP McCormick, NJ Alexander, RH Proctor AE Desjardins. 2002. Inactivation of a cytochrome P-450 is a determinant of trichothecene diversity in *Fusarium* species. *Fungal Genet Biol.* 36:224-233.
- Brown RL, D Bhatnagar, TE Cleveland. 2004a. Molecular biology for Control of Mycotoxigenic Fung. "Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications", Dilip K. Arora (ED.). New York, NY: Marcel Dekker, Inc. 69-77.
- Brown RL, Z-Y Chen, SV Gembeh, TE Cleveland, D Bhatnagar, K Howard. 2004b. Identification of natural resistance in corn against mycotoxin-producing fungi. *Res. Adv. In Food Science.* 4:85-95.
- Brown RL, Bhatnagar D, Cleveland TE, Z-Y Chen. 2004c. Molecular Biology for Control of Mycotoxigenic Fungi. *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications.* E.U.A. Pags: 69-77.
- Bucio-Villalobos CM, D Guzmán, JJ Peña. 2001. Aflatoxin Synthesis in Corn Fields in Guanajuato, Mexico. *Rev Iberoam Micol.* 18:83-87.
- Calvo AM, RA Wilson, JW Bok, y NP Keller. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66: 447-459.
- Cano J y M Soler. 2000. Epidemiología molecular aplicada a la detección de brotes de aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micol.* 17: S97-S99.
- Carrillo L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. ISBN 987-9381-19-X © Universidad Nacional de Salta
- Chang PK, Cary JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, Bennett JW, Linz J, Woloshuk CP, GA Payne. 1993. Cloning of the *Aspergillus parasiticus* *Apa-2* gene associated with the biosynthesis. *Applied and environmental microbiology* 59(10):3273-3279.
- Chen Z-Y, Brown RL, Lax AR, Guo BZ, Cleveland TE JS Russin. 1998. Resistance to *Aspergillus flavus* in corn kernels is associated with a 14 kDa protein. *Phytopathology* 88: 276-281.
- Chen Z-Y, Brown RL, Russin JS, Lax AR, TE Cleveland. 1999a. A corn trypsin

- inhibitor with antifungal activity inhibits *Aspergillus flavus* a-amylase. *Phytopathology* 89:902-907.
- Chen Z-Y, Brown, RL, Lax AR, Cleveland TE, JS Russin. 1999b. Inhibition of plant pathogenic fungi by a corn trypsin inhibitor over-expressed in *Escherichia coli*. *Applied Environ. Microbiol.* 65:1320-1324.
- Chen Z-Y, Brown RL, Cleveland TE, Damann KE, Russin JS. 2001. Comparison of Constitutive and Inducible Maize Kernel Proteins of Genotypes Resistant or Susceptible to Aflatoxin Production. *Journal of Food Protection.* 64 (11): 1785-1792.
- Chen, Z-Y., Cleveland TE, Brown RL, Bhatnagar D, Cary JW, K Rajasekaran. 2002a. Corn as a source of Antifungal Genes for Genetic Engineering of Crops for Resistance to Aflatoxin Contamination. American Chemical Society. Chapter 11. 131-150.
- Chen ZY, RL Brown, KE Damann, TE Cleveland. 2002b. Identification of Unique or Elevated Levels of Kernel Proteins in Aflatoxin Resistant Maize Genotypes Through Proteome Analysis. *Phytopathology.* 92:1084-1094
- Codex Alimentarius Commission. 2001. Comments submitted on the draft maximum level for aflatoxin M1 in milk. Codex Committee on Food Additives and Contaminants, Session 33, La Haya, Países Bajos.
- Cohen SN, Chang ACY, L Hsu. 1972. Non chromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69:2110.
- Cotty PJ, Cardwell KF. 1999. Divergence of west african and north american communities of *Aspergillus* section *Flavi*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2264-2266
- Devi QR, H Polasa. 1987. Interference in toxin production among toxigenic *Aspergillus* species. *Journal of Stored Products Research* 23: 149-150.
- Dohlman E. 2003. Mycotoxin Hazards and Regulations Impacts on Food and Animal Feed Crop Trade. Economic Research Service/USDA. International Trade and Food Safety/ AER-828. 145 pp. Chapter 6. 98-108.

URL: www.ers.usda.gov/publications/aer828/aer828h.pdf

Dongen VPWJ y Groot DANJA. 1995. History of ergot alkaloids from ergotism to ergometrine. *European journal of obstetrics, gynecology and reproductive biology*. 60: 109-116.

Duke JA, ES Ayensu. 1985. *Medicinal Plants of China* Reference Publications, Inc. ISBN 0-917256-20-4. Details of over 1,200 medicinal plants of China and brief details of their uses. Often includes an analysis, or at least a list of constituents. Heavy going if you are not into the subject.

Durán N, Lozano S, Martínez I, Deepak B, Brown RL, Reyes CA, A Morales. 2004. Proteína 14 kDa en maíz relacionada a resistencia contra *Aspergillus* spp. y producción de AF. No 62. ISBN 968-02-0069-8, 2004. Congreso Nacional de Biotecnología Agropecuaria y Forestal. Memorias de resúmenes.

Einsele H, Hebart H, G Roller. 1997. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol*. 35: 1353-1360.

Ellis W, Smith O, and BK Simpson. 1991. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organism, detection, and methods of control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 30(3): 403-439.

ENV/JM/MONO. OECD. The Organisation for Economic Co-operation and Development. Environment Directorate. 2003. Consensus Document on the Biology of *Zea mays* subsp. *mays* (Maize). Environment, Health and Safety Publications. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology. No. 27. Health and Safety Division, <http://www.oecd.org/biotrack> . 11 1-49.

Feng GH and TJ Leonard. 1998. Culture conditions control expression of the Genes for aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* and *A. nidulans*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2275-2277.

Frisvad JC and RA Samson. 1999. New producers of aflatoxin. In :RA Samson and JI Pitt, eds. *Interaction of molecular and morphological approaches to Aspergillus and Penicillium taxonomy*. Hardwood, Reading.

- Geisen R. 1998. Detection of Mycotoxin-producing Fungi. CAB International. Applications of PCR in Micology. Pp 258-266
- Goto T, Wicklow DT, and Y Ito. 1996. Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by sclerotium-producing *Aspergillus tamarii* strain. Appl Environ Microbiol 62:4036-4038.
- Henry S, FX Bosch, JC Bowers, CJ Portier, BJ Petersen y L Barraja. 1998. Safety evaluation of certain food additives and contaminants: AF. Series 40. World Health Organization, Ginebra 1998
(<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v040je16.htm>)
- Henry T, PC Iwen, SH Hinrichs. 2000. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. J Clin Microbiol. 38: 1510-1515.
- Herrman JL, R Walker. 2000. Risk analysis of mycotoxins by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.
(<http://www.fao.org/docrep/x2100t/x2100t04.htm>).
- Ito Y, SW Peterson, DT Wicklow, T Goto. 2001. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section Flavi. Mycological Res.v. 105. p. 233-239.
- Klich MA, JI Pitt. 1992. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. CSIRO Division of Food Processing, North Ryde, Australia.
- Kozakiewicz Z. 1989. *Aspergillus* species on stored products. CAB International Mycological Institute, Kew, Surrey.
- Kumeda Y y T Asao. 1996. Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacers To Differentiate Species of *Aspergillus* Section *Flavi* Applied and environmental microbiology, Aug., Vol. 62, No. 8p. 2947–2952
- Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
- Lalev AI y RN Nazar. 1999. Structural equivalence in the transcribed spacers of pre-rRNA transcripts in *Schizosaccharomyces pombe*. Oxford University Press. Nucleic Acids Research. 27:13 3071–3078.

- Latgé JP. 1999. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. Clin Microbiol Rev. 12: 310-350.
- Lillehoj BE. 1986. The Aflatoxin-in-Maize Problem: The Historical Perspective. Aflatoxin in Maize. El Batán, México: 13-32.
- Lillehoj EB. 1992. Aflatoxin: genetic mobilization agent. pp. 1-22 en: Mycotoxins in Ecological Systems. Bhatnagar D et al., editores. Marcel Dekker, New York.
- Lozano S. 2000. Influencia de extractos de Agavaceas sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus* LINK ex. FRIES y *Aspergillus parasiticus* SPEARE.. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas.
- Marr JS, CD Malloy. 1996. An epidemiologic analysis of the ten plagues of Egypt. Caduceus. 12:7-24.
- Morales LA, Durán NM, Lozano S, Martínez IO, Alvarado JS, Álvarez G, Bhatnagar D, Brown RL, Reyes CA, RE Preciado. 2004. Proteína 14 kDa en maíz relacionada a resistencia contra *Aspergillus* spp. y producción de AF. Congreso de Inocuidad Alimentaria. No.110.
- Moss MO. 1991. The environmental factors controlling mycotoxin formation. pp. 37-56 en: Mycotoxins and Animal Foods. Smith JE, Henderson RS, editores. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- NOM-188-SSA1-2002. Norma Oficial Mexicana. Publicado en el Diario Oficial de la Federación el 15 de octubre de 2002.
- Novas MV, D Cabral. 2002. Association of mycotoxin and sclerotia production with compatibility groups in *Aspergillus flavus*. Plant Disease 86: 215-219.
- Payne GA and MP Brown. 1998. Genetics and Physiology of aflatoxin biosynthesis. Annu Rev Phytopathol. 36:329-362.
- Pecina V, Martínez O, Alvarado MJ, Vandemark GJ, H Williams. 2001. Comparación de dos sistemas de marcadores moleculares en el análisis de las relaciones genéticas de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Revista Mexicana de Fitopatología. 19 (2) 129-139.
- Peraica M, Radic B, Lucic A, M Pavlovic. 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. Bull World Health Organ. 77:754-766.

