



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Detección y Cuantificación por PCR tiempo real de  
genes involucrados en la vía de biosíntesis de  
deoxinivalenol y zearalenona de *Fusarium  
graminearum* en tortillas de maíz.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS  
PRESENTA**

**Domínguez Martínez Ricardo.**

**Tutor: Dra Carolina Peña Montes  
Asesor: Dra Amelia Farrés González Sarabia**

**Ciudad Universitaria, Cd. Mex., 2017**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Dra CARMEN ADRIANA MENDOZA RODRIGUEZ  
**VOCAL:** Dr JOSE ADELFO ESCALANTE LOZADA  
**SECRETARIO:** Dra CAROLINA PEÑA MONTES  
**1er. SUPLENTE:** Dra TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA  
**2° SUPLENTE:** Dr AMELIA MARIA DE GUADALUPE FARRÉS GONZÁLEZ SARABIA

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

LABORATORIO 312 CONJUNTO E DE LA FACULTAD DE QUÍMICA.

### **ASESOR**

**Dra. Carolina Peña Montes**

### **SUPERVISOR TÉCNICO**

**Dra. Amelia María de Guadalupe Farrés González Sarabia**

### **SUSTENTANTE**

**Ricardo Domínguez Martínez**

## **Agradecimientos.**

A la Dra Carolina Peña Montes gracias por compartir todo su conocimiento conmigo, orientarme, tenerme paciencia y ser la mejor tutora que alguien podría desear. A la Dra Amelia Farrés gracias por aceptarme en el proyecto y confiar en mí. A Ambas porque de ustedes también el significado de la palabra humildad.

Al Dr Adelfo Escalante y la Dra Carmen Mendoza por sus aportaciones y consejos para la elaboración de este trabajo.

A ti mamá por siempre preocuparte por mí y quererme de manera incondicional. A ti papá gracias por tu apoyo y cariño para poder llegar a este punto de mi carrera. A ambos por comprensión y enseñanzas para formar el hombre crítico y honesto que soy ahora.

A mis hermanas gracias por siempre estar para mí cuando las necesito y por darme el regalo de ser el tío de los mejores sobrinos que alguien pudiera desear.

A mis tíos Mario y Chuy por su cariño apoyo y ser como unos segundos padres para mí, muchas gracias por todo lo que han hecho por nuestra familia.

A toda mi demás y muy extensa familia, les agradezco por sus consejos y cariño que me han brindado durante toda mi vida.

A mis amigos de la facultad de química, Giuly tú que empezaste este camino conmigo te has convertido en una de las personas más especiales en mi vida gracias por todos. A Dea gracias por todas las risas y momentos juntos eres una persona muy valiosa para mí. A Dafne y Oscar gracias por enseñarme a ser un gran ser humano como ustedes. A Anallely que eres un ejemplo a seguir gracias. Bere bebe te agradezco por todas las salidas tanto científicas como sociales, desde que te conocí mi vida dio un giro donde mejoro. A Gaona y Rafa los quiero mucho y sé que siempre seres amigos.

A mis amigos del laboratorio, Abish, Alfredo, Augusto, Carlos, Sara y Tizo porque son parte esencial de mi vida, sin su gran amistad y consejos de vida logre terminar este proyecto, los aprecio mucho y gracias a Adriana,

Alejandra, Cindy, Eva, Karina, Lalo, Manuel, Myrna y Paola gracias por brindarme su tiempo y conocimiento para poder concluir mi trabajo.

A mis geniales amigos Q.A, Claudia, Deivy, Diana, Gabs, José, Juanjo, Laritza, Nidia gracias por esos momentos inolvidables en la facultad y su amistad para siempre salir adelante. A mi amigo Quimico Alan, muchas gracias por toda tu brillante ayuda durante mi larga travesía en la facultad.

A mis amigos del CCH Sur, Abigail, Areli, Genivive Román, Jazmín y Xóchitl me siento muy feliz de conservar su amistad, gracias por siempre estar para mí y todas sus palabras de aliento.

A mis amigos del crew, Alfredo, Brian, David, Fabián, Sebastián por todo el bullying, pero sincera amistad. A mis primos Carlos y Oscar porque los considero como unos hermanos para mí y no podría pedir mejores personas en mi vida.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Química gracias por abrirme las puertas y permitirme ser parte de la mejor aventura de mi vida y brindarme herramientas invaluable para enfrentar al mundo.

Porque soy y seguiré siendo PUMA

*“Por mi raza hablara el espíritu”*

Al PAIP por el financiamiento para este proyecto de investigación.

PAIP 5000-9495

## Contenido

|  |       |
|--|-------|
| 1. Resumen .....                                   | 1     |
| 2. Introducción .....                              | 2-3   |
| 3. Marco teórico .....                             | 4     |
| <b>3.1 El maíz en México</b> .....                 | 4-5   |
| 3.1.1 Tortilla y Nixtamalización .....             | 5-7   |
| 3.1.2 Maíz transgénico .....                       | 7-8   |
| 3.1.3 Plagas y enfermedades el maíz .....          | 8-9   |
| <b>3.2 El género <i>Fusarium</i></b> .....         | 9     |
| 3.2.1 <i>Fusarium graminearum</i> .....            | 10-11 |
| <b>3.3 Micotoxinas</b> .....                       | 11-12 |
| 3.3.1 Toxicidad .....                              | 12-14 |
| <b>3.4 Zearalenona</b> .....                       | 13-15 |
| 3.4.1 Biosíntesis .....                            | 15-16 |
| <b>3.5 Deoxinivalenol</b> .....                    | 17    |
| 3.5.1 Biosíntesis .....                            | 17-19 |
| <b>3.6 PCR punto final</b> .....                   | 20-21 |
| <b>3.7 PCR tiempo real</b> .....                   | 21-22 |
| 3.7.1 Fluoróforos con afinidad al ADN .....        | 22-23 |
| 3.7.2 Métodos de análisis .....                    | 24-25 |
| <b>3.8 Antecedentes del grupo de trabajo</b> ..... | 26    |
| <b>3.9 Justificación</b> .....                     | 26    |
| 4. Hipótesis .....                                 | 27    |
| 5. Objetivos .....                                 | 27    |
| 5.1 Objetivo principal.....                        | 27    |
| 5.2 Objetivos particulares .....                   | 27    |
| 6. Metodología .....                               | 28    |
| 6.1 Crecimiento de cepas puras.....                | 29    |
| 6.2 Cosecha de esporas y cuantificación .....      | 29-30 |
| 6.3 Obtención de micelio y extracción de ADN ..... | 30-31 |
| 6.4 Muestreo .....                                 | 31    |
| 6.5 Oligonucleótidos.....                          | 31    |
| 6.6 PCR punto final .....                          | 31-32 |
| 6.7 PCR tiempo real.....                           | 33-34 |
| 6.8 Detección de DON y ZEA por Inmunoensayo .....  | 34    |

|  |       |
|--|-------|
| <b>7. Resultados y discusión</b> .....                           | 35    |
| 7.1 Determinación de la pureza de las cepas por morfología ..... | 35    |
| 7.2 Conteo de esporas .....                                      | 36    |
| 7.3 Extracción de ADN cromosomal de cepas puras .....            | 36-37 |
| 7.4 Detección de los genes de interés por PCR punto final .....  | 38-39 |
| 7.5 Secuenciación de productos de PCR punto final .....          | 39-42 |
| 7.6 Extracción de ADN de muestras de tortilla .....              | 42-43 |
| 7.7 PCR tiempo real .....  | 44    |
| 7.7.1 Especificidad de oligonucleótidos por qPCR .....           | 44-49 |
| 7.7.2 Curvas de disociación .....                                | 49-51 |
| 7.7.3 Curvas estándar .....                                      | 51-54 |
| 7.7.4 qPCR con ADN de muestras de tortilla .....                 | 55-56 |
| 7.7.5 qPCR para detección de transgénicos .....                  | 56-59 |
| 7.7.6 Resumen de resultados de qPCR .....                        | 59-62 |
| 7.8 Prueba de inmunoensayo .....                                 | 63-64 |
| <b>8. Conclusiones</b> .....                                     | 65    |
| <b>9. Referencias</b> .....                                      | 66-74 |

## 1. Resumen

La presencia de micotoxinas en cereales es uno de los contaminantes que con mayor frecuencia se presenta. Las condiciones de colonización por hongos micotoxigénicos juegan un papel importante en control y prevención. Sin embargo, es un tema que se encuentra descuidado en nuestro país ya que no existe legislación actual que enfrente dicho problema.

En el presente trabajo, se presenta el estudio de la detección de genes en tortillas de maíz por medio de técnicas moleculares PCR y PCR tiempo real, que se encuentran involucrados en la vía de biosíntesis de las micotoxinas zearalenona y deoxinivalenol sintetizadas por el microorganismo *Fusarium graminearum* que es el principal contaminante del maíz.

Los resultados obtenidos para las tortillas analizadas muestran resultados positivos para *tri5* (codifica para deoxinivalenol) en un 88.33% y *pks4* (codifica para zearalenona) en un 72.22%. También se observó la presencia de los dos genes juntos en un 61.11% de las tortillas evaluadas. En cuanto a los resultados observados para la secuencia de organismos genéticamente modificados muestran un 22.2% para el gen *35s* y 55.56% para el gen *tnos*. Se detectó la presencia conjunta de las dos secuencias de OGM en un 16.67% de las 18 muestras analizadas.

Por otra parte, la prueba de inmunoensayo resultó negativa para zearalenona y deoxinivalenol en las muestras que presentaban la mayor concentración de ADN para el gen *tri5* y *pks4* por qPCR.

## 2. Introducción

En México, la producción de maíz es de 25 millones de toneladas al año (Sagarpa, 2015). La tortilla de maíz es un alimento básico con un consumo promedio por persona al día de 155.4 g en zonas urbanas y 217.9 g en zonas rurales (CONEVAL, 2012). El cultivo de maíz, como el de otros cereales, enfrenta en campo la presencia de hongos. Su crecimiento en campo puede presentar la producción de micotoxinas. Además, la presencia de esporas produce problemas durante el almacenamiento cuando el secado de los granos no es el correcto: estas esporas pueden germinar y por lo tanto pueden generarse toxinas también en almacén. Uno de los hongos con mayor incidencia en los cultivos es *Fusarium graminearum*, el cual es el agente causal de la roña, tizón o fusariosis. Este género se caracteriza por su toxicidad y es reconocido como uno de los mayores problemas de la agricultura. Particularmente *F. graminearum* produce dos micotoxinas de gran relevancia en cuanto a seguridad alimentaria, el deoxinivalenol y la zearalenona (Soriano del Castillo, 2007).

En México la norma NOM-247- SSA1-2008 regula el contenido de aflatoxinas totales en cereales de origen nacional o importado para el consumo humano y animal. No se cuenta con normatividad que aborde técnicas para la detección de otras micotoxinas. El conocimiento cada vez mayor de los daños a la salud provocados por micotoxinas y la importancia de evitar que un lote contaminado llegue al consumidor plantean la necesidad de protocolos que permitan detectar de manera rápida y específica, así como cuantificar la presencia de micotoxinas.

Es así que la contaminación por micotoxinas condujo a la creación de técnicas confiables para su detección en las que se incluye cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y ensayos inmunológicos (ELISA). Por otra parte, la detección de hongos micotoxigénicos se ha confiado al aislamiento tradicional y cultivo. Sin embargo, todas estas técnicas son tardadas y laboriosas. La detección microbiológica además requiere de experiencia taxonómica y que el microorganismo se encuentre viable (Edwards *et al.*, 2002).

El conocimiento cada vez mayor de los daños a la salud provocados por micotoxinas y la importancia de evitar que un lote contaminado llegue al consumidor plantean la necesidad de protocolos que permitan detectar de manera rápida y específica, así como cuantificar la presencia del hongo micotoxigénico incluso antes de que la micotoxina sea biosintetizada por completo. Actualmente la técnica de PCR permite lograrlo, basados en PCR punto final y PCR en tiempo real (qPCR). En este proyecto se realizó el análisis de secuencias de genes de interés involucrados en la vía de biosíntesis de ZEA y DON (*pks4* y *tri5* respectivamente) por medio de las técnicas de PCR y qPCR. Adicionalmente se analizó por qPCR la presencia de las secuencias de OGM (*35s* y *tnos*) para la determinación de maíz transgénicos ya que se ha planteado que un maíz con estas características, por ejemplo, el maíz Bt, inhibe los daños causados por insectos y, por lo tanto, las infecciones de hongos (Soberón y Bravo, 2007).

Este desarrollo nos permitirá la detección temprana del hongo micotoxigénico en un alimento de alto consumo en nuestro país a base de maíz y contribuirá en las buenas prácticas de comercialización y seguridad de granos y sus productos derivados.

### 3. Marco Teórico

#### 3.1 El maíz en México

Desde el punto de vista alimentario, político, económico y social, el maíz es el cultivo más importante del país (SIAP, 2007). En México, centro de origen, domesticación y diversificación del maíz (*Zea mays L.*), existen 59 razas de acuerdo con la clasificación basada en características morfológicas e isoenzimáticas (Sánchez *et al.*, 2000), que representan un significativo porcentaje de las 220 a 300 razas de maíz existentes en el continente americano (Kato *et al.*, 2009).

Este cereal cubre poco más de la mitad de la superficie agrícola sembrada, con aproximadamente 7.5 millones de hectáreas. A nivel mundial en producción de maíz México ocupa el séptimo lugar con 25,000 millones de toneladas (figura 1). (Sagarpa, 2015)

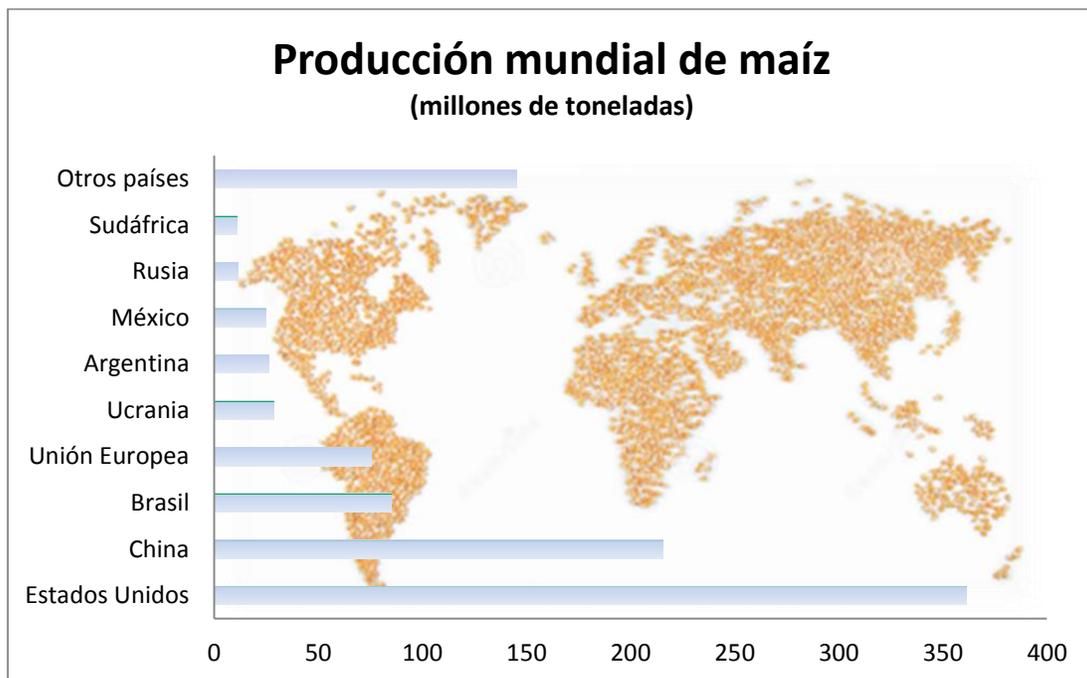


Figura1. Principales países productores de maíz.

Sin embargo, la producción a nivel nacional no es suficiente para cumplir con la cantidad de maíz que se consume en el país 34,250 millones de toneladas. Por ello en el periodo de 2014-2015 México importó 11,000 millones de toneladas provenientes de Estados Unidos (figura 2) (Sagarpa, 2015).

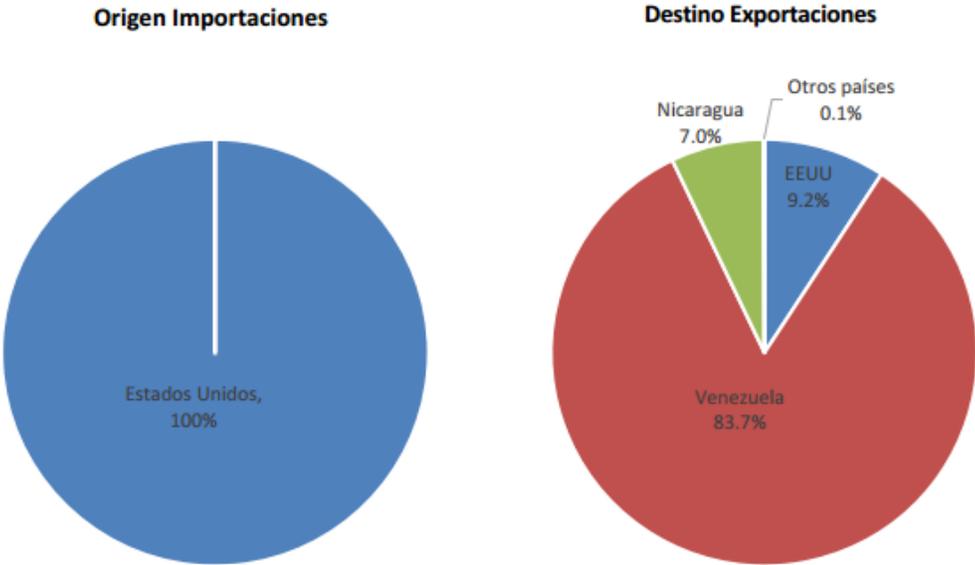


Figura 2. Principales orígenes y destinos de las importaciones y exportaciones de maíz en México, 2015 (SIAVI-Secretaría de economía).

### 3.1.1 Tortilla y Nixtamalización.

La nixtamalización del maíz, que consiste en la cocción alcalina en agua con cal, es por mucho la operación culinaria y tecnológica más sofisticada de todas y un rasgo distintivo en la cocina mesoamericana que sobrevive hasta nuestros días. No solo es la base de al menos la mitad de las preparaciones culinarias (Echeverría y Arroyo, 2000), también ha sido modernizada y adoptada por la industria de la masa y la tortilla, uno de los sectores de mayor relevancia económica en el país (SIAP, 2007). A pesar de que este proceso conduce a pérdidas de algunas vitaminas y aminoácidos por el tratamiento térmico alcalino (Bressani, 2008), la nixtamalización también induce otros cambios que desde el punto de vista nutricional son positivos, sobre todo en lo referente a la biodisponibilidad de nutrientes. Se ha reportado un

aumento significativo en el contenido de calcio (del orden de 13 veces), el cual es biodisponible prácticamente en su totalidad (Bressani, 2008). También es mayor la cantidad de fibra dietaria soluble e incrementa la biodisponibilidad de la mayoría de los aminoácidos indispensables, lo que aumenta sensiblemente el valor biológico de la proteína (Paredes-López *et al.*, 2009). Aunque se reportan pérdidas de niacina (que no se halla disponible en el maíz) de hasta 22 % después del tratamiento alcalino (Bressani, 2008), las moléculas que quedan intactas son liberadas como ácido nicotínico para su aprovechamiento, lo que destruye el efecto pelagrogénico que tienen las dietas ricas en maíz crudo o tostado (Paredes-López *et al.*, 2009).

La tortilla es uno de los alimentos predominantes en la dieta mexicana. Alrededor de 82 % de los hogares incluyen a las tortillas en su dieta, y representa 6.4 % del gasto total en alimentos (INEGI, 2010). De acuerdo con el Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social, el consumo diario *per capita* de tortilla es de 155.4 g en las zonas urbanas y hasta 217.9 g en las zonas rurales (CONEVAL, 2012). La importancia de la tortilla en la dieta no es menor, pues se trata de una excelente fuente de calorías y calcio (Serna-Saldívar y Amaya-Guerra, 2008) que puede proporcionar de 32 a 62 % de los requerimientos mínimos de hierro (Paredes-López *et al.*, 2009).

Por otro lado, con respecto a las micotoxinas, algunos reportes han indicado que, durante la cocción con cal con CaO (1-3% p/p), los niveles de actividad de aflatoxinas en tortilla disminuían 98%. La aflatoxina es la micotoxina más estudiada debido a su efecto cancerígeno en humanos, es producida principalmente por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* y se encuentran principalmente en cereales, frutos secos y leche. Estos datos de disminución se refieren a la pérdida de fluorescencia en la aflatoxina, pero cuando el pH cambia a ácido, la aflatoxina se reactiva y recupera su fluorescencia y toxicidad. El calentamiento y tratamiento con cal aplicado a los granos de maíz producen la hidrólisis del anillo de lactona de las aflatoxinas, formando sales solubles que son eliminadas durante los lavados. El cierre del anillo de lactona reactiva las aflatoxinas previamente degradadas, esto sucede cuando el pH de la masa es neutralizado resultando la masa en un pH final de 6-8, reconvirtiendo las aflatoxinas degradadas en compuestos activos. Se ha

calculado que el incremento de aflatoxinas por acidificación es de 0-18%. (Castillo-Urueta, 2011).

En 1998 Abbas y colaboradores inocularon intencionalmente las micotoxina deoxinivalenol y zearalenona en masa de maíz, después realizaron el proceso de nixtamalización para la elaboración de tortillas y midieron la cantidad de deoxinivalenol y zearalenona resultante después de dicho proceso, mediante HPLC. Los resultados arrojaron una reducción de 59-100% para zearalenona y 72-82% para deoxinivalenol. Estos valores dependen de la cantidad inicial de micotoxina inoculada en la masa antes de la elaboración de la tortilla.

### 3.1.2 Maíz transgénico.

Un organismo genéticamente modificado (OGM), es aquel cuyo material genético es manipulado en laboratorios donde ha sido diseñado o alterado deliberadamente con el fin de otorgarle alguna característica específica que no tenía. Comúnmente se les denomina transgénicos (Rubio, 2004). Los caracteres estudiados con mayor frecuencia son la tolerancia a los herbicidas, la resistencia a insectos derivada de la bacteria *Bacillus thuringiensis*, la resistencia a virus y a hongos, maduración tardía y mejora en el contenido nutricional (Cuadrado, 2008).

Las construcciones presentes en el mercado actual de OGM tienen los siguientes componentes: a) Dos fragmentos de ADN que señalan el inicio (región promotora) y el fin (región terminadora), b) El gen estructural que codifica la proteína del carácter transgénico; y c) El gen de selección, cuya función es marcar las células de los embriones de maíz que han sido transformadas para luego ser aisladas y crecidas en condiciones de cultivo de tejidos y así regenerar plantas (Turrent-Fernández *et al.*, 2009).

El promotor constitutivo 35S (derivado del virus del mosaico de la coliflor) exhibe un alto nivel de actividad transcripcional en diversos tipos de tejido vegetal, mientras que la señal de terminación es la poliadenilación del gen NOS de la nopalina sintasa del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* (T-nos) (Holden *et al.*, 2009); ambos

constituyen el llamado “método de cribado” para la identificación de alimentos derivados de plantas genéticamente modificadas. Esto es así debido a que el uso de dichos elementos reguladores como secuencias diana, hasta ahora están presentes en casi todos los OGMs autorizados (Cuadrado, 2008).

De los 185 millones de hectáreas plantadas con cultivos transgénicos a nivel mundial en 2015, 29% o 53,6 millones de hectáreas fueron destinadas a maíz transgénico. Un total de 17 países fueron los que sembraron dicho maíz, los más importantes son: EE.UU. (33,1 millones de hectáreas), Brasil (13,1 millones), Argentina (2,9 millones), Sudáfrica (1,8 millones) y Canadá (1,4 millones de hectáreas) (James, 2015).

Por su parte, los maíces mejorados son los que satisfacen en buena medida las necesidades de la agroindustria mexicana, y ocupan tan solo 20 % de la superficie total sembrada con maíz, mientras que el 80% restante corresponde a maíz nativo (SIAP, 2011). Se producen principalmente bajo sistemas de riego en el noroeste de México, en donde se registra un uso notable de agroquímicos.

### 3.1.3 Plagas y Enfermedades del Maíz.

Los insectos se convierten en plagas cuando el tamaño de la población o el daño que causan o ambos, exceden los valores normales los cuales se encuentran en la norma oficial mexicana NOM-247-SSA1-2008. A estos límites se les conoce como umbral de daño económico, el cual constituye una amenaza para las cosechas y un riesgo para la inversión del agricultor. Las plagas son capaces de infestar al maíz en cualquiera de las etapas de desarrollo y durante el almacenamiento; atacan cualquier parte de la planta, incluso el grano y se les asocia a enfermedades y a otros riesgos sanitarios, como la presencia de hongos y toxinas. Las plagas más importantes en el maíz son el grupo de las palomillas (gusano elotero, cogollero y barrenadores) y los escarabajos (gusano de raíz y de alambre, gallina ciega y gorgojos) (Gracia-Lara *et al*, 2007).

Por otro lado, las enfermedades causadas por hongos en cereales son las más comunes y extendidas. Tienen síntomas característicos que pueden aparecer en

tallos, hojas y espigas cuando la infección es severa. El maíz, debido a sus características (alto contenido de hidratos de carbono principalmente como almidón que corresponde al 72-73% de peso del grano, proteína entre un 8-11%, lípidos entre un 3-18%, minerales 1.3%) es susceptible a infecciones por varios hongos. Dentro de las principales enfermedades causadas por hongos en el maíz, se encuentra el carbón del maíz causado por *Ustilagomaydis*; tizón del maíz causado por *Exserohilum turcicum*; roya del maíz causado por *Pucciniasorghii*, y una de las más importantes, la fusariosis de la espiga de maíz por *Fusarium graminearum* y *F. culmorum* (CYMMYT, 2004).

### 3.2 El género *Fusarium*

El género *Fusarium* fue descrito hace 200 años y abarca una gran variedad de especies de importancia por ser patógenas para plantas y porque muchas de ellas producen micotoxinas, es el tercer hongo con más especies micotoxigénicas, por debajo de *Aspergillus* y *Penicillium* (tabla 1) (Glenn, 2007).

#### 3.2.1 *Fusarium graminearum*

La temperatura óptima de crecimiento de *F. graminearum* es de 24-26 °C a una Aw (actividad del agua) de 0.960. A temperatura de entre 15 a 20 °C la Aw mínima para observar crecimiento es de 0.90. La contaminación de maíz por *F. graminearum* ocurre en precosecha, desde el momento de la antesis (floración), debido a la relativamente alta actividad de agua óptima de crecimiento cuando las condiciones de humedad y temperatura son favorables (Ramírez *et al.*, 2006a).

La enfermedad causada por este hongo, la fusariosis de la espiga, se presenta en las regiones cálido-húmedas del mundo, teniendo una patogenicidad severo-fuerte. En diferentes estudios realizados para identificar organismo causal, se han aislado e identificado hasta 18 especies de *Fusarium*. El 98% de los aislados pertenecen a *Fusarium graminearum*, el 8.2% de *F. poae*; el 2.4% de *F. acuminatum*; el 1.8% de

*F. moniliforme*; el 1.6% de *F. equiseti*; y el 0.1% de *F. culmorum*, *F. avenaceum* y *F. nivale*.

Tabla 1. Especies de *Fusarium*, especies agrícolas afectadas, zona geográfica endémica y micotoxinas conocidas que producen (Adaptado de Glenn, 2007).

| <b>Especie</b>              | <b>Especie agrícola afectada</b> | <b>Zona geográfica endémica</b>  | <b>Micotoxina *</b> |
|-----------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------|
| <i>F. avenaceum</i>         | Maíz, cereales de grano pequeño. | Mundial                          | MON, BEA, FUS       |
| <i>F. crookwellense</i>     | Cereales de grano pequeño.       | Mundial                          | NIV, ZEA, FUS       |
| <i>F. culmorum</i>          | Maíz, cereales de grano pequeño. | Mundial                          | DON, ZEA, NIV, FUS  |
| <i>F. fujikuroi</i>         | Arroz                            | Mundial                          | GB, MON, BEA, FBs   |
| <i>F. globosum</i>          | Maíz                             | África                           | FBs, BEA            |
| <i>F. graminearum</i>       | Maíz, cereales de grano pequeño  | Mundial                          | DON, ZEA, NIV, FUS  |
| <i>F. kyushuense</i>        | Trigo                            | Japón                            | NIV, T2, DAS        |
| <i>F. napiforme</i>         | Mijo                             | África, Argentina                | FBs, MON            |
| <i>F. nygamai</i>           | Sorgo                            | África, Argentina                | FBs, MON, BEA       |
| <i>F. proliferatum</i>      | Maíz                             | África                           | FBs, MON, BEA, FP   |
| <i>F. pseudoanthophilum</i> | Maíz                             | África, Australia, Norte América | BEA                 |
| <i>F. pseudonygamai</i>     | Mijo                             | Mundial                          | MON, FP             |
| <i>F. subglutinans</i>      | Maíz                             | Mundial                          | MON, BEA, FP        |
| <i>F. thapsinum</i>         | Sorgo                            | Mundial                          | MON                 |
| <i>F. verticillioides</i>   | Maíz                             | Mundial                          | FBs, FUS, MON       |

\*BEA, beauvericina; DAS, diacetoxiscirpenol; DON, deoxinivalenol y sus derivados; FBs, fumonisinas; FP, fusoproliferina P; FUS, fusarina C; GB, giberelinas; MON, moniliformina; NIV, nivalenol; T2, toxina T-2; ZEA, zearalenona.

Los principales medios de diseminación del microorganismo son la lluvia y el viento. Durante la cosecha, la mayoría de las semillas infectadas son eliminadas por la trilladora, por lo que *F. graminearum* no es un patógeno de semillas muy importante; sin embargo, los granos infectados que caen al suelo y se mantienen en la superficie de este, son la fuente de inóculo para el cultivo del año siguiente. Si esos granos infectados son enterrados, pueden afectar las raíces del nuevo cultivo. La espiguilla infectada pierde clorofila rápidamente y se torna descolorida. Posteriormente toma un color rosa o salmón. Si las condiciones ambientales permanecen favorables, la infección avanza hacia las espiguillas adyacentes y, en algunos casos, puede llegar a infectar toda la espiga. *F. graminearum* además de provocar contaminación de los granos de cereales por la síntesis de deoxinivalenol (DON) y zearalenona (ZEA), produce fuertes infecciones y los granos dañados son cubiertos por el micelio del hongo y toman una apariencia de masa algodonosa de color rosa. Si la severidad del ataque es moderada, los granos pueden quedar chupados y bajos de peso, además de tomar una coloración blanquecina (Moreno y Gilchrist, 1994).

### 3.3 Micotoxinas

Los hongos utilizan para su crecimiento sustancias químicas denominadas metabolitos primarios; como pueden ser ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos. El uso de estos metabolitos primarios se asocia con la fase de crecimiento rápido. Los metabolitos secundarios son compuestos no indispensables para el crecimiento vegetativo en cultivo puro. Dentro de este grupo se encuentran las micotoxinas, las cuales actúan como antibióticos favoreciendo la prevalencia del hongo frente a otros microorganismos durante la fase estacionaria (figura 3) (Soriano del Castillo, 2007).

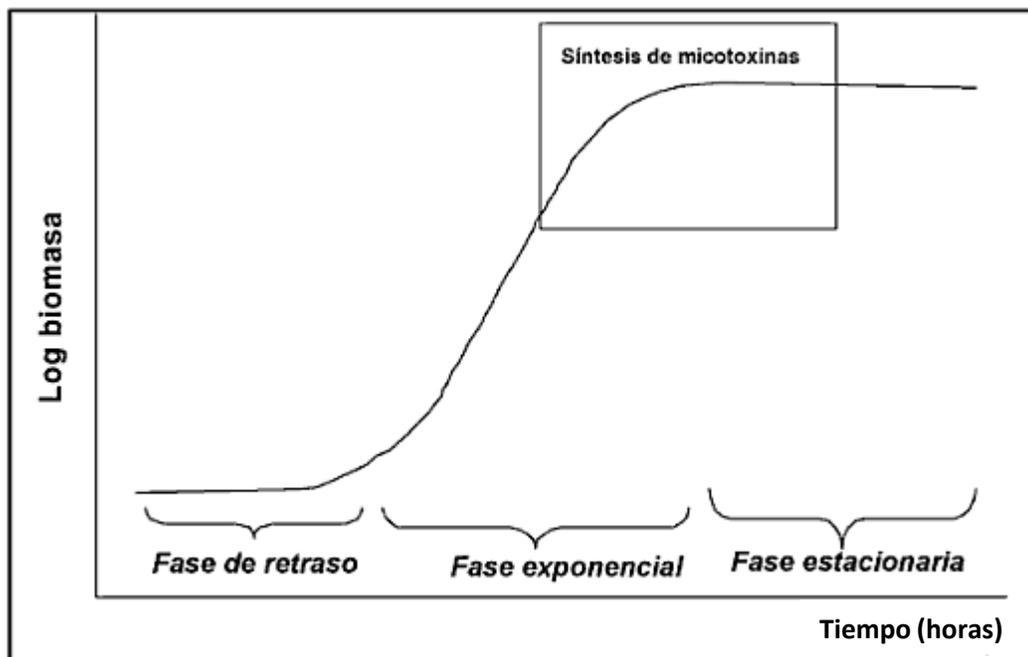


Figura 3. Fases de crecimiento fúngico y localización de la fase de la síntesis de micotoxinas (Soriano del Castillo, 2007).

Las micotoxinas son sustancias producidas por ciertos hongos. Suelen encontrarse en una gran variedad de productos agrícolas, y son los contaminantes naturales de los alimentos más extendidos a nivel mundial. Son altamente tóxicos, producen mutaciones (mutágenos), producen cáncer (cancerígenos), malformaciones en los fetos (teratógenos) y disminuyen la inmunidad (in-munosupresores). Debido a su gran variedad de efectos tóxicos, y sobre todo a su extrema resistencia al calor (termorresistencia), la presencia de las micotoxinas en los alimentos es considerada de alto riesgo para la salud humana y de los animales (Méndez A. & Moreno E, 2009).

### 3.3.1 Toxicidad

La toxicidad de las micotoxinas en el hombre radica, en general, en su toxicidad crónica, asociada al consumo de pequeñas cantidades de micotoxinas durante periodos prolongados. El riesgo de intoxicación aguda es bajo o mederado

comparado con intoxicaciones de origen microbiológico, mientras que la exposición crónica y teniendo en cuenta la severidad de dichas lesiones (especialmente cáncer), las micotoxinas presentan mayor riesgo tóxico que los contaminantes de origen antropogénico, aditivos alimentarios y plaguicidas (Figura 4) (Soriano del Castillo, 2007).

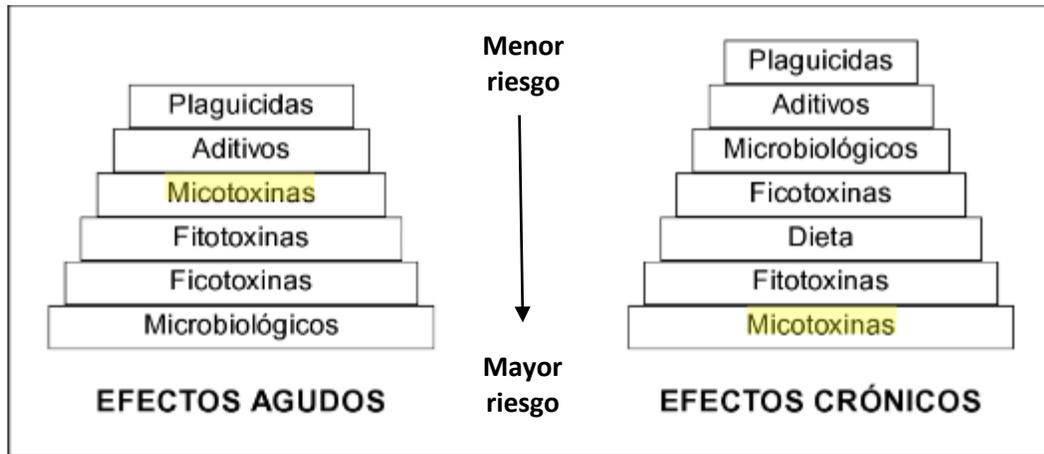


Figura 4. Riesgos de intoxicación para la salud humana. El riesgo aumenta de arriba hacia abajo de la pirámide (Soriano del Castillo, 2007).

En cuanto a la toxicidad crónica, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC; International Agency for Research on Cancer) (IARC, 2002), clasifica varias micotoxinas como carcinógenas o potencialmente carcinógenas para el hombre. En la Tabla 2 se resume la evaluación realizada por la IARC con relación al poder carcinógeno de las micotoxinas más importantes.

Se debe tener en cuenta que la presencia de estas micotoxinas en los alimentos, puede ser individual o simultánea con otras, lo que puede provocar efectos sinérgicos en su acción sobre el organismo aumentando así su toxicidad (Soriana del Castillo, 2007). Por ejemplo, aflatoxinas y fumonisinas, deoxinivalenol (u otros tricotecenos) y zearalenona aparecen frecuentemente contaminando el mismo cereal (Ibañez-Vea *et al.*, 2011).

Tabla 2. Clasificación de las micotoxinas según la IARC.

| <b>Micotoxina</b>                        | <b>Hongo productor</b>  | <b>Grupo IARC</b> |
|--|---|-------------------|
| <b>Ocratixina A</b>                      | <i>Penicillium verruscum</i>  | 2B                |
| <b>Zearalenona (ZEA)</b>                 | <i>Fusarium graminearum</i>   | 3                 |
| <b>Patulia</b>                           | <i>Penicillium expansum</i>   | 3                 |
| <b>Tricotecenos Deoxinivalenol (DON)</b> | <i>Fusarium graminearum</i><br><i>F. verticilliodes</i><br><i>F. culmorum</i> | 3                 |
| <b>Fumonisinias</b>                      | <i>Fusarium verticilliodes</i><br><i>F. proliferatum</i>                      | 2B                |
| <b>Aflatoxinas</b>                       | <i>Aspergillus flavus</i><br><i>A. parasiticus</i>                            | 1                 |

Grupo 1: Cancerígeno en humanos.

Grupo 2A: Probable cancerígeno en humanos; Existe limitada evidencia sobre humanos, pero suficiente con animales.

Grupo 2B: Posible cancerígeno; la evidencia en humanos es limitada y tampoco hay suficiente evidencia con animales de experimentación.

Grupo 3: No clasificado como cancerígeno humano y no puede incluirse en otro grupo.

Grupo 4: Probablemente no cancerígeno en humanos y no puede incluirse en otro grupo. (IARC, 2002).

### 3.4 Zearalenona

La zearalenona (ZEA) es una micotoxina que pertenece al grupo policétido. Es producida por algunas especies del género *Fusarium*, especialmente por *Fusarium graminearum* y *F. culmorum*. Es la micotoxina que está presente con mayor frecuencia en la enfermedad conocida como fusariosis. Los granos infectados por *Fusarium* pueden presentar una coloración rosa asociada con la producción de un pigmento rosa producido simultáneamente con zearalenona (ZEA) (Kim *et al.*, 2005).

La zearalenona se produce normalmente en la pre-cosecha, pero puede originarse bajo condiciones inadecuadas de almacenamiento. ZEA produce efectos

estrogénicos tanto en humanos como en animales y puede causar severos problemas de infertilidad en animales de granja, particularmente en cerdos. La zearalenona y sus metabolitos se unen a los receptores de estrogénicos ( $\alpha$  y  $\beta$ ) como mezclas antagonistas e inducen un síndrome en los animales descrito como hiperestrogenismo, el que puede observarse mediante cambios en órganos reproductivos, afecta el útero disminuyendo la hormona luteinizante y la secreción de progesterona, además se ha demostrado la disminución de la fertilidad, reducción de tamaño de la camada, disminución de la glándula adrenal, entre otras cosas (Nesic *et al.* 2010; Hewitt *et al.* 2012).

#### 3.4.1 Biosíntesis

La ZEA es producida por la ruta acetato-polimalonato. Las sintetasas policétido fúngicas (PKSs) son grandes dominios que codifican múltiples enzimas. Se han encontrado un total de 16 genes de PKS en el genoma de *F. graminearum*, 10 reductores y 6 no reductores (Kroken *et al.*, 2003).

Estudios de disrupción génica han determinado que se requieren cuatro genes estrechamente vinculados para la biosíntesis de la zearalenona que se encuentran en un cluster: PKS4, PKS13, ZEB1 y ZEB2 (Lysøe *et al.* 2006).

La vía de biosíntesis de la zearalenona (figura 5) inicia por el gen PKS4, que es un polipéptido multifuncional que contiene 6 dominios: 1)  $\beta$ -cetoacil sintetasa, 2) Aciltransferasa, 3) Proteína portadora de acil, 4)  $\beta$ -cetoacil reductasa, 5) deshidratasa y 6) enoil reductasa, el cual cataliza la condensación de una unidad de acetil-CoA y 5 unidades de malonil-CoA, lo que resulta en la formación de un hexacétido. Este hexacétido es entonces detectado por la proteína del gen no reductor PKS13 y funciona como una unidad de arranque para la extensión de la cadena policétida a través de 3 iteraciones de malonil-CoA adicionales, lo que resulta en un nanocétido, que por medio de un dominio de ciclación presente en PKS13 realiza el plegamineto del C-2 y C-7 para la formación de una macrolactona. La macrolactona a continuación se somete a dos procesos de ciclación intermolecular, formando así

un anillo aromático y una estructura de anillo macrólido y enlace lactona. La conversión final de zearalenol a zearalenona es catalizada por la isoamil alcohol oxidasa (ZEB2) que transforma el grupo hidroxilo unido a macrólido en una cetona. El gen ZEB1 contiene un dominio de una región básica de cierre de leucina y funciona como un factor de transcripción específica, que controla la expresión de toda la vía de biosíntesis (Kim *et al.*, 2005; Gaffoor y Trail, 2006; Desjardins y Proctor, 2007).

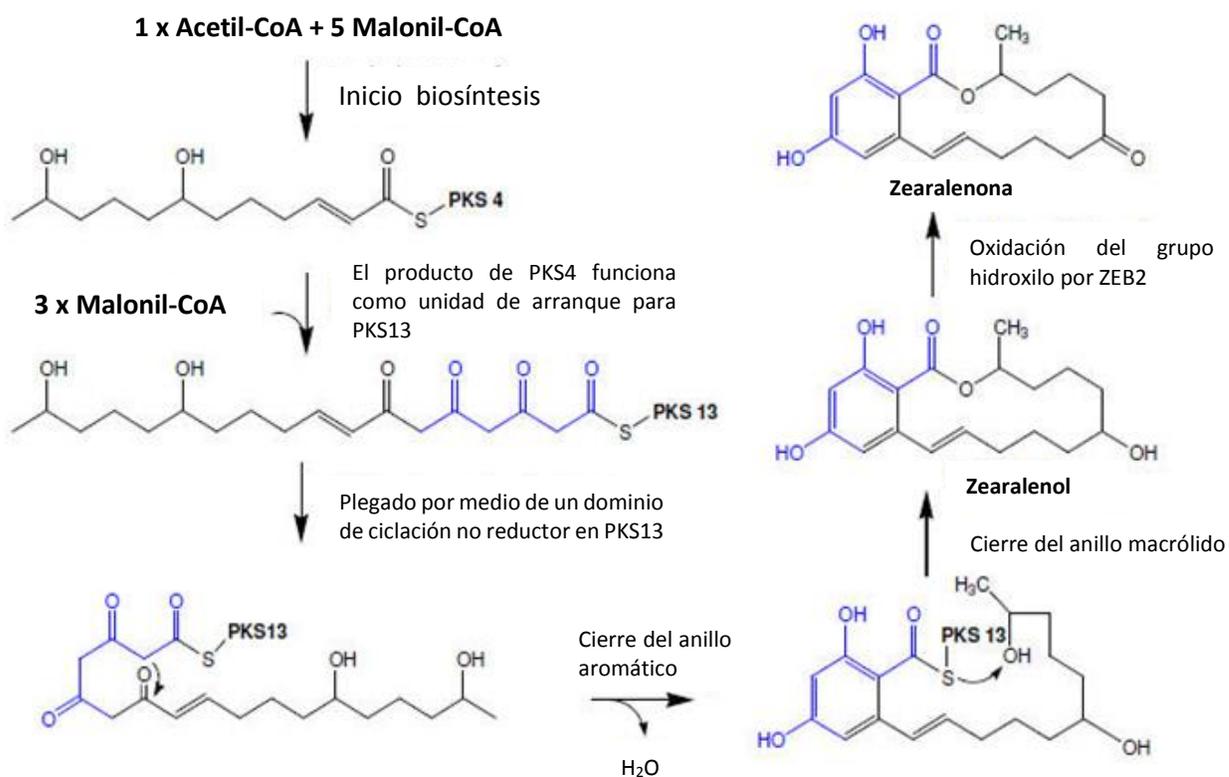


Figura 5. Vía de biosíntesis de zearalenona (Kim *et al.*, 2005).

### 3.5 Deoxinivalenol

El deoxinivalenol (DON) pertenece a la familia de los tricotecenos de tipo B (posee un grupo carbonilo en el carbono 8). Es producida por especies de *Fusarium*, principalmente *F. graminearum* en áreas templadas y húmedas, y *F. culmorum* en aquellas áreas donde prevalecen condiciones ambientales frías, tales como el norte de Europa (Miller *et al.*, 2001).

El DON es una de las micotoxinas más fácilmente encontrada en los granos, aunque menos tóxico que otros tricotecenos. Es la micotoxina más frecuente y se encuentra comúnmente en cebada, maíz, centeno, semillas de girasol y trigo (Parent-Massin, 2004). Su toxicidad se debe a que son potentes inhibidores de la síntesis proteica en eucariotas al unirse al ribosoma e inhibir la actividad peptidil-transferasa en la traducción (Brown *et al.*, 2001).

La ingestión de DON ha ocasionado brotes de micotoxicosis agudas en la población de la India, China y zonas rurales de Japón. Un grave brote surgido en China entre los años 1984-1985 debido al consumo de maíz y trigo mohosos provocó que en un plazo de entre cinco y treinta minutos se presentaran síntomas de náuseas y vómitos, de ahí que al DON se le conozca vulgarmente con el nombre de vomitoxina. Además, se presentaron dolores abdominales, diarrea, mareos y cefaleas. En cerdos y otros animales de granjas se observa pérdida de peso y rechazo a la comida (Luo, 1988).

#### 3.5.1 Biosíntesis

Se han descrito varios genes implicados en la biosíntesis de los tricotecenos, la mayoría de ellos localizados en un grupo de genes. El gen Tri5 codifica para una tricodieno sintasa, que cataliza el primer paso en la biosíntesis de los tricotecenos (ciclación). La secuencia de nucleótidos del gen Tri5 se ha caracterizado en varias especies de *Fusarium* (Brown *et al.*, 2001); todas las especies de *Fusarium* capaces de producir tricotecenos son portadores del gen Tri5 (Niessen y Vogel 1998).

La vía de biosíntesis de tricotecenos (figura 6) fue identificada en la mayoría de los genes de *Fusarium* directamente implicados en la síntesis de oxinivalenol, nivalenol y la toxina T-2. Estos genes se sitúan en un cluster (TRI) designado como núcleo tricoteceno (Brown *et al.*, 2002). Tri5 es el centro topográfico de dicho cluster donde además se encuentran al menos 12 genes, y es necesaria la expresión de 10 de ellos para la producción de la toxina (2 genes reguladores, 7 genes de la vía de biosíntesis y un gen transportador) (Kimura *et al.*, 2007).

La vía comienza con la ciclación del sesquiterpeno, pirofosfato de farnesilo (FPP) a un tricodieno catalizada por la enzima tricodiendo sintasa codificada por el gen Tri5. La citocromo P450 monooxigenasa con carácter multifuncional, codificada por el gen TRI4, cataliza los siguientes 4 pasos de oxigenación (hidroxilaciones y epoxidaciones en diferentes posiciones) dando lugar a isotricotriol (McCormick *et al.*, 2006), posterior a dos isomerizaciones no enzimáticas y una ciclación, se forma el isotricodermol, que forma el esqueleto de la estructura del tricoteceno. A continuación, el esqueleto es acetilado e hidroxilado por las enzimas que codifican los genes TRI101 y TRI11, respectivamente, dando lugar a la 15- decalonectrina. Este intermediario puede ser sustrato para producir DON (tras una hidroxilación y la adición del grupo ceto) o después de una acetilación puede dar lugar a la calonectrina (Alexander *et al.*, 2009).

La calonectrina es el sustrato para la formación de NIV y DON, además del 3,15-diacetildeoxinivalenol (3,15-ADON), 15-acetildeoxinivalenol (15-ADON) y 4-acetilnivalenol (4-ANIV). La expresión de los genes TRI7 y TRI13 es necesaria para la producción de NIV, la ausencia de funcionalidad de estos genes da lugar a la producción de DON (Lee *et al.*, 2002). Esto confiere una variabilidad a nivel intraespecífico, ya que diferentes especies de *Fusarium* pueden ser o bien quimiotipo NIV o quimiotipo DON (Chandler *et al.*, 2003). Para el caso de *Fusarium graminearum*, en Norteamérica Ward *et al.*, (2008) determinaron que el 3-ADON era el quimiotipo más común. Sin embargo, también se detectó DON, 3,15-ADON y NIV. Los aislamientos de la población pertenecientes al quimiotipo 3,15-ADON son más agresivos y con la particularidad de poder acumular más DON en los granos infectados.

Además de los genes biosintéticos que intervienen en la ruta, existen otros genes que son necesarios que se expresen con el fin de llevar a cabo la producción de los tricotecenos. Estos genes pueden ser genes reguladores (TRI6 y TRI10), o de transporte (TRI12) y dos genes con función desconocida (TRI9 y TRI4) (Brown *et al.*, 2001)

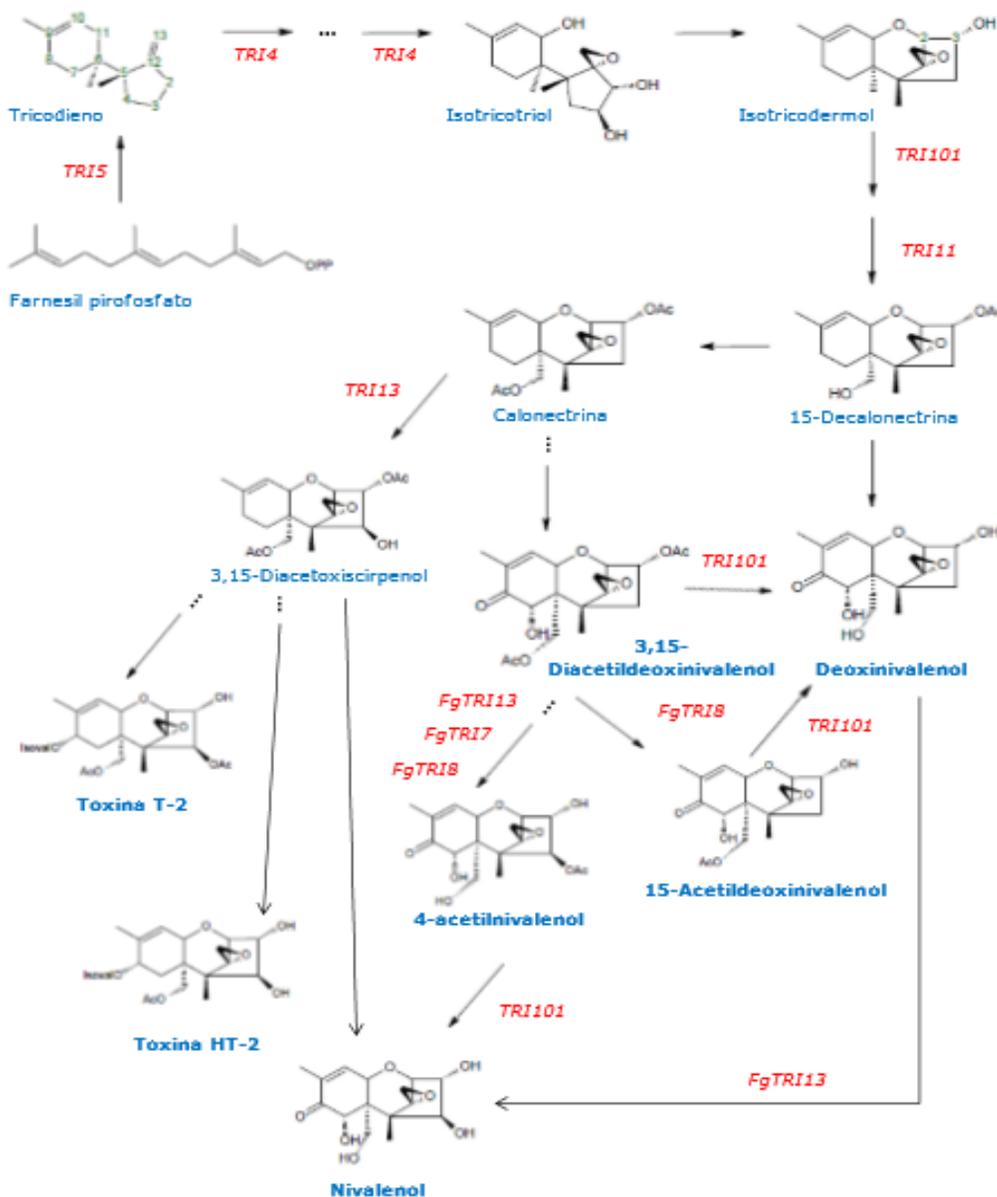


Figura 6. Esquema de la biosíntesis de tricotecenos. Fg se designa a los genes que interfieren en la vía de *Fusarium graminearum*. Diagrama adaptado de Foroud y Eudes, 2009

### 3.6 PCR punto final

PCR son las siglas en inglés de “Polymerase Chain Reaction” o Reacción en Cadena de la Polimerasa. Es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa. Cuando se realiza una reacción de PCR se simula lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el ADN y así en un tubo se mezclan todos los ingredientes necesarios para hacerlo: 1) la polimerasa, 2) el ADN del organismo que se desea estudiar (donde se encuentra el fragmento que se quiere sintetizar), 3) los oligonucleótidos que son secuencias que flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta, 4) los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina) que son los sustratos de la nueva cadena de ADN y estos se deben de añadir en concentraciones iguales, 5) Iones de magnesio ( $Mg^{2+}$ ) que son un cofactor de la polimerasa y 6) una solución amortiguadora que mantiene el pH de la reacción.

Cada ciclo de la PCR se lleva a cabo en tres etapas principales (Figura 7). 1) Desnaturalización: en esta etapa, las cadenas de ADN desnaturalizadas térmicamente a una temperatura de 95 °C, el tiempo va a depender de la secuencia del templado, al final se tendrán las dos cadenas en forma sencilla. 2) Hibridación: en esta etapa se lleva a cabo el alineamiento de una pareja de oligonucleótidos complementarios de la región blanco que flanquean por ambos extremos el fragmento de interés formando una pequeña región de doble cadena; para que se forme el complejo templado-oligonucleótido es importante que la temperatura de fusión ( $T_m$ ) sea la óptima, ésta generalmente oscila entre 50-60 °C. 3) Extensión: en esta etapa, la polimerasa actúa sobre el complejo templado-oligonucleótido y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb). La magnitud de amplificación de una

secuencia específica de ADN es de  $2^n$ , donde  $n$  es el número de ciclos, de esta manera las secuencias originales se van incrementando de manera exponencial (Mcpharsony Moller, 2000) (Tamay de Dios, 2007).

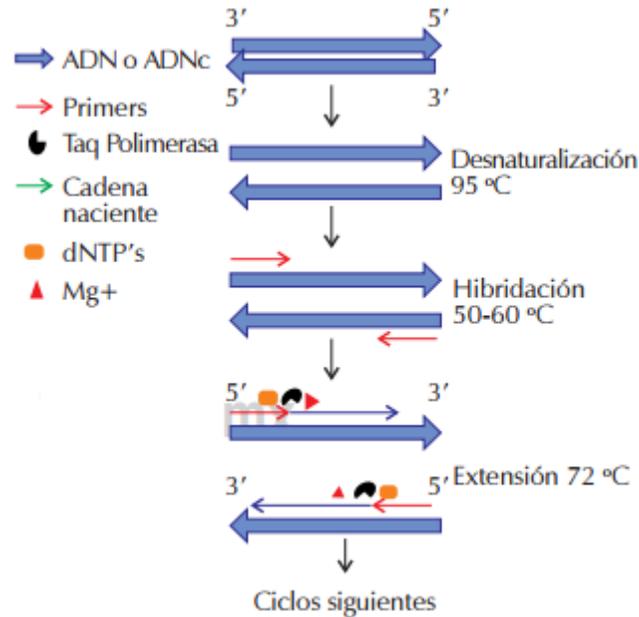


Figura 7. Pasos en un ciclo de la reacción en cadena de la polimerasa (Tamay de Dios, 2007).

### 3.7 PCR tiempo real

El principio de la técnica se basa en la PCR punto final, sólo que la forma en cómo se detectan y analizan los productos de la amplificación es diferente. El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción. Por su parte, el término cuantitativo hace referencia a que es posible cuantificar la cantidad de ADN en la muestra, a diferencia de la PCR punto final. Precisamente, estas últimas dos características representan grandes ventajas de la PCR en tiempo real, ya que el producto de amplificación es monitoreado conforme transcurre la reacción sin que haya la necesidad de que sea manipulado en un gel de agarosa (Bustin, 2005). Los fluoróforos utilizados para seguir la amplificación del ADN durante la PCR en tiempo real pueden ser de dos tipos: a) fluoróforos con afinidad por el ADN y b) sondas específicas para fragmentos

del ADN, es decir, que sólo emiten fluorescencia cuando se ha amplificado un fragmento del ADN de interés (blanco).

### 3.7.1 Fluoróforos con afinidad por el ADN

Estos fluoróforos emiten fluorescencia cuando se unen al ADN. La intensidad de la fluorescencia se incrementa proporcionalmente a la concentración del ADN de doble cadena. Inicialmente, se utilizaba bromuro de etidio, pero su uso no es recomendable porque no discrimina de manera eficiente entre ADN de cadena doble o sencilla. Por otro lado, al ser un agente que se intercala en el ADN, se ha reportado que interfiere con la polimerización. También, existen otros como BEBO, YOYO-1 y TOTO-1 pero no son usados cotidianamente. El compuesto más utilizado es SYBR Green, el cual se une al surco menor del ADN de doble cadena, emitiendo 1000 veces más fluorescencia que cuando está libre en solución. El incremento de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida en SYBR Green (figura 8). Este sistema es muy económico y permite el empleo de un solo fluoróforo en diferentes ensayos. Sin embargo, presenta varias desventajas, ya que no es posible hacer reacciones múltiples o multiplex (en donde se amplifican varios genes en la misma reacción), además de que la señal emitida no es específica, porque el fluoróforo se une a cualquier amplicón del ADN, incluyendo dímeros de oligonucleótidos. Por lo anterior, para un uso correcto del SYBR Green en la PCR cuantitativa es obligatorio verificar la especificidad de la señal, analizar la curva de disociación y comprobar que la señal de fluorescencia obtenida se debe sólo a la amplificación del producto único (figura 9) (Lutfalla y Uze, 2006).

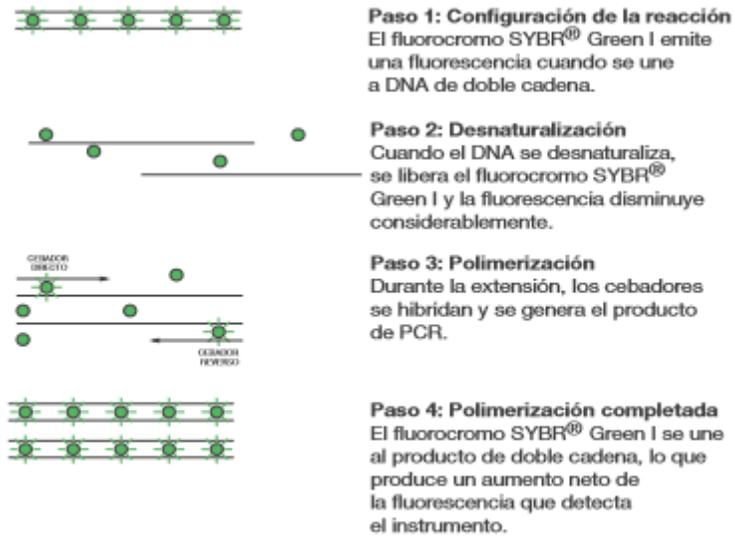


Figura 8. Esquema de la reacción de PCR tiempo real, utilizando como fluoróforo SYBR Green (Applied Biostymes, 2010)

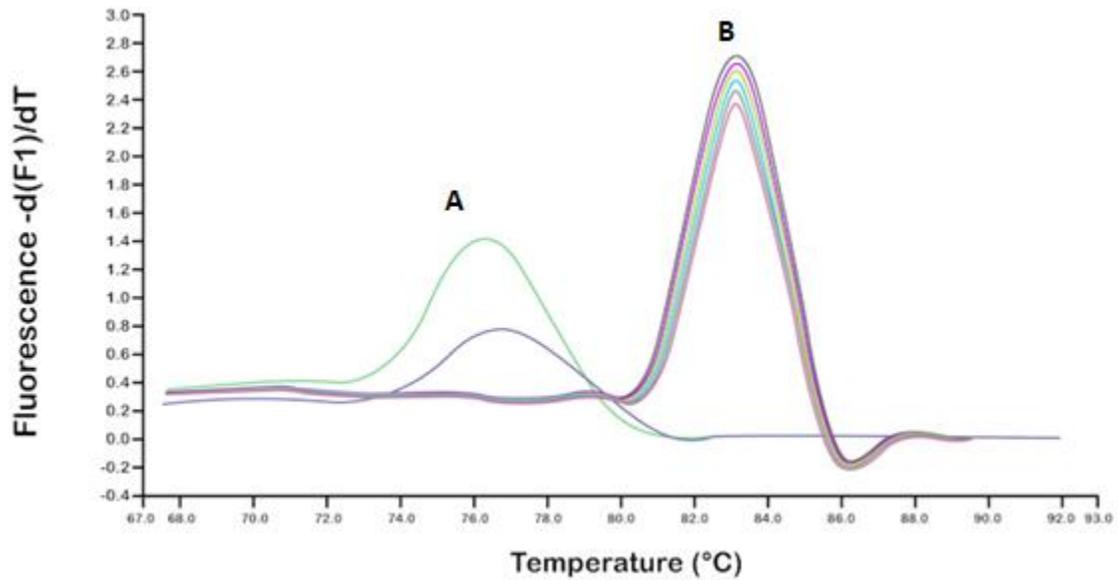


Figura 9. Curva de disociación en un qPCR (SYBR Green), donde A) formación de dímeros de oligonucleótidos y B) formación de un solo pico, correspondiente con el producto esperado (Lutfalla y Uze, 2006).

### 3.7.2 Métodos de análisis

La PCR en tiempo real se divide en 4 fases principales (Figura 10): a) La fase inicial o basal, en la cual la fluorescencia de los primeros ciclos 10-15 es mínima y no rebasa la señal del medio circundante. En esta fase se calcula la línea base, en la cual todo por debajo de la línea base es inferior al nivel de detección del equipo de tiempo real; b) La fase exponencial temprana, en la cual la fluorescencia producida por el producto de PCR rebasa el umbral definido por el equipo, o por el investigador. El ciclo en el cual la fluorescencia ha alcanzado el umbral definido se conoce como Ct (CycleThreshold o Ciclo Umbral). Este valor es representativo de la cantidad inicial de templado que hay en la reacción y es usado en los cálculos posteriores. El valor de Ct es inversamente proporcional al número de copias del ADN templado en la reacción; c) La fase lineal, en la cual se alcanza un estado de amplificación óptima, en donde la cantidad de producto de PCR se duplica en cada ciclo y finalmente; d) La fase estacionaria, en la cual los reactivos y el equipo han alcanzado el límite de detección y la reacción ha terminado (Wong & Medrano, 2005).

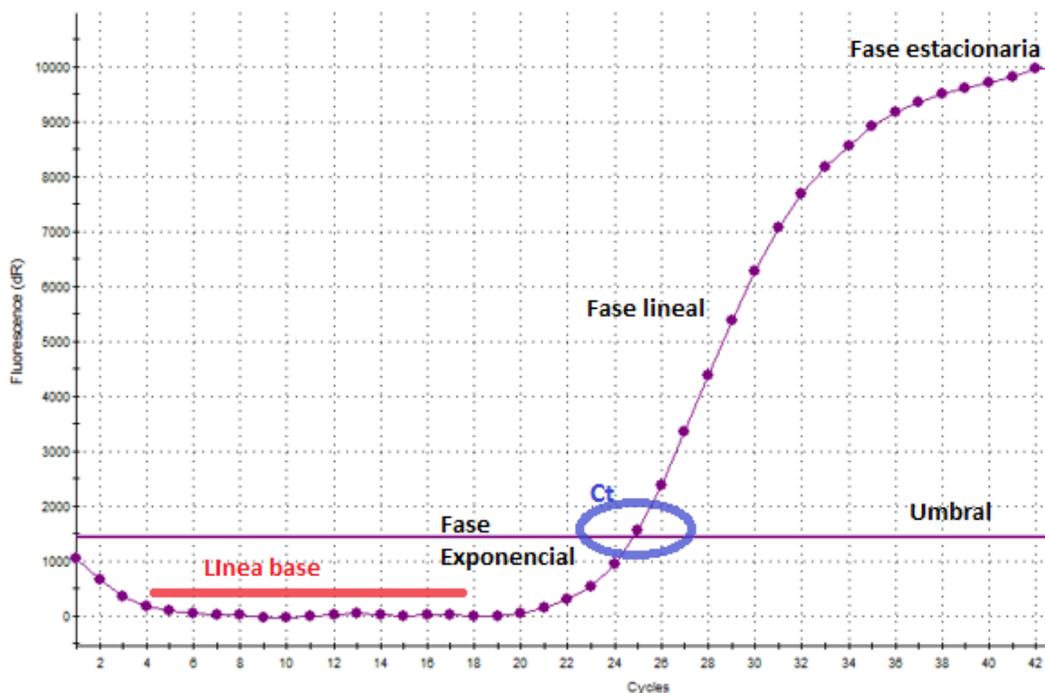


Figura 10. Diferentes etapas en PCR tiempo real (Wong & Medrano, 2005).

Idealmente, cada ADN blanco en la muestra original se duplicada de ciclo en ciclo, lo que equivale a una eficiencia del 100%, La eficiencia de la reacción de la PCR se calcula utilizando una curva proveniente de la amplificación de una dilución serial de un estándar (Figura 11A). Los valores de Ct de las curvas obtenidas se grafican contra el logaritmo del factor de dilución del número de copias del molde o de la concentración de la muestra (Figura 11B). Deben hacerse triplicados o cuadruplicados de cada dilución y la desviación estándar entre los diferentes puntos debe tener un valor de Ct menor a 0.2 (Wong y Medrano 2005).

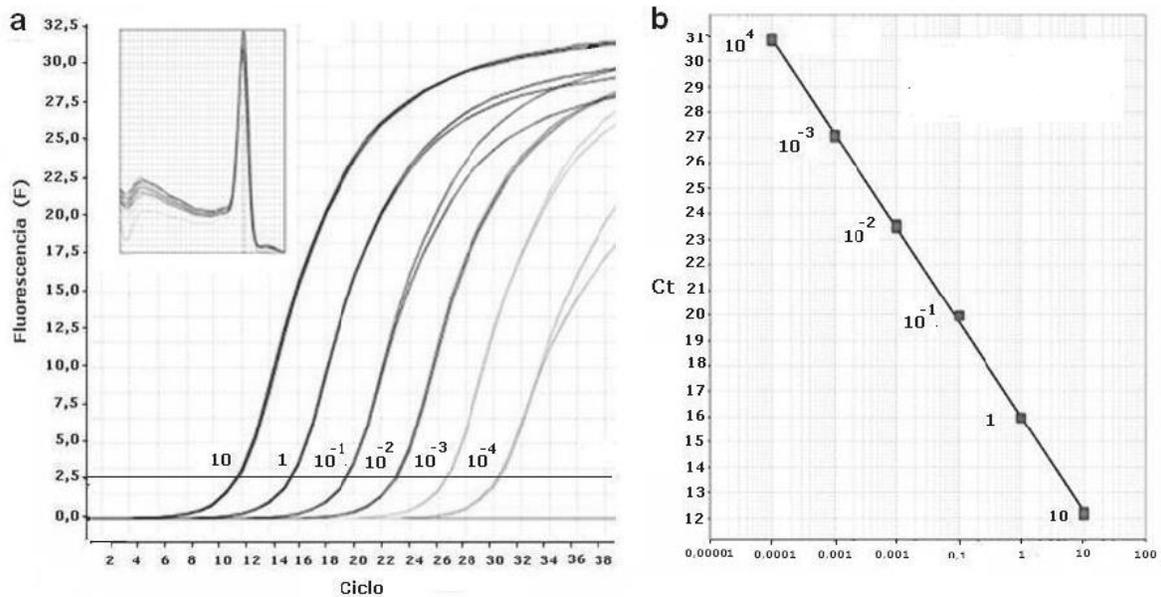


Figura 11: A) curva estándar de amplificación, generada a partir de diluciones seriadas de ADN de una muestra con concentración conocida. B) Curva estándar. La recta obtenida permite calcular las concentraciones desconocidas de las muestras usando la ecuación:  $Y = mX + b$  ( $Ct = m\log X + b$ ).

También, permitirá calcular la eficiencia de la reacción ( $E = 10^{-1/m} - 1$ ).

Y: Ct que se obtiene del termociclador, m: pendiente, X: concentración de ADN, b: ordenada al origen.

### 3.8 Antecedentes del grupo de trabajo.

González-Osnaya & Farrés (2011), llevaron a cabo la detección y cuantificación de *Fusarium graminearum* en 30 muestras de trigo mediante PCR punto final usando como gene blanco Tri5 y el gen PKS4. El PCR indicó la presencia del gen Tri5 y PKS4 en 16.7% y 23.3% de las muestras, respectivamente y un 10% de las muestras era positiva para ambos genes. Para cuantificar emplearon cromatografía líquida acoplada a un detector UV, donde el DON fue detectado en 68.6% y la ZEA en 45.7% de las muestras, donde se obtuvo una amplificación positiva.

Ramírez Erick y colaboradores (2012), desarrollaron un protocolo mediante qPCR por química de SYBR Green para la detección de ZEA en trigo, donde obtuvo un límite de cuantificación de 0.01 ng para el gen *tri5* y *βtub* (con los mismo primer que se emplearon en este estudio) y un límite de cuantificación de 0.001 ng de ADN de *Fusarium graminearum*.

### 3.9 Justificación.

La importancia de evitar que un lote contaminado llegue al consumidor plantea la necesidad de protocolos que permitan detectar y/o cuantificar de manera rápida y específica la presencia del hongo micotoxigénico, incluso antes de que la micotoxina sea biosintetizada por completo

## 4 Hipótesis

La detección de los genes *pks4* y *tri5*, que participan en la vía de biosíntesis de micotoxinas de *Fusarium graminearum*, por medio de las técnicas de PCR y PCR tiempo real, indicará que las muestras se encuentran contaminadas por las esporas de este moho fitopatógeno y que existe una alta probabilidad de que se encuentren micotoxinas en el alimento analizado, con la excepción de alimentos OGM.

## 5 Objetivos

### 5.1 Objetivo Principal

Detección y cuantificación del gen *pks4* implicado en la biosíntesis de zearalenona, así como del gen *tri5* implicado en la biosíntesis de deoxinivalenol, y de secuencias de OGM en tortillas de maíz.

### 5.2 Objetivos Particulares

Identificar la presencia de los genes a analizar en las cepas fúngicas de referencia, por PCR punto final y PCR tiempo real.

Evaluar la especificidad de los cebadores diseñados.

Realizar curvas de disociación y curva estándar, los cuales cumplan con los parámetros adecuados para poder ser usados en la detección y cuantificación de los genes.

Establecer el límite de detección, contaminando artificialmente muestras con *Fusarium graminearum*.

Detección de secuencias de OGM en totillas de maíz.

## 6 Metodología

Para alcanzar los objetivos planteados, se propone la metodología que se ilustra en la figura 12.

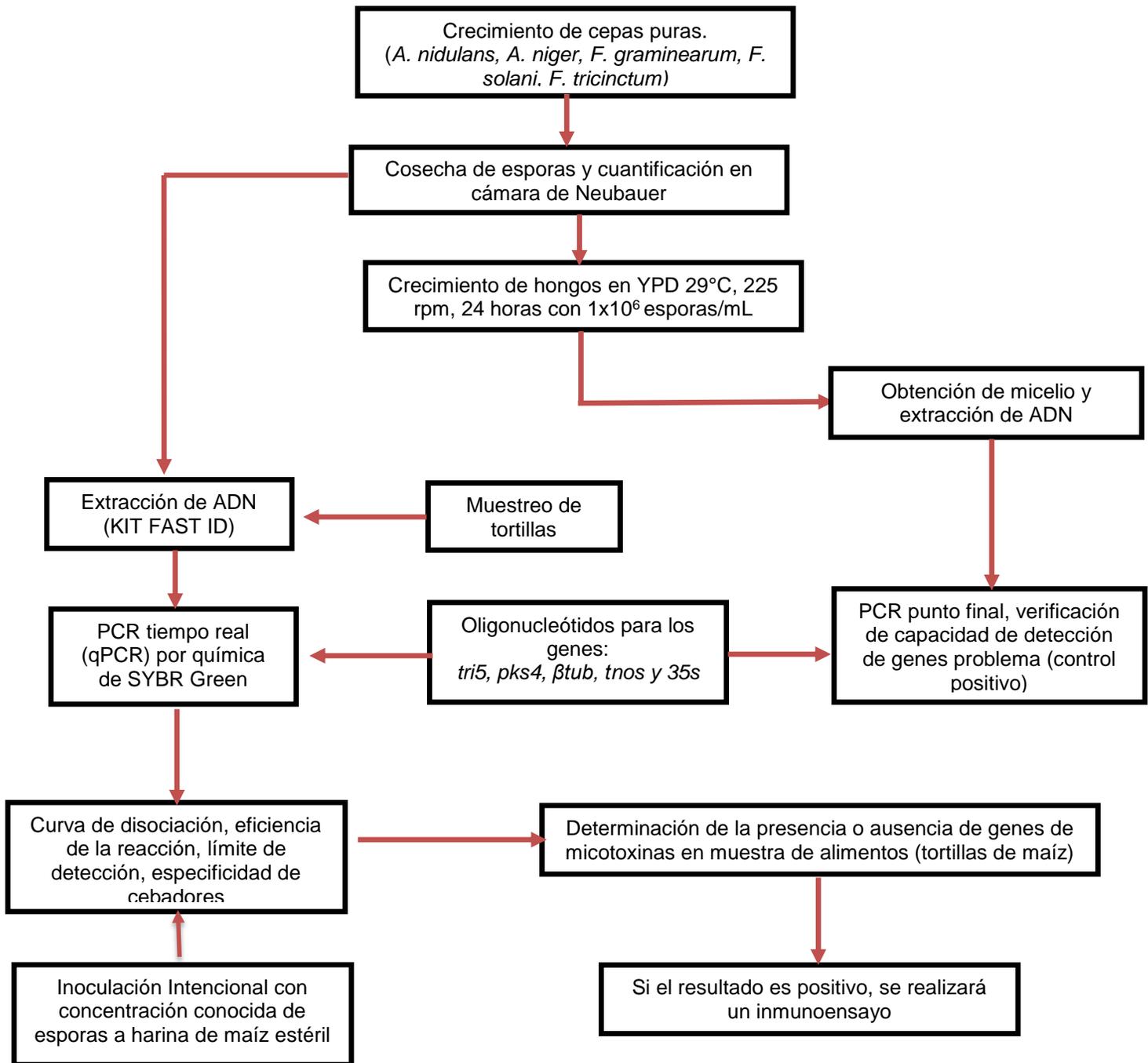


Figura 12. Diagrama general de la estrategia para la determinación de DON y ZEA en tortillas de maíz.

## 6.1 Crecimiento de cepas puras

Se procedió a reactivar las cepas fúngicas para poder obtener la cosecha de esporas. *A. nidulans* y *A. niger* se encontraban en gránulos de sílica gel, *F. graminearum* en solución acuosa y *F. solani* y *F. tricinctum* en medio PDA adquiridas del IPN. El proceso para que el hongo crezca y esporule toma aproximadamente 10 días (eso varía dependiendo de la especie ya que en el caso de *F. graminearum* fueron necesarios 20 días para producir esporas). Todos los hongos se inocularon en medio PDA, a excepción de *A. nidulans* que se inoculó en medio mínimo.

La concentración de los componentes que se utilizan para preparar un litro de medio mínimo es la siguiente: 50 mL de solución de sales 20X ( $\text{NaNO}_3$ , 12 g,  $\text{KCl}$  1.04 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.04 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3.04 g,  $\text{H}_2\text{O}$ , 100 mL, el cual se esteriliza a  $121^\circ\text{C}$  por 15 min); glucosa 10 g, 1 mL de solución de elementos traza 100X ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2.20 g,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 1.10 g,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.50 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.50 g,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.16 g,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.16g,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.11g, EDTA, 5.0 g, añadir en dicho orden en 80 mL de agua destilada y calentar a ebullición, enfriar y aforar a 100 mL y guardar en un envase de vidrio ámbar); metionina, 0.11 g, 5 mL de arginina, 16.8% (p/v), 0.5 mL de biotina 0.05% disuelta en etanol (todos los reactivos se prepararon con agua previamente esterilizada). Para la elaboración de placas se agregaron 15 g de agar, el pH del medio se ajustó a 6.5 con NaOH y se esterilizó (Castro-Ochoa, 2014).

## 6.2 Cosecha de esporas y cuantificación en cámara de Neubauer.

Para la recolección de esporas se adicionó un volumen de 5 mL de Tween 80 al 0.1% directamente sobre cada caja. Se rasparon las cajas con un asa micológica y se recuperaron esporas en un tubo desechable Falcon de 50 mL. Se centrifugó durante 15 min a 8,500 rpm a  $4^\circ\text{C}$ , se desechó el sobrenadante, se adicionaron 10 mL de agua estéril, desionizada y filtrada en membrana Millipore de 0.22nm y se ajustó a un pH de 7. Se volvió a centrifugar con las condiciones anteriores (por

triplicado). Finalmente, se resuspendieron las células en 5 mL de agua desionizada y estéril y se almacenaron a 4°C.

Se realizó el conteo de esporas con la ayuda de la cámara de Neubauer y microscopio y se procedió a inocular  $1 \times 10^6$  esporas/mL en 50 mL de medio YPD (extracto de levadura, peptona y dextrosa). Se dejó crecer a 29°C a 225 rpm por 24 horas para colectar micelio.

### 6.3 Obtención de micelio y extracción de ADN

Una vez que se obtuvo el micelio del medio YPD, se filtró con ayuda de gasas estériles y se realizó la extracción de ADN como lo describen González Osnaya & Farrés, (2011), con una modificación en el paso de lisis, pues se empleó el equipo TissueLyser. Este método consiste en pesar 350 mg de micelio y colocarlo en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. El micelio fue suspendido en 500  $\mu$ L de una solución, la cual contenía 0.2M Tris-HCl (pH 7.5), 0.5M NaCl, 0.01M EDTA y 1% SDS. Se agregó una perla de tungsteno para romper la pared celular y exponer el material genético, los tubos se colocaron en el equipo TissueLyser por 2 min a 30Hz. Después, los tubos fueron centrifugados durante 10 min a 11,000 rpm. Posteriormente, los sobrenadantes fueron decantados a nuevos tubos y el procedimiento de extracción fue repetido. El sobrenadante recolectado se trató con RNasa (SIGMA), la cual se dejó actuar por 1 hora a temperatura ambiente. Un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1, v/v) (SIGMA) fueron agregados a cada tubo, los tubos fueron colocados brevemente en vórtex y centrifugados durante 5 min en una microcentrífuga. La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo y extraída nuevamente con un volumen igual de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1, v/v). Los tubos fueron mezclados vigorosamente y centrifugados durante 5 min a 11,000 rpm. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo Eppendorf y 2.5 volúmenes de isopropanol frío fueron agregados para la precipitación de ADN. Los tubos fueron incubados a -20°C durante toda la noche, y centrifugados a 4°C por 10 min a 14,000 rpm. Los pellets fueron lavados dos veces con etanol frío al 70%, y resuspendidos en agua estéril grado biología molecular

(MO BIO). La pureza y concentración del ADN extraído se analizaron midiendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm, por medio del programa Gen5 Take3 (BioTek). La calidad del ADN extraído se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) teñido con bromuro de etidio. El ADN extraído fue almacenado a -4 °C.

#### 6.4 Muestreo

Se realizó el muestro en 3 tortillerías y 3 supermercados de las delegaciones Coyoacán, Azcapotzalco y Benito Juárez en la Ciudad de México. Se tomó 1 kg por cada muestra. Dichas muestras fueron colocadas en un desecador donde circulaba aire caliente por 24 horas, una vez secas las muestras se molieron en una licuadora para obtener la harina de maíz. Se realizó un cuarteo de la muestra total de harina para finalmente tomar una muestra representativa de 200 mg para la extracción de ADN siguiendo el protocolo del proveedor del Kit FastID. Se realizaron dos extracciones de ADN por muestra de harina de manera independiente.

#### 6.5 Oligonucleótidos.

Se empleó la siguiente lista de oligonucleótidos (tabla 3)

#### 6.6 PCR punto final.

Se llevó a cabo la reacción en una mezcla de 50 µL de acuerdo a la tabla 4.

La amplificación del ADN se realizó en un termociclador Applied Biosystems VERITI®, usando inicialmente 5 minutos de desnaturalización a 95 °C, seguido por 35 ciclos que incluyeron 1 minuto de desnaturalización a 95 °C, 50 segundos a 60 °C para alineamiento de oligonucleótidos; 1 minuto de extensión a 72 °C seguido por una extensión final de 10 minutos a 72 °C. Los amplicones fueron observados mediante un gel de agarosa al 1% (p/v), teñidos con bromuro de etidio y observados a luz UV.

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos, tamaño del producto esperado y gen blanco.

| Nombre oligonucleótido | Gen blanco                                  | Secuencia                 | Inicio | Alto | Tamaño de producto (bp) | Referencia             |
|------------------------|---|---------------------------|--------|------|-------------------------|------------------------|
| <b>PKS4Fw</b>          | Gen policétido sintasa                      | TGCTGGCGGTGTCGGAATGATC    | 672    | 693  | 200                     | Ramírez 2012           |
| <b>PKS4Rv</b>          | (pks4) <i>Gibberellazeae</i>                | GGATGACTGCCCTGATGTTGTC    | 871    | 850  |                         |                        |
| <b>TRI5Fw</b>          | Gen tricodieno sintasa                      | CTACACTCGTCTAAGCAGATGGTT  | 858    | 881  | 162                     | Ramírez 2012           |
| <b>TRI5Rv</b>          | (tri5) <i>Gibberellazeae</i>                | CTCTGTATCCTTATCCTTGACCTT  | 1019   | 996  |                         |                        |
| <b>βTUBFw</b>          | Gen beta-tubulina                           | AGGGTAACCAAATCGGTGCTGCTT  | 216    | 239  | 175                     | Ramírez 2012           |
| <b>βTUBRv</b>          | <i>Fusarium graminearum</i>                 | GCCTACATGCGTGAGCTTGTGT    | 369    | 390  |                         |                        |
| <b>35SFw</b>           | Promotor del virus del                      | CGTCTTCAAAGCAAGTGGATTG    |        |      | 79                      | JRC, 2010 <sup>a</sup> |
| <b>35SRv</b>           | mosaico de la coliflor (CaMV)               | TCTTGCGAAGGATAGTGGGATT    |        |      |                         |                        |
| <b>T-nosFw</b>         | Gen terminador nopalín                      | CATGTAATGCATGACGTTATTTATG |        |      | 84                      | JRC, 2010 <sup>c</sup> |
| <b>T-nosRv</b>         | sintasa: <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . | TTGTTTTCTATCGCGTATTAAATGT |        |      |                         |                        |

Tabla 4. Volúmenes agregados de los reactivos usados para la PCR punto final (Ramírez, 2012).

| Reactivo             | Concentración Inicial | Concentración final | Volumen agregado (μL) |
|----------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|
| Buffer de Reacción   | 10X                   | 1X                  | 5                     |
| Polimerasa Pfu       | 2.5U/L                | 1.25 U              | 0.5                   |
| dNTPs                | 10 mM                 | 0.2 mM              | 1                     |
| Primer Forward       | 10 mM                 | 0.2 mM              | 1                     |
| Primer Reverse       | 10 mM                 | 0.2 mM              | 1                     |
| ADN molde            | 20 ng/μL              | 100 ng              | 5                     |
| Agua                 |                       |                     | 36.5                  |
| <b>Volumen final</b> |                       |                     | <b>50</b>             |

## 6.7 PCR tiempo real.

Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 12.5  $\mu\text{L}$  (tabla 5).

Tabla 5. Volúmenes agregados de los reactivos usados para la qPCR (Ramírez, 2012)

| Reactivo                     | Concentración Inicial | Concentración final | Volumen agregado ( $\mu\text{L}$ ) |
|------------------------------|-----------------------|---------------------|------------------------------------|
| SYBR Green PCR<br>Master Mix | 2X                    | 1X                  | 6.25                               |
| Rox Low                      |                       |                     | 0.25                               |
| Primer Forward               | 10 mM                 | 0.2 mM              | 0.25                               |
| Primer Reverse               | 10 mM                 | 0.2 mM              | 0.25                               |
| ADN molde                    | 20 ng/ $\mu\text{L}$  | 100 ng              | 5                                  |
| Agua                         |                       |                     | 0.5                                |
| <b>Volumen final</b>         |                       |                     | <b>12.5</b>                        |

El qPCR fue realizado en un Sistema de PCR tiempo real 7500 de Applied Biosystems, y usando la master mix SYBR Green PCR (Kappa). Cada pozo contenía los reactivos necesarios mostrados en la tabla 3, llegando a un volumen final de 12.5  $\mu\text{L}$ . El equipo fue programado con el siguiente protocolo: 10 minutos a 95 °C para activación de la enzima. Seguido por 40 ciclos que incluyeron, 15 segundos de desnaturalización a 95 °C, 1 minuto de alineamiento y extensión a 60 °C, seguido de un ciclo de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C y 15 segundos a 95 °C (este último conocido como etapa de disociación).

Una vez comprobado que no existía la formación de dímeros de oligonucleótido u otro producto, se procedió a realizar la curva estándar para los genes *tri5*,  *$\beta$ tub*, *pk4* usando el ADN genómico de *Fusarium graminearum*. Se realizaron diluciones seriadas de ADN de 100 ng/ $\mu\text{L}$ , 10 ng/ $\mu\text{L}$ , 1 ng/ $\mu\text{L}$ , y 0.1 ng/ $\mu\text{L}$ . Para cada dilución, se realizó la reacción de PCR en tiempo real por triplicado con cada uno de los pares de oligonucleótidos.

Para la detección de secuencias de OGM en tortillas de maíz, se utilizó los mismos volúmenes de acuerdo a la tabla 5, pero para el caso del gen *35s*, fue necesario aumentar la temperatura de extensión a 61°C, esto para hacer más astringente la reacción y evitar la formación de productos inespecíficos.

Los blancos de reacción en qPCR se conocen como NTC por sus siglas en inglés (no template control).

#### 6.8 Detección de DON y ZEA por inmunoensayo

Se empleó la prueba rápida de inmunoensayo de flujo continuo para la detección de zearalenona y deoxinivalenol en cereales de la empresa EuroProxima B.V.

El primer paso para la detección de micotoxinas por inmunoensayo es la preparación de la muestra, la cual consistió en homogenizar aproximadamente 50 g de la harina de tortilla de maíz, se tomó 1.0 g de este homogenizado y se agregó 3.0 mL de la solución de extracción, se agitó manualmente alrededor de 3 minutos y se dejó que la mezcla se asentara lo más posible. Usando una jeringa se tomó 1.0 mL del buffer de dilución, utilizando la misma jeringa se tomó 1.0 mL del sobrenadante de la muestra, se mezcló suavemente y se colocó un filtro en la boca de la jeringa. La muestra está lista para utilizarse.

La micotoxina (ZEA o DON) acoplado a la proteína albúmina de suero bovina (ASB), se inmovilizó como una línea distinta en una membrana de flujo continuo. El conjugado, que consiste en partículas rojas móviles de oro coloidal marcadas con un anticuerpo monoclonal para la micotoxina, se depositó en forma seca sobre una almohadilla de conjugado de fibra de vidrio en un vial de plástico. Antes de su uso, el conjugado se puso en el buffer de reconstitución (8 gotas). A continuación, se añadió 3 gotas de la muestra a ensayar a la solución de conjugado. Después de una incubación de 10 minutos, el complejo conjugado se transfirió a la membrana de flujo continuo, dejando que la mezcla pasara a través de la membrana completamente y por último se lavó la membrana con 5 gotas de buffer de corrida. Si la muestra contiene una cantidad nula o muy baja de la micotoxina particular, los anticuerpos en el conjugado se unieron al compuesto ASB inmovilizado y aparecieron una línea roja en la zona de ensayo (resultado negativo).

## 7 Resultados y Discusión

### 7.1 Determinación de la pureza de las cepas por morfología

Como primer paso, antes de la extracción de ADN, se comprobó la pureza de las cepas. Las cepas de *F. graminearum*, *F. solani*, *F. tricinctum* y *A. niger* fueron sembradas en PDA, mientras que la cepa de *A. nidulans* se inoculó en medio mínimo. Como se observa en las figuras (13-17) las cepas presentan características propias de su género (lado izquierdo se observa la parte posterior y del derecho la parte inferior de la caja de petri).



Figura 13. Características morfológicas de la cepa micotoxigénica *Aspergillus niger*

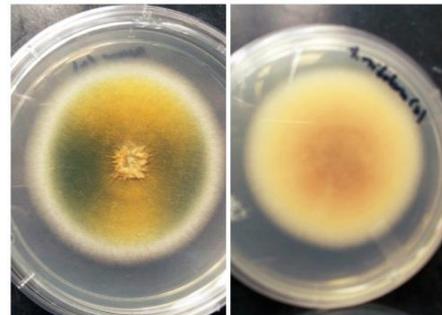


Figura 14. Características morfológicas de la cepa micotoxigénica *Aspergillus nidulans*

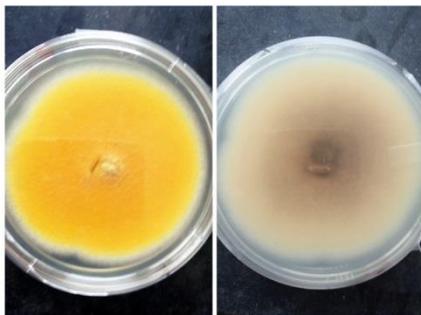


Figura 15. Características morfológicas de la cepa micotoxigénica *Fusarium tricinctum*



Figura 16. Características morfológicas de la cepa micotoxigénica *Fusarium solani*

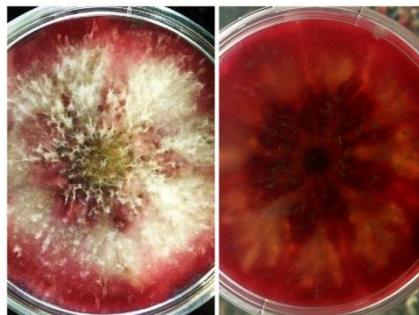


Figura 17. Características morfológicas de la cepa micotoxigénica *Fusarium graminearum*

## 7.2 Conteo de esporas

Una vez que se comprobó la pureza de las cepas, se realizó la cosecha de esporas a  $10^6$  esporas/mL en 50 mL de medio YPD, que sirvieron para poder obtener el micelio y hacer la extracción de ADN.

Tabla 6. Cantidad de esporas/mL obtenida después de cosechar esporas y  $\mu$ L necesarios para ajustar a una concentración de  $10^6$  esporas/mL

| Cepa                  | Esporas/mL           | $\mu$ L necesarios para ajustar a $10^6$ |
|-----------------------|----------------------|--|
| <i>F. tricinctum</i>  | $452.5 \times 10^6$  | 110.50                                   |
| <i>F. solani</i>      | $206.75 \times 10^6$ | 241.84                                   |
| <i>F. graminearum</i> | $822.5 \times 10^6$  | 60.79                                    |
| <i>A. niger</i>       | $102.5 \times 10^6$  | 487.80                                   |
| <i>A. nidulans</i>    | $358.78 \times 10^6$ | 139.36                                   |

## 7.3 Extracción de ADN cromosomal de las cepas puras.

Una vez crecido el micelio se realizó la extracción de ADN cromosomal. Se analizó la pureza del ADN extraído mediante la medición de la absorbancia del ADN a 260 nm y 280 nm. Una relación mayor a 1.8 es generalmente aceptada como indicador de pureza; si la relación es apreciablemente más baja puede indicar la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes que absorben fuertemente cerca de 280 nm. Es importante realizar el análisis de pureza del ADN, ya que algunos contaminantes procedentes del proceso de extracción pueden inhibir las reacciones de PCR (Hughes y Moody, 2007). Los resultados se muestran en la tabla 7 donde se comprueba que la medición de la absorbancia 260/280 es por arriba de 1.8, por lo tanto, se afirma que el ADN cromosomal está libre de contaminantes o se encuentre en concentraciones muy bajas y no interferirán en análisis posteriores.

Tabla 7. Cuantificación de ADN cromosomal de las cepas puras y relación de la absorbancia 260/280 nm.

| Cepa                  | Concentración de DNA<br>(ng/ $\mu$ L) | Relación 260/280 |
|-----------------------|---------------------------------------|------------------|
| <i>F. tricinctum</i>  | 959.74                                | 2.20             |
| <i>F. solani</i>      | 1136.15                               | 1.78             |
| <i>F. graminearum</i> | 517.22                                | 1.99             |
| <i>A. niger</i>       | 547.56                                | 1.97             |
| <i>A. nidulans</i>    | 772.95                                | 1.99             |

Otra característica que es importantes analizar, antes de proceder con los ensayos de PCR, es la integridad del ADN cromosomal, debido a que si el ADN se encuentra muy degradado la reacción no tendrá una eficiencia adecuada, ya que es posible que la secuencia blanco de los oligonucleótidos se encuentre degradada y por lo tanto no se pueda amplificar el producto esperado. Para comprobar que el ADN está íntegro se realizó un gel de agarosa, el cual se muestra en la Figura 18, donde se observa una banda para todas las cepas a 10,000 bp lo cual comprueba la integridad del ADN, las bandas que se observen en la parte inferior del gel corresponden a la degradación del ADN por el proceso de extracción.

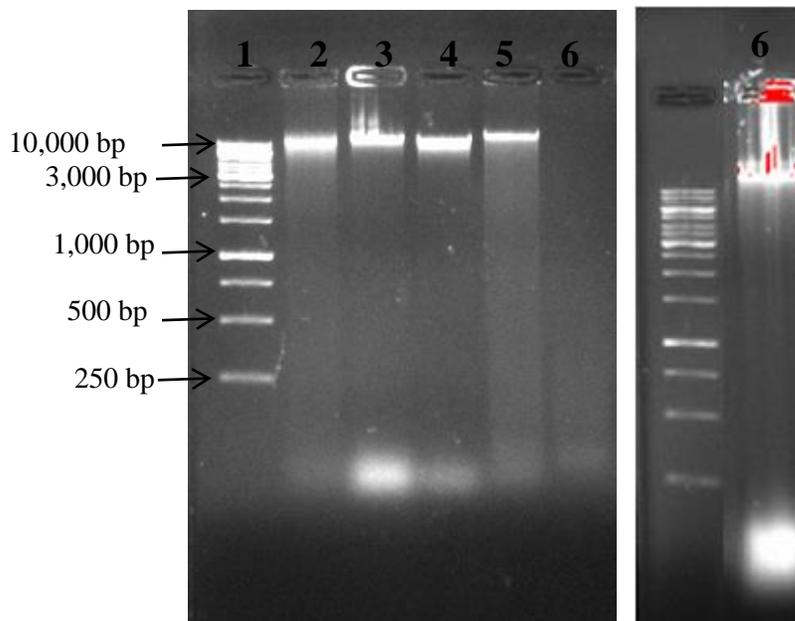


Figura 18. ADN fúngico cromosal extraído de las cepas puras en gel de agarosa al 1 carril: Marcador 1 kb (Thermo Scientific) 2° carril: *F. graminearum*, 3° carril: *A. nidulans*, 4° carril: *A. niger*, 5° carril: *F. solani*, 6° carril: *F. tricinctum*

#### 7.4 Detección de los genes de interés por PCR punto final

Una vez que se obtuvo el ADN de las cepas, se realizó la reacción de PCR de acuerdo a lo sección (5.6). Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para verificar el tamaño del amplicón. En la figura 19 se observa el gel del segmento amplificado del gen endógeno *βtub*, el cual amplifica para todas las cepas en el peso esperado, ya que este gen se encuentra en una región altamente conservada entre género.

La figura 20 a) corresponde al gel con el amplicón de los oligonucleótidos de *pks4*, mientras que la Figura 20 b) corresponde a *tri5*. En ambos se observa una banda solo para *F. graminearum* en el peso esperado, lo cual nos indica que estos cebadores son específicos y que no existe homología con alguna otra cepa que no sea *F. graminearum*.

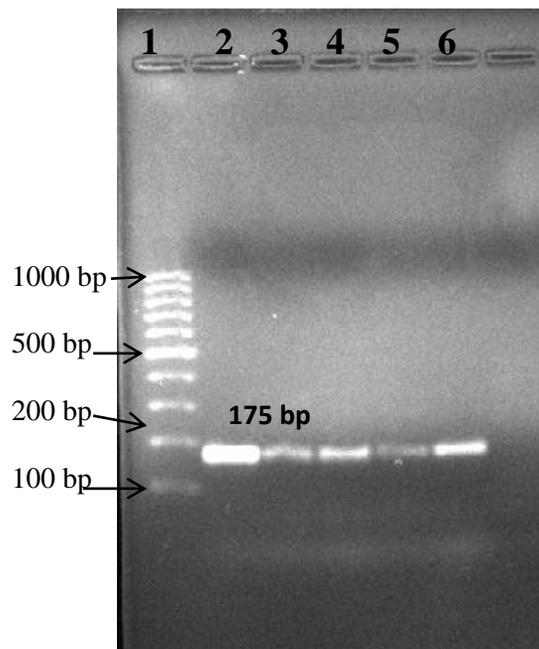


Figura 19. Amplificación del gen *βtub* por PCR, de la reacción de PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. 1° carril: Marcador 100 bp (Thermo Scientific), 2° carril: *F-graminearum*, 3° carril: *F. solani*, 4° carril: *F. tricinctum*, 5° carril: *A. niger*, 6° carril: *A. nidulans*, 7° carril: blanco.

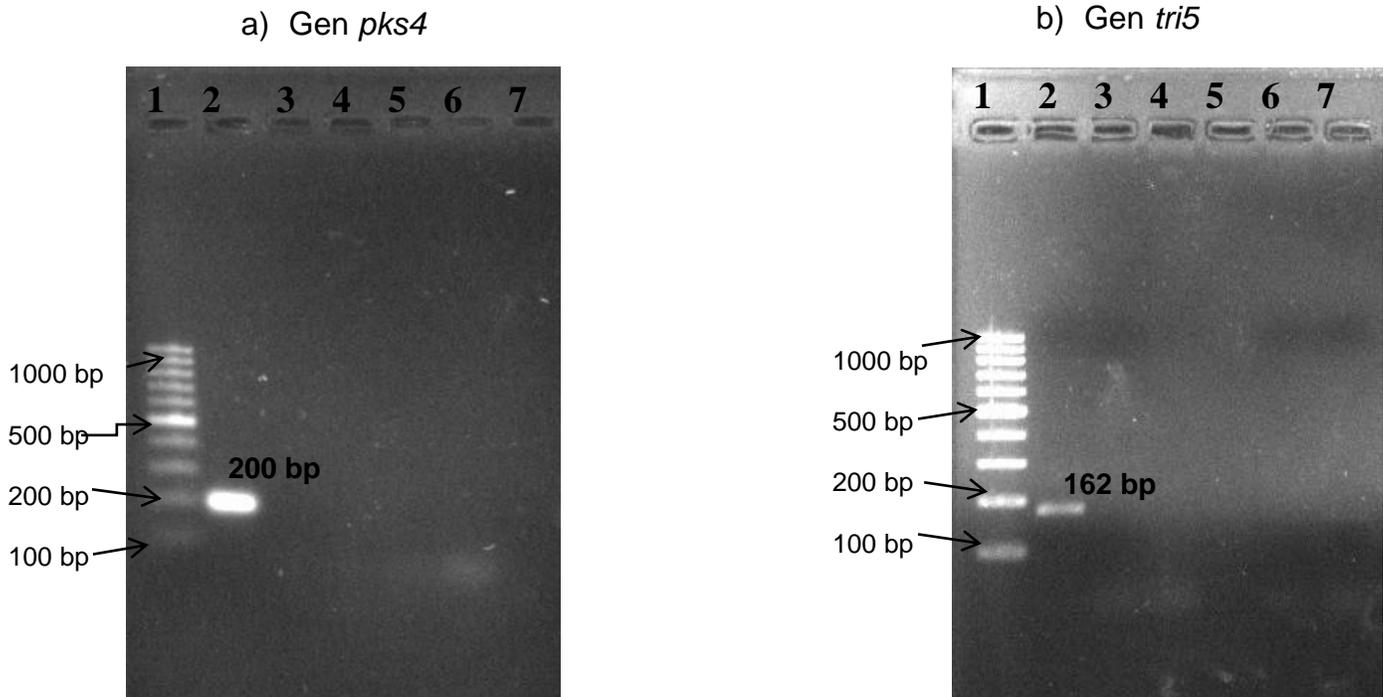


Figura 20. Amplificación de los genes *pks4* y *tri5* por PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, a) Gen *pks4*, b) Gen *tri5*. 1° carril: Marcador 100 bp (Thermo Scientific), 2° carril: *F-graminearum*, 3° carril: *F. solani*, 4° carril: *F. tricinctum*, 5° carril: *A. niger*, 6° carril: *A. nidulans*, 7° carril: blanco.

### 7.5 Secuenciación de productos de PCR punto final.

Los productos obtenidos por medio de PCR punto final fueron mandados a secuenciar a MacroGen (Japón), para cada gen se mandó a secuenciar el control positivo, es decir, ADN de *Fusarium graminearum* y una muestra de tortilla de maíz positiva. Cada producto fue secuenciado con cada uno de sus oligonucleótidos (Forward y Reverse), por lo que se obtuvieron dos secuencias por cada producto, estas dos secuencias fueron alineadas con la secuencia del gen blanco para comprobar la homología. En la Figura 21 y 22 se puede comprobar que ambas secuencias muestran homología con los genes esperados y presentan el tamaño esperado.

Para el caso de el gen *tri5* se obtiene un porcentaje de identidad con *Fusarium graminearum* del 100%, considerando el menor valor de E (espectancia), pero es interesante mencionar ya que la secuencia también arroja un parecido con otras

cepas, por ejemplo, con *Fusarium boothi* (100%) que es un causante de la podredumbre del maíz en Sudáfrica, *Fusarium asiaticum* (97%) principal contaminante en Asia, *Fusarium acaciae-mearnsii* (97%) para Australia, *Fusarium mesoamericanum* (97%) en Centroamérica, además de los conocidos mundialmente como *Fusarium culmorum* (96%) y *Fusarium cerealis* (96%) (Glenn, 2007). Lo cual sugiere que el trabajo llevado a cabo puede ser considerado como específico para la detección de DON a partir de hongos productores.

Para el caso del gen *pk4* se encontró un porcentaje de identidad del 99% con *Fusarium graminearum*, de 96% con *Fusarium culmorum* y *Fusarium pseudograminearum*. Todos estos microorganismos son los grandes contaminantes de tricotecenos en el mundo junto con *F. cerealis* (Glenn, 2007) el cual no presento similitud con la secuencia obtenida en este trabajo, ocurriendo un caso similar con deoxinivalenol.

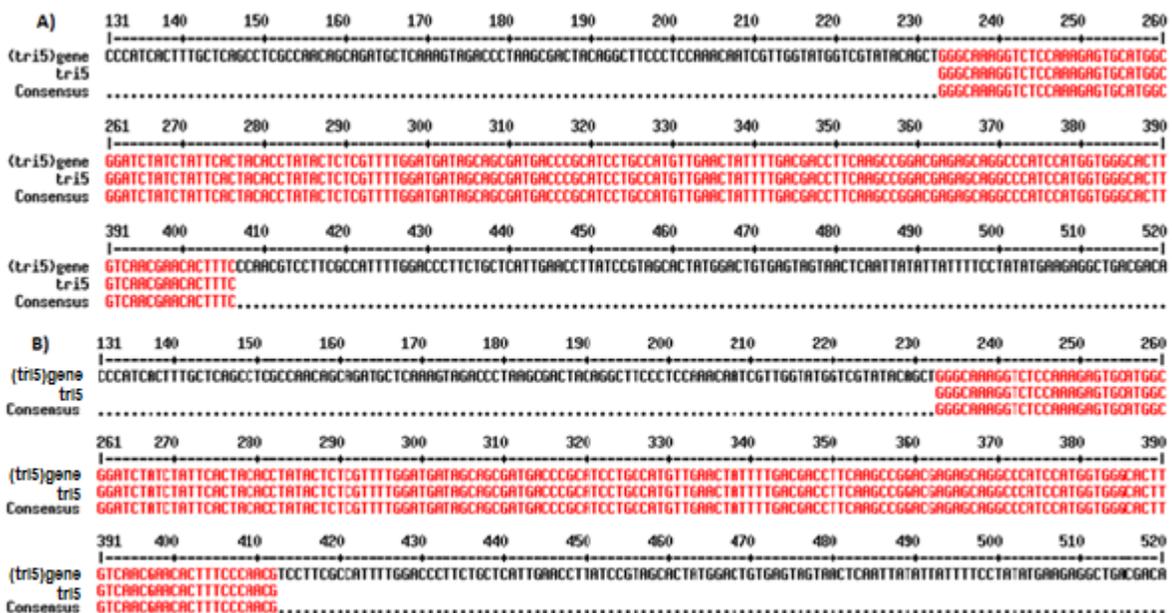


Figura 21. Alineamiento del producto de PCR punto final para el gen *tri5*, con la secuencia del gen *tri5* reportada en el NCBI (*tri5*gene) con A) secuencia amplificada a partir del ADN de tortilla de maíz y B) secuencia amplificada a partir del ADN de *Fusarium graminearum*.

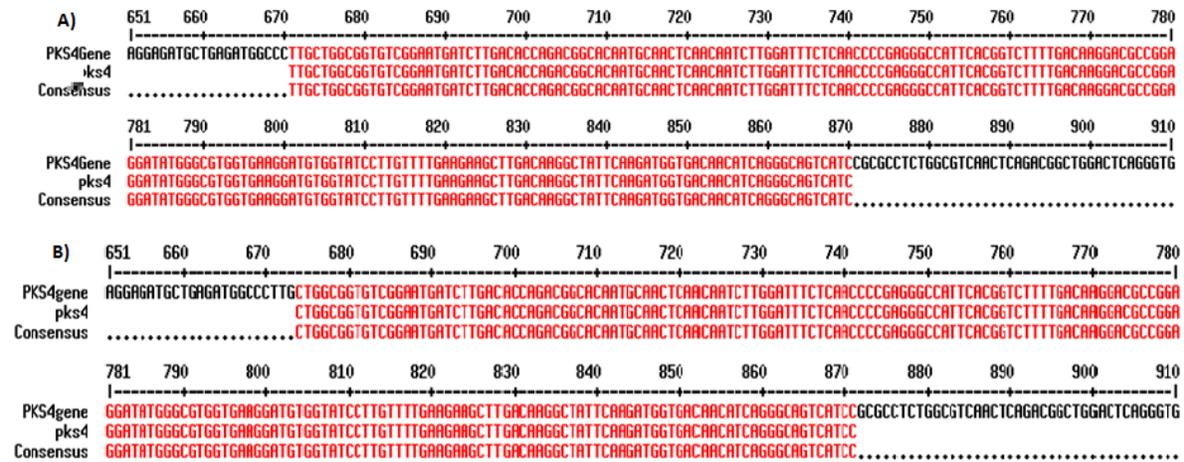


Figura 22. Alineamiento del producto de PCR punto final para el gen *pks4*, con la secuencia del gen *pks4* reportada en el NCBI (PKS4gene) con A) secuencia amplificada a partir del ADN de tortilla de maíz y B) secuencia amplificada a partir del ADN de *Fusarium graminearum*.

A continuación, se incluyen las secuencias reportadas por el NCBI, las cuales se tomaron de referencia para el diseño de los cebadores, así como para alinear los resultados obtenidos de las secuenciaciones. Los genes de eucariotas contienen secuencias codificantes (exones) y secuencias intercaladas no codificantes (intrones). Los intrones son eliminados en el proceso de maduración del ARN (Jiménez-García *et al.*, 2004). En las secuencias que se muestran, las partes señaladas en azul corresponden a exones del mRNA del gen, y se partió de estas para diseñar los cebadores (se resaltan en color rojo y subrayados), la parte sin color corresponde a intrones.

>AY495629.1 *Gibberella zeae* polyketidesynthase (PKS4) gene, partial cds

```

GCCATCGTAGGCCTGGCTTGTGCGCTTTCTCTGGCGATGCCACATCTCCATCCAAGTTCTGGGACCTTCTGA
AGAGCGGAAAAGGTGAGCAGCAATAAGAACCAGCATCCTTATTGGTGTCAACATGACCTTGTGAGCGCT
ATATCTCTGCCTCCAGTTCATCACTAATTTCGTACCAAGACGCATACTCCGAAACAACGGATCGGTACAAT
GCACAAGCCTTCTACCATCCAACAGCAAACGACAAAATGTTTTGCCAGTCACAGGTGGACACTTTTTGA
AGCAGGATCCTCATGTCTTTGATGCTGCCTTCTCAATATTACTGCCGCTGAGGCTACTCTCACTTGACCC
AAAACAGCCCATCGCCCTCGAGGTTGCATACGAGGCCTTCGAAAATGCTGGTAAGCCCTCAAACAGGTT
GCTGGTACTACCACTGCGTGT TTTGTTGGATCCTCCATGAGCGACTACAGAGATGCTGTGCTCCGTGATT
TCGCTCATAATCCCAAGTACCATGTACTTGGCACTTGTGAGGAGATGATCGCCAACCGAATCTCCCACCT
CTTCGACATACATGGTCCAAGTGCTACTGTACATACAGCCTGCTCATCAAGCCTCGTGGCGATTCACTTG
GCCTGCCAGAGTCTCCTGTGAGGAGATGCTGAGATGGCCCTTGCTGGCGGTGTCGGAATGATCTTGACAC
CAGACGGCACAAATGCAACTCAACAATCTGGATTTCTCAACCCCGAGGGCCATTACAGGCTTTTGACAA
GGACGCCGAGGATATGGGCGTGGTGAAGGATGTGGTATCCTTGT TTTGAGAAGCTTGACAAGGCTATT
CAAGATGGTGACAACATCAGGGCAGTCATCCGCGCCTCTGGCGTCAACTCAGACGGCTGGACTCAGGGTG
TCACAATGCCATCCAGCGAGGCTCAAGCAGCACTTATCAAGCATGTTTACGAGACTCGTGGCTTGGACTA
TGGCGCCACCCAGTATGTGGAGGCTCATGTGAGTTTTATCTTTGTTTATCCACCAAATACTGATA
TTGCTACAGGGTACCGGAACCAAGCTGGAGATCCTGTTGAAACGGGCGCTATCCACCGTACTATTGGCC
AAGGCGCAAGCAAGAATCGAAAGCTGTGGGTTGGAAGTGTCAAGCCAAATGTAAGTCGTGTCCCAAAGAT
ACAAAAGTCGATTGAAGACTAACTCTAGATTAGATCGGTCATCTTGAGGCTGCTGCAGGTGTGGCTAGCG
TTATCAAGGGGTTCTGGCTATGGAAAACAGCCTTATTCCTCCCAATATTCATTTTCGCTAGTCCAAACCC
TGAGATTCCACTCGACGAGTGAACATGGCTGTACCCACCAAGCTAACTCCGTGGCCCCGGGCTCGTACC

```

AAGCGTATGAGCGTTAGTGGCTTTGGCATGGGAGGT

>AY130290.1 *Gibberella zeae* trichodienesynthase (tri5) gene, complete cds

ATGGAGAACTTTCCACCGAGTATTTTCTTAACACTAGCGTGCGCCTTCTCGAGTATATTCGATACCGAG  
ACAGCAATTACACCCGAGAGGAGCGCATCGAGAATTTGCACTATGCTTACAACAAGGCTGCCACCACCTT  
TGCTCAGCCTCGCCAACAGCAGATGCTCAAGGTAGACCCTAAGCGACTACAGGCTTCCCTCCAAACAATC  
GTTGGCATGGTTGTATACAGCTGGGCAAAGGTGTCCAAAGAGTGCATGGCGGATCTATCTATTCACTACA  
CCTATACTCTCGTTTTGGATGACAGCAGCGATGATCCCCATCCTGCCATGTTGAACTATTTTTGACGACCT  
TCAAGCCGGACGAGAGCAGGCCCATCCATGGTGGGCACTTGTCAACGAGCACTTTCCCGACGTCCTTCGC  
CATTTTGGACCTTTCTGCTCATTGAACCTTATCCGTAGCACTATGGACTGTAAGATACCGATTCTATTAT  
TCACCCGTATGAAGAAGCTAACGGCGGTGGAACAACAGTTTTTGGAGGATGTTGGATTGAGCAGTACAAC  
TTTGGAGGATTTCCAGGATCTGATGACTACCCTCAATTCCCTTCGTCGTATGAATGGTTTGGGTCATTGTG  
TTGGGCTTCTCTATGGCCCAAGGACCTGTTTGTATGAGCGGAAGCATTTCCTTGAATCACGTCAGCCGT  
TGCTCAGATGGAGAAGCTGGATGGTTTGGGTCATGATCTCATGTCATTCTACAAGGAATTCGACGATGAG  
CGTGACCAAATCAGTCTGGTCAAGAAGCTTTGTCACCTGCCATGAGATCACTCTGGATGAAGCTTTGGAGA  
AGCTCACCCAGGAAACCCTACACTCGTCTAAGCAGATGGTTGCTGTCTTCTCGGACAAGGACCCTCAGGT  
GATGGACACGATTGAGTGTTCATGCATGGCTACGTACGTGGCACTTGTGCGACGCTCGATACCGCCTC  
CATGAGATTTATGAAAGGTC AAGGTC AAGGATAAGGATACAGAGGACGCCAAGAAGTTCTGCAAGTTCTTTGAGC  
AGGGCGCAATGTGGCGCCGTTGCACCCTCGGAGTGGGCTTATCCACAAGTTGCACAAGTGGCAAACGT  
TCGGGCCAAGGACGATGTGAAGGAGGCTCAGAAGCCCATCCTAAGTTCAATTGAGCTAGTGGAGTGA

## 7.6 Extracción de ADN de muestras de tortilla.

Una vez verificada la detección los genes de interés con los oligonucleótidos seleccionados, se procedió a buscarlos en todas las muestras de tortillas de maíz. La extracción del ADN de las muestras se realizó con el kit FastID (los resultados se observan en la tabla 8), el cual ha sido usado en amplia variedad de muestras, como semillas, plantas, alimentos y tejido animal. Este kit es altamente usado para análisis de alimentos transgénicos, demostrando una alta calidad de extracción y pureza (Aportela *et al.*, 2008). Así mismo se ha reportado su uso para obtención de ADN en diferentes cereales, demostrando un ADN puro y sin posibles inhibidores que puedan interferir en la reacción de PCR (Ramírez, 2012).

El kit se basa en la ruptura celular con detergentes iónicos y con la proteinasa K. La purificación se da por unión específica del ADN a una membrana de sílica, a la que se le realizan lavados para eliminar sustancias que puedan inhibir la reacción de PCR (Somma y Querci, 2007). Para todas las extracciones se partió de la misma cantidad (200 mg) y se suspendieron en 30 µL de agua grado biología molecular.

Tabla 8. Cuantificación de las extracciones de muestras de tortilla y relación de las absorbancias 260/280.

| <b>Muestra</b> | <b>Lugar</b>   | <b>Concentración de DNA<br/>(ng/<math>\mu</math>L)</b> | <b>Relación<br/>260/280</b> |
|----------------|--|--|-----------------------------|
| 1              | Sumesa (Centenario Rio<br>Churubusco)                              | 54.13  | 1.87                        |
| 2              | Mega Comercial (Gransur)   | 66.67  | 1.94                        |
| 3              | Wal-Mart (Miramontes)  | 51.54  | 2.00                        |
| 4              | Tortillería (Pacífico No 333, col<br>reyes)                        | 49.73  | 1.97                        |
| 5              | Tortillería (Anacahuíta No. 40, Col.<br>Pedregal de Santo Domingo) | 84.13  | 2.01                        |
| 6              | Tortillería (Av 3, col educación)                                  | 39.67  | 2.08                        |
| 7              | Chedraui (Universidad No. 740.<br>Col Sta. cruz Atoya)             | 20.82  | 1.88                        |
| 8              | Wal-Mart (Tlalpan Nativitas)                                       | 35.87  | 1.91                        |
| 9              | Superama (Xochicalco y Romero,<br>Col Narvarte)                    | 43.76  | 1.95                        |
| 10             | Tortillería (Jesús Urueta, No 15.<br>Col Moderna)                  | 23.12  | 1.99                        |
| 11             | Tortillería (Romero de Terreros,<br>Col Narvarte)                  | 60.54  | 1.91                        |
| 12             | Tortillería (Sevilla, No 522, Col<br>Portales Ote)                 | 70.90  | 1.87                        |
| 13             | Wal-Mart (Av Nextengo, No 78,<br>Col. Sta Cruz Acayucan)           | 49.33  | 1.93                        |
| 14             | Wal-Mart (Av Cuitláhuac 3651,<br>Col. Hogar y Seguridad)           | 16.23  | 1.81                        |
| 15             | Bodega Comercial (Azcapotzalco<br>No. 527, Col. Azcapotzalco)      | 24.78  | 2.28                        |
| 16             | Tortillería (El Triunfo Col.<br>Prohogar)                          | 54.23  | 1.83                        |
| 17             | Tortillería (Av Real de San Martín,<br>No134, Col Nueva España)    | 29.12  | 1.98                        |
| 18             | Tortillería (Av Jardín, No 36-1, Col.<br>Del gas)                  | 33.56  | 1.96                        |

## 7.7 PCR tiempo real (qPCR)

### 7.7.1 Especificidad de oligonucleótidos por qPCR

Si bien se llevó a cabo una prueba de especificidad de los genes por medio de la técnica de PCR punto final, es necesario realizar un análisis por medio de qPCR ya que es una técnica más sensible. Se emplearon las 5 cepas de las que se disponía 100 ng de concentración final en la mezcla de reacción.

En la figura 23 se observa la curva de amplificación y de disociación para el gen *βtub*; se observa que para *F. graminearum* se obtiene un Ct menor por lo que hay una mayor cantidad de ADN detectable con respecto a las otras cepas, lo cual es debido a que los oligos se diseñaron tomando como gen blanco a *F. graminearum*. Sin embargo, en la curva de disociación se logran observar para todas las muestras un pico de amplificación, siendo esta prueba positiva para todas las cepas. En el caso de los NTC como se esperaba, no se observó este pico.

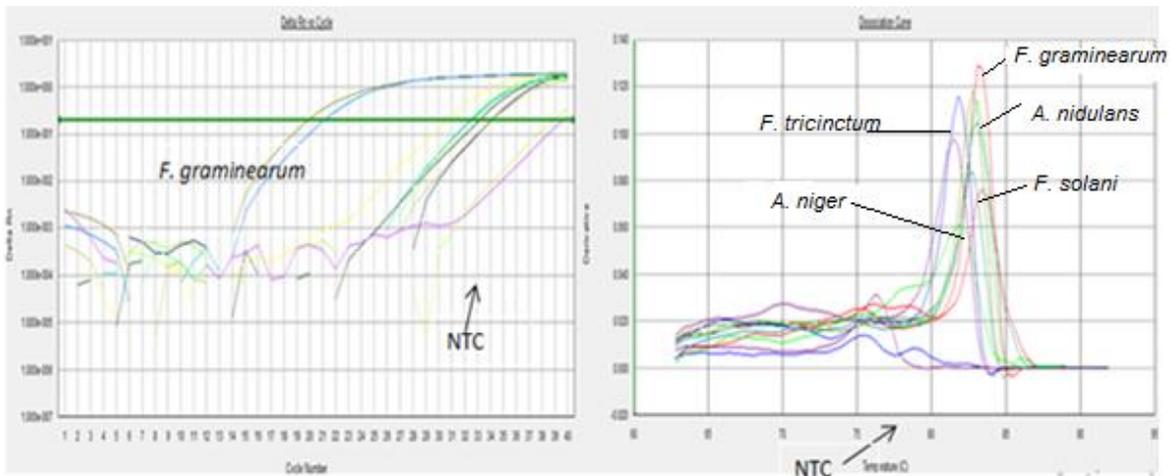


Figura 23. Diagrama de amplificación (izquierda) y curva de disociación (derecha) para el gen *Btub*. Cada reacción fue llevada a cabo por duplicado. NTC: blanco de reacción.

Para el caso de *pk4* (figura 24) se observa en la curva de disociación picos definidos con el ADN de *Fusarium graminearum* tanto para el ADN de micelio como en el de esporas, con una  $T_m$  de  $\approx 82.0^\circ\text{C}$  para micelio y para esporas, además en la curva de amplificación el equipo arroja un resultado en los Ct de 19.60 para

micelio y 25.28 para esporas. Es importante mencionar que, para el caso de ADN de micelio de *Aspergillus nidulans*, se observa un pequeño pico de formación de producto. Sin embargo, el valor de  $T_m$  del equipo es de 76°C, que corresponde con dímeros de los cebadores que se formaron, dado que este pico es el más grande. El valor de  $C_t$  es de 31.93 y corresponde al de la formación de dímeros y no del producto. Por otro lado, para *A. nidulans* se ha reportado la presencia en su genoma de 32 genes que codifican para PKSs, los cuales son precursores de metabolitos como esterigmatocistina, aspertecina, asperfuranona, ácido orselínico etc. Sin embargo, con los primers diseñados no se detectó dicha secuencia (klejnstrup *et al.*, 2012).

En el caso de las cepas de *Fusarium solani* y *Fusarium tricinctum* que se encuentran más relacionadas con *F. graminearum* y por tanto contener el gen *pk4*, así Brown *et al.*, (2012<sup>a</sup>), realizaron un análisis filogenético y funcional sobre los dominios de policétidos sintasa, dando como resultado que *F. solani* no tiene el cluster de genes que contiene al *pk4*. En el caso de *F. tricinctum*, Wiśniewska *et al.*, (2013) reportaron que es un no productor de policétidos por lo tanto ocurre un caso similar al de *F. solani*. De acuerdo a la anterior información, no se observó un pico del producto en la curva de disociación.

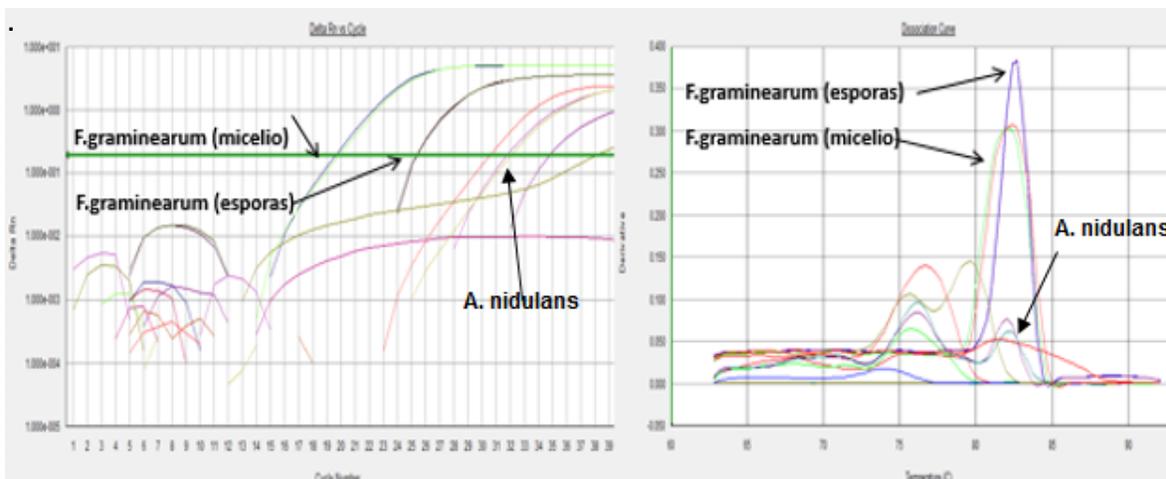


Figura 24. Diagrama de amplificación (izquierda) y curva de disociación (derecha) para el gen *pk4*. Cada reacción fue llevada a cabo por duplicado

Para el *tri5* (figura 25), se observa que en los NTC no se obtiene ninguno pico en la curva de disociación en la zona donde se disocian los dímeros de cebadores ( $T_m$  de  $75^{\circ}\text{C}$ ), por lo que, en la curva de amplificación hay resultado positivo con un Ct de 34. Por otra parte, para las cepas se observa un comportamiento similar a *pks4* con respecto a *F. graminearum*, donde para micelio se tiene un Ct de 26.80 y una  $T_m$  de  $83.1^{\circ}\text{C}$  y para esporas un Ct de 28.87 y una  $T_m$  de  $82.7^{\circ}\text{C}$ .

El ADN de la cepa de *A. nidulans* mostró un pico de disociación a  $81.70^{\circ}\text{C}$ , y una curva de amplificación donde el duplicado arroja valores muy distintos de Ct, de 24.07 y 29.07. Aunque no se encuentra algún reporte que lleve a pensar que *Aspergillus nidulans* pueda contener el gen *tri5*. Además, una búsqueda en la base de datos del genoma de *A. nidulans* (BLAST) mostró que no presenta en su genoma el gen *tri5*, por lo que es necesario confirmar este resultado dado que lo más seguro es que sea producto de una contaminación o de alguna amplificación inespecífica.

En el caso de los miembros del género *Fusarium*, *F. solani* y *F. tricinctum* existe un reporte de Fekete, (1997), quien realizó un screening con varios hongos para observar la presencia de *tri5*, donde *F. solani* obtiene un resultado negativo, pero *F. tricinctum* un resultado de una hibridación muy débil. En este estudio el resultado fue negativo en ambos casos.

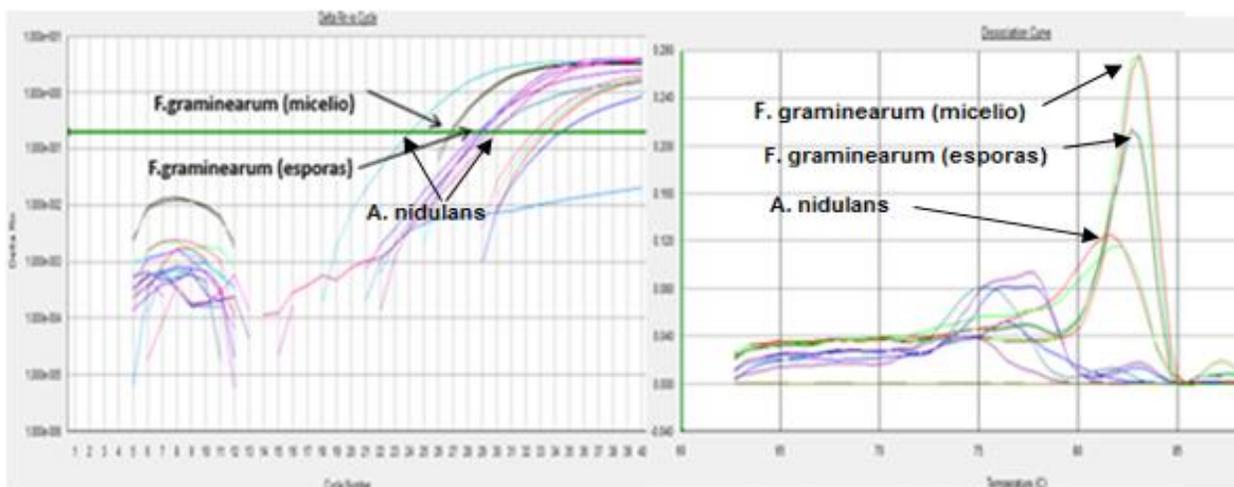


Figura 25. Diagrama de amplificación (izquierda) y curva de disociación (derecha) para el gen *tri5*. Cada reacción fue llevada a cabo por duplicado

Adicionalmente se inoculó intencionalmente maíz chalqueño estéril con la misma cantidad de esporas de los 5 microorganismos con que se disponía ( $1 \times 10^8$  esporas/mL). Los resultados se muestran en la Figura 26, donde se observa para ambos casos a y b, un pico bien definido, en el caso de *tri5* se obtuvo una  $T_m$  de  $82.7^\circ\text{C}$  y un  $C_t$  de 28.86 y para *pks4* se obtuvo una  $T_m$  de  $82.25^\circ\text{C}$  y un  $C_t$  de 26.41. Estos valores son similares con los obtenidos anteriormente con solo esporas de *F. graminearum* por lo tanto el método es además de específico, sensible, para detectar *Fusarium graminearum* en las muestras sin importar que esté contaminada con otro tipo de hongos. Es interesante resaltar que en todos los casos el ADN se extrajo de esporas y en los casos anteriores de especificidad (figura 24 y 25) el ADN se extrajo de micelio.

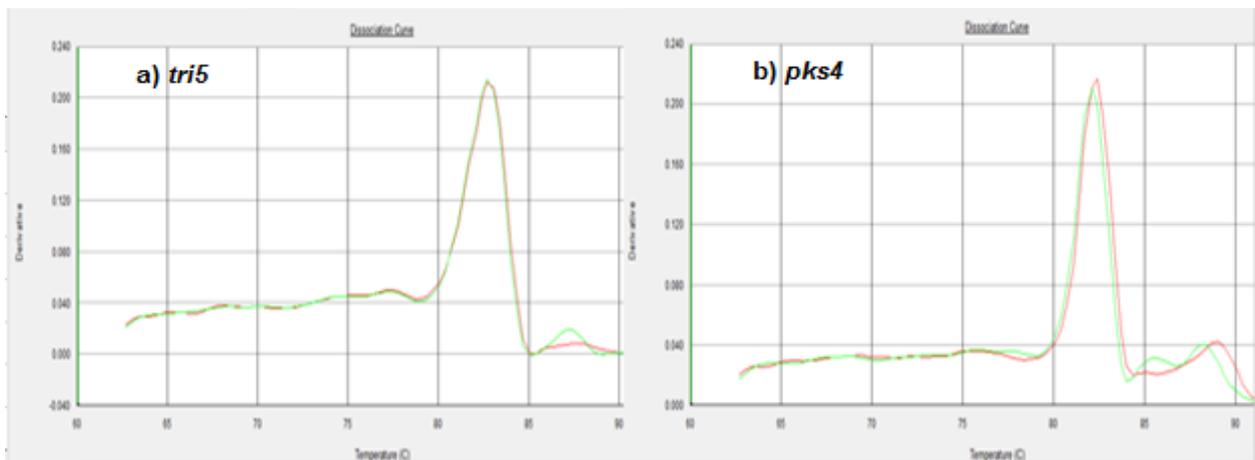


Figura 26. Curva de disociación de mezcla de esporas para el gen a) *tri5* b) *pks4*. Cada reacción fue llevada a cabo por duplicado

Durante condiciones favorables, *F. graminearum* produce peritecios con ascosporas (esporas sexuales) que son expulsadas y se dispersan por movimientos de aire y junto a los conidios (esporas asexuales) constituyen las fuentes de inóculo primario. Los conidios se diseminan por medio de la lluvia y así arriban a hospederos o sustratos donde producen enfermedad, micotoxinas, o ambos (Osborne *et al.*, 2007). Las esporas son estructuras unicelulares de resistencia que contienen toda la información genética necesaria para el desarrollo completo de un nuevo hongo. De la amplia capacidad de dispersión de las esporas fúngicas, se deriva la facilidad

y frecuencia con que provocan problemáticas de producción, conservación de alimentos, así como de tipo sanitario. Por esta razón en el presente proyecto se decidió realizar el estudio para la cuantificación de genes micotoxigénicos a partir de esporas. Sin embargo, se observó que al realizar la reacción de PCR en tiempo real no se obtienen los resultados esperados ya que en las diluciones de esporas de  $10^8$  a  $10^7$  a  $10^6$  etc., se esperaba que por cada ciclo logarítmico la diferencia del Ct fuera de 3.3, debido a que se realiza una dilución 1:10 y no de un ciclo como se obtuvo. Las esporas son sumamente resistentes y no es posible realizar un proceso de extracción de ADN satisfactorio, esto probablemente a la superficie de contacto que tienen las esporas durante el proceso. Estos resultados coinciden con lo obtenido anteriormente por Ramírez, (2012). Por ello se decidió continuar los ensayos con el micelio de *Fusarium graminearum*.

Adicionalmente, existen reportes de extracción de ADN de esporas de *Glomus intraradices* (Filion *et al.*, 2003) y *Helminthosporium solani* (Cullen *et al.*, 2001) que tienen un comportamiento no lineal a diferencia del ADN genómico, este comportamiento puede ser atribuido a que los hongos son organismo eucariontes y por tanto presentan múltiples núcleos (Bridge y Spooner, 2001) y al hecho de que podría haber múltiples y diferentes copias de la secuencia ribosomal presentes en una célula fúngica dada. *Fusarium graminearum* es homotálico (auto fértil) y puede sufrir meiosis y producir esporas con mayor frecuencia porque no está restringido por la necesidad de encontrar una pareja compatible, además presenta poliformismo dentro y fuera de las esporas (Cuomo *et al.*, 2007). El polimorfismo puede prevenir la unión sustancial de oligonucleótidos y reducir la eficiencia de la PCR que a su vez también se reduciría proporcionalmente a medida que la cantidad de ADN genómico objetivo aumenta. Es necesario realizar una investigación más intensa en este aspecto, con el fin de poder cuantificar esporas en muestras de alimentos.

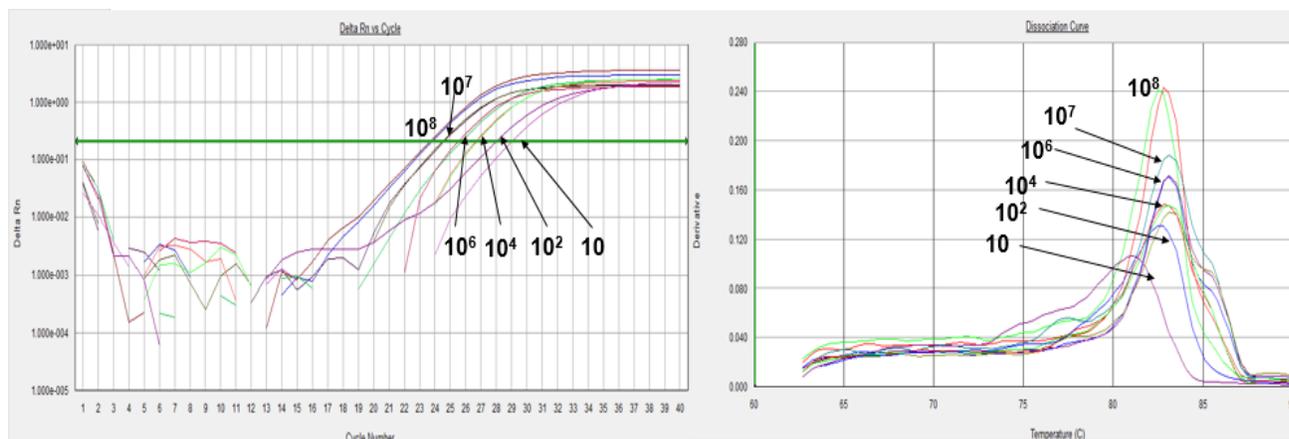


Figura 27. Diagrama de amplificación (izquierda) y curva de disociación (derecha) para el gen *tri5* usando diluciones seriadas de ADN de *Fusarium graminearum*. Cada reacción fue llevada a cabo por triplicado

### 7.7.2 Curvas de disociación.

Como primer paso para el desarrollo de la metodología de cuantificación por qPCR con química de SYBR Green, es necesario comprobar la especificidad de los cebadores y comprobar que la señal de fluorescencia obtenida se debe solo al producto esperado (Lutfella y Uze, 2006). Para este fin, se empleó por triplicado el ADN de *Fusarium graminearum* a diferentes concentraciones con cada par de oligonucleótidos y NTC por duplicado.

El análisis de la curva de disociación después del qPCR es una forma sencilla para revisar en las reacciones del qPCR la presencia de artefactos, dímeros de cebadores, la contaminación y además de asegurar la especificidad de la reacción. Debido a que la temperatura de disociación de los ácidos nucleicos es afectada por el contenido de guanina y citosina y la presencia de bases “mismatches” entre otros factores, diferentes productos de qPCR pueden ser distinguidos con frecuencia por sus características de disociación. La caracterización de los productos de la reacción por medio del análisis de la curva de disociación reduce la necesidad de consumir tiempo con el gel de electroforesis. Los dímeros de cebadores se producen cuando dos cebadores con secuencias homólogas se unen unas con otras en el producto. El análisis de la curva de disociación puede identificar la presencia

de dímeros de cebadores debido a que ellos exhiben una temperatura de disociación menor a la de los amplicones. La presencia de dímeros de cebadores no es deseable en muestras que contienen producto, ya que estos disminuyen la eficiencia del qPCR [Dorak, 2007].

En las figuras 28, 29 y 30 se muestran las curvas de disociación para los genes de *βtub*, *tri5* y *pks4*, respectivamente. Se aprecia la amplificación de 1 solo pico en cada par de cebadores, el cual corresponde únicamente al producto esperado. No se observa la presencia de dímeros de cebadores en ningún caso después de la amplificación por qPCR, ni en los NTC. El gen *βtub* presenta una  $T_m$  de 83.4°C, para *tri5* de 82.2 °C y de *pks4* de 82.3 °C.

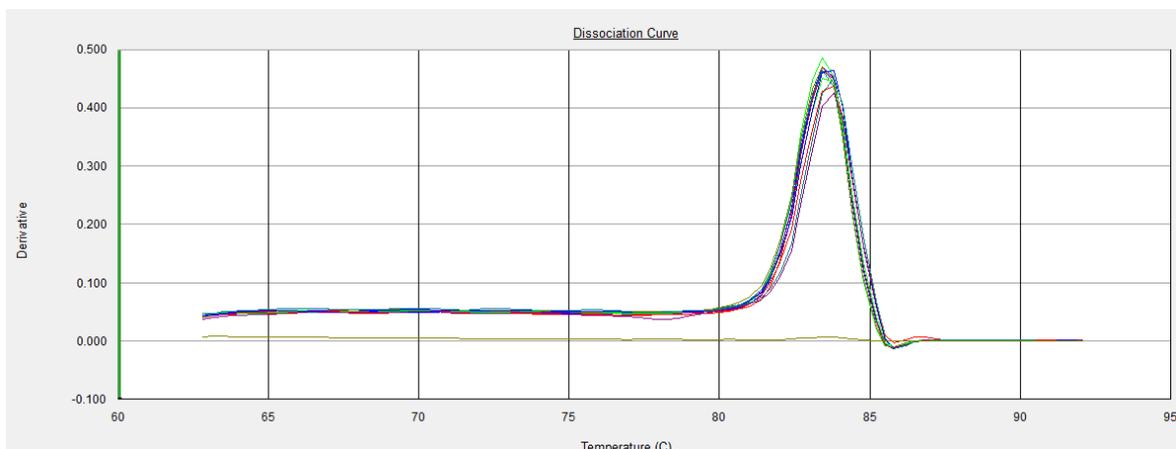


Figura 28. Curva de disociación para el gen *βtub* con ADN de *Fusarium graminearum* en concentraciones de 100, 10, 1 y 0.1 ng. Cada reacción se llevó a cabo por triplicado.

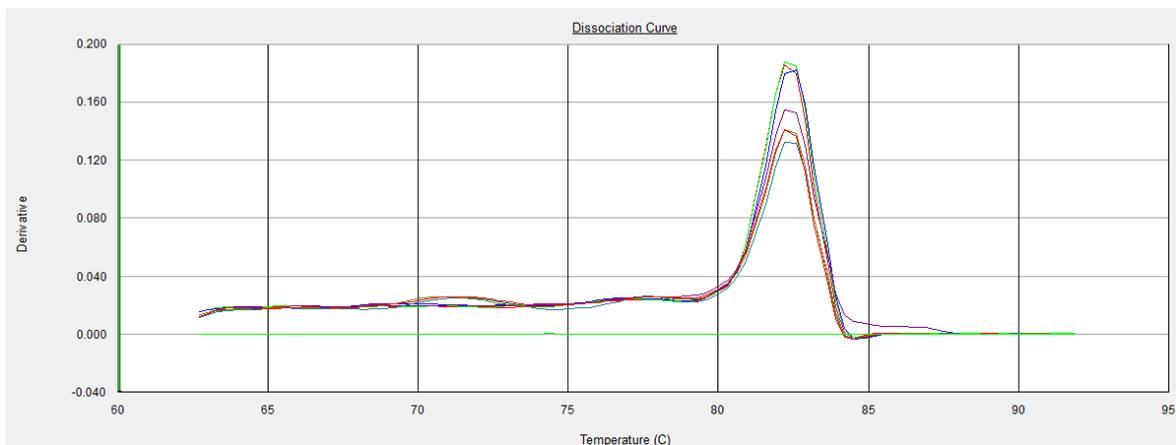


Figura 29. Curva de disociación para el gen *tri5* con ADN de *Fusarium graminearum* en concentraciones de 100, 10, 1 y 0.1 ng. Cada reacción se llevó a cabo por triplicado.

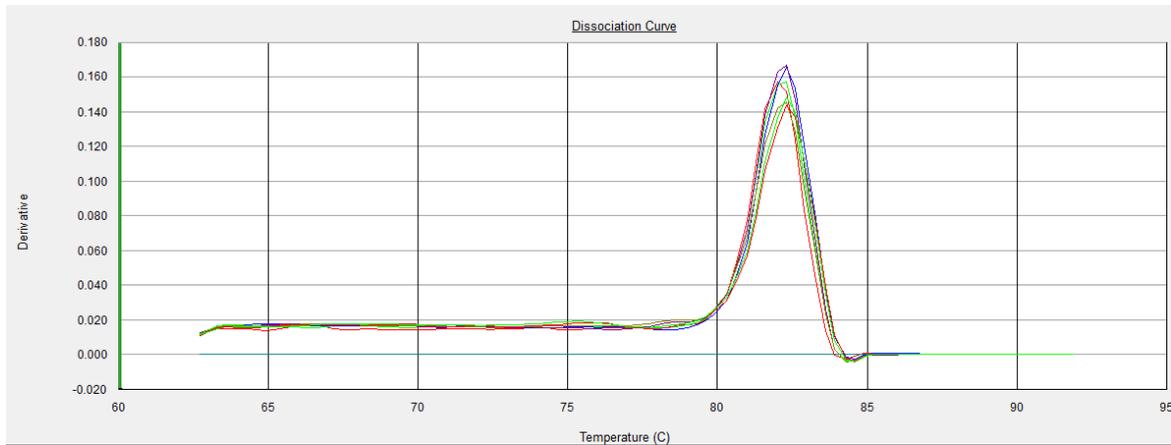


Figura 30. Curva de disociación para el gen *pks4* con ADN de *Fusarium graminearum* en concentraciones de 100, 10, 1 y 0.1ng. Cada reacción se llevó a cabo por triplicado.

Como se observó en las tres figuras anteriores, los picos de disociación permanecen prácticamente igual para cualquier concentración de ADN, lo que habla de la capacidad de la técnica para detectar de manera eficiente concentraciones bajas del gen diana.

### 7.7.3 Curva estándar

Se elaboraron las curvas patrón de los genes *βtub*, *tri5* y *pks4*, mediante diluciones consecutivas de ADN de *F. graminearum*, de tal forma que en el volumen final de la reacción se tuvieron 100, 10, 1 y 0.1 ng.

En las figuras 31, 32 y 33 se observan los diagramas de amplificación para los genes *βtub*, *tri5* y *pks4* respectivamente. Un diagrama de amplificación es un gráfico de la señal de fluorescencia en función del número de ciclos. En los ciclos iniciales de PCR hay un pequeño cambio en la señal de la fluorescencia, esto define la línea de fondo para el diagrama de amplificación. Un aumento en la fluorescencia sobre la línea de fondo indica la detección del producto acumulado de PCR (Cortazar y Silva, 2004). Por esta razón es que a menor concentración de ADN molde se requiere más números de ciclos para que el producto acumulado de PCR pueda ser detectado.

La curva de amplificación de cualquier ADN molde consta de una fase inicial donde la producción de fluorescencia (ADN producto) está por debajo del nivel de

detección del termociclador. Una segunda fase es la que se dan las primeras señales detectables en donde la amplificación se está llevando a cabo a una velocidad máxima exponencial, y es donde se recolectan los datos para el análisis. Una tercera fase lineal donde la amplificación comienza a disminuir y una cuarta fase (estacionaria) donde finaliza la reacción y se estabiliza la fluorescencia (Dorak, 2006).

El gen de interés se detecta en la fase exponencial, determinado por el número de ciclos al cual la intensidad del fluoróforo aumenta con respecto al ruido de fondo (background). Este número de ciclos se conoce como ciclo umbral (Ct: thresholdcycle) y se representa en la curva de amplificación como el punto de cruce de la curva de amplificación con la recta horizontal (umbral). El Ct está determinado en la fase exponencial de la reacción y es inversamente proporcional al número de copias de ADN blanco, así cuanto más ADN inicial tenga la muestra será menor el número de ciclos Ct. Si la eficiencia de la reacción es óptima, cada vez que se diluye una muestra 10 veces el valor de Ct aumenta aproximadamente 3.32 ciclos (Cortazar y Silva, 2004).

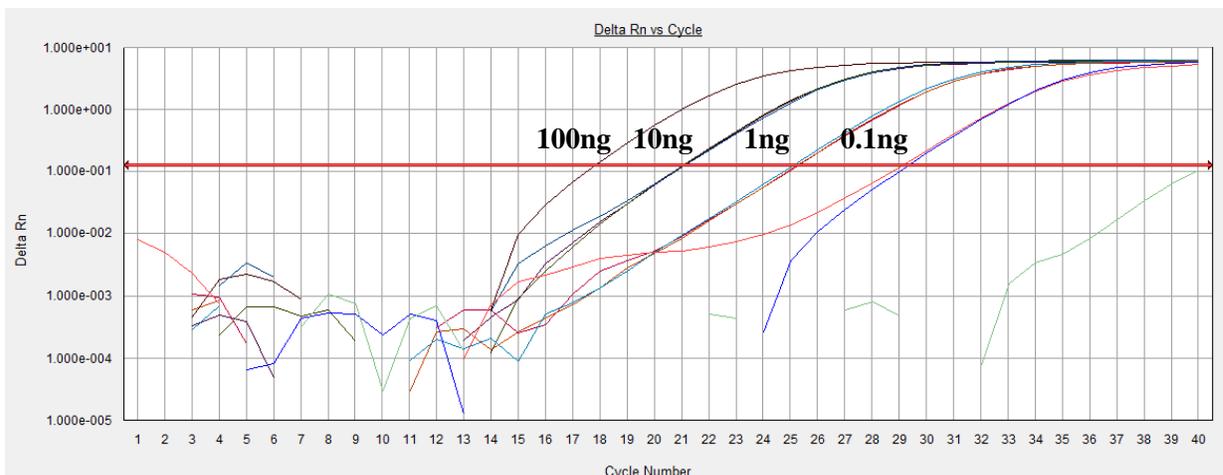


Figura 31. Curva de eficiencia para el gen  $\beta tub$  en *F. graminearum*. Cada reacción se llevó a cabo por triplicado.



Figura 31. Curva de eficiencia para el gen *tri5* en *F. graminearum*. Cada reacción se llevó a cabo por triplicado.



Figura 32. Curva de eficiencia para el gen *pks4* en *F. graminearum*. Cada reacción se llevó a cabo por triplicado.

Los valores de Ct se grafican en función del logaritmo de la cantidad inicial de ADN genómico donde se obtiene la curva estándar. Un valor que se debe analizar cuidadosamente es el valor obtenido en la pendiente de la curva estándar ya que indica el porcentaje de eficiencia de la reacción. Un valor de -3.32 corresponde a una eficiencia de amplificación del 100%, es decir, que por cada copia presente del gen blanco se sintetiza una cadena igual. Cuando una pendiente se vuelve más negativa (<-3.32) la eficiencia decrece, un ensayo de PCR tiempo real es aceptable hasta un 90% de eficiencia o en -3.60 en la pendiente (Rodríguez y Rodríguez, 2006).

Los resultados de la eficiencia se muestran en la tabla 9, los valores se encuentran en el límite del 90%, lo cual es aceptable para el ensayo de cuantificación.

Tabla 9. Resultados que muestran la pendiente, eficiencia de la reacción y coeficiente de correlación de los genes *βtub*, *tri5* y *pks4*, después de realizar la curva estándar por medio de la técnica qPCR

| Gen                | Pendiente | Eficiencia (%) | Coeficiente de correlación $r^2$ | Ecuación de la recta |
|--------------------|-----------|----------------|----------------------------------|----------------------|
| <b><i>Btub</i></b> | -3.53     | 91.99          | 0.99                             | Ct= -3.53LogCo+22.02 |
| <b><i>tri5</i></b> | -3.24     | 103.54         | 0.987                            | Ct= -3.24LogCo+24.63 |
| <b><i>pks4</i></b> | -3.43     | 95.70          | 0.992                            | Ct= -3.43LogCo+23.40 |

El límite de cuantificación indica el valor a partir del cual es posible hacer una afirmación cuantitativa del resultado de una medición. El límite de cuantificación para la metodología de qPCR estandarizada y desarrollada en este estudio es de 0.1 ng para los tres genes de estudio, dado que no se realizaron diluciones posteriores a 0.1ng. Sin embargo, se sabe que, en el 2012, Ramírez en su reporte de tesis y utilizando los mismos cebadores para *pks4* antes mencionados y las mismas condiciones de trabajo, obtuvo un límite de cuantificación de 0.01 ng que es la cantidad de ADN hasta la cual logró construir la curva estándar. Por otro lado, obtuvo un límite de detección de 0.001 ng de ADN de *Fusarium graminearum* que es la concentración más baja de un determinado analito que puede ser detectada en forma concluyente por un método, en este caso el qPCR, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto (Rodríguez *et al.*, 2011)

Tomando lo antes mencionado como referencia, para este estudio el valor de Ct del límite de cuantificación (0.1 ng) para el gen *tri5* es de  $27.76 \pm 0.61$  y para el gen *pks4* es de  $26.93 \pm 0.30$ .

#### 7.7.4 qPCR con ADN de muestras de tortillas.

Una vez que se contaba con las curvas estándar para los genes en estudio, se realizó el qPCR con las muestras de alimentos, cuyo ADN pudo haber sufrido daños por el procesamiento de la matriz alimentaria (Gryson, 2010). Además, el ADN degradado puede producir fragmentos monocatenarios y desnaturalización, y se produce la separación de cadenas lo cual es relevante en el método de SYBR Green ya que se pueden sobreestimar las concentraciones de ADN entre 15 a 50% (Nielsen *et al.*, 2008). Así Quirasco *et al.*, (2004) aplicaron el Kit de extracción FastID (que es el mismo empleado en este trabajo) para detectar transgénicos en tortillas de maíz horneadas y fritas, donde obtuvieron ADN amplificable para llevar a cabo la PCR.

Para el análisis se realizaron dos extracciones independientes para cada muestra y cada una de estas se analizó por duplicado por qPCR, para obtener un total de 4 valores por muestra. A continuación, en la figura 33, se muestra un ejemplo de qPCR llevado a cabo en las muestras de tortilla, y en la tabla 10 los resultados de todas las muestras. La concentración se obtuvo de despejar el valor de X de la ecuación de la tabla 9.

Se llevó a cabo la qPCR con 100 ng de ADN final para las muestras de la delegación Coyoacán, mientras que las restantes se realizaron con 50 ng, esto debido a la cantidad de ADN inicial con la que se disponía para realizar las reacciones.

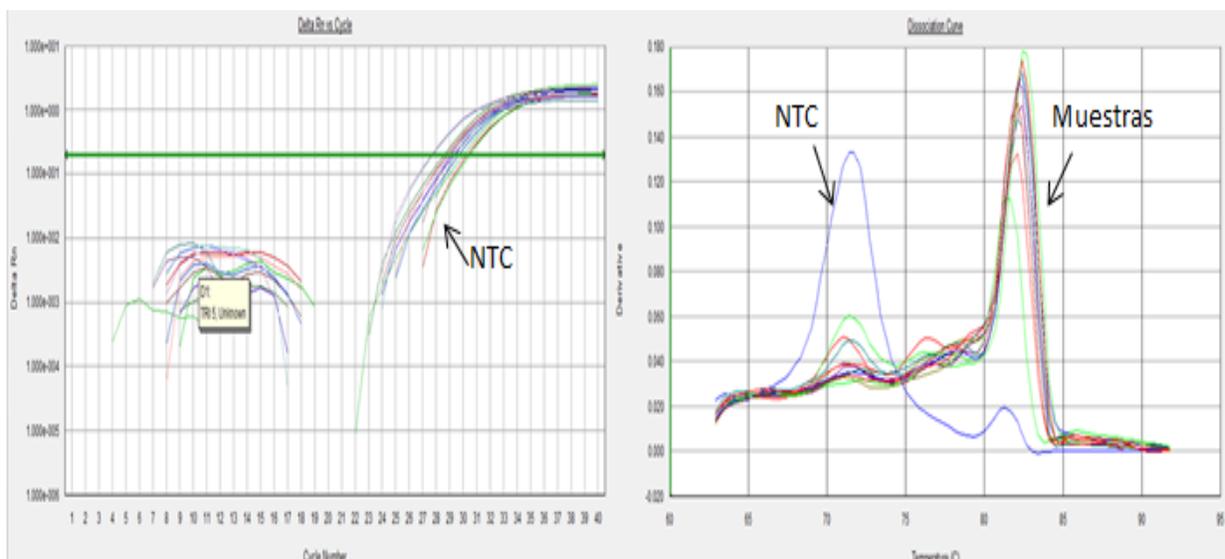


Figura 33. Diagrama de amplificación (izquierda) y curva de disociación (derecha) para el gen *tri5*, en muestras de tortilla de la delegación de Coyoacán (cada color representa una muestra diferente). 55

Tabla 10. Resultados del qPCR para el gen *tri5* y *pks4* en muestras de tortilla. DS: desviación estándar.

|  | Lugar       | Ct<br><i>Pks4</i> | DS   | Concentración<br>ng/μL<br>(ng de ADN de<br><i>F. graminearum</i><br>en la reacción) | Ct<br><i>Tri5</i> | DS   | Concentración<br>ng/μL<br>(ng de ADN de<br><i>F. graminearum</i><br>en la reacción) |
|--|-------------|-------------------|------|---|-------------------|------|---|
| <b>Coyoacán</b><br>(Masa final<br>100 ng)              | Sumesa      | 24.35             | 0.29 | 0.53  | 24.24             | 0.46 | 1.32  |
|  | Mega        | 24.13             | 0.21 | 0.61  | 24.29             | 0.36 | 1.27  |
|  | Comercial   |                   |      |   |                   |      |   |
|  | Wal-Mart    | 24.77             | 0.24 | 0.40  | 25.07             | 0.39 | 0.73  |
|  | Tortillería | 24.18             | 0.23 | 0.59  | 24.81             | 0.11 | 0.88  |
|  | Tortillería | 26.23             | 0.14 | 0.15  | 26.54             | 0.60 | 0.26  |
| <b>Benito</b><br><b>Juárez</b><br>(Masa final<br>50ng) | Tortillería | 26.32             | 0.13 | 0.14  | 26.31             | 0.19 | 0.30  |
|  | Chedraui    | 24.27             | 1.24 | 0.56  | 24.77             | 0.63 | 0.91  |
|  | Wal-Mart    | 25.01             | 0.20 | 0.34  | 25.02             | 0.98 | 0.76  |
|  | Superama    | 24.29             | 0.38 | 0.55  | 24.95             | 0.48 | 0.80  |
|  | Tortillería | 28.43             | 1.41 | -   | 26.75             | 0.37 | 0.22  |
|  | Tortillería | 28.04             | 0.53 | -   | 27.18             | 0.29 | 0.16  |
| <b>Azcapotzalco</b><br>(Masa final<br>50ng)            | Tortillería | 28.12             | 0.20 | -   | 26.93             | 0.19 | 0.20  |
|  | Wal-Mart    | 23.65             | 0.18 | 0.85  | 25.99             | 0.79 | 0.38  |
|  | Wal-Mart    | 23.04             | 0.12 | 1.28  | 25.34             | 0.18 | 0.60  |
|  | Bodega      | 26.11             | 0.06 | 0.16  | 28.16             | 1.44 | -   |
|  | Comercial   |                   |      |   |                   |      |   |
|  | Tortillería | 25.93             | 0.66 | 0.18  | 28.48             | 0.98 | -   |
| <b>Azcapotzalco</b><br>(Masa final<br>50ng)            | Tortillería | 28.54             | 0.48 | -   | 28.91             | 0.84 | -   |
|  | Tortillería | 27.02             | 0.52 | -   | 27.40             | 0.54 | 0.14  |

### 7.7.5 qPCR para detección de transgénicos

Se realizó el análisis de los genes involucrado en transgénicos más comunes, estos son 35s y tnos. Para el caso de 35s se empleó como control positivo el maíz resistente a herbicidas T25 y para el caso del tnos se utilizó el Maíz Bt11 resistente a insectos lepidópteros. Las reacciones se llevaron a cabo bajo las mismas

condiciones que para los genes *tri5* y *pks4*, pero para el caso del gen *35s* fue necesario aumentar la temperatura de alineamiento de los oligos a 61°C para volver la reacción más astringente, ya que a 60°C se obtenían la formación de varios picos inespecíficos después del pico del producto en la curva de disociación. Los resultados se muestran en la figura 34 y 35.

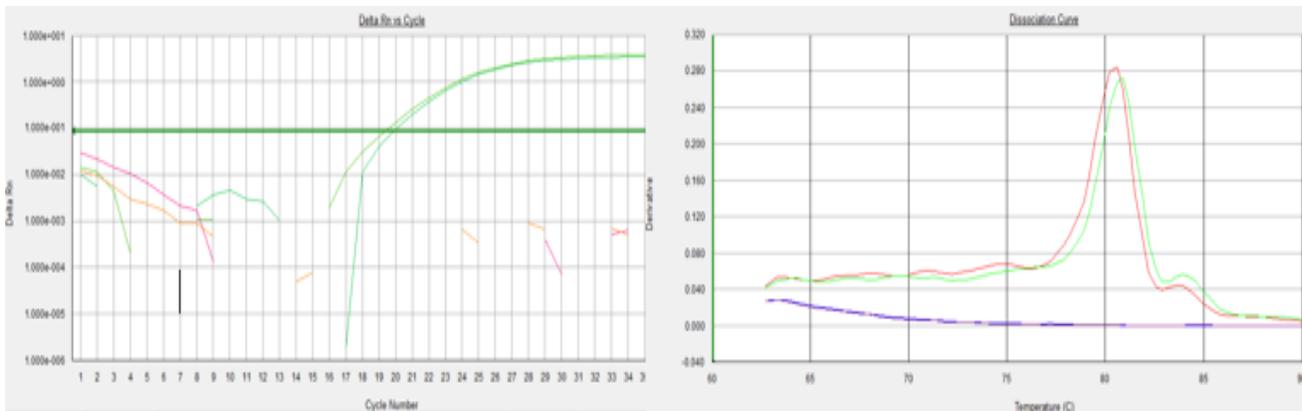


Figura 34. Diagrama de amplificación (izquierda) y curva de disociación (derecha) para el gen *35s*, de la muestra de maíz resistente a herbicidas T25, cada reacción se llevó a cabo por duplicado.

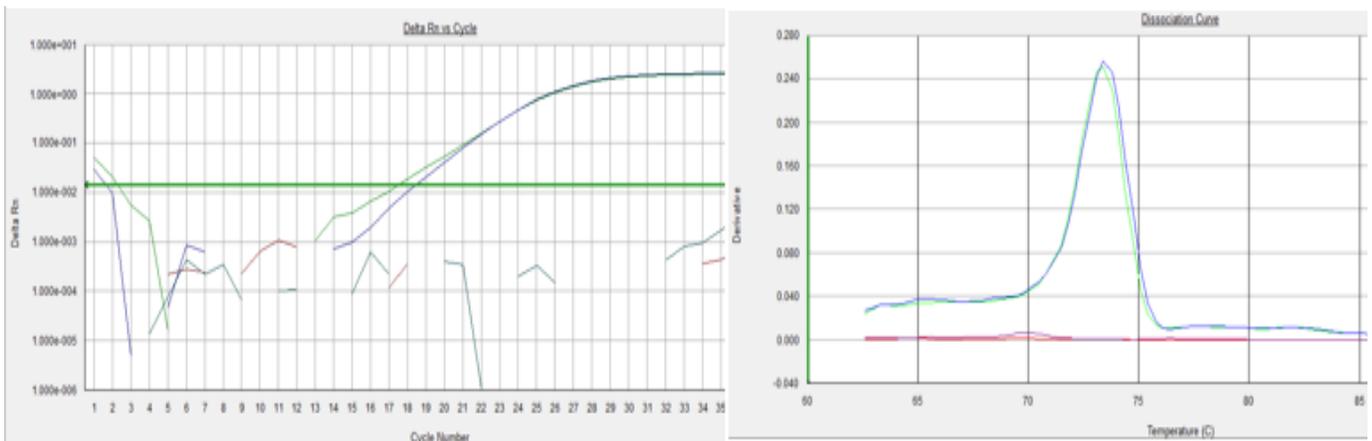


Figura 35. Diagrama de amplificación (izquierda) y curva de disociación (derecha) para el gen *thos*, de la muestra resistente de maíz a insectos lepidópteros Bt11, cada reacción se llevó a cabo por duplicado.

Para cada reacción con el control positivo se utilizaron 50 ng de ADN, en el caso del gen *35s* se obtuvo un valor de Ct de  $19.58 \pm 0.38$  con un valor de Tm de 80.75°C, mientras que para el gen *thos* se tiene un Ct de  $17.95 \pm 0.65$  y un valor de Tm de 73.4°C.

Para los resultados de esta prueba se considerará el pico de disociación que este al Tm esperada y los valores de Ct. En la figura 36 se muestran algunas de las muestras de tortilla, donde se observa que hay formación de productos no específicos a un Tm diferente, por lo que solo se consideró las que se encontraban a valores muy cercanos a la Tm del control positivo mostrado en la figura 34.

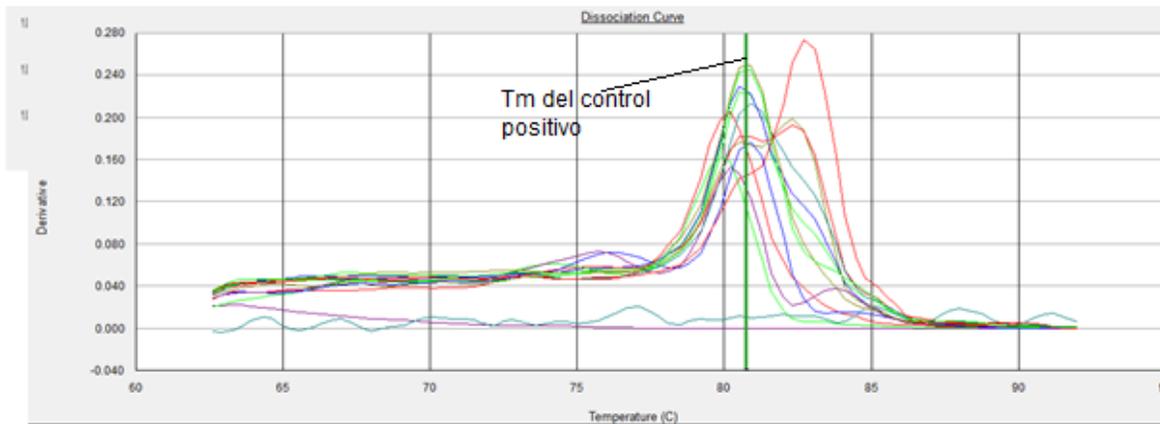


Figura 36. Curva de disociación para el gen 35s, cada color representa una muestra de tortilla, cada reacción se llevó a cabo por duplicado.

A continuación, en la tabla 11 se muestra el resumen de los resultados para la evaluación de maíz transgénico. Hay que destacar que estos cebadores son los que se utilizan universalmente por la comisión europea para la detección de transgénicos por química TaqMan, para este proyecto se utilizó la química de SYBR Green.

Para el caso de los genes de estudio se reportó un límite de detección de 0.02% (JRC, 2010).

Se ha reportado para el genoma del maíz un tamaño de  $2.4 \times 10^9$  bp (Haberer *et al.*, 2005), con este valor es posible calcular el número de copias con las que se partió para realizar la reacción de qPCR.

$$\# \text{ de copias} = \frac{\text{Cantidad de ADN (ng)} \times 6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}}{\# \text{bp}(10^9) \left( 660 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right)}$$

Sabiendo que en 50 ng de ADN del control positivo se cuenta con aproximadamente 19,000 copias del genoma del maíz, y el límite de 0.02% corresponde a un límite de detección de hasta 3.8 copias, pero un valor más conservador de 0.2% (38 copias equivalente a 0.1 ng de ADN) permite detectar sin error asociado. Utilizando el valor en el límite de detección, el valor de Ct de los controles positivos en este trabajo y considerando un valor de eficiencia alrededor del 100% lo cual indica que cada vez que se diluye una muestra 10 veces el valor de Ct aumenta 3.32 ciclos ( $2^n = \text{factor dilución}$ , donde n representa el número de ciclos de la reacción de PCR),

Así si se tiene para el caso del gen *35s* una concentración inicial de 50 ng un valor de Ct de 19.58, para 5 ng se tiene un Ct de 22.90, para 0.5 ng se tiene un Ct 26.22 y para 0.05 ng se tiene un Ct de 29.64. Por tanto con la información anterior es posible calcular el Ct del límite de detección, es decir 0.1 ng de ADN ( $2^n = 5$ , el valor de n es de 2.32 ciclos). Así por lo tanto los resultados son 28.54 de Ct para el gen *35s* y 26.91 de Ct para el gen *tnos*.

Tomando en cuenta estas consideraciones es como se decidió evaluar el resultado de las muestras.

#### 7.7.6 Resumen de resultados de qPCR

Por último, en la tabla 12 se muestra el resumen de los resultados obtenidos en las reacciones de qPCR para los genes involucrados en la biosíntesis de micotoxinas y para los genes involucrados en eventos transgénicos

Después de analizar estos resultados se observa que de las 18 muestras analizadas el 83.33% es positiva para el gen *tri5* que codifica para tricotecenos (deoxinivalenol), esto no es raro ya que esta micotoxina se encuentra de manera más común en cereales, por otro lado el gen *pks4* se encuentra en 72.22% de las muestras, y en conjunto los dos genes se encuentran en la misma muestra en un 61.11%, lo cual no es de extrañar ya que las micotoxinas de *Fusarium* en general se encuentran juntas contaminando (Placinta *et al.*, 1999) además se han reportado que la

zearalenona y el deoxinivalenol presentan efecto aditivo y también se ha reportado interacción sinérgica (Streit *et al.*, 2012).

. Tabla 11. Resultados del qPCR para el gen *35s* y *t-nos* en muestras de tortilla, DS: desviación estándar, (+): resultado positivo, (-): resultado negativo.

|  | Lugar            | Ct<br><b>35S</b> | DS   | Resultado | Ct<br><i>tnos</i> | DS   | Resultado |
|--|------------------|------------------|------|-----------|-------------------|------|-----------|
| <b>Coyoacán</b><br>(Vol final 100 ng)    | Sumesa           | 26.34            | 0.17 | +         | 25.40             | -    | +         |
|  | Mega Comercial   | -                | -    | -         | 24.69             | 0.03 | +         |
|  | Wal-Mart         | 32.36            | 0.55 | -         | 31.55             | -    | -         |
|  | Tortillería      | 33.40            | 0.54 | -         | 34.18             | 0.68 | -         |
|  | Tortillería      | -                | -    | -         | 25.82             | 0.47 | +         |
|  | Tortillería      | -                | -    | -         | 19.89             | -    | +         |
| <b>Benito Juárez</b><br>(Vol final 50ng) | Chedraui         | 31.92            | 0.22 | -         | 28.18             | 0.09 | -         |
|  | Wal-Mart         | 31.30            | 2.25 | -         | 24.69             | 0.25 | +         |
|  | Superama         | 26.71            | 0.13 | +         | 24.69             | 0.25 | +         |
|  | Tortillería      | -                | -    | -         | 32.77             | 1.21 | -         |
|  | Tortillería      | -                | -    | -         | 32.26             | 0.56 | -         |
|  | Tortillería      | -                | -    | -         | 20.05             | 0.01 | +         |
| <b>Azcapotzalco</b><br>(Vol final 50ng)  | Wal-Mart         | 28.02            | 0.33 | +         | 26.33             | -    | +         |
|  | Wal-Mart         | -                | -    | -         | 35.07             | -    | -         |
|  | Bodega Comercial | 29.36            | 0.30 | -         | 29.56             | 2.08 | -         |
|  | Tortillería      | 28.36            | 0.18 | +         | 27.88             | 0.71 | -         |
|  | Tortillería      | -                | -    | -         | 23.60             | 0.03 | +         |
|  | Tortillería      | -                | -    | -         | 19.50             | 0.44 | +         |

. Tabla 12. Resumen de resultados, para los genes *pks4*, *tri5*, *35s* y *tnos*

|  | Lugar       | Concentración<br>ng/μL<br>(ng de ADN de<br><i>F. graminearum</i><br>en la reacción)<br><i>Pks4</i> | Concentración<br>ng/μL<br>(ng de ADN de<br><i>F. graminearum</i><br>en la reacción)<br><i>Tri5</i> | Detección de<br>Transgénico<br><i>35s</i> | Detección de<br>Transgénico<br><i>Tnos</i> |
|--|-------------|--|--|---|--|
| <b>Coyoacán</b><br>(Masa final<br>100 ng)              | Sumesa      | 0.53   | 1.32   | +   | +  |
|  | Mega        | 0.61   | 1.27   | -   | +  |
|  | Comercial   |  |  |   |  |
|  | Wal-Mart    | 0.40   | 0.73   | -   | -  |
|  | Tortillería | 0.59   | 0.88   | -   | -  |
|  | Tortillería | 0.15   | 0.26   | -   | +  |
| <b>Benito</b><br><b>Juárez</b><br>(Masa final<br>50ng) | Tortillería | 0.14   | 0.30   | -   | +  |
|  | Chedraui    | 0.56   | 0.91   | -   | -  |
|  | Wal-Mart    | 0.34   | 0.76   | -   | +  |
|  | Superama    | 0.55   | 0.80   | +   | +  |
|  | Tortillería | -  | 0.22   | -   | -  |
|  | Tortillería | -  | 0.16   | -   | -  |
| <b>Azcapotzalco</b><br>(Masa final<br>50ng)            | Tortillería | -  | 0.20   | -   | +  |
|  | Wal-Mart    | 0.85   | 0.38   | +   | +  |
|  | Wal-Mart    | 1.28   | 0.60   | -   | -  |
|  | Bodega      | 0.16   | -  | -   | -  |
|  | Comercial   |  |  |   |  |
|  | Tortillería | 0.18   | -  | +   | -  |
|  | Tortillería | -  | -  | -   | +  |
|  | Tortillería | -  | 0.14   | -   | +  |

Después de analizar estos resultados se observa que de las 18 muestras analizadas el 83.33% es positiva para el gen *tri5* que codifica para tricotecenos (deoxinivalenol). Esto no es raro ya que esta micotoxina se encuentra de manera más común en cereales, por otro lado el gen *pks4* se encuentra en 72.22% de las muestras, y en conjunto los dos genes se encuentran en la misma muestra en un 61.11%, lo cual no es de extrañar ya que las micotoxinas de *Fusarium* en general se encuentran juntas contaminando (Placinta *et al.*, 1999) además se han reportado que la

zearalenona y el deoxinivalenol presentan efecto aditivo y también se ha reportado interacción sinérgica (Streit *et al.*, 2012).

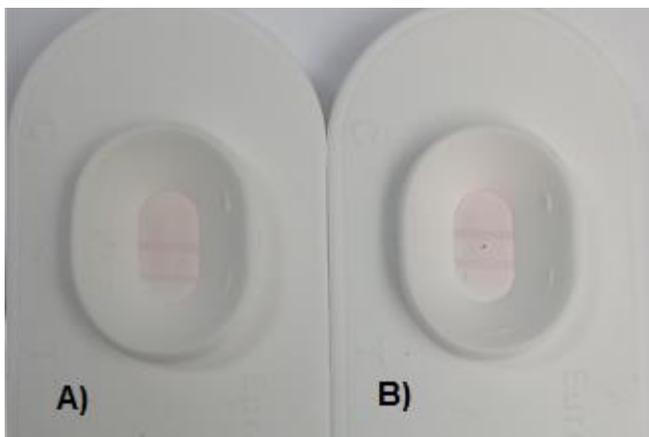
Estos resultados comparados a los obtenidos por González-Osnaya & Farrés (2011) en las que se detectó por PCR punto final los genes *tri5* y *35s* en un 16.7% y 23.3% de las 30 muestras, respectivamente. Lo anterior nos lleva a pensar que el método de PCR tiempo real es un método mucho más sensible y eficiente para detectar la presencia de ADN de *Fusarium graminearum*. En otro estudio realizado en Tlaxcala, Briones-Reyes *et al.*, (2007) detectó y cuantificó ZEA en 24 muestras de maíz por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a un equipo de detección UV, encontrando contaminación de un 70%.

Se observa también que, de manera general, las muestras que corresponden con supermercados, tienen una mayor cantidad de ADN de *Fusarium graminearum*. Esto puede deberse a que estas tiendas adquieren gran cantidad de producto (harina de maíz ya nixtamalizada) el cual almacenan hasta su posterior uso. El hecho de no almacenar correctamente esta harina, puede ser un peligro latente para aquellas muestras que se encuentren contaminadas con esporas ya que puede dar lugar a la biosíntesis total de micotoxinas.

Para los resultados de transgénicos, el gen *35s* es positivo para 22.2% de las muestras y el gen *tnos* para 55.56%, y los dos genes se encuentran en una misma muestra en un 16.67%. Se esperaría que, en 3 muestras positivas para ambos genes transgénicos (16.67%), no hubiera contaminación con ADN de *Fusarium graminearum* o por lo menos los valores de ADN para estas muestras fueran menores comparadas con las muestras que presuntamente son negativas para transgénicos. Sin embargo, el resultado observado no fue así. Por otro lado, existe la posibilidad de que dichos transgénicos no sean aquellos que son resistentes a la toxina Bt, sino aquellos tolerantes al herbicida glufosinato de amonio y glifosato que son unos de los transgénicos más comunes.

## 7.8 Prueba de inmunoensayo

Se realizó un inmunoensayo (figura 37) en aquellas muestras que presentaron un valor de Ct más bajo para el caso de *pk54* y *tri5*, y por tanto con mayor cantidad de ADN de hongo micotoxigénico. Esto con la finalidad de demostrar si a esos valores de Ct la micotoxina ya está presente o no, y en cantidades detectables. Los resultados fueron negativos para ambos casos.



. Figura 37. Resultado de la prueba de inmunoensayo para A) zearalenona y B) deoxinivalenol. Ambos ensayos resultaron negativos..

La prueba rápida de flujo continuo de zearalenona y deoxinivalenol es un inmunoensayo enzimático competitivo para el screening de cereales por la posible presencia de micotoxinas. Estas pruebas son fluidos a base de oro coloidal. Si la muestra contiene  $\geq 100$  ng/g de ZEA, o  $\geq 1000$  ng/g de DON, todos los anticuerpos serán capturados por el conjugado y no aparecerá ninguna línea (resultado positivo). Con cualquier muestra, debe aparecer una línea en la zona de control.

A pesar del hecho de no haber encontrado la toxina formada en las muestras con menor Ct, no significa que no exista un peligro por la contaminación con micotoxinas, sino al contrario la técnica de PCR tiempo real resulta como un paso preventivo, ya que dicha técnica logra detectar ADN de *Fusarium graminearum*, lo cual representa un peligro a largo plazo si es que no se tiene el debido cuidado con el trato y almacenamiento de las muestras, y de la misma materia prima para su elaboración.

El hecho de nixtamalizar la tortilla resulta de gran ayuda en la eliminación de micotoxinas, como ya lo demostró Abbas *et al.*, (1998), que hallaron reducciones importantes de DON y ZEA; el porcentaje de reducción variaba entre el 58 y el 100 por ciento en el caso de la zearalenona, y entre el 72 y el 82 por ciento en el del DON, sin embargo, el hecho de nixtamalizar la tortilla no garantiza que esta se encuentre libre de micotoxinas, es más bien un paso para reducir mas no para eliminar. Sería interesante realizar una prueba con esporas del hongo *Fusarium graminearum* inoculando intencionalmente maíz con una concentración conocida, nixtamalizar y observar si hay alguna pérdida de esporas, esto debido a que puede ser que el producto final sea resultado de emplear materia prima contaminada con esporas, pero no necesariamente con la micotoxina.

Por ultimo existe un trabajo realizado por Wall, Hiram (2016), en la que evalúa el riesgo a la exposición a aflatoxinas y fumonisinas en tortillerías en la ciudad de Veracruz. Sus resultados muestran que obtuvo una mayor contaminación por aflatoxinas en tortillerías que nixtamalizaban *in situ*, y que de las 120 muestras que analizó en los años 2013, 2014 y 2015, sólo 3 de ellas se encontraban por encima de lo establecido por la normatividad mexicana (NOM-187-SAA1/SCFI-2002). Sin embargo, al evaluar la exposición, es decir el consumo de tortillas por mexicano al día encontró que hasta un 61.5% de la población podría estar consumiendo una dosis mayor a la recomendada por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) por sus siglas en inglés (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) (2001) para aflatoxinas (1 ng/kg peso corporal al día). Con los resultados obtenidos y con la ausencia de legislación para DON y ZEA en nuestro país hacen necesario prestar especial atención a estos contaminantes en un producto tan consumido, siendo necesario un estudio en la evaluación de riesgo sabiendo que el Codex Alimentarius (2002) ha establecido una ingestión diaria máxima tolerable provisional (IDMTP) para la zearalenona y sus metabolitos de 0,5 µg/kg de peso corporal al día y para el deoxinivalenol 1 µg/kg peso corporal al día.

## 8. Conclusiones

Se lograron estandarizar las técnicas de PCR punto final y PCR tiempo real para los genes *tri5* y *pks4*, los cuales permitirán detectar *Fusarium graminearum* en muestras de tortilla de maíz, estableciendo un límite de detección y cuantificación en 0.1 ng para ambos genes.

Se comprobó la especificidad de los cebadores para *Fusarium graminearum* por medio de PCR punto final, y qPCR, donde los resultados fueron negativos para todas las cepas a excepción de *A. nidulans* qPCR.

Para el análisis de datos de qPCR por química de SYBR Green se deben de analizar la curva de amplificación y la curva de disociación para poder establecer un resultado contundente.

La técnica de qPCR es una técnica muy sensible que presenta ventajas frente a otras técnicas analíticas, como HPLC, GC-MC, LC-MC y ELISA que se basan en la detección de la micotoxina final, mientras que la técnica de qPCR se basa en la detección de un gen involucrado en la biosíntesis de las micotoxinas producidas por *Fusarium graminearum*. Por tanto, la técnica puede detectar ADN de dicho hongo, lo cual es de gran ayuda para establecer protocolos de prevención en la seguridad alimentaria.

La técnica de qPCR permite la detección de OGMs, pero el hecho de contar con la presencia de OGM en la muestra no necesariamente significa que no habrá o habrá poca cantidad de ADN de hongo micotoxigénico ya que existen diferentes tipos de OGM. Por lo tanto, es necesario un estudio con eventos específicos por ejemplo para los OGM que son resistentes a hongos y poder establecer una relación.

## 9. Referencias

- Abbas, H.K., Mirocha, C.J., Rosiles, R., & Carvajal, M. (1988). Decomposition of zearalenone and deoxynivalenol in the process of making tortillas from corn. *Cereal Chemistry*, 65 (1): 15-19.
- Alexander, N.J., Proctor, R.H., & McCormick, S.P. (2009). Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. *Toxin Reviews*, 28 (2-3):198-215.
- Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Guía de reactivos, EEUU, 4377718 Rev. B 06/2010.
- Aportela, J., Fernández-Suárez, M.D., & Rocha-Munive, M.G. (2008). Detección de organismos genéticamente modificados en cultivos de maíz en las delegaciones de Milpa Alta, Tláhuac y Magdalena Contreras del D.F. Instituto Nacional de Ecología. 2da Etapa.
- Bressani, R. 2008. Cambios nutrimentales en el maíz inducidos por el proceso de nixtamalización. In: Rodríguez-García, M.E., Serna-Saldívar, S.O., & Sánchez-Sinencio, F (eds). Nixtamalización del Maíz a la Tortilla. Aspectos Nutrimentales y Toxicológicos. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México. pp:19-80.
- Bridge, P., & Spooner, B. (2001). Soil fungi: diversity and detection. *Plant and soil*, 232 (1-2): 147-154.
- Briones-Reyes, D., Gómez-Martínez, L., & Cueva-Rolón, R. (2007). Zearalenone contamination in corn for human consumption in the state of Tlaxcala, Mexico. *Food Chemistry*, 100 (2): 693-698.
- Brown, D.W., McCormick, S.P., Alexander, N.J., Proctor, R.H., & Desjardins, A.E. (2002). Inactivation of a cytochrome P-450 is a determinant of trichothecene diversity in *Fusarium* species. *Fungal Genetics and Biology*, 36 (3): 224–233.
- Brown, D.W., McCormick, S.P., Alexander, N.J., Proctor, R.H., & Desjardins, A.E. (2001). A genetic and biochemical approach to study trichothecene diversity in *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology*, 32 (2): 121-133.

- Brown, D.W., Butchko, R.A.E., Baker, S.E., & Proctor, R.H. (2012a). Phylogenomic and functional domain analysis of polyketide synthases in *Fusarium*. *Fungal Biology*, 116 (2): 318–331.
- Bustin, S.A., Benes, V., Nolan, T., & Pfaffl, M.W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR-a perspective. *Journal of molecular endocrinology*, 34 (3): 597-601.
- Castillo-Urueta P., Carvajal, M., Méndez, I., Meza, F., & Gálvez, A. (2011) Survey of aflatoxins in maize tortillas from Mexico City. *Food Additives and Contaminants*, 4 (1): 42-51.
- Castro-Ochoa, Lelie Denise. (2014). *Producción, identificación y caracterización de carboxilesterasas de Aspergillus nidulans*. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, México.
- Chandler, E.A., Simpson, D.R., Thomsett, M.A., & Nicholson, P. (2003). Development of PCR assays to Tri7 and Tri13 trichothecene biosynthetic genes, and characterisation of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62 (6): 355- 367.
- Codex Alimentarius (2002). Programa conjunto fao/oms sobre normas alimentarias comité del codex sobre aditivos alimentarios y contaminantes de los alimentos. 34ª reunión, Rotterdam, Países Bajos
- CONEVAL, Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social (2012) Construcción de las Líneas de Bienestar. Documento metodológico. Disponible en: [http://www.coneval.gob.mx/Informes/Coordinacion/INFORMES\\_Y\\_PUBLICACIONES\\_PDF/Construccion\\_lineas\\_bienestar.pdf](http://www.coneval.gob.mx/Informes/Coordinacion/INFORMES_Y_PUBLICACIONES_PDF/Construccion_lineas_bienestar.pdf).
- Cortazar, A., & Silva, P. (2004). *Instituto de Biotecnología*. Recuperado el 29 de Julio de 2012, de Institutito de Biotecnología. UNAM: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf>
- Cuadrado, M.T. (2008). Técnicas Moleculares en la Detección de alimentos genéticamente modificados. Curso de experto universitario en “Biotecnología aplicada de los alimentos”. 1–32.

- Cullen, D.W., Lees, A.K., Toth, I.K., & Duncan, J.M. 2001. Conventional PCR and real-time quantitative PCR detection of *Helminthosporium solani* in soil and on potato tubers. *European Journal of Plant Pathology*, 107 (4): 387-398.
- Cuomo, C.A., Güldener, U., Xu, J.R., Trail, F., Turgeon, B.G., Di Pietro, A., & Adam, G. (2007). The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. *Science*, 317 (5843): 1400-1402.
- Desjardins, A.E., & Proctor, R.H. (2007). Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International journal of food microbiology*, 119 (1): 47-50.
- Dorak, M.T. (Ed.). (2007). *Real-time PCR*. New York: Taylor & Francis.
- Edwards, S.G., O'Callaghan, J., & Dobson, A.D. (2002). PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. *Mycological Research*, 106 (09): 1005-1025.
- Echeverría, M.E., & Arroyo, L.E. (2000). Recetario del Maíz. Cocina Indígena y Popular. *Consejo Nacional para las Culturas y las Artes*, D.F., México. 441 pp.
- Fekete, C., Logrieco, A., Giczey, G., & Hornok, L. (1997). Screening of fungi for the presence of the trichodiene synthase encoding sequence by hybridization to the Tri5 gene cloned from *Fusarium poae*. *Mycopathologia*. 138 (2):91–97.
- Filion, M., St-Arnaud, M., & Jabaji-Hare, S.H. (2003). Direct quantification of fungal DNA from soil substrate using real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 53 (1): 67-76.
- Foroud, N.A., & Eudes, F. (2009). Trichothecenes in cereal grains. *International Journal of Molecular Sciences*, 10 (1): 147-173.
- Gaffoor, I., & Trail, F. (2006). Characterization of two polyketide synthase genes involved in zearalenone biosynthesis in *Gibberella zeae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (3): 1793-1799.
- García-Lara, S., Espinosa-Carillo, C., & Bergvinson, D.J. (2007). *Manual de plagas en granos almacenados y tecnologías alternativas para su mejora y control*. México, D.F. CIMMYT.
- Glenn, A.E. (2007). Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, 137 (3): 213-240.

- González-Osnaya, L., & Farrés, A. (2011). Deoxynivalenol and zearalenone in Fusarium contaminated wheat in Mexico City. *Food Additives and Contaminants*, 4 (1): 71-78.
- Gryson, N. (2010). Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396 (6): 2003-2022.
- Haberer, G., Young, S., Bharti, A.K., Gundlach, H., Raymond, C., Fuks, G., & Nusbaum, C. (2005). Structure and architecture of the maize genome. *Plant Physiology*, 139 (4): 1612-1624.
- Hewitt, T.C., Flack, C. L., Kolodziejczyk, J.K., Chacon, A.M., & D'Ovidio, K. L. (2012). Occurrence of zearalenone in fresh corn and corn products collected from local Hispanic markets in San Diego County, CA. *Food control*, 26 (2): 300-304.
- Holden, M. J., Levine, M., Scholdberg, T., Haynes, R. J., & Jenkins, G. R. (2010). The use of 35S and Tnos expression elements in the measurement of genetically engineered plant materials. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396 (6): 2175–2187.
- Hughes, S., & Moody, A. (2007). *PCR: methods Express*, UK, Bloxham. Scion Publishing.
- IARC. (2002). International Agency for Research on Cancer. Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. World Health Organization. Some Traditional Herbal Medicines. Some Mycotoxins and Styrene. Summary of Data Reported and Evaluation. Lyon, France. IARC
- Ibañez-Vea, M., Lizarraga, E., González-Peñas, E., & López de Cerain, A. (2012). Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in breakfast cereals from spanish market. *Food control*, 22 (12): 1949-1955
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2014). Encuesta Nacional de Ingresos y Gastos de los Hogares (ENIGH). Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/Proyectos/Encuestas/Hogares/regulares/Enigh>
- James, Clive. (2015). 20th Anniversary (1996 to 2015) of the Global Commercialization of Biotech Crops and Biotech Crop Highlights in 2015. *ISAAA Brief*, 51.

- Jiménez-García, E., Tapia-Vieyra, J.V., & Mas-Oliva, J. (2004). El espliceosoma: Corte y empalme del pre-ARNm. *Revista de Educación Bioquímica*, 23, 59-63.
- JRC<sup>2010a</sup>. Qualitative PCR method for detection of Cauliflower Mosaic Virus 35-S promoter. JRC Compendium of Reference Methods for GMO Analysis. European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed. 2010. pp 173
- JRC<sup>2010c</sup>. Qualitative duplex PCR method for detection of Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter and Nopaline synthase terminator (partimCaMPV P-35S). JRC, Compendium of Reference Methods for GMO Analysis. European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed. 2010. pp 179
- Kato, T.A., Mapes, C., Mera, L.M., Serratos, J.A., & Bye, R.A. (2009). Origen y Diversificación del Maíz: *Una Revisión Analítica*. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Uso y Conocimiento de la Biodiversidad. Editorial Impresora Apolo, S.A. de C.V. D.F., México. 116 p.
- Kim, Y.T., Lee, Y. R., Jin, J., Han, K.H., Kim, H., Kim, J.C., & Lee, Y.W. (2005). Two different polyketide synthase genes are required for synthesis of zearalenone in *Gibberella zeae*. *Molecular Microbiology*, 58 (4): 1102–1113.
- Kimura, M., Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Ohsato, S., & Fujimura, M. (2007). Molecular and genetic studies of *Fusarium* trichothecene biosynthesis: pathways, genes, and evolution. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71 (9): 2105-2123.
- Klejnstrup, M.L., Frandsen, R.J., Holm, D.K., Nielsen, M.T., Mortensen, U.H., Larsen, T.O., & Nielsen, J.B. (2012). Genetics of polyketide metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Metabolites*, 2 (1): 100-133.
- Kroken, S., Glass, N.L., Taylor, J.W., Yoder, O.C., & Turgeon, B.G. (2003). Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 (26): 15670-15675.
- Luftalla, G., & Uze G. (2006). Performing Quantitative Reverse-Transcribed Polymerase Chain Reaction Experiments. *Methods in Enzymology*, 410, 386-400.
- Luo, X.Y. (1988). *Fusarium* toxins contamination of cereals in China. *Proceedings of the Japanese Association of Mycotoxicology*, 97-98.

- Lysøe, E., Klemsdal, S.S., Bone, K.R., Frandsen, R.J.N., Johansen, T., Thrane, U., & Giese, H. (2006). The PKS4 gene of *Fusarium graminearum* is essential for zearalenone production. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (6): 3924–3932.
- McCormick, S.P., Alexander, N.J., & Proctor, R.H. (2006). *Fusarium Tri4* encodes a multifunctional oxygenase required for trichothecene biosynthesis. *Canadian Journal of Microbiology*, 52 (7): 636-642.
- McPherson, M.J., & Moller, S.G. (2000). *PCR*. Oxford, Bios Scientific Publishers.
- Méndez, A., & Moreno, E. (2009). Las micotoxinas, contaminantes naturales de los alimentos. *Revista Ciencia*, 61, 1-7.
- Meriç, S., Çakır, Ö., Turgut, N., & Arı, S. (2014). Detection of genetically modified maize and soybean in feed samples, *Genetics and Molecular Research*, 13 (1): 1160-1168.
- Miller, J.D., ApSimon, J.W., Blackwell, B.A., Greenhalgh, R., & Taylor, A. (2001). Deoxynivalenol: a 25 year perspective on a trichothecene of agricultural importance. In *Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium APS Press, St. Paul, Minnesota* (pp. 310-320).
- Nesic, S., Grubic, G., Adamovic, M., Đorđević, N., Stojanovic, B., & Boickovic, A. (2010). Uso de la zeolita como absorbente de la zearalenona en la nutrición de terneros. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 44 (3), 227-232.
- Niessen, M.L., & Vogel, R.F. (1998). Group specific PCR-detection of potential trichothecene producing *Fusarium*-species in pure cultures and cereal samples. *Systematic and Applied Microbiology*, 21 (4): 618–631.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008, Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Métodos de prueba.
- Osborne, L.E., & Stein, J.M. (2007). Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 119 (1): 103-108.
- Paredes-López, O., Guevara-Lara, F., & Bello-Pérez, L.A. (2009). La nixtamalización y el valor nutritivo del maíz. *Ciencias*, 92 (092).

- Parent-Massin, D. (2004). Haematotoxicity of trichothecenes. *Toxicology Letters*, 153 (1): 75-81.
- Placinta, C.M., D'Mello, J.P.F., & Macdonald, A.M.C. (1999). A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 78 (1): 21–37.
- Programa de Maíz del CIMMYT. 2004. Enfermedades del maíz: una guía para su identificación en el campo. Cuarta edición. México, D.F.: CIMMYT.
- Quirasco, M., Schoel, B., Plasencia, J., Fagan, J., & Gálvez, A. (2004). Suitability of real-time quantitative polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for cry9C detection in Mexican corn tortillas: fate of DNA and protein after alkaline cooking. *Journal of AOAC International*, 87 (3): 639-646
- Ramírez Ramos, Erick (2012). *Determinación y cuantificación de Fusarium graminearum en trigo por medio de técnicas de PCR punto final y PCR tiempo real*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, México.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Luque, M.I., Justesen, A., & Córdoba, J. (2011). Quantification of ochratoxin A-producing molds in food by SYBR Green and TaqMan real-time PCR methods. *International Journal of Food Microbiology*, 149 (3): 226-235.
- Rodríguez, M., & Rodríguez, W. (2006). *PCR Tiempo Real*. México: IBT-UNAM.
- Rubio, J. (2004). Alimentos transgénicos, Ciencia, Ambiente y Mercado: Un debate abierto. *Editorial Siglo XXI*. México, D. F.
- SAGARPA. (2015). Panorama Agroalimentario Maíz 2015, 0–39.
- Sánchez, J.J., Goodman, M.M., & Stuber, C.W. (2000). Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of Mexico. *Economic Botany*, 54 (1):43-59.
- Serna-Saldívar, S.O., & Amaya-Guerra, C.A. (2008). El papel de la tortilla nixtamalizada en la nutrición y la alimentación. *Nixtamalización del Maíz a la Tortilla. Aspectos Nutrimientales y Toxicológicos*. M E Rodríguez-García, S O Serna-Saldívar, F Sánchez-Sinencio (eds). Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México. pp:105-151.

- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2007) Situación Actual y Perspectivas del Maíz en México 1996 - 2012. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). México, D.F. pp 208.
- Soberón, M., Bravo, A. (2007). Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. *López-Mungía, A., Una ventana al que hacer científico, Instituto de Biotecnología de la UNAM, 25, 303-314.*
- Soriano del Castillo, J. (2007). *Micotoxinas en Alimentos*. España: Díaz de Santos.
- Somma, M., & Querci, M. (2007). Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos. *Extracción y purificación de ADN. European Commission JRC.*
- Streit, E., Schatzmayr, G., Tassis, P., Tzika, E., Marin, D., Taranu, I., & Oswald, I. P. (2012). Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed—Focus on Europe. *Toxins, 4* (10): 788-809.
- Suárez, R. F., Morales, L. A., & Gálvez, A. (2013). Importance of Mexican Maize Landraces in the National Diet. An Essential Review. *Revista Fitotecnia Mexicana, 36, 275–283.*
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad, 2* (2): 10-78.
- Turrent Fernández, A., Serratos Hernández, J. A., Mejía Andrade, H., & Espinosa Calderón, A. (2009). Liberación comercial de maíz transgénico y acumulación de transgenes en razas de maíz mexicano. *Revista fitotecnia mexicana, 32* (4): 257-263.
- Wall Martínez, Alejandro Hiram (2016). *Evaluación probabilística del riesgo a la exposición a aflatoxinas y fumonisinas por consumo de tortilla de maíz en la Ciudad de Veracruz*. Tesis de Doctorado. Tecnológico nacional de México, Instituto tecnológico de Veracruz, México.
- Ward, T.J., Clear, R.M., Rooney, AP., O'Donnell, K., Gaba, D., Patrick, S., Starkey, D.E., Gilbert, J., Geiser, D.M., Nowicki, T.W. (2008). An adaptive evolutionary shift in *Fusarium* head blight pathogen populations is driving the rapid spread of

more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America. *Fungal Genetics and Biology* 45 (4): 473-484.

Wiśniewska, H., Stępień, Ł., Waśkiewicz, A., Beszterda, M., Góral, T., Belter, J. (2014). Toxigenic *Fusarium* species infecting wheat heads in Poland. *Central European Journal of Biology*, 9 (2):163-172.

Wong, M., & Medrano, J. (2005). Real-time PCR for mRNA quantification. *Biotechniques*, 39 (1): 75-85.