

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



ANÁLISIS GENÉTICO DE *Aspergillus* spp Y SU IMPLICACION
EN LA IDENTIFICACION DE HONGOS
AFLATOXIGENICOS

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA

POR:

M.C. ALBERTO MORALES LOREDO

San Nicolás de los Garza, N. L.

Noviembre de 1997

[1997,

M.C. ALBERTO MORALES LOREDO

TD
QK623
.A9
M6
c.1



1080080886

11759

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



ANÁLISIS GENÉTICO DE *Aspergillus* spp Y SU IMPLICACION EN LA IDENTIFICACION DE HONGOS AFLATOXIGENICOS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA

TESIS

M. C. ALBERTO MORALES LOREDO

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA

Dr. Juan Pablo Martínez Pacheco
Director de Tesis

POR

Dr. Reyes S. Tamez Guerra
Asesor

Dr. Luis Jesús
Asesor

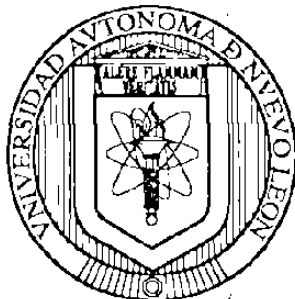
M. C. ALBERTO MORALES LOREDO

Dr. Benito Perea Alarcón
Asesor

Dr. Mario A. Rocha Páez
Asesor

Dra. Ma. Julia Verde Mar
Relatora de Tesis

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



ANÁLISIS GENÉTICO DE *Aspergillus* spp. Y SU IMPLICACIÓN EN LA
IDENTIFICACIÓN DE HONGOS AFLATOXIGÉNICOS

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA

POR

M. C. ALBERTO MORALES LOREDO

COMISION DE APROBACION DE TESIS

Dr. Juan Pablo Martínez Soriano
Director de Tesis

Dr. Reyes S. Tamez Guerra
Asesor

Dr. Luis Jesús Galán Wong
Asesor

Dr. Benito Pereyra Alférez
Asesor

Dr. Mario A. Rocha Peña
Asesor

Dra. Ma. Julia Verde Star
Subdirectora de Postgrado

Handwritten signatures of the thesis committee members over horizontal lines.

San Nicolás de los Garza, N. L., México

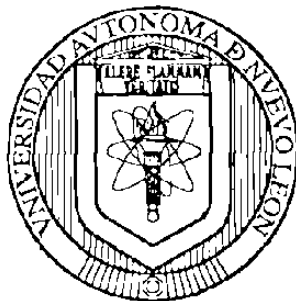
Noviembre de 1997

QA6
9

M



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**ANÁLISIS GENÉTICO DE *Aspergillus* spp. Y SU IMPLICACIÓN EN LA
IDENTIFICACIÓN DE HONGOS AFLATOXIGÉNICOS**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA**

POR

M. C. ALBERTO MORALES LOREDO

COMISION DE EXAMEN

Dr. Reyes S. Tamez Guerra
PRESIDENTE

Dr. Luis Jesús Galán Wong
SECRETARIO

Dr. Benito Pereyra Alférez
VOCAL

Dr. Juan Pablo Martínez Soriano
VOCAL

Dr. Mario A. Rocha Peña
VOCAL

San Nicolás de los Garza, N. L., México

Noviembre de 1997

INDICE DE CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
LOCALIZACION	V
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABLAS	VIII
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA	X
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIII
Capítulo 1.	
INTRODUCCION	1
1. Hipótesis	3
2. Objetivo general	4
3. Objetivos específicos	4
Capítulo 2.	
ANTECEDENTES	5
1. Biología del género <i>Aspergillus</i>	5
1.1. Biología de <i>Aspergillus flavus</i>	6
2. Estudios de la variabilidad de <i>Aspergillus</i> spp. basados en métodos moleculares.	8
2.1. Análisis genético con base en secuencias intergénicas de los genes ribosomales (ITS).	9
2.2. Análisis genético con base a la técnica de amplificación al azar de DNA polimórfico (RAPD).	11
3. Genes involucrados en la ruta de la biosíntesis de aflatoxinas.	13
4. Métodos oficiales para determinar y cuantificar aflatoxinas	16
Capítulo 3.	
MATERIALES Y METODOLOGIA	19
1. Material biológico.	19
1.1. Aislamiento de <i>Aspergillus</i> spp.	19

	Página
1.2. Mantenimiento de los aislamientos	19
1.3. Obtención de cultivos monospóricos	19
2. Extracción del DNA.	20
2.1. Producción de micelio	20
2.2. Purificación de DNA.	20
2.3. Protocolos de extracción de DNA.	20
2.3.1. Método "Universal" de extracción de DNA.	20
2.3.2. Método "Cenis" de extracción de DNA para PCR.	21
2.3.3. Método "Chang" de extracción de DNA utilizado en <i>Aspergillus</i>	22
2.3.4. Método "Moller" de extracción de DNA de alto peso molecular para hongos.	22
2.3.5. Método "Universal" de extracción de DNA modificado para tejidos vegetales.	23
3. PCR sobre regiones ITS.....	23
3.1. Secuenciación de los productos de ITS-PCR.	24
3.2. Electroforesis de los productos de PCR de ITS y RAPD.	24
3.3. Obtención de los polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP) de los productos de PCR-ITS	25
3.4. Obtención de patrones electroforéticos de la digestión con enzimas de restricción de los fragmentos amplificados ITS.	25
3.5. Análisis de las secuencias de los fragmentos ITS	25
4. Reacciones de RAPD-PCR.	26
4.1. Análisis de los patrones electroforéticos de RAPD-PCR.	26
5. Expresión del gen <i>omt-A</i> en <i>E. coli</i> mediante el sistema pET.	27
5.1. Clonación y subclonación del gen <i>omt-A</i>	27
5.2. Expresión y obtención del extracto de proteínas.....	28
5.3. Purificación de la proteína OMT-A	29
5.4. Electroforesis de proteínas	29

	Página
Capítulo 4.	
RESULTADOS Y DISCUSION	30
1. Integración del cepario	30
2. Extracción de DNA	30
3. Estandarización de las reacciones de ITS-PCR y RAPD-PCR.	31
4. Análisis genético de <i>Aspergillus</i> spp.	32
4.1 Resultados con base en secuencias ITS	32
4.2. Análisis de los resultados de secuenciación de los productos de ITS-PCR	32
4.3. Polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP)	35
4.4. Análisis de restricción a partir de los fragmentos amplificados de ITS	36
4.5. Análisis del patrón electroforético de la amplificación con RAPD	38
5. Identificación de un patrón electroforético específico para cepas altamente productoras de aflatoxinas.	39
6. Resultados de la expresión del gen <i>omt-A</i> involucrado en la biosíntesis de aflatoxinas.	41
6.1. Clonación y subclonación del gen <i>omt-A</i>	41
6.2. Expresión del gen <i>omt-A</i>	43
7. Consideraciones finales.	44
Capítulo 5.	
CONCLUSIONES	45
LITERATURA CITADA	47
FIGURAS	54
TABLAS	64

DEDICATORIA

A la memoria de mi madre,

María Concepción Loredo Olivo

A mi padre,

José C. Morales Cervantes

A mi esposa e hijos,

Rosalba, Adriana y Alberto

AGRADECIMIENTOS

A las instituciones:

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP) por la oportunidad otorgada para la realización de los estudios de doctorado.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la Beca Crédito conferida.

Unidad de Investigación en Biología Celular y Molecular del convenio INIFAP-UANL y Departamento de Microbiología e Inmunología de la FCB-UANL por las facilidades otorgadas para la realización del trabajo de laboratorio de esta investigación.

Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas, Fac. de Medicina, UANL, Programa Universitario de Alimentos, UNAM, Laboratorio de Bioquímica de Microorganismos, FCB-UANL y Laboratorio de Micología Médica, FCB-UANL por la amable donación de cepas.

CINVESTAV-Unidad Irapuato del IPN por su apoyo en los trabajos de secuenciación de DNA.

Subdirección de Posgrado de la FCB-UANL, por el apoyo recibido durante mis estudios.

A las personas:

Dr. Juan Pablo Martínez Soriano, por la dirección y apoyo recibido durante la presente investigación.

Dr. Reyes S. Tamez Guerra, Dr. Luis Galán Wong, Dr. Benito Pereyra Alférez y Dr. Mario A. Rocha Peña, por su importante asesoría.

Dr. Rodrigo Aveldaño Salazar, MC. Dr. Luis Ángel Rodríguez del Bosque, MC. Fernando Patiño Valera y MC. Jorge Cantú Vega por la confianza depositada en la Unidad de Investigación en Biología Celular y Molecular del convenio INIFAP-UANL para la realización de la presente investigación, con lo cual se

logra cumplir con los objetivos de capacitación de personal y generación de tecnología de importancia para el sector agropecuario y forestal de México.

MC. Irma O. Martínez Vázquez y Dra. Diana Sara Leal Klevezas, por su valioso apoyo y sugerencias para la realización de la investigación.

Dr. Deepak Bhatnagar y Dr. Thomas E. Cleveland del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica (USDA), Servicio de Investigación Agrícola (ARS) de Nuevo Orleans, USA así como a Gary Payne de la Universidad del Norte de Carolina, USA por la amable donación de clonas y amplia disponibilidad de colaboración en la presente investigación.

Dr. Octavio Martínez de la Vega del CINVESTAV-Irapuato por su apoyo en el análisis estadístico de los resultados.

MC. Nabor González Garza, por su apoyo y facilidades otorgadas de laboratorio para el manejo de los hongos.

QBP. Edgar A. Gallardo Zapata, y QFB. Reynaldo Viera por su colaboración durante la investigación.

MC. Raúl Rodríguez Guerra, por su apoyo en la capacitación para la obtención de cultivos monospóricos.

MC. Gloria González González y Dr. José Santos García Alvarado, por la amable donación de cepas.

MC. Armando José Gomez Sánchez, Dr. Juan M. Alcocer González, MVZ. Pablo Zapata Benavidez, QBP. Luis Cástulo Damas Buenrostro, MC. Magdalena Iracheta Cárdenas por sus sugerencias y apoyo en la realización de esta investigación.

MC. Javier Martínez Solís y Dr. Antonio Luna Delgado, por la asesoría en la toma de fotografías.

Ing. Felipe Rojas Patlán por su apoyo en la edición del documento.

C. Mirthala Páez Hernández por su apoyo en el mecanografiado del documento.

Humberto, Omar, Elisa, Isadora, Tomás, Leobardo, Irene, Norma y Eleazar compañeros de la Unidad de Investigación en Biología Celular y Molecular del convenio INIFAP-UANL, por su contribución en el desarrollo de este trabajo.

Y a todos aquellos, que de alguna manera colaboraron para la realización de este trabajo.

La presente investigación se realizó en la Unidad de Investigación en Biología Celular y Molecular, del Convenio de Cooperación entre la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) y el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP) de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGAR). Esta Unidad se ubica en el Departamento de Inmunología y Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, en San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

LISTA DE FIGURAS

Figura No.	Página
1. Biosíntesis de aflatoxinas B ₁ y B ₂	54
2. Posición de los iniciadores para amplificar las regiones ITS.	54
3. Expresión del gen <i>omt-A</i>	55
4. Comparación de diferentes métodos de extracción de DNA de <i>Aspergillus</i> sp.	55
5. Amplificación de los ITS-PCR de diferentes especies de <i>Aspergillus</i>	56
6. Representación esquemática de las secuencias ITS-PCR.	56
7. Arbol de las relaciones filogenéticas de las secuencias consenso 5.8S de cinco especies de <i>Aspergillus</i>	56
8. Arbol de las relaciones filogenéticas de las secuencias ITS de cinco especies de <i>Aspergillus</i>	57
9. Polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) de los fragmentos ITS de cinco especies de <i>Aspergillus</i>	57
10. Patrón de restricción de los ITS-PCR con las endonucleasas <i>Xho</i> I, <i>Xho</i> I + <i>Eco</i> R I y <i>Dde</i> I ..	58
11. Sitios de restricción de las secuencias ITS en cinco especies de <i>Aspergillus</i>	59
12. Patrón de restricción de ITS-PCR con la endonucleasa <i>Dde</i> I para diferentes aislamientos de <i>A. flavus</i>	60
13. Patrones RAPD de seis aislamientos de <i>A. flavus</i> obtenidos con los iniciadores 50-10, 60-10, 70-10 y 80-10..	61
14. Mapa de restricción del clon <i>omt-A</i>	60
15. Sitios únicos de corte con enzimas de restricción de la secuencia del gen <i>omt-A</i>	60
16. Subclonación del gen <i>omt-A</i> en el vector de expresión pET- 30c(+).	62

Figura No.	Página
17. Productos de la digestión enzimática del vector de expresión pET-30c(+).	63
18. Electroforesis de proteínas totales de células recombinantes pET-30c(+)+ <i>omt-A</i>	63
19. Tiempo y curso de la expresión de pET-30c(+) + <i>omt-A</i> en <i>E. coli</i>	63

LISTA DE TABLAS

Tabla No.	Página
1. Composición de bases y secuencia de los iniciadores utilizados en las reacciones de RAPD-PCR.	64
2. Procedencia de cepas de <i>Aspergillus</i> spp, utilizadas en esta investigación.	64
3. Comparación de métodos de extracción de DNA.	65
4. Secuencias del fragmento de DNA ITS1-5.8S-ITS2 de cinco especies de <i>Aspergillus</i> , obtenidas mediante el método Sanger.	65
5. Alineamiento de bases del fragmento ITS de cinco especies de <i>Aspergillus</i> con el método J. Hein	67
6. Porcentajes de similitud y divergencia para cinco especies de <i>Aspergillus</i> obtenidos mediante el método J. Hein.....	69
7. Fragmentos obtenidos mediante la digestión con <i>Xho</i> I	69
8. Fragmentos obtenidos mediante la digestión con <i>Xho</i> I + <i>Eco</i> RI	69
9. Fragmentos obtenidos (pb/pb) mediante análisis de restricción de acuerdo al programa computacional DNA Strider 1.1.	70
11. Matriz de fragmentos amplificados en cinco especies de <i>Aspergillus</i> spp.....	70
12. Indices de similitud de Dice con base en los patrones electroforéticos generados con RAPD-PCR (iniciador 50-10).	72
13. Indices de similitud de Dice con base en los patrones electroforéticos generados con RAPD-PCR (iniciador 60-10).	72
14. Indices de similitud de Dice con base en los patrones electroforéticos generados con RAPD-PCR (iniciador 70-10). ..	72
15. Indices de similitud de Dice con base en los patrones electroforéticos generados con RAPD-PCR (iniciador 80-10).	72

Figura No.	Página
16. Matriz de fragmentos amplificados en seis aislamientos de <i>A. flavus</i>	73
17. Indices de similitud de Dice de seis aislamientos de <i>A. flavus</i> (iniciador 50-10).	74
18. Indices de similitud de Dice de seis aislamientos de <i>A. flavus</i> (iniciador 60-10).	74
19. Indices de similitud de Dice de seis aislamientos de <i>A. flavus</i> (iniciador 70-10).	74
20. Indices de similitud de Dice de seis aislamientos de <i>A. flavus</i> (iniciador 80-10).	75
21. Comparación de los índices de similitud de Dice obtenidos con cuatro iniciadores en aislamientos de <i>A. flavus</i>	75