- Prieto, R and CP Woloshuk. 1997. *ord-1*, an oxidoreductase Gene responsible for conversion of O-methylsterigmatocystin to aflatoxin in *Aspergillus flavus*. Appl. Environ. Microbiol. 63(5):1661-1666.
- Reddy GL, Reddy SM. 1992. Production of roridin by *Myrothecium roridium* in mixed culture. Indian Journal of Microbiolofgy 31: 281-284.
- Recce K, T Bittner, S Raza, D Walton, M Healy, K Shah. 2003. *Aspergillus* peciation and strain discrimination; a comparison between automated rep-PCR-based profiling and 28s rDNA sequencing. www.bacterialbarcodes.com
- Reyes M C A y M A Cantú A. 2004a. H-437, H-439 y H-440: nuevos híbridos trilineales de maíz de grano blanco para el noreste de México y regiones similares. Día del agricultor 2004. INIFAP-CIRNE. Campo Experimental Rio Bravo. Publicación Especial No 28. Mayo.
- Reyes MCA y MA Cantú. 2004b. H-440, híbrido de maíz tolerante a sequía para el noreste de México. memoria de resúmenes del xx congreso nacional de fitogenética. toluca, edo de méxico. pag. 162.
- Reyes MCA y MA Cantú. 2004c. H-437, Híbrido de maíz para el noreste de México. Rev. Fitotec. Mex.
- Reyes MCA y MA Cantú. 2005a. Comportamiento de los híbridos H-437 y H-440 en el ciclo primavera-verano 2004. Día del agricultor 2005. INIFAP-CIRNE. campo experimental Río Bravo. publicación especial no 29. junio.
- Reyes MCA y MA Cantú. 2005b. H-439, nuevo híbrido trilineal de maíz para areas de riego en el subtropico de mexico. revista fitotecnia. vol 31, no 1.
- Robens JF. 1993. Aflatoxin Elimination Workshop. Little Rock, Arkansas.
- Rodríguez-del Bosque, LA Reyes, AC Acosta. 1992. Aflatoxin in Corn in Northeastern México: Effect of Enviromental and Cultural Practices.
- Rosas AG. 2001. Actividad de extractos de *Agave americana* sobre el crecimiento, conidiogénesis y expresión del gen regulador de la biosíntesis de AF de *Aspergillus parasiticus*. Universidad Autonoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas.
- SAGARPA. 2002. Ficha tecnológica por sistema producto maíz.1. H-437 Nuevo híbrido de maíz para sembrarse todo el año en el noreste de México

- Schmidt O y U Moreth. 2002. Data bank rDNA-ITS sequences from building-rot fungi for their identification. *Wood Science and Technology* 36:429-433.
- Schoental R. 1984. Mycotoxins and the Bible. *Perspect Biol Med* 28:117-120.
- Scott J y N Straus. 2000. A review of current methods in DNA fingerprinting. pp. 209-224 en: *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification*. Samson RA, Pitt JI, editores. Harwood Academic Publishers, Australia.
- Selim MI, WJ Popendorf y AM Juchems 2002. Levels and distribution of aflatoxin B1 in grain dust. NASD.
<http://www.cdc.gov/nasd/docs/d001301-d001400/d001376.html>
- Selitrennikoff, CP. 2001. Antifungal Proteins. *Applied and Environmental Microbiology*. 2883-2894.
- Taylor JW, Geiser DM, Burt A, Koufopanou V. 1999. The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. *Clin Microbiol Rev*. 12: 126-146.
- Turenne CY, SE Sanche, DJ Hoban, JA Karlowsky, AM Kabani. 1999. Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system. *J Clin Microbiol*; 37: 1846-1851.
- Varga J, Rigo K, Toth B, Teren J, Z Kozakiewicz. 2003. Evolutionary Relationships among *Aspergillus* Species Producing Economically Important Mycotoxins. *Food. Technol. Biotechnol.* 41 (1) 29-36.
- Voetz M and F Rath. 2002. Identification and quantification of ochratoxin synthesizing fungi on cereals using real time PCR. p. 22. Abstracts. American Society of Brewing Chemists, Annual Meeting, Tucson, AZ.
- Von Eiff M, N Roos, R Schulten, M Hesse, M Zuhlsdorf, JV Loo. 1995. Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival. *Respiration*. 62:341-34715.
- Withe, T.J, T Bruns, S Lee and JW Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: *PCR Protocols: A guide to methods and applications*, eds. Innis, M.A. D.H Gelfand, J.J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York.

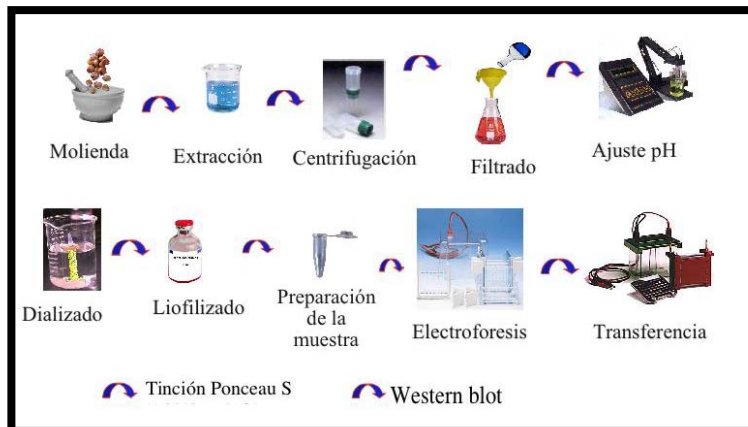
- Widstrom NW. 1992. Aflatoxin in developing maize: interactions among involved biota and pertinent economic factors. pp. 23-58 en: *Mycotoxins in Ecological Systems*. Bhatnagar D, Lillehoj EB, Arora DK, editores. Marcel Dekker, New York.
- Wyatt RD. 1991. Poultry. pp. 553-605 en: *Mycotoxins and Animal Foods*. Smith JE, Henderson RS, editores. CRC Press, Boca Ratón, Florida
- Yamakami Y, Hashimoto A, Tokimatsu I, M Nasu. 1996. PCR detection of DNA specific for *Aspergillus* species in serum of patients with invasive aspergillosis. *JClin Microbiol*. 34: 2464-2468.
- Yu, J, Cary JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, Keller NP, FS Chu. 1993. "Cloning and characterization of a cDNA from *Aspergillus parasiticus* encoding an O-methyltransferase involved in aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* 59(11):3564-3571.
- Yu J, Ghatnagar D, TE Cleveland. 2002a. *Aspergillus flavus* genomics for elimination of aflatoxin contamination. *Mycopathologia (Special Issue)*. 155:6
- Yu J, Bhatnagar D, KC Ehrlich. 2002b. Aflatoxin biosynthesis. *Rev. Iberoam Micol*. 19:191-200.
- Yu J, Proctor RH, Brown DW, Abe K, Gomi K, Machida M, Hasegawa F, Nierman WC, Bhatnagar D, TE Cleveland. 2004a. Genomics of Economically significant *Aspergillus* and *Fusarium* Species. *Applied Mycology & Biotechnology. Fungal Genomics*. 4: 249-283.
- Yu J, Chang P-K, Ehrlich KC, Cary JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, Payne GA, Linz JE, Woloshuk ChP, JW Bennett. 2004b. Minireview. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol*. 70 (3) 1253-1262.
- Yu J, Chang P-K, Ehrlich CE, Cary JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, Payne GA, Linz JE, Woloshuk ChP, JW Bennet. 2004c. Cluster pathway genes in Aflatoxin Biosynthesis. *Appl Environ Microbiol*. 70:1253-1262.
- Zhao J, Kong F, Li R, Wang X, Wan Z, D Wang. 2001. Identification of *Aspergillus fumigatus* and Related Species by Nested PCR Targeting Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Regions. *Journal of Clinical Microbiology*. 39 (6) 2261-2266.
- Zuber MS, EB Lillehoj, BL Renfro, eds. 1987. *Aflatoxin in Maize: A proceedings of the workshop*. CIMMYT, Mexico, D.F.

