

UTILIZACIÓN DEL GEN *Alt a 1* PARA LA DETECCIÓN DE *Alternaria* spp. EN PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS MEDIANTE UNA TÉCNICA DE PCR
PCR DETECTION OF *Alternaria* spp. IN VEGETABLE PRODUCTS BASED ON THE GENETIC MARKER *Alt a 1*

M. A. Pavón Moreno, T. García Lacarra y R. Martín de Santos

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid

Resumen

Se ha desarrollado una técnica de PCR para la detección de *Alternaria* spp. en productos hortofrutícolas, empleando cebadores que amplifican un fragmento de 195 pb del gen *Alt a 1*. El límite de detección de la técnica desarrollada fue de 10^2 ufc/ml, tanto en medio de cultivo como en pulpa de tomate.

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 *Alternaria* spp. in vegetables. The limit of detection of the method was 10^2 cfu/ml either in culture or tomato paste.

Key words: 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 (King y Schade, 1984). Incluye numerosas especies que pueden invadir los cultivos vegetales antes y después de la recolección. Asimismo, se les considera responsables de cuantiosas pérdidas económicas en el sector agrícola. Algunas especies de *Alternaria* son específicas de determinados cultivos mientras que otras, como *Alternaria alternata*, afectan a gran variedad de vegetales. *A. alternata* se aísla con mucha frecuencia de frutas y hortalizas frescas, en las que produce deterioro durante el transporte, manipulación y almacenamiento post-cosecha incluso a bajas temperaturas. También se ha aislado de cereales y oleaginosas cuando el secado de los granos en el campo se demora por la lluvia, lo que conlleva niveles de humedad elevada.

Se han identificado más de 60 especies en el género *Alternaria*, muchas de las cuales producen metabolitos tóxicos para los mamíferos y aves (micotoxinas) y/o para las plantas (fitotoxinas) (Minoletti et al., 2002). La principal especie productora de micotoxinas es *A. alternata*, que produce ácido tenuazónico, alternariol (AOH), alternariol metil eter (AME), altenueno, altertoxina-I y toxinas AAL (Bottalico y Logrieco, 1998). Las toxinas de *Alternaria* son responsables de varias enfermedades que afectan al hombre y a los animales. El consumo de maíz contaminado con *A. alternata* se ha asociado con una elevada incidencia de cáncer de esófago en determinadas zonas geográficas (Liu et al., 1991, 1992). Además, se ha demostrado que los extractos de *A. alternata* tienen efecto citotóxico y actividad mutagénica en microorganismos y en células de mamíferos (Lehman et al., 2006).

La frecuente contaminación con *A. alternata* de algunos productos hortofrutícolas como tomates, peras, cítricos y sus derivados (zumos, néctares, compotas, purés, ketchup, etc.) es objeto de especial preocupación por la repercusión que la presencia continuada de micotoxinas como AOH y AME puede tener a largo plazo en la salud de los consumidores. Teniendo en cuenta que *Alternaria* spp. sintetiza múltiples micotoxinas, la detección de cada una de ellas no resulta práctico ni realista, puesto que el elevado coste económico resultaría inviable.

Una alternativa que permitiría estimar de una forma indirecta la posible presencia de micotoxinas en materias primas o productos elaborados consiste en la detección y enumeración rápida de las especies de *Alternaria* en estas matrices. Disponer de técnicas rápidas y específicas con este fin permitiría a las industrias elaboradoras establecer un control adecuado de sus proveedores, mejorar la trazabilidad de los productos hortofrutícolas y eliminar de los canales de comercialización los lotes que puedan representar un peligro para la salud del consumidor. El objetivo de este trabajo ha consistido en el desarrollo de una técnica genética basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección y enumeración rápida de *Alternaria* spp. en productos hortofrutícolas.

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). Las cepas seleccionadas se cultivaron en Agar Patata Dextrosa (PDA) y en Agar Extracto de Malta (MEA) a 25 °C durante 7 días.

Extracción del ADN.

La extracción del ADN de los mohos a partir de cultivos puros y de alimentos se realizó según el método descrito por Marek et al. (2003). La concentración y calidad del ADN obtenido se determinó espectrofotométricamente y su integridad se evaluó por electroforesis en gel de agarosa de 1%.

Diseño de cebadores y amplificación por PCR.

Los cebadores Dir3Alta1 (5'-CGAGGGTGACTACGTCTGGAAG-3') e Inv4Alta1 (5'-CGCGGCAGTAGTTGGGAA-3') se diseñaron a partir de la alineación y análisis informático de las secuencias del gen *Alt a 1* disponibles en la base de datos GenBank. Estos cebadores delimitan una región de 350 pb del citado gen en todas las especies de *Alternaria*. Asimismo, la comparación de las secuencias del fragmento amplificado con los cebadores Dir3Alta1/Inv4Alta1 en las especies de *Alternaria* se empleó para diseñar el cebador Dir5cAlta1 (5'-GAGAACAGCTTCATGGACTTCTCTTT-3') que, combinado con el Inv4Alta1, delimita un fragmento de 195 pb del gen *Alt a 1*.

La especificidad de las parejas de cebadores Dir3Alta1/Inv4Alta1 y Dir5cAlta1/Inv4Alta1 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.

Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron en un volumen total de 25 µL, con 10 pmoles de cada cebador y 10 ng de ADN. La reacción de PCR 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.

Límite de detección

El límite de detección y la influencia de los tratamientos térmicos en la capacidad del método para detectar *Alternaria* spp. se evaluaron mediante el análisis, en paralelo, de diluciones decimales de un cultivo de *A. alternata* fresco y del mismo cultivo sometido a tratamientos térmicos de 60 °C durante 30 min y 90 °C durante 5 min. La influencia de una matriz vegetal en la sensibilidad de la técnica de PCR se evaluó mediante el análisis de muestras de pulpa de tomate inoculadas con diluciones de un cultivo viable de *A. alternata*.

Resultados y discusión

Para la detección específica de *Alternaria* spp. se deben seleccionar marcadores génicos con un grado de variabilidad interespecífica adecuada. En este trabajo se seleccionó el gen *Alt a 1* porque codifica el principal alérgeno de *A. alternata* y de otras especies de este género (Abebe et al., 2006).

Los cebadores Dir3Alta1/Inv4Alta1 y Dir5Alta1/Inv4Alta1 amplificaron un fragmento de 350 pb y 195 pb, respectivamente, en todas las especies de *Alternaria* analizadas, sin que se produjera amplificación del ADN procedente de otros hongos, bacterias, plantas o animales (Figuras 1 y 2). El fragmento amplificado por los cebadores Dir5cAlta1/Inv4Alta1 presenta una intensidad homogénea en las distintas especies de *Alternaria* y, debido a su menor tamaño, es más adecuado para el análisis de productos tratados térmicamente que el delimitado por los cebadores Dir3Alta1/Inv4Alta1, en los que puede existir cierta degradación del ADN fúngico.

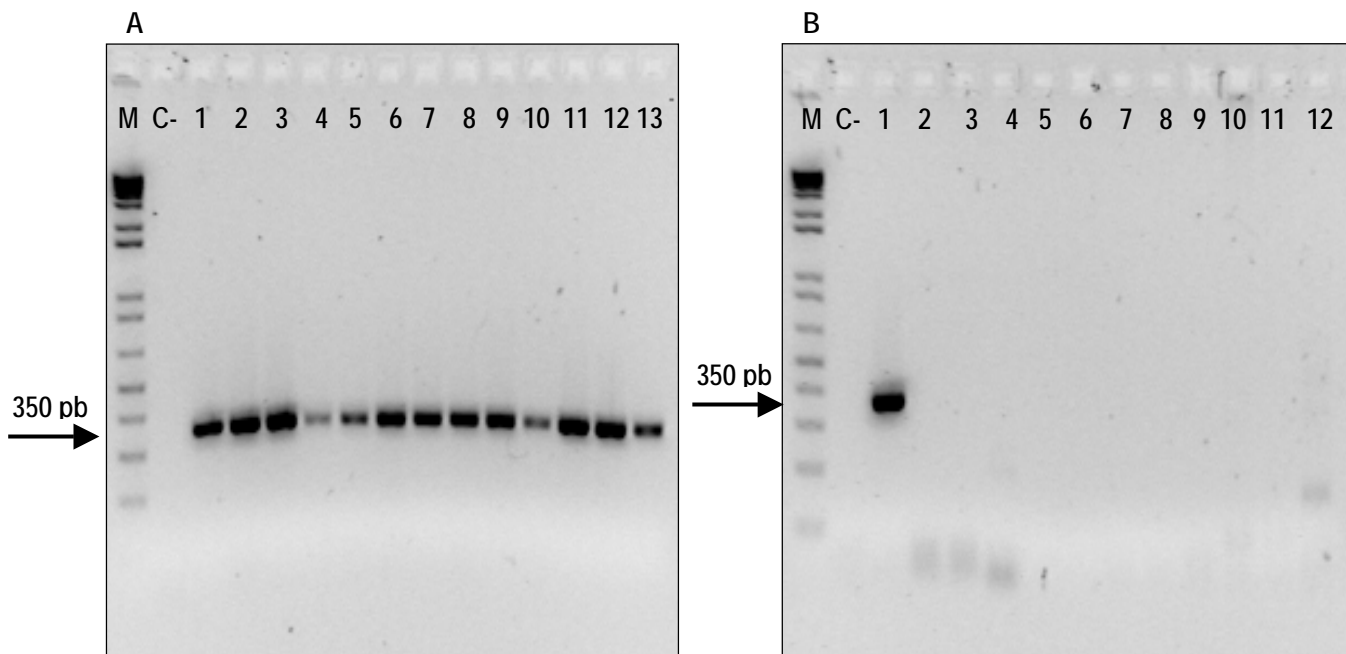


FIGURA 1. Análisis electroforético de los productos de PCR del marcador génico *Alt a 1* obtenidos con los cebadores Dir3Alta1/Inv4Alta1. (A) Amplificación a partir de especies de *Alternaria*: *A. alternata* (1-3), *A. tenuisima* (4), *A. gaisen* (5), *A. dauci* (6), *A. infectoria* (7), *A. longipes* (8), *A. citri* (9), *A. radicina* (10), *A. porri* (11), *A. solani* (12), *A. arborescens* (13). (B) Amplificación a partir de otros organismos: *A. alternata* (1), *Rhizopus stolonifer* (2), *Penicillium expansum* (3), *Fusarium oxysporum* (4), *Aspergillus alutaceus* (5), *Saccharomyces cerevisiae* (6), *Escherichia coli* (7), Cacahuete (8), Nuez (9), Cabra (10), Merluza (11) y Pollo (12). (C-) Control negativo sin ADN, (M) Marcador de tamaño molecular 1 Kb plus DNA ladder.

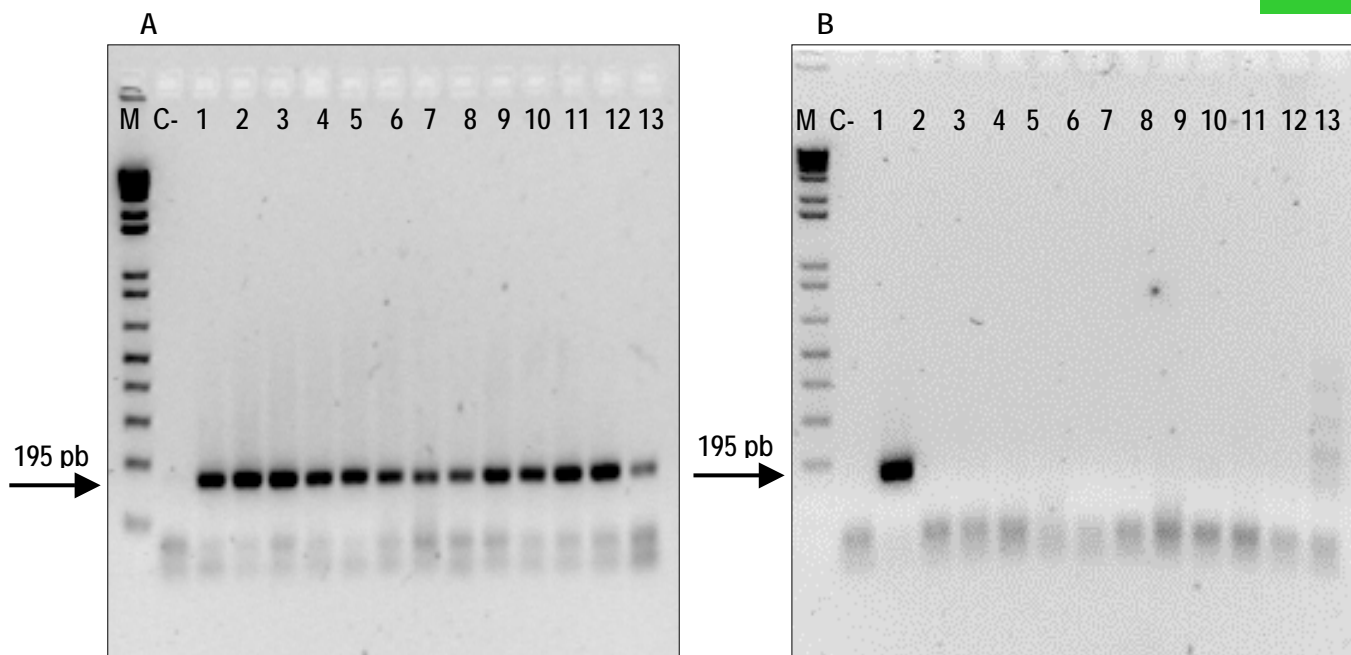


FIGURA 2. Análisis electroforético de los productos de PCR del marcador génico *Alt a 1* obtenidos con los cebadores Dir5cAlta1/Inv4Alta1. (A) Amplificación a partir de especies de *Alternaria*: *A. alternata* (1-3), *A. tenuissima* (4), *A. gaisen* (5), *A. dauci* (6), *A. infectoria* (7), *A. longipes* (8), *A. citri* (9), *A. radicina* (10), *A. porri* (11), *A. solani* (12), *A. arborescens* (13). (B) Amplificación a partir de otros organismos: *A. alternata* (1), *Rhizopus stolonifer* (2), *Penicillium expansum* (3), *Fusarium oxysporum* (4), *Aspergillus alutaceus* (5), *Saccharomyces cerevisiae* (6), *Escherichia coli* (7), Cacahuete (8), Nuez (9), Cabra (10), Merluza (11) y Pollo (13). (C-) Control negativo sin ADN, (M) Marcador de tamaño molecular *1 Kb plus DNA ladder*.

Conviene señalar que cuando se analizaron algunas muestras de arroz, girasol y salvado de trigo se amplificó una banda del mismo tamaño que la de *Alternaria* spp., lo que podría indicar una contaminación de la materia prima de la que se había extraído el ADN con alguna especie de este género (Figura 3). Para comprobar esta hipótesis, se purificaron y secuenciaron las bandas de amplificación obtenidas a partir del ADN de arroz, girasol y salvado de trigo. Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos GenBank, utilizando el programa BLAST del paquete informático NCBI. Se encontró una coincidencia del 99,5% entre la secuencia de la muestra de trigo y la secuencia de *Alternaria infectoria*. Asimismo, se obtuvo una coincidencia del 100% entre las secuencias de las bandas amplificadas en las muestras de arroz y girasol y la de *A. alternata*. Sin embargo, no se encontró homología entre las secuencias analizadas y las secuencias de especies vegetales, lo que permitió concluir que los cebadores diseñados son específicos del género *Alternaria* y no amplifican el ADN de animales, plantas, levaduras ni bacterias.