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

5.8S	Acido ribonucleico ribosomal 5.8S
18S	Acido ribonucleico ribosomal 18S
28S	Acido ribonucleico ribosomal 28S
50-10	Iniciador de 10 bases con 50% de bases G-C
60-10	Iniciador de 10 bases con 60% de bases G-C
70-10	Iniciador de 10 bases con 70% de bases G-C
80-10	Iniciador de 10 bases con 80% de bases G-C
AFB1	Aflatoxina B ₁
Ags.	Aguascalientes
Alu I	Enzima que reconoce la secuencia 5'-AGCT
Bam H I	Enzima que reconoce la secuencia 5'-GGATCC
BL21	Cepa <i>Escherichia coli</i> de no expresión con genotipo: F ⁻ <i>ompThsdS</i> B(rB ⁻ mB ⁻) <i>gal</i> <i>dcm</i>
BL21(DE3)	Cepa <i>E. coli</i> de expresión genotipo: F ⁻ <i>ompThsdS</i> B(rB ⁻ mB ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementario
CEI	Centro de Control de Enfermedades Infecciosas
CIBIN	Centro de Investigación Biomédica del Noreste
CIRNE	Centro de Investigaciones Regional del Noreste
cm	Centímetros
cols.	Colaboradores
CTAB	Bromuro de Cetil-trimetil-amonio.
Dde I	Enzima que reconoce la secuencia 5'-CTNAG
ddNTP's	Di-desoxinucleósidos trifosfatados
DHOMST	Dihidro-O-metilesterigmatocistina
DHST	Dihidroesterigmatocistina
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleósidos trifosfatados
dsDNA	Acido desoxirribonucleico de cadena doble
Eco R I	Enzima que reconoce la secuencia 5'-GAATTC
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima
<i>et al.</i>	Y colaboradores
FDA	Administración de Drogas y Alimentos
g	Gramos.
G-C	Guanina-Citosina
h	Horas
Hinf I	Enzima que reconoce la secuencia 5'-G ANTC
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias
IS	Indice de similitud
ITS	Espacio transcrito interno
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
LB	Medio Luria-Bertani
M	Concentración molar
m	Marcador de peso molecular
mA	Miliamperios
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitro
MM	Micología Médica
mM	Concentración milimolar
mm	Milímetro

NCBI	National Center Biotechnological Information
ng	Nanogramos
NL	Nuevo León
No.	Número
O-MST	O-metilesterigmatocistina
°C	Grados celsius
OD600	Densidad optica a 600 nm.
OMT-1	Enzima O-metiltransferasa
p/v	Peso/volumen
pb	Pares de bases
pBR322	Plásmido de Bolívar y Rodríguez
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD	Papa-Dextrosa
PDA	Papa-Dextrosa-Agar
pH	Potencial hidrógeno
pmol	Picomoles
ppb	Partes por billón
RAPD	Amplificación de DNA polimórfico.
RFLP	Fragmentos polimórficos de restricción
RNA	Acido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Acido ribonucleico ribosomal
SAGAR	Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural
SAM	S-adenosil-L-metionina
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS
seg	Segundos
SEVAG	Mezcla de cloroformo-álcohol isoamílico 24:1 v/v.
sp.	Especie
spp	Especies
SRRC	Southern Regional Research Center
SSCP	Polimorfismos conformacionales de cadena sencilla
ssDNA	Acido desoxirribonucleico de cadena sencilla
ST	Esterigmatocistina
Taq	Enzima que polimerisa DNA proviene de <i>Thermus aquaticus</i>
TBE Buffer	Buffer tris-boratos-EDTA
TE Buffer	Buffer tris-EDTA
TES Buffer	Buffer Tris-EDTA-SDS
Tris	TRIZMA® Base. Tris[Hidroximetil]aminometano
U	Unidades de actividad enzimática
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UGS	Unidad de Granos y Semillas
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México.
USA	Estados Unidos de América
V	Voltios
v/v	Volumen/volumen
Vol	Volumen
X	Número de veces la concentración con respecto a la de trabajo
Xho I	Enzima endonucleasa que reconoce la secuencia 5'-CTCGAG
µF	Microfaradios
µl	Microlitros
%	Por ciento (medida de cantidad)

RESUMEN

El género *Aspergillus* presenta una gran diversidad y variabilidad en la naturaleza. Esta variabilidad dentro, de las poblaciones de *A. flavus*, influye en el proceso de contaminación de los cultivos. Se conoce que los aislados individuales de *A. flavus* varían en su capacidad para producir aflatoxinas, tanto *in vitro* como durante la infección de los cultivos. Mediante la caracterización del hongo con técnicas moleculares y la serología a partir de productos de genes involucrados en la biosíntesis de aflatoxinas se estará en posibilidades de diseñar una estrategia de identificación de la contaminación. Para apoyar lo anterior, la presente investigación se planteó los siguientes objetivos: (i) Inferir las relaciones filogenéticas de cinco especies de *Aspergillus* con base en su análisis molecular. (ii) Caracterizar genéticamente aislamientos de *Aspergillus* spp, mediante Polimorfismos Conformacionales de Cadena Sencilla (SSCP), análisis de restricción de los fragmentos de DNA que codifican para los rRNA y Amplificación al Azar de DNA Polimórfico (RAPD). (iii) Identificar un patrón electroforético específico para hongos aflatoxigénicos mediante RAPD. (iv) Expresar el gen *omt-A* involucrado en la biosíntesis de aflatoxinas. Como resultados, se logró integrar 23 aislamientos que representaron a las especies *A. flavus*, *A. chevalieri*, *A. ochraceus*, *A. terreus* y *A. niger*. La extracción de DNA de *Aspergillus* spp, con el método de Cenis a partir de cultivos monospóricos, permitió obtener DNA de calidad y en la cantidad adecuada para las reacciones de PCR. En las cinco especies, se amplificó un fragmento de DNA de 600 pares de bases (pb), que incluyó las regiones ITS1-5.8S-ITS2, mediante iniciadores complementarios a las regiones conservadas 18S y 28S de los genes que codifican para los rRNA. Se analizó la secuencia de bases del fragmento ITS1-5.8S-ITS2, mediante el algoritmo de alineamiento J. Hein, y se encontró una región conservada de 198 pb la cual incluyó el gen 5.8S. Esta región fue altamente conservada (100%) entre la mayoría de las especies, con excepción de *A. chevalieri* y *A. flavus* que variaron en cuatro y 11 posiciones, respectivamente. Las secuencias en las regiones ITS1 e ITS2 fueron más variables. Estas diferencias en la secuencia permite distinguir entre especies, debido a que existen diferentes sitios de reconocimiento de endonucleasas lo que genera diferentes patrones de restricción y además en un futuro se pueden diseñar iniciadores específicos para PCR. El análisis de las secuencias ITS mediante, el algoritmo J. Hein, con base en la región conservada y variable, permitió elaborar el árbol filogenético, en el cual se formó un grupo entre *A. ochraceus*, *A. chevalieri* y *A. niger* y otro entre *A. terreus* y *A. flavus*. Mediante la técnica SSCP se diferenciaron tres especies: *A. flavus*, *A. chevalieri* y *A. ochraceus* y se encontró un comportamiento similar tanto en la migración como en la separación de cadenas de DNA, entre *A. terreus* y *A. niger*. Los fragmentos ITS se sometieron a digestión con tres enzimas, de las cuales sólo *Dde I*, permitió obtener un patrón de restricción diferente y específico para las cinco especies en estudio. Mediante la técnica de RAPD se logró asociar de acuerdo a su patrón electroforético *A. ochraceus* y *A. chevalieri*, las cuales presentaron los mayores índices de asociación de Dice (1.0, 0.60, 0.86 y 0.80) con los cuatro iniciadores evaluados. además con RAPD, se logró obtener un patrón electroforético común para las cepas productoras de aflatoxinas, es decir aflatoxigénicas, de *A. flavus*. Se identificó mediante SDS-PAGE una proteína de 26.0 kDa expresada por el gen *omt-A*, involucrado en la ruta de la biosíntesis de aflatoxinas. Finalmente, las técnicas moleculares RAPD, SSCP, secuenciación y análisis de restricción del fragmento ITS, permitió inferir las relaciones filogenéticas entre cinco especies del género *Aspergillus*, así como identificar un patrón electroforético específico tanto para la especie como para cepas aflatoxigénicas.

ABSTRACT

The genus *Aspergillus* occurs in nature, with a great diversity and variability. Aflatoxin production among the *A. flavus* population is influenced by this variability both *in vitro* and in the field. The molecular characterization of the fungi and the serological detection of gene products involved in the aflatoxin biosynthesis, will provide new strategies to identify contaminated plant products. Therefore, the objectives of this work were: (i) Based on the molecular analysis, elucidate the phylogenetic relationship among five species of *Aspergillus*. (ii) Characterize strains of *Aspergillus* spp using Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP), restriction analysis of rDNA and Random Amplification Polymorphic DNA (RAPD). (iii) To determine aflatoxigenicity with fingerprint patterns by RAPD on *A. flavus*. (iv) Express *omtA* gene, involved in the aflatoxin biosynthesis. Twenty three isolates belonging to the species *A. flavus*, *A. chevalieri*, *A. ochraceus*, *A. terreus*, and *A. niger* were evaluated. DNA for PCR reactions was extracted from monospore cultures of *Aspergillus* spp, following Cenis's method. Using primers to anneal at conserved regions on the 18S and 28S rDNA, a 600 base pair (bp) fragment was amplified from the ITS1-5.8S-ITS2 region of the five species. The sequence analysis of the 600 bp fragment by the J. Hein algorithm showed a highly conserved region spanning 198 bp which included the 5.8 S rDNA. This region was highly conserved (100%) among most species, except *A. chevalieri*, which had 4 bp changed and *A. flavus*, with a difference of 11 bp. All of these might be further studied and exploited to look for specific sequences by PCR. On the other hand, ITS1 and ITS2 were less conserved. Phylogenetic analysis of the five species, based on both, conserved and variable regions, yielded two groups: one constituted by *A. ochraceus*, *A. chevalieri*, and *A. niger* and another by *A. terreus* and *A. flavus*. SSCP analysis differentiated three species: *A. flavus*, *A. chevalieri*, and *A. ochraceus*; likewise, *A. terreus* and *A. niger* were found to be related. Restriction analysis of ITS1-5.8-ITS2 with *Dde* I identified distinct patterns for the five studied species. In addition, amplified fragments by RAPD provided information, associating *A. ochraceus* and *A. chevalieri* with values of 1.0, 0.60, 0.86, and 0.80, corresponding to four different 10-mer primers. Likewise, the use of RAPD could distinguish aflatoxigenic strains of *A. flavus*. On a set of different experiments, a 26-kDa protein of the *omtA* gene, was identified by SDS-PAGE. Finally RAPD, SSCP, DNA Sequencing, and restriction analysis allowed to infer phylogenetic relationships among five species of the genus *Aspergillus* and identified a electrophoretic pattern distinctive for species and for aflatoxigenic strains.

Capítulo 1

INTRODUCCION

Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos secundarios producidos principalmente por los hongos imperfectos *Aspergillus parasiticus* Speare y *A. flavus* Link ex. Fries (27). Estos compuestos son los carcinogénicos más potentes producidos naturalmente y pueden contaminar alimentos para ganado y consumo humano, por lo que son una amenaza potencial para la salud (55). La Organización Mundial de la Salud sobre aspectos microbiológicos de la higiene de alimentos, reconoció una lista de 150 tipos diferentes de hongos productores de micotoxinas tóxicas para el hombre y los animales, dentro de los cuales se encuentran los del género *Aspergillus*. Estos causan de manera directa micosis e indirectamente micotoxicosis por las aflatoxinas generadas como producto del metabolismo. En México, estos metabolitos secundarios, contaminan el cultivo de maíz con niveles superiores a lo permitido por la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos de Norteamérica (FDA-USA) (48), para la comercialización de granos.

Los hongos *A. flavus* y *A. parasiticus* pueden crecer y producir aflatoxinas sobre un gran número de sustratos, sobresaliendo por su importancia para México el maíz. Estos hongos producen las aflatoxinas B₁ y B₂, además *A. parasiticus* produce dos aflatoxinas adicionales G₁ y G₂. De todas las aflatoxinas, la B₁ es la más carcinogénica y generalmente es producida en mayor cantidad. Otros tipos de aflatoxinas como la M₁, P₁, Q₁, Aflatoxicol y otras han sido identificadas y todas ellas proceden de la aflatoxina B₁ (8).

La contaminación por aflatoxinas ha sido reportada prácticamente en todo el mundo. En los Estados Unidos de Norteamérica, la FDA prohíbe el comercio de granos para alimento que contengan más de 20 partes por billón (ppb) de aflatoxinas y prohíbe la venta de leche con presencia de más de 0.5 ppb (69). En México la contaminación de maíz con aflatoxinas fue baja (12-35% de ocurrencia) durante 1981-1988; sin embargo, en 1989 el maíz del Noreste presentó una contaminación de 100% de ocurrencia con niveles superiores a 20.0 ppb de aflatoxinas. En el año de 1991 la contaminación del hongo fue de un 23% el cual fue reducido hasta un porcentaje menor del 1% en 1992 mediante un plan regional de medidas preventivas (80). Se ha determinado que la prevalencia de *Aspergillus*

y la subsecuente producción de aflatoxinas es condicionada por el medio ambiente. Los problemas más serios con la contaminación han ocurrido en regiones con años donde las temperaturas y precipitaciones son superiores e inferiores a la media, respectivamente (35). Cuando estas condiciones ambientales coinciden con la floración y desarrollo del grano del maíz, el problema se agudiza, ocasionando que la contaminación puede ocurrir en el campo antes de la cosecha y durante el almacén (69, 81).

La clasificación de las especies del género *Aspergillus* no cumple cánones ortodoxos de la taxonomía de hongos, ya que este género ha sido dividido por Raper y Fennell en 1965 (78), en 18 grupos, con 132 especies. En *Aspergillus* las diferencias en la composición del sustrato produce contrastes marcados en el crecimiento y coloración, en las dimensiones y morfología de las cabezas conidiales. Además, este género presenta una gran diversidad y variabilidad en la naturaleza. Los aislados individuales de *A. flavus* varían ampliamente en su capacidad para producir aflatoxinas, tanto *in vitro* como durante la infección de los cultivos (21). Se considera también que las especies *A. glaucus*, *A. restrictus*, *A. ochraceus*, *A. candidus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. versicolor*, *A. fumigatus* *A. parasiticus* y *A. clavatus* son importantes en el deterioro de granos y semillas almacenados (64).