APENDICE A

Determinación de la proteína inhibidora de tripsina de 14 kDa en variedades maíz de México mediante Western Blot

La contaminación de maíz por *A. flavus* y *A. parasiticus* y su contaminación por AF son problemas crónicos reconocidos por su potencial daño a la salud humana y animal por asociarse al cáncer de hígado (Ellis *et al.*, 1991). El maíz está expuesto a estos hongos en los diferentes procesos a los que está sujeto como lo son precosecha, cosecha, almacenamiento, manejo, distribución y consumo. Las plantas son expuestas a una gran cantidad de patógenos, pero estas no tienen sistema inmune, por lo que las plantas tienen varios mecanismos de defensa, incluyendo la síntesis de compuestos de bajo peso molecular, proteínas y péptidos que tienen actividad antifúngica (Selitrennikoff, 2001). En vez del sistema inmune de las plantas tienen mecanismos de defensa activos o pasivos, o almacén estratégicamente ubicado de compuestos antimicrobianos que funcionan para prevenir la colonización en el tejido de las plantas (Chen *et al.*, 2001). En vías de intensificar su resistencia como hospedero al *Aspergillus* spp., el mejoramiento genético natural de maíz ha permitido desarrollar líneas resistentes a estos hongos, en donde se han detectado diferencias en las proteínas totales del grano de maíz resistente del susceptible a ataque por hongos *Aspergillus* spp. y su consecuente producción de AF en el grano. La presencia de una proteína inhibidora de tripsina de 14 kDa (IT-14kDa) se ha correlacionado con resistencia de varios genotipos de maíz (Chen *et al.*, 1998, 1999a, 1999b.), incluso esta proteína es purificada del maíz y utilizada para fines terapéuticos (Bank *et al.*, 2002). La resistencia en maíz a producción de AF es directamente relacionado a la resistencia a la colonización de hongos en ciertos genotipos (Brown *et al.*, 1995). La estrategia más efectiva para el control de la contaminación por maíz en alimentos para humanos y animales es reducir o eliminar el proceso de iniciación de la producción de AF (Zúber *et al.*, 1987; Brown *et al.*, 2004a). En Estados Unidos se purificó la proteína inhibidora de tripsina de 14 kDa aislada de granos de maíz resistente del genotipo GT-MAS:gK y se produjo anticuerpos. La proteína inhibidora de tripsina de 14 kDa, presente en el maíz ocasiona cambios morfológicos de la hifa y ruptura del conidio en *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, and *Fusarium moniliforme* (Brown, *et al.*, 2004b; Chen, *et al.*, 2001, 2002). Por tanto, este estudio de la proteína inhibidora de tripsina en maíz de México es de gran importancia.

Material y método



Germoplasma: Líneas de maíz del Noreste de México T-38, T-41, T-42, LRB-16, LRB-18, LRB-137, LRB-10, LRB-14; híbridos de cruza simples: LRB-16xLRB-18, H-435, H-436; híbridos cruza trilineales: H-437, H-439, H-440; polinización libre: VS-409, CPSRC3; VS-454, VS-440, de Iguala Guerrero ciclos C4, C5, C6, obtenidos de población Amplia Base Genética (PABG) y del Bajío Mexicano (H-347, SB302).

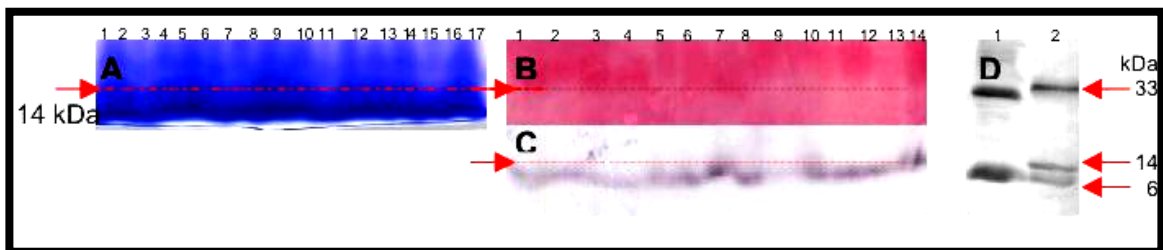
Extracción de proteínas totales de maíz: 10 g de maíz seco pulverizado se extrajo con 20 ml de amortiguador de fosfato-citrato pH 2.8 (84 mM ácido cítrico, 30 mM Na₂HPO₄) y 14 mM βmercaptoetanol, 6 mM ácido ascórbico, a 4°C, en agitación 200 rpm/1h. Se centrifugó a 3,000 rpm/20 min a 4°C, el sobrenadante se filtró (papel Whatman No 4) y ajustó a pH 7. Se dializó por 12 h (Pierce, 10,000 MWCO) y después se liofilizó. Se resuspendió en 1 ml de H₂O y un volumen igual de amortiguador de muestra pH 6.8 (2% SDS, 5% βmercaptoetanol, 0.002% azul de bromofenol, 0.0625 mM Tris-HCl, 10% glicerol).

Electroforesis de proteínas totales: El gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 15% se realizó por duplicado de los extractos proteicos, uno para tinción con azul Coomassie R-250, acorde a Laemmli (Laemmli, 1970) y otro para transferir a membrana de nitrocelulosa, y teñirse con Ponceau S para visualización de las proteínas transferidas, antes de realizar el Western blot. La electroforesis se llevó a cabo a 100V/2h. Se utilizó un marcador Bench Mark TM (*Invitrogen*).

Inmunodetección de la proteína de 14 kDa: La membrana de nitrocelulosa se bloqueó con 10 mL de solución TBS-TWEEN-leche descremada durante toda la noche o 2 h (2-5% leche descremada, 1X PBS, 0.05% Tween-20, pH 7.4). Se lavo 3 veces con solución de enjuague por un tiempo de 10 min. cada uno (1X PBS, 0.05% de Tween-20, pH 7.4). Posteriormente se agregó el primer anticuerpo anti-IT diluido 1:1500 en 1X PBS-Tween-20 0.05% pH 7.4. (anticuerpo anti-inhibidor de tripsina de 14 kDa obtenida del extracto proteico del maíz GT:MASK, donado por el Dr. Ziwan Chen, de Louisiana State University). Se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche o 2 horas. Se lavó la membrana por 10 min, 2 veces con TBS-Tween 0.05% y una vez con TBS, posteriormente se incubó por 3 h con 5mL del conjugado IgG anti ratón marcado con peroxidasa en una solución de 1:10000 en TBS. Se lavó la membrana por 10 min, 2 veces con TBS-Tween 0.05% y una vez con TBS. Se añadió solución reveladora diaminobenzidina 0.05% como sustrato (pastilla NBT/BCIP para fosfatasa alcalina disuelta en 10 mL H₂O (Sigma)) hasta que apareció las bandas en un tiempo aproximado de 10 a 30 min.

Resultados y Discusión. La infección por hongos es una causa de pérdidas económicas en todo el mundo (Robens,1993). Además, *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* producen una toxina altamente carcinogénica (AF) que pueden causar el rechazo de los cultivos y sus subproductos por regulación preventiva en su venta en todo el mundo. Esto resulta en pérdidas económicas (Dohlman, 2003), hay otros tipos de presión como de ecologistas y del medio ambiente, aun y el desarrollo de funguicidas seguros y mas eficientes por lo cual se exigen la implementación en métodos de control para la prevención de la infección de los cultivos por hongos. En esta investigación, se utilizó

un método para medir la resistencia del maíz, a la invasión por hongos basado en el descubrimiento de una única, proteína antifúngica inhibidora de tripsina de 14 kDa (IT-14kDa) la cual ocurre en algunos maíces pero no en otros (Chen *et al.*, 1998). La transferencia y la aplicación de este tipo de tecnología a México ayuda a identificar algunos maíces con altas concentraciones de la proteína IT-14kDa, la cual tiene potente actividad antifúngica contra *A. flavus* y *A. parasiticus* (Chen *et al.*, 1999) y así mismo, utilizándola en la protección de cultivos como parte integral de un paquete tecnológico para su control. La proteína IT-14kDa puede también ser utilizada para otras aplicaciones (alimentos, medicina) (Banks *et al.*, 2002). Se utilizaron análisis de SDS-PAGE y Western blot para examinar 23 variedades y líneas de maíz de México, para identificar la proteína de IT-14kDa, del noreste de México, del Bajío mexicano y de Iguala Guerrero. Los resultados de este estudio fueron basados solo en análisis cualitativos, descriptivos. En el análisis de SDS-PAGE y de Western blot por ejemplo el mostrado en la siguiente figura, indicaron que las 23 variedades y líneas de maíz expresaron la proteína de IT-14 kDa. El Western blot reveló que la variedad de maíz H-437 mostró presencia de la proteína IT-14kDa como monómero (14kDa), y como dímero. La proteína de peso molecular de 33kDa en la fracción de el control positivo de la proteína IT de 14kDa, es un dímero de IT (Chen, *et al* 1999), también la proteína IT-14kDa puede ser fraccionada, en el método de extracción, en otras proteínas de 6 y 2 kDa (Chen *et al.*, 1998). Los extractos de proteínas totales obtenidas del maíz de México tienen reacción en el análisis de Western blot con el anticuerpo obtenido de el purificado nativo del inhibidor de tripsina de maíz GT-MASK: gk de USDA ARS de 14 kDa y reacción cruzada con el dímero de 33kDa y con las fracciones de la proteína IT de 6 y 2 kDa.