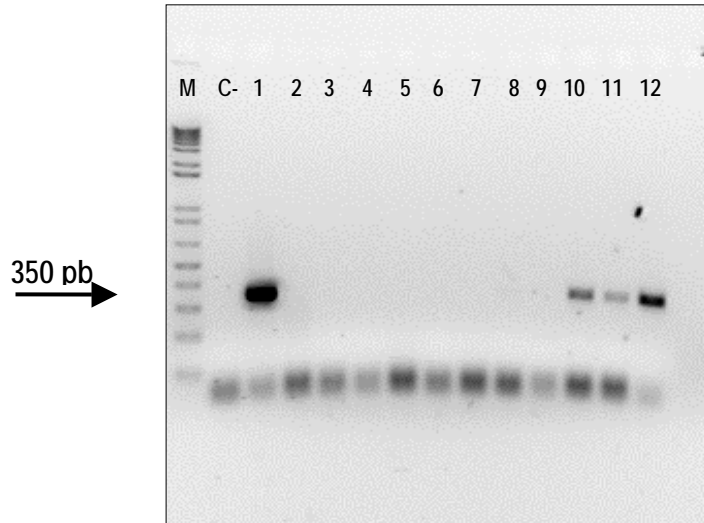


FIGURA 3. Análisis electroforético de los productos de PCR del marcador génico *Alt a 1* obtenidos con los cebadores Dir3Alta1/Inv4Alta1. Amplificación a partir de *A. alternata* (1), Avena (2), Soja (3), Cacahuete (4), Pistacho (5), Avellana (6), Almendra (7), Nuez (8), Piñón (9), Arroz (10), Girasol (11) y Salvado de trigo (12). (C-) Control negativo sin ADN, (M) Marcador de tamaño molecular *1 Kb plus DNA ladder*.

El límite de detección de la técnica fue de de 0,01 ng de ADN de *A. alternata* (Figura 4) y de 10^2 ufc/ml tanto en el cultivo viable como en los inactivados por calor a 60 o 90 °C (Figura 5) y en pulpa de tomate (Figura 6).

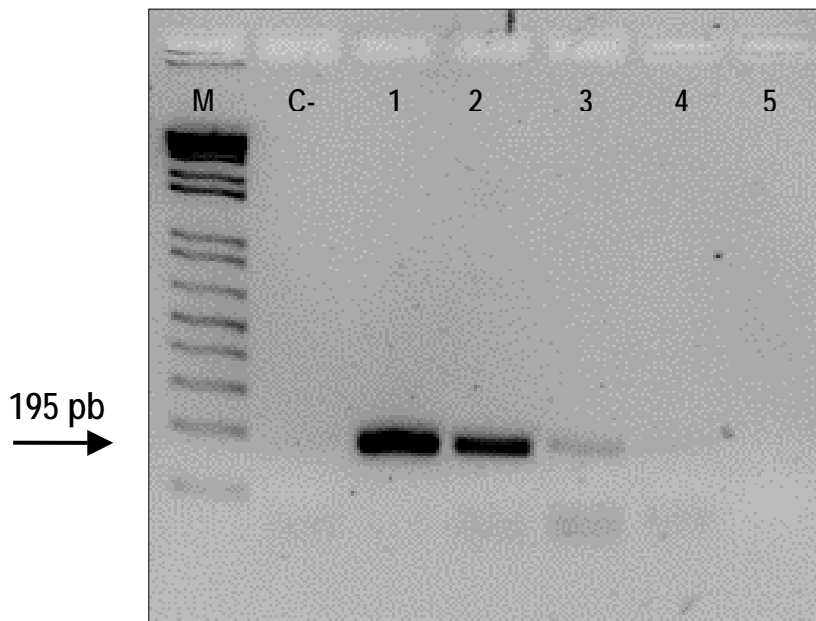


FIGURA 4. Análisis electroforético de los productos de PCR del marcador génico *Alt a 1* obtenidos con los cebadores Dir5cAlta1/Inv4Alta1a partir de diluciones decimales del ADN extraído de un cultivo de *A. alternata* CBS 117143: 10 ng (1), 1 ng (2), 0,1 ng (3), 0,01 ng (4), 0,001 ng (5). (C-) Control negativo sin ADN, (M) Marcador de tamaño molecular *1 Kb plus DNA ladder*.

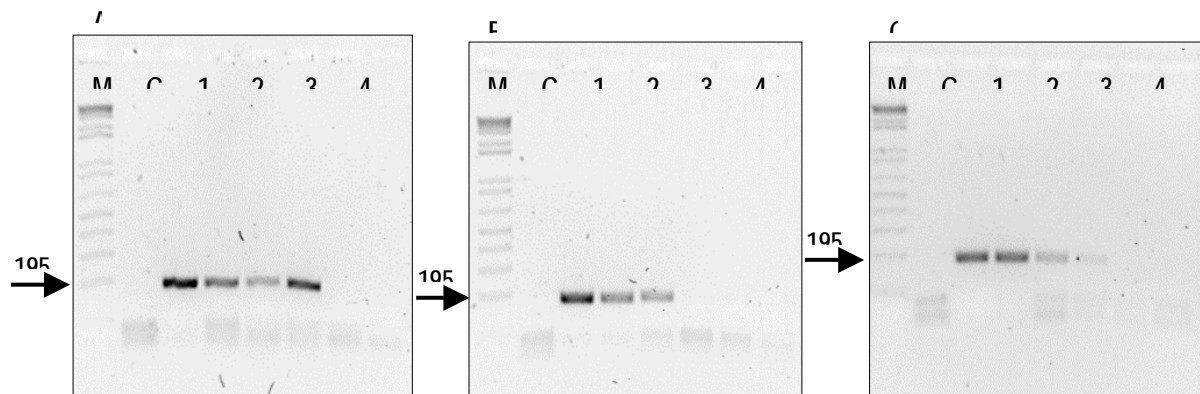


FIGURA 5. Análisis electroforético de los productos de PCR del marcador génico *Alt a 1* obtenidos con los cebadores Dir5cAlta1/Inv4Alta1a a partir de diluciones decimales de un cultivo de *A. alternata* CBS 117143 sometido a distintos tratamientos térmicos. (A) Cultivo fresco viable. (B) Cultivo tratado a 60°C/30 min. (C) Cultivo tratado a 90 °C/5 min. El recuento de *A. alternata* antes del tratamiento térmico corresponde a $2,5 \times 10^5$ ufc/ml (1), $2,5 \times 10^4$ ufc/ml (2), $2,5 \times 10^3$ ufc/ml (3), $2,5 \times 10^2$ ufc/ml (4), $2,5 \times 10^1$ ufc/ml (5) y 2,5 ufc/ml (6). (C-) Control negativo sin ADN, (C+) Control positivo con ADN de $2,5 \times 10^5$ ufc/ml viables. (M) Marcador de tamaño molecular 1 Kb plus DNA ladder.

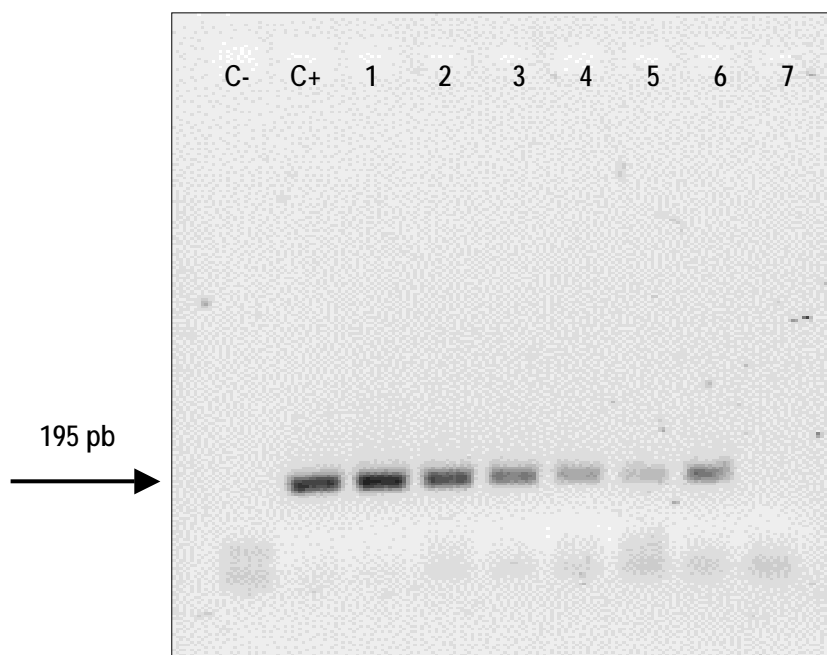


FIGURA 6. Análisis electroforético de los productos de PCR del marcador génico *Alt a 1* obtenidos con los cebadores Dir5cAlta1/Inv4Alta1 a partir de pulpa de tomate contaminada con diluciones de un cultivo fresco de *A. alternata* CBS 117143. Los recuentos de *A. alternata* en las muestras fueron de $1,6 \times 10^5$ ufc/ml (1), $3,5 \times 10^4$ ufc/ml (2), $5,5 \times 10^3$ ufc/ml (3), 7×10^2 ufc/ml (4), $3,5 \times 10^2$ ufc/ml (5), 10^2 ufc/ml (6), Tomate sin contaminar y con recuento de 0 ufc/ml (7). (C-) Control negativo sin ADN, (C+) Control positivo con ADN de $2,5 \times 10^5$ ufc/ml viables.

Conclusión

Los resultados obtenidos en este trabajo han puesto de manifiesto que la técnica de PCR desarrollada es rápida, específica y sensible para la detección de bajas concentraciones de especies de *Alternaria* spp. con un límite de detección de 10^2 ufc/ml tanto en cultivo fresco y tratado térmicamente, como en muestras de alimentos. En consecuencia, se trata de una técnica que podría emplearse como marcador de calidad y bioseguridad de materias primas y productos elaborados en las industrias de transformación de vegetales.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por la Dirección General de Universidades de la Comunidad de Madrid (Programa de Vigilancia Sanitaria S-0505/AGR/000265) y el Ministerio de Educación y Ciencia (proyecto AGL 2006-07659). Miguel Ángel Pavón disfruta una Beca Predoctoral del Ministerio de Educación y Ciencia.

Bibliografía

Abebe, M, Kumar, V, Rajan, S, Thaker A, Sevine, S y Vijay, HM. 2006. Detection of recombinant Alt a 1 in a two-site, IgM based, sandwich ELISA opens up possibilities of developing alternative assays for the allergen. *J. of Immunol. Methods*, 312: 111-117.

Bottalico, A y Logrieco, A. 1998. Toxigenic *Alternaria* species of economic importance. En: *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. New York, EE.UU: Marcel Dekker, Inc., 65-108.

King, AD y Schade, JE. 1984. *Alternaria* toxins and their importance in food. *J. Food Prot.* 47: 886-891.

Lehmann, L, Wagner, J y Metzler, M. 2006. Estrogenic and clastogenic potential of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Food Chem. Toxicol.* 44: 398-408.

Liu, GT, Qian, YZ, Zhang, P, Dong, ZM, Qi, YM y Guo, HT. 1992. Etiological role of *Alternaria alternata* in human esophageal cancer. *Chin. Med. J.*, 105: 390-400.

Liu, GT, Qian, YZ, Zhang, P, Dong, ZM, Shi, ZY, Zhen, YZ, Miao, J y Xu, YM. 1991. Relationships between *Alternaria alternata* and oesophageal cancer. *IARC Scientific Publications* 105: 258-262.

Marek, P, Annamalai, T, y Venkitanarayan, K. 2003. Detection of *Penicillium expansum* by polimerase chain reaction. *Int. J. Food Microbiol.*, 89: 139-144.

Minoletti, C, Santolini, J, Haraux, F, Pothier, J, y Andre, F. 2002. Rebuilt 3D structure of the chloroplast f1 ATPase-tentoxin complex. *Proteins* 49: 302-20.