



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *Fusarium  
graminearum* EN TRIGO POR MEDIO DE MÉTODOS DE  
PCR Y PCR TIEMPO REAL

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO DE ALIMENTOS**

P R E S E N T A :

**ERICK RAMÍREZ RAMOS**



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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:** M.C. Olga del Carmen Velázquez Madrazo

**VOCAL:** QFB Aurora Irma Ortegón Ávila

**SECRETARIO:** Dra. Liliana Rocío González Osnaya

**1er. SUPLENTE:** Dra. Gloria Díaz Ruiz

**2° SUPLENTE:** M.C. Martha Giles Gómez

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

**LABORATORIO 312 CONJUNTO E DE LA FACULTAD DE QUÍMICA.**

### **ASESOR**

---

**Dra. Liliana Rocío González Osnaya**

### **SUPERVISOR TÉCNICO**

---

**Dra. Carolina Peña Montes**

### **SUSTENTANTE**

---

**Erick Ramírez Ramos**

## Tabla de contenido

Introducción .....	1
1. ANTECEDENTES.....	3
1.1. El Trigo en México.....	3
1.2. Plagas e infecciones del trigo.....	7
1.2.1. <i>Fusarium graminearum</i> .....	7
1.2.2. Factores para contaminación y desarrollo de <i>Fusarium</i> .....	8
1.3. Micotoxinas en cereales .....	9
1.3.1. Toxicidad de micotoxinas.....	11
1.3.2. Micotoxinas de <i>F. graminearum</i> .....	13
1.4. Zearalenona.....	13
1.4.1. Toxicidad .....	14
1.4.2. Legislación.....	15
1.4.3. Incidencia en alimentos.....	15
1.4.4. Biosíntesis .....	18
1.5. Cuantificación de micotoxinas.....	18
1.5.1. Métodos para cuantificación de hongos micotoxigénicos basados en técnicas de análisis del ADN .....	20
1.5.2. Genes utilizados en la detección de hongos productores de micotoxinas .....	21
1.6. PCR punto final.....	21
1.7. PCR tiempo real (qPCR).....	23
1.7.1. Sistemas de detección usadas en PCR tiempo real (qPCR).....	24
1.7.2. Fluoróforos de unión al ADN.....	25
1.7.2.1. SYBR Green.....	25
1.7.3. Sonda de hidrolisis (TaqMan) .....	27
1.7.4. Métodos de cuantificación .....	29
1.7.4.1. Cuantificación absoluta .....	29

1.7.4.1.1. Curva estándar cuantificación absoluta .....	29
1.7.4.2. Cuantificación relativa.....	29
2. Objetivos .....	31
2.1. Objetivos generales .....	31
2.2. Objetivos particulares.....	31
3. Metodología .....	32
3.1. Diseño de oligonucleótidos .....	32
3.2. Extracción de ADN de cepas puras .....	32
3.3. PCR punto final.....	33
3.4. Especificidad de oligonucleótidos y secuenciación de productos de PCR.....	34
3.5. Muestreo .....	35
3.6. Conteo en placa de muestras .....	35
3.7. Extracción del ADN de muestras de trigo .....	37
3.8. Muestras artificialmente contaminadas .....	37
3.9. Estandarización del PCR tiempo real (qPCR) .....	39
4. Resultados y discusión .....	41
4.1. Diseño de oligonucleótidos.....	41
4.2. Extracción de ADN cromosomal de cepas micotoxigénicas de <i>Fusarium</i> .....	44
4.2.1 PCR punto final con ADN de cepas micotoxigénicas.....	47
4.2.2. Secuenciación de productos obtenidos en PCR punto final ...	48
4.3. Tratamiento de muestras de trigo para consumo humano .....	49
4.3.1. Conteo en placa .....	49
4.3.2 Extracción de ADN de muestras de trigo .....	50
4.3.3. PCR punto final del ADN de muestras de trigo.....	50
4.4. PCR Tiempo real (qPCR).....	51
4.4.1. Curvas de disociación .....	51
4.4.2. Elaboración de curvas patrón.....	53
4.4.3. PCR tiempo real (qPCR) con ADN de muestras de la Central de Abasto.....	59

4.4.4. Estandarización de PCR tiempo real (qPCR) .....	61
4.5. Limite de detección y cuantificación .....	68
4.6. Interferencia de la matriz alimenticia .....	69
4.7. Muestras de trigo para consumo humano de la Central de Abasto de la Ciudad de México.....	71
4.8. Muestras artificialmente contaminadas .....	75
4.8.1. Muestras artificialmente inoculadas e incubadas .....	76
4.8.2. Muestras artificialmente inoculadas sin incubar .....	80
4.9. Comparación de métodos de extracción: FastID y método convencional .....	82
5. Conclusiones .....	86
6. Perspectivas.....	87
7. Bibliografía .....	88

## Índice de Figuras:

Figura 1. Principales producciones de alimentos y productos agrícolas de México en el año 2009. ....	4
Figura 2. Principales productos exportados por México en el año 2009. .	5
Figura 3. Principales productos importados a México en 2009.....	6
Figura 4. Fases de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxinas .....	10
Figura 5. Riesgos de las micotoxinas para la salud humana.....	11
Figura 6. Estructura química de zearalenona. ....	14
Figura 7. Esquema representativo de los pasos en una PCR convencional .....	22
Figura 8. Curva de QPCR, donde se detallan sus componentes .....	24
Figura 9. Representación grafica de la incorporación de SYBR Green resultando en un incremento de la señal fluorescente durante el PCR..	26
Figura 10. Análisis de disociación de un QPCR usando SYBR Green .....	27
Figura 11. Representación grafica de la química de TaqMan durante el PCR tiempo real (qPCR).....	28
Figura 12. Características morfológicas de las cepas micotoxigénicas de <i>F. graminearum</i> . ....	45
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN cromosomal extraído de las cepas puras .....	47
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos de PCR punto final de las cepas micotoxigénicas de <i>F. graminearum</i> .....	48
Figura 15. Secuenciación y alineamiento del producto de PCR punto final para los oligonucleótidos a) PKS4 y, b) $\beta$ Tub.....	49
Figura 16. Curvas de disociación de oligonucleótidos de PKS4 y $\beta$ Tub con ADN de trigo control. ....	52
Figura 17. Curvas de disociación para genes a) PKS4 con ADN de <i>F. graminearum</i> , b) $\beta$ Tub con ADN de <i>F. graminearum</i> .....	52

Figura 18. Diagrama de amplificación para el gen PKS4.....	54
Figura 19. Curva estándar para el gen PKS4 con cantidades de 100 ng a 0.01 ng de ADN de <i>Fusarium</i> .....	55
Figura 20. Curva estándar para el gen $\beta$ Tub con cantidades de 100 ng a 0.01 ng de ADN de <i>Fusarium</i> .....	57
Figura 21. Diagrama de amplificación para el gen PKS4 con cantidades por debajo de 0.001 ng. ....	58
Figura 22. Curvas de disociación para gen PKS4 con concentraciones por debajo 0.001ng.....	59
Figura 23. Curvas de disociación PCR tiempo real (qPCR) con muestras de trigo de la Central de Abasto de la Ciudad de México .....	60
Figura 24. Curvas de disociación muestras de trigo de la central de abasto de la ciudad de México donde se observa una gran cantidad de dímeros y/o productos inespecíficos.....	61
Figura 25. Curvas de disociación con una temperatura de alineamiento a 68°C.....	62
Figura 26. Curvas de disociación de las muestras de trigo de la central de Abasto de la Ciudad de México, con una temperatura de alineamiento a 68°C. ....	63
Figura 27. Protocolo de estandarización de PCR tiempo real (qPCR), al cual se le adicionó un paso a diferentes temperaturas durante 31 segundos en el cual fue medida la fluorescencia. ....	64
Figura 28. Curvas de amplificación para el gen PKS4 con ADN de trigo control a diferentes temperaturas donde se recolecto la fluorescencia .	65
Figura 29. Curva estándar para los genes a) PKS4 y b) $\beta$ Tub .....	66
Figura 30. Curva de disociación a) gen PKS4 y b) gen $\beta$ Tub .....	67
Figura 31. Limite de detección para a) gen PKS4 y b) gen $\beta$ Tub .....	69
Figura 32. Ensayo para interferencia de la matriz alimentaria.....	70



Figura 33. Curvas de amplificación para muestras de trigo para consumo humano de la Central de Abasto de la Ciudad de México, a) gen PKS4 y b) gen $\beta$ Tub.....	72
Figura 34. Ejemplo de curva de fluorescencia sin escala logarítmica....	73
Figura 35. Fluorescencia en crudo para muestras de trigo para consumo humano de la Central de Abasto de la Ciudad de México. a) Gen PKS4, y b) Gen $\beta$ Tub .....	74
Figura 36. Trigo inoculado con esporas de <i>F. graminearum</i> (F40) e incubado durante 6 semanas a 29 °C.....	76
Figura 37. Gel de agarosa al 2% de reacción de PCR punto final para ADN de trigo incubado durante 6 semanas .....	77
Figura 38. Curvas de amplificación para ADN de trigo inoculado e incubado durante 6 semanas. ....	78
Figura 39. Fluorescencia en crudo para ADN de trigo inoculado e incubado para a) gen PKS4 y b) gen $\beta$ Tub. ....	79
Figura 40. Gel de agarosa al 2% de reacción de PCR punto final para ADN de trigo inoculado sin incubar .....	80
Figura 41. Curvas de amplificación para ADN de trigo inoculado sin incubar para ambos genes.....	81
Figura 42. Fluorescencia en crudo para ADN de trigo inoculado sin incubar para a) gen PKS4 y b) gen $\beta$ Tub. ....	82
Figura 43. Curvas de amplificación de extracción de esporas para el gen PKS4, usando a) método convencional y b) kit FastID. ....	83
Figura 44. Curvas de amplificación de extracción de esporas para el gen $\beta$ Tub, usando a) método convencional y b) kit FastID. ....	84
Figura 45. Fluorescencia en crudo para los dos métodos de extracción usados, a) gen PKS4 y b) gen $\beta$ Tub. ....	85

## Índice de Tablas:

Tabla 1. Principales países exportadores de trigo en 2009.....	5
Tabla 2. Clasificación de las micotoxinas según la IARC.....	12
Tabla 3. Principales especies productoras de zearalenona. ....	13
Tabla 4. Niveles máximos admitidos de zearalenona en alimentación humana por la Comisión Europea.....	15
Tabla 5. Presencia mundial de ZEA de diversos productos para consumo humano. ....	16
Tabla 6. Volúmenes agregados de los reactivos usados para PCR punto final.....	35
Tabla 7. Concentraciones y reactivos para la realización del PCR tiempo real (qPCR).....	39
Tabla 8. Secuencia de oligonucleótidos, tamaño del producto de PCR y gen blanco.....	42
Tabla 9. Valores E, obtenidos mediante análisis BLAST de oligonucleótidos seleccionados .....	43
Tabla 10. Valores de delta G obtenidos por el programa Oligo Analyzer para formación de dímeros y heterodímeros. ....	44
Tabla 11. Cuantificación de las extracciones de cepas puras, y relación de absorbancia 260/280 nm .....	46
Tabla 12. Conteo en placa de muestras de trigo procedentes de la central de abasto.....	50
Tabla 13. Eficiencia y amplificación de varios valores de pendiente en una reacción de PCR tiempo real (qPCR).....	56
Tabla 14. Ecuaciones de curvas estándar para genes blanco. ....	68
Tabla 15. Concentración obtenida experimentalmente de las disoluciones de ADN de <i>F. graminearum</i> junto con ADN de trigo lavado y estéril. ...	71
Tabla 16. Concentración de ADN de <i>F. graminearum</i> en trigo inoculado e incubado durante 6 semanas para los dos genes blanco. ....	79



## Introducción

La mayoría de los cereales, semillas y fruto secos, son susceptibles de manera natural, debido a sus características, a ser contaminados por hongos y, como consecuencia, a la posible formación de micotoxinas. En México, el trigo es el segundo cereal en importancia, después del maíz; y es base en la alimentación mexicana. 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 de la espiga de trigo. Este género se caracteriza por producir micotoxinas, especialmente cuando ataca a cereales como el maíz, trigo, arroz y sorgo; y su toxicidad es reconocida 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).

La zearalenona (ZEA) es una micotoxina producida principalmente por *F. graminearum* y *F. culmorum*, la cual ha sido asociada con síndromes estrogénicos. La ZEA puede estar presente en granos en el campo cuando las condiciones ambientales favorecen la infección fúngica y los niveles pueden incrementar dramáticamente si las condiciones de almacenamiento son favorables para el crecimiento microbiano (Coulombe, 1993).

En México se han llevado a cabo pocos estudios relacionados a la detección de esta micotoxina. En 2007, se detectó y cuantificó zearalenona en 24 muestras de maíz, encontrado contaminación de dicha micotoxina en el 70% de las muestras, en un rango de 3 a 83 µg/kg de grano (Briones-Reyes, Gómez- Martínez, & Cueva-Rolón, 2007). Posteriormente en 2010, González-Osnaya & Farrés detectaron y

cuantificaron esta misma micotoxina en 30 muestras de trigo, y en el 71.4% de dichas muestras se detectó zearalenona, en un rango de 0.073 a 1 mg/kg.

El prevenir la formación de micotoxinas por los hongos contaminantes se considera la medida más eficaz para reducir el nivel de estas micotoxinas en los alimentos. Por estas razones es necesario garantizar un control de calidad de los alimentos mediante la identificación y control de la micobiota contaminante. La metodología para el análisis de tricotecenos y otras micotoxinas de *Fusarium* en general es complicada y se requieren técnicas de purificación, lo que hace que la recolección del analito se reduzca. Se requieren métodos rápidos y sencillos para la detección y cuantificación de *F. graminearum*, lo cual serviría como indicador indirecto de posible contaminación por micotoxinas. Los últimos trabajos en detección de hongos micotoxigénicos se dirigen hacia la búsqueda de genes implicados en la producción de la micotoxina. Teniendo como premisa que sí se encuentra presente el gen, existe la posibilidad de que el grano esté contaminado por micotoxinas.

Este proyecto pretende desarrollar métodos de PCR punto final y PCR tiempo real (qPCR), basados en la detección y cuantificación de hongos productores de estas micotoxinas en trigo, lo cual permitirá disponer de técnicas rápidas y específicas para la detección de este hongo, y por consiguiente, mejorar el control de proveedores y la seguridad de los granos comercializados.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1. El Trigo en México

El trigo ha formado parte del desarrollo económico y cultural del hombre, siendo el cereal más cultivado. Es considerado un alimento para consumo humano, aunque gran parte se destina a la alimentación animal. La propiedad más importante del trigo es la capacidad de coacción de la harina debida a la elasticidad del gluten que contiene. Esta característica permite la panificación, constituyendo un alimento básico para el hombre.

La mayoría de la producción del trigo mundial se destina a la alimentación. Casi un 75% de esta producción se utiliza para la producción de harina de trigo. La mayor parte de esta harina, especialmente aquella procedente de las variedades de trigo blando, se destina a la producción de pan. Las harinas que proceden de trigos duros se utilizan fundamentalmente para la confección de pasteles, galletas o harinas caseras.

Además de harina, hay que considerar que una buena proporción de grano se reserva para las nuevas siembras. Una proporción menor se utiliza para la elaboración de productos industriales, como almidón, gluten o dextrosa. Los granos de menor calidad y los subproductos de refinado se destinan también a la industria de los piensos.

En México, el trigo es el segundo cereal en importancia después del maíz. En 2009, ocupó el quinto lugar a nivel nacional en cuanto a importancia en producciones de alimentos y productos agrícolas, con una producción de 4,116,160 toneladas (Figura 1), y se cultivaron 828,408 hectáreas para dicha producción (FAO, 2012).

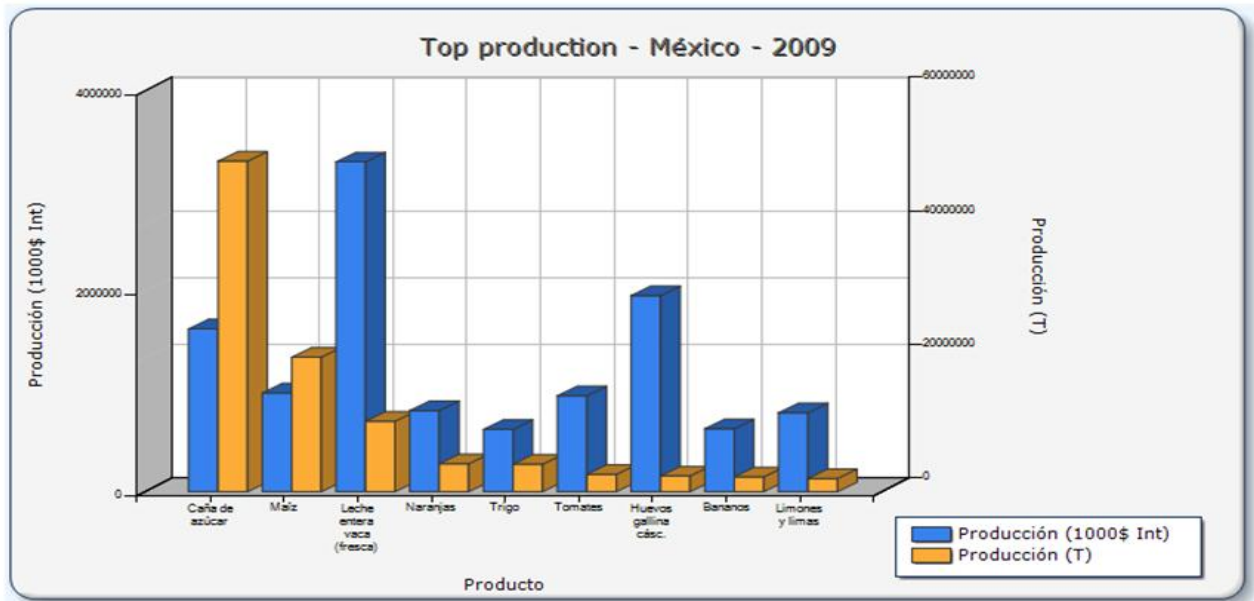


Figura 1. Principales producciones de alimentos y productos agrícolas de México en el año 2009. ( FAOSTAT, 2009)

En cuanto a exportaciones, el trigo es el segundo producto a nivel nacional que se exporta con 1,136,320 toneladas, solo por debajo de la cebada para cerveza (Figura 2). A nivel mundial, México ocupa el décimo noveno lugar como exportador de trigo, y el cuarto lugar en el continente, por debajo de Estados Unidos de América, Canadá y Argentina (Tabla 1).

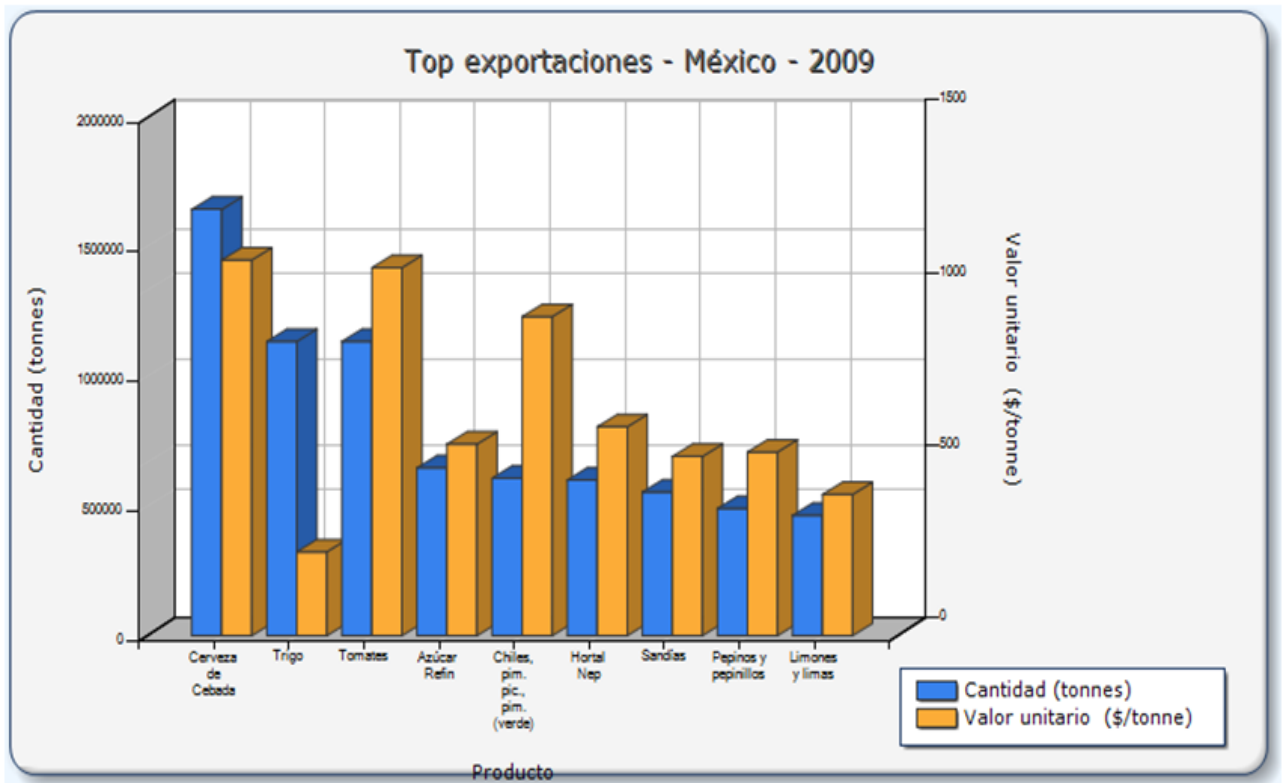


Figura 2. Principales productos exportados por México en el año 2009.

Fuente: FAOSTAT, 2009.

Tabla 1. Principales países exportadores de trigo en 2009.

Posición	Región	Cantidad (toneladas)
1	Estados Unidos de América	21942200
2	Unión Europea	20598486
3	Canadá	19279100
4	Australia	17528300
5	Francia	16872200
6	Federación de Rusia	16821206
7	Ucrania	12882600
8	Alemania	9697780
9	Argentina	5118010
10	Kazajstán	3229020



<b>11</b>	Reino Unido	2533100
<b>12</b>	Rumania	2340670
<b>13</b>	Polonia	2015950
<b>14</b>	República Checa	1775330
<b>15</b>	Bulgaria	1771180
<b>16</b>	Hungría	1660680
<b>17</b>	Dinamarca	1555090
<b>18</b>	Lituania	1275620
<b>19</b>	<b>México</b>	<b>1136320</b>
<b>20</b>	Letonia	1087500

Fuente. FAOSTAT, 2009.

Respecto a las importaciones, es el tercer producto que se importa en el país con 2, 776,930 toneladas, por debajo del maíz y de la soya (Figura 3).

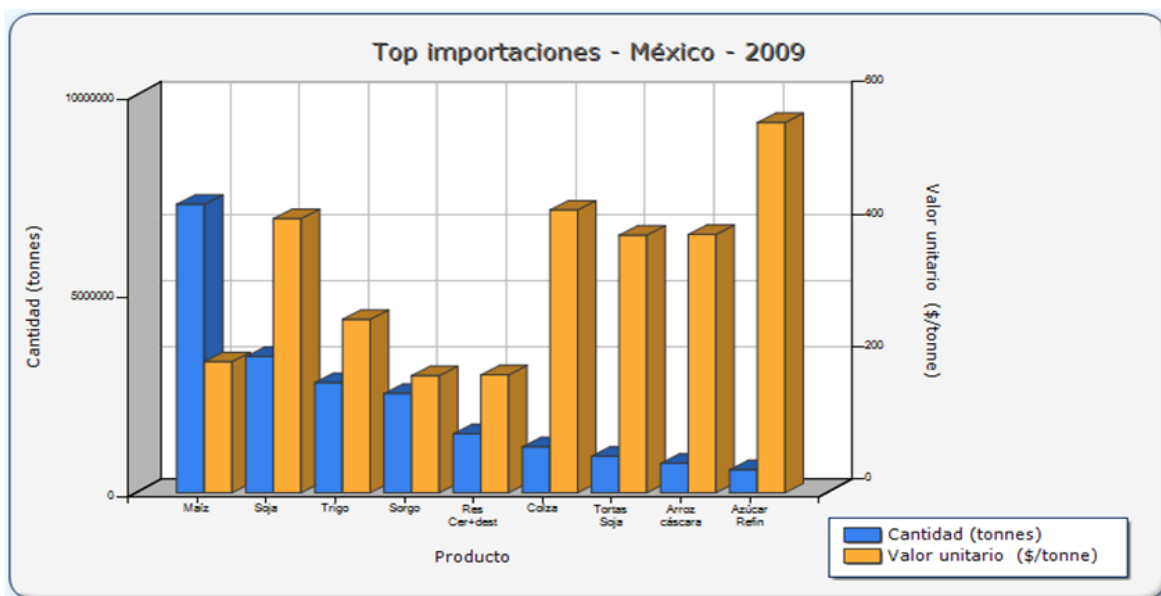


Figura 3. Principales productos importados a México en 2009.

Fuente: FAOSTAT, 2009.

## 1.2. Plagas e infecciones del trigo

Dentro de las plagas que afectan a este cultivo se encuentran larvas de diversas especies de escarabajos, mosquitos, y gusanos en general, que se alimentan durante todo su desarrollo. Al nacer las larvas se dirigen rápidamente hacia la vaina en la base de las hojas, fijándose cerca del primer nudo, donde se alimentarán durante todo su desarrollo. Por esta causa, el tallo atacado no puede evolucionar y queda marchito, de un color verde oscuro e incluso, si el número de larvas es elevado, no suele tardar en perecer.

Por otro lado, las enfermedades causadas por hongos son las más comunes y extendidas. Tienen síntomas característicos que pueden aparecer en tallos, hojas y espigas cuando la infección es severa. El trigo, y en general los cereales, debido a sus características es susceptible a infecciones por varios hongos.

Dentro de los principales enfermedades causadas por hongos se encuentra el morrón de trigo, causada por *Tilletia foetida*; la roya causada por *Puccinia recondita*, *P. graminis* y *P. striiformis*; oídio en trigo causado por *Erysiphe graminis*; carbón de trigo y cebada causado por *Ustilago tritici*, y una de las más importantes, la fusariosis de la espiga de trigo causado por *F. graminearum* y *F. culmorum* (Alfonso & Perea, 2011).

### 1.2.1. *Fusarium graminearum*

El género *Fusarium* presenta una amplia distribución, tanto en suelos como en sustratos orgánicos, y se considera como el género productor de toxinas de mayor prevalencia en las regiones templadas del hemisferio norte, se encuentra habitualmente en cereales cultivados en regiones templadas de América, Europa y Asia (Creppy, 2002). Este género es uno de los más importantes patógenos fúngicos en granos de

cereal, ya que es responsable de la roña de tizón en maíz (Goswani & Kistler, 2004).

La enfermedad de la roña de tizón ó FHB (*Fusarium head blight*) además de provocar la contaminación de los granos por la síntesis de deoxinivalenol (DON) y zearalenona (ZEA) durante la formación y almacenamiento de los mismos, produce reducción del rendimiento por una pérdida considerable de peso. El daño del FHB incluye el arrugado y la coloración rosada blanquecina de los granos.

La fusariosis o roña de la espiga de trigo ataca la planta a partir de la emisión de la espiga, aunque la floración es el estado más susceptible. En México, la especie causal que predomina es *F. graminearum* (teleom. *Gibberella zeae*), pero también están presentes *F. culmorum*, *Microdochium nivale* (antes *F. nivale*), *F. equiseti* y *F. avenaceum* (teleom. *Gibberella avenacea*) (Gilchrist-Saavedra, Fuentes-Dávila, & Martínez-Cano, 2005).

Las condiciones ideales para el desarrollo de FHB son humedad relativa por encima del 95% por 40-60 h combinadas con temperaturas de 25-30 °C. Las pérdidas de rendimiento dependen de varios factores: susceptibilidad del cultivo, clima y cantidad inicial de inóculo, así como el tiempo de floración. La importancia económica de esta enfermedad, esta relacionada con el porcentaje de espiguillas que están infectadas, ya que no son adecuadas para consumo humano, y puede ser tan alta como el 100% en algunos casos (CIMMYT, 2009).

### **1.2.2. Factores para contaminación y desarrollo de *Fusarium***

La mayoría de los cereales, semillas, nueces y frutos secos, son susceptibles de manera natural a ser contaminados por hongos y a la formación de micotoxinas. Esta patología es el resultado de la infección individual de las espiguillas en el estadio de plena floración o

inmediatamente después de ésta. Para que se produzca esa infección deben existir condiciones ambientales favorables como, días húmedos (92-94% humedad relativa ambiente), presencia de lluvia durante esa etapa y una alta presión de inóculo del patógeno consistente en la presencia del hongo en el rastrojo (restos de la cosecha anterior) o en las malezas que actúan como hospedantes secundarios y/o alternativos para el patógeno (Carrillo, 2003).

*Fusarium* infecta antes de la cosecha y requiere una humedad relativa entre el 90 y 100% y un contenido de agua en las semillas de 22 a 23% para crecer, con un amplio rango de temperatura entre 0 y 30 °C, aunque algunos pueden desarrollarse a 35 °C o más (Christensen & Kaufman, 1969). El crecimiento fúngico continúa en los productos frescos después de la cosecha. En los granos de cereales, los hongos persisten si el grano está suficientemente seco como para soportar la competencia de otras especies incorporadas posteriormente (Christensen, 1987).

Las infecciones secundarias de trigo son producidas principalmente por la dispersión de conidias entre plantas del mismo campo, estas conidias sobreviven en residuos de la cosecha, rastrojo y/o paja y contaminan a las nuevas semillas. El hongo puede vivir en semillas asintomáticas. Asimismo, el viento puede dispersar las conidias (esporas asexuales) o ascosporas (esporas sexuales) infectando nuevas plantas (CIMMYT, 2009).

### **1.3. Micotoxinas en cereales**

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 moho frente a otros microorganismos durante la fase estacionaria (Figura 4), muchos de los cuales son tóxicos para plantas, animales y/o humanos (Cabañes, 2000).

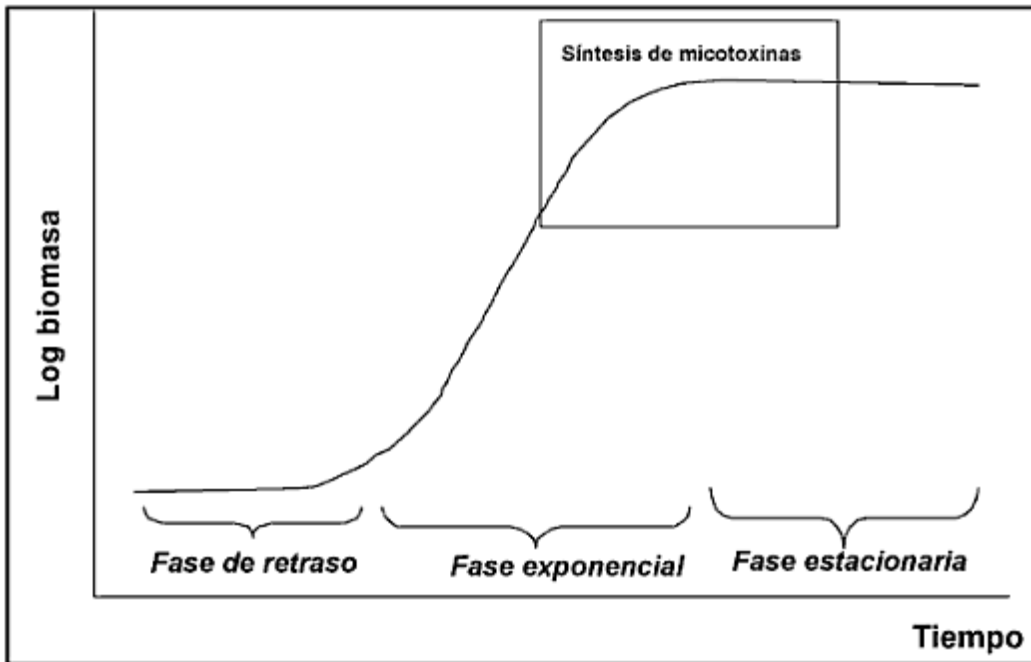


Figura 4. Fases de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxinas (Soriano del Castillo, 2007).

Los metabolitos secundarios son formados a partir de unos pocos intermediarios del metabolismo primario, bajo condiciones sub-óptimas y de estrés. Durante la biosíntesis de estos metabolitos, la cantidad producida depende no sólo de los parámetros nutricionales y ambientales, sino también de la historia del desarrollo del moho. La competencia entre las poblaciones microbianas mixtas que se encuentran naturalmente suele favorecer la producción de las micotoxinas (Swanson, 1987).

### 1.3.1. Toxicidad de micotoxinas

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. En términos generales, el riesgo de intoxicación aguda por micotoxinas en el hombre es bajo o moderado en comparación con intoxicaciones de origen bacteriológico o por contaminantes químicos. No obstante la exposición crónica y teniendo en cuenta la severidad de las lesiones crónicas, como es el cáncer, las micotoxinas presentan mayor riesgo tóxico que los contaminantes de origen antropogénico, aditivos alimentarios y plaguicidas (Figura 5) (Soriano del Castillo, 2007).

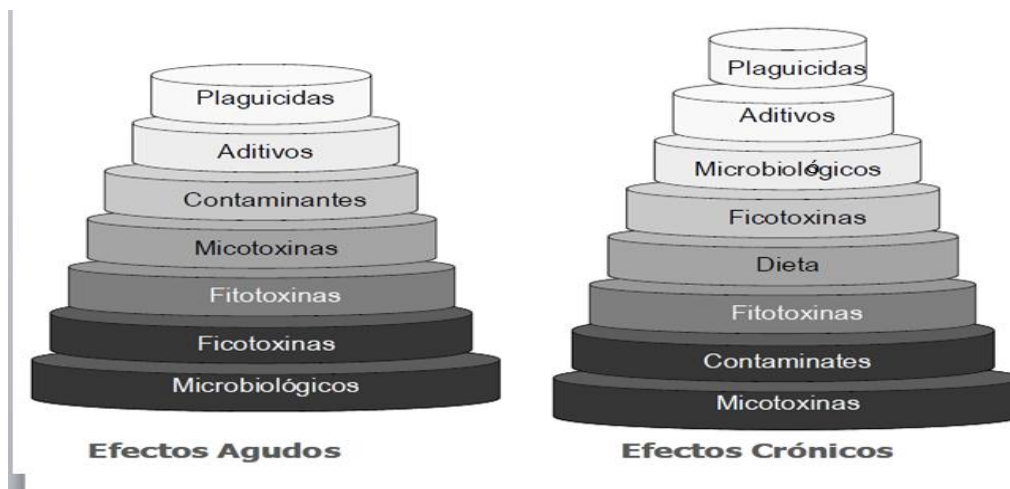


Figura 5. Riesgos de las micotoxinas para la salud humana según su efecto. El riesgo aumenta de arriba hacia debajo de la pirámide.

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, de acuerdo a los siguientes grupos:

- Grupo 1: El agente es carcinógeno en humanos.
- Grupo 2A: Agente probablemente carcinógeno en humanos; existe evidencia limitada sobre humanos pero suficiente con animales.

- Grupo 2B: Agente posiblemente carcinógeno; la evidencia en humanos es limitada y tampoco hay suficiente evidencia con animales de experimentación.
- Grupo 3: El agente no es clasificable como carcinógeno para humanos, y no puede incluirse en otro grupo.
- Grupo 4: El agente probablemente no es carcinógeno en humanos; la evidencia disponible, tanto de humanos como de experimentación animal lo sugiere.

En la Tabla 2 se resume la evaluación realizada por la IARC con relación al poder carcinógeno de algunas micotoxinas.

Tabla 2. Clasificación de las micotoxinas según la IARC.

<b>Micotoxina</b>	<b>IARC</b>
<b>Aflatoxinas</b>	1
<b>Aflatoxinas M1</b>	1
<b>Citrinina</b>	3
<b>Esterigmatocistina</b>	2B
<b>Fumonisina B1</b>	2B
<b>Ocratoxina A</b>	2B
<b>Patulina</b>	3
<b>Toxinas derivadas de <i>F. graminearum</i>, <i>F. culmorum</i>, <i>F. crookwellense</i> (zearalenona, deoxinivalenol, nivalenol y fusarenona X)</b>	3
<b>Toxinas derivadas de <i>F. sporotrichioides</i> (toxina T-2)</b>	3

Así mismo, se deben considerar varios factores, de los cuales dependerá el impacto de los efectos de las micotoxinas en la salud, entre los que se encuentran (Kuiper-Goodman, 1991):

- La cantidad de micotoxina consumida,
- La toxicidad del compuesto,
- El peso corporal del individuo,
- La presencia de otras micotoxinas (efecto sinérgico),
- Factores dietéticos y patológicos

### 1.3.2. Micotoxinas de *Fusarium graminearum*

*Fusarium* es uno de los principales géneros productores de micotoxinas, ya que posee aproximadamente 12 especies micotoxigénicas, solo por debajo de *Penicillium* y *Aspergillus*, las cuales poseen 32 y 15 especies micotoxigénicas, respectivamente.

Las principales micotoxinas producidas por *Fusarium* son los tricotecenos y la zearalenona. Las micotoxinas son específicas, es decir; cuanto más compleja es la ruta biosintética de estos metabolitos secundarios, más restringido es el número de especies de hongos productores. En la Tabla 3 se dan las principales especies productoras de la micotoxina zearalenona producidas por este género fúngico.

Tabla 3. Principales especies productoras de zearalenona.

Micotoxina	Moho
<b>Zearalenona</b>	<i>Fusarium culmorum</i>
	<i>Fusarium crookwellense</i>
	<i>Fusarium equiseti</i>
	<i>Fusarium graminearum</i>
	<i>Fusarium heterosporum</i>

### 1.4. Zearalenona

La zearalenona (ZEA), antes conocida como toxina F-2, es una lactona derivada del ácido  $\beta$ -resorcílico (Figura 8). Es un metabolito termoestable por lo que no se ve afectado durante procesos térmicos (Lauren & Smith, 2001). Es una micotoxina producida principalmente por *F. graminearum* y *F. culmorum*, la cual ha sido asociada con síndromes estrogénicos. ZEA puede estar presente en granos en el campo cuando las condiciones ambientales favorecen la infección fúngica, y los niveles pueden incrementar dramáticamente si las condiciones de almacenamiento son favorables para el crecimiento microbiano (Coulombe, 1993).



La temperatura tiene una gran influencia sobre el crecimiento y la actividad de los mohos. *Fusarium* está asociado con los climas fríos. *F. graminearum* produce la mayor cantidad de zearalenona a 25 °C y de deoxinivalenol a 28 °C a una  $a_w=0.98$  (Moss, 1991).

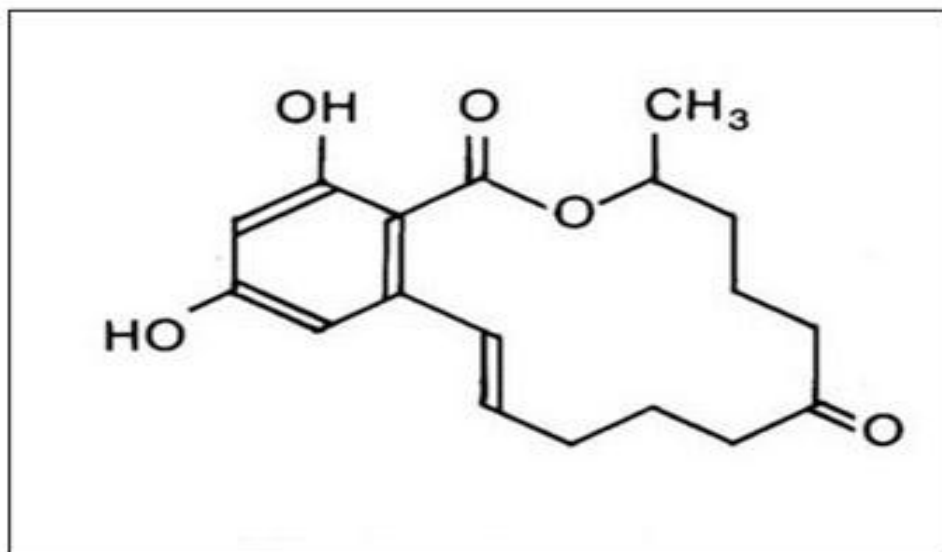


Figura 6. Estructura química de zearalenona.

#### 1.4.1. Toxicidad

Se considera que la ZEA tiene relativamente baja toxicidad aguda (> 4000 a 20000 mg/kg pc) después de su administración oral en ratones, ratas y cerdos (Kuiper-Goodman, Scott, & Watanabe, 1987).

El efecto estrogénico es una consecuencia importante hacia los mamíferos incluso a niveles más bajos que 1.5-3.0 mg/kg (D´Mello, Placinta, & Macdonald, 1999). Esta micotoxina causa alteración en el tracto reproductivo de animales de laboratorio, afecta al útero disminuyendo la hormona luteinizante y la secreción de progesterona (Etienne & Dourmand, 1994). Diversos estudios han demostrado una disminución del tamaño de la glándula adrenal, entre otras, pero no se han detectado efectos teratógenos en ratones, ratas, cobayas y conejos

(Bacha, Hadidane, Ellouz, & Creppy, 1993) (JECFA, 2000) (Maaroufi, Chekir, Creppy, Ellouz, & Bacha, 1996).

#### 1.4.2. Legislación

En 2003, la zearalenona solamente estaba reglamentada en 16 países, de los cuales 8 tenían el límite en 1000 µg/kg y 5 en 200 µg/kg para cereales y sus derivados. En la Tabla 4, se muestran los límites para la zearalenona en maíz y otros cereales para alimentación humana, los cuales varían entre 50 y 200 µg/kg (Soriano del Castillo, 2007). Respecto a la legislación mexicana no existe una Norma que establezca los límites máximos permitidos en alimentos para esta micotoxina.

Tabla 4. Niveles máximos admitidos de zearalenona en alimentación humana por la Comisión Europea (Soriano del Castillo, 2007).

Productos	Zearalenona (µg/kg)
<b>Cereales no elaborados distintos al maíz</b>	100
<b>Maíz no elaborado</b>	200
<b>Harina de cereales, excepto la harina de maíz</b>	75
<b>Harina de maíz, maíz molido, maíz triturado y aceite de maíz refinado</b>	200
<b>Pan, pasteles y galletas</b>	50
<b>Aperitivos de maíz y cereales para el desayuno a base de maíz</b>	50
<b>Otros aperitivos de cereales y cereales para el desayuno</b>	50
<b>Alimentos elaborados a base de maíz para lactantes y niños de corta edad</b>	20
<b>Otros alimentos elaborados a base de cereales para lactantes y niños de corta edad y alimentos infantiles</b>	20

#### 1.4.3. Incidencia en alimentos

La ZEA se aísla mayoritariamente de cereales, simultáneamente con otras micotoxinas incluyendo tricotecenos. Kuiper-Goodman, Scott, & Watanabe (1987) sugieren que su presencia, en grandes cantidades, se

debe a prácticas incorrectas de almacenamiento más que su desarrollo en el campo.

Tabla 5. Presencia mundial de ZEA de diversos productos para consumo humano.

País	Muestra	Concentraciones (mg/kg)
<b>México</b>	Trigo	0.077
<b>México (Tlaxcala)</b>	Maíz	0.00325-0.08363
<b>Alemania</b>	Trigo	0.001-8.04
<b>Alemania</b>	Cebada	0.002-0.311
<b>Polonia</b>	Trigo	0.01-2
<b>Bulgaria</b>	Trigo	Hasta 0.12
<b>Finlandia</b>	Piensos	0.022-0.095
<b>Holanda</b>	Trigo	0.02-0.231
<b>Sudáfrica</b>	Cereales/piensos	0.05-8.0
<b>India</b>	Cereales	0.843
<b>Filipinas</b>	Maíz	0.059-0.0505
<b>Tailandia</b>	Maíz	0.923
<b>Japón</b>	Trigo	0.002-0.025
<b>Japón</b>	Cebada	0.010-0.658
<b>Japón</b>	Trigo	0.053-0.51
<b>Japón</b>	Cebada	11-15
<b>Corea</b>	Cebada y derivados	0.0034-0.120
<b>Corea</b>	Maíz	0.0034-0.0058
<b>Corea</b>	Derivados del maíz	0.0036-0.084
<b>Nueva Zelanda</b>	Maíz	2.7-10.5
<b>Canadá</b>	Trigo y cebada	Hasta 0.3
<b>Brasil</b>	Trigo	0.04-0.21
<b>Marruecos</b>	Maíz	0.0135-0.0165
<b>Qatar</b>	Arroz	0.00018-0.0014
<b>Qatar</b>	Trigo	0.00021-0.0021
<b>Qatar</b>	Cereales de desayuno	0.0038-0.00681
<b>China</b>	Trigo	0.005-1.4
<b>Inglaterra</b>	Piensos de maíz	0.02-1.8
<b>Egipto</b>	Cereales	0.005-0.045
<b>Argentina</b>	Piensos para aves	0.03-0.28
<b>Argentina</b>	Maíz	0.005-2
<b>Canadá</b>	Maíz	0.005-0.647
<b>Canadá</b>	Cebada	0.004-0.021
<b>Suiza</b>	Trigo	0.01-0.121
<b>EE UU</b>	Maíz contaminado	0.1-21.4
<b>Indonesia</b>	Piensos y maíz	0.0055-0.619

En México se han llevado a cabo pocos estudios relacionados a la detección de esta micotoxina. En 2007, se detectó y cuantificó zearalenona en 24 muestras de maíz, encontrado contaminación de dicha micotoxina en el 70% de las muestras, en un rango de 3 a 83  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de grano (Briones-Reyes, Gómez- Martínez, & Cueva-Rolón, 2007). Posteriormente en 2010, González-Osnaya & Farrés detectaron y cuantificaron esta misma micotoxina en 30 muestras de trigo, y en el 71.4% de dichas muestras se detectó zearalenona, en un rango de 0.073 a 1  $\text{mg}/\text{kg}$ .

En Alemania, se confirmó la contaminación en muestras de trigo por ZEA, siendo 8.04  $\text{mg}/\text{kg}$  el nivel de contaminación más alto (Muller & Schwadorf, 1993). En Polonia, se demostró la presencia en el mismo tipo de muestras en niveles comprendidos entre los 0.01 y 2  $\text{mg}/\text{kg}$ , además de la presencia simultánea de otras micotoxinas como DON (Perkowski, Plattner, Golinski, & Vesonder, 1990). En Finlandia, los niveles de ZEA se encontraron en un rango entre 0.022 y 0.095  $\text{mg}/\text{kg}$  (Hietaniemi & Kumpulainen, 1991.). En Holanda, el rango se situó entre 0.020-0.231  $\text{mg}/\text{kg}$  (Tomaszewski, Miturski, Semczuk, Kotarski, & Jakowicki, 1998).

En Sudáfrica, diversas muestras de cereales y de piensos para animales tenían cantidades apreciables de ZEA (0.05-8.0  $\text{mg}/\text{kg}$ ) (Dutton & Kinsey, 1996), mientras que en Egipto, los valores de esta micotoxina se situaban entre 0.005-0.045  $\text{mg}/\text{kg}$  para maíz, trigo y arroz. En Japón, el trigo contenía niveles de ZEA situados entre 0.053 y 0.51  $\text{mg}/\text{kg}$  (Yoshizawa, 1997). Furlong, Valente & Yoko (1995), en Brasil detectaron la micotoxina en trigo en niveles situados entre 0.04 y 0.21  $\text{mg}/\text{kg}$ .

#### 1.4.4. Biosíntesis

La ZEA es producida por la ruta acetato-polimalonato y es un policétido que es sintetizado enteramente a partir de unidades de acetato-malonato. Las sintetasas policétido fúngicas (PKSs) son grandes dominios que codifican múltiples enzimas. Un PKS consiste de los siguientes dominios:  $\beta$ -cetoacil sintasa, acil transferasa, y proteína transportadora de acilo. ZEA es un macrólido totalmente reducido, y una PKS involucrada en la biosíntesis de ZEA, probablemente, también debe tener dominios catabólicos ceto reductasa, deshidratasa, y enoil reductasa (ER) (Dewick, 2001). El dominio ER realiza el último paso de reducción y es siempre encontrado junto con dominios ceto reductasa y deshidratasa, el candidato más probable para la biosíntesis de ZEA es un PKS con un dominio ER.

El gen PKS4 ha sido reportado como indispensable para la producción de ZEA en *F. graminearum*. Un análisis de transcritos del gen policétido sintasa (PKS) fue llevado a cabo en mutantes de *F. pseudograminearum*, los cuales producen altos niveles de ZEA. En este estudio se reemplazó la parte central del gen PKS4 con un gen de resistencia hygB a través de recombinación homóloga en una cepa de *F. graminearum*, la cual producía altos niveles de ZEA. Posteriormente se realizaron análisis por cromatografía líquida, los cuales mostraban que la mutante a la cual se reemplazó el gen PKS4 no producía ZEA. Por lo que se concluyó, que el gen PKS4 codifica una enzima requerida para la producción de ZEA en *F. graminearum* (Lysoe, Klemsdal, & Bone, 2006).

#### 1.5. Cuantificación de micotoxinas

Son muchos los factores que determinan y limitan el criterio para elegir la metodología de análisis adecuada. La combinación de micotoxinas en cada tipo de muestra representa un problema diferente para el análisis, el criterio a seguir para elegir la técnica de determinación dependerá del

equipo y tiempo disponible, la sensibilidad y la selectividad que sean requeridos y el costo del análisis.

Se considera que alrededor del 20% de los alimentos de origen vegetal están contaminados por micotoxinas, por lo tanto el análisis continuo de los alimentos en busca de micotoxinas es importante no solamente para protección del consumidor sino también para los productores de alimentos.

La metodología analítica para micotoxinas generalmente incluye las siguientes etapas: muestreo y preparación de la muestra, extracción, purificación, concentración, detección y cuantificación.

La distribución de las micotoxinas no es por lo general homogénea, por lo tanto las muestras se preparan y, sobre todo, homogeneizan, con sumo cuidado. La preparación de la muestra a analizar requiere procesos de extracción y purificación, la cual debe realizarse con sumo cuidado ya que generalmente las micotoxinas se encuentran a concentraciones muy bajas. Por otra parte; la alta complejidad del alimento, ya que se encuentran presentes cantidades importantes de proteínas, lípidos, hidratos de carbono, agua y otras especies moleculares que pueden interferir en el análisis, siendo necesario purificar el extracto (González-Osnaya L. R., 2007).

Cuando la matriz es de naturaleza sólida, los disolventes orgánicos más empleados para la extracción, son el metanol, acetona, acetato de etilo, acetonitrilo, diclorometano, hexano y mezclas de ellos (Scott, 1995). La selección del disolvente se realiza dependiendo de la polaridad de la micotoxina y de la naturaleza de la muestra. Sin embargo existen varios inconvenientes para llevarlo a cabo, como es los elevados volúmenes de muestra y disolventes que se requieren, la baja selectividad junto a

recuperaciones en ocasiones insuficientes y su dificultad de automatización.

En general, los métodos de extracción para su posterior cuantificación de estas micotoxinas son en general complicados, y se requieren técnicas de purificación que permitan facilitar la determinación y cuantificación, las cuales presentan varias desventajas, como es el elevado costo del equipo así como pasos posteriores (filtración, limpieza del extracto) lo que podría producir pérdida de analito, y por lo tanto; podría conducir a una sub-estimación.

Seguido del paso de purificación, procede el paso de detección y cuantificación. En los últimos años se han desarrollado técnicas muy sensibles y adecuadas para la detección de micotoxinas en una gran variedad de matrices. Generalmente se utilizan técnicas separativas como cromatografía gaseosa (GC, *gas chromatography*) o cromatografía líquida (LC, *liquid chromatography*) acopladas a diferentes tipos de detectores, sin embargo, la fidelidad de los resultados obtenidos mediante la cromatografía para la determinación de micotoxinas, siempre va a estar condicionada por las etapas del análisis que le preceden, todos los compuestos presentes en la muestra que puedan interferir en la determinación cromatográfica deben ser eliminados lo más completamente posible (González-Osnaya L. R., 2007).

#### **1.5.1. Métodos para cuantificación de hongos micotoxigénicos basados en técnicas de análisis del ADN**

Los últimos trabajos en detección de hongos micotoxigénicos se dirigen a la detección de genes implicados en la producción de micotoxinas por medio de PCR punto final y PCR tiempo real (qPCR).

Entre las técnicas de biología molecular, las basadas en PCR son las que están siendo más utilizadas para la detección de hongos

micotoxigénicos. Esta técnica ha revolucionado la biología molecular. En efecto, en el pasado el generar grandes cantidades de determinadas secuencias de ácidos nucleicos para el análisis genético era muy laborioso. Actualmente en pocas horas, con la ayuda de los modernos termocicladores, se puede tener gran cantidad de copias de material genético.

### **1.5.2. Genes utilizados en la detección de hongos productores de micotoxinas**

Actualmente se conocen genes implicados en la biosíntesis de algunas micotoxinas. Así, por ejemplo, ya se han puesto a punto técnicas PCR bastante sensibles y con diferentes especificidades para las especies de *Fusarium* productoras de tricotecenos, utilizando los genes Tri5 y Tri6. En el caso de las especies potencialmente productoras de aflatoxinas y esterigmatocistina se han utilizado distintos genes (nor-1, ver-1, aflR, omt-A) implicados en su biosíntesis, siendo útiles algunos de ellos para diferenciarlas de otros hongos, pero sin presentar una especificidad muy elevada (Nicholson, 2004). Los genes que codifican policétido sintasas son unos de los que están recibiendo mayor atención últimamente.

### **1.6. PCR punto final**

Por definición, la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (*Polymerase Chain Reaction*), permite la amplificación *in vitro* de una secuencia específica de ADN y se realiza mediante el uso de un par de oligonucleótidos iniciadores que flanquean la secuencia de ADN a amplificar, y de ciclos repetidos de síntesis de nuevas cadenas de ADN por acción de una ADN polimerasa. Básicamente cada ciclo de amplificación se divide en 3 partes, como se observa en la Figura 7, en el siguiente orden: 1) la desnaturalización, donde se separan las cadenas de ADN por medio de elevación de la temperatura, 2) el alineamiento, donde los iniciadores se hibridan, en sentido y antisentido con las secuencias complementarias que flanquean la región a



amplificar, y por último, 3) la extensión, donde por acción de la ADN polimerasa se sintetizan nuevas cadenas de ADN complementarias a la cadena molde a partir de los iniciadores. La magnitud de amplificación de una secuencia específica de ADN es de  $2^n$  en donde n es el número de ciclos. De esta manera las secuencias originales se van incrementando de manera exponencial, así después de terminado todos los ciclos se producen millones de secuencias específicas de ADN idénticas a las original.

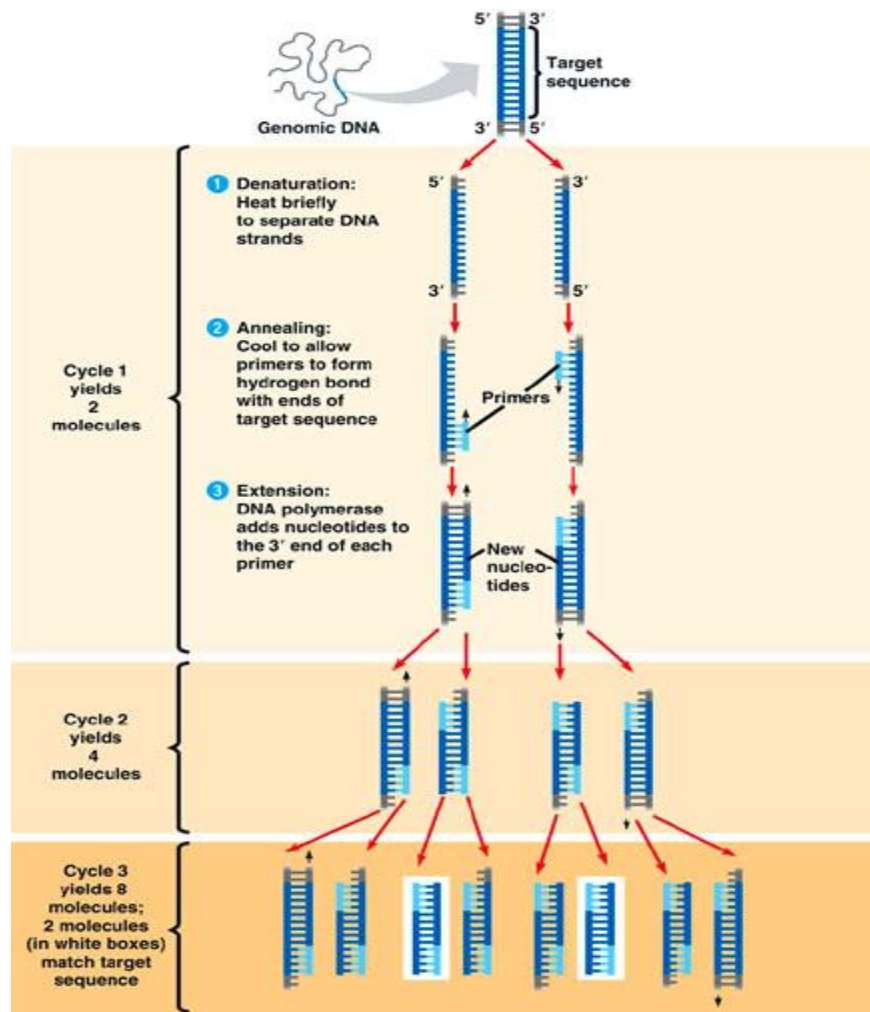


Figura 7. Esquema representativo de los pasos en una PCR convencional (Rodríguez & Rodríguez, 2006).

### 1.7. PCR tiempo real (qPCR)

La PCR fue considerada como una revolución en la ciencia desde su invención por Kary Mullis en 1984 (D´Mello, Placinta, & Macdonald, 1999) (Schaad & Frederick, 2002). A partir de allí y hasta el día de hoy la PCR ha experimentado grandes avances dentro de los cuales, la PCR en tiempo real (qPCR) constituye uno de sus más importantes.

A diferencia del PCR punto final, el qPCR es un método cuantitativo, pues se pueden transformar las señales fluorescentes de cada reacción en un valor numérico para cada muestra. Entre las ventajas de la qPCR se encuentra su sensibilidad, lo que permite la amplificación de fragmentos de ADN en muestras con muy poca cantidad de templado inicial (Zagachin, Nickleit, Haufman, Dutt, Foster, & Colvin, 2004). Otra de las ventajas de esta técnica es la rapidez con la que se pueden obtener resultados. El tiempo estimado de una qPCR está entre los 20 minutos y las 2 horas.

La qPCR se divide en 4 fases principales: a) La fase inicial, en la cual la fluorescencia de los primeros ciclos 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* (*Cycle Threshold* o Ciclo Umbral) (Applied Biosystems, 2009). Este valor es representativo de la cantidad inicial de templado que hay en la reacción y es usado en los cálculos posteriores. Mientras más bajo es el valor de *Ct*, mayor es el 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 platea o estacionaria, en la cual los reactivos y el equipo han alcanzado el límite de detección y la reacción ha terminado (Wong & Medrano, 2005). Estas fases se observan en la Figura 8.

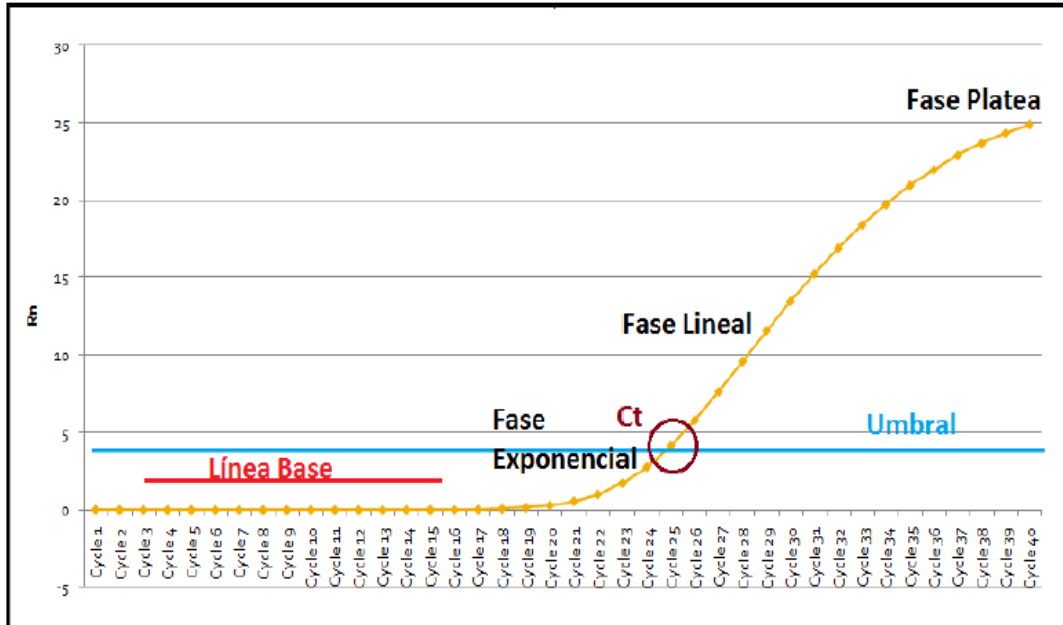


Figura 8. Curva de qPCR, donde se detallan sus componentes (Rivas, 2010).

### 1.7.1. Sistemas de detección usadas en qPCR

Todos los instrumentos del tiempo real están basados en la detección de una señal fluorescente. El incremento en la fluorescencia es directamente proporcional al incremento del producto amplificado durante el PCR. La detección de cada reacción se realiza por la adición de una sustancia que emite una fluorescencia conocida como fluorocromo. Esta fluorescencia producida es directamente proporcional a la cantidad de producto de PCR generado. Para la detección se utiliza un termociclador especialmente adaptado para la lectura de cantidades mínimas de fluorescencia. La qPCR tiene una gran variedad de tecnologías para liberar la fluorescencia.

Las moléculas fluorescentes absorben luz debido a los protones dentro de un rango de longitud de onda de luz estrecho. La longitud de onda en la cual el colorante absorbe la máxima cantidad de luz es llamada la longitud de onda para esa molécula. Seguido de la excitación, la molécula es colocada en un estado de alta energía. Este estado de alta energía es transitorio y de vida corta. La molécula excitada decae rápidamente, volviendo al estado de energía baja. Cuando esto ocurre un fotón de luz es emitido en una longitud de onda baja. La luz que se libera es la longitud de onda de emisión (Tevfik, 2006).

### **1.7.2. Fluoróforos de unión al ADN**

Entre los métodos más utilizados y más comunes, se encuentran los fluoróforos de unión al ADN. En esta tecnología, se añade un fluoróforo que es afín al ADN de doble cadena, es decir, la fluorescencia aumenta, en función de que el producto de qPCR se acumula en cada ciclo de la reacción. Sin embargo, la capacidad de multiplex (detección de dos o más genes) de esta tecnología es nula, por que los fluoróforos no son de unión específica a un fragmento en particular, siendo esta tecnología susceptible a la aparición de falsos positivos.

#### **1.7.2.1. SYBR Green**

El fluoróforo de unión al ADN de mayor uso en esta técnica es el SYBR Green (Ponchel, y otros, 2003) (Wong & Medrano, 2005). Esta metodología es una de las más usadas por su bajo costo y facilidad de manejo.

SYBR Green es usado enormemente como reportero, es un colorante libre en el PCR. La fluorescencia de SYBR Green cuando está en solución como colorante libre, y es estimulado por luz de la longitud de onda apropiada es muy baja. En contraste, cuando se forma el producto de ADN de doble cadena, el SYBR Green se une fuertemente al ADN de doble cadena. El complejo ADN-SYBR resulta en un incremento

dramático de fluorescencia, de alrededor de 2000 veces la inicial. En la Figura 9 se observa el sistema de SYBR Green.

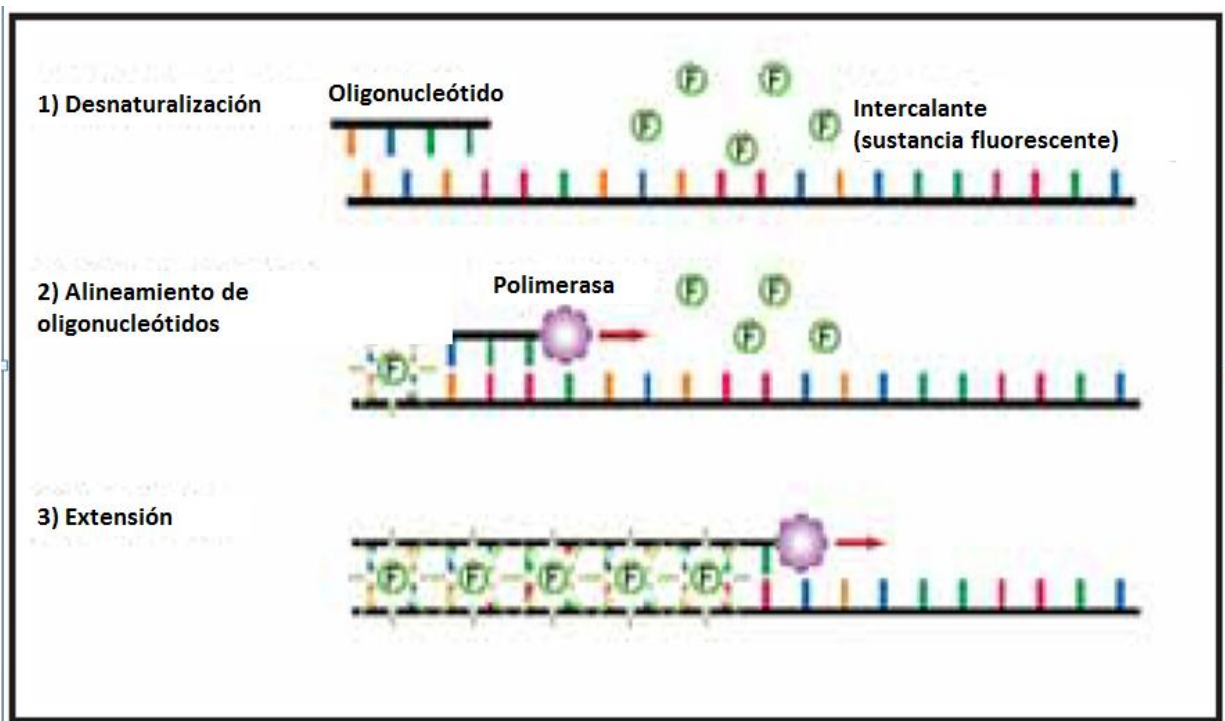


Figura 9. Representación gráfica de la incorporación de SYBR Green resultando en un incremento de la señal fluorescente durante el PCR (Rodríguez & Rodríguez, 2006).

El SYBR Green tiene 3 grandes ventajas: 1) bajo costo del colorante, 2) facilidad de desarrollo de ensayos, y 3) el mismo mecanismo de detección puede ser usado para cada ensayo. Pero por otro lado, tiene la desventaja de que el colorante se une al ADN de doble cadena sin importar su secuencia, generando señal, como es el caso de los dímeros de oligonucleótido o productos de PCR indeseados. Por lo que es de suma importancia un correcto diseño de oligonucleótidos y un cuidadoso control durante el desarrollo del ensayo (Tevfik, 2006).

Para evitar esto, es indispensable la optimización del proceso y el análisis de las curvas de disociación, el cual nos muestra que dichos oligonucleótidos no formen dímeros, así como que no se produzcan

productos inespecíficos, lo cual se ve reflejado en el número de picos de disociación. A continuación se muestra un ejemplo de curvas de disociación. En la Figura 10, panel a) se observa un solo pico, el cual corresponde a la temperatura de disociación del producto esperado, pero por otro lado, Figura 10, panel b) se observan dos picos, uno de menor temperatura de disociación, el cual corresponde a dímeros de oligonucleótidos, por su menor tamaño, y otro pico de mayor temperatura de disociación, el cual corresponde al producto esperado.

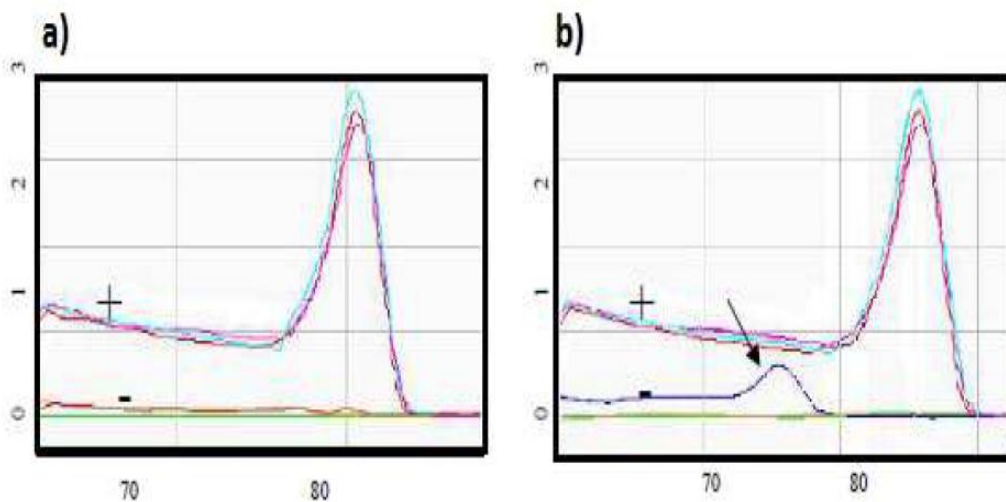


Figura 10. Análisis de disociación de un qPCR usando SYBR Green: a) Pico de disociación de 1 solo fragmento; b) Pico de disociación de un fragmento con la presencia de dímeros de oligonucleótidos (**Ponchel, y otros, 2003**).

### 1.7.3. Sonda de hidrólisis (TaqMan)

Otra de las tecnologías más utilizadas en la qPCR es la de las sondas de hidrólisis, en la cual la tecnología TaqMan es la más conocida y utilizada. Esta tecnología es conocida también como ensayo 5' nucleasa. Estas sondas consisten de una molécula de cadena sencilla de ADN la cual contiene un colorante reportero 5', así como un apagador 3' que inhibe la emisión de fluorescencia debido a la proximidad con el reportero. Estas sondas se alinean a un sitio específico sobre el ADN molde, localizado entre las posiciones de los oligonucleótidos en sentido y

antisentido. Durante la amplificación, la ADN polimerasa extiende el oligonucleótido y alcanza la sonda alineada. La actividad exonucleasa 5' de la ADN polimerasa actúa en el nucleótido terminal 5' de la sonda junto con el colorante reportero, liberándolo dentro de la mezcla de reacción. Esta acción resulta en la separación física del colorante reportero del apagador y consecuentemente, el colorante reportero es capaz de emitir una fuerte fluorescencia. A diferencia de SYBR Green, las sondas TaqMan se unen únicamente a un sitio específico del ADN molde (Takara Bio USA, 2012).

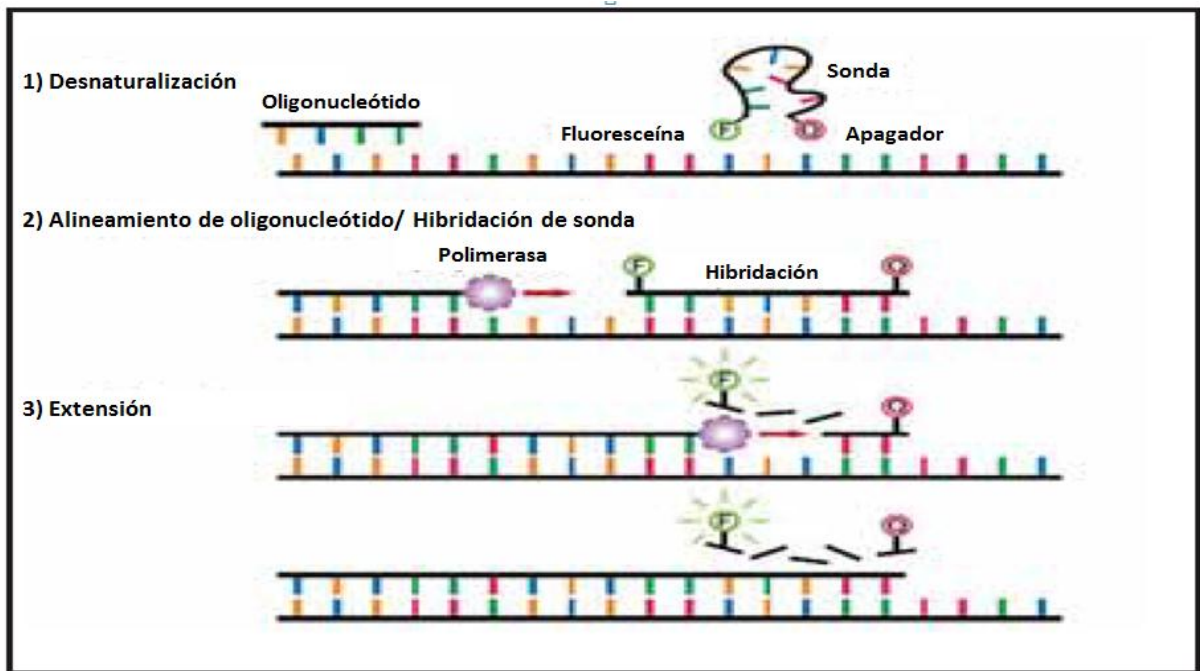


Figura 11. Representación gráfica de la química de TaqMan durante la qPCR (Rodríguez & Rodríguez, 2006).

Esta tecnología presenta una alta sensibilidad y tiene una gran capacidad de multiplex al añadir a la reacción sondas de distintos genes de interés, cada una con un fluoróforo distinto, detectando los niveles de expresión de todos los genes en una sola reacción. Sin embargo el alto costo de la técnica limita el uso de esta tecnología (Wong & Medrano, 2005).

#### **1.7.4. Métodos de cuantificación**

Existen básicamente dos métodos de cuantificación, que dependiendo del tipo de aplicación, se determinará cuál es el mejor a usar.

##### **1.7.4.1. Cuantificación absoluta**

El modelo de cuantificación absoluta, permite determinar el número exacto de moléculas de ADN presentes en una muestra determinada, para lo cual es necesario utilizar una curva de calibración a partir de un stock de estándares de concentración finamente conocida y determinada por otra técnica en la cual las unidades estén expresadas en número de copias, ng/ $\mu$ L,  $\mu$ mol/ $\mu$ L de la secuencia blanco en específico.

Este tipo de análisis es necesario para determinar cargas virales, agentes patógenos, terapia génica, cuantificación de microorganismos genéticamente modificados, en donde es preciso saber el número exacto de copias o cantidad de material genético para la secuencia blanco.

##### **1.7.4.1.1. Curva estándar cuantificación absoluta**

La curva tipo o curva de calibración se construye a partir de valores de Ct obtenidos para cada estándar y graficados contra el logaritmo de la concentración correspondiente. Sobre esta curva de calibración, se interpola directamente el valor de Ct de las muestras problema para obtener de esta forma su concentración expresada en escala logarítmica, el valor del antilogaritmo expresa el valor exacto en las unidades de los estándares empleados para construir la curva patrón.

##### **1.7.4.2. Cuantificación relativa**

En este caso al igual que en el método de cuantificación absoluta, es necesario construir al menos una vez una curva estándar de calibración, pero a diferencia de los estándares utilizados para cuantificación absoluta, no es necesario saber la cantidad precisa de la secuencia blanco de interés, basta con saber la cantidad de ADN/ARN total que se está utilizando, ya que la comparación cuantitativa del ácido nucleico



blanco se expresa en órdenes de magnitud relativas a un calibrador. En este tipo de cuantificación, es necesario incluir una referencia activa de amplificación, la cual se refiere a la amplificación de un blanco diferente de expresión constitutiva a partir de la misma muestra de ARN o ADN de cada muestra o tejido, bajo las condiciones experimentales. El valor obtenido del gen de interés, se divide entre el valor obtenido para la referencia activa para normalizar los resultados y asegurar que las variaciones observadas en expresión, sean realmente debidas a cambios de expresión y no a cantidad variable de muestra añadida entre dos ensayos. Los controles más comúnmente utilizados como referencia activa son GAPDH y 18s, sin embargo existe un gran número de ensayos ya optimizados con distintos genes de expresión constitutiva. Una vez normalizado el resultado de expresión con respecto al control endógeno o referencia activa, este valor se divide entre el valor de otro ensayo elegido como calibrador (condición, tejido, tratamiento, etc.) lo que resulta en un orden de magnitud con respecto al calibrador (Biosystems, 2009).

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivos generales

- Desarrollar métodos de PCR punto final y qPCR, basados en la detección del gen PKS4 implicado en la producción de zearalenona, para la detección y cuantificación de hongos productores de esta micotoxina en trigo.
- Disponer de técnicas rápidas y específicas para la detección de *F. graminearum*, que permitirán mejorar el control de proveedores y la seguridad de su comercialización.

### 2.2. Objetivos particulares

- Diseñar oligonucleótidos específicos para la detección del gen PKS4, el cual está involucrado en la producción de zearalenona, y del gen  $\beta$ Tub, como gen endógeno de *F. graminearum*.
- Estandarizar los métodos de PCR punto final y qPCR para la detección y cuantificación de *F. graminearum* en trigo.
- Realizar las curvas estándar para ambos genes, las cuales cumplan con los parámetros adecuados, y poder ser usadas para cuantificar el ADN del hongo en muestras de trigo.
- Realizar la cuantificación de *F. graminearum* en muestras artificialmente contaminadas y en muestras para consumo humano de la Central de Abasto de la Ciudad de México.

### 3. Metodología

#### 3.1. Diseño de oligonucleótidos

Se consultó en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), las secuencias de los genes Policétido sintasa (No. de acceso: AY495629), y del gen  $\beta$ -tubulina (No. de acceso: DQ459636) el cual funcionó como gen endógeno de *F. graminearum*.

A partir de cada secuencia se realizó el diseño de oligonucleótidos, usando el programa primer-BLAST del NCBI. Se seleccionaron los oligonucleótidos tomando en cuenta el contenido de GC, así como la temperatura de alineamiento ( $T_m$ ) entre el oligonucleótido en sentido y el de antisentido. Posteriormente, se realizó un análisis para determinar si existía la posibilidad de formación de horquillas, dímeros y heterodímeros a cada oligonucleótido seleccionado, mediante el programa OligoAnalyzer.

#### 3.2. Extracción de ADN de cepas puras

Se emplearon cuatro cepas micotoxigénicas de *F. graminearum* (F40, F41, F53 y F60), donadas de la colección de cultivos de la Unidad de Investigación de Semillas, UNAM. Se inoculó medio YPD (extracto de levadura, bactopectona, glucosa) con cada una de las cepas, y se incubaron a 29 °C, 150 rpm durante 5 días. Se realizó un filtrado del medio líquido a través de un filtro Whatman. El procedimiento de extracción se realizó como lo describió González-Osnaya & Farrés, 2011. El cual consistió en pesar 350 mg de micelio y colocarlo en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. El material micelar fue suspendido en 500  $\mu$ L de un solución, la cual contenía 0.2M Tris-HCl (pH 7.5), 0.5M NaCl, 0.01M EDTA y 1% SDS. Aproximadamente 0.2 g de perlas de vidrio de diferentes tamaños (1.0/0.5/0.1 mm) fueron agregados para romper la pared celular. Los tubos fueron colocados en vórtex durante 10 min a velocidad máxima. 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 1 hora, 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 (Epoch, BioTek Instruments Inc., Vermont, USA). 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.

### **3.3. PCR punto final**

La PCR fue llevada a cabo en una mezcla de reacción de 50 µL, la cual fue preparada de acuerdo a la Tabla 6.

Tabla 6. Volúmenes agregados de los reactivos usados para PCR punto final

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración final	Volumen agregado ( $\mu\text{L}$ )
<b>Buffer de reacción</b>	10x	1x	5
<b>Polimerasa Pfu</b>	2.5 U/ $\mu\text{L}$	1.25 U	0.5
<b>dNTPs</b>	10 mM	0.2 mM	1
<b>Oligonucleótido sentido</b>	10 $\mu\text{M}$	0.2 $\mu\text{M}$	1
<b>Oligonucleótido antisentido</b>	10 $\mu\text{M}$	0.2 $\mu\text{M}$	1
<b>ADN molde</b>	200 ng/ $\mu\text{L}$	1000 ng	5
<b>Agua</b>			36.5
<b>Volumen final</b>			50

La amplificación del ADN fue realizado en un termociclador Axygen Maxygene con gradiente de temperatura, 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 67.3 °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 2% (p/v), teñidos con bromuro de etidio y observados a luz UV.

### 3.4. Especificidad de oligonucleótidos y secuenciación de productos de PCR

Para verificar la especificidad de los oligonucleótidos sobre el gen de interés, se realizaron reacciones de PCR punto final con el ADN extraído de las 4 cepas micotoxigénicas (F40, F41, F53 y F60), así como con ADN de trigo previamente lavado con hipoclorito de sodio. Se realizó un gel de agarosa al 2% para observar los amplicones, y su posterior purificación mediante el kit GenElute Minus EtBr Spin Columns (SIGMA-ALDRICH, USA).

Para la purificación de los amplicones. Se colocó una columna GenElute dentro de un tubo de 1.5 mL. Se pre-lavó la columna, agregando 100  $\mu$ L de 1X TE (10mM Tris, pH 8.0, y 1 mM EDTA). El tubo se centrifugó a 16,000 rpm por 10 segundos. Se transfirió la columna a un nuevo tubo. Se cortó la banda con el producto de interés del gel de agarosa, y se colocó dentro de la columna prelavada. Se centrifugó la columna a 16,000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, se realizó una precipitación para purificar el producto, al volumen recolectado, se le adicionaron 0.1 volúmenes de acetato de sodio (3 M, pH 5.2), y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó 15 minutos a 16,000 rpm, y se descartó el sobrenadante. Se realizó un lavado con 70% de etanol, y se resuspendió el pellet en agua grado biología molecular.

Cada amplicón se secuenció en la compañía MacroGen (Japón) para confirmar la amplificación del gen deseado.

### **3.5. Muestreo**

Muestras de trigo para consumo humano fueron recolectadas en el mercado de la Central de Abasto de la Ciudad de México, de acuerdo a los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de niveles de micotoxinas en alimentos (Commission, 2006). Se tomaron diez submuestras de 0.1 kg cada una, del mismo lote; combinando todas las submuestras el tamaño total fue de 1 kg para cada muestra. Todas las muestras fueron almacenadas en bolsas de plástico y mantenidas en refrigeración hasta su análisis.

### **3.6. Conteo en placa de muestras**

Se homogeneizó cada muestra (1 kg), se distribuyó en una superficie rectangular y se dividió en forma de cruz para realizar el cuarteo. De las 4 partes, se tomó material proveniente de los dos extremos que no

estaban juntos. Estos dos extremos se homogeneizaron y se repitió el procedimiento hasta obtener aproximadamente 20 gramos de muestra, los cuales fueron finamente pulverizados en un molino eléctrico marca Krups. Posteriormente, se realizaron las diluciones consecutivas de acuerdo al punto 8 de la NOM 110-SSA1-1994, "Bienes y Servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico". Se pesaron 10 g de la muestra molida y se colocaron en un matraz con 90 mL de solución reguladora de fosfatos estéril (pH 7,2), la cual fue homogeneizada. Se permitió que las partículas grandes se sedimentaran. Se transfirió 1 mL de esta dilución a un tubo con 9 mL del mismo diluyente estéril y se homogeneizó. El proceso se repitió hasta obtener una dilución de  $10^{-4}$ .

Una vez elaboradas las diluciones, se realizó el plaqueo de las muestras de acuerdo al punto 9 de la NOM-111-SSA1-1994, "Bienes y Servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en Alimentos". Se colocó por duplicado en cajas Petri 1 mL de la dilución correspondiente. Se vertió de 15 a 20 mL de agar papa dextrosa acidificado (pH 3.5), adicionado con cloranfenicol (0,5 g/L) como antibacteriano y rosa de bengala ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) para controlar el crecimiento extendido de hongos y permitir un mejor conteo de las colonias.

Se mezcló cuidadosamente el medio con seis movimientos de derecha a izquierda, seis en el sentido de las manecillas del reloj, seis en el sentido contrario y seis de atrás para adelante, sobre una superficie lisa. Se permitió que la mezcla se solidificara. Las cajas se colocaron en incubación a  $29 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , y se realizó el conteo de cada placa después de 3, 4 y 5 días de incubación. Después de 5 días, se seleccionaron aquellas placas que contenían entre 10 y 150 colonias. Si alguna parte de la caja mostraba crecimiento extendido de mohos o si era difícil contar colonias bien aisladas, se consideraron los conteos de 4 días de incubación y aún de 3 días.

### **3.7. Extracción del ADN de muestras de trigo**

Se realizó la extracción por medio del kit FastID (GeneticID, USA). Se pesaron 200 mg de muestra, previamente molidos y homogeneizados y se mezclaron con 1000  $\mu$ L de una premezcla de 1000  $\mu$ L de buffer de lisis, y 10  $\mu$ L de solución de proteinasa K. Se colocó en vórtex brevemente hasta obtener una solución homogénea. Se incubó a 65 °C por 30 minutos, se agregó un volumen igual de cloroformo, y se centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos en una microcentrífuga. La fase acuosa se recolectó en un nuevo tubo y se repitió la extracción con cloroformo. Se recolectó la fase acuosa en un tubo de 2 mL.

Se agregó un volumen igual de buffer de unión y se colocó en vórtex brevemente. Se centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos. Se pasó el sobrenadante a través de la columna de unión de ADN, centrifugando a 10000 rpm por 5 minutos. Se descartó el filtrado. Se lavó con 800  $\mu$ L de buffer de lavado, centrifugando a 10000 rpm por 5 minutos, y se descartó el filtrado. Se lavó tres veces con 800  $\mu$ L con etanol 75%, centrifugando a 10000 rpm por 2 minutos en cada lavado. Se realizó una centrifugación adicional a 10000 rpm por 1 minuto.

Se transfirió la columna a un tubo de 1.5 mL. Se agregaron 100  $\mu$ L de buffer 1xTE. Se incubó por 5 minutos a 65 °C y se centrifugó nuevamente en las condiciones anteriormente descritas para eluir el ADN. La integridad del ADN se analizó mediante una electroforesis en agarosa al 1%. La pureza y concentración se analizaron midiendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm en formato de nanogota, por medio del programa Gen5 con el accesorio Take3 del espectro EPOCH, BioTek. Las extracciones fueron almacenadas a 4 °C.

### **3.8. Muestras artificialmente contaminadas**

Como primer paso para la contaminación intencional de *F. graminearum* a muestras de trigo, se realizó la cosecha de esporas del hongo. Se sembró la cepa micotoxigénica F40 en 10 cajas Petri con medio PDA (BD



Bioxon), durante 5 días. Posteriormente, se depositó 5 mL de Tween 80 al 0.1% estéril por cada caja. Se realizó un raspado con un asa estéril y enfriada. Se recuperó el Tween 80% de cada caja y se depositó en un tubo Falcon, y se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos. Se retiró el sobrenadante y se agregó el mismo volumen de agua desionizada estéril, y se resuspendió el pellet. Se centrifugó nuevamente, y la operación fue repetida dos veces más. El pellet obtenido finalmente se resuspendió en 5 mL de agua desionizada estéril.

Para el conteo de esporas, se realizó una dilución de la suspensión de esporas. Se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión de esporas y se agregaron 900  $\mu\text{L}$  de agua estéril. De esta dilución se tomaron 20  $\mu\text{L}$  y se colocaron en la cámara de Neubauer para el conteo de esporas en el microscopio. Posteriormente, obtenido el número de esporas en la suspensión, se realizaron diluciones para obtener suspensiones de una concentración de  $4 \times 10^5$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^3$ ,  $4 \times 10^2$  y  $4 \times 10^1$  UFC/mL.

Por otro lado, se colocaron 50 gramos de trigo en 12 matraces Erlenmeyer de 125 mL, y se sometieron a esterilización (15 minutos,  $121^\circ\text{C}$ ). Se inocularon 5 mL de una dilución diferente para cada matraz, cada dilución se inoculó por duplicado; para obtener las siguientes concentraciones:  $4 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^3$ ,  $4 \times 10^2$ ,  $4 \times 10^1$  y 4 UFC/ gramo de trigo. Los dos matraces sobrantes se usaron como control, a los cuales se les adicionó 5 mL de agua estéril.

Un juego de matraces se incubó a  $29^\circ\text{C}$  durante 6 semanas, y posteriormente se realizó la extracción de ADN con el kit FastID. Al otro juego de matraces, se le realizó la extracción de ADN inmediatamente después de la inoculación, por medio del método de FastID.

La concentración y pureza de los ADN obtenidos de las muestras artificialmente contaminadas se determinaron mediante el espectro EPOCH con el programa Gen5 y el accesorio Take3 para el formato de

nanogota (BioTek). Se realizó el qPCR de las muestras artificialmente contaminadas con las condiciones descritas en la sección 3.3.

### 3.9. Estandarización del PCR tiempo real (qPCR)

El qPCR fue realizado en un Sistema de PCR tiempo real 7500 de Applied Biosystems, y usando la master mix SYBR Green PCR (Applied Biosystems, UK). Cada pozo contenía los reactivos necesarios mostrados en la Tabla 7, llegando a un volumen final de 12.5  $\mu$ L.

Como primer paso se elaboraron las curvas de disociación de los oligonucleótidos con el fin de observar si se formaban dímeros o subproductos los cuales interfirieran en la cuantificación, estas pruebas se realizaron con las cuatro cepas micotoxigénicas de *F. graminearum* (Fu40, Fu41, Fu53 y Fu60), y con ADN de trigo lavado previamente con hipoclorito de sodio. Cada prueba se realizó por triplicado, así como cada cepa fue probada con los 2 pares de oligonucleótidos diseñados. Para la realización de estas curvas se agregaron 5  $\mu$ L de una dilución del ADN de las cepas micotoxigénicas con concentración de 20 ng/ $\mu$ L para así obtener 100 ng de ADN en el volumen final de la reacción.

Tabla 7. Concentraciones y reactivos para la realización del qPCR.

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración final	Vol. Adicionado ( $\mu$ L)
<b>SYBR Green PCR Master Mix</b>	2X	1X	6.25
<b>Oligonucleótido forward</b>	10 $\mu$ M	200 nM	0.25
<b>Oligonucleótido reverse</b>	10 $\mu$ M	200 nM	0.25
<b>ADN molde</b>	20 ng/ $\mu$ L	100 ng totales	5
<b>Agua</b>	--	--	0.75
<b>Total</b>			12.5

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 final de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C y 15 segundos a 95 °C, durante el cual se elaboró la curva 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 cada gen usando el ADN genómico de una de las 4 cepas micotoxigénicas de *F. graminearum*. Se realizaron diluciones seriadas de ADN de 20 ng/μL, 2 ng/μL, 0.2 ng/μL, 0.02 ng/μL y 0.002 ng/μL. Para cada dilución, se realizó la reacción de qPCR por triplicado con cada uno de los pares de oligonucleótidos.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Diseño de oligonucleótidos

El diseño de oligonucleótidos se realizó mediante el programa primer-BLAST con las secuencias de los genes anteriormente citados, consultadas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Dado que el ensayo de qPCR se realizó usando como compuesto fluorescente a SYBR Green, éste tiene la inconveniencia de que no es específico pues se une a cualquier producto de doble cadena, por lo que detecta productos inespecíficos y dímeros de oligonucleótidos. Estos problemas se reducen sí el diseño de oligonucleótidos se realiza con precisión y cuidadosamente. Por estas razones es deseable que los oligonucleótidos cumplan ciertas condiciones (Martín, 2010):

- Deben tener longitudes de entre 19 a 25 nucleótidos.
- Contenido de GC debe ser entre 40 a 60%
- El contenido de GC de los oligonucleótidos de la misma reacción deben ser similares.
- Deben ser complementarios a las regiones deseadas.
- Las temperaturas de fusión de los oligonucleótidos usados en la misma reacción deben ser similares.
- Las secuencias de lo oligonucleótidos no deben formar horquillas internas ni sean complementarias entre sí.

Tabla 8. Secuencia de oligonucleótidos, tamaño del producto de PCR esperado y gen blanco.

Nombre Oligonucleótido	Gen blanco	Secuencia	Inicio	Alto	Tamaño de producto (bp)
PKS4F	Gen policétido sintasa (PKS4) <i>Gibberella zeae</i>	TGCTGGCGGTGTCGGAATGATC	672	693	200
PKS4R		GGATGACTGCCCTGATGTTGTC	871	850	
$\beta$ TUBF	Gen beta-tubulina <i>Gibberella zeae</i>	GTGCCCTTGATTGTACCCCGCC	72	93	184
$\beta$ TUBR		TCCCTCCGACGAGATGGAAGAGCA	255	232	

Se ha descrito en la literatura que el tamaño del amplicón no debe exceder a las 300 bp (idealmente es de 50-250 bases). Amplicones pequeños ofrecen resultados más consistentes, debido a que el PCR es más eficiente y más tolerante a las condiciones de reacción (Tevfik, 2006).

Se seleccionaron los oligonucleótidos mostrados en la Tabla 8 de las opciones presentadas para cada par de oligonucleótidos, tomando en cuenta parámetros tales como tamaño de producto, %GC, especificidad de oligonucleótidos y tamaño de oligonucleótido. Todos los productos de PCR esperados tienen un tamaño entre 180 a 200 bp. Posteriormente, se realizó un análisis de cada oligonucleótido con el programa BLAST, el cual realiza una comparación de la secuencia del oligonucleótido contra múltiples secuencias de base de datos, encontrando las secuencias con mayor parecido. Un parámetro muy importante proporcionado por este análisis es el valor E, el cual es el número esperado de veces que se puede obtener un alineamiento particular que sea producto del azar, por

lo que entre menor sea el valor de E, menos probabilidad de que el alineamiento se deba únicamente al azar y por tanto más posibilidades tiene de representar una posible homología. Un valor E muy confiable es menor a 0.02, un valor E entre 0.02 y 1 es posible indicador de homología. Mientras tanto, un valor E mayor a 1 debe analizarse con mucha cautela, pues probablemente se deba más al azar que a un fundamento biológico particular (Lesk, 2002). Como se observa en la Tabla 9, todos los oligonucleótidos obtuvieron un valor de E por debajo de 0.02, por lo que son muy confiables.

Tabla 9. Valores E, obtenidos mediante análisis BLAST de oligonucleótidos seleccionados

Oligonucleótido	VALOR E
<b>PKS4F</b>	0.006
<b>PKS4R</b>	0.006
<b>βTUBF</b>	0.006
<b>βTUBR</b>	0.006

Así mismo se realizó un análisis mediante el programa OligoAnalyzer 3.1 desarrollado por Integrated DNA Technologies (IDT). Este programa toma en cuentas variables termodinámicas, tales como; la energía libre de Gibbs, entalpía y entropía para determinar la probabilidad de la formación de dímeros, horquillas y/o heterodímeros. Entre más negativo sea un valor de  $\Delta G$  de una estructura secundaria, es más probable que experimentemos problemas con el ensayo de PCR. El IDT reporta que oligonucleótidos con un valor de  $\Delta G$  mayor de -9 kcal/mol pueden causar problemas en la reacción de PCR. Este valor es principalmente una guía para el diseño de oligonucleótidos. Idealmente los valores de  $\Delta G$  deben ser más positivos que -9 kcal/mol; sin embargo, esto no es garantía de que no se presenten problemas durante el ensayo de PCR.

En la Tabla 10 se muestran los valores de  $\Delta G$  para dímeros y heterodímeros, todos los valores son mayores a -9 kcal/mol.

Tabla 10. Valores de  $\Delta G$  obtenidos por el programa OligoAnalyzer para formación de dímeros y heterodímeros.

Oligonucleótidos	$\Delta G$ dímeros	$\Delta G$ heterodímeros
<b>PKS4f</b>	-4.62	-6.21
<b>PKS4r</b>	-3.14	
<b><math>\beta</math>Tubf</b>	-3.65	-5.09
<b><math>\beta</math>Tubr</b>	-4.64	

Sabiendo que los oligonucleótidos cumplen con los parámetros mencionados anteriormente, se sintetizaron por medio de la compañía Invitrogen.

#### 4.2. Extracción de ADN cromosomal de cepas micotoxigénicas de *Fusarium*

Como primer paso, antes de la extracción, se comprobó la pureza de las cepas micotoxigénicas. Cada cepa se sembró en medio PDA, y se observaron las características morfológicas. Como se observa en la Figura 12, todas las cepas presentaban una coloración rojiza, principal característica de este género, así como un halo blanco en la parte inferior del agar; el micelio aéreo es blanco algodonoso y abundante.

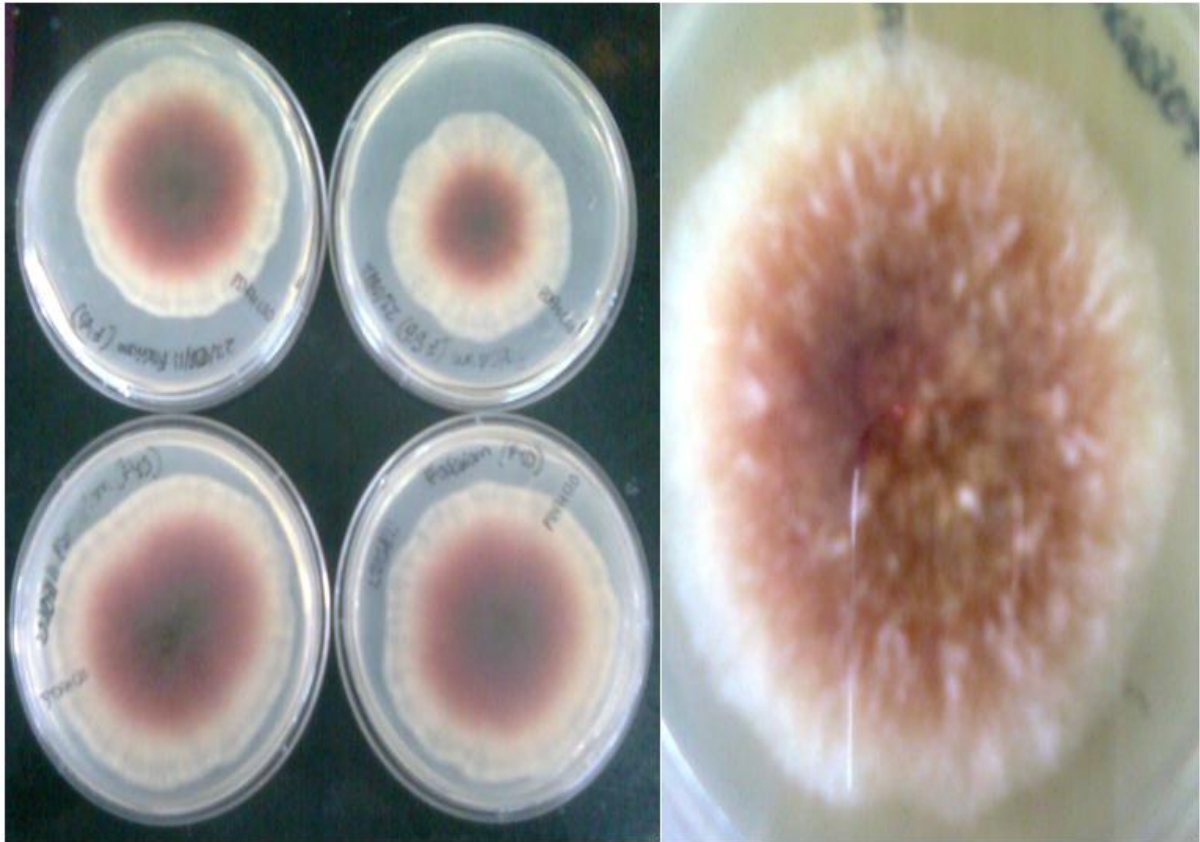


Figura 12. Características morfológicas de las cepas micotoxigénicas de *F. graminearum*.

Se realizó la extracción de ADN cromosomal de las cepas puras (F40, F41, F53, F60), de acuerdo a González-Osnaya y Farrés, 2011. Se analizó la pureza del ADN extraído mediante la medición de la absorbancia a 280 nm y 260 nm. Una relación mayor a 1.8 es generalmente aceptada como puro. Si la relación es apreciablemente más baja, puede indicar la presencia de proteína, fenol u otros contaminantes que absorben fuertemente cerca de 280 nm. Es importante realizar el análisis de pureza, ya que algunos contaminantes procedentes del propio proceso de extracción o de la matriz alimentaria pueden inhibir las reacciones de PCR (Hughes & Moody, 2007). Los datos obtenidos son mostrados en la Tabla 11, en la que se aprecia que todas las relaciones 260/280 están por arriba de 1.8, por lo que se



puede afirmar que están libres de proteína y de compuestos fenólicos, o que están en concentraciones bajas que no interferirán en el análisis posterior. Así mismo, se determinó la concentración del ADN extraído, dando rendimientos muy altos, por arriba de los 1000 ng/ $\mu$ L.

Tabla 11. Cuantificación de las extracciones de cepas puras, y relación de absorbancia 260/280 nm

Cepa	Concentración de ADN (ng/ $\mu$ L)	Relación 260/280
F40	1722.61	2.144
F41	3452.12	2.048
F53	1075.05	2.119
F60	1351.59	2.269

Otra característica que se debe analizar antes de realizar el ensayo de PCR, es la integridad del ADN a usar, debido a que si el ADN se encuentra muy degradado, la reacción no tendrá una eficiencia adecuada ya que posiblemente la secuencia blanco a los oligonucleótidos se encuentre degradada. En la Figura 13, se muestra que el ADN obtenido en la extracción está libre de ARN, aunque debido al método de extracción se observa una pequeña porción del ADN degradado, la cual es tenue encontrándose en su mayoría íntegro y por lo tanto se puede realizar la PCR.

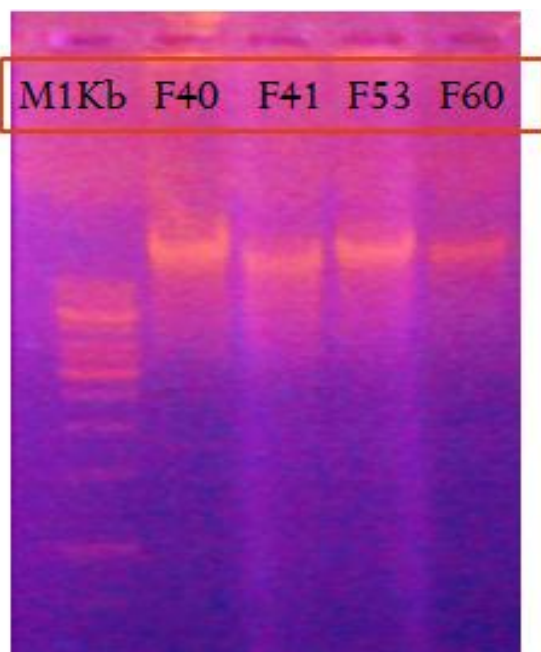


Figura 13. ADN cromosomal extraído de las cepas puras en electroforesis en gel de agarosa al 1%. 1° carril: Marcador 1Kb (Fermentas), 2° carril: cepa F40, 3° carril: cepa 41, 4° carril: cepa 53, 5° carril: cepa 60.

#### 4.2.1 PCR punto final con ADN de cepas micotoxigénicas

Una vez obtenido el ADN de las cepas micotoxigénicas, se procedió a realizar el PCR punto final siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.3. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% para verificar la obtención de los productos deseados. En la Figura 14 se observa que para ambos pares de oligonucleótidos, se obtiene un solo producto de PCR del peso esperado para las 4 cepas micotoxigénicas. También se probó cada par de oligonucleótidos con ADN trigo, con el cual no se observó amplificación de ningún producto con los dos pares de oligonucleótidos, por lo que no existe homología de *F. graminearum* y el ADN de trigo.

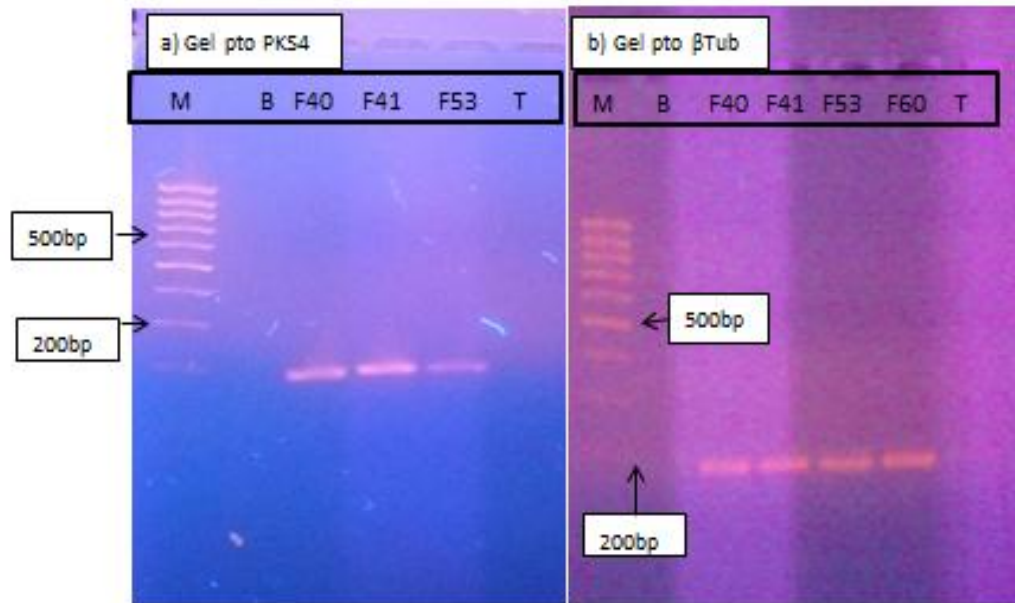


Figura 14. Productos de PCR punto final de las cepas micotoxigénicas de *F. graminearum* en electroforesis en gel de agarosa al 2%. a) Gen PKS4, b) Gen  $\beta$ Tub. 1° carril: M (marcador de bajo peso molecular Fermentas). 2° carril: blanco de reacción. 3° carril: cepa F40. 4° carril: cepa 41. 5° carril: cepa 53. 6° carril: cepa 60. 7° carril: trigo.

#### 4.2.2. Secuenciación de productos obtenidos en PCR punto final

Los productos obtenidos del PCR de los genes blanco fueron purificados del gel de agarosa y posteriormente, secuenciados en MacroGen (Japón). Cada producto fue secuenciado con cada uno de sus oligonucleótidos (forward y reverse), por lo que, se obtuvieron dos secuencias para cada producto. Estas dos secuencias fueron alineadas junto con la secuencias del gen blanco, para observar homología. Como se observa en la Figura 15, en ambos productos, las dos secuencias del producto obtenidas se alinean con el gen blanco con una alta identidad. El producto esperado para el gen PKS4, como se muestra en la Tabla 8, es de un tamaño de 200 pb, el cual comienza a ser sintetizado a partir del nucleótido 672 del gen hasta el nucleótido 871, lo cual se observa en los alineamientos, por lo que se puede asegurar que se obtuvo el producto deseado mediante los oligonucleótidos PKS4. Esto mismo se

puede decir respecto al gen  $\beta$ Tub, comparando y alineando las secuencias con los datos mostrados en la Tabla 8.

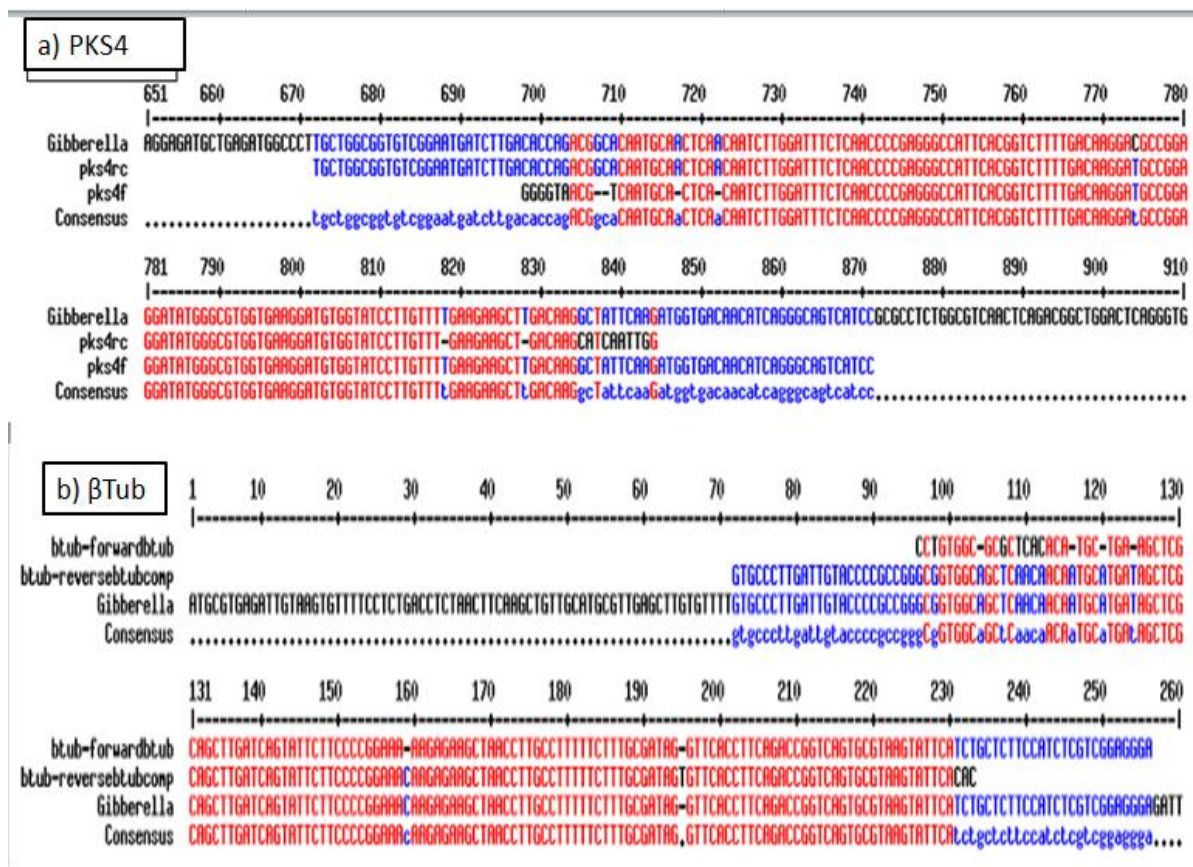


Figura 15. Secuencias y alineamiento del producto de PCR punto final obtenido con los oligonucleótidos de los genes blanco a) PKS4 y, b)  $\beta$ Tub.

### 4.3. Tratamiento de muestras de trigo para consumo humano

Las muestras fueron recolectadas en la central de Abasto de la Ciudad de México, de acuerdo a lo descrito en la metodología, y almacenadas a 4 °C hasta su análisis.

#### 4.3.1. Conteo en placa

Se realizó plaqueo de las muestras en medio PDA, las cajas se incubaron a 29°C, y se realizó conteo de colonias al tercer, cuarto y quinto día. Los resultados del conteo se muestran en la Tabla 12. Ninguna de las

muestras presentó alguna colonia con características similares a *F. graminearum*, además de que no presentaban una alta contaminación de hongos.

Tabla 12. Conteo en placa de muestras de trigo procedentes de la central de abasto.

Muestra	3er día de incubación			4to día de incubación			5to día de incubación			UFC/g trigo
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	
A	134	9	0	140	11	0	149	11	0	14x10 <sup>2</sup>
	123	4	1	132	6	1	139	6	1	
B	4	0	0	4	0	0	4	0	0	25*
	1	0	0	1	0	0	1	0	0	
C	1	0	0	2	0	0	3	0	0	25*
	0	0	0	1	0	0	2	0	0	
D	2	1	0	2	1	0	2	1	0	15*
	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
E	115	41	2	128	42	3	>150	46	4	34x10 <sup>2</sup>
	113	35	2	119	36	2	132	43	2	

\*Valor estimado

#### 4.3.2 Extracción de ADN de muestras de trigo

La extracción de ADN de las muestras se realizó por duplicado con el kit FastID, el cual ha sido usado en una 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, Fernández Suárez, & Rocha Munive, 2008). Así mismo se ha reportado su uso para obtención de ADN en diferentes cereales, como maíz, trigo, arroz y cebada; demostrando una obtención de ADN puro y sin posibles inhibidores que pudieran interferir en el desarrollo de la PCR.

#### 4.3.3. PCR punto final del ADN de muestras de trigo

Cada extracción individual de las muestras fue sometida a PCR punto final por triplicado, con 100 ng de ADN en el volumen final de la

reacción con cada uno de los pares de oligonucleótidos. No se observó producto en los geles de agarosa al 2% para ninguno de los pares de oligonucleótidos, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en la cuantificación en placa, en la cual no se detectaron colonias con morfología característica de *F. graminearum*.

#### **4.4. PCR Tiempo real (qPCR)**

##### **4.4.1. Curvas de disociación**

Como primer paso para el desarrollo de la metodología de qPCR, se debe comprobar que los oligonucleótidos no formen dímeros o productos inespecíficos, ya que esta metodología con la química de SYBER Green al ser más sensible que el PCR punto final, puede detectar concentraciones muy bajas de éstos o de cualquier otro producto inespecífico, los cuales pueden interferir en la cuantificación de la señal de fluorescencia.

Se realizó el qPCR en el equipo 7500 de Applied Biosystems, y usando la master mix SYBR Green PCR (Applied Biosystems, UK). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 12.5 µL con 100 ng de ADN en el volumen final de la reacción. Se usó el ADN de las cepas micotoxigénicas como control de *F. graminearum*. Cada par de oligonucleótidos se probó, tanto con el ADN de las cepas micotoxigénicas y con el ADN de trigo control libre de *F. graminearum*, por triplicado.

Como se observa en la Figura 16, con ambos pares de oligonucleótidos no se obtiene ningún producto en las reacciones con ADN de trigo, por lo que; se puede decir que no habrá interferencia del ADN de trigo y falsos positivos al tratar las muestras.

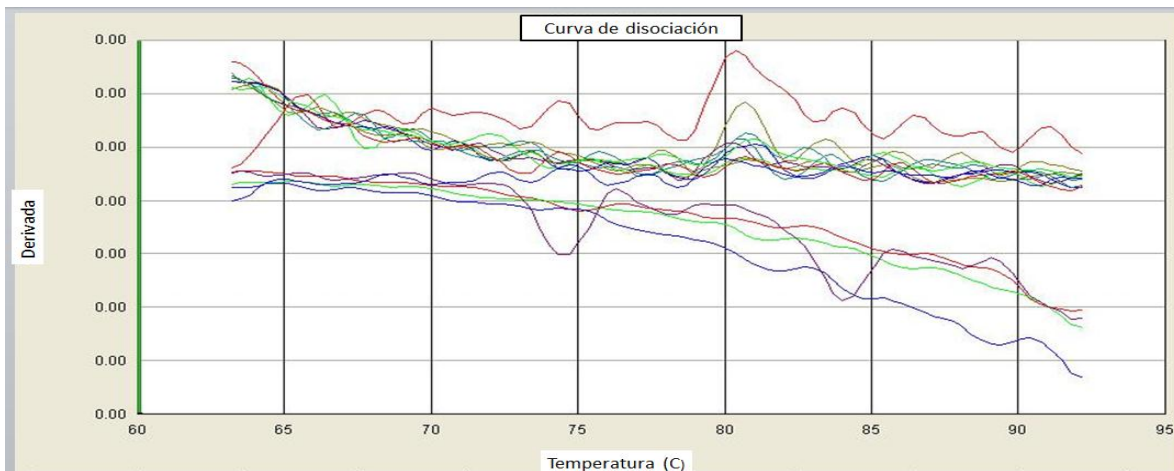


Figura 16. Curvas de disociación de oligonucleótidos de PKS4 y  $\beta$ Tub con ADN de trigo control libre de *F. graminearum*.

En la Figura 17, la curva de disociación para ambos pares de oligonucleótidos, mostró la presencia de un solo pico el cual corresponde al producto esperado.

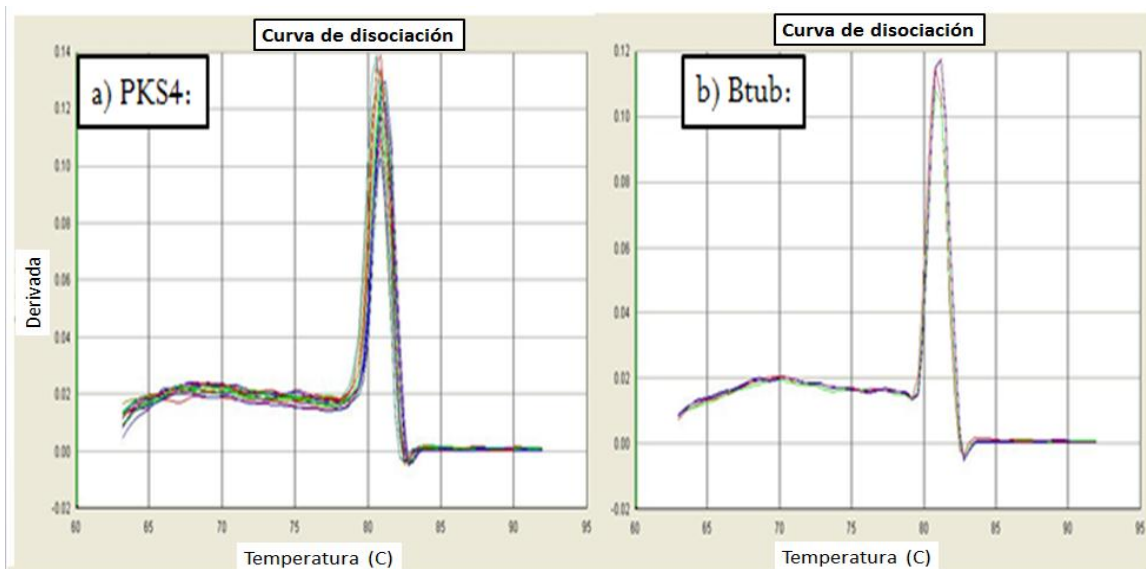


Figura 17. Curvas de disociación para genes a) PKS4 con ADN de *F. graminearum*, b)  $\beta$ Tub con ADN de *F. graminearum*. Condiciones de PCR: 10 minutos a 95 °C. Seguido por 40 ciclos que incluyeron; 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C, seguido de un ciclo de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C y 15 segundos a 95 °C, durante el cual se elaboró la curva de disociación. Cada reacción fue llevada a cabo por triplicado.

#### 4.4.2. Elaboración de curvas patrón

Se elaboraron las curvas patrón de los genes PKS4 y  $\beta$ Tub mediante diluciones consecutivas de ADN de la cepa micotoxigénica F40, de tal forma que en el volumen final de reacción se tuvieran 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 y 0.00001 ng. La reacción se realizó por triplicado con cada dilución, en un volumen final de 12.5  $\mu$ L. En la Figura 18 se muestra el diagrama de la amplificación. Un diagrama de amplificación es una gráfica de la señal de la fluorescencia en función del número de ciclos. En los ciclos iniciales de PCR hay un pequeño cambio en señal de fluorescencia, esto define la línea base para el diagrama de la amplificación. Un aumento en fluorescencia sobre la línea de fondo indica la detección del producto acumulado de PCR (Cortazar & Silva, 2004). Por esta razón es que a menor concentración de ADN molde, se requieren más números de ciclos para que el producto acumulado de PCR pueda ser detectado.

La amplificación de cualquier ADN molde es definida por 4 fases: 1.- Línea base, 2.-Exponencial; 3.-Lineal y 4.-Plana. La fase 1 o de línea base contiene toda la amplificación que está por debajo del nivel de detección del equipo de tiempo real. La fase exponencial está compuesta de las primeras señales detectables donde la amplificación se está llevando a cabo en su velocidad máxima exponencial, y es donde se recolectan los datos para su análisis, como se observa en la Figura 18. En la fase lineal la eficiencia de la amplificación comienza a disminuir. En la fase plana es donde la amplificación rápidamente cesa para el resto de los ciclos del experimento (Tevfik, 2006).



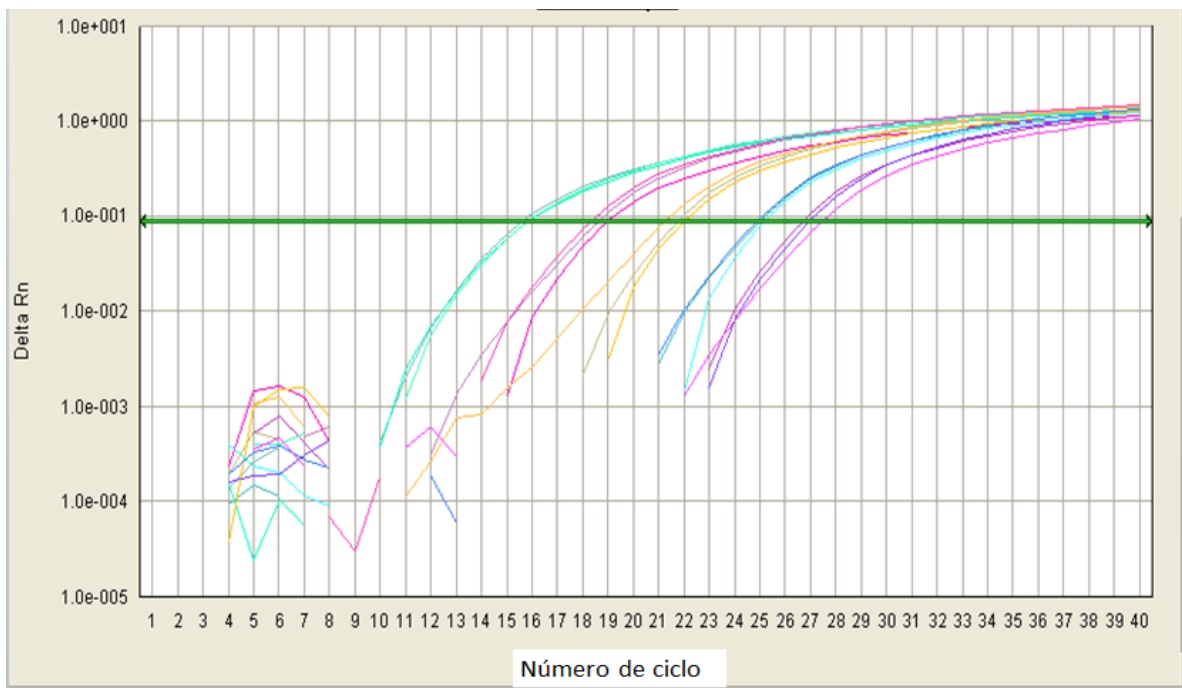


Figura 18. Diagrama de amplificación para el gen PKS4. Condiciones de PCR: 10 minutos a 95 °C. Seguido por 40 ciclos que incluyeron; 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C, seguido de un ciclo de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C y 15 segundos a 95 °C, durante el cual se elaboró la curva de disociación. Cada reacción fue llevada a cabo por triplicado.

Los datos con los que se trabajan, se adquieren cuando la amplificación del gen de interés se encuentra todavía en la fase exponencial. Esto está determinado por la identificación del número de ciclo al cual la intensidad de emisión del fluoróforo aumenta con respecto al ruido de fondo (*background*). Este número de ciclo se conoce como ciclo umbral (Ct: threshold cycle). El Ct está determinado en la fase exponencial de la reacción y es inversamente proporcional al número de copias del ADN blanco; es decir, a mayor concentración de gen blanco, menor Ct medido (Cortazar & Silva, 2004). Los valores de Ct se grafican en función del logaritmo de la cantidad inicial de ADN genómico para dar la curva estándar mostrada en la Figura 19.

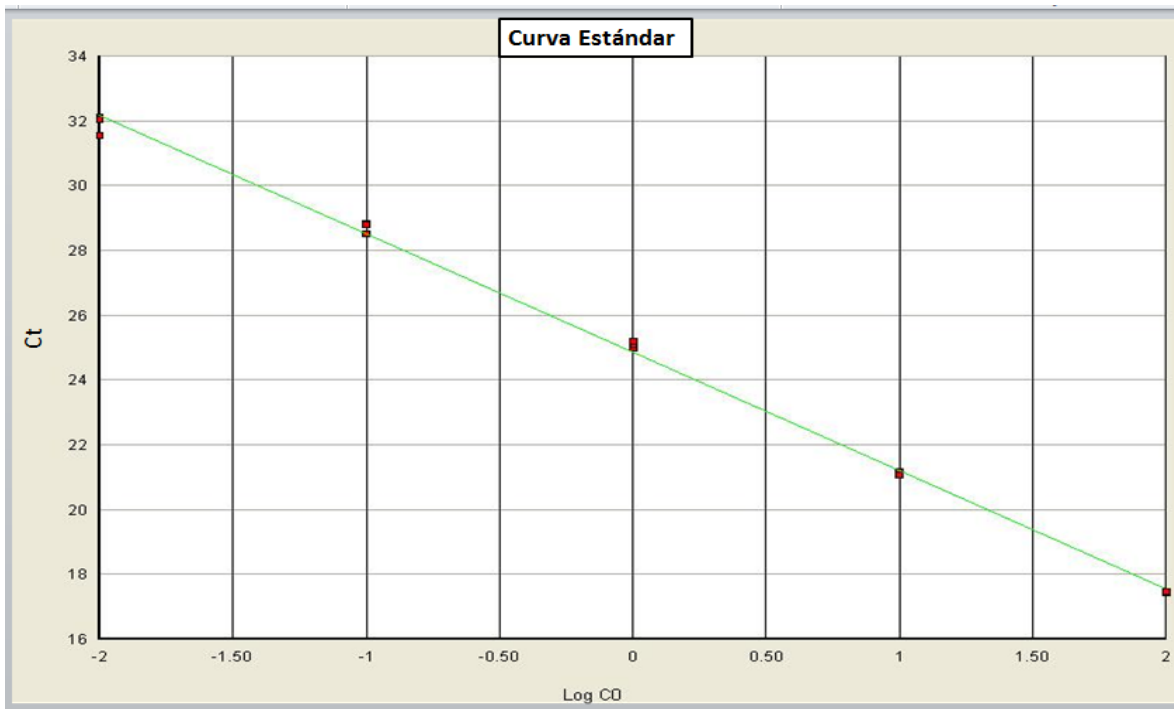


Figura 19. Curva estándar para el gen PKS4 con cantidades de 100 ng a 0.01 ng de ADN de *Fusarium*. Condiciones de PCR: 10 minutos a 95 °C. Seguido por 40 ciclos que incluyeron; 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C durante el cual fue medida la fluorescencia, seguido de un ciclo de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C y 15 segundos a 95 °C. Cada reacción fue llevada a cabo por triplicado.

La cuantificación del gen de interés en las muestras, es lograda interpolando el Ct obtenido de la muestra mediante qPCR en la curva estándar para determinar la cantidad inicial de ADN presente en la muestra. Un valor que se debe analizar cuidadosamente es el valor obtenido de 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 igual al 100%, es decir; que por cada copia presente del gen blanco se sintetiza una cadena igual. La eficiencia es un indicador de cómo se ha realizado la reacción de PCR. Cuando una pendiente se vuelve más negativa ( $<-3.32$ ) la eficiencia decrece, como se observa en la Tabla 13, donde se muestran, como ejemplo diversos valores de pendiente y su eficiencia correspondiente.

Tabla 13. Eficiencia y amplificación de varios valores de pendiente en una reacción de qPCR.

<b>Pendiente</b>	<b>Amplificación</b>	<b>Eficiencia (%)</b>
<b>-3.60</b>	1.8957	89.57
<b>-3.55</b>	1.9129	91.29
<b>-3.50</b>	1.9307	93.07
<b>-3.45</b>	1.9492	94.92
<b>-3.40</b>	1.9684	96.84
<b>-3.35</b>	1.9884	98.84
<b>-3.32</b>	2.0000	100.00
<b>-3.30</b>	2.0092	100.92
<b>-3.25</b>	2.0309	103.09
<b>-3.20</b>	2.0535	105.35
<b>-3.15</b>	2.0771	107.71
<b>-3.10</b>	2.1017	110.17

De acuerdo a Rodríguez & Rodríguez (2006), un ensayo de qPCR es aceptable hasta con un 91% de eficiencia. La curva estándar obtenida para el gen PKS4 (Figura 19) tiene una pendiente de -3.55, lo que indica un valor de eficiencia del 91.29%, lo cual es aceptable para el ensayo. La curva de calibración del gen  $\beta$ Tub se muestra en la Figura 20, la pendiente obtenida de esta curva fue de -3.45, lo cual corresponde con una eficiencia del 94.92%.

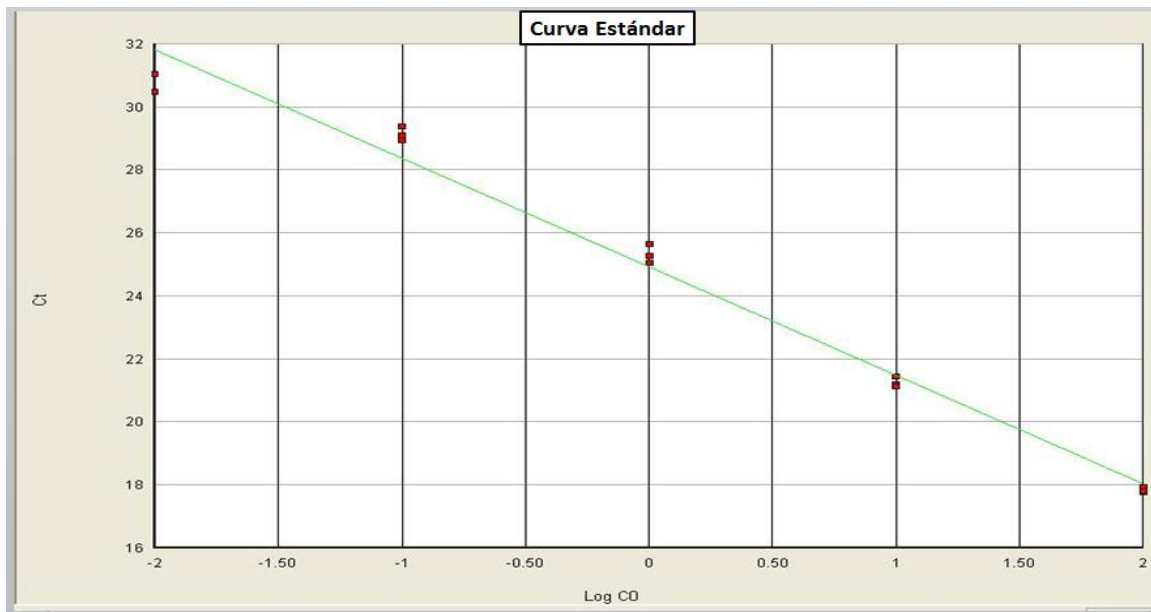


Figura 20. Curva estándar para el gen  $\beta$ Tub con cantidades de 100 ng a 0.01 ng de ADN de *Fusarium*. Condiciones de PCR: 10 minutos a 95 °C. Seguido por 40 ciclos que incluyeron; 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C durante el cual fue medida la fluorescencia, seguido de un ciclo de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C y 15 segundos a 95 °C. Cada reacción fue llevada a cabo por triplicado.

En las Figuras 18-20, se ilustran los principios básicos de la cuantificación en tiempo real de PCR. Cuanto más alta es la cantidad inicial de ADN genómico, más pronto se detecta el producto acumulado en el proceso de PCR, y más bajo es el valor de Ct. Los valores de Ct son reproducibles en las réplicas porque el umbral se escoge en la fase exponencial de la PCR. Esto se demuestra en la Figura 18, donde el umbral intersecta la gráfica de amplificación en la región donde hay una relación lineal entre el logaritmo del cambio en fluorescencia y el número del ciclo. En la fase exponencial, los componentes de la reacción no están limitados y las reacciones de replicación exhiben resultados reproducibles y uniformes (Cortazar & Silva, 2004).

Las curvas estándar para ambos genes (PKS4 y  $\beta$ Tub) se lograron construir con cantidades mayores de 0.01 ng de ADN en el volumen final de la reacción. Entre cada dilución 1:10 debe existir una separación de

3.3 ciclos, como se observa en la Figura 18 para las concentraciones por arriba de 0.01 ng. Por debajo de esta concentración, a partir de 0.001 ng, no se obtuvo la separación de ciclos entre cada dilución (Figura 21), ya que se obtuvieron ciclos muy cercanos entre sí, a pesar de estar trabajando con diluciones seriadas y consecutivas. Esto se debe a que por debajo de la cantidad de 0.001 ng, la reacción es incapaz de alcanzar una eficiencia óptima debido a la baja concentración presente del gen blanco en el volumen de la reacción.

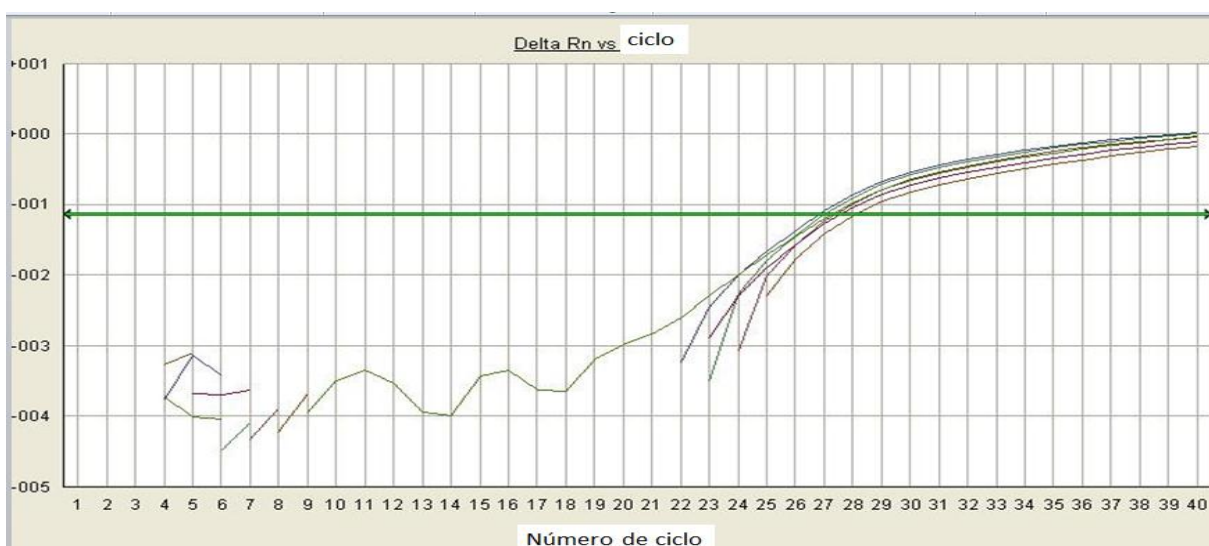


Figura 21. Diagrama de amplificación para el gen PKS4 con cantidades por debajo de 0.001 ng.

Así mismo, las curvas de disociación a concentraciones más bajas mostraban que, conforme la cantidad de ADN disminuía, se incrementaba la aparición de dímeros de oligonucleótidos (Figura 22). Este comportamiento fue descrito previamente por Schnerr, Niessen & Vogel (2000); al cuantificar el gen Tri5 en muestras de cereales, se observó la aparición de un pico en la curva de disociación entre 75 °C y 78 °C, correspondiente a dímeros de oligonucleótidos, los cuales incrementaban al disminuir la concentración de ADN presente en la reacción. Estos dímeros se forman debido a que existen oligonucleótidos

que no son utilizados para la reacción y tienden a formar dímeros, los cuales a su vez sirven de molde. Estos dímeros interfieren en la cuantificación ya que, igualmente que el producto principal, emiten fluorescencia. Por lo anterior, la cantidad de 0.01 ng se considera como el límite de cuantificación para ambos genes, ya que por debajo de esta concentración no se puede cuantificar con exactitud el gen blanco debido a la interferencia de los dímeros de oligonucleótidos.

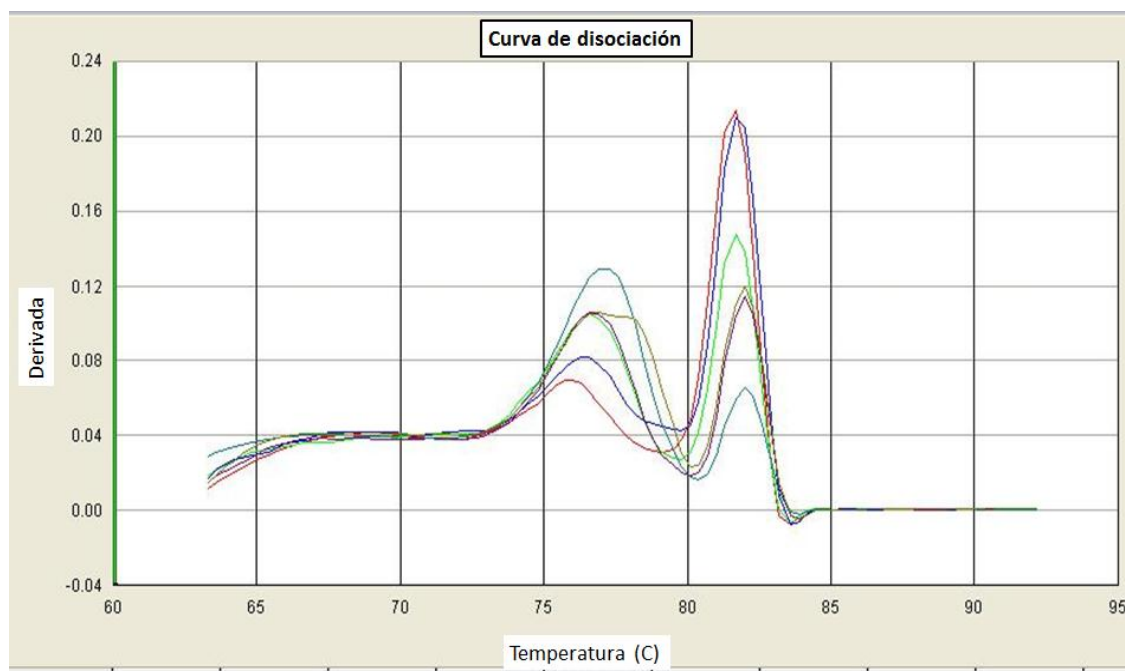


Figura 22. Curvas de disociación para gen PKS4 con concentraciones por debajo 0.001 ng.

#### 4.4.3. PCR tiempo real (qPCR) con ADN de muestras de la Central de Abasto

Contando con las curvas estándar para los genes PKS4 Y  $\beta$ Tub se realizó la qPCR con las muestras. El protocolo se realizó con las condiciones descritas anteriormente. Cada muestra fue analizada por triplicado. Las curvas de amplificación son mostradas en la Figura 23, en la cuales se observa que no muestran el comportamiento típico de una curva de amplificación, ya que no se distingue una fase exponencial definida para ambos genes.

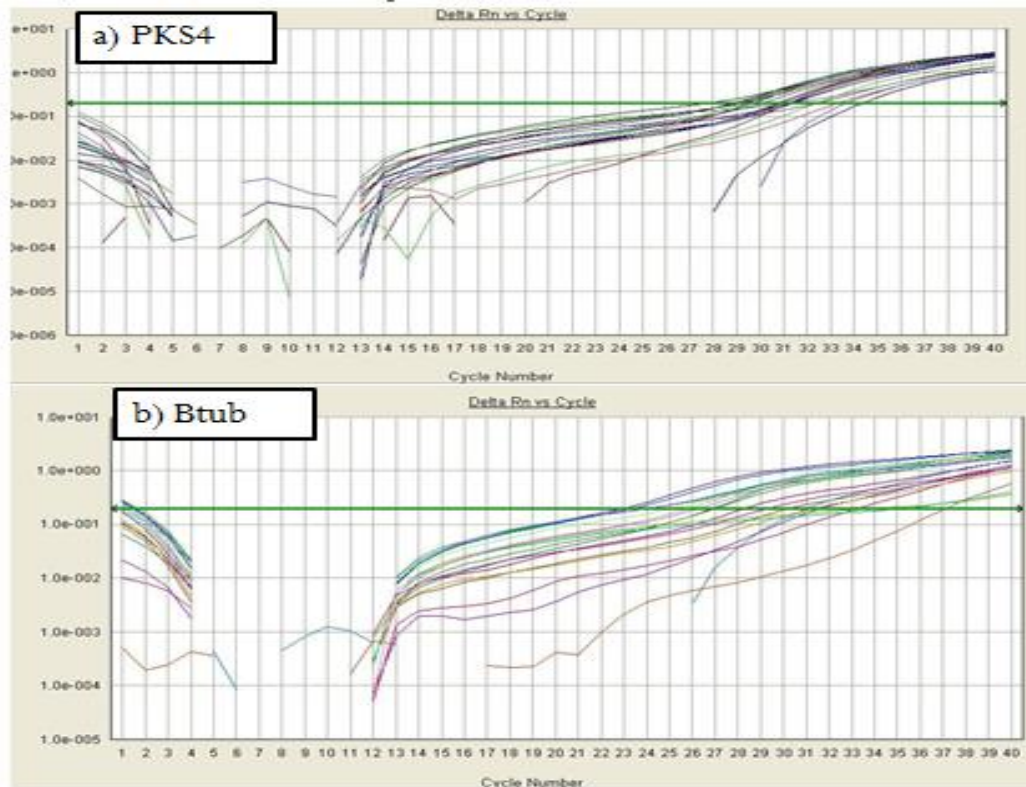


Figura 23. Curvas de disociación qPCR con muestras de trigo de la Central de Abasto de la Ciudad de México. a) Gen PKS4 y b) Gen  $\beta$ Tub.

Siguiendo el análisis de la curva de disociación obtenidas para las muestras (Figura 24), donde se muestran los 3 casos que se observaron en las diferentes muestras, las cuales presentan diversos problemas: a) gran cantidad de dímeros, b) productos inespecíficos, y c) señal de fluorescencia por parte de los dímeros. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por el conteo en placa y del PCR punto final de las muestras, no se esperaba obtener amplificaciones en el tiempo real para las muestras para ambos genes (PKS4 y  $\beta$ Tub). Estas curvas de amplificación atípicas se deben a la fluorescencia de una gran cantidad de dímeros, así como a la presencia de productos inespecíficos con una  $T_m$  de 84.7 °C.

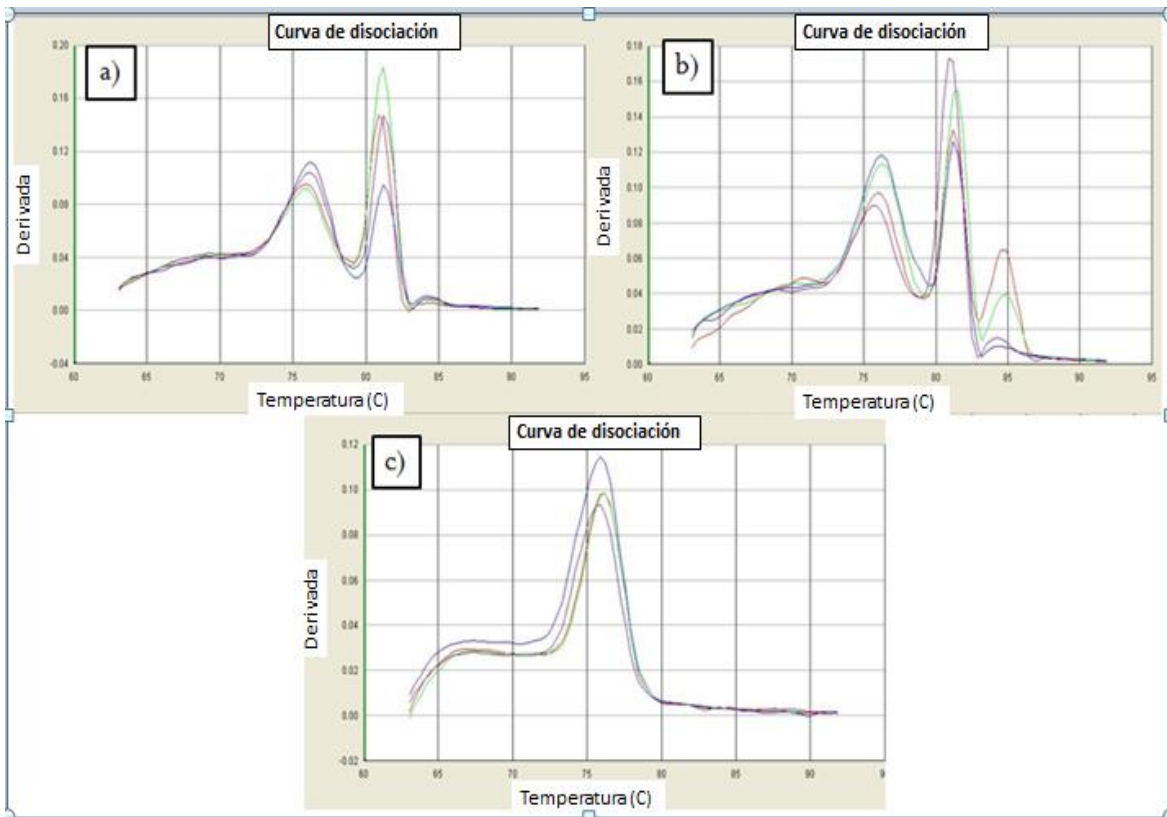


Figura 24. Curvas de disociación muestras de trigo de la central de abasto de la ciudad de México donde se observa una gran cantidad de dímeros y/o productos inespecíficos.

#### 4.4.4. Estandarización de qPCR

Tanto los dímeros de oligonucleótidos como la aparición de un producto inespecífico, posiblemente debido a la presencia de una secuencia similar al gen blanco en otro hongo presente en las muestras, causaron diversos problemas en la estandarización del protocolo de qPCR. Para resolver dichos problemas se decidió aumentar la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos de 60 °C a 68 °C. Para ello, se realizó una reacción control con 100 ng de la cepa micotoxigénica F40. Así mismo se realizó la reacción de las muestras que presentaban dímeros y/o la aparición del tercer producto.

Las curvas de disociación de las reacciones control se muestran en la Figura 25, donde se observa que ambos pares de oligonucleótidos



presentan un solo producto, por lo que el aumento de temperatura no afecta en la amplificación del producto deseado.

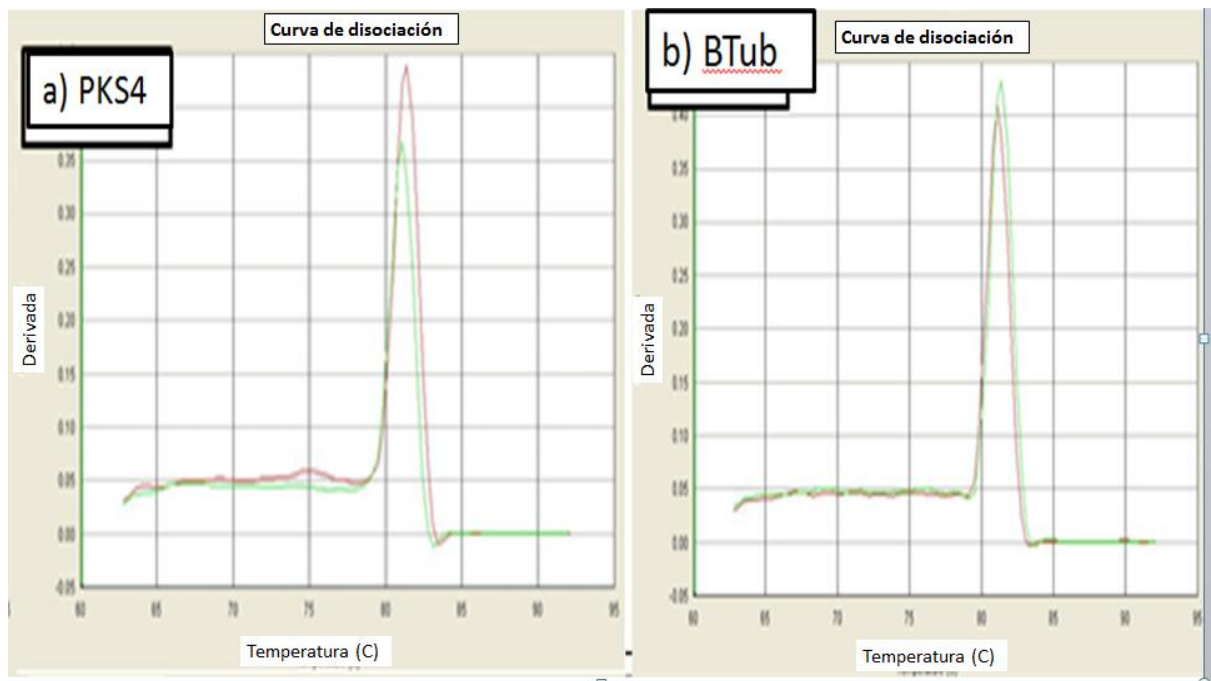


Figura 25. Curvas de disociación con una temperatura de alineamiento a 68°C. a) Gen PKS4, b) Gen  $\beta$ Tub. Condiciones de PCR: 10 minutos a 95 °C. Seguido por 40 ciclos que incluyeron; 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 68 °C durante el cual fue medida la fluorescencia, seguido de un ciclo de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C y 15 segundos a 95 °C. Cada reacción fue llevada a cabo por triplicado.

Respecto a las muestras, las curvas de disociación muestran la desaparición por completo del pico del producto inespecífico que se presentaba a una  $T_m$  de 84.5 °C (Figura 26). Esto se debe a que al elevar la temperatura de alineamiento, los oligonucleótidos son más específicos a la secuencia con la que se deben alinear para llevar a cabo la polimerización. Sin embargo, el pico correspondiente a dímeros de oligonucleótidos presenta una fluorescencia muy grande, el cual interfiere en la cuantificación y representación de las curvas de disociación.

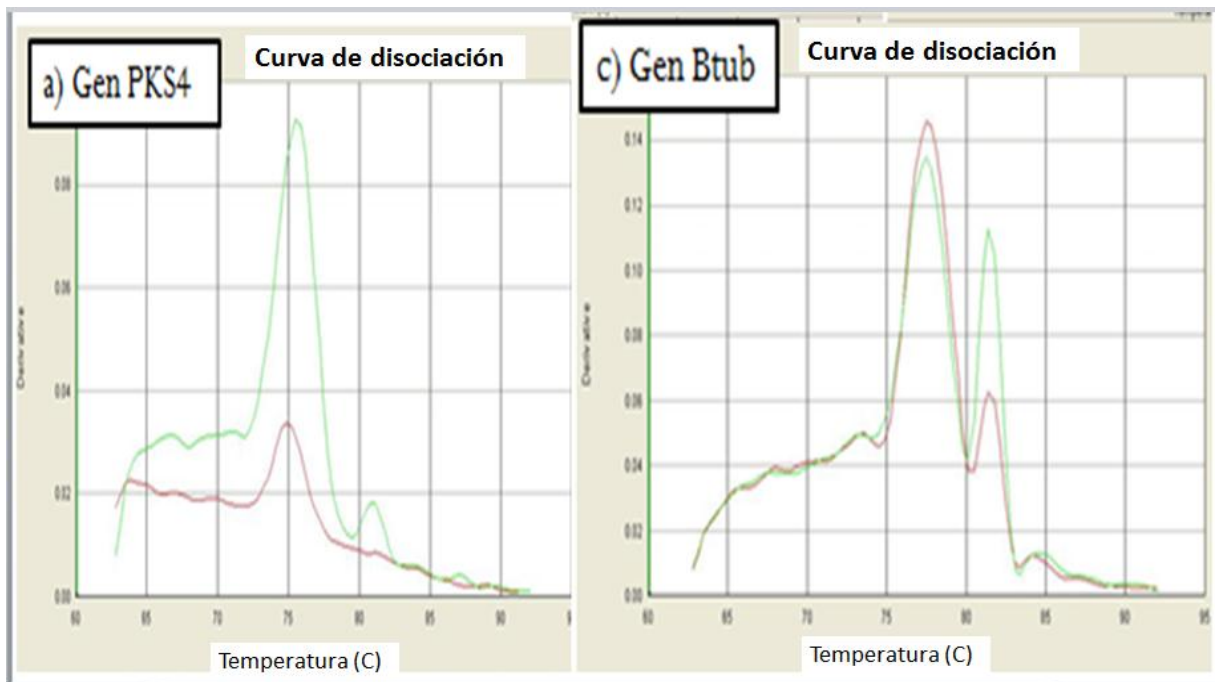


Figura 26. Curvas de disociación de las muestras de trigo de la central de Abasto de la Ciudad de México, con una temperatura de alineamiento a 68°C.

Como estrategia para eliminar dichos dímeros de oligonucleótidos se decidió agregar un paso adicional a la reacción de qPCR, inmediatamente después del paso de alineamiento, como se observa en la Figura 27. Este paso adicional consiste en 31 segundos, y se realizó a diferentes temperaturas, 78 °C, 79 °C y 80 °C. Esto con el fin de que al medir la fluorescencia a una temperatura mayor que la temperatura de disociación de los oligonucleótidos (75.3°C), estos estuvieran disociados, por lo que, el SYBR Green únicamente se unirá al producto deseado; ya que este colorante sólo se une a ADN de doble cadena, y así se evitara la señal de fluorescencia de los dímeros. Jiménez y Montes (2010); observaron también la aparición de un pico entre 72 y 75 °C en la curva de disociación, para evitar la señal de fluorescencia emitida por estos dímeros, la fluorescencia del producto principal fue detectada a 79 °C.

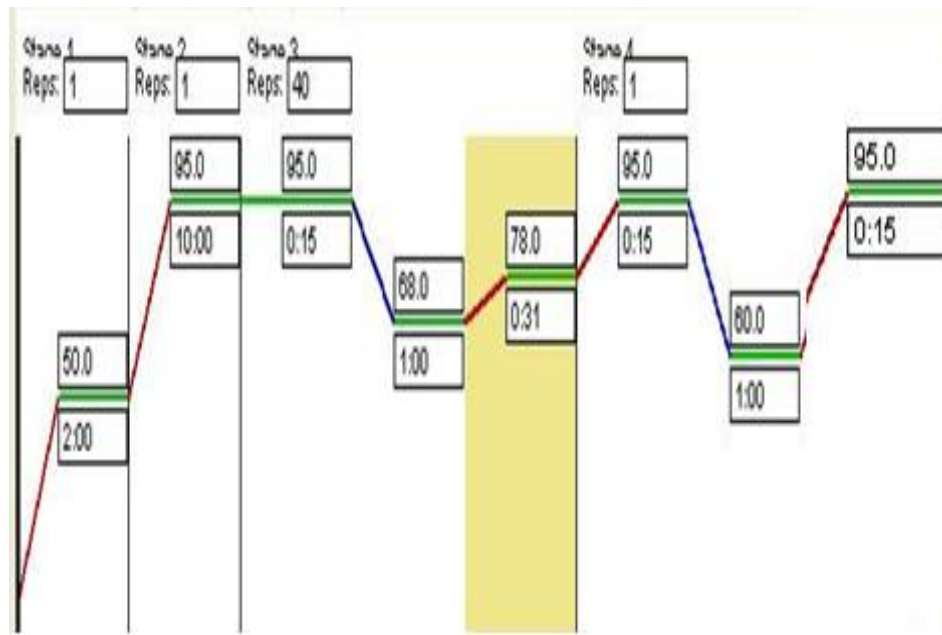


Figura 27. Protocolo de estandarización de qPCR, al cual se le adicionó un paso a diferentes temperaturas durante 31 segundos en el cual fue medida la fluorescencia.

Las curvas de amplificación para el gen PKS4, con el paso adicional descrito previamente, son mostradas en la Figura 28, donde se realizó el qPCR con ADN de trigo control (sin presencia de *F. graminearum*). Dado que se trabajó con ADN de trigo control, se esperaba no tener amplificación para este gen. Tanto en la temperatura de 78 °C y 79 °C, se observaron curvas atípicas de amplificación, similares a las obtenidas por interferencia de dímeros de oligonucleótidos, sin embargo al medir la fluorescencia a la temperatura de 80 °C, no se obtiene amplificación alguna, es decir, los dímeros de oligonucleótidos no interfieren a la intensidad de la fluorescencia. Por lo que la temperatura adecuada para la realización del qPCR, es con una temperatura de alineamiento a 68 °C, y recolectar la fluorescencia a 80 °C durante 32 segundos, a estas condiciones se logra eliminar la interferencia de los dímeros.

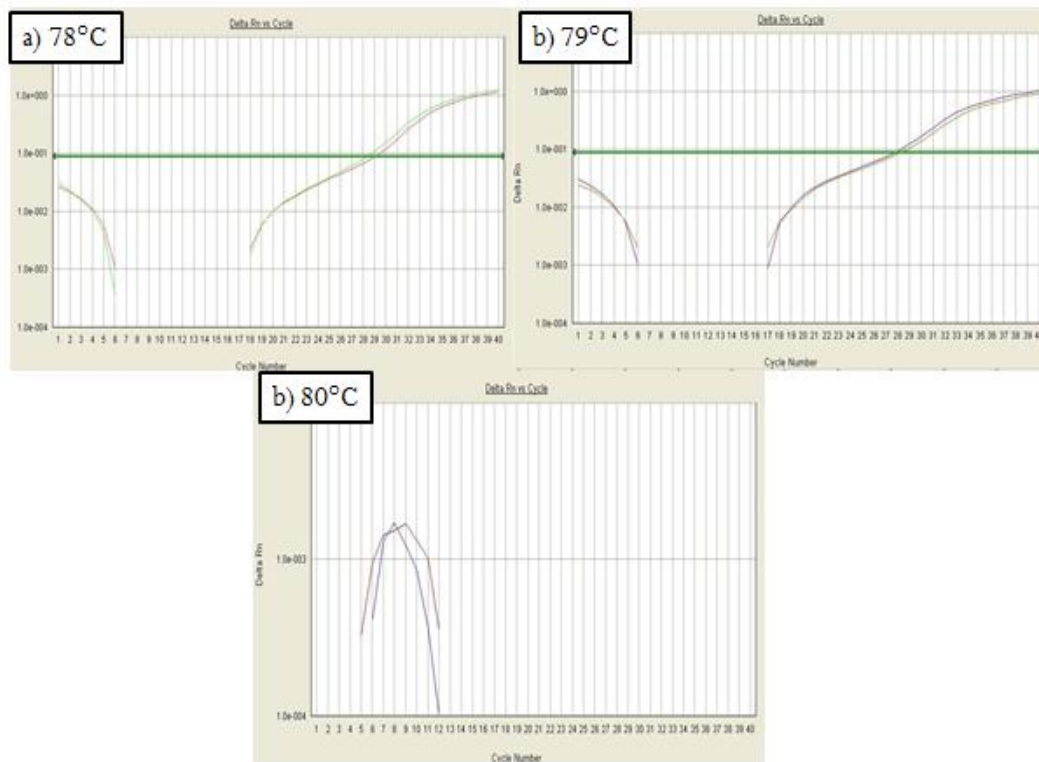


Figura 28. Curvas de amplificación para el gen PKS4 con ADN de trigo control a diferentes temperaturas donde se recolectó la fluorescencia. Condiciones de PCR: 10 minutos a 95 °C. Seguido por 40 ciclos que incluyeron; 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 68 °C, 32 segundos a 78, 79 u 80°C durante el cual fue medida la fluorescencia, seguido de un ciclo de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C y 15 segundos a 95 °C. Cada reacción fue llevada a cabo por triplicado.

Obtenida la temperatura adecuada en la cual no se observa interferencia de dímeros de oligonucleótidos, se procedió a realizar nuevamente las curvas estándar, ya que debido al incremento de temperatura donde se recolecta la fluorescencia, y, por lo tanto el rendimiento y la eficiencia de la reacción se pueden ver afectados.

Las curvas estándar obtenida para el gen PKS4 y  $\beta$ Tub se muestran en la Figura 29. La curva para el gen PKS4 mostró una pendiente de  $m = -3.5$ , lo cual indica una eficiencia de 93.07%; comparando con la curva obtenida sin el paso adicional de 80 °C (Figura 19), la eficiencia aumentó al pasar de 91.29% a 93.07%. En el caso del gen  $\beta$ Tub se

obtuvo una pendiente de  $m=-3.4$ , con una eficiencia de 96.84%, al igual que en el caso del gen PKS4 se observó un aumento en la eficiencia al pasar de 93.07% a 96.84% (Figura 20).

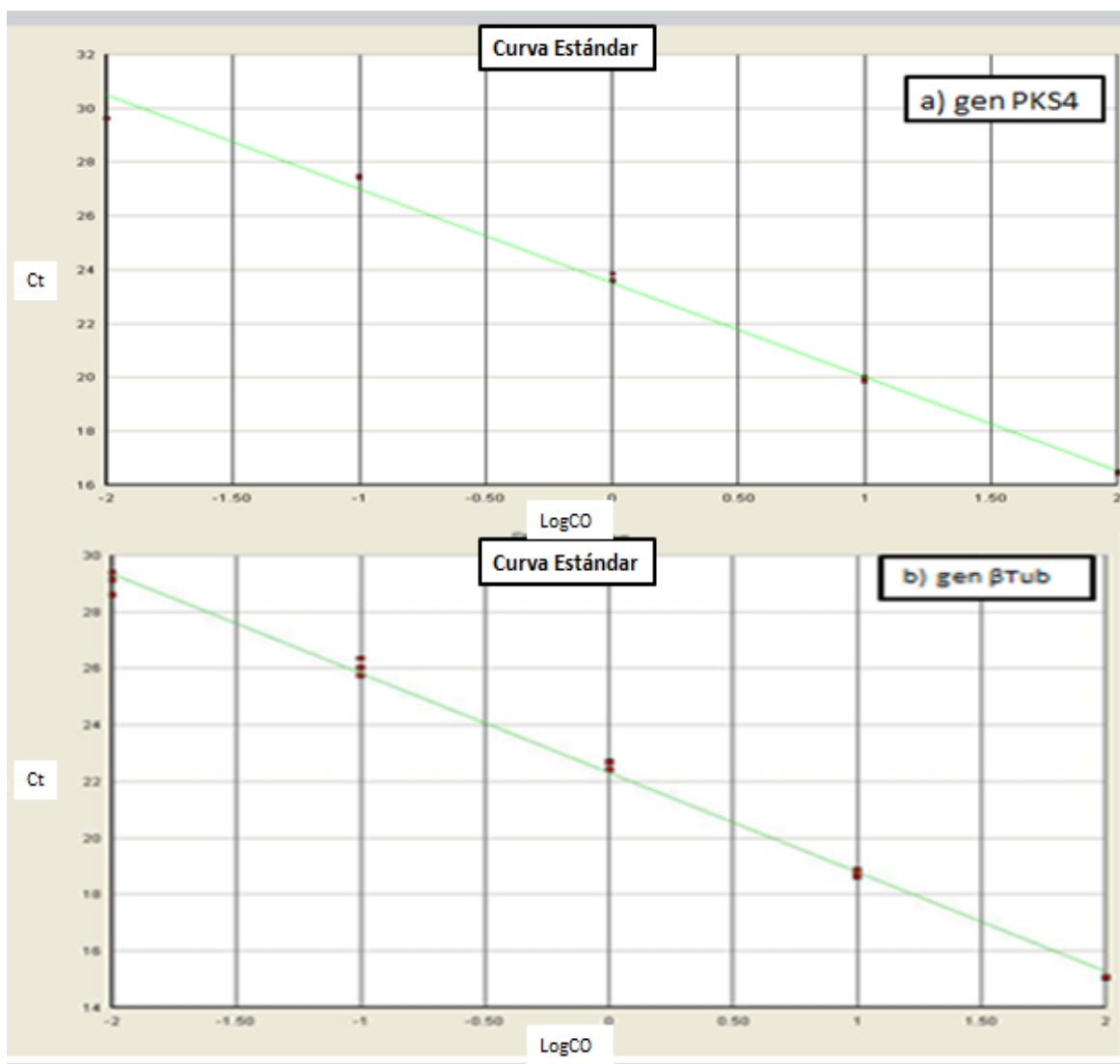


Figura 29. Curva estándar para los genes a) PKS4 y b)  $\beta$ Tub. Condiciones de PCR: 10 minutos a 95 °C. Seguido por 40 ciclos que incluyeron; 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 68 °C, 32 segundos a 80°C durante el cual fue medida la fluorescencia, seguido de un ciclo de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C y 15 segundos a 95 °C. Cada reacción fue llevada a cabo por triplicado.

Observando las curvas de disociación usando este protocolo, se observa que no existe formación de dímeros y/o productos inespecíficos que

puedan interferir en la cuantificación y construcción de la curva estándar (Figura 30).

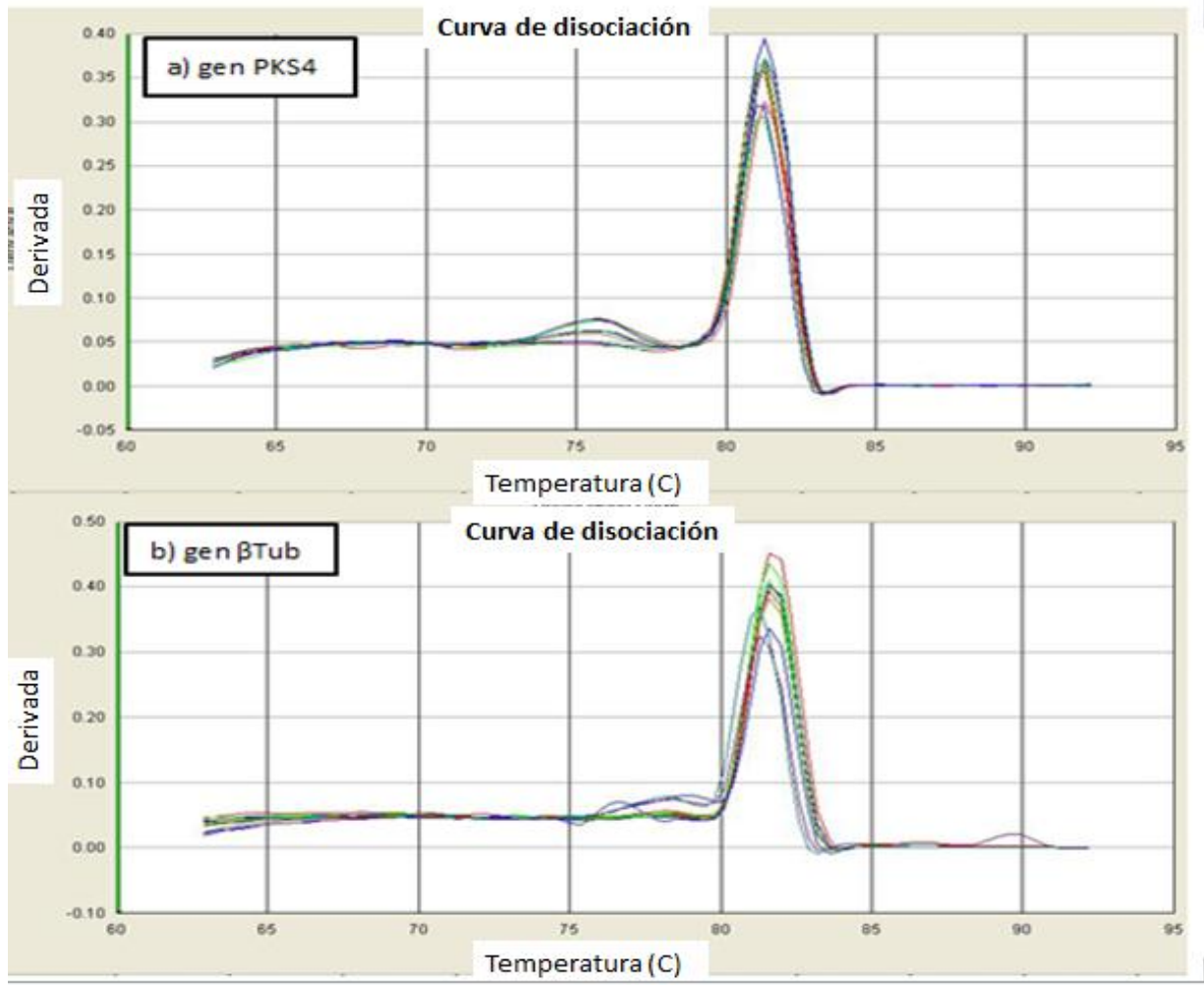


Figura 30. Curva de disociación a) gen PKS4 y b) gen  $\beta$ Tub. Condiciones de PCR: 10 minutos a 95 °C. Seguido por 40 ciclos que incluyeron; 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 68 °C, 32 segundos a 80°C durante el cual fue medida la fluorescencia, seguido de un ciclo de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C y 15 segundos a 95 °C. Cada reacción fue llevada a cabo por triplicado.

A partir de las curvas estándar se calculó la ecuación lineal para ambos genes, en las cuales se interpolaron los Cts obtenidos en las muestras, con el fin de obtener la concentración de ADN presente originalmente en las mismas. Las ecuaciones se muestran en la Tabla 14. La integridad del ajuste de los datos a la línea teórica es descrita por el valor de  $R^2$ . Esta es una medida de la precisión de las diluciones y precisión del

pipeteo (Tevfik, 2006). Ambas curvas presentan un valor de  $R^2$  por arriba de 0.99, por lo que se puede decir que la ecuación lineal se ajusta a los datos y se pueden usar para cálculos posteriores.

Tabla 14. Ecuaciones de las curvas estándar para los dos genes blanco.

Gen blanco	Ecuación de la recta	$R^2$
<b>PKS4</b>	$Ct = -3.5LogCo + 23.514$	0.994
<b><math>\beta</math>Tub</b>	$Ct = -3.4LogCo + 20.98$	0.996

#### 4.5. Límites de detección y cuantificación

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 0.01 ng para ambos genes, que es la cantidad de ADN hasta la cual se logró construir la curva estándar. Considerando que se usan 100 ng de ADN extraído para realizar la qPCR, se pueden detectar 0.1 pg de *F. graminearum* por cada nanogramo de ADN extraído.

El límite de detección 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 A. , Rodríguez, Luque, F. Justesen, & Córdoba, 2011). Para determinar el límite de detección, se elaboró un gel de agarosa al 2% de la reacción de qPCR a diferentes concentraciones. En la Figura 31, se observa que la cantidad que se puede detectar es de 0.001 ng de ADN de *F. graminearum*.

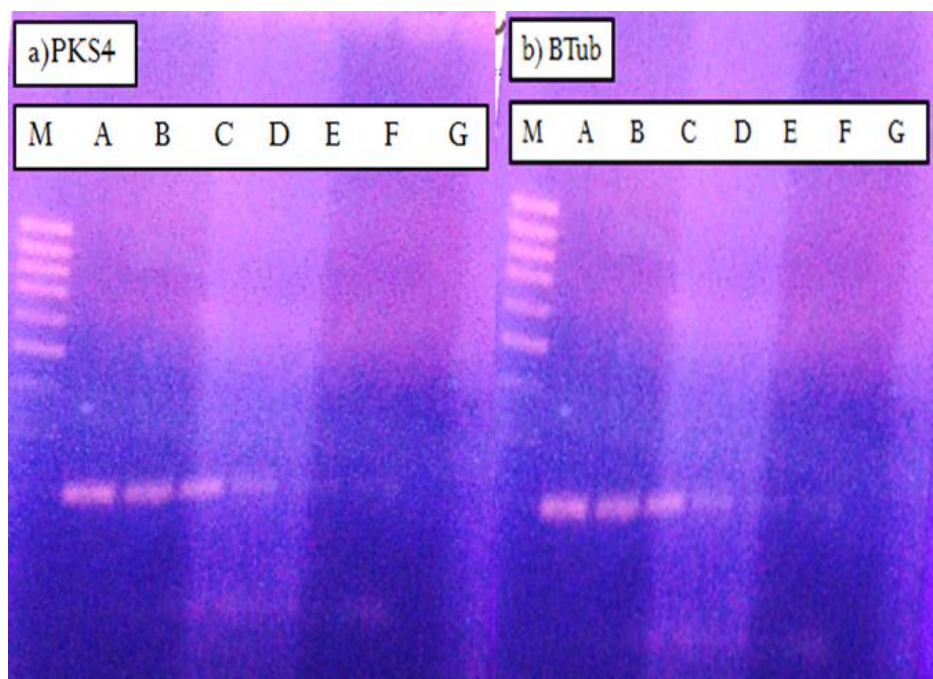


Figura 31. Límite de detección para a) gen PKS4 y b) gen  $\beta$ Tub. M: Marcador de bajo rango (Fermentas), A) 100 ng, B) 10 ng, C) 1 ng, D) 0.1 ng, E) 0.01 ng, F) 0.001 ng y G) 0.0001 ng.

#### 4.6. Interferencia de la matriz alimenticia

Con el fin de establecer si la matriz alimenticia, en este caso el trigo, causaba interferencias que inhibiesen la reacción de qPCR, se realizó una mezcla con 50 ng de ADN de *F. graminearum* junto con 50 ng de ADN de trigo lavado y estéril, y otra solución con 0.1 ng de ADN de *F. graminearum* junto con 100 ng de trigo lavado y estéril. Con las soluciones anteriores, se realizó qPCR.

En la Figura 32 se observa que las curvas de amplificación son curvas típicas y bien definidas, para ambas soluciones y ambos genes. Por lo que se puede concluir que no existe una interferencia por parte de la matriz que pueda afectar o inhibir la reacción.



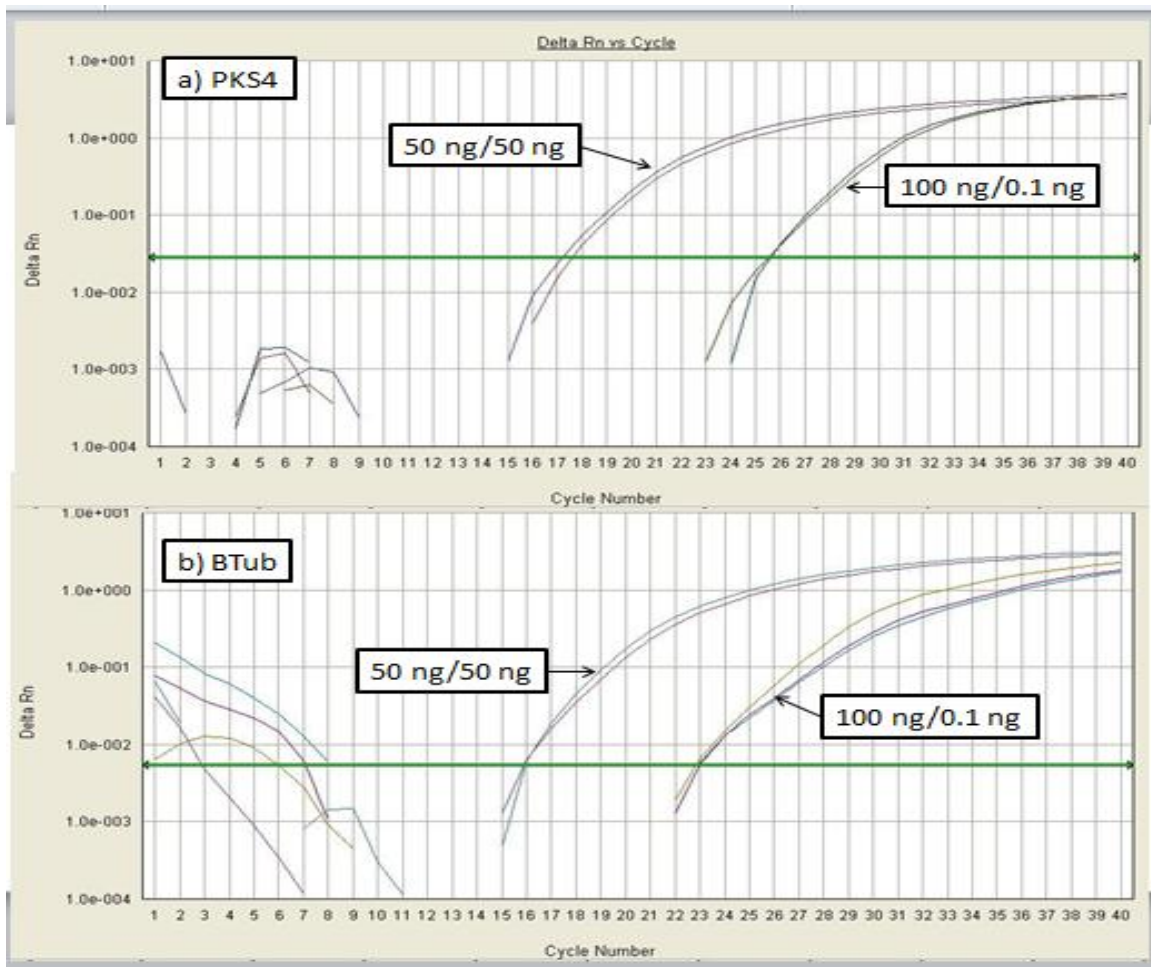


Figura 32. Ensayo para interferencia de la matriz alimentaria. 50 ng de ADN de *F. graminearum* mezclados con 50 ng de trigo lavado y estéril (50 ng/50 ng), y 100 ng de ADN de trigo lavado y estéril mezclado con 0.1 ng de ADN de *F. graminearum* (100 ng/ 1ng).

Con los Cts obtenidos de las curvas de amplificación y usando las ecuaciones de las líneas obtenidas de las curvas estándar, se calculó la concentración experimentalmente, para compararla con la concentración teórica, la cual fue calculada midiendo la absorbancia a 260 nm por medio del programa Gen5 Take3 de BioTek. En la Tabla 15 se muestran los valores obtenidos usando las ecuaciones de las curvas estándar, como se observa, los valores son muy cercanos a los valores teóricos.

Tabla 15. Concentración obtenida experimentalmente de las disoluciones de ADN de *F. graminearum* junto con ADN de trigo lavado y estéril.

Gen PKS4 (Conc. teórica Abs 260 nm)	Ct	Conc. Exp. (ng de ADN <i>F.</i> <i>graminearum</i> en la reacción)	Gen $\beta$ Tub (Conc. teórica Abs 260 nm)	Ct	Conc. Exp. (ng de ADN <i>F.</i> <i>graminearum</i> en la reacción)
<b>50 ng/ 50 ng</b>	17.41±0.454	56.66±2.65	50 ng/ 50 ng	15.25±0.346	47.35±1.35
<b>100 ng/ 0.1 ng</b>	26.73±0.272	0.119±0.007	100 ng/ 0.1 ng	23.96±0.130	0.135±0.006

#### 4.7. Muestras de trigo para consumo humano de la Central de Abasto de la Ciudad de México

Se analizaron 5 muestras de la Central de Abasto de la Ciudad de México. Se realizó la extracción de ADN con el kit FastID, y se usaron 100 ng de ADN extraído para realizar el qPCR con la metodología descrita anteriormente, así mismo se colocó un control positivo durante la PCR, la cual contenía 100 ng de *F. graminearum*.

Las curvas de amplificación se muestran en la Figura 33, se observa que las señales para las muestras aparecen en ciclos por arriba de 30, y no cruzan la línea base, por lo que; se consideran negativas para ambos genes.

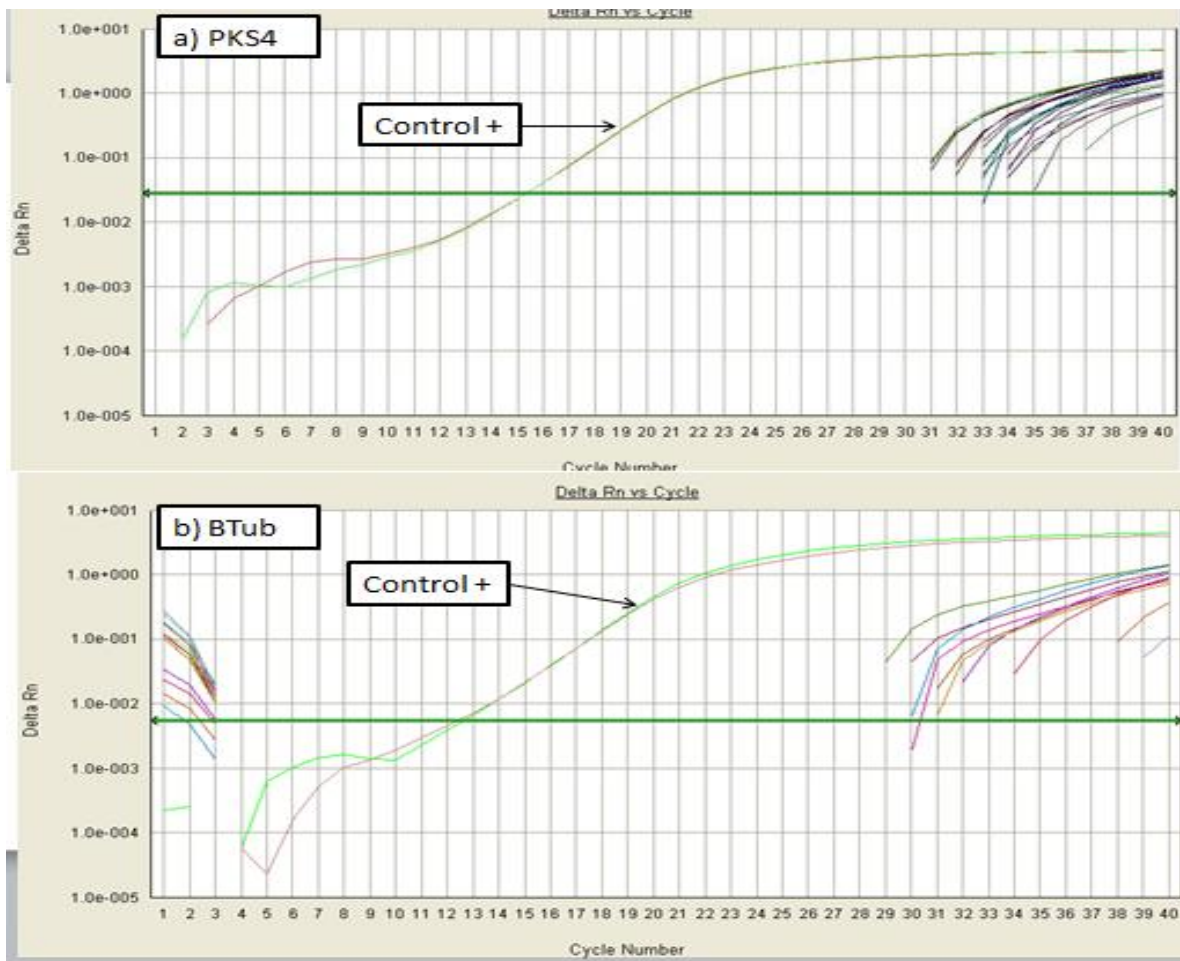


Figura 33. Curvas de amplificación para muestras de trigo para consumo humano de la Central de Abasto de la Ciudad de México, a) gen PKS4 y b) gen  $\beta$ Tub. Condiciones de PCR: 10 minutos a 95 °C. Seguido por 40 ciclos que incluyeron; 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 68 °C, 32 segundos a 80°C durante el cual fue medida la fluorescencia, seguido de un ciclo de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C y 15 segundos a 95 °C. Cada reacción fue llevada a cabo por triplicado.

Para confirmar las reacciones positivas y negativas, el análisis de la curva de fluorescencia sin escala semilogarítmica es de mucha ayuda, ya que permite distinguir qué reacciones presentan amplificación y cuáles no. En la Figura 34 se muestra un ejemplo de este tipo de curvas.

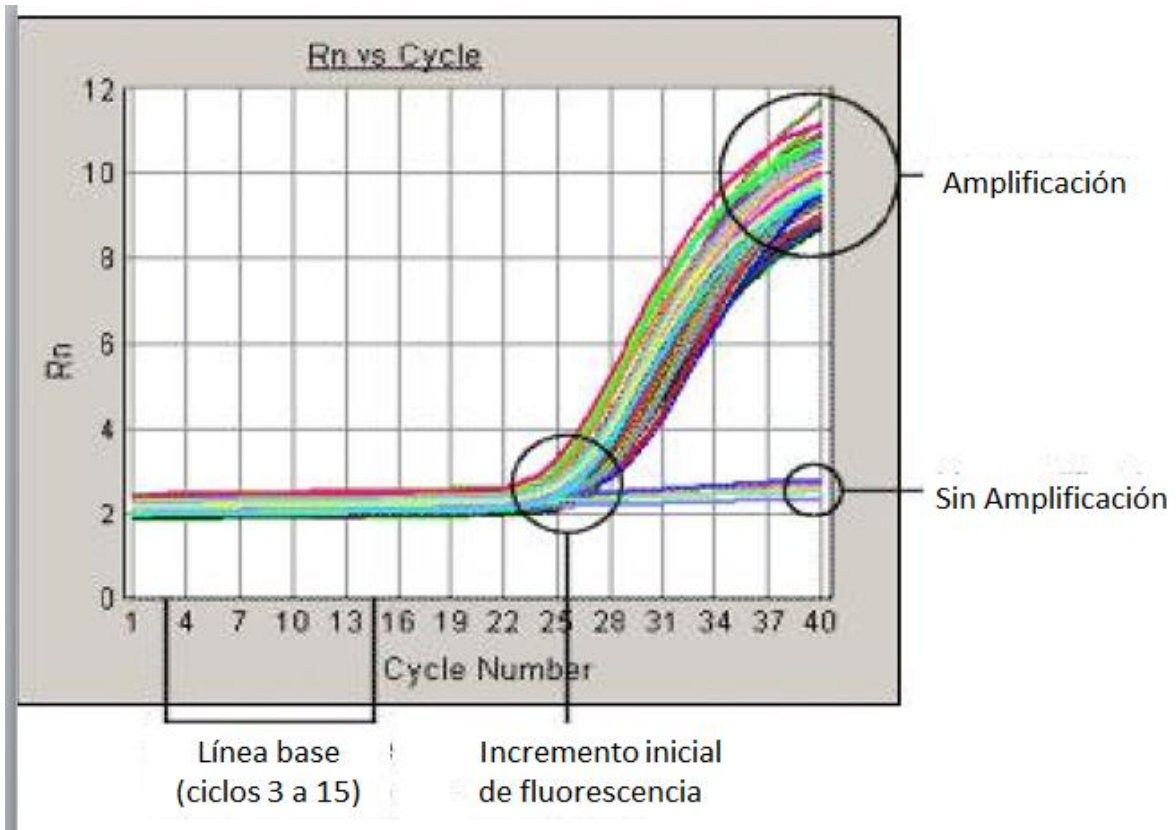


Figura 34. Ejemplo de curva de fluorescencia sin escala logarítmica, la cual permite distinguir cuando existe amplificación o no.

Confirmando la reacción negativa para ambos genes se presenta la curva de fluorescencia sin escala semilogarítmica (Figura 35), donde se observa claramente, la diferencia de la curvas del control positivo respecto a las curvas de las muestras, las cuales no presentan una curva típica y se presentan en ciclos tardíos.

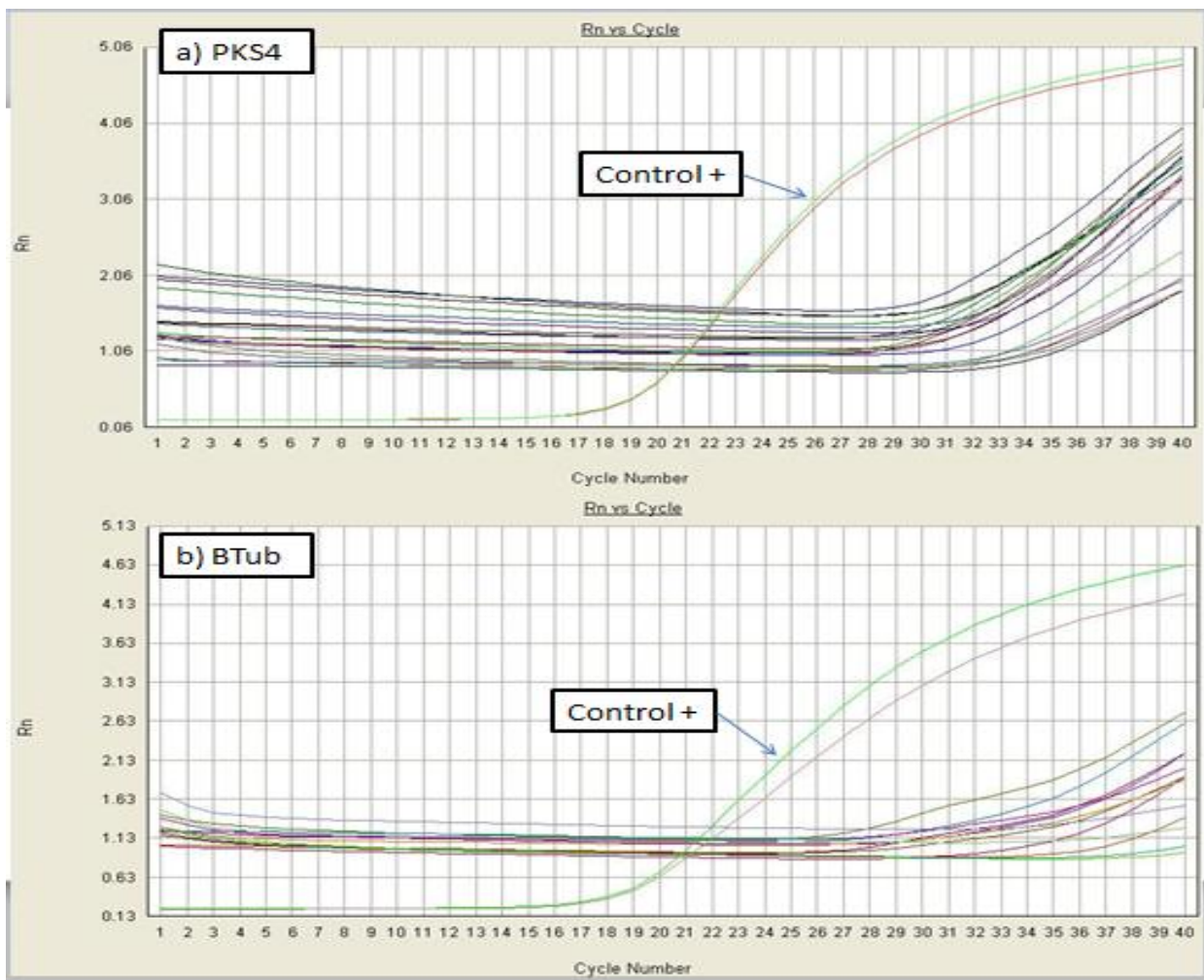


Figura 35. Fluorescencia en crudo para muestras de trigo para consumo humano de la Central de Abasto de la Ciudad de México. a) Gen PKS4, y b) Gen  $\beta$ Tub. Condiciones de PCR: 10 minutos a 95 °C. Seguido por 40 ciclos que incluyeron; 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 68 °C, 32 segundos a 80°C durante el cual fue medida la fluorescencia, seguido de un ciclo de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C y 15 segundos a 95 °C. Cada reacción fue llevada a cabo por triplicado.

Estudios previos sobre la incidencia de *F. graminearum*, y sus toxinas, en la Ciudad de México han demostrado la presencia de este hongo en la Ciudad de México. González-Osnaya & Farrés (2011), llevaron a cabo la detección y cuantificación de *F. graminearum* en trigo mediante PCR punto final usando como genes blanco Tri5, el cual está involucrado en la biosíntesis de la micotoxina deoxinivalenol (DON); y el gen PKS4. La

PCR indicó la presencia del gen Tri5 y PKS4 en 16.7% y 23.3% de las muestras, respectivamente.

En otro estudio realizado en el estado de Tlaxcala, Briones-Reyes & colaboradores (2007) detectaron y cuantificaron la micotoxina ZEA mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) en 24 muestras de maíz. El 70% de las muestras analizadas presentaban contaminación de ZEA, con niveles dentro de 3 a 83 µg/ kg de maíz. El no detectar *F. graminearum* en las muestras analizadas en el presente estudio, se debe a que la presencia, desarrollo y proliferación de este hongo depende de las condiciones de almacenamiento, de las condiciones climáticas y de la región en el momento en que son recolectadas las muestras.

Zhang & colaboradores (2007) estudiaron la incidencia de *F. graminearum* productor de deoxinivalenol en diferentes regiones de China, así como en diferentes épocas del año; encontrando que la mayor incidencia se encontró en las regiones más frías, con temperaturas por debajo de 15°C o menos, y en épocas del año húmedas y con lluvias; también encontraron que la producción de la micotoxina se ve influenciada por las condiciones climáticas, ya que se producía más micotoxina en temperaturas mayores a 35 °C y menores a 15 °C . Por lo que se debe llevar a cabo un análisis de un mayor número de muestras durante diferentes épocas del año.

#### **4.8. Muestras artificialmente contaminadas**

Dado que en las muestras obtenidas de la Central de Abasto de la Ciudad de México no se detectó contaminación por *F. graminearum* y con el fin de comprobar la efectividad de la metodología desarrollada en identificar y cuantificar este hongo, se inoculó una muestra de trigo artificialmente como se describe en el apartado 3.8. A continuación se muestran los resultados de dicha inoculación.

#### 4.8.1. Muestras artificialmente inoculadas e incubadas

Después de 6 semanas de incubación se observó micelio en los matraces, excepto en el matraz control y el inoculado con 1 UFC (Figura 36).

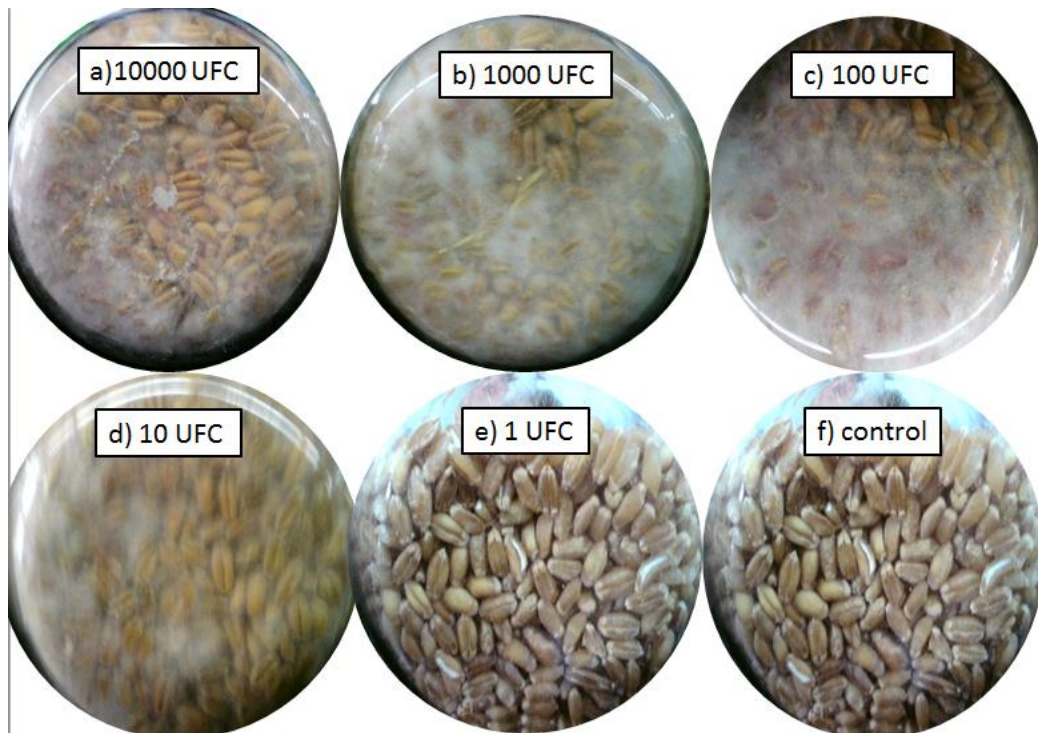


Figura 36. Trigo inoculado con esporas de *F. graminearum* (F40) e incubado durante 6 semanas a 29 °C.

Se realizó la extracción de ADN con el kit FastID a las muestras artificialmente contaminadas y se realizó PCR punto final para cada gen. Se elaboró un gel de agarosa al 2% del PCR punto final para observar la presencia o ausencia del producto deseado (Figura 37). No se obtuvo producto para el control negativo, ni en el caso de 1 UFC, este último debido a la baja concentración de ADN de *F. graminearum* en la muestra; a partir de 10 UFC inoculadas e incubadas si se observa producto para ambos genes.

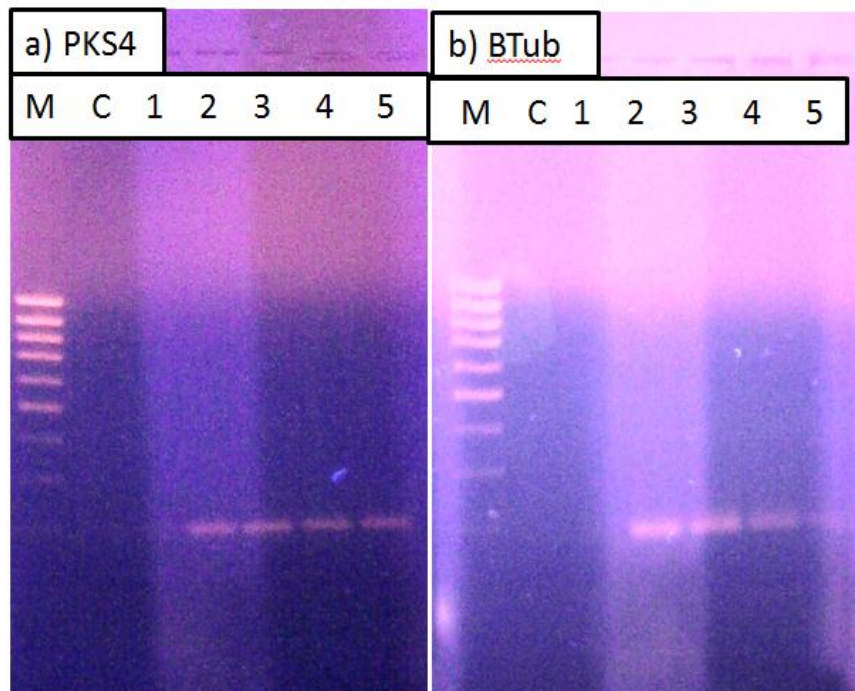


Figura 37. Gel de agarosa al 2% de reacción de PCR punto final para ADN de trigo incubado durante 6 semanas. M.- marcador de bajo peso molecular (Fermentas). C.- control de trigo. 1.- 1 UFC. 2.-10 UFC. 3.- 100 UFC. 4.-1000 UFC. 5.-10000 UFC.

Respecto al qPCR, se observa en la Figura 38 la gráfica de amplificación de las muestras inoculadas e incubadas. A partir de la concentración de 10 UFC inoculadas e incubadas, y concentraciones más altas a ésta, se observó una amplificación en ciclos muy tempranos para ambos genes; para el caso de 1 UFC se observó una amplificación en un ciclo más tardío (23 para  $\beta$ TUB y 25 para PKS4) (Tabla 16).



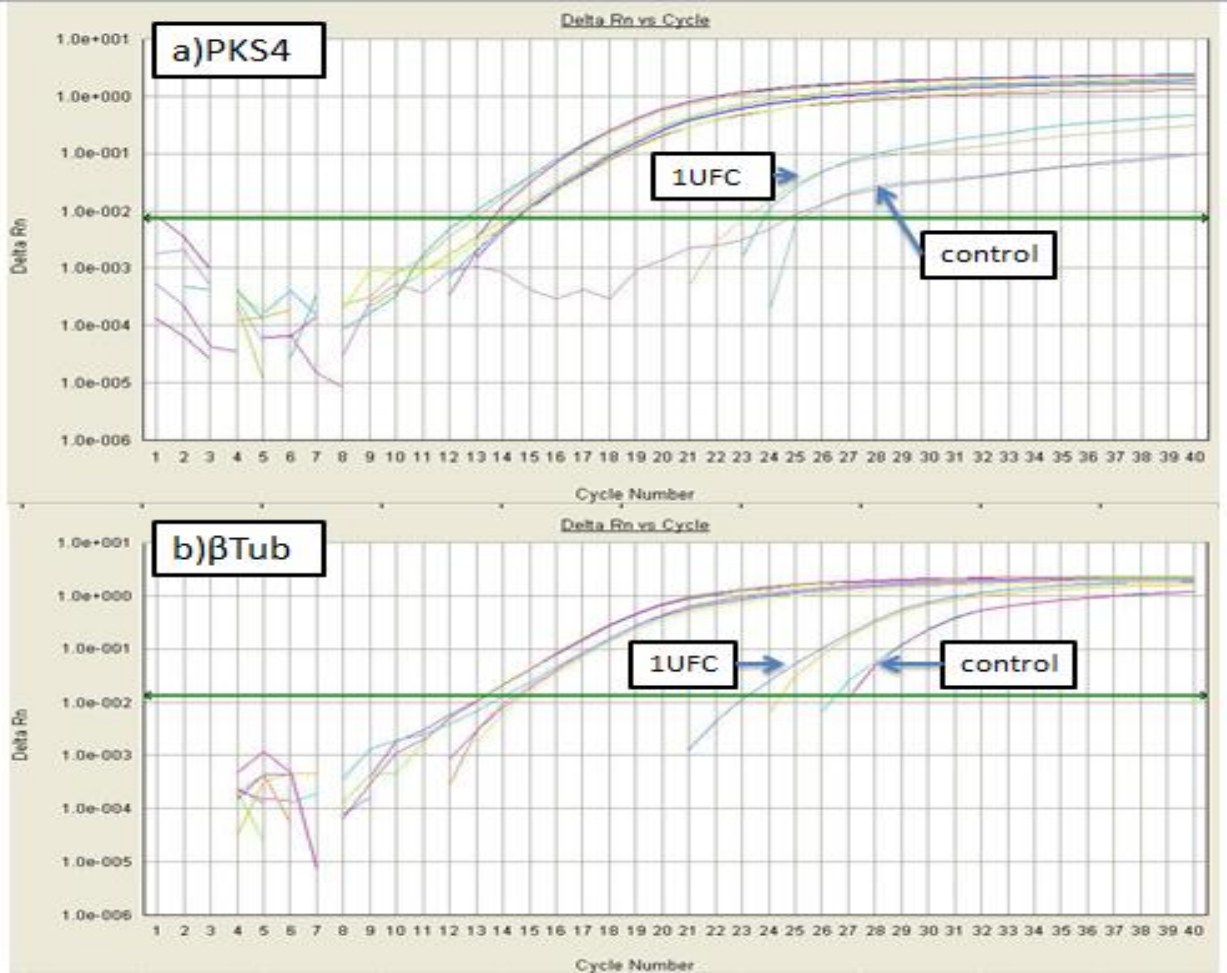


Figura 38. Curvas de amplificación para ADN de trigo inoculado e incubado durante 6 semanas.

Analizando la curva de fluorescencia sin escala logarítmica del matraz control, se observa que no hubo un incremento de la fluorescencia respecto a las demás concentraciones (Figura 39), por lo que se considera negativa esta reacción para ambos genes.

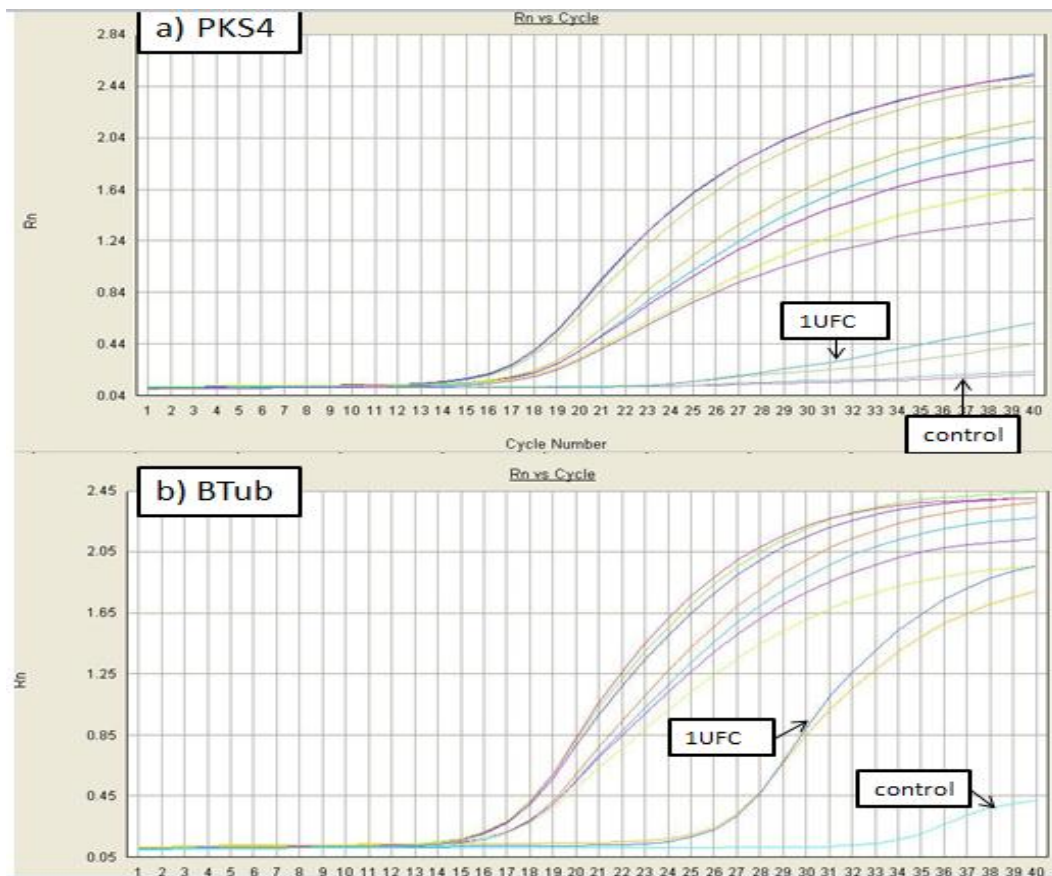


Figura 39. Fluorescencia en crudo para ADN de trigo inoculado e incubado para a) gen PKS4 y b) gen  $\beta$ Tub.

Con los Cts obtenidos de la reacción de tiempo real para las diferentes concentraciones inoculadas e incubadas, y con las ecuaciones de las curvas estándar (Tabla 14) se calculó la cantidad de *F. graminearum* por gramo de trigo, los cuales se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Concentración de ADN de *F. graminearum* en trigo inoculado e incubado durante 6 semanas para los dos genes blanco.

<i>F. graminearum</i> (UFC)	Ct (PKS4)	Concentración PKS4 ( $\mu\text{g/g}$ trigo)	Ct ( $\beta$ Tub)	Concentración $\beta$ Tub ( $\mu\text{g/g}$ trigo)
<b>10000</b>	16.30 $\pm$ 0.107	43.98 $\pm$ 3.08	13.68 $\pm$ 0.238	50.86 $\pm$ 8.2
<b>1000</b>	16.05 $\pm$ 0.103	68.63 $\pm$	12.98 $\pm$ 0.595	111.01 $\pm$ 11.34
<b>100</b>	14.65 $\pm$ 0.302	332.64 $\pm$ 64.9	12.10 $\pm$ 0.104	402.41 $\pm$ 29.7
<b>10</b>	15.4 $\pm$ 1.17	156.03 $\pm$ 11.26	12.01 $\pm$ 0.174	265.66 $\pm$ 30.28
<b>1</b>	25.01 $\pm$ 0.140	0.268 $\pm$ 0.025	23.03 $\pm$ 1.245	0.214 $\pm$ 0.014

Como era de esperarse, la concentración de 1 UFC incubada es la que muestra una concentración de  $\mu\text{g}$  de ADN de *F. graminearum*/g de trigo menor respecto a los demás inóculos.

#### 4.8.2. Muestras artificialmente inoculadas sin incubar

Se realizó la extracción de ADN de las muestras inmediatamente después de la inoculación con el kit FastID, y se realizó el PCR punto final con 100 ng del ADN extraído. Posteriormente, se realizaron geles de agarosa al 2% (Figura 40) y en ninguna de las muestras se observó producto para ambos genes.

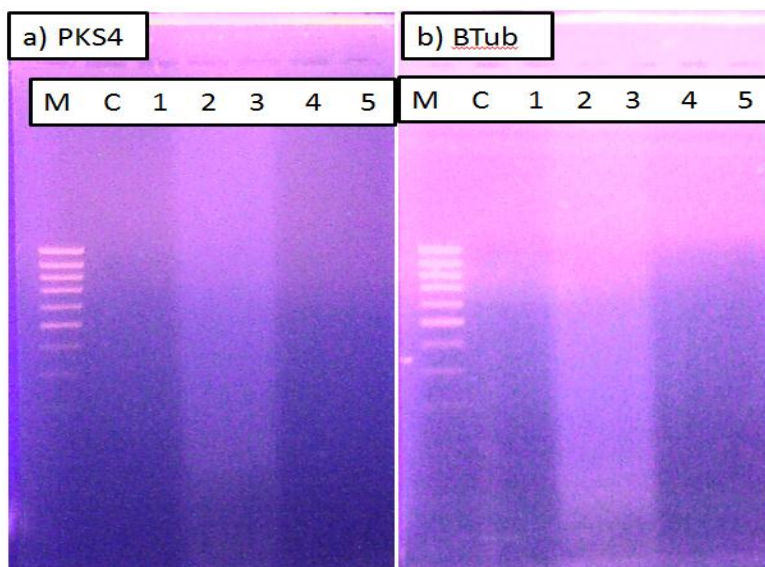


Figura 40. Gel de agarosa al 2% de reacción de PCR punto final para ADN de trigo inoculado sin incubar. M.- marcador de bajo peso molecular (Fermentas). C.- control de trigo. 1.- 1 UFC. 2.-10 UFC. 3.- 100 UFC. 4.-1000 UFC. 5.-10000 UFC.

En el caso de la qPCR, las curvas de amplificación (Figura 41) muestran una amplificación en ciclos ya tardíos, y al analizar las gráficas de fluorescencia sin escala semilogarítmica (Figura 42) se observan curvas atípicas y en ciclos posteriores a 30, por lo que, se consideran como negativas.

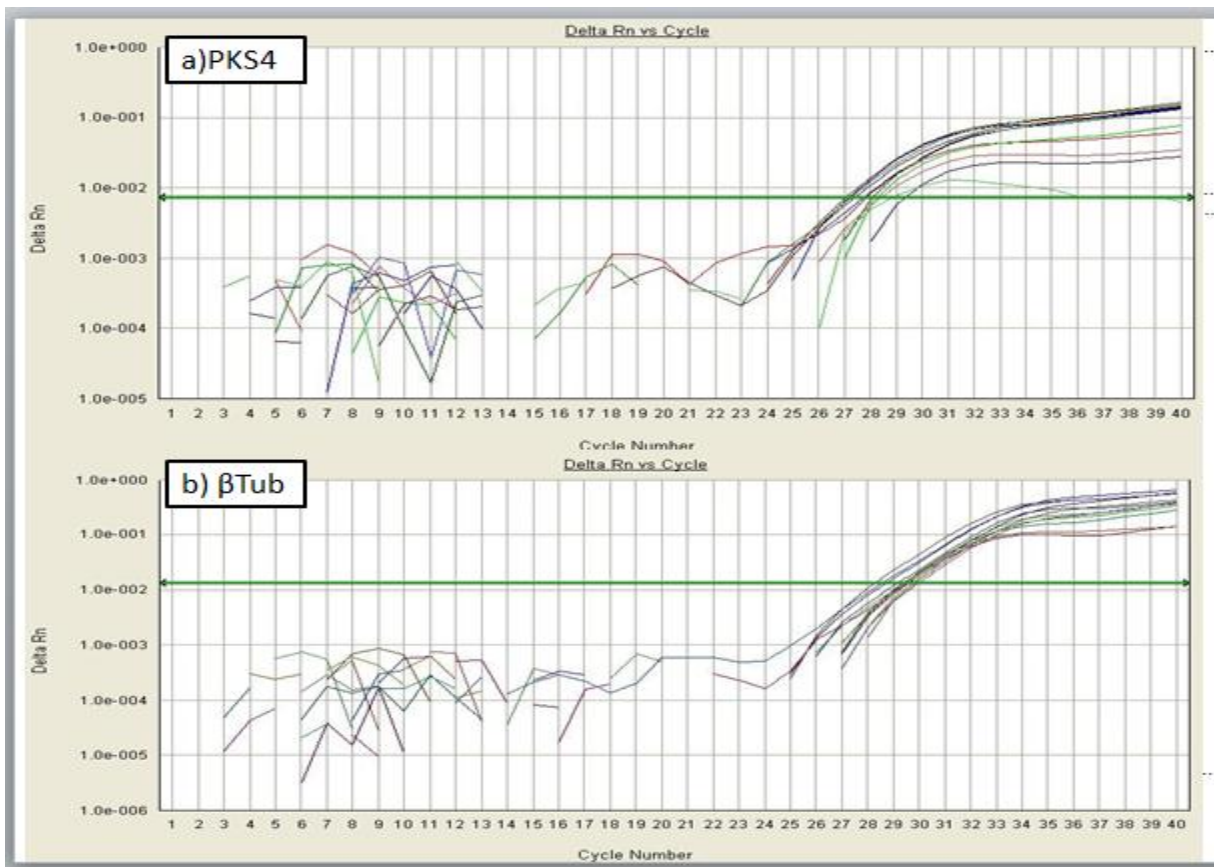


Figura 41. Curvas de amplificación para ADN de trigo inoculado sin incubar para ambos genes.

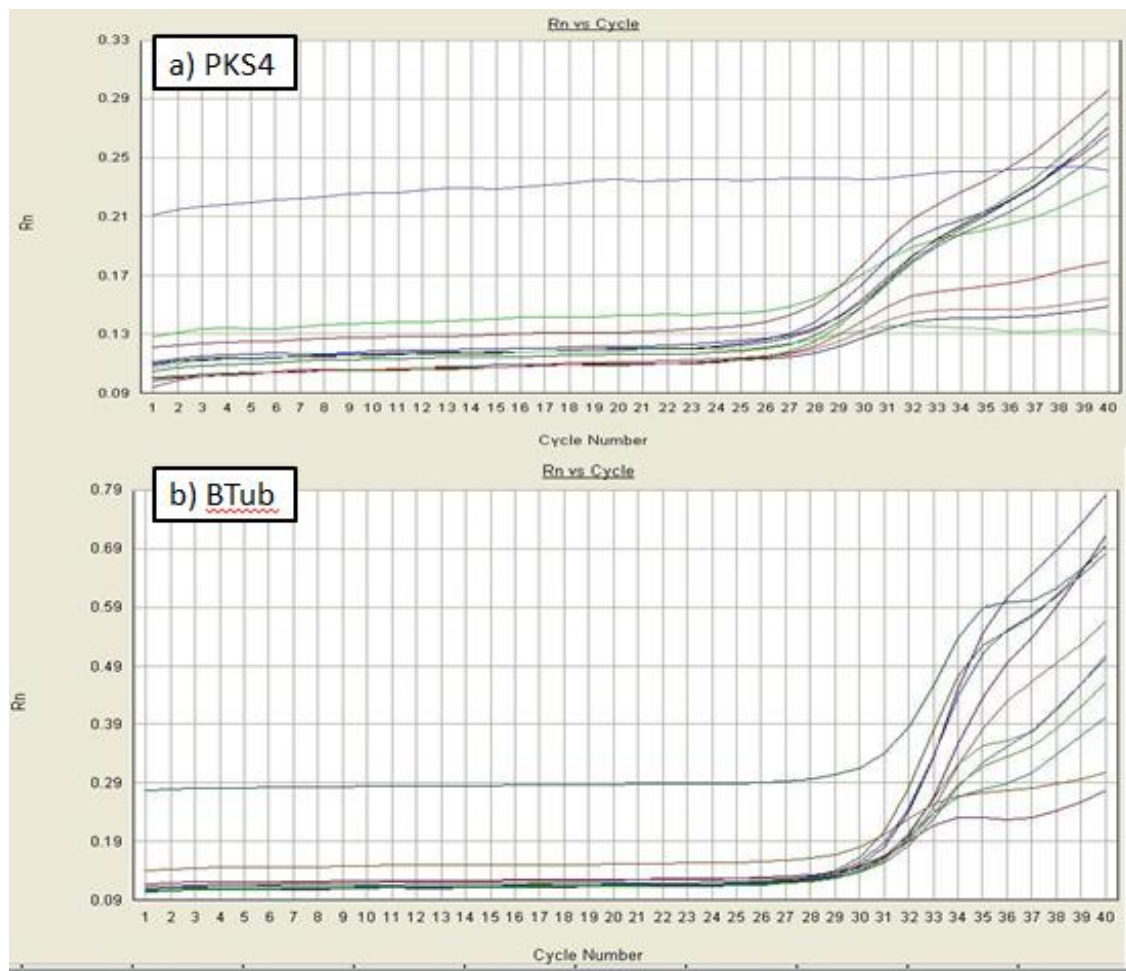


Figura 42. Fluorescencia en crudo para ADN de trigo inoculado sin incubar para a) gen PKs4 y b) gen  $\beta$ Tub.

#### 4.9. Comparación de métodos de extracción: FastID y método convencional

Debido a que no se obtuvo producto en las muestras inoculadas sin incubar, tanto en el caso del PCR punto final y qPCR; se pensó que el método de extracción usado, kit FastID, no era el adecuado o era ineficiente. Para comprobar esta hipótesis, se decidió realizar la extracción de ADN de esporas, usando el kit FastID y el método utilizado previamente por González-Osnaya & Farrés (2011), con este último en

el presente trabajo si se logró obtener un alto rendimiento de extracción de ADN a partir de micelio de *F. graminearum*.

Se realizaron diluciones de la suspensión de esporas, para realizar la extracción de  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  y 10 esporas. Posteriormente se realizó la qPCR para ambos genes. En la Figura 43, se muestran las curvas de amplificación para el gen PKS4 para ambos métodos. Como se observa, únicamente para el caso de la concentración de  $10^6$  esporas se observa una curva en ciclos típica y bien definida de amplificación cuando se usó el kit FastID para la extracción.

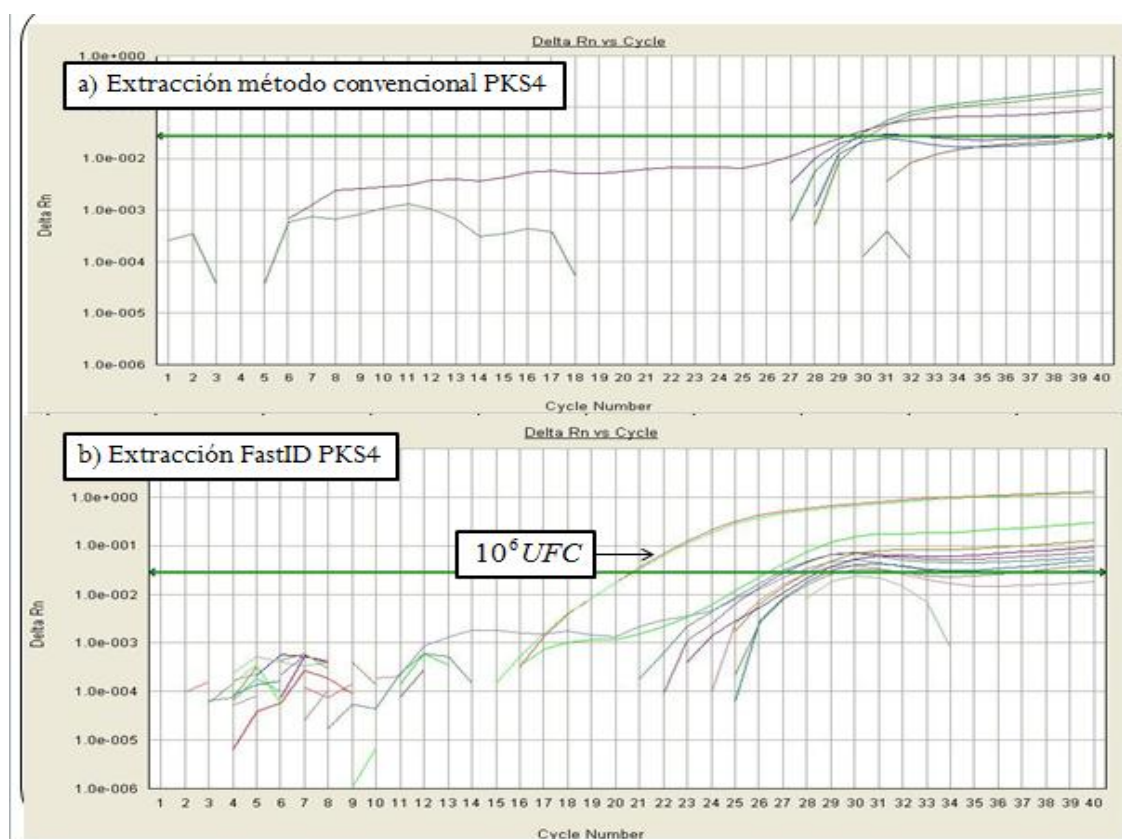


Figura 43. Curvas de amplificación de extracción de esporas para el gen PKS4, usando a) método convencional y b) kit FastID.

Esta misma situación se presenta en el caso del gen de  $\beta$ Tub, donde únicamente se observa una amplificación clara para la concentración de

10<sup>6</sup> esporas usando como método de extracción el kit de FastID (Figura 44).

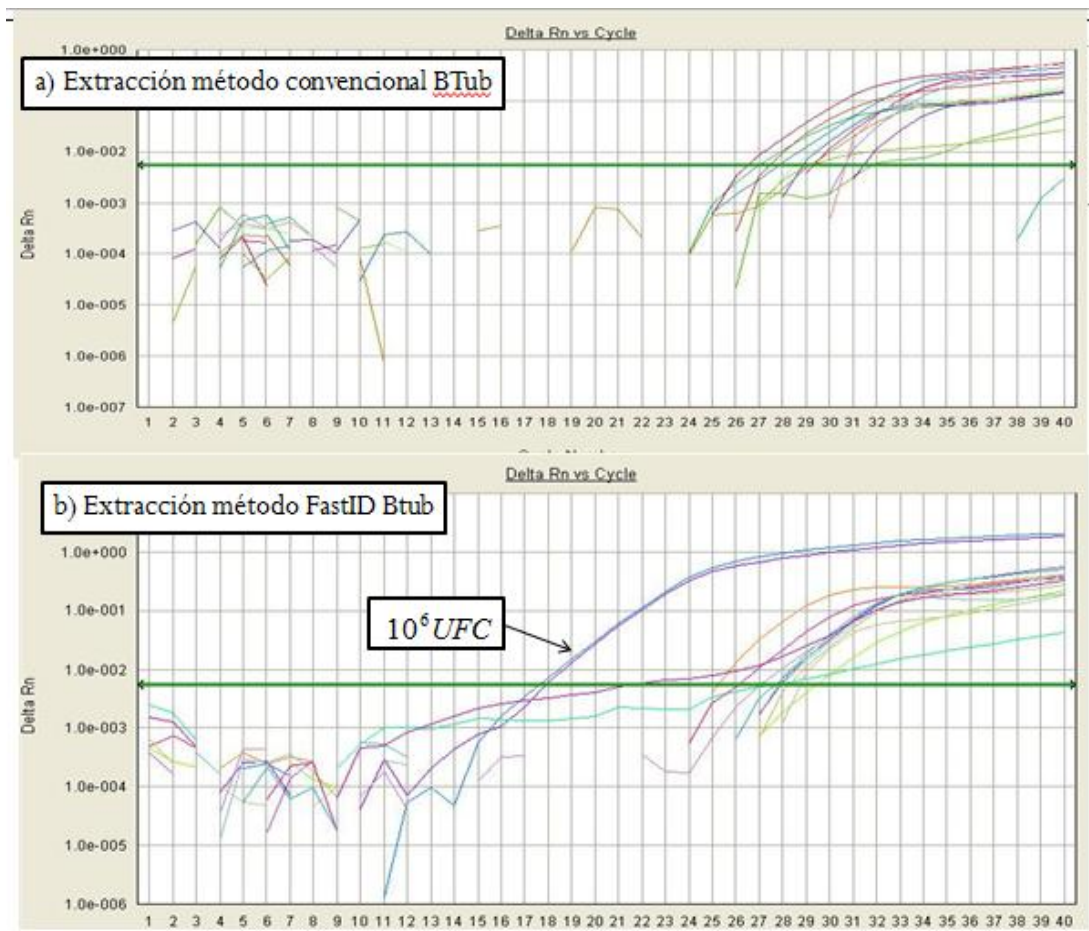


Figura 44. Curvas de amplificación de extracción de esporas para el gen  $\beta$ Tub, usando a) método convencional y b) kit FastID.

Observando la fluorescencia sin escala semilogarítmica, se confirma que la única reacción positiva es la de 10<sup>6</sup> esporas para ambos genes usando el kit FastID (Figura 45).

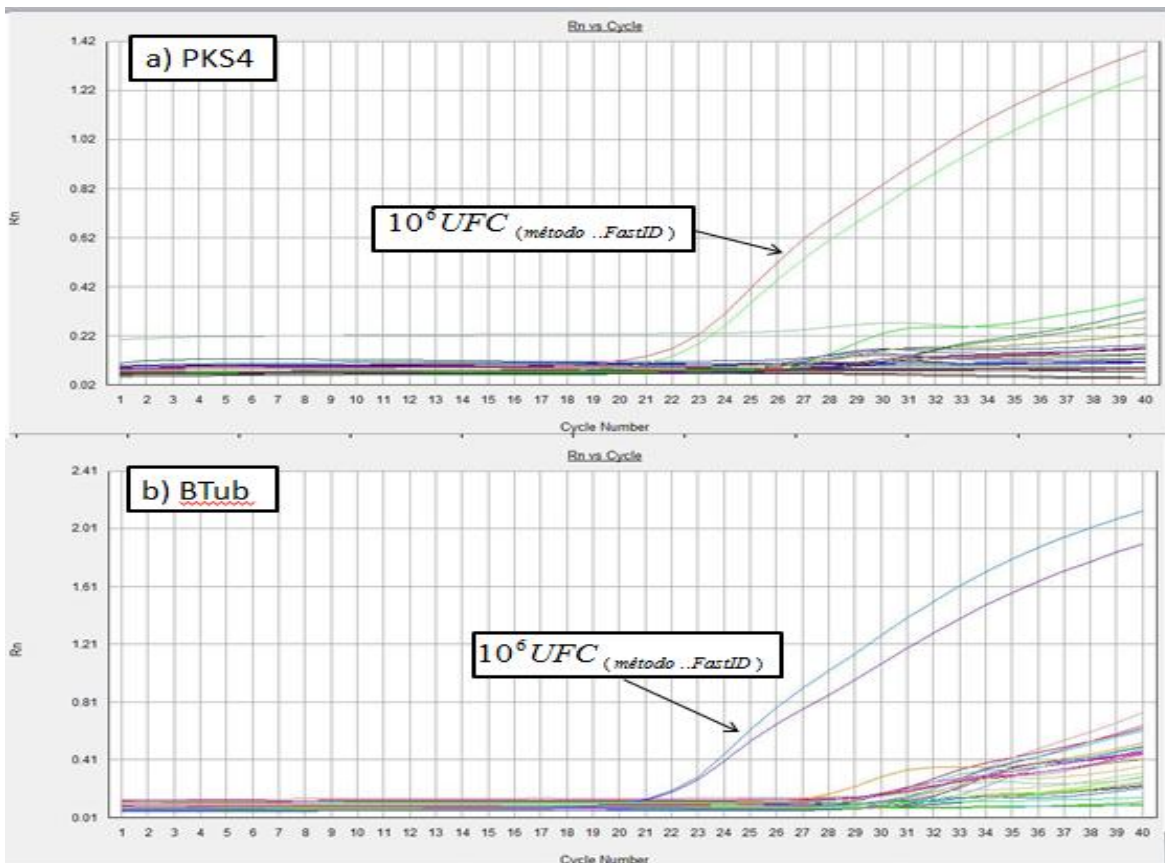


Figura 45. Fluorescencia en crudo para los dos métodos de extracción usados, a) gen PKS4 y b) gen  $\beta$ Tub.

Con los resultados anteriormente expuestos, el kit FastID es el que presentó una mayor eficiencia de extracción en comparación con la metodología convencional. Mediante las ecuaciones obtenidas de las curvas estándar, se calculó que una concentración de  $10^6$  esporas equivaldría a  $36.41 \pm 6.2$  ng de ADN de *F. graminearum*/g de trigo para el gen  $\beta$ Tub y  $26.51 \pm 1.36$  ng de ADN de *F. graminearum*/g de trigo para el gen PKS4. Esto indica que a pesar de que el límite de cuantificación de la metodología diseñada y estandarizada de qPCR es de 0.01 ng, la metodología usada para extracción de ADN de la muestra de trigo solo nos permitirá cuantificar contaminaciones por arriba de  $10^6$  esporas. Esto se puede deber a la alta resistencia de las esporas a condiciones adversas, lo cual dificulta su ruptura y como consecuencia a la extracción de su ADN.



## 5. Conclusiones

- Se estandarizaron las técnicas de PCR punto final y qPCR, los cuales permitirán detectar y cuantificar *F. graminearum* en muestras de trigo en un límite de detección de 0.1 pg de *F. graminearum* por cada nanogrammo de ADN extraído.
- La metodología de PCR punto final estandarizada es: 5 minutos de desnaturalización a 95 °C, seguido por 35 ciclos que incluyeron 1 minuto de desnaturalización a 95 °C, 50 segundos a 67.3 °C para alineamiento de oligonucleótidos; 1 minuto de extensión a 72 °C seguido por una extensión final de 10 minutos a 72 °C.
- La metodología de qPCR para la detección del gen PKS4 mediante el siguiente protocolo: 10 minutos a 95 °C; seguido por 40 ciclos que incluyeron, 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C, 32 segundos a 80 °C durante, el cual resulta ser un paso crucial ya que en este punto es recolectada la fluorescencia para evitar la interferencia en la cuantificación de los dímeros de oligonucleótidos; seguido de un ciclo de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C y 15 segundos a 95 °C, el cual permitió detectar *F. graminearum* en muestras artificialmente contaminadas.
- Con estos métodos rápidos y sencillos se podrá detectar y cuantificar *F. graminearum*, lo que permitirá un control y prevención en la seguridad alimentaria, evitando los daños que éste pudiera causar.
- El análisis de los datos obtenidos de qPCR, se debe realizar analizando diversos parámetros, tales como curvas de disociación, curvas de amplificación y curvas de amplificación en escala semilogarítmica; lo cual nos llevara a un análisis correcto y más amplio.

## 6. Perspectivas

- Realizar el análisis de un número representativo de muestras de trigo para consumo humano de la Central de Abasto de la Ciudad de México, para determinar la incidencia de *F. graminearum* en la Ciudad de México.
- Realizar un muestreo durante todo el año, ya que el desarrollo y proliferación de *F. graminearum* dependerá de las condiciones climáticas.
- Estandarizar una metodología de extracción de ADN de muestras de trigo que permita detectar y cuantificar concentraciones más bajas que  $10^6$  esporas de *F. graminearum*.
- Evaluar el uso de la química de TaqMan para la cuantificación por qPCR.

## 7. Bibliografía

- Alfonso, D., & Perea, S. (Abril de 2011). *Agrocabildo Tenerife*. Recuperado el 5 de Mayo de 2012, de Servicio Técnico de Agricultura y Desarrollo Rural. Área de Agricultura, Ganadería, Pesca y Aguas:  
[http://www.agrocabildo.org/publica/Publicaciones/otro\\_263\\_T\\_PLA\\_ENFER\\_TRIGO\\_2010.pdf](http://www.agrocabildo.org/publica/Publicaciones/otro_263_T_PLA_ENFER_TRIGO_2010.pdf)
- 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. México*: Instituto Nacional de Ecología.
- Bacha, H., Hadidane, R., Ellouz, F., & Creppy, E. (1993). Effects of zearalenone on fertilization and digestion in rats. En C. S. Laboratory., *Occurrence and Significance of Mycotoxins* (págs. 252-628). London: Scudamore, KA.
- Bhat, R. B., Ramakrishna, Y., & Munshi, K. (1989). Outbreak of trichothecene mycotoxicosis associated with consumption of mould-damaged wheat production in Kashmir Valley, India. *Lancet*, 35-37.
- Biosystems, A. (2009). *Curso Teórico-Práctico de PCR tiempo real y sus Aplicaciones*. USA: Applied Biosystems.
- Briones-Reyes, D., Gómez- Martínez, L., & Cueva-Rolón, R. (2007). Zearalenone contamination in corn for human consumption in the state of Tlaxcala, Mexico. *Food Chem.*100, 693-698.
- Briones-Reyes, D., Gomez-Martinez, L., & Cueva-Rolon, R. (2007.). Zearalenone contamination in corn for human consumption in the state of Tlaxcala, Mexico. *Food Chem.*, 100: 693-698.
- Cabañes, F. (2000). Micotoxinas emergentes. Introducción. *Rev. Iberoam Micol.* 17, S61-S6.
- Carrillo, L. (2003). *Los Hongos de los Alimentos y Forrajes*. Salta: Universidad Nacional de Salta.

- Christensen, C. (1987). Field and Storage Fungi. En L. Beuchat, *Food and Beverage Mycology*. (pág. USA). New York: Van Nostrand Reinhold.
- Christensen, C., & Kaufman, H. (1969). *Grain storage: The role of fungi in quality loss*. Minneapolis: University of Minnesota Press.
- CIMMYT. (22 de Febrero de 2009). *Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo*. Recuperado el 18 de Junio de 2012, de CIMMYT:  
<http://wheatdoctor.cimmyt.org/es/component/content/article/176/142-fusarium-head-blight-extended-information>
- Commission, E. (2006). Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Official Journal European Commission*, L70:12.
- Cortazar, A., & Silva, P. (Junio de 2004). *Instituto de Biotecnología*. Recuperado el 29 de Julio de 2012, de Instituto de Biotecnología.UNAM:  
<http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf>
- Coulombe, R. A. (1993). Biological Action of Mycotoxins. *Journal of Dairy Science*, 880-891.
- D´Mello, J., Placinta, C., & Macdonald, A. (1999). Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology*, 183-205.
- Deepak, S., Kottapalli, K., Rawwal, R., Oros, R., Rangappa, K., Iwahashi, H., y otros. (2007). Real time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Current Genomics*, 234-251.
- Desjardins, A., & Proctor, H. (2001). Biochemistry and genetics of Fusarium toxins. En A. Summerell, J. Leslie, & D. Backhouse, *Fusarium*. (págs. 50-69). St. Paul. Minn.: Memorial Symposium American Phytopathological Society Press.

- Dewick, P. (2001). The acetate pathway: fatty acids and polyketides. En J. Wiley, *Medicinal natural products, a biosynthetic approach* (págs. 35-117). United Kingdom: West Sussex.
- Dutton, M., & Kinsey, A. (1996). A note on the occurrence of mycotoxins in cereals and animal feedstuffs in Kwazulu Natal, South Africa 1984-1993. *S. Afr. J. Anim. Sci.*, 53-57.
- Etienne, M., & Dourmand, J. (1994). Effects of zearalenone or glucosinolates in the diet on reproduction in sows. *Livest. Prod. Sci.*, 120-131.
- FAO. (2012). *FAOSTAT*. Recuperado el 4 de Marzo de 2012, de FAOSTAT: <http://faostat.fao.org/>
- Forsyth, O., Yoshizawa, T., Morooka, N., & Tuite, T. (1997.). Emetic and refusal activity of the deoxynivalenol to swine. *Appl Environ Microbiol.*, 34: 547-552.
- Furlong, E., Valente, L., Lasca, C., & Yoko, E. (1995). Mycotoxins and Fungi in wheat harvested during 1990 in test plots in the state of Sao Paulo, Brazil. *Mycopathologia*, 185-190.
- Gilchrist-Saavedra, L., Fuentes-Dávila, G., & Martínez-Cano, R. L.-A. (2005). *Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada*. México, DF.: CIMMYT.
- González-Osnaya, L. R. (2007). *Estudio Nutricional y Evaluación de la Ingesta de Micotoxinas de la Población Universitaria*. Valencia: Universidad de Valencia.
- González-Osnaya, L., & Farrés, A. (2011.). Deoxynivalenol and zearalenone in Fusarium-contaminated wheat in Mexico City. *Food Additives & Contaminants.*, 1-8.
- Goswani, R., & Kistler, H. (2004). Heading for disaster: Fusarium graminearum on cereal crops. *Molecular Plant Pathology.*, 5(6). 515-525.
- Harris, J., Desjardins, A., Plattner, R., Nicholson, P., Butler, G., Young, J., y otros. (1999). Possible Role of Trichothecene Mycotoxins in Virulence of Fusarium graminearum on Maize. *Plant Dis.*, 954-960.

- Hietaniemi, V., & Kumpulainen, J. (1991.). Contents of Fusarium toxins in Finnish and imported grains and feeds. *Food Addit. Contam.*, 8: 171-182.
- Hohn, T., & Beremand, P. (1989). Isolation and nucleotide sequence of a sesquiterpene cyclase gene from the trichothecene-producing fungus *Fusarium sporotrichioides*. *Gene* 79., 131-138.
- Hughes, S., & Moody, A. (2007). PCR. *Methods Express*, 8.
- IARC. (1993). *International Agency for Research on Cancer. Monographs 56: Some naturally-occurring substances: same food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*. Lyon, France: IARC.
- 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.
- Ichinoe, M., Kurata, H., Sugiura, Y., & Ueno, Y. (1983). Chemotaxonomy of *Gibberella zeae* with special reference to production of trichothecenes and zearalenone. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1364-1369.
- JECFA. (2000). *Joint FAO/WHO Food Standards Program. Position paper on zearalenone, Codex Committee on Food Additives and Contaminants, Thirty-second session*. Beijing, P.R. of China.: JECFA.
- Jiménez, D., Montes, M., Navas, J. A., Jjiménez, R., & B., B. (2010). Identification and quantification of *Fusarium oxysporum* in planta and soil by means of an improved specific and quantitative PCR assay. *Applied Soil Ecology*, 372-382.
- Kuiper-Goodman, T. (1991). Risk assessment to humans of mycotoxins in animal-derived food products. *Vet. Hum. Toxicol.*, 33 (4). 325-333.

- Kuiper-Goodman, T., Scott, P., & Watanabe, H. (1987). Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regul Toxicol Pharmacol.*, 7: 253-306.
- Lacey, J. (1989). Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. *Journal of Applied Bacteriology.*, 11S-25S.
- Lesk, A. (2002). *Introduction to Bioinformatics*. Oxford.
- Luo, X. (1988). *Outbreaks of moldy cereals poisoning in China*. Washington DC: Toxicology Forum.
- Lysoe, E., Klemsdal, S., & Bone, K. (2006). The PKS4 gene of *Fusarium graminearum* is essential for zearalenone production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 3924-3932.
- Maaroufi, K., Chekir, L., Creppy, E., Ellouz, F., & Bacha, H. (1996). Zearalenone induces modifications in haematological and biochemical parameters in rats. *Toxicol.*, 534-540.
- Martín, E. (2010). *Curso: Introducción a la Bioinformática*. México: Aula virtual.
- Miller, J. (1990). Contamination of food by *Fusarium* toxins: studies from Austria-Asia. *Proc. Jap. Assoc Mycotoxicol.*, 32. 17-24.
- Moss, M. (1991). The Environmental factors controlling mycotoxin formation. En J. Smith, & R. Henderson, *Mycotoxins and animal foods*. (págs. 37-56). Boca Raton: CRC Press.
- Muller, H., & Schwadorf, K. (1993). A survey of the natural occurrence of *Fusarium* Toxins in wheat grown in a southern area of Germany. *Mycopathologia.*, 115-121.
- NCBI. (01 de Enero de 2012). *Primer Designing Tool*. Recuperado el 13 de Enero de 2012, de Primer Designing Tool: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
- Nicholson, P. (2004). Rapid detection of mycotoxigenic fungi in plants. En N. Magan, & M. Olsen, *Mycotoxins in food, detection and control*. (págs. 111-136). Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.

- Nicholson, P. (2004.). Rapid Detection of mycotoxigenic fungi in plants. En N. Magan, & M. Olsen, *Mycotoxins in food, detection and control*. (págs. 111-136.). Cambridge.: Woodhead Publishing Ltd.
- Niessen, M., & Vogel, R. (1998). Group specific PCR-detection of potential trichothecene-producing Fusarium-species in pure culture and cereal samples. *Syst. Appl. Microbiol.*, 21. 618-631.
- Nowicki, T., Gaba, D., Dexter, J., Matsuo, R., & Clear, R. (1988). Retention of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol in wheat during processing and cooking of spaghetti and noodles. *J Cereal Chem.*, 8. 189-202.
- Perkowski, J., Plattner, R., Golinski, P., & Vesonder, R. (1990). Natural occurrence of deoxynivalenol, 3-acetyl-deoxynivalenol, 15-acetyl-deoxynivalenol, nivalenol, 4,7-dideoxynivalenol and zearalenone in Polish wheat. *Mycotoxin Res.*, 7-12.
- Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F., Douglas, S., Field, S., y otros. (2003). *Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions*. BMC Biotechnol.
- Proctor, R., Hohn, T., & McCormick, S. (1995). Reduced virulence of Gibberella zeae caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Mol. Plant-Microb Interact.*, 593-601.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Luque, M. I., F. Justesen, A., & Córdoba, J. (2011). Quantification of ochratoxin A-producing molds in food products by SYBR Green and TaqMan real-time PCR methods. *International Journal of Food Microbiology*, 226-236.
- Rodríguez, M., & Rodríguez, W. (2006). *PCR Tiempo Real*. México: IBT-UNAM.
- Schaad, N. W., & Frederick, R. D. (2002). Real time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Plant Pathology*, 72-83.
- Schnerr, H., Niessen, L., & Vogel, R. (2000). Real time detection of the tri5 gene in Fusarium species by LightCyclere-PCR using



- SYBRGreen I for continuous fluorescence monitoring. *International Journal of Food Microbiology*, 54-61.
- Scott, P. (1995). Mycotoxin methodology. *Food Addit Contam.*, 12. 395-403.
- Soriano del Castillo, J. (2007). *Micotoxinas en Alimentos*. España: Díaz de Santos.
- Swanson, B. (1987). Mycotoxins on fruits and vegetables. *Acta Horticulturae.*, 49-61.
- Takara Bio USA. (2012). *Successful PCR Guide*. USA: Takara.
- Technologies, I. D. (01 de Enero de 2012). *Oligo Analyzer*. Recuperado el 13 de Enero de 2012, de Oligo Analyzer: <http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>
- Tevfik, D. (2006). *Real-time PCR*. New York: Taylor & Francis.
- Tomaszewski, J., Miturski, R., Semczuk, A., Kotarski, J., & Jakowicki, J. (1998). Tissue zearalenone concentration in normal, hyperplastic and neoplastic human endometrium. *Ginekol.*, 363-366.
- WHO. (2001). *Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. Geneva, Switzerland.: Tech. Report Series.
- Wong, M., & Medrano, J. (2005). Real-time PCR for mRNA quantification. *Biotechniques*, 75-85.
- Yoshizawa, T. (1997). Geographic difference in trichothecene occurrence in Japanese wheat and barley. *Bull. Inst. Compr. Agric. Sci. Kinki University*, 23-30.
- Zagachin, L., Nিকেleit, V., Haufman, A., Dutt, J., Foster, C., & Colvin, R. (2004). Healing corneas express embryonic fibronectin isoforms in the epithelium, subepithelial stroma, and endothelium. *The American Journal of Pathology*, 549-558.