Extracto proteico de variedades de maíz (50 µl). **Panel A:** SDS-PAGE (15%), carril 1: BenchMarck (15 µl), 2: C+ IT-14 kDa (7µl), 3: LRB-16xLRB-18, 4: LRB-16, 5: VS-409, 6: H-437, 7: LRB-10, 8: H-439, 9: L-14, 10: T-38, 11: LRB-12, 12: H-438, 13:H-440, 14:T-41, 15:H-435, 16:LRB-137, 17:Marcador BenchMarck. **Panel B.** SDS-PAGE (15%) transferido a membrana de nitrocelulosa y teñido con ponceu S 1: LRB-137, 2: H-435, 3: T-41, 4: H-440, 5: T-42, 6: T-38, 7: LRB-14, 8: H-439, 9: LRB-10, 10: H-437, 11: VS-409, 12: LRB-16, 13:LRB-16xLRB-18, 14:H-436. **Panel C:** Western blot de panel B, con anticuerpo contra la proteína IT-14 kDa. **Panel D.** Western blot con anti IT-14kDa en papel de nitrocelulosa. carril 1: H-437, 2: Control + proteína IT-14kDa.

Los expresión de proteínas en granos de maíz implicadas en la resistencia o susceptibilidad a infección por *A. flavus* y producción de AF, incluyen el estudio de la proteína IT-14kDa, la cual se a observado en altos niveles en el endospermo de las líneas de maíz resistente, pero en bajos niveles o ausente en las líneas de maíz susceptible, dicha proteína a demostrado fuerte bioactividad *in vitro* contra *A. flavus* y otros patógenos, además, de tener actividad lítica contra la pared celular del hongo, así como inhibir la actividad α -amilasa de *A. flavus*.

Existen diferencias en las proteínas de grano de maíz resistente y susceptible a contaminación por AF, por ejemplo las variedades de maíz susceptible Va35, G4666, P3165, de USDA ARS, variedades de maíz medio susceptible B73, y variedades de maíz resistente Mp420, Mp313E, T115, GT-MAS:gk de USDA ARS, y ejemplos de las proteínas que se han encontrado relacionadas con la susceptibilidad o resistencia de maíz a la producción de AF por *A. flavus* son globulinas (GLBs), proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEAs), proteínas que se inducen por el estrés hídrico (WSI), aldosa reductasa (ALD), y proteínas del estrés térmico (HSP) (Chen *et al.*, 2002b). Los materiales de maíz encontrados que expresan la proteína se sugiere ser utilizados como progenitores para conferir este carácter o característica a las nuevas variedades de maíz en México.

El híbrido H-435 esta formado por las líneas T-38 Y T42 y el H-436 por las líneas T-41 Y T-42. El híbrido H-437 lo forman las líneas H-436 y LRB-10. El híbrido H439 esta formado por H-435 y LRB-14. Así como H-440 esta formado por LRB-137 y LRB-16x LRB-18. Cuando algún progenitor mantiene la característica de expresar la IT-14kDa, el híbrido que forma también mantiene esta característica, este es el caso de H-435, H-436, H-437, H-439 y H-440. Esta característica podría ser controlada genéticamente. Probablemente los maíces de lugares cálidos que son expuestos a temperaturas altas y a sequía han tenido algún tipo de selección y por eso muestran esta característica. La tolerancia a AF se relaciona a la expresión de la proteína IT-14 kDa la cual puede buscarse en maíces que son resistentes a sequía y temperaturas altas o que son resistentes a condiciones adversas. El siguiente paso en este estudio sería buscar cual de estas líneas con niveles de expresión de la proteína IT, es resistente a la infección por *A. flavus* y la producción de AF utilizando el Kernel Screening Assay (Brown 2004b). Esto podría aclarar la relación entre la expresión de IT y la resistencia a las líneas examinadas y permitir una identificación rápida de la resistencia en germoplasma de maíz, que podría ser utilizado en la agricultura o en programas de mejoramiento genético. En este trabajo se identificó la expresión de la proteína de 14 kDa mediante Western blot, en líneas y variedades de maíz de México.

Conclusión

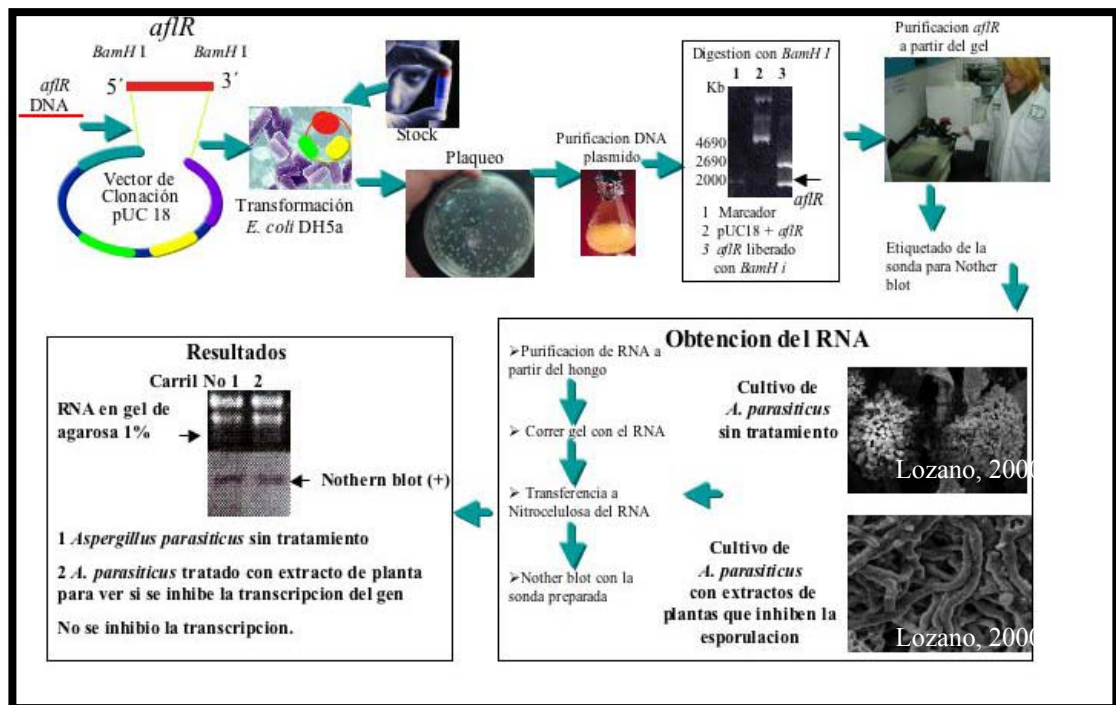
Se encontraron variedades de maíces de México que presentan la característica de expresar la proteína de IT-14 kDa asociada a resistencia al ataque por *Aspergillus* spp.

APENDICE B

Implementación de una sonda tipo Northern del gen regulador de biosíntesis de aflatoxinas en *Aspergillus spp afl-R*

La ruta biosintética de la producción de AF involucra varios pasos enzimáticos, los factores de regulación de síntesis de AF son componentes genéticos, en donde en el agrupamiento de genes de AF, hay un gen de regulación positiva, *afl-R*, localizado en el medio de el agrupamiento de genes para activar la transcripción genética de la vía, el cual codifica para una secuencia específica de proteína de unión al DNA (zinc), que ha mostrado ser requerida para la activación transcripcional, de si no de todos de la mayoría de los genes estructurales (Yu *et al.*, 2004). Se preparó una sonda tipo Northern para detección de la expresión del gen *afl-R* de *Aspergillus parasiticus*, con fines de detectar su expresión en cultivos del hongo.

Material y método



Cepas utilizadas: *Aspergillus parasiticus* 148, *E. coli* DH5α. Plásmido pUC 18 con el gen *aflR*.

Preparación de células frescas calcio competentes de DH5α. Se produjeron células competentes con un rendimiento de 5×10^6 colonias transformadas de un cultivo de *E. coli* DH5α se sembró en cultivo en placa con medio LB agar, y se incubó a 37°C 12 hr. Del cual se selecciono una colonia con un picadientes estéril, de 16 h a 37°C, y se transfirió a 100 ml de medio LB en un matras de 1000 ml, y se incubó a 37°C 300 ciclos/min, procurando no pasar de 1×10^8 células/ml. Se transfirió el cultivo a 2 tubos de 50 ml asépticamente helados, se enfrió por 10 min, para parar el crecimiento celular. Se centrifugó 4,000 rpm 10 min 4°C. Se decantó, y se mantuvo en posición invertida 1 min.