Para caracterizar y diferenciar el género *Aspergillus* se han utilizado métodos basados en biología molecular, como el análisis de las secuencias que codifican para los genes de los RNA ribosomales eucariotes 18S, 5.8S y 28S (51, 60, 92, 95). A partir de los fragmentos amplificados de las Secuencias de Transcripción Interna (ITS), de los genes ribosomales, se pueden realizar los análisis con enzimas de restricción para distinguir entre especies; y análisis de los Polimorfismos Conformacionales de Cadena Sencilla (SSCP), con los cuales se tiene como un método sensible y rápido para identificar cambios pequeños en la secuencia del DNA. Recientemente, se ha encontrado que la producción de aflatoxinas difiere significativamente entre grupos de compatibilidad vegetativa, y estos grupos son consistentes con los polimorfismos de DNA (5). La habilidad para caracterizar y monitorear cepas genéticamente idénticas de poblaciones de *Aspergillus* spp, permitirá determinar como la contaminación se dispersa y cuales poblaciones están asociados con los maíces afectados (59).

Aunque los factores que influyen en el metabolismo primario afectan el metabolismo secundario, los metabolitos secundarios no aparecen durante la fase del crecimiento del hongo (trofofase), debido que las enzimas necesarias para su formación están ausentes (20). Se ha establecido una relación estrecha entre la biosíntesis de aflatoxinas y biosíntesis de lípidos (28) y es conocido que la síntesis de proteínas disminuye durante la fase de producción de aflatoxinas (idiofase) (27). La biosíntesis de policétidos representa el paso inicial en el cual el organismo es llevado a la producción del producto del metabolismo secundario (16) y muchos de los pasos son esencialmente irreversibles. Se conoce que en la ruta de la biosíntesis de aflatoxinas el paso de ST a O-MST y O-metildihidro-ST es único para *A. flavus* y *A. parasiticus* (10). La enzima que cataliza este paso es una metiltransferasa codificada por el gen *omt-A*. Por otra parte se obtuvieron anticuerpos policlonales contra cepas aflatoxigénicas de *A. parasiticus*. Lo anterior apoya la detección, de metabolitos intermediarios de la biosíntesis de aflatoxinas, mediante serología de las proteínas-enzimas específicas de la ruta de la biosíntesis.

Al combinar la caracterización del hongo mediante técnicas moleculares y la serología a partir de productos de genes involucrados en la biosíntesis de aflatoxinas se estará en posibilidades de diseñar una estrategia de predicción de la contaminación precosecha de aflatoxinas, de suma importancia en el manejo agronómico del cultivo, en la toma de decisiones para la comercialización y en un futuro para un manejo potencial precosecha.

1. Hipótesis

1. Con base en el análisis genético, mediante técnicas moleculares, es posible inferir las relaciones filogenéticas entre especies de *Aspergillus* spp.
2. La variabilidad en la capacidad de producir aflatoxinas de *Aspergillus flavus* es posible detectarla mediante análisis molecular.

2. Objetivo General

Inferir relaciones filogenéticas de cinco especies de *Aspergillus* e identificar mediante técnicas moleculares, un patrón genómico específico ("huella genómica") en *A. flavus*, para especie y para aislamientos aflatoxigénicos.

3. Objetivos Específicos

1. Inferir las relaciones filogenéticas de cinco especies de *Aspergillus*, con base en su análisis molecular.
2. Caracterizar genéticamente aislamientos de *Aspergillus* spp mediante SSCP, análisis de restricción de los fragmentos de DNA que codifican para los rRNA y RAPD.
3. Identificar un patrón electroforético específico para hongos aflatoxigénicos mediante RAPD en *A. flavus*.
4. Expresar el gen *omt-A* involucrado en la biosíntesis de aflatoxinas.

Capítulo 2

ANTECEDENTES

1. Biología del género *Aspergillus*

Los hongos del género *Aspergillus* siempre han estado presentes en el ambiente del hombre, pero fue hasta 1729 que Micheli distinguió las estructuras tales como los tallos y las cabezas de esporas. Él observó que las cadenas de esporas o columnas radiadas surgen de una estructura central similar al aspergillum o hisopo usado para rociar agua bendita en el catolicismo, de aquí el nombre de *Aspergillus* utilizado para estos hongos. Pero fue al inicio de la década de los 40s que este género se estudió más ampliamente, debido a que se estableció su potencial en la industria de la producción de ciertos ácidos orgánicos, su implicación en las enfermedades de animales y humanos, su papel en los procesos de descomposición en el suelo, asimismo han sido recientemente incorporados como herramienta para investigar los procesos fisiológicos y rutas metabólicas en los microorganismos.

Debido a que algunas pocas especies de *Aspergillus* presentan etapa ascospórica, mientras que la mayoría no la tienen, existe considerable confusión para definir los nombres que deberían ser aplicados a los miembros de este género. De acuerdo con Thom y Church, 1926 y Thom y Raper, 1945 el nombre genérico de *Aspergillus* debería ser aplicado para todos aquellos hongos, con o sin etapa ascospórica. La identificación de los aislamientos debería ser basada en las características de sus colonias y en los detalles de morfología de sus esporas. Los hongos de *Aspergillus* están presentes sobre un gran número de sustratos, pero las diferencias en la composición del mismo produce cambios marcados en el crecimiento y coloración, en las dimensiones y morfología de las cabezas conidiales (78).

Por lo anterior, es notorio que el género *Aspergillus* tiene una gran importancia en la industria, como patógeno y como herramienta en investigación, pero la gran variación y variabilidad en su morfología y fisiología por efecto de mecanismos genéticos tales como mutaciones, rearrreglos cromosomales, ploidía, heteriocariosis, etc., ocasiona que el estudio para su clasificación, por técnicas tradicionales basadas en su morfología, requiera un trabajo exhausto y un amplio conocimiento del hongo, de lo contrario los resultados pueden ser conflictivos.

1.1. Biología de *Aspergillus flavus*

Aspergillus flavus, además de ser un saprófito, es patógeno oportunista de plantas, insectos, vertebrados e inclusive de animales domésticos y humanos (9). En los campos agrícolas, durante condiciones de sequía y temperaturas altas, las poblaciones de *A. flavus* se incrementan sobre los restos del cultivo, sobre tejidos maduros o muertos y sobre material vegetativo dañado, lo que le permite ser una fuente de inóculo (68). La asociación de *A. flavus* con el cultivo puede iniciar desde la madurez, cosecha y hasta el almacén. Asimismo la fuente de inóculo de infección inicial puede ser interrumpida, el proceso de contaminación puede ser dividido en dos fases: una ocurre durante la maduración del cultivo y la segunda después de la maduración (20). En la madurez, los cultivos susceptibles a la contaminación con aflatoxinas son generalmente susceptibles a la infección por *A. flavus*. La colonización de los cultivos por el hongo no necesariamente lleva a una acumulación de aflatoxinas en semillas de algodón (29). En el cultivo de maíz existe una relación entre el grano y el hongo, por lo que se ha sugerido que la α -amilasa producida por *A. flavus* tiene un papel en la inducción de la biosíntesis de aflatoxinas en los granos de maíz infectados (100).

A. flavus y *A. parasiticus*, son productores de aflatoxinas, y además son especies patógenas para una gran variedad de plantas, aunque *A. flavus* predomina sobre la mayoría de hospederos, a excepción de cacahuete (26). En 1984, Durakovic y cols. (31), al estudiar de manera *per se* las relaciones de la biomasa del hongo y la biosíntesis de aflatoxinas, establecieron que el tipo y cantidad de aflatoxinas depende, principalmente, de la temperatura del medio de cultivo, más que del crecimiento del micelio. En campo, la ocurrencia y severidad de la contaminación por aflatoxinas es altamente dependiente del ambiente y se relaciona con temperaturas superiores al promedio y precipitaciones inferiores al promedio de una región determinada (35). Si estas condiciones coinciden con la etapa de floración y desarrollo del grano del maíz, el problema se agudiza, debido a que la contaminación puede ocurrir antes de la cosecha (69, 80). Además, en 1995 Rodríguez y cols., proponen un modelo de predicción de la contaminación de aflatoxinas, el cual considera las temperaturas nocturnas durante el período crítico y la aplicación de un "Paquete Tecnológico", el que incluye prácticas agronómicas como control de plagas, fecha de siembra, entre otras. Al implementar el modelo, se observa que los riesgos de contaminación se incrementan notablemente al aumentar la temperatura, independiente de la aplicación del paquete tecnológico. En vista del limitado

potencial para reducir los niveles de aflatoxinas en el campo, se ha recurrido a métodos de destoxificación y remoción adsorbsiva de aflatoxinas, pero éstos tienen como limitante la incertidumbre de la aprobación por agencias que regulan el uso de este material tanto para consumo animal como humano (11).

En el género *Aspergillus* existe variación regularmente entre los miembros de cualquier especie, serie o grupo. Estas variaciones comúnmente difieren en grado más que en caracteres básicos. El grupo *A. flavus* sirve para ilustrar esta variación. Las características de *A. oryzae*, *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. tamarrii* son típicas, pero entre una especie y otra se tienen formas intermedias, que muestran grados de variación entre las cepas seleccionadas como típicas. Esta situación es común entre *A. flavus* y *A. oryzae*, *A. flavus* y *A. parasiticus* y entre *A. flavus* y *A. tamarrii* (78). Se piensa que existe variabilidad a nivel poblacional, pues al asignar aislados de *A. flavus* en grupos de compatibilidad vegetativa, vía pruebas de complementación entre mutantes no utilizadores de nitrato, se encontró que, aunque muchos grupos de compatibilidad vegetativa están ampliamente distribuidos, en un campo agrícola puede haber un perfil poblacional único, que cambie significativamente de un año a otro (6).

La variabilidad dentro de las poblaciones de *A. flavus* influyen en el proceso de contaminación de los cultivos. Los aislados individuales de *A. flavus* varían ampliamente en su capacidad para producir aflatoxinas, tanto *in vitro* como durante la infección de los cultivos (21). Sin embargo la producción de aflatoxinas *in vitro* es similar entre organismos relacionados, lo que supone que la producción de éstas es un carácter genético (5). Además, la capacidad de *A. flavus* para producir aflatoxinas es independiente de su capacidad para infectar y multiplicarse en cultivos, lo que sugiere que la producción de aflatoxinas no incrementa la virulencia en la interacción con algodón (21). Recientemente se ha identificado, en la semilla de maíz, inhibidores del crecimiento de *A. flavus* y por lo consiguiente en la acumulación de aflatoxinas. (45), así como inductores de la biosíntesis de aflatoxinas en granos de maíz (34).

También se ha sugerido que la resistencia, en el cultivo de maíz, para evitar la producción de aflatoxinas está directamente relacionada a la resistencia para la colonización del hongo en ciertos genotipos de maíz (15). Existen cepas que no producen aflatoxinas (22), que pueden interferir en el proceso de contaminación por

competencia que permita excluir cepas toxigénicas y además por interferencia directa con la toxigenesis. Lo anterior sugiere que cepas no productoras de aflatoxinas pueden ser útiles como agentes de control biológico para prevenir la contaminación de aflatoxinas. La causa de la variación en los niveles de producción de aflatoxinas es desconocida, aun entre semillas igualmente infectadas, aunque aquí la heterogeneidad contribuye de manera importante en esta variabilidad (53). El conocimiento de ésta puede ayudar, a un mejor entendimiento de la variación genética intraespecífica y al conocimiento del fenómeno de contaminación con aflatoxinas (9).

Además de la variabilidad morfológica del género *Aspergillus*, en la especie *A. flavus* existe variabilidad en cuanto a la capacidad de producción de aflatoxinas y en la patogenicidad, estas características han mostrado ser independientes, pero deben ser consideradas de importancia desde el punto de vista del control de la contaminación en campos de maíz.

2. Estudios de la variabilidad de *Aspergillus* spp basados en métodos moleculares

Dentro de los 18 grupos del género *Aspergillus*, considerados por Raper y Fennell en 1965 (78), entre los que invaden granos almacenados se tiene a: *A. glaucus*, *A. restrictus*, *A. ochraceus*, *A. candidus*, *A. flavus* y *A. versicolor*, entre otros. Cada uno de estos grupos, a excepción de *A. candidus* que sólo presenta una especie, está integrado por especies con características morfológicas generales muy similares dentro del grupo, su clasificación en especies individuales se basa principalmente en características morfológicas específicas (forma, estructura, tamaño y color) y fisiológicas (reproducción y crecimiento) (64).

Para caracterizar y diferenciar el género *Aspergillus* se han utilizado métodos basados en biología molecular tales como la caracterización de metabolitos (30), complementariedad del DNA (52), RFLPs de DNA mitocondrial y de DNA que codifica para los rRNA en *A. niger* (95), análisis del patrón de restricción en DNA mitocondrial (62), entre otros.

También se han usado métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), éstos han permitido establecer relaciones genéticas entre aislamientos de *A. flavus* sect. *flavi* con base en la variabilidad de un sitio de

restricción en una porción del gen de la Taka-amilasa A (32). También han permitido asociar grupos de compatibilidad vegetativa y morfología con los polimorfismos de DNA (RAPD) en *A. flavus* (5). Además, analizar especies de *Aspergillus*, mediante RAPD (63). Diferenciar especies con PCR específico, mediante iniciadores que complementan con la secuencia de los genes *ver-1*, *omt-1* y *apa-2* involucrados en la ruta de la biosíntesis de aflatoxinas (84). Además se ha detectado DNA de especies de *Aspergillus* en muestras de lavados broncoalveolar por PCR competitivo (14) y se ha construido y caracterizado una sonda con DNA mitocondrial de *A. flavus* var. *flavus* para distinguir entre cepas de *A. flavus* (59).

De los métodos moleculares utilizados, para los estudios taxonómicos en *Aspergillus* spp, destacan; el análisis de las secuencias de DNA que codifican para los RNA ribosomales (rRNA) y los espaciadores transcriptos internos (ITS) así como la técnica de RAPD, las cuales se revisan a continuación.

2.1. Análisis genético con base en las secuencias intergénicas de los genes ribosomales (ITS)

Otra opción para la determinación taxonómica es el análisis molecular de las secuencias que codifican para los genes de los RNA ribosomales (rRNA) eucariotes 18S, 5.8S y 28S. Estas secuencias son fácilmente aisladas, ya que son moderadamente repetitivas y son un blanco atractivo para los ensayos de PCR. Las regiones de estos genes se encuentran altamente conservadas y están separadas por dos espacios transcritos internos (ITS). Las regiones más conservadas se utilizan para la clasificación a niveles taxonómicos superiores (de género a *Phylum*), mientras las regiones ITS, menos conservadas, se utilizan a nivel de especie y subespecie (96). Las diferencias en las secuencias ITS son efectivas para la diferenciación de variedades y especies de *Gossypium* (58), en la detección y clasificación de *Verticillium tricorpus* (65), *V. dahliae* y *V. albo-atrum* con iniciadores específicos que diferencian entre estas dos especies que atacan el cultivo de alfalfa (66). Además, los análisis con enzimas de restricción de las secuencias ITS han sido utilizados para distinguir entre especies y aislamientos de nematodos *Meloidogyne hapla* y *M. chitwoodi* (109).

Con el propósito de diagnosticar la aspergilosis invasiva en pacientes inmunocomprometidos, Melchers y cols. en 1994 (60), compararon la secuencia

nucleotídica de los genes que codifican el rRNA 18S de *A. nidulans*, *A. terreus*, *A. niger* y *A. flavus* junto con la de *A. fumigatus*, y el de otros microorganismos de importancia clínica. Se identificaron secuencias específicas del género en las regiones V7 y V9 del rRNA 18S. Además se logró la determinación sensitiva y específica de *Aspergillus* mediante hibridación Southern blot y análisis de restricción.

Con la finalidad de resumir la calificación filogenética molecular de los hongos Taylor, 1995 (92) discute los siguientes conceptos (i) el lugar de los hongos en el todo de la vida, (ii) la relación de la importancia médica del hongo con otros hongos como organismos modelo y (iii) la integración del hongo asexual y sexual en una clasificación basado en la comparación de la secuencia de los genes ribosomales. Este discute la estrecha relación del reino animal y de los hongos y dentro del orden Eurotiales, considera dos géneros mitospóricos de importancia económica: *Aspergillus* y *Penicillium*, los cuales contienen especies patogénicas. En *Aspergillus* se tienen 16 especies que han sido reportadas como causa de enfermedad en humanos, pero solamente cuatro de ellas son consideradas en la mayoría de los reportes clínicos, éstas son: *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, y *A. terreus*. Además se tienen evidencias moleculares que reportan relaciones filogenéticas de *A. fumigatus* y *A. flavus*. Por otra parte, al considerar que los caracteres moleculares están presentes en todos los hongos, independientemente de poseer o no reproducción sexual, la necesidad de ubicar a los hongos como Deuteromycetes tiende a desaparecer.

El análisis de los polimorfismos de conformacionales de cadena sencilla (SSCP) a partir de fragmentos amplificados por PCR se presenta como un método sensible y rápido para identificar cambios pequeños en la secuencia del DNA. Un método rápido, simple y no isotópico ha sido desarrollado, éste involucra la desnaturalización del DNA de doble cadena (dsDNA) por álcali, uso de formamida, colorantes de carga y detección por teñimiento con bromuro de etidio. La conformación dependiente de la secuencia y la movilidad del DNA de cadena sencilla (ssDNA) son afectadas por un número de factores físicos, dentro de los cuales se incluyen la composición del gel y las condiciones de electroforesis (103). Al inicio de esta investigación no se tenían reportes del uso de esta técnica en la diferenciación de especies de *Aspergillus*, y fue hasta 1996 que Kumeda y Asao la utilizaron para distinguir entre especies de *Aspergillus* sección *Flavi*. (51). Para ésto, amplificaron

mediante PCR los espaciadores transcritos internos lo que incluyó la región 5.8S (ITS1-5.8S-ITS2), los productos de PCR obtenidos, de aproximadamente 570-590 pares de bases (pb), se sometieron a la técnica de SSCP con formamida al 20%. Encontraron que este análisis es económico y práctico para apoyar la identificación morfológica de los hongos, al clasificar 67 de 68 cepas de *Aspergillus* Sección *Flavi* dentro de cuatro grupos taxonómicos.

Además de los SSCP, el análisis de restricción de los productos de PCR, ha permitido distinguir entre especies, para lo anterior se han realizado digestiones con diferentes enzimas y se encontró que con *Dde* I se obtenían cuatro fragmentos de DNA para *A. flavus* y tres para *A. oryzae*. En general, los resultados del análisis de las diferentes especies con las enzimas de restricción fueron consistentes con los resultados de los SSCP, con excepción de *A. nomius* que no fue claramente diferenciada de *A. parasiticus/A. sojae* (51). Este tipo de análisis, con productos de PCR obtenidos con iniciadores que amplifican los ITS, se ha utilizado como herramienta para la identificación de especies en diferentes géneros del orden Glomales (79).

En general, el análisis de los fragmentos de DNA, amplificados por PCR, que codifican para los genes de los rRNA, tiene una gran utilidad en la clasificación taxonómica del género *Aspergillus*, su ventaja radica en que estas secuencias ITS son fácilmente amplificadas por PCR, por ser repetitivas y además presenta regiones conservadas y variables. Estas características permite identificar organismos desde un nivel taxonómico superior como género y a un nivel inferior de género mediante los análisis SSCP, patrones de restricción y PCR con iniciadores internos diseñados con base en las variaciones de secuencia existentes en el primer fragmento amplificado entre los organismos. Otro aspecto importante que se está explotando, son las diferencias y similitudes en secuencia de las regiones conservadas para inferir relaciones filogenéticas, considerando que la evolución implica cambios en el genoma de los organismos.

2.2. Análisis genético con base en la técnica de amplificación al azar de DNA polimórfico (RAPD)

En los análisis genéticos mediante RAPD, se requiere evaluar un gran número de individuos, para lo cual es necesario desarrollar métodos de extracción de DNA rápidos y simples que permitan evaluar el mayor número de individuos de una

población genética. Opciones en las que se reducen los pasos y el tiempo de extracción de DNA, son los métodos desarrollados por Oard y Dronavalli en 1992 (67) para especies vegetales, tales como son los cultivos de arroz y maíz y otro método de extracción de DNA de hongos desarrollado en 1992 por Cenis (18), entre otros.

La técnica de RAPD se ha utilizado en estudios de determinación genética (43), para distinguir entre cepas de una especie (4), en estudios de diversidad genética y su relación con la heterosis (47), estudios de migración y evolución (1), en el análisis taxonómico y evolutivo (25), entre otros usos. Además la técnica de RAPD ha sido usada con otros organismos como una alternativa a los RFLPs, por proveer información más fácil, rápida y segura para mapear las características genéticas de cualquier especie. Al comparar RAPD, RFLP e hibridaciones con sondas de DNA de secuencias repetitivas en 16 aislamientos de *A. fumigatus*, Anderson y cols. en 1996 (2), encontraron que la sonda M13 en combinación con el iniciador R108 dio el mismo nivel de discriminación que el consenso de tres técnicas de tipificación basadas en DNA. La técnica de RAPD, ha permitido obtener marcadores de DNA, y se presentó como una opción rápida y confiable para diferenciar aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* en algodón (3). La diferenciación por medio del análisis de RAPD, ha ayudado a obtener marcadores de DNA para observar la variabilidad en hongos patógenos de plantas, tal es el caso de la diferenciación de razas de *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* (24), *Fusarium oxysporum pisi* (40) y *Gremmeniella abietina* (41).

La presencia de variabilidad en la producción de aflatoxinas, se ha intentado asociar con marcadores bioquímicos y genéticos tales como: producción de lípidos y esteroides, isoenzimas, grupos de compatibilidad vegetativa y polimorfismos en DNA nuclear y mitocondrial, pero ninguno de éstos ha tenido éxito. Recientemente se ha encontrado que la producción de aflatoxinas difiere significativamente entre grupos de compatibilidad vegetativa, y estos grupos son consistentes con los polimorfismos de DNA (5). La habilidad para caracterizar y monitorear cepas genéticamente idénticas de poblaciones de *Aspergillus* spp, permitirá determinar cómo la contaminación se dispersa y cuales poblaciones están asociadas con los maíces afectados (59).

La técnica de RAPD se está utilizando ampliamente en estudios genéticos y sistemáticos, debido a que presenta ventajas, con respecto a estudios basados en caracteres morfológicos y a otras técnicas moleculares (RFLP e isoenzimas) principalmente en que no maneja radioactividad o fluorescencia, se realiza con cantidades mínimas de DNA, como se analiza el DNA no se tiene influencia del medio ambiente y que además, esta técnica es aplicable a cualquier organismo. Por lo anterior, el uso de RAPD ha aportado progresos en estudios de determinación genética e identificación marcadores moleculares en una gran variedad de organismos y particularmente en hongos de importancia para el hombre.

3. Genes involucrados en la ruta de la biosíntesis de aflatoxinas

Las investigaciones iniciales de la genética de *A. flavus* y *A. parasiticus* estuvieron obstaculizadas por la falta de reproducción sexual en estas especies de hongos imperfectos. Sin embargo, cepas marcadas de *A. parasiticus* y *A. flavus* han sido analizadas genéticamente mediante el ciclo parasexual (50). La genética de *A. flavus* ha sido mejor estudiada que la de *A. parasiticus*, en esta especie más de 30 genes han sido mapeados en ocho grupos ligados (7). Recientemente se han derivado 24 mutantes de la línea parental PC-7 de *A. flavus*. Estos mutantes no son productores de aflatoxinas y varían en el color de espora. En la cepa PC-7, 11 loci relacionados con aflatoxinas han sido mapeado a través de recombinación parasexual, 9 están sobre el grupo ligado VII, uno en el grupo II y uno en el grupo VIII. La secuencia de marcadores sobre el grupo VII son (*nor*, *Afl-1*), *lev*, *afl-15* *arg-7*, *afl-17* y centrómero. Los loci de aflatoxinas son todos recesivos en diploides, con la excepción del mutante que contiene el alelo *afl-1*.

Los genes en la ruta biosintética de aflatoxinas pueden ser identificados fácilmente por su habilidad para complementar cepas de *A. flavus* por medio de bloqueo específico en la ruta a través de transformación (44, 74, 76, 87, 102). En *A. parasiticus* mediante selección diferencial se identificaron clones asociados con la biosíntesis de aflatoxinas, uno de estos clones correspondió al gen sintasa policétido (*pksL1*), gen clave para la iniciación de la biosíntesis de aflatoxinas (33). Posteriormente un nuevo gen, *fas-1A*, directamente involucrado en la biosíntesis de aflatoxinas B₁, fue clonado por complementación genética de una cepa mutante de *A. parasiticus*, bloqueada en dos sitios únicos de la ruta biosintética. Los datos obtenidos en 1996 por Mahanthi y cols. (56), sugieren que *fas-1A* codifica para una

nueva sintasa ácido graso, la cual sintetiza parte de la estructura policétido de AFB₁. La caracterización de la función de los genes *ver-1A* y *ver-1B* indicó que *ver-1A* es el gen funcional en la cepa SU-1 de *A. parasiticus* y el producto del gen está involucrado en la conversión de versicolorin A a esterigmatocistina (ST) (54), el gen *norA* codifica para deshidrogenasa (17).

Mediante una biblioteca de DNA complementario (cDNA) construida de RNA aislado de *A. parasiticus* SRRC 143, se clonó un inserto de cDNA (1,460 pb) que contiene la región codificante del gen *omt-1* (105). Se determinó que esta secuencia codifica para una enzima de 46 kilodaltons (kDa). Estudios posteriores de ensayos de la actividad enzimática de extractos crudos de *E. coli* mostraron que esterigmatocistina (ST) es convertido a O-metilesterigmatocistina (O-MST) en la presencia de S-adenosil-L-metionina (SAM).

Recientemente en *A. nidulans* se determinó que el gen *stcP* codifica para una O-metiltransferasa que es requerida para la biosíntesis de ST (49). Por otra parte, clonaron un gen de *A. parasiticus* (72), designado como *apa-2*, este gen fue identificado como un gen regulador en las biosíntesis de aflatoxinas. El gen *apa-2* fue clonado en base a la sobreproducción de intermediarios de la ruta biosintética seguido de la transformación de cepas del hongo con DNA cósmido que contiene los genes de la biosíntesis de aflatoxinas *nor-1* y *ver-1*. La transformación de una cepa, que acumula O-MST, mediante un fragmento de DNA que contenía el gen *apa-2* resultó en la sobreproducción de todos los intermediarios de ruta analizados, lo que sugirió que *apa-2* aumenta una función existente del gen.

La ruta biosintética de la producción de aflatoxinas involucra varios pasos enzimáticos que parecen ser regulados por los genes *afl-2* en *A. flavus* y *apa-2* en *A. parasiticus*. Al considerar la homología de los genes y su habilidad para regular la biosíntesis de aflatoxinas se ha sugerido que sean designados como *afl-R*. Además el gen *afl-2* es requerido para la expresión de los genes *nor-1* y *ver-1* en *A. flavus* (101). Recientemente, se ha utilizado el gen *af1R* de *A. parasiticus* para examinar la presencia de homólogos de este gen en otras especies de *Aspergillus* sección *Flavi*. El gen *af1R* parece estar involucrado en la regulación de la biosíntesis de aflatoxinas, ya que codifica para una proteína de unión al DNA. Por otra parte, mediante iniciadores que amplifican un segmento de aproximadamente 500 pb se encontró que

el dominio de unión al DNA estuvo presente en todos los aislados examinados de *A. sojae*, *A. flavus* y *A. parasiticus* en algunos de *A. oryzae* (71).

Las aflatoxinas son sintetizadas por condensación de unidades acetato; su síntesis esta estimada que involucra al menos 16 enzimas diferentes. En otro estudio realizado por Yu y cols. en 1995 (106) mostraron que al menos nueve genes involucrados en la ruta de la biosíntesis de aflatoxinas están localizados dentro de un fragmento de DNA de 60 kilobases (kb). Cuatro de estos genes, *nor-1*, *aflR*, *ver-1*, y *omtA* (previamente llamado *omt-1*), han sido clonados de *A. flavus* y *A. parasiticus*. Además otros cinco genes, *pksA*, *uvm8*, *aad*, *ord-1* y *ord-2* han sido clonados recientemente de *A. parasiticus*. Las distancias físicas y las direcciones de transcripción han sido determinadas, quedando en el orden siguiente: *pksA*, *nor-1*, *uvm8*, *aflR*, *aad*, *ver-1*, *ord-1*, *ord-2* y *omtA* en *A. parasiticus* y *nor-1*, *aflR*, *ver-1*, *ord-1*, *ord-2* y *omtA* en *A. flavus*. Recientemente se ha determinado que *ord1*, una oxidoreductasa, es la responsable de la conversión de O-MST a aflatoxina en *A. flavus* (75, 76). Se ha demostrado que la función de *AflR* está conservada entre *Aspergillus* spp y que la expresión de *aflR* es suficiente para activar genes en la ruta de ST (107). Además *aflR* está involucrado en la regulación de partes múltiples de la ruta de la biosíntesis de aflatoxinas (73). La ruta de la biosíntesis de aflatoxinas y algunos de los genes involucrados se muestran en la Figura 1.

En el hongo, aunque los factores que influyen en el metabolismo primario afectan el metabolismo secundario, los metabolitos secundarios no aparecen durante la fase del crecimiento del hongo (trofofase) debido a que las enzimas necesarias para su formación están ausentes (19). Se ha establecido una relación estrecha entre la biosíntesis de aflatoxinas y biosíntesis de lípidos (28) y es conocido que la síntesis de proteínas disminuye durante la fase de producción de aflatoxinas (idiofase) (27). La biosíntesis de policétidos representa el paso inicial en el cual el organismo es llevado a la producción del producto del metabolismo secundario y muchos de los pasos son esencialmente irreversibles.

En la ruta de la biosíntesis de aflatoxinas el paso de ST A O-MST y O-metildihidroST es único para *A. flavus* y *A. parasiticus* (10). La enzima que cataliza este paso es una metiltransferasa codificada por el gen *omt-1*. Muchas especies de hongos (ejemplo *A. nidulans*) producen ST y sus precursores pero no producen aflatoxinas B₁ y B₂. Recientemente se reportó un caso que podría ser considerado

como excepción ya que se detectó producción de aflatoxinas B₁ y B₂ por *A. tamarii* (subgénero *Cicumdati* sección *Flavi*) (39).

Por otra parte los metabolitos precursores de la biosíntesis de aflatoxinas están agrupados en dos etapas: metabolismo primario y secundario. Dentro del secundario existen pasos enzimáticos específicos para la producción de las aflatoxinas B₁ y B₂ que no son comunes en otros hongos. Mediante un método inmunoquímico basado en la aplicación de anticuerpos monoclonales preparados contra ocratoxina A, se logró la selección de producción de ocratoxina A entre *aspergilli* (94).

Lo anterior apoya que mediante la detección de metabolitos intermediarios de la biosíntesis de aflatoxinas, con serología de las proteínas-enzimas específicas de la ruta de la biosíntesis, ayudará al diagnóstico de la contaminación en maíz. Lo que permitirá diseñar una estrategia de predicción de la contaminación precosecha de aflatoxinas, de suma importancia en el manejo agronómico del cultivo, en la toma de decisiones para la comercialización y en un futuro para su control precosecha.

4. Métodos oficiales para determinar y cuantificar aflatoxinas

De los métodos oficiales para determinar y cuantificar aflatoxinas se tienen los siguientes: (1) Espectrofotómetros-Cromatográficos de Capa Fina, para determinar la concentración de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ o G₂. (2) Cromatografía Líquida, para la determinación de aflatoxinas en maíz y mantequilla de cacahuete. (3) Inmunoadsorción Ligado a Enzima (ELISA), para identificar aflatoxina B₁, B₂ y G₂ que contaminan semilla de algodón y mantequilla de cacahuete en más de 20 ng/g y en maíz y cacahuete en más de 30 ng/g. Si se tienen más de 5% de falsos negativos se repite la prueba y se deben reanalizar las muestras positivas por métodos oficiales cuantitativos. (4) ELISA, para identificar aflatoxina B₁ en más de 20 ng/g, en maíz y cacahuete tostado. (5) Minicolumna Romer, para detección de más de 5 ppb de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, en almendras; más de 10 ppb en maíz amarillo y blanco y más de 15 ppb en alimentos mezclados. (6) Minicolumna De Holaday-Velasco, para la detección de más de 10 ppb de aflatoxinas totales en maíz blanco y amarillo; en cacahuete con cáscara y crudo. (7) Columnas de Inmunoafinidad (Aflatest), para la determinación de aflatoxinas B₁, B₂ y G₂ en más de 10 ng total de aflatoxinas/g en maíz, cacahuete crudo y mantequilla de cacahuete. (8) Columna

Multifuncional (Mycosep), aplicable para la determinación de 5-30 ng de aflatoxinas totales/g en maíz, almendras, cacahuete, pistacho y nueces de brasil (83).

Un número alarmante de micotoxinas, entre éstas las aflatoxinas y específicamente la AFB₁, poseen actividades carcinogénicas, mutagénicas y otras actividades que afectan de una manera u otra el aparato genético. La interacción de las aflatoxinas con los ácidos nucleicos puede ser una posible explicación de sus actividades carcinogénicas y genéticas (90). Con frecuencia, el maíz es contaminado por una combinación de aflatoxina B₁ y B₂ y, es menos frecuente la combinación B₁, B₂, G₁ y G₂. Para determinar la presencia de contaminación por aflatoxinas se considera que la técnica de ELISA puede ser ampliamente desarrollada y utilizada, debido a su rapidez facilidad de preparación de la muestra y un potencial bajo costo por análisis. La desventaja actual es la especificidad por la aflatoxina B₁ y reacción cruzada con las otras aflatoxinas. Por lo anterior la técnica de ELISA necesita mayor refinamiento de tal manera que permita distinguir individualmente a cada aflatoxina o de manera conjunta a todas ellas (99). Para cuantificar aflatoxinas se combina las columnas de inmunoafinidad con fluorometría (93).

Recientemente se obtuvieron anticuerpos policlonales contra cepas aflatoxigénicas de *A. parasiticus* mediante dos fuentes diferentes para la extracción de anticuerpos: (i) filtrados de cultivo sobre el cual el hongo había sido cultivado (ii) dos proteínas quiméricas, expresadas en *E. coli* como productos separados, de los genes *ver-1* y *apa-2*, los cuales están involucrados en la biosíntesis de aflatoxinas. La utilización de los anticuerpos como un sistema multianticuerpos combinado con técnicas de PCR se podría disponer de una herramienta para la detección rápida, sensible y precisa de productos de aflatoxinas presentes en alimentos y granos (85).

De las opciones para controlar y/o eliminar la contaminación por aflatoxinas, la biología molecular tiene un papel sumamente importante, sin menospreciar los trabajos de investigación en destoxificación química, medios físicos de control y el control biológico. Dentro de las estrategias para eliminar la contaminación precosecha de aflatoxinas están (i) reemplazar cepas aflatoxigénicas con cepas no aflatoxigénicas en el campo, (ii) incorporar genes antifungosos expresados en el tejido específico de la planta (ejemplo tejidos de semillas) y (iii) mejoramiento genético para resistencia varietal (12).

Considerando lo anterior, el análisis genético de *Aspergillus* spp, mediante métodos moleculares, con fines de identificación de la variabilidad genética así como el caracterizar hongos productores de aflatoxinas (aflatoxigénicos) en *A. flavus*, aunado a estudios que utilicen los avances en el conocimiento de los genes involucrados en la ruta de la biosíntesis de aflatoxinas con fines de diagnóstico serológico, permitirá generar conocimientos que apoyen la identificación de la contaminación de aflatoxinas en el cultivo de maíz el cual es de importancia socioeconómica para México.

Capítulo 3

MATERIALES Y METODOLOGIA

1. Material biológico

1.1. Aislamiento de *Aspergillus* spp

A partir de muestras de maíz contaminadas se realizaron aislamientos del hongo; éstos se integraron en un cepario a partir del cual se realizó parte de esta investigación. Para los aislamientos del hongo realizados en nuestro laboratorio, el maíz contaminado, se trató 1 min con hipoclorito de sodio 1%. Posteriormente, se lavó con cloruro de sodio 1.5% o agua destilada, se sembraron en agar-papa-dextrosa (PDA marca Bioxon) y se incubaron 72 h/25 °C. Estos aislamientos fueron identificados, mediante microcultivos, con base en las características morfológicas tales como forma, color y tamaño de las cabezas conidiales características del conidióforo y de la colonia, entre otras. Para la identificación anterior, se utilizó el Manual para la Identificación de Hongos en Granos y sus Derivados de Moreno, 1988 (64), así como las claves para la identificación de grupo taxonómico y especies de Raper y Fennell, 1965 (78).

1.2. Mantenimiento de los aislamientos

Las cepas se conservaron mediante dos métodos: (1). Preservación del cultivo, en medio PDA y se cubrió con aceite mineral estéril. (2). Almacenamiento del cultivo en glicerol al 25% v/v a -70 °C en criotubos. Los tubos con PDA se inocularon con una asada del cultivo original, se sembró por punción para que el crecimiento fuera uniforme, se incubó por 7 días a temperatura ambiente, después de observar el crecimiento se adicionó el aceite mineral estéril hasta cubrir el crecimiento, todo bajo condiciones de asepsia. La inoculación de las cepas en los criotubos se llevó a cabo con una asada del cultivo original, se almacenó a -70 °C. Para determinar la reactivación de la cepa se tomaron 10 µl, y se inocularon en una caja petri con PDA, se incubó por 4 días a temperatura ambiente.

1.3. Obtención de cultivos monospóricos

Para obtener cultivos monospóricos, con una pipeta pasteur se sembró sobre PDA una suspensión de esporas contenida en una gota de agua ultrapura estéril. Se distribuyó la suspensión con una varilla curva de vidrio y se dejó adsorber por 30

min. Posteriormente las cajas se incubaron en posición invertida 26 h/25 °C. Se seleccionaron las esporas con una aguja entomológica mediante observación microscópica y aumento de 10. Cinco esporas lo suficientemente aisladas se sembraron en cajas con medio PDA. Las cajas en las que existió crecimiento, fueron consideradas como un cultivo monospórico.

2. Extracción del DNA.

2.1. Producción de micelio

Para la producción de micelio de las cepas de *Aspergillus* se utilizó el medio de cultivo líquido de papa-dextrosa (PD), el cual se preparó de la siguiente manera: 350 g de papa en 1000 ml de agua bidestilada, se calentaron hasta punto de cocción, después se filtró para eliminar los sólidos generados durante su calentamiento. Se agregó al filtrado 20 g de dextrosa (SIGMA Inc.) y se esterilizó 15 min/121 °C. Posteriormente a la siembra se incubó por 72 h, a una temperatura de 25 °C en una incubadora Thermolyne modelo Rossi 1000.

2.2. Purificación de DNA

A partir de micelio de *Aspergillus*, se probaron diferentes métodos de extracción de DNA tales como: el método "Universal" de extracción de DNA y modificado para tejidos vegetales (57), el método Cenis para extracción de DNA para PCR (18) con volúmenes de 0.5 ml y 10 ml de medio para la producción de micelio, el método Chang de extracción de DNA utilizado en *Aspergillus* (71), y el método Moller de extracción de DNA de alto peso molecular para hongos (61).

2.3. Protocolos de extracción de DNA

2.3.1. Método "Universal" de extracción de DNA (57).

Este método ha sido utilizado por Martínez-Soriano, 1993, para la obtención de DNA a partir de tejidos y sangre y por su sencillez se probó para la obtención de DNA de hongos.

Se tomó una asada del cultivo y se inoculó en 15 ml del medio líquido Papa-Dextrosa en un tubo Nalgene. Se incubó por 72 h/25 °C para lograr el crecimiento micelial. El tubo con el micelio se centrifugó a 6,000 rpm en una centrífuga Beckman modelo J2-21 por 3 min, el medio de cultivo se decantó y el micelio se lavó con 5 ml

de agua bidestilada estéril, se volvió a centrifugar para eliminar el agua. El micelio se resuspendió en 2 ml de solución de lisis (2% Tritón X, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0 1% SDS), 1 ml de fenol saturado (82) y 1 ml de SEVAG (cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 vol/vol) se mezclaron por 4 min con la ayuda de un vortex G-560 VWR Scientific. Enseguida se le adicionó 2 ml de buffer Tris-EDTA (Buffer TE) (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA). Se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min, se extrajeron aproximadamente 300µl de la fase superior y se transfirieron a un tubo Eppendorf. Para precipitar el DNA se le agregó al tubo 2.5 vol de etanol (KCl 2%) y se incubó por 2 h/-20 °C, después se centrifugaron los tubos a 10,000 rpm por 3 min en una microcentrífuga Eppendorf modelo 5415 C. El sobrenadante se decantó y el DNA se lavó con 500 µl de etanol al 70% frío; nuevamente se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min, se eliminó el sobrenadante y los tubos se colocaron en posición invertida, para eliminar los restos de etanol. Eliminado el etanol, el DNA se resuspendió en 100 µl de buffer TE y se almacenó a -20 °C.

2.3.2. Método "Cenis" para extracción de DNA para PCR (18)

Un tubo Eppendorf con 0.5 ml de medio de cultivo con micelio se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min, el medio de cultivo se eliminó y el micelio se lavó con 500 µl de buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM de EDTA pH 8.0). Nuevamente se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min para eliminar el buffer. Se adicionaron 300 µl del buffer de extracción (200 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM de NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS). Posteriormente el micelio se trituró con un homogenizador de tejidos Contes por espacio de 4 min y se le agregaron 150 µl de acetato de sodio 3 M pH 5.2, se incubó por espacio de 10 min en un congelador a -20 °C. Después de la incubación, los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 min. El sobrenadante (aproximadamente 400 µl) se transfirió a otro tubo Eppendorf estéril, se le agregó 400 µl de isopropanol frío y se incubó por 15 min en hielo. Para precipitar el DNA se centrifugó por 5 min a 10,000 rpm. La pastilla formada se lavó con etanol al 70% frío, nuevamente se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min y se decantó el sobrenadante. Los tubos se colocaron en posición invertida para eliminar el exceso de etanol. Para resuspender la pastilla se agregaron 50 µl de buffer TE y se almacenó a -20 °C.

2.3.3. Método "Chang" de extracción de DNA utilizado en *Aspergillus* (71)

La generación de micelio se realizó en tubos Nalgene con 15 ml de medio cultivo líquido papa-dextrosa, incubándose por 72 h/25 °C. Posteriormente el micelio se centrifugó a 15,000 rpm por 5 min en una centrífuga Beckman modelo J2-21, se eliminó el medio de cultivo y se lavó el micelio con 5 ml de agua bidestilada estéril. El micelio ya lavado, se colocó en un mortero estéril y se molió con nitrógeno líquido. El micelio triturado se transfirió a tubos Eppendorf estériles y se resuspendió en 500 µl de buffer extracción (400 mM NaCl, 40 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 2% SDS). Se incubó 20 min/68 °C, se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo y estéril, enseguida se le agregó 25 µl de acetato de potasio 5 M pH 4.2. A esta mezcla se le agregaron 500 µl de fenol saturado mas 500 µl de SEVAG (cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 vol/vol), se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min. De la fase acuosa se tomaron 300 µl y se transfirieron a otro tubo Eppendorf. Se le agregó un volumen igual de isopropanol frío (300 µl) y se incubó 15 min/-20 °C, enseguida se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min. El sobrenadante se decantó y la pastilla que se formó se lavó dos veces con etanol al 70%; el DNA que se obtuvo se resuspendió en 50 µl de buffer TE.

2.3.4. Método "Moller" de extracción de DNA de alto peso molecular para hongos (61)

El micelio se centrifugó a 15,000 rpm por 5 min, el medio de cultivo se desechó y el micelio se colocó con ayuda de una asa bacteriológica en morteros estériles. Posteriormente se procedió a molerlo con nitrógeno líquido, ya molido, el micelio se transfirió a un tubo Eppendorf estéril con 500 µl de buffer TES (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 2% SDS). Se adicionaron 7 µl de Proteínasa K de un stock de 10 mg/ml y se incubó 30 min/58 °C, se ajustó la concentración a 1.4 M con 140 µl de NaCl 5M. Se agregó 65 µl de CTAB al 10% y se incubó 10 min/65 °C. Se mezcló con 500 µl de fenol saturado mas 500 µl de SEVAG, y se centrifugó a 10,000 rpm a 4 °C por 10 min. Posteriormente la fase superior se transfirió un tubo Eppendorf estéril y se le agregó 225 µl de acetato de amonio 5 M. El tubo se colocó en hielo por aproximadamente 30 min para nuevamente centrifugarlo a 10,000 rpm por 10 min/4 °C. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se le agregó 500 µl de isopropanol frío para incubarlo en hielo por 30 min. El tubo se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min y se eliminó el sobrenadante. La pastilla se lavó dos veces con etanol al 70%, entre

cada lavada se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min. El DNA que se obtuvo al final se resuspendió en 50 µl de buffer TE y se almacenó a -20 °C.

2.3.5. Método "Universal" de extracción de DNA para tejidos vegetales

(Modificado del de extracción de DNA en tejidos y sangre) (57)

La producción de micelio se realizó en tubos Nalgene de 15 ml. Se eliminó el medio de cultivo por centrifugación a 15,000 rpm por 5 min, se agregó 5 ml de agua bidestilada estéril para lavar el micelio, se centrifugó 5 min a 15,000 rpm, se decantó el agua y el micelio se transfirió a un mortero estéril para proceder a molerlo con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Ya molido se colocó nuevamente en un tubo para Nalgene y se le adicionó 800 µl de solución de lisis (Tritón 10X 2%, SDS 1%, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0). El tubo se mantuvo en hielo; e inmediatamente se centrifugó 2 min a 5,000 rpm. Se le agregó al tubo 400 µl de fenol saturado y 400 µl de SEVAG, se centrifugó a 10,000 rpm 10 min/4 °C. La fase acuosa, aproximadamente 300 µl, se transfirió a tubos Eppendorf y se le adicionó 750 µl de etanol salado (2 % de CH₃COOK). Se centrifugó a 10,000 rpm por 2 min y el sobrenadante se decantó, posteriormente se lavó con 500µl de etanol al 70% frío. Se dejó secar en posición invertida, se resuspendió en 100 µl de buffer TE y se conservó a -20 °C.

3. PCR sobre Regiones ITS

Las reacciones de PCR del DNA de *Aspergillus* spp se llevaron a cabo en tubos Eppendorf de 500 µl de capacidad, en un volumen total de 50 µl de reacción que contenía 5-10 ng de DNA, 10 pmoles de los iniciadores, 200 µM de una mezcla de los cuatro desoxinucleósidos trifosfatados (GIBCO-BRL), 1 mM de MgCl₂ (GIBCO-BRL), 1X del buffer Taq (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl) y 2.5 unidades de la enzima DNA *Taq*-polimerasa.

Las reacciones de PCR se realizaron con los iniciadores C015-14 5'-caagggtttccgtaggtg-3' y C021-01 5'-cgcttattgatatgctt-3', los cuales son complementarios con la secuencia de las regiones conservadas 18S y 28S (Fig. 2) y han sido utilizados en la detección y diferenciación de especies de *Verticillium* por Nazar y cols., en 1991 (66).

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Perkin Elmer®, por un lapso de tiempo aproximado de 3 h, con 30 min de las condiciones y temperaturas siguientes: Un paso de desnaturalización inicial de 2 min/94 °C, seguido de 30 ciclos de tres pasos/ciclo siguientes: desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento de iniciadores a 45 °C por 1 min y una extensión a 72 °C por 2 min, con una extensión final de 5 min/72 °C.

3.1. Secuenciación de los productos de ITS-PCR

Los productos de PCR fueron clonados en el sistema pGEM®-T (77) y secuenciados por el método de Sanger, con ddNTP's fluorescentes. Para lo anterior se hizo una reacción de polimerización en cadena con 8 µl de mezcla de reacción (125 mM Tris-HCl, pH 9.5, 5 mM de MgCl₂, 0.25 mM de cada dNTP y de cada ddNTP fluorescente, ampliTAQ DNA polimerasa, pirofosfatasa inorgánica termoestable), 500 ng de molde de cadena doble y 3.2 pmoles de iniciador, todo lo anterior en un volumen final de 20 µl. Las condiciones para el termociclador fueron: 30 seg/96 °C , 15 seg/50 °C y 4 min/60 °C por 25 ciclos. Posterior a la reacción de polimerización, la mezcla se transfirió por una columna de purificación (Centri- Sep de Perkin Elmer) para eliminar los nucleótidos no incorporados y las sales. La muestra recuperada se evaporó y resuspendió en 6 µl de buffer de corrida (5 µl formamida, 1 µl 25 mM EDTA, pH 8.0, 50 mg/ml azul dextran), se calentó 2 min/90 °C y se cargó en el gel de secuenciación (Acrilamida/bis-acrilamida al 4 %, TBE 1X, Urea 8 M). Las condiciones de corrida fueron las siguientes: 1800 Voltios (V), 20-40 mAmperios (mA), 7 h/51 °C.

3.2. Electroforesis de los productos de PCR

El fraccionamiento de los productos derivados de PCR se llevó a cabo en geles de agarosa (SIGMA) al 1.5 %. Se pesó 0.350 g de agarosa y se mezcló con 25 ml de buffer TBE 0.5X (0.045 M Tris-borato, 0.001 M EDTA pH 8.0) (82). Para teñir los geles, se le adicionó 1.5 µl de bromuro de etidio de una solución concentrada de 10 µg/ml. El gel de agarosa ya solidificado se colocó en una cámara de electroforesis (Bio-Rad) inmerso en un buffer de corrimiento TBE 0.5X. Posteriormente de 5 a 15 µl del producto de la PCR se mezclaron con 2 µl de solución Halt (25% Glicerol, 0.25 % Xilencianol, 0.25% azul de bromofenol, 50 mM de Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA, 0.25% SDS) y se colocaron en los pozos del gel; las condiciones de voltaje fueron de 100 V por 90 min. Los voltajes requeridos fueron dados por una fuente de poder Bio-

Rad modelo 200/2.0. Después de fraccionar las muestras se llevó a cabo la visualización de los geles de agarosa en un transiluminador de luz ultravioleta Fotodyne. Posteriormente los geles fueron fotografiados con una cámara Fotodyne-Polaroid, FCR-10, filtro TIFFEN 40.5MM RED 23A, provista de una película Polaroid 667 instantánea.

3.3. Obtención de los polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP) de los productos de PCR-ITS

Para realizar los SSCP, un volumen de 15 μ l del producto de PCR se concentró y resuspendió en 50 μ l de formamida al 100% + 0.1% de xilencianol. Esta mezcla se calentó 10 min/95 °C con agitación a los 5 min. Posteriormente se enfrió en hielo con cloruro de amonio para obtener una temperatura de -20 °C. Las muestras se fraccionaron en un gel de poliacrilamida al 5% con 140 V por 180 min en una cámara de 23 cm x 20 cm x 0.5 mm. Posteriormente el gel se tiñó con nitrato de plata (46).

3.4. Obtención de patrones electroforéticos de la digestión con enzimas de restricción de los fragmentos amplificados ITS

Una vez obtenidos los fragmentos amplificados por PCR, se procedió a realizar las digestiones con enzimas de restricción. Para esto se revisó en el banco de genes la secuencia disponible de *A. awamori* y se realizó el análisis de restricción con el programa computacional DNA Strider 1.1. Con base a estos análisis y ha resultados obtenidos por Kumeda y Asao, 1996 (51), se seleccionaron las enzimas *Xho* I, *Eco*R I y *Dde* I. Las reacciones se realizaron con 20 μ l de producto de PCR al cual se le agregaron 10 U de enzima y 2 μ l de buffer. Esta se incubó 5 h/37 °C. Los productos de las digestiones se fraccionaron en un gel de poliacrilamida al 15% a 15 mA por 120 min en una cámara de 18 cm x 20 cm por 1 mm (BioRad). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio.

3.5. Análisis de las secuencias de los fragmentos ITS

Las secuencias de los fragmentos ITS se analizaron mediante el programa computacional DNA Strider 1.1, para obtener los sitios de restricción. Además, para determinar las regiones conservadas y el árbol filogenético entre las especies se utilizó el programa computacional MegAlign, para esto se realizó primero el

alineamiento de bases de las secuencias con el método Joun Hein, 1990 (42). Se calcularon los porcentajes de similitud y divergencia con base en las regiones conservadas y variables de las secuencias.

4. Reacciones de RAPD-PCR

La PCR del DNA de *Aspergillus* spp se llevó a cabo en tubos Eppendorf de 500 µl de capacidad, en un volumen total de 25 µl de reacción con 40 ng de DNA, 20 pmoles de cada uno de los iniciadores (Tabla 1) (Bio-Synthesis, Inc.), 200 µM de una mezcla de los cuatro deoxinucleósidos trifosfatados (GIBCO-BRL), 2 mM de MgCl₂ (GIBCO-BRL), 1X del Buffer Taq (200 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM KCl) y 2.5 unidades de la enzima *Taq* DNA polimerasa.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador MJ Research modelo PTC-150, con las condiciones y temperaturas siguientes: Un paso de desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min, seguido de 36 ciclos con los pasos siguientes: desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento de iniciadores a 36 °C por 1 min, y extensión a 72 °C por 2 min. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa como se mencionó en el apartado 3.2.

4.1. Análisis de los patrones electroforéticos de RAPD-PCR

Los fragmentos amplificados mediante las reacciones de RAPD-PCR fueron analizados basados en la teoría de la taxonomía numérica (23). Cada fragmento en un aislamiento del hongo, fue considerado un dato del tipo de binario, es decir que tiene dos estados, presencia/ausencia. Con base a lo anterior se realizó una matriz básica de datos, en la cual cada uno de los aislamientos es comparado con el resto de los mismos incluidos en la evaluación. A partir de esta matriz se calcularon los coeficientes de asociación de Dice (89), los cuales miden las coincidencias y diferencias. Para las coincidencias se tiene el índice de similitud (IS), calculado con base al número doble de fragmentos compartidos entre los dos aislamientos, dividido entre la suma de todos los fragmentos en los dos aislamientos. Para el cálculo de las diferencias a la unidad se le resta el índice de similitud (1 - IS).

5. Expresión del gen *omt-A* en *Escherichia coli* mediante el sistema pET

5.1. Clonación y subclonación

El gen *omt-1*, posteriormente llamado *omt-A*, involucrado en la biosíntesis de aflatoxinas fue clonado en el plásmido pBluescript en 1993 por Yu y cols.(105) y donado amablemente por el Dr, Deepak Bhatnagar del Southern Regional Research Center, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, USA. El cDNA de 1460 pb fue aislado de *A. parasiticus*. Las actividades realizadas en nuestro laboratorio se presentan en el Figura 3.

Se seleccionaron las clonas y se decidió trabajar con la que contenía el gen *omt-A*, este inserto fue subclonado en el vector de expresión pET-30c(+) obtenido de Novagen, Inc., Madison Wis., con los sitios *Bam*H I y *Xho* I para ambos vectores. Para realizar la subclonación el inserto fue liberado del plásmido pBluescript SK mediante la digestión con la enzima *Bam*H I y posteriormente con *Xho* I de acuerdo con Sambrook y cols., 1989 (82). El plásmido pET-30c(+) fue linearizado con las mismas enzimas mencionadas. Posteriormente se ligó con aproximadamente 80 ng del vector linearizado, 200 ng del plásmido con el inserto liberado más 1.5 µl de buffer de ligasa 10X y 1.0 µl de enzima T4-DNA ligasa (GIBCO BRL). Esta reacción se incubó 3 h/16 °C y se dejó toda la noche a 4 °C. Antes de realizar la transformación la reacción se incubó 10 min/65 °C (104). Para transformar se utilizó 2 µl del producto de ligación y el equipo Gene Pulser y Pulse Controller (Bio-Rad Laboratories).

Las células de BL21 se prepararon de acuerdo al manual de electroporación de Bio-Rad-Laboratories solo que el volumen fue escalado a 100 ml. La electroporación se realizó en cubetas de 0.2 cm con las siguientes condiciones; 25 µF de conductancia, 200 Ohms de resistencia y 2.5 Kvolts de voltaje. Se agregó a la celda 1 ml de medio SOC, preparado de acuerdo a Sambrook y cols., 1989 (82), y de ésta se transfirieron a tubos de 13/100 para incubar 1 h/37 °C con 200 rpm. Posteriormente se sembraron en cajas con medio LB que contenía kanamicina (30 µg/ml). Para la selección de las colonias recombinantes se realizó la extracción de DNA plásmido por el método de lisis alcalina (82), y la identificación de las clonas con el inserto mediante digestión con las enzimas *Bam*H I y *Xho* I. Una vez identificada la clona recombinante con inserto se procedió a transformar la cepa de expresión BL21(DE3) con 80 ng de DNA y el método de transformación químico de CaCl₂. La cepa BL21(DE3) tiene, entre otras características, una copia del gen que

codifica para la T7 RNA polimerasa la cual es inducida por la adición de isopropil-tiogalactopiranoside (IPTG).

5.2. Expresión y obtención del extracto de proteínas

La construcción de pET-30c(+) más el inserto denominada pETOMTA tiene la característica de tener 10 codones de histidina en el extremo C-terminal del lado del inserto *omt-A*, además el gen de resistencia a kanamicina y el promotor T7. El plasmido pETOMT1 fue utilizado para transformar la cepa de clonación BL21 y posteriormente una vez verificada la construcción, mediante análisis de restricción, se transformó la cepa de expresión BL21(DE3). La expresión fue inducida al agregar IPTG a una concentración final de 1 mM. Para asegurar la estabilidad del plasmido se utilizó la técnica de plaqueo de Suter-Crazzolaro y Unsiker, 1995 (91), modificada para 100 ml y además en lugar de resuspender una colonia con plásmido en 200 µl de agua se utilizó 100 µl de medio SOC más 100 µl de agua, esto se resuspendió con agitación y se incubó 20 min/37 °C.

Posteriormente se sembró en una caja de LB con kanamicina a una concentración final de 30 µg/ml. Se incubó 18 h/37 °C. Un cuarto de la caja de petri con las colonias fueron tomadas y resuspendidas en 100 ml de medio LB con antibiótico. A partir de este inóculo se inició la inducción con 1 mM de IPTG para obtener a las 4 h el crecimiento para las pruebas de identificación de la proteína OMT-A. Para lo anterior, la purificación de la proteína se realizó bajo condiciones desnaturalizantes. El extracto de células fue obtenido al cosechar por centrifugación a 9,000 rpm por 5 min (centrifuga Beckman modelo J2-21). Se eliminó el medio y la pastilla de resuspendió en 40 ml de buffer de unión 1X (5 mM de imidazole, 0.5 M de NaCl 20 mM de Tris-HCl pH 7.9) que no contenía urea. Se sonicó por 4 min tres veces con descansos de 3 min. Posteriormente se centrifugó a 18,000 rpm por 15 min para coleccionar los cuerpos de inclusión y los restos celulares. La pastilla se resuspendió en 20 ml de buffer de unión (sin desnaturalizante). Se repitió nuevamente la centrifugación a 18,000 rpm por 15 min. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 5 ml de buffer de unión con 6M de urea. Se incubó en hielo por 1 h para disolver completamente la proteína. Se centrifugó a 25,000 rpm por 20 min para eliminar cualquier remanente de material insoluble. Finalmente se filtró el sobrenadante con una membrana de 0.45 micras antes de cargar la columna.

5.3. Purificación de la proteína OMT-A

Primeramente se preparó la columna con 2.5 ml de resina de unión a histidinas en la columna de polipropileno. Posteriormente se agregó 7.5 ml de agua bidestilada estéril, 12.5 ml de buffer de carga 1X (50 mM NiSO₄) y 7.5 ml de buffer de unión 1X con 6M de urea. Una vez que el buffer de unión drenó hasta la parte alta de la cama de la columna, se cargó el extracto de proteínas. Enseguida se agregaron 25 ml de buffer de unión 1X, se lavó la columna con 15 ml de buffer de imidazole 20 mM. Se eluyó la proteína con buffer de elución (1M imidazole, 0.5 M NaCl y 20 mM de Tris-HCl pH 7.9).

5.4. Electroforesis de proteínas

La electroforesis de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) (88). Los geles se realizaron al 12 % de la mezcla 29:1 acrilamida-bis acrilamida y la tinción se realizó con el colorante azul brillante Coomassie R 250.

Capítulo 4

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Integración del cepario

Se logró integrar un total de 23 aislamientos que representaron a las especies *A. parasiticus*, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. chevalieri*, *A. niger* y *A. ochraceus*, *A. parasiticus*. En el caso de la especie *A. flavus*, se contó con aislamientos obtenidos a partir de maíces (F3, F4, F6-F8, F1059, F1273 y F1299) y de humano (F5, F9 y F10) (Tabla 2).

Las cepas de referencia F1059, F1273 y F1299, de *A. flavus* fueron donadas por el Laboratorio de Bioquímica de Microorganismos de la Facultad de Ciencias Biológicas y fueron obtenidas originalmente del Southern Regional Research Center (SRRC) de los Estados Unidos de Norteamérica; estas cepas tienen como característica principal que son altamente productoras de aflatoxinas. Además, las cepas P148 y PSU-1 que pertenecen a la especie *A. parasiticus* también se caracterizan por ser productoras de aflatoxinas. La cepa PSU-1 ha sido utilizada para el aislamiento de genes involucrados en la ruta de la biosíntesis de aflatoxinas (74), como fue el caso del gen *omt-A* utilizado en esta investigación. Cabe mencionar, que la obtención de cultivos monospóricos de los aislamientos nacionales fue de suma importancia para asegurar la pureza genética del material. Además se realizaron microcultivos para observar al microscopio las características morfológicas e identificar el aislamiento.

2. Extracción de DNA

A partir de los aislamientos realizados de muestras de México, se obtuvieron cultivos monospóricos, y estos fueron el inóculo para la obtención del micelio necesario para la extracción de DNA. Al inicio de la investigación se probaron diferentes métodos de extracción de DNA. Uno de los métodos fue el de Cenis (18). Con este método se realizaron dos cultivos para generar micelio, en tubos Eppendorf con 0.5 ml y en tubos Nalgene con 10 ml de medio de cultivo PD (Tabla 3). Estos cultivos se incubaron por 72 h a 25 °C. Cuando se utilizó el volumen de 10 ml, se obtuvo más micelio y más DNA, pero con la desventaja de que se requerían mayores condiciones de esterilidad dado que se transfirió parte del micelio a un tubo Eppendorf (Fig. 4).

Al trabajar directamente en tubos Eppendorf, se logró una mayor rapidez, reducción en el tiempo de realización, materiales y reactivos; así como la obtención de suficiente cantidad de DNA para realizar ensayos con PCR.

Con el método de extracción de Ceniz, con un volumen de 500 μ l de medio conteniendo micelio, se logró obtener la cantidad suficiente (aproximadamente 20-40 ng/ μ l) para las reacciones de PCR. Este método tiene un período corto de extracción, lo que facilita el manejo de un gran número de muestras, pero si se requiere asegurar la calidad del DNA es conveniente realizar una purificación con fenol-cloroformo, la cual se realizó antes de precipitar el DNA en método original. Con este método, se redujo la contaminación del material biológico y eliminó el uso de grandes cantidades de micelio fresco o liofilizado. Se disminuyó la contaminación al trabajar en el mismo tubo Eppendorf desde la producción de micelio hasta el inicio del proceso para la obtención de DNA. Se ha encontrado que la contaminación se incrementa al aumentar el volumen de medio y el período de incubación para la producción de micelio, por lo que se hace necesario verificar mediante microscopía la presencia de bacterias o levaduras (37).

Con los métodos de Chang (71), Moller (61) y el "Universal" (57), se obtiene DNA genómico de alto peso molecular y de buena calidad, pero para llevar a cabo estas técnicas se necesitó mayor cantidad de micelio fresco y macerar con nitrógeno. Lo anterior tuvo como principal inconveniente la peligrosidad inherente de trabajar con hongos patogénicos hacia el hombre, ya que se requirieron estrictas medidas de seguridad, adecuadas para el manejo de estos hongos; también debe de cultivarse por un tiempo prolongado lo que aumentó el tiempo empleado en la extracción y el grado de contacto con el hongo.

3. Estandarización de las reacciones de ITS-PCR y RAPD-PCR

Para las reacciones de PCR que amplificaron las secuencias de los espaciadores transcritos internos, las cuales se encuentran repetidas en el genoma de *Aspergillus* spp, se utilizó en promedio 8 ng de DNA y de iniciadores 10 pmoles. Generalmente se requiere para PCR de 0.1 a 10 ng de DNA, debido a que la secuencia blanco se encuentra en multicopia (53). Para las reacciones de RAPD-PCR se utilizó de dos a tres veces más la cantidad de DNA requerida en las reacciones de ITS, y en cuanto a los iniciadores se utilizó 20 pmoles. Para las reacciones de RAPD-PCR se utilizó

aproximadamente 30 ng de DNA, en un volumen de 25 μ l, cantidad apropiada para lograr una reproducibilidad adecuada de las señales. Las condiciones anteriores de amplificación son similares a las obtenidas por Williams y cols. en 1993 (98) en donde utilizaron 1 ng/ μ l para amplificaciones reproducibles con DNA de una variedad amplia de organismos.

Otro factor importante en la estandarización de las reacciones de PCR fue la temperatura de alineamiento, la cual fue de 45 °C y 50 °C para las reacciones ITS y de 36 °C para las reacciones de RAPD. Cuando se utilizaron temperaturas de alineamiento de 45 °C en las reacciones de ITS, se obtuvieron dos fragmentos en lugar de uno, esto sucedió con las especies *A. chevalieri* y *A. niger*, lo cual se eliminó al utilizar 50 °C como temperatura de alineamiento.

4. Análisis genético de *Aspergillus* spp

4.1 Resultados con base en secuencias ITS

Los productos de las reacciones de ITS-PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1.5% y de poliacrilamida al 6%, en ambos se observó un fragmento de DNA de tamaño promedio de 600 pb, sin variación notoria entre las diferentes especies (Fig. 5). Este tamaño coincidió con el reportado para las especies *A. oryzae*, *A. tamaritii*, *A. parasiticus*, *A. sojae* y *A. nomius* no incluidas en este estudio pero reportadas en 1996 por Kumeda y Asao (51), con tamaños de 570 a 590 pb, y utilizaron, al igual que en esta investigación, iniciadores complementarios a la secuencia de las regiones del 18S y 28S, denominados ITS1 e ITS4, pero con secuencia y número de nucleótidos diferentes a los utilizados en nuestra investigación.

4.2. Análisis de los resultados de secuenciación de los productos de ITS-PCR

La migración de los fragmentos ITS en electroforesis fue muy similar, pero al realizar la secuenciación de éstos, presentaron tamaños moleculares variables de 637 pb para *A. chevalieri*, 581 pb para *A. niger*, 620 pb para *A. ochraceus* y 581 pb para *A. terreus* y de 479 para *A. flavus* (aislamiento F3). En el caso de *A. flavus*, se consideró en el análisis, la secuencia del aislamiento H-142 reportada en el Banco de Genes del National Center Biotechnological Information (NCBI), con número de acceso L76747 (38), ésta corresponde a la región ITS1-5.8S-ITS2 con un tamaño de 441 pb (Tabla 4). De acuerdo al alineamiento con el programa computacional

MegAlign, mediante el método J. Hein, existe una región conservada a partir de la posición 276 a la 473, con variación sólo para *A. chevalieri* en las posiciones 349, 402, 423 y 457, así como para la especie *A. flavus* (F3) en 11 bases correspondientes a las posiciones 328, 352, 370, 436, 451-453, 455, 456, 458 y 459 (Fig. 6 y Tabla 5). Al considerar en este mismo análisis el aislamiento H-142, existió variación en la región conservada en tres posiciones. Por lo anterior esta región deberá ser la 5.8S, debido a que al comparar la secuencia depositada en 1996 por Geiser y cols. (38) para el aislamiento H 142 de *A. flavus* se localizó una región conservada con las secuencias de las especies en estudio.

Las secuencias de los fragmentos ITS obtenidas en esta investigación, se compararon con secuencias depositadas en el banco de genes (NCBI) para las especies *A. terreus* y *A. niger*. En el caso de *A. niger* se consideró la secuencia del aislamiento H-125 depositada por Geiser y cols., en 1996 (38), y para *A. terreus* se consideraron las secuencias de los aislamientos CCF2539 y ATTC20542 depositadas por Pazoutova y cols., en 1997 (70). Al comparar las secuencias de *A. terreus* mediante el programa computacional MegAlign y el método J. Hein de alineamiento, se encontró un 95% y 97% de similitud de la secuencia obtenida en esta investigación con las de los aislamientos CCF2539 y ATTC20542, respectivamente. Para la secuencia *A. niger* la similitud obtenida con la depositada en el banco de genes fue de 99%. Lo anterior confirma, que los aislamientos considerados como *A. terreus* y *A. niger* corresponden a la especie identificada.

La región 5.8S, al igual que la 18S y 28S y de acuerdo con White y cols., 1990 (96), permite comparar organismos a niveles taxonómicos desde género a *Phylum*. Melchers y cols., en 1994, no encontraron variación en la secuencia del 18S de *A. flavus*, *A. terreus*, *A. nidulans*, que permitiera diseñar iniciadores específicos para especie. En nuestro caso, en las regiones variables ITS1 e ITS2, como en la que incluye el gen 5.8S, se pueden diseñar iniciadores específicos para las especies *A. chevalieri* y *A. flavus*. Además la región conservada del 18S, ha permitido resumir la clasificación filogenética molecular de los hongos Taylor, 1995 (92), discutió con base en la comparación de esta región, los conceptos: (i) el lugar de los hongos en el todo de la vida, (ii) la relación de la importancia médica del hongo con otros hongos inclusive con organismos modelo y (iii) la integración del hongo asexual y sexual en una clasificación basado en el análisis de la secuencia de los genes ribosomales.

Además el mismo autor elaboró árboles cladísticos en donde encontró que el reino Fungi y el reino animal fueron los más cercanos.

Se realizó un análisis considerando sólo la región conservada, que incluyó 198 pb en promedio. Para cada especie esta región fue de la posición 206 a 403 para *A. chevalieri*, de la 222 a 418 para *A. niger*, de la 223 a 420 para *A. terreus*, de la 256 a 430 para *A. flavus* y de la 221 a 418 para *A. ochraceus*. Los porcentajes de similitud fueron superiores a 92.0 como era de esperarse por ser una región conservada, con valores de 100.0 entre *A. niger* con *A. ochraceus* y *A. terreus* y entre *A. terreus* y *A. ochraceus* y la mayor divergencia con 82.8 % se encontró entre *A. flavus* y *A. terreus*. Los resultados anteriores se reflejan en el árbol filogenético representado en la Figura 7, en donde un grupo más cercano se formó entre *A. ochraceus*, *A. chevalieri* y *A. niger*, uniéndose *A. terreus* y *A. flavus*. El que esté más alejada la especie *A. flavus*, puede ser debido a las 11 bases que variaron con respecto a la secuencia consenso.

Otra situación de interés fueron las regiones variables ITS1 e ITS2, que se ubicaron de la posición 1 a 276 y de la 473 a la 637, respectivamente. Estas regiones permitieron la clasificación a nivel de especie en la presente investigación. Situación similar ha sido aprovechada en otros hongos de importancia agrícola (65), en donde les ha permitido la clasificación a nivel de especie. Además de variar entre especies, las regiones ITS1 e ITS2 pueden variar en su secuencia entre géneros o entre poblaciones (96).

Con base al alineamiento de las secuencias completas ITS1-5.8S-ITS2, mediante el método J. Hein, se construyó el árbol filogenético para las cinco especies en estudio. En este árbol *A. chevalieri*, *A. ochraceus* y *A. niger* representan un grupo, otro se formó con *A. flavus* y *A. terreus* (Fig. 8).

Las cinco especies evaluadas presentaron porcentajes de similitud superiores al 76.0 (Tabla 6). Se encontró el porcentaje de similitud mayor de 89.0 entre *A. terreus* y *A. niger*. Para las especies *A. flavus* y *A. niger* el porcentaje fue de 87.0, el cual es relativamente alto y de 100.0 para la región conservada, lo que podría apoyar los resultados que sugieren que éstas dos especies comparten un ancestro común en su filogenia (97). Los porcentajes menores de similitud se encontraron entre *A. ochraceus* con *A. flavus* (76.0), con *A. chevalieri* (80.0) y con *A. terreus* (80.0). Entre

A. ochraceus y *A. chevalieri*, se encontró un porcentaje de similitud de 80.0, y un porcentaje de disimilitud relativamente bajo de 34.1, considerando que el más alto fue de 53.2 entre *A. flavus* y *A. ochraceus*. Las especies *A. ochraceus* y *A. chevalieri* a nivel taxonómico están clasificadas en dos grupos distintos, de acuerdo Raper y Fennell, 1965 (78), y son morfológicamente diferentes en características tales como la forma y el color de las cabezas conidiales. Es importante mencionar, que aunque en algunas características morfológicas sean diferentes, el grupo taxonómico *A. ochraceus* y el grupo *A. glaucus*, que incluye a la especie *A. chevalieri*, presentan especies ascospóricas con cleistotecio, el cual incluye a las esporas sexuales. La situación anterior sugiere, que las especies ascospóricas surgen con características básicamente similares. Además otra característica de importancia que comparten estos grupos taxonómicos es que pueden crecer en condiciones de alta presión osmótica. Yukawa en 1911 (citado por Raper y Fennell, 1965) encontró *A. ochraceus* en preparaciones fermentadas saladas hechas de pescado. Lo anterior puede fundamentar la similitud genética de *A. ochraceus* y *A. chevalieri* que se encontró en el análisis tanto de la región consenso como de la secuencia completa ITS.

4.3. Polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP)

A partir de los fragmentos amplificados ITS se realizaron los SSCP, con los cuales se logró obtener patrones de separación de las cadenas de DNA. Las especies *A. flavus* presentaron una separación mínima de las cadenas de DNA, y se observó que este patrón fue consistente tanto para la cepa nativa (F5) como para la cepa de referencia SRRRC 1255. *A. chevalieri* presentó un patrón de migración diferente del resto de las especies con una separación de cadenas similar a *A. ochraceus* (Fig. 9). Las especies *A. ochraceus* y *A. chevalieri* aunque presentaron una separación de cadenas similar, existió variación en el patrón de migración. Considerando que la variación en el patrón de migración está basada en el hecho de que las moléculas de DNA difieren por cambios desde una base lo que hace que tenga diferentes propiedades de desnaturalización (86, 103). En estas dos especies se presentó una divergencia en sus secuencias en un 34.1 % (Tabla 6) lo que afectó la movilidad de las cadenas. Para el caso de *A. niger* y *A. terreus*, tanto el patrón de migración como la separación mínima de las cadenas fue similar, es importante mencionar que estas dos especies en el análisis de las secuencias ITS, presentaron los porcentajes mayores de similitud con 89.0 y ninguna variación en la región conservada que incluyó el gen 5.8S. Cabe mencionar, que las especies *A. niger* y *A. terreus* e inclusive *A. flavus* se han incluido en la mayoría de los reportes clínicos, por lo que coinciden en ser

patógenos oportunistas para el hombre (92). Al comparar las cepas de *A. flavus*, F5 de México y F1255 de referencia, la migración fue similar lo que permitió identificarlas como especie *A. flavus*. Con los resultados obtenidos con este análisis se logró diferenciar *A. ochraceus*, *A. chevalieri* y *A. flavus*, tres de las cinco especies incluidas en el estudio.

4.4. Análisis de restricción a partir de los fragmentos amplificados de ITS

Las digestiones de los fragmentos amplificados ITS con la enzima *Xho* I generó dos fragmentos visibles en gel de poliacrilamida con tamaño aproximado de 460 y 130 pb para todas la especies, con excepción de un supuesto aislamiento de *A. niger* (N2) y otro de *A. flavus* (F1273) (Fig. 10, panel A y Tabla 7). Al realizar la digestión, con base en las secuencias de los fragmento ITS, con el programa computacional DNA Strider 1.1, se observó que solamente se tiene un sitio para *A. ochraceus*, *A. flavus* y para *A. niger*, esto generó dos fragmentos de 314/136, 467/11 y 479/97 pb, respectivamente (Fig. 11 y Tabla 7). Para el caso de *A. flavus* el sitio de reconocimiento para la endonucleasa *Xho* I (c/tcgag), no se localizó en la secuencia, pero existió una secuencia casi homóloga de la posición 463 a la 468 con las bases c/tcgggg, donde existe un cambio de base de g por a en la posición 467.

Al digerir con dos enzimas *Xho* I y *Eco*R I se observaron tres fragmentos en gel de poliacrilamida de tamaño aproximado de 300, 160 y 130 pb (Tabla 8). Al realizar el análisis de restricción de las secuencias mediante el programa computacional se determinó un sitio para *Eco*R I (Fig. 11) en cada una de las especies, de manera similar a lo encontrado por Kumeda y Asao, 1996 (51) en donde en seis especies de *Aspergillus* encontró un sitio único para esta enzima.

La presente investigación, las digestiones con *Xho* I y *Eco*R I en electroforesis se observaron tres fragmentos (Fig. 10, Panel B), que coinciden en parte con los resultados del programa computacional, con base en la secuencia nucleotídica, en donde se generó un fragmento de tamaño promedio de 306 pb y otro de menor tamaño con 259 pb (Tabla 9), lo que indicó que se tiene un sitio para *Eco*R I. El programa no generó el fragmento de menor tamaño presente en la electroforesis. Las digestiones con las dos enzima anteriores no permitió diferenciar ninguna de las especies evaluadas.

Cuando los fragmentos amplificados de ITS se digirieron con la enzima *Dde* I, se presentó un patrón electroforético diferente para cada una de las especies incluidas en el estudio. Además, diferentes aislamientos de una misma especie presentaron patrones electroforéticos similares (Fig. 10, Panel C). Se obtuvieron dos fragmentos para *A. terreus*, cuatro para *A. flavus*, dos para *A. chevalieri*, dos para *A. niger* y tres para *A. ochraceus*, todas las especies comparten un sólo fragmento que varió entre 390 y 400 pb (Tabla 10). El análisis de las secuencias de *A. terreus*, *A. chevalieri*, *A. flavus* y *A. niger*, con el programa computacional, generaron patrones electroforéticos que coincidieron con los análisis de restricción obtenidos a partir de digestiones enzimáticas. En el caso de *A. ochraceus* el patrón electroforético no coincidió con los resultados del programa computacional, ya que éste presentó dos fragmentos (de 400 pb y 140 pb), y con el programa computacional se generaron dos fragmentos de tamaño diferente (de 410 y 40 pb). Lo anterior puede deberse a un cambio de base, como se ejemplificó con los resultados del análisis de restricción en *A. flavus* con la enzima *Xho* I. Por otra parte se debe considerar lo que sugiere Bretagne y cols., en 1995 (14), que en la detección de especies de *Aspergillus* por medio de PCR, se debe valorar el riesgo de contaminación de buffers o muestras biológicas con conidias de *Aspergillus*. Para la especie *A. flavus*, los cuatro fragmentos obtenidos con digestión enzimática y análisis computacional, coinciden con lo reportado por Kumeda y Asao, 1996 (51).

Los análisis de restricción concuerdan con lo encontrado en las especies del género *Aspergillus* sección *flavi* donde existe un sitio único para *Eco*R I (51) y otro sitio único para *Xho* I como se presentó para *A. awamori* (13). En nuestro caso, se identifican sitios únicos para *Eco*R I en las cinco especies del género *Aspergillus* (Fig. 10, Panel B). Los patrones más similares se encontraron entre *A. terreus*, y *A. niger* y entre *A. chevalieri* y *A. ochraceus*. En el caso de *A. chevalieri*, esta especie representa al grupo taxonómico de *A. glaucus* y *A. ochraceus* al grupo *A. ochraceus*, pero de acuerdo al análisis de restricción, se observó que ambas comparten similitudes genéticas. La anterior similitud se ha encontrado en estas mismas especies mediante el análisis con la técnica RAPD-PCR (63). Finalmente los análisis de restricción enzimática de secuencias de DNA ribosomal son apropiados para distinguir especies, variedades y aislados de organismos (51, 58, 109), como se muestra con los resultados de la digestión con *Dde* I, en donde los patrones electroforéticos generados permitió diferenciar los cinco especies que representan a

diferentes grupos taxonómicos, y ésta se presenta como una alternativa sencilla y precisa para la diferenciación de especies del género *Aspergillus*.

4.5. Análisis del patrón electroforético de la amplificación con RAPD

Las especies *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. chevalieri*, *A. niger* y *A. terreus* fueron sometidas evaluadas bajo la técnica de amplificación al azar de DNA polimórfico (RAPD) (36). Los fragmentos de DNA amplificados, para cada una de las especies con cuatro iniciadores se analizaron mediante el índice de asociación de Dice (IS) (89). Con el iniciador con 50 % G-C, se encontró que *A. ochraceus* y *A. chevalieri* presentaron un IS de 1.0, y *A. terreus* y *A. flavus* con 0.82. Para el cálculo de los índices se elaboró una matriz básica de datos a partir de los patrones electroforéticos (Tabla 11). También se observó que algunos de los fragmentos presentan más intensidad en el gel que otros; esto podría deberse a que en la PCR se produjeron mucho más copias de ese fragmento de DNA que otros, o que estos sitios probablemente también se encontraron repetidos en el DNA genómico varias veces. Esta variación en la intensidad del fragmento amplificado ha sido considerada en estudios de discriminación de aislamientos de diferente origen epidemiológico de *A. fumigatus* (2). Por otra parte, *A. niger* presentó IS menores a 0.22 (Tabla 12).

El análisis de los fragmentos amplificados con el iniciador 60-10 nos indicó que los índices de similitud mayores se obtuvieron entre *A. flavus* y *A. ochraceus* con 0.88 y *A. terreus* y *A. chevalieri* con 0.75 (Tabla 13). El análisis del patrón electroforético resultado de la amplificación con el iniciador 70-10 también nos mostró diferencias entre algunas de las especies, pero las similitudes entre las especies se observaron nuevamente entre *A. ochraceus* y *A. chevalieri*, con el mayor IS de 0.86 (Tabla 14).

Al analizar el gel de agarosa con la amplificación del DNA genómico de las diferentes especies de *Aspergillus* spp, y con el iniciador 80-10. Con este iniciador se obtuvieron los IS con valores menores al resto de los iniciadores probados. El IS más alto fue de 0.80 entre *A. ochraceus* y *A. chevalieri*, y en el resto de las especies los valores de IS fueron menores a 0.5 (Tabla 15). El valor obtenido de 1 - IS nos indicó la disimilitud entre las especies y éstas presentaron valores mayores al utilizar el iniciador 80-10. Lo anterior indica que estos polimorfismos resultaron de mayores diferencias nucleotídicas entre las secuencias de las especies. Se conoce que los iniciadores utilizados en RAPD son extremadamente sensibles a cambios en una

simple base en el sitio blanco del iniciador, por lo cual RAPD es útil en el análisis filogenético entre individuos estrechamente relacionados (98, 108). Al promediar los índices de las cinco especies con los cuatro iniciadores, se obtiene la mayor asociación entre *A. ochraceus* y *A. chevalieri* con 0.67 y entre *A. ochraceus* y *A. terreus* con 0.56. Estos resultados concuerdan con los resultados del análisis de la secuencias ITS, en donde los porcentajes de similitud fueron entre los mayores, con 80.0 % entre *A. ochraceus* y *A. chevalieri* y de 86.0 % entre *A. chevalieri* y *A. terreus*.

La literatura menciona la diversidad y la problemática en la diferenciación taxonómica entre los miembros del género *Aspergillus* spp (5, 6, 78), así la técnica de RAPD-PCR permitió solucionar en parte esta problemática al caracterizar la variabilidad y similitudes genéticas entre algunas de las especies que representan grupos taxonómicos diferentes. Se puede inferir que existe una relación filogenética entre las especies *A. ochraceus* y *A. chevalieri* y esta última con *A. terreus*. Lo anterior permitió hacer inferencias sobre las relaciones filogenéticas con base en los polimorfismos genéticos que comparten los grupos taxonómicos.

5. Identificación de un patrón electroforético específico para cepas altamente productoras de aflatoxinas

Como se mencionó anteriormente se encontró un patrón electroforético específico para la especie *A. flavus* al digerir el fragmento ITS con la enzima *Dde* I. Una vez que se verificó que el aislamiento pertenece a la especie *A. flavus* (Fig. 12), éste fue analizado mediante la técnica de RAPD-PCR con fines de encontrar un patrón electroforético específico para aislamientos aflatoxigénicos. Se realizaron las reacciones de RAPD, con cuatro iniciadores que variaron desde 50, 60, 70 y 80 % de G-C, denominados 50-10, 60-10, 70-10 y 80-10. Inicialmente con base en los fragmentos de DNA amplificados por PCR con cada uno de los cuatro iniciadores, se construyó la matriz de datos básica para el análisis de los índices de similitud de Dice (Tabla 16).

El relacionar un patrón electroforético como un marcador molecular para la producción de aflatoxinas (5), o una característica morfológica con la producción de aflatoxinas (32), no ha sido una tarea fácil. En esta investigación se evaluaron 6 aislamientos; tres de diferente origen nacional y tres cepas de referencia (F1059, F1273 y F1299) de los Estados Unidos de Norteamérica, las cuales se caracterizan por ser altamente productoras de aflatoxinas. Cuando se utilizó el iniciador 50-10

(Fig. 13, Panel A), no se encontró con un patrón característico para las cepas altamente productoras de aflatoxinas. Los índices de similitud indican que el valor mayor fue de 0.88 entre F3 y F1299, y le siguen con 0.85 entre las cepas F4 y F1299. Las cepas nacionales F3 y F4 fueron aisladas de maíces contaminados de Aguascalientes, México y Tamaulipas, México, a diferencia de F5 aislado de humano, que presentó un índice de 0.29 (Tabla 17). Con lo anterior se observa una tendencia de similitud de cepas nacionales aisladas de maíces contaminados con cepas aflatoxigénicas.

Al utilizar el iniciador 60-10, se encontró una mayor definición de los fragmentos amplificados y un patrón más característico para las cepas altamente productoras de aflatoxinas (Fig. 13, Panel B). Los índices de similitud fueron mayores entre las cepas altamente productoras de aflatoxinas con valores de 0.86 y 1.00, y la cepa nacional con mayor similitud con las cepas aflatoxigenicas fue F5 con valores de 0.57 y 0.67 (Tabla 18).

Al evaluar los aislamientos mediante RAPD con el 70-10, se observó que existe un mayor número de fragmentos amplificados en las cepas F3 y F1299 (Fig. 13, Panel C y Tabla 16). Los índices de similitud nuevamente fueron mayores dentro de los aislamientos altamente productores de aflatoxinas con 0.33, 0.40 y 0.67 en comparación con las cepas nacionales con 0.00, 0.29 y 0.40. De manera individual la cepa nacional con el mayor índice de similitud con una cepa productora de aflatoxinas fue entre F4 y F1299 con 0.67 (Tabla 19).

Con el iniciador 80-10 se observó un patrón de fragmentos muy similar entre las cepas F1059 y F1273, en cuanto al número y tamaño de los fragmentos (Fig. 13, Panel D). Los índices de similitud nos indica un valor de 1.0 entre F1059 y F1273 y la cepa nacional con mayor similitud con una cepa productora de aflatoxinas fue entre F3 y F1299 con un valor de 0.91 (Tabla 20).

En general un patrón electroforético común para las cepas aflatoxigénicas F1059 y F1273 se presentó con los iniciadores 60-10, 70-10 y 80-10. Andesorn y cols., en 1996 (2), mediante RAPD y con un sólo iniciador pudieron discriminar entre aislados de *A. fumigatus* de diferente origen epidemiológico. Al realizar el promedio de los índices, con los cuatro iniciadores, se observó que la mayor similitud entre las tres cepas nacionales la obtuvo el iniciador 80-10 con 0.58 y en promedio fue de 0.49.

Para las cepas altamente productoras de aflatoxinas (aflatoxigénicas) el valor mayor de similitud entre las tres cepas se obtuvo con el iniciador 60-10 con 0.91, y en promedio de los cuatro iniciadores fue de 0.71 (Tabla 21). Con el iniciador 60-10 se obtuvo la mayor disimilitud de las tres cepas nacionales con las cepas aflatoxigénicas con 0.66, pero de manera individual la mayor similitud de cada una de las cepas nacionales con las tres aflatoxigénicas se presentó con la cepa F3 con un valor promedio de 0.51, y le siguió la cepa F5 con 0.48 y luego la F4 con 0.31.

En resumen, con los cuatro iniciadores en las tres cepas aflatoxigénicas, se encontró un patrón electroforético común con un índice de similitud de 0.71. Por otra parte Bayman y Cotty en 1993 (5) encontraron también en *A. flavus* una consistencia entre el análisis cladístico de los polimorfismos de DNA con los grupos de compatibilidad vegetativa, es decir los RAPD se asociaron con características morfológicas. Assigbetse y cols., en 1994 (3), asociaron RAPD con grupos de patogenicidad en *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. En nuestro caso se asoció RAPD con una característica fisiológica-genética, la producción de aflatoxinas. Finalmente entre las tres cepas nacionales, la similitud fue menor con 0.40 y de éstas cepas la F3 fue la que más similitud tuvo con las tres cepas aflatoxigénicas con un índice de 0.51.

6. Resultados de la expresión del gen *omt-A* involucrado en la biosíntesis de aflatoxinas

6.1 Clonación y subclonación del gen *omt-A*

A partir de una biblioteca de cDNA construida con RNA aislado de un cultivo de 24 h de la cepa silvestre SRRC 143 de *A. parasiticus* y seleccionada mediante anticuerpos policlonales levantados contra una proteína O-metiltransferasa de 40 kDa, se identificó el clon *omt-A*. Este fragmento se insertó en pBluescript SK⁻ con extremos de restricción *Eco*R I y *Xho* I. El clon tiene una longