

DIFERENCIACIÓN DE GRUPOS DE ESPECIES DEL GÉNERO *Alternaria* MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

DIFFERENTIATION OF *Alternaria* SPECIES-GROUPS BY POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Miguel Ángel Pavón Moreno, Rosario Martín de Santos y Teresa García Lacarra

Dpto. Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos Fac. Veterinaria. Univ.
Complutense. Madrid

RESUMEN

Se ha desarrollado una técnica de PCR múltiple para la diferenciación de grupos de especies del género *Alternaria*. Para ello se han diseñado cebadores que amplifican un fragmento del gen *Alt a 1* a partir del ADN de las especies de *Alternaria* pertenecientes a un grupo determinado y no producen amplificación a partir del ADN de especies de otros grupos de *Alternaria* ni de otros organismos analizados. La introducción de un tercer cebador en la reacción de PCR múltiple permite amplificar una banda común a todas las especies de *Alternaria* analizadas, además del fragmento específico de cada grupo.

Palabras clave: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), *Alternaria* spp., *Alt a 1*

ABSTRACT

A polymerase chain reaction (PCR) method, based on oligonucleotide primers targeting the *Alt a 1* gene, has been developed for the specific identification of several species-groups within the genus *Alternaria*. The introduction of a third oligonucleotide in the multiplex PCR allows amplification of a common DNA fragment in all *Alternaria* species, besides the specific fragment of each group.

Key words: multiplex polymerase chain reaction (PCR), *Alternaria* spp., *Alt a 1*

INTRODUCCIÓN

Alternaria es un género fúngico muy común y ampliamente distribuido en el suelo, la materia orgánica en descomposición y el polvo doméstico. Incluye numerosas especies que pueden invadir los cultivos vegetales antes y después de la recolección. Asimismo, es responsable de considerables pérdidas económicas en el sector agrícola, debido a que reduce el rendimiento de las cosechas y produce alteraciones en los vegetales durante su

almacenamiento. Muchas especies del género *Alternaria* producen micotoxinas, aunque solo se ha demostrado la producción natural en los alimentos y piensos del ácido tenuazónico (TeA), alternariol (AOH), éter metil alternariol (AME), altenueno (ALT) y altertoxina-I (ATX-I), y más raramente de toxinas AAL. La clasificación de las especies de *Alternaria* es compleja, sin embargo diferentes estudios filogenéticos (Chou y Wu, 2002; Hong *et al.*, 2005) agrupan las especies de *Alternaria* en cuatro grupos principales:

1) El grupo de *A. alternata* engloba las principales especies del género (*A. alternata*, *A. arborescens*, *A. tenuísima*, *A. gaisen*, *A. citri* y *A. longipes*) productoras de micotoxinas como AOH, AME, TeA y ATX-I (Andersen *et al.*, 2001, 2002), por lo que su identificación en las materias primas vegetales y productos transformados reviste especial interés.

2) El grupo de *A. porri* incluye especies como *A. solani*, *A. porri*, *A. dauci* y *A. tomatophila* con esporas grandes, causante de pérdidas económicas importantes en agricultura por su carácter fitopatógeno. Algunas de estas especies producen además micotoxinas como AOH, ATX y altersolanol (Andersen *et al.*, 2008).

3) El grupo de *A. infectoria* se aísla con frecuencia de cereales y está implicada en infecciones humanas.

4) El grupo de *A. radicina* comprende especies patógenas de cultivos de umbelíferas como la zanahoria.

A. alternata es una de las especies fúngicas más frecuentemente implicadas en la podredumbre de las frutas y hortalizas y produce la mayoría de las micotoxinas descritas en este género. Por ello, su detección en productos elaborados (zumos, purés, salsas, conservas, etc.) indica la utilización de materias primas deterioradas y constituye un marcador indirecto de la posible presencia de metabolitos tóxicos. En consecuencia, disponer de técnicas rápidas y específicas para la detección y enumeración de las formas viables y no viables de las especies de *Alternaria* permitiría a las industrias elaboradoras establecer un control adecuado de sus proveedores, mejorar la trazabilidad de estos productos y eliminar de los canales de comercialización los lotes que puedan representar un peligro para la salud del consumidor.

En este trabajo se ha desarrollado una técnica de PCR múltiple para la detección e identificación de los diferentes grupos de especies del género *Alternaria*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Selección y obtención de cepas fúngicas.

Se seleccionaron trece cepas de *Alternaria* spp. productoras de micotoxinas, correspondientes a 11 especies de este género (colección de cepas fúngicas *Centraalbureau*

voor *Schimmelcultures*, CBS, Holanda). Asimismo, se adquirieron cepas fúngicas pertenecientes a varios géneros y especies en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia) y la colección de cepas fúngicas, Mycothèque de l'Université catholique de Louvain, (BCCM/MUCL, Louvain-la-Neuve, Bélgica). Las cepas seleccionadas (Tabla 1) se cultivaron en Agar Patata Dextrosa (PDA) y en Agar Extracto de Malta (MEA) a 25 °C durante 7 días.

Tabla 1. Cepas fúngicas utilizadas en este trabajo.

Especie	Cepa
<i>Alternaria alternata</i>	CBS 154.31 CBS 117130 CBS 117143
<i>A. arborescens</i>	CBS 109730
<i>A. citri</i>	CBS 192.81
<i>A. dauci</i>	CBS 101592
<i>A. gaisen</i>	CBS 632.93
<i>A. infectoria</i>	CBS 210.86
<i>A. longipes</i>	CBS 917.96
<i>A. porri</i>	CBS 109.41
<i>A. radicina var. radicina</i>	CBS 245.67
<i>A. solani</i>	CBS 347.79
<i>A. tenuissima</i>	CBS 880.95
<i>Aspergillus ochraceus</i>	MUCL 14207
<i>Fusarium oxysporum</i>	CECT 2866
<i>Penicillium expansum</i>	CECT 2278
<i>Rizopus stolonifer</i>	CECT 2344

Extracción del ADN.

La extracción del ADN fúngico a partir de cultivos puros y de alimentos se realizó según el método descrito por Marek *et al.* (2003), basado en la lisis celular seguida de la extracción del ADN mediante fenol:cloroformo:isoamilalcohol. La concentración y calidad del ADN obtenido se determinó espectrofotométricamente y su integridad se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Diseño de cebadores y amplificación por PCR.

El gen *Alt a 1* codifica el principal alérgeno de *Alternaria alternata* (Alt a 1) y se han descrito secuencias homólogas de este gen en otras especies del género (Hong *et al.*, 2005). Por ello, en este trabajo se seleccionó para el diseño de cebadores específicos de cada uno de los grupos de *Alternaria* seleccionados. Mediante la alineación y análisis informático de las secuencias del gen *Alt a 1* disponibles en la base de datos GenBank se diseñaron las siguientes

parejas de cebadores: AALTDIRALTA1/AALTINV2ALTA1 que delimitan un fragmento de 93 pb en las especies del grupo de *Alternaria alternata*; AINFDIRALTA1/AINFINVALTA1 para la amplificación de un fragmento de 118 pb en el ADN de *A. infectoria*; ASOLDIRALTA1/ASOLINVALTA1 que amplifican un fragmento de 118 pb exclusivamente a partir del ADN de las especies del grupo de *A. porri* y ARADIR2ALTA1/ASOLINVALTA1 que delimitan un fragmento de 131 pb en el ADN de *A. radicina*.

La especificidad de las parejas de cebadores diseñadas se determinó mediante el análisis del ADN extraído a partir de once especies del género *Alternaria* y de diversas especies de hongos, bacterias, plantas y animales.

Asimismo, se diseñó un cebador adicional Dir3Alta1 para ser utilizado en una técnica de PCR múltiple junto a los cebadores específicos de los distintos grupos de especies de *Alternaria*. La técnica de PCR múltiple tiene por objetivo realizar simultáneamente la detección de *Alternaria* spp. y la identificación del grupo a que pertenece la especie detectada.