Se resuspendió el pellet celular en 40 ml de 0.1M CaCl₂ frío y se incubó en hielo por 20 min. Se centrifugó 4,000 rpm 10 min 4°C. Se decantó, y se mantuvo en posición invertida 1 min. Se resuspendió cada pellet en 2 ml de 0.1M CaCl₂ y se alicuotó en tubos de 1.5 ml con volúmenes de 50 µl y se dejó reposar 1 hr y se procedió a la transformación de las células de *E.coli* DH5α con el plásmido pUC18 *afl-R*.

Subclonación del plásmido pUC18 *aflR* en cepa de *E.coli* DH5α. Se colocaron las células calcio competentes en hielo y se agregó 2 µl del DNA plásmido pUC18 *afl-R*. Se mezcló e incubó en hielo 30 min. Se calentó el tubo a 42°C por 90 seg y se incubó en hielo 2 min. Se agregó 800 µl de medio SOC y se incubó 1 hr a 37°C. Se vació a placas con medio LB agar y ampicilina. Se seleccionaron colonias para purificación del DNA plásmido pUC18 *afl-R*, para su posterior purificación.

Purificación de DNA plásmido de pUC18 *aflR*: Se utilizó el kit de BIO 101 el cual se basa en el método de lisis alcalina para la purificación del DNA plásmido.

Digestión del plásmido pUC18 *aflR*: Se tomaron 48 µl de plásmido purificado por lisis alcalina y se le agregó 1 µl de enzima *Bam* HI, 7 µl de amortiguador React III y 14 µl de agua miliQ estéril y se incubó a 37 °C toda la noche. Se corrió un gel al 1% de agarosa en TBE 0.5 X para observar la digestión de pUC18 *afl-R* con *Bam* HI tomando 5 µl de marcador de 50 a 2000 kb, 5 µl de digerido y 5 µl sin digerir, para observar el fragmento de 1900 pb y proceder a cortar el gel para su purificación mediante el kit QIAEX II, obteniéndose el DNA en 20 µl de agua. Y se procedió a marcar la sonda con digoxigenina-dUTP con el kit Genius 6.

Extracto acuoso de *A. americana*: Se licuaron 20 gr de planta en 100 ml de agua, dejando reposar a 4°C, concentrándose en rotavapor, deshidratándose a 60°C y se disolvió a 10mg/ml (Lozano 2000).

Extracción de RNA: Se pesó 0.001 g de micelio, triturándose con nitrógeno líquido y mortero, hasta obtener un polvo fino. Para la extracción de RNA se utilizó el kit Rneasy Plant Mini de Quiagen.

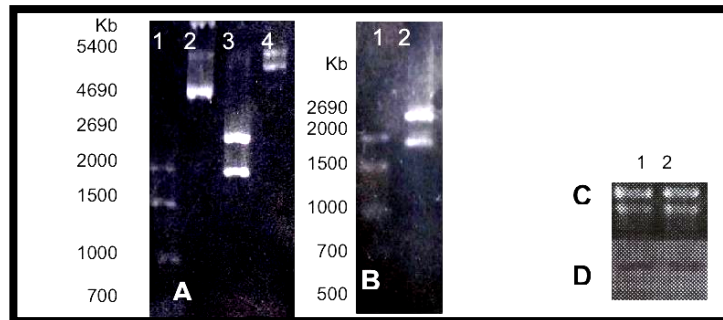
Gel agarosa-formaldehído: Se preparó un gel con agarosa al 1% con agua tratada con dietileno-pirocarbonato (DEPC), adicionando 5 ml de MOPS 10X y 1.5 ml de formaldehído 37%.

Preparación de la muestra: Cada muestra de RNA (1 a 10 µg) se preparó con 2.5 µl de MOPS 10X, 4.4 µl de formaldehído 37% y 12.5 µl de formamida, incubándose a 55°C por 15 min. Se centrifugó 12000 rpm por 10 min y se adicionó al precipitado el amortiguador marcador de RNA (1 mM de EDTA pH 8.0, azul de bromofenol 0.25% y glicerol al 50%).

Transferencia del RNA del gel a nitrocelulosa. El gel se sumergió en NaOH 50 mM por 30 min en agitación, se enjuagó con agua destilada y se adicionó el amortiguador de neutralización Tris 0.5 M NaCl 1.5 M a pH 7.5 por 30 min y se colocó en N - lauril - sarcosina 10X y se procedió a transferir a membrana de nitrocelulosa.

Northern blot: Se trató la membrana con 10 ml de solución de hibridación y se mantuvo en agitación por 30 min a 42°C, y se adicióno la sonda preparada del gen *aflR*, y se incubó en estas condiciones durante la noche. Una vez fijada la sonda, se removió la solución de hibridación y se realizaron dos lavados con solución SSC 2X + SDS 0.1% a temperatura ambiente con agitación. Después se lavo con 25 ml de solución SSC 0.5% + SDS 0.1% a 68°C, 5 min con agitación. Se lavó 1 min con solución de lavado poshibridación (0.1 M Ácido maléico, 0.15 M NaCl, Tween 20 al 3% v/v a pH 7.5). Se lavo por 45 min con solución de bloqueo de sitios inespecíficos con amortiguador 1:10 (0.1 M ácido maléico, 0.15 M NaCl pH 7.5). Y posteriormente con solución de anticuerpos anti-DIG-fosfatasa diluida 1:5000 en (0.1 M ácido maléico, 0.15 M NaCl pH 7.5) durante 30 min. Se realizaron dos lavados de 15 min en 100 ml (0.1 M Ácido maléico, 0.15 M NaCl, Tween 20 al 3% v/v a pH 7.5). Se realizó un ultimo lavado con solución de detección (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 9.5). Se disolvió 80 µl de NBT/BCIP en 20 ml de solución de detección (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 9.5) y se incubo la membrana 12 h a temperatura ambiente en oscuridad para revelar la señal de la sonda tipo Norther blot.

Resultados y discusión: Se utilizó el plásmido pUC18 *afl-R* para transformar células calcio competentes de *E. coli* DH5α, utilizadas para producir mayor cantidad de plásmido pUC18 *afl-R*, el cual se purifico a partir del pastilla celular de *E. coli* DH5α, para digerirlo con la enzima *Bam* HI y liberar el gen *afl-R* panel A y B, y proceder al marcaje de la sonda del gen *afl-R* con digo-oxigenina empleando el kit Genius 6 y para utilizarse en el análisis de Northern blot (panel D) con el RNA obtenido a partir de crecimiento fúngico de *Aspergillus* (panel C).



Purificación del gen *aflR*, subclonación en *E. coli* DH5α, purificación de RNA de *Aspergillus parasiticus* y Northern blot para detección del gen *aflR*. Panel A: gel de agarosa al 1%. carril 1: marcador Gibco 100 pb, 2: plásmido pUC18 *aflR*, 3: plásmido pUC18 *aflR* digerido con *Bam* HI, 4: pET22b. Panel B: gel de agarosa al 1%. carril 1: marcador Gibco 100 pb, 2: pUC18 + *aflR* digerido con *Bam* HI. Panel C: gel de agarosa al 1%, extracción de RNA, carril 1: *Aspergillus parasiticus*, 2: *A. parasiticus* con extracto acuoso de *A. americana* que inhibe la esporulación. Panel D: membrana de nitrocelulosa, análisis de hibridación tipo Northern, carril 1: *A. parasiticus*, 2: *A. parasiticus* con extracto acuoso de *A. americana* que inhibe la esporulación.

El análisis de hibridación tipo Northern indicó que la transcripción del gen *afl-R* se llevó a cabo en *Aspergillus parasiticus* cultivado con y sin con extracto acuoso de *A. americana* que inhibe la esporulación

Conclusión: Se logró implementar una sonda tipo Northern para determinar la trascipción del gen *afl-R* en *A. parasiticus* cultivado con y sin extracto acuoso de *A. americana* que inhibe la esporulación.

RESUMEN CURRICULAR

Susana Lozano Muñiz

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Biotecnología

Tesis: RECURSOS ALTERNATIVOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Aspergillus* spp. Y LA DETERMINACIÓN DE SU POTENCIALIDAD EN LA PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS.

Campo de Estudio: Ciencia de la Salud

Datos Personales: Nacido en Monterrey Nuevo León el 18 de Noviembre de 1971, hijo de Rosendo Lozano Quezada y Maria del Pilar Muñiz Salcedo.

Educación:

Egresado del Instituto Tecnológico Regional de Culiacán Sinaloa Grado obtenido, Ingeniero Bioquímico con especialidad en alimentos.

Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Grado obtenido,

Maestro en Ciencias con especialidad en microbiología.

Experiencia Profesional:

Analista Químico, Productos Chata S.A. de C. V., Departamento de Control de Calidad y de Investigación y Desarrollo. Actividades Desarrolladas: Análisis fisicoquímico, Análisis microbiológico, Análisis sensorial, Inspector de calidad, Determinación de perfiles de transferencia de calor en autoclaves industriales, Elaboración del primer manual de buenas practicas de laboratorio de control de calidad y de investigación y desarrollo para certificación del USDA.

Analista Químico, Comité para el Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Nuevo León, Departamento de Residuos Tóxicos y Contaminantes. Actividad Desarrollada: Análisis microbiológico de patógenos de alimentos por la norma oficial mexicana y del USDA.

PUBLICACIONES



**LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE
MICROBIOLOGÍA Y LA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

Hacen constar que el (los):

*Susana Lozano Muñiz, Alberto Morales Laredo, Santos García
Alvarado, Irma O. Martínez Vázquez, Deepak Bhatnagar*

Presentaron el trabajo libre

**Desarrollo de una prueba diagnóstica para la determinación de la
contaminación de aflatoxinas basada en serología de intermediarios de
la ruta biosintética de aflatoxinas**

**En el marco del XXXIII
Congreso Nacional de Microbiología**
Monterrey Nuevo León, 7-10 de Abril de 2002



Dra. Enedina Jiménez Cardoso
Presidenta de la AMM y Presidenta del XXXIII
Congreso Nacional de Microbiología



Dra. Patricia Tamez Guerra
Presidenta local del XXXIII
Congreso Nacional de Microbiología



**IV CONGRESO
LATINOAMERICANO
DE
MICOLOGÍA**



ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE MICOLOGÍA

EL COMITÉ ORGANIZADOR ENTREGA LA PRESENTE

CONSTANCIA
a Susana Lozano

POR LA PRESENTACIÓN DEL TRABAJO

*“Purificación de omt-A y ord-1 intermediarios de la ruta biosintética
de aflatoxinas de Aspergillus flavus y A. parasiticus a partir de cepas de Escherichia
coli, recombinantes obtenidas por subclonación de los genes omt-A y ord-1”
En su modalidad de CARTEL*

DEL 13 AL 17 DE MAYO DE 2002
XALAPA, VERACRUZ, MÉXICO



DR. GANTÓN GUZMÁN
PRESIDENTE DE LA ALM



DR. GERARDO MATA
VICEPRESIDENTE DE LA ALM



SECT
INSTITUTO DE
ECOLOGÍA, A.C.
SNP - CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología


UANL


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN □ FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

otorga a:

Alberto Morales Loredo, Nubia M. Durán Manríquez, Susana Lozano Muñiz,
Irma O. Martínez Vázquez, José S. Alvarado García, Genoveva Álvarez
Ojeda, Deepak Bhatnagar, Robert L. Brown, Cesar A. Reyes
y Ricardo E. Preciado Ortiz

la presente

Constancia

Por su participación en la modalidad de presentación CARTEL con el título:
**"PROTEÍNA 14 kDa EN MAÍZ RELACIONADA A RESISTENCIA CONTRA
Aspergillus spp. Y PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS"**

En el Congreso Internacional de Inocuidad Alimentaria 2004,
llevado a cabo del 20 al 22 de Octubre del 2004.

"Alere Flammam Veritatis"

Ciudad Universitaria, Octubre de 2004


 Dr. José Santos García A.
 Director de Facultad


 Dra. Norma Heredia Rojas
 Coordinador


 Congreso de Inocuidad Alimentaria
2004




**ASOCIACIÓN NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA
AGROPECUARIA Y FORESTAL (ANABAF)**


OTORGA LA PRESENTE

Constancia

A: Nubia Melisa Durán Manríquez, Susana Lozano Muñiz, Irma O. Martínez Vázquez, Robert L. Brown, Cesar A. Reyes, Alberto Morales Loredo, José S. Alvarado García, Genoveva Álvarez Ojeda, Ricardo E. Preciado Ortiz, Zhiyuan Chen y Deepak Bhatnagar

Por haber presentado el cartel **PROTEÍNA 14 kDa EN MAÍZ RELACIONADA A RESISTENCIA CONTRA *Aspergillus* spp. Y PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS** durante el V Congreso Nacional de Biotecnología Agropecuaria y Forestal celebrado en Chapingo México del 24 al 27 de agosto de 2004


 Dr. José Luis Rodríguez De La O
 PRESIDENTE

Por la ANABAF


 Dr. Héctor González Rosas
 SECRETARIO





Alberto Morales Loreda¹, Nubia M. Durán Manríquez², Susana Lozano Muñoz², Irma O. Martínez Vázquez², José S. Alvarado García², Genoveva Alvarez Ojeda¹, Cesar A. Reyes¹, Ricardo E. Preciado Ortiz¹, Robert L. Brown³, Zhiyuan Chen³, Deepak Bhatnagar³.

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, ²Universidad Autónoma de Nuevo León, ³USDA ARS SRRC, Apdo. P. 129 - F, Unidad de Investigación y Desarrollo en Biología Celular y Molecular INIFAP-UANL, Cd. Universitaria San Nicolás de los Garza, N.L. C.P. 66450. morales.alberto@inifap.gob.mx

SUMMARY.

This study was to identify a 14-kDa trypsin inhibitor corn protein that confers resistance to the attack by *Aspergillus* spp. Corn kernels of northeast and Bajío of Mexico were analyzed, 2 expressed 14 kDa protein in high level, 10 in medium level, 8 in low level and 2 were absent.

INTRODUCCIÓN.

En México el maíz constituye el alimento fundamental de la población y este país es uno de los principales productores a nivel mundial (1). Se producen anualmente 10.2 millones de toneladas para consumo humano y 5 millones para consumo animal (2). Las condiciones del medio ambiente (sequía) y prácticas agronómicas, son favorables para la síntesis de aflatoxinas en campo (3). Se han encontrado diferentes componentes del grano asociados a resistencia a la contaminación por aflatoxinas (4). En programas de mejoramiento genético de alta calidad proteica y resistencia a sequía, es posible inferir indirectamente, con biomarcadores la resistencia a la contaminación por aflatoxinas. La proteína 14 kDa, inhibidora de tripsina (IT-14kDa) presente en el maíz esta relacionada con cambios morfológicos de la hifa y ruptura del conidio en *Aspergillus* (5). La identificación de la proteína IT-14kDa en maíces de México, nos permitirá inferir su resistencia al ataque por *Aspergillus* spp. El propósito de este estudio fue identificar la proteína IT-14kDa en variedades y líneas de maíces del Noreste y Bajío Mexicano, mediante inmunodetección.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Germoplasma.

Del Noreste de México: T-38, T-41, L-42, L-16', L-18', L-137, LRB-10', L-14, 16x18, T-38 x T-42, H-436, H-437, H-438, 363x137, VS-409'. Del Bajío Mexicano: C5, C6, VS440, H347, CPR33, VS454, SB302. Se utilizó como control la proteína de 14 kDa inhibidora de tripsina obtenida del extracto proteico del maíz Opaque-2, amablemente donada por el Dr. R. L. Brown, SRRC, USDA-ARS (5). () = Maíz resistente a sequía.



Extracción de proteínas:

10 g de maíz seco pulverizado se extrajo con 20 ml de amortiguador de fosfato-citrato pH=2.8 (84 mM ácido cítrico, 30 mM Na₂HPO₄) y 14 mM 2-mercaptoetanol, 6 mM ácido ascórbico, a 4 °C, en agitación 200 rpm/1h. Se centrifugó a 3,000 rpm/20 min a 4 °C, el sobrenadante se filtró (papel Whatman No 4) y ajustó a pH 7. Se dializó por 12 h (Pierce, 10,000 MWCO) y después se liofilizó. Se resuspendió en 1 ml de H₂O y un volumen igual de amortiguador de muestra pH 6.8 (2% SDS, 5% β-mercaptoetanol, 0.002% azul de bromofenol, 0.0625 mM Tris-HCl, 10% glicerol).

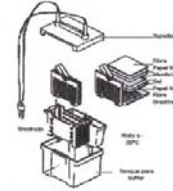


Electroforesis:

El gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 15% se realizó por duplicado de los extractos proteicos, se corrió a 100V/2h. Se utilizó un marcador Bench Mark™ (Invitrogen). Un gel se utilizó para tinte con azul Coomassie R-250 y otro para transferir a membrana de nitrocelulosa.



Preparación del sándwich de transferencia



Transferencia de proteínas en membrana de nitrocelulosa.



Western blot (Wb):

Solución bloqueadora: 5% leche descremada, 1X PBS, 0.05% Tween-20, pH 7.4. Anticuerpo primario: anticuerpo anti-inhibidor de tripsina 14 kDa (IT) obtenido del extracto proteico del maíz Opaque-2, donado por el Dr. R. L. Brown, SRRC, USDA-ARS, dilución 1:1500 en 1X PBS-Tween-20 0.05% pH 7.4. Anticuerpo secundario (anti IgG conjugado a fosfatasa alcalina a una dilución 1:10000. Solución reveladora: pastilla NBT/BCIP para fosfatasa alcalina disuelta en 10 ml H₂O (Sigma).

Figuras y Tablas

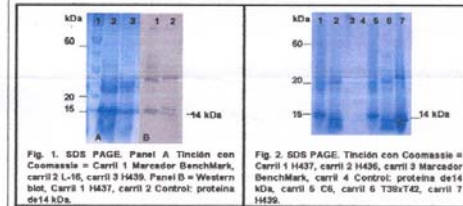


Fig. 1. SDS PAGE. Panel A Tinción con Coomassie = Carril 1 Mercador BenchMark, carril 2 L-16, carril 3 H439. Panel B = Western blot. Carril 1 H437, carril 2 Control: proteína de 14 kDa.

Nivel	Señal en Western blot		
	Ato	Medio	Ausente
Variedades/			
Total	2/22	10/22	6/22

Tabla 1. Detección de la expresión de IT-14

RESULTADOS Y DISCUSION.

Por análisis en gel y por Wb (Figura 1), se presentó un alto nivel de expresión de la proteína de 14 kDa en las variedades C6, VS454. Medio en L16', L14, H437, H347, CPR33, 363 x 137, LRB-10', 16x18, H-438, VS-409'. Bajo en SB302, L18', VS440, C5, T-38, T-41, L-42, L-137. Ausente en T38xT42, H-436 (Tabla 1). En la extracción se ajustó a pH 7 para evitar degradación. La diálisis incrementó la definición de bandas en el gel. Los análisis de extracto proteico de maíz seco de las 22 variedades, revelaron en Wb algunas diferencias en el patrón electroforético. Las variedades resistentes a sequía se ubicaron en su mayoría en el nivel medio de expresión de la proteína de 14 kDa.

CONCLUSION.

Se encontraron maíces del Noreste y Bajío Mexicano que presentan la característica de expresar la proteína de IT-14 kDa asociada a resistencia al ataque por *Aspergillus* spp.

BIBLIOGRAFÍA.

- 1.- <http://www.monografias.com/trabajos/almalz/almalz>
- 2.- Robledo M. y cols. 2001. Rev. Iberoam Micol. 18: 141-144
- 3.- Bucio-Villalobos C, D. y cols. 2001. Rev. Iberoam. Micol. 18:83-87.
- 4.- Huang Z, y cols. 1997. Phytopathology. 18(6):622-627.
- 5.- Chan, Z.Y., R. L. Brown, A. R. Jax, B. Z. Guo, T. E. Cleveland and J. S. Russin. 1998. Phytopathology 88:276-281
- 6.- <http://mexico.udg.mx/coeina/maiz/Utiliza-maiz.html>
- 7.- <http://www.fotositio.net/Agropecuaria/espanol/maiz.htm>

24/Octubre/2005

Estimados autores y coautores de los Resúmenes In Extenso.

Estos son los 140 resúmenes aceptados para presentarse en el XXX Congreso Nacional de Genética Humana del 16 al 19 de noviembre en la ciudad de Monterrey.

La modalidad en cartel esta numerado, lo cual significa que será el sitio de mampara que le corresponderá colocar el cartel. La modalidad de los trabajos en Oral están señalados al final en celda color amarillo.

Nota: Los resúmenes aquí presentes fueron enviados al Dr. Ricardo M. Cerda Flores a su correo electrónico ricardocerda_mx@yahoo.com.mx como se estipuló en la segunda circular de la AMGH y en la página Web de la AMGH.

Favor de difundir estos resultados a otros autores de resúmenes.

Gracias

Atte.

HBS

Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña
Presidente de la AMGH

[Signature]

Dr. Ricardo M. Cerda Flores
Secretario

114	DM04	Lopez-Jimenez	VARIABILIDAD CLINICA DE LA HEMOFILIA POR LA PRESENCIA DE FACTOR V (Liden), PROTROMBINA (20210A) y MTHFR (C67T)	José de Jesús López-Jiménez, Claudia Patricia Boltrán-Miranda, Johanna Mariella Capacho, Ana Rebeca Jaloma-Cruz
115	DM05	Lozano-Muniz	IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE ASPERGILLUS SPP MEDIANTE EL ANÁLISIS DE rDNA	Susana Lozano-Muñiz, Irma O. Martínez-Vasquez, Alberto Morales-Loredo, Santos García-Alvarado M. Maecena-Perez, Ma. Paloma Arroyo, Fernando Diaz, Lur Ma. González H.



Identificación de especies de *Aspergillus* spp mediante el análisis de rDNA

Susana Lozano Muñiz¹, Alberto Morales Loredo², Irma O. Martínez Vasquez¹, Santos García Alvarado¹
¹Facultad de Ciencias Biológicas, UANL - ²INIFAP, Cd. Universitaria, A1-223, Apdo. 128-F, C.P. 66450.
E-mail: almorales@fcb.uanl.mx



INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de hongos dañinos a la salud humana y animal, por contaminar alimentos como maíz, cacahuete, leche y sus derivados. Por ser tóxicos y extremadamente carcinogénicos, estos metabolitos afectan la economía agrícola y la inocuidad alimentaria, además de ocasionar daños severos a la salud humana y animal. La aflatoxinas (AF) son producidas por especies de *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. tamarii* y *A. ochraceoseus*. En el género de *Aspergillus*, hay especies muy cercanas a las productoras de AF como las especies no aflatoxigénicas *A. fumigatus* que es un patógeno, *A. oryzae* y *A. niger* son usadas en la producción de enzimas, péptidos y otros compuestos orgánicos, y *A. sojae* es usado en la fermentación de salsa de soja (Yu, et al 2004). Las especies del género *Aspergillus* presentan una gran diversidad y variabilidad en la naturaleza. Su clasificación y/o identificación tradicional está basada principalmente en las características morfológicas. Los estudios comparativos de secuencias de nucleótidos de genes de DNA ribosomal (rDNA) pueden ser utilizados para análisis de relaciones filogenéticas y/o identificación de especie o subespecie de hongos (Kumeda and Asao, 1996, Schmidt, 2002). En esta investigación se utilizaron análisis de restricción de regiones de rDNA, incluyendo las regiones ITS1-5.8-ITS2, con fin de elucidar relaciones filogenéticas para identificación de algunas especies de *Aspergillus*.

OBJETIVO

Diferenciar las especies de *Aspergillus* spp. mediante digestión enzimática de amplificaciones de secuencias de transcripción intergénicas

HIPOTESIS

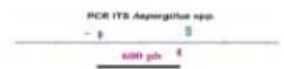
Mediante amplificación de PCR ITS y su digestión es posible diferenciar especies de *Aspergillus* spp.



Electroforesis de extracción de DNA



Gel de agarosa al 0.8 % con 3 µl de extracción de DNA mediante CTAB de *Aspergillus* spp. Carril 1: *A. tamarii*, carril 2: *A. pseudotamarii*, carril 3: *A. ochraceus*, carril 4: *A. niger*, carril 5: *A. fumigatus*.

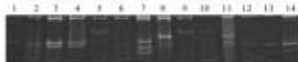


PCR-ITS1 5'-caaggtttcctgaggtg-3'
PCR-ITS4 5'-agctttgctgctgcm-3'
Tm: 50 °C



Gel de agarosa al 1.2% con 3 µl de amplificación de las regiones intergénicas de aproximadamente 600 pb de *Aspergillus* spp. Carril 1: Marcador Bioline 100pb, 2: *A. oryzae*, 3: *A. Asmarii*, 4: *A. pseudotamarii*, 5: *A. niger*, 6: *A. niger*, 7: *A. flavus*, 8: *A. ochraceus*, 9: *A. terreus*, 10: *A. chrysivertii*, 11: *A. pseudotamarii*, 12: *A. flavus*, 13: *A. niger*, 14: *A. flavus*, 15: *A. oryzae*, 16: *A. Asmarii*, 17: *A. niger*, 18: *A. niger*, 19: *A. niger*, 20: *A. chrysivertii*, 21: *A. flavus*, 22: *A. oryzae*, 23: Marcador Bioline 100pb.

DIGESTIÓN DE PCR-ITS CON ENZIMA DdeI



10 µl de poliacrilamida al 10% con 10 µl de producto de PCR-ITS de *Aspergillus* spp. ligados con la enzima DdeI. Carril 1: Marcador Bioline 100pb, 2: *A. oryzae*, 3: *A. Asmarii*, 4: *A. pseudotamarii*, 5: *A. niger*, 6: *A. flavus*, 7: *A. ochraceus*, 8: *A. niger*, 9: *A. niger*, 10: *A. niger*, 11: *A. chrysivertii*, 12: *A. pseudotamarii*, 13: *A. flavus*, 14: *A. niger*, 15: *A. oryzae*, 16: *A. Asmarii*, 17: *A. niger*, 18: *A. niger*, 19: *A. niger*, 20: *A. chrysivertii*, 21: *A. flavus*, 22: *A. oryzae*, 23: Marcador Bioline 100pb.

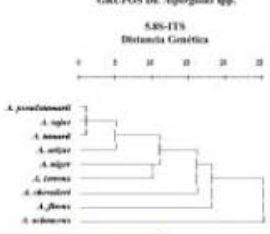
METODOLOGIA



RESULTS

En el análisis filogenético *A. sojae*, *A. tamarii* y *A. pseudotamarii*, son las tres especies de *Aspergillus* más cercanas filogenéticamente a diferencia de las demás, que después de estos dos se agrupan en el siguiente orden: *A. oryzae*, *A. niger* formando un grupo con *A. sojae*, *A. tamarii* y *A. pseudotamarii*, luego estos 5 en conjunto con *A. flavus* y *A. chrysivertii* y finalmente todos se agrupan junto con *A. ochraceus*, la especie más alejada filogenéticamente. El dendograma se basa en el coeficiente de similitud genética determinada por la presencia o ausencia de los fragmentos de DNA originado por la enzima de restricción Dde I de las regiones ITS.

DENDOGRAMA ANALISIS DE GRUPOS DE Aspergillus spp.



CONCLUSIONES

Se obtuvieron productos de ITS-PCR, los cuales presentaron un tamaño promedio de 600 pb, sin variación notoria entre las diferentes especies. Al digerirse los PCR-ITS con la enzima Dde I, y analizarlos electroforéticamente en gels de poliacrilamida al 10 % se logra obtener patrones electroforéticos con los que se puede diferenciar 7 especies de *Aspergillus* spp.

PERSPECTIVAS

Análisis más especies de *Aspergillus* spp.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto CONACYT 29130 B y beca No. 113533



LITERATURA

Kumeda and Asao, 1996, Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacers To Differentiate Species of *Aspergillus* Section *Floer*. Applied and environmental microbiology, Aug., Vol. 62, No. 8p. 2947-2952.

Lozano S. 2000. Influencia de extractos de *Agave* sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus* Link ex. Fies y *A. parasiticus* Speer. Tesis Maestría. UANL, FCB.

Schmidt O and U. Moorth. 2002. Data bank rDNA-ITS sequences from building-rot fungi for their identification. Wood Science and Technology 36:429-433.


Yu J, R. H. Proctor, D. W. Brown, K. Abe, K. Gomi, M. Machida, F. Hasegawa, W. C. Nierman, D. Bhatnagar and T. E. Cleveland, 2004. Genomics of Economically significant *Aspergillus* and *Fusarium* Species. Applied Mycology &


ASOCIACIÓN MEXICANA DE GENÉTICA HUMANA, A. C.


XXX CONGRESO NACIONAL DE GENÉTICA HUMANA
 Monterrey, Nuevo León, México

Del 16 al 19 de
 Noviembre de 2005

"Impacto del Conocimiento del Genoma Humano en la Sociedad"



DM05. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *ASPERGILLUS* SPP MEDIANTE EL ANÁLISIS DE RDNA

Susana Lozano-Muñiz¹, Irma O. Martínez-Vasquez², Alberto Morales-Loredo³, Santos García-Alvarado⁴, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL-INIFAP, Cd. Universitaria, E-mail: almorales@fcb.uanl.mx

Palabras clave: *Aspergillus flavus*, *affinis*, *flavus*, *fungi*

Introducción. Las micotoxinas son metabolitos secundarios de hongos que son dañinos para la salud humana y animal, por contaminar alimentos como maíz, cacahuate, leche y sus derivados y afectar con ello la economía agrícola y de inocuidad de alimentos para consumo humano o animales, ocasionando daños severos al hígado y la salud, por ser tóxicos y extremadamente carcinogénicos. La aflatoxinas (AF) son producidas por especies de *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. niger* y *A. ochraceus*. En el género de *Aspergillus*, hay especies muy cercanas a las productoras de AF como las especies no aflatoxigénicas *A. fumigatus* que es un patógeno, *A. oryzae* y *A. niger* son usadas en la producción de enzimas, péptidos y otros compuestos orgánicos, y *A. niger* es usado en la fermentación de salsa de soja, industria global de billones de dólares (Yu, et al 2004). Las especies del género *Aspergillus* presentan una gran diversidad y variabilidad en la naturaleza. Su clasificación y/o identificación tradicional está sujeta principalmente en las características morfológicas. Estudios comparativos de secuencias de nucleótidos de genes de RNA ribosomal (rRNA) pueden ser utilizados para análisis de relaciones filogenéticas y/o identificación de especie o subespecie de hongos (Kameda and Arai, 1996, Schmidt, 2002). En esta investigación se utilizaron análisis de restricción de regiones de rDNA, incluyendo las regiones ITS1, 5.8-ITS2, con fin de elucidar relaciones filogenéticas para identificación de especies de algunos géneros de *Aspergillus* spp.

Materiales. Se utilizaron cepas de *Aspergillus oryzae* NRRL 149, *Aspergillus niger* NRRL 2038, *Aspergillus nidulans* NRRL 25517, *Aspergillus niger* NRRL 5997, *Aspergillus niger* SKRC 61, *Aspergillus flavus* 1273, *Aspergillus ochraceus* MC 228, *Aspergillus terreus* MC111966, *Aspergillus chevalieri* NRRL 78 obtenida de USDA ARS NCAUR y de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Métodos. El DNA se obtuvo por el método CTAB de cepas de *Aspergillus* spp. y se amplificó por PCR-ITS 1'-3' (incubadores reportados por Lalev and Nazari, 1999). Los productos de PCR se digirieron con la enzima DdeI. Las digestiones enzimáticas se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%.

Resultados. Se obtuvieron patrones electroforéticos diferentes para cada especie de *Aspergillus* spp respectivamente, como indica la fig 1 y el cuadro 1.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

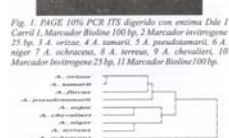


Fig. 1. PAGE 10% PCR ITS digerido con enzima DdeI. 1. Marcador Biotinico 100bp, 2. Marcador Investigador 25 bp, 3. *A. oryzae*, 4. *A. niger*, 5. *A. nidulans*, 6. *A. niger*, 7. *A. ochraceus*, 8. *A. terreus*, 9. *A. chevalieri*, 10. Marcador Investigador 25bp, 11. Marcador Biotinico 100bp.



Fig. 2. Análisis de grupos. Dendrograma usando medidas de similitud entre grupos Cuadro 1. Tamaño de fragmentos de DNA obtenidos en el gel de poliacrilamida al 10% de la digestión con enzima DdeI, de los fragmentos amplificadas por PCR-ITS.

Especie	Tamaño
<i>A. oryzae</i>	100/100/100
<i>A. niger</i>	100/100
<i>A. nidulans</i>	100/100/100
<i>A. niger</i>	100/100
<i>A. terreus</i>	100/100
<i>A. ochraceus</i>	100/100/100
<i>A. oryzae</i>	100/100
<i>A. chevalieri</i>	100/100

Conclusiones. Se pudo diferenciar especies de *Aspergillus* spp. Nueve en total, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus chevalieri*.

Agradecimientos. Proyecto 201306 CONACYT y beca 113535.

Bibliografía. Yu, et al 2004. Genomics of economically significant *Aspergillus* and *Fusarium* species. Applied Microbiology and Biotechnology: Fungal Genomics, 4: 4. *Environ Science*, 249: 203.

2. Kameda Y and T. Arai 1996. Single-strand conformation polymorphism analysis of PCR amplified ribosomal DNA internal transcribed spacer in different species of *Aspergillus* Section *Flocc*. Appl. Environ. Microbiol 62:1204-1212.

3. Schmidt O and U. Month. 2002. Data bank of DNA-ITS sequences for building an fungal key for identification. World Science and Technology 31: 429-431.

4. Lalev A., and R. Nazari. 1999. Standard approaches in the molecular species of pea rDNA transcripts in *Delphinium* flavescens group. Russian Acad. Research, 17(1):1071-1078.


ASOCIACIÓN MEXICANA DE GENÉTICA HUMANA, A. C.


Otorga la presente
CONSTANCIA
 a
Susana Lozano-Muñiz, Irma O. Martínez-Vasquez, Alberto Morales-Loredo, Santos García-Alvarado

Por la presentación de su trabajo
IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *ASPERGILLUS* SPP MEDIANTE EL ANÁLISIS DE RDNA



XXX CONGRESO NACIONAL DE GENÉTICA HUMANA
MONTERREY, N.L. 16 AL 19 DE NOVIEMBRE DE 2005


 Dr. Hugo A. Barrera Saldana
 Presidente


 Dr. Ricardo M. Cerda Flores
 Secretario


 Dr. Augusto Rojas Martínez
 Tesorero