Las reacciones de amplificación por PCR convencional y múltiple se realizaron en un volumen total de 25 μ L, con 10 pmoles de cada cebador y 10 ng de ADN. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador programado para realizar una desnaturalización inicial del ADN a 93°C durante 2 min, seguida de 35 ciclos que comprendían las siguientes etapas: 30 s a 93°C, 30 s a 55°C y 45 s a 72°C. La última extensión se prolongó durante 5 min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La identificación de especies del género *Alternaria* y su división en grupos de especies se realiza atendiendo características morfológicas y producción de metabolitos secundarios (Andersen *et al.*, 2001, 2002, 2008; Pryor y Bigelow, 2003) y también mediante análisis filogenético basado en perfiles de amplificación con cebadores aleatorios (RAPD) (Roberts *et al.*, 2000) o en la secuenciación de determinados marcadores genéticos. Entre los marcadores genéticos empleados con este fin destacan los espaciadores internos de la transcripción, ITS1 e ITS2 (Chou y Wu, 2002; Konstantinouva *et al.*, 2002; Zur *et al.*, 2002), el gen que codifica para la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (gdp) (Pryor y Bigelow, 2003; Hong *et al.*, 2005), genes que codifican para la síntesis de micotoxinas (Andersen *et al.*, 2006) y el gen *Alt a 1* (Hong *et al.*, 2005)

Las técnicas basadas en el análisis microscópico y bioquímico de las especies fúngicas aisladas de los alimentos son laboriosas y complejas y los resultados obtenidos pueden variar según las condiciones de cultivo. Por otra parte, los resultados obtenidos con las técnicas de RAPD son muy sensibles a pequeñas variaciones en las condiciones de amplificación y pueden proporcionar resultados variables en distintos laboratorios (Jones *et al.*, 1997). Finalmente, la secuenciación de determinados marcadores genéticos es muy útil para la realización de estudios filogenéticos y la clasificación de especies de *Alternaria*, pero es laboriosa y requiere disponer de instrumental complejo.

Para la detección de los diferentes grupos de especies de *Alternaria* se deben seleccionar marcadores genéticos con un grado de variabilidad intra e interespecífica adecuado. Por ello, en este trabajo se ha seleccionado el gen *Alt a 1*, que codifica el principal alérgeno de *Alternaria* spp., para desarrollar una técnica de PCR múltiple que permita en una sola reacción detectar y diferenciar las especies de *Alternaria* pertenecientes a los principales grupos de este género.

Los cebadores AALTDIRALTA1/AALTINV2ALTA1 amplificaron un fragmento de 93 pb en las especies del grupo de *Alternaria alternata* que, además de esta especie, incluye a otras como *A. tenuissima*, *A. arborescens*, *A. longipes*, *A. gaisen* y *A. citri*. Sin embargo, estos cebadores no amplificaron el ADN de especies de *Alternaria* pertenecientes a otros grupos (Figura 1).

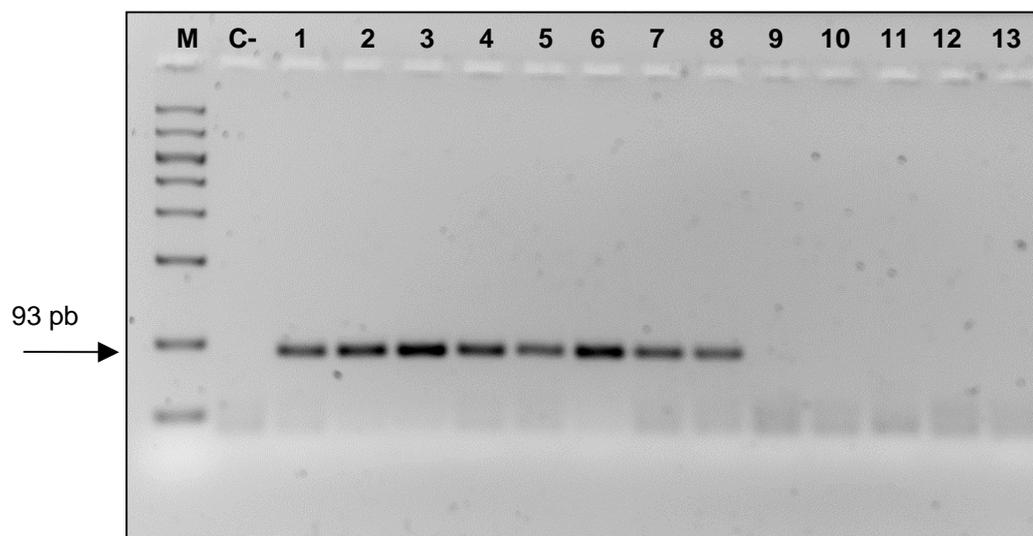


FIGURA 1. Análisis electroforético de los productos de PCR del marcador genético *Alt a 1* obtenidos con los cebadores AALTDIRALTA1/ AALTINV2ALTA1 (específicos del grupo de *Alternaria alternata*). Amplificación a partir de *A. alternata* CBS 154.31(1), *A. alternata* CBS 117130 (2), *A. alternata* CBS 117143 (3), *A. tenuissima* (4), *A. longipes* (5), *A. arborescens* (6), *A. citri* (7), *A. gaisen* (8), *A. solani* (9), *A. dauci* (10), *A. porri* (11), *A. radicina* (12), *A. infectoria* (13). (C-) Control negativo sin ADN, (M) Marcador de tamaño molecular Biomarker® Low.

Los cebadores AINFDIRALTA1/AINFINVALTA1 amplificaron específicamente un fragmento de 118 pb en el ADN de *A. infectoria*, y no amplificaron este fragmento en otras especies del género (Figura 2).

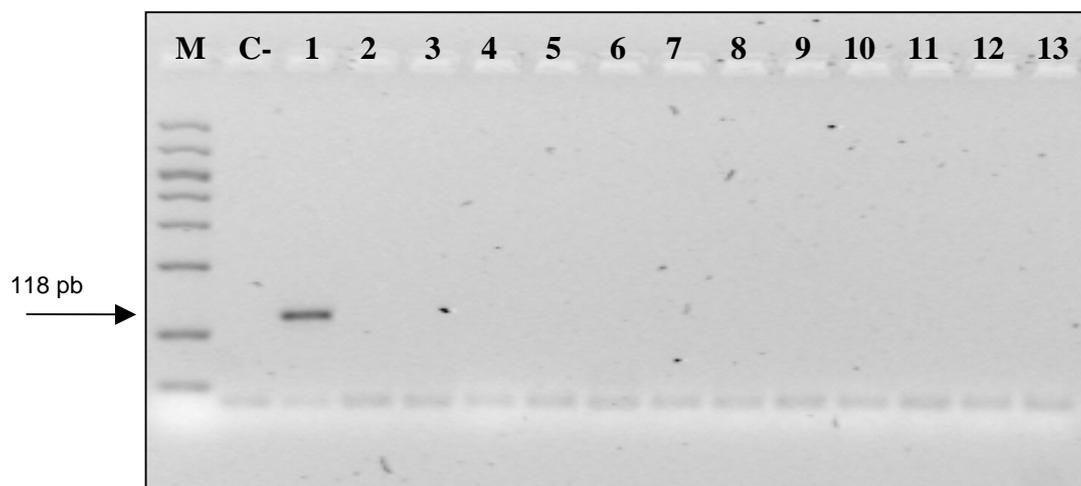


FIGURA 2. Análisis electroforético de los productos de PCR del marcador genético *Alt a 1* obtenidos con los cebadores AINFDIRALTA1/ AINFINVALTA1 (específicos del grupo de *Alternaria infectoria*). Amplificación a partir de *Alternaria infectoria* (1), *A. alternata* CBS 154.31(2), *A. alternata* CBS 117130 (3), *A. alternata* CBS 117143 (4), *A. tenuissima* (5), *A. longipes* (6), *A. arborescens* (7), *A. citri* (8), *A. gaisen* (9), *A. solani* (10), *A. dauci* (11), *A. porri* (12), *A. radicina* (13),. (C-) Control negativo sin ADN, (M) Marcador de tamaño molecular Biomarker® Low.

Los cebadores ASOLDIRALTA1/ASOLINVALTA1 amplificaron un fragmento de 118 pb exclusivamente a partir del ADN de las especies incluidas en el grupo de *A. porri*, como *A. solani*, *A. porri* y *A. dauci* (Figura 3).

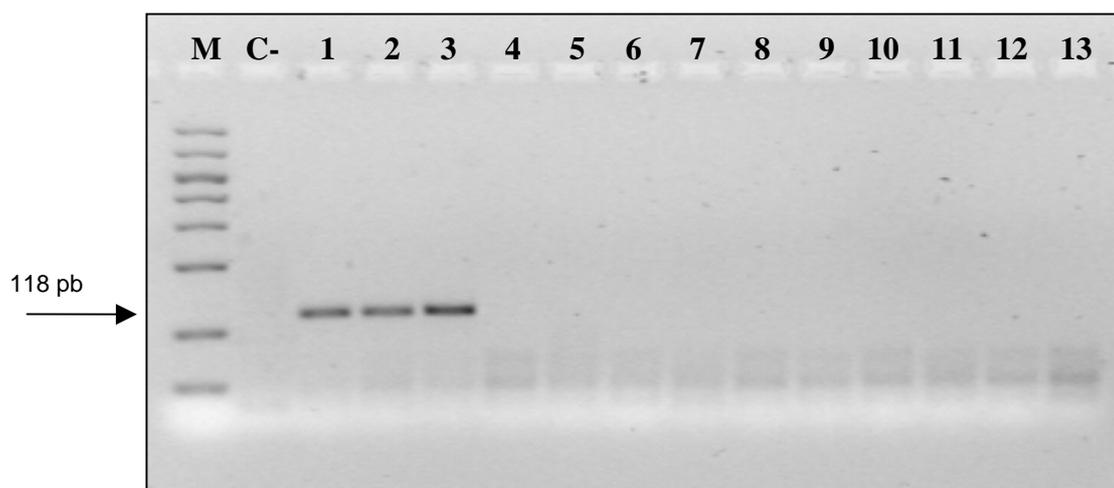


FIGURA 3. Análisis electroforético de los productos de PCR del marcador genético *Alt a 1* obtenidos con los cebadores ASOLDIRALTA1/ ASOLINVALTA1 (específicos del grupo de *Alternaria porri*). Amplificación a partir de *Alternaria solani* (1), *A. dauci* (2), *A. porri* (3), *A. alternata* CBS 154.31(4), *A. alternata* CBS 117130 (5), *A. alternata* CBS 117143 (6), *A. tenuissima* (7), *A. longipes* (8), *A. arborescens* (9), *A. citri* (10), *A. gaisen* (11), *A. infectoria* (12), *A. radicina* (13). (C-) Control negativo sin ADN, (M) Marcador de tamaño molecular Biomarker® Low.

Por último, los cebadores ARADIR2ALTA1/ASOLINVALTA1 amplificaron un fragmento de 131 pb en el grupo de *A. radicina*, pero no en otros grupos de *Alternaria* (Figura 4).

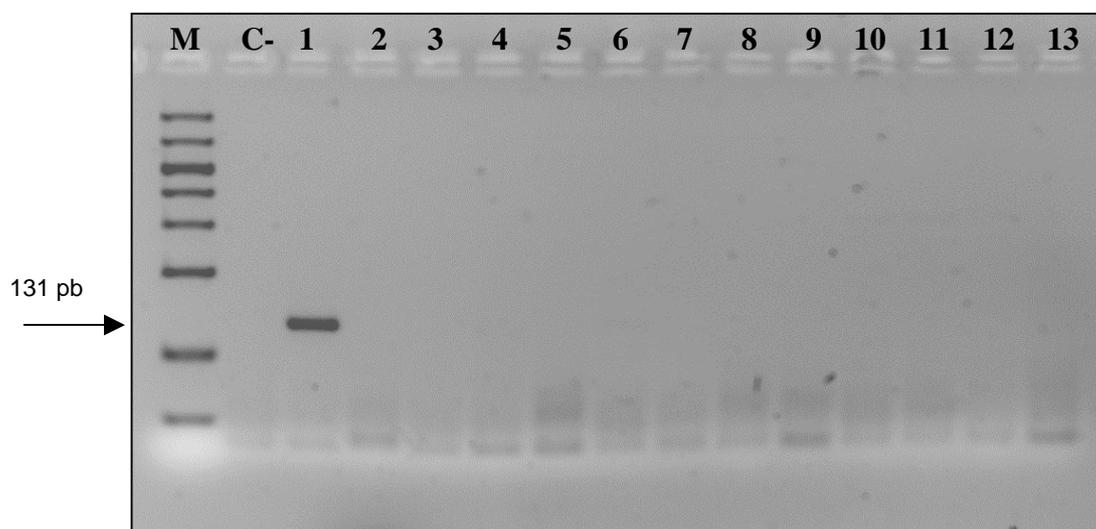


FIGURA 4. Análisis electroforético de los productos de PCR del marcador genético *Alt a 1* obtenidos con los cebadores ARADIR2ALTA1/ ASOLINVALTA1 (específicos del grupo de *Alternaria radicina*). Amplificación a partir de *Alternaria radicina* (1), *A. alternata* CBS 154.31(2), *A. alternata* CBS 117130 (3), *A. alternata* CBS 117143 (4), *A. tenuissima* (5), *A. longipes* (6), *A. arborescens* (7), *A. citri* (8), *A. gaisen* (9), *A. solani* (10), *A. dauci* (11), *A. porri* (12), *A. infectoria* (13). (C-) Control negativo sin ADN, (M) Marcador de tamaño molecular Biomarker® Low.

La utilización de los cebadores específicos de los distintos grupos de especies de *Alternaria*, junto con el cebador Dir3Alta1 produjo la amplificación del ADN de todas las especies de *Alternaria* analizadas y no interfirió en la amplificación del fragmento específico de grupo. Además, las parejas de cebadores utilizadas no produjeron bandas de amplificación a partir del ADN de organismos diferentes al género *Alternaria* (Figuras 5-7).

La metodología desarrollada permitió detectar y diferenciar mediante una técnica de PCR múltiple las especies de *Alternaria* pertenecientes a los principales grupos de este género. Disponer de técnicas genéticas rápidas capaces de diferenciar los grupos de especies de *Alternaria* es importante para la detección precoz de especies fitopatógenas en cultivos sensibles y el establecimiento de medidas preventivas y correctoras con el fin de reducir las pérdidas económicas en el sector primario. Estas técnicas podrían emplearse en las industrias de transformación de vegetales como marcadores de calidad y bioseguridad de materias primas y productos elaborados.

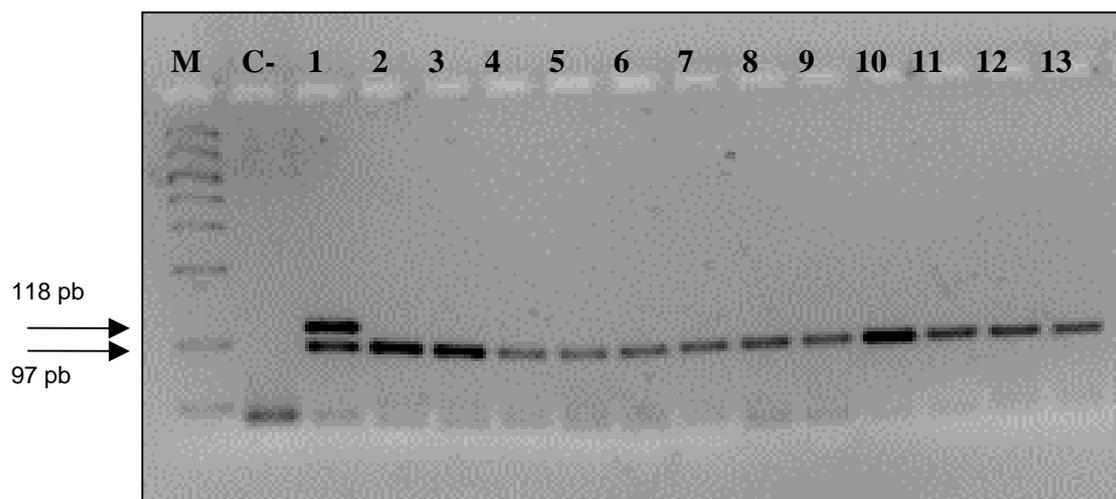


FIGURA 5. Análisis electroforético de los productos de PCR del marcador genético *Alt a 1* obtenidos con los cebadores Dir3Alta1 (común del género *Alternaria*) y AINFDIRALTA1/ AINFINVALTA1 (específicos del grupo de *Alternaria infectoria*). Amplificación a partir de *Alternaria infectoria* (1), *A. alternata* CBS 154.31(2), *A. alternata* CBS 117130 (3), *A. alternata* CBS 117143 (4), *A. tenuissima* (5), *A. longipes* (6), *A. arborescens* (7), *A. citri* (8), *A. gaisen* (9), *A. solani* (10), *A. dauci* (11), *A. porri* (12), *A. radicina* (13),. (C-) Control negativo sin ADN, (M) Marcador de tamaño molecular Biomarker® Low.

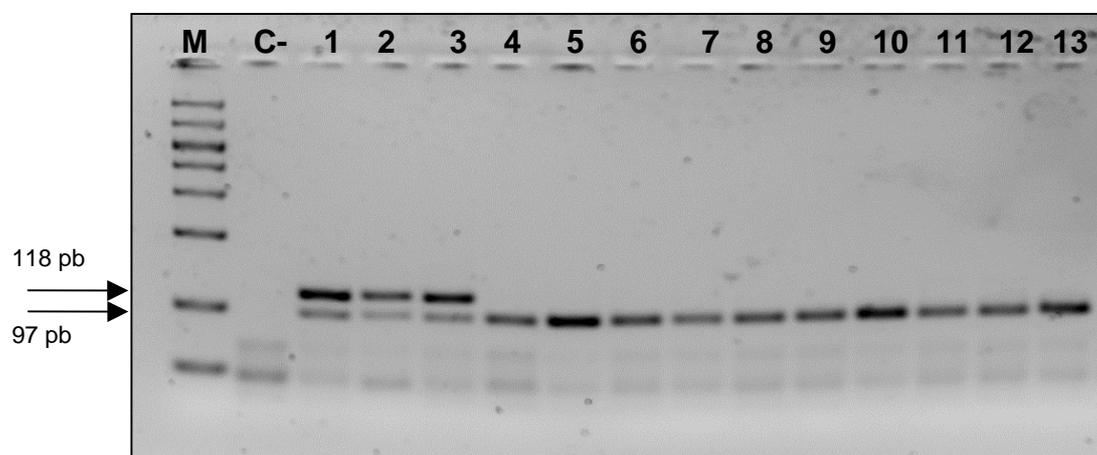


FIGURA 6. Análisis electroforético de los productos de PCR del marcador genético *Alt a 1* obtenidos con los cebadores Dir3Alta1 (común del género *Alternaria*) y ASOLDIRALTA1/ ASOLINVALTA1 (específicos del grupo de *Alternaria porri*). Amplificación a partir de *Alternaria solani* (1), *A. dauci* (2), *A. porri* (3), *A. alternata* CBS 154.31(4), *A. alternata* CBS 117130 (5), *A. alternata* CBS 117143 (6), *A. tenuissima* (7), *A. longipes* (8), *A. arborescens* (9), *A. citri* (10), *A. gaisen* (11), *A. infectoria* (12), *A. radicina* (13). (C-) Control negativo sin ADN, (M) Marcador de tamaño molecular Biomarker® Low.

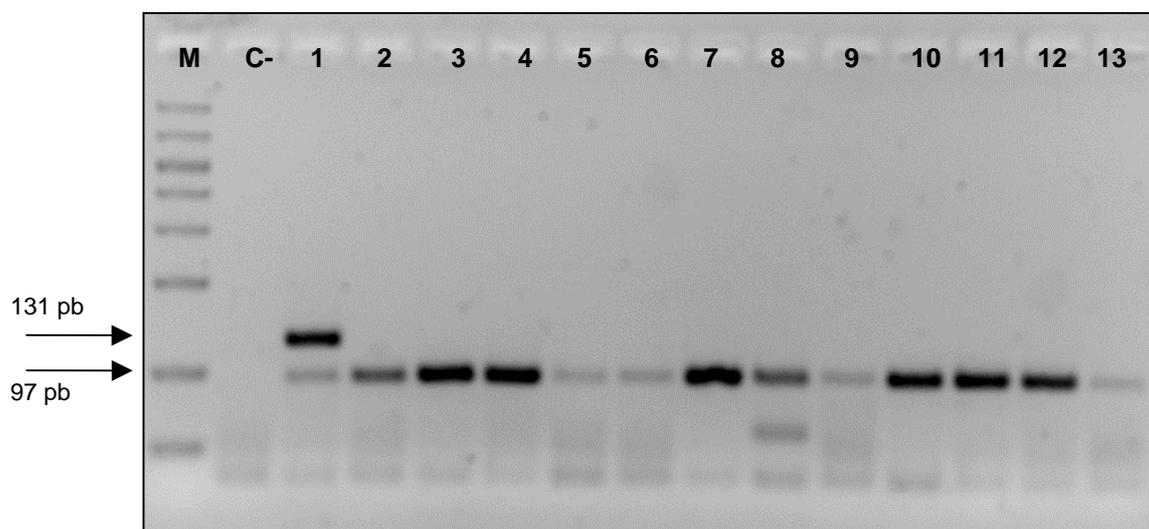


FIGURA 7. Análisis electroforético de los productos de PCR del marcador genético *Alt a 1* obtenidos con los cebadores Dir3Alta1 (común del género *Alternaria*) y ARADIR2ALTA1/ ASOLINVALTA1 (específicos del grupo de *Alternaria radicina*). Amplificación a partir de *Alternaria radicina* (1), *A. alternata* CBS 154.31(2), *A. alternata* CBS 117130 (3), *A. alternata* CBS 117143 (4), *A. tenuissima* (5), *A. longipes* (6), *A. arborescens* (7), *A. citri* (8), *A. gaisen* (9), *A. solani* (10), *A. dauci* (11), *A. porri* (12), *A. infectoria* (13). (C-) Control negativo sin ADN, (M) Marcador de tamaño molecular Biomarker® Low.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo han puesto de manifiesto que las técnicas de PCR desarrolladas son rápidas y específicas para la detección y diferenciación de diferentes grupos de especies de *Alternaria*. En consecuencia, se trata de técnicas que podrían emplearse como marcadores de calidad y bioseguridad de materias primas y productos elaborados en las industrias de transformación de vegetales.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (proyecto AGL 2006-07659). Miguel Ángel Pavón disfruta una Beca Predoctoral del Ministerio de Educación y Ciencia.

BIBLIOGRAFÍA

Andersen, B, Dongo, A y Pryor, BM. (2008). Secondary metabolite profiling of *Alternaria dauci*, *A. porri*, *A. solani*, and *A. tomatophila*. Mycol. Res. 112: 241-250.

- Andersen, B, Smedsgaard, J, Jorring, I, Dkouboe, P y Pedersen, LH.** (2006). Real-time quantification of the AM-toxin gene and HPLC quantification of toxigenic metabolites from *Alternaria* species from apples. *Int. J. Food Microbiol.* 111: 105-111.
- Andersen, B, Kroger, E y Roberts, RG.** (2002). Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-groups. *Mycol. Res.* 106: 170-182.
- Andersen, B, Kroger, E y Roberts, RG.** (2001). Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. *Mycol. Res.* 105: 291-299.
- Chou, HH y Wu, WS.** (2002). Phylogenetic analysis of internal transcribed spacer regions of the genus *Alternaria*, and the significance of filament-beaked conidia. *Mycol. Res.* 106: 164-169.
- Hong, GS, Cramer, RA, Lawrence, CB, Pryor, BM.** (2005). Alt a 1 allergen homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure. *Fungal Genet. Biol.* 42: 119-129.
- Jones CJ, Edwards, KJ, Castaglione, S, Winfield, MO, Sala, F, van deWiel, C, Bredemeijer, G, Vosman, B, Matthes, M, Daly, A, Brettschneider, R, Bettini, P, Buiatti, M, Maestri, E, Malcevski, A, Marmiroli, N, Aert, R, Volckaert, G, Rueda, J, Linacero, R, Vazquez, A y Karp, A.** (1997). Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol. Breed.* 3: 381-390.
- Konstantinova, P, Bonants, PJM, Gent-Pelzer MPE, Zouwen, P y Bulk, R.** (2002). Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. In carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays. *Mycol. Res.* 106: 23-33.
- Pryor, BM y Bigelow, DM.** (2003). Molecular characterization of *Embellisia* and *Nimbia* species and their relationship to *Alternaria*, *Ullocladium* and *Stemphylium*. *Mycologia* 95: 1141-1154.
- Roberts, RG, Reymond, ST y Andersen, B.** (2000). RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of small-spored *Alternaria* species and species groups. *Mycol. Res.* 104: 151-160.
- Marek, P, Annamalai, T, y Venkitanarayan, K.** (2003). Detection of *Penicillium expansum* by polymerase chain reaction. *Int. J. Food Microbiol.* 89: 139-144.
- Zur, G, Shimoni, E, Hallerman, E y Kashi, Y.** (2002). Detection of *Alternaria* fungal contamination in cereal grains by a polymerase chain reaction-based assay. *J. Food Prot.* 65: 1433-1440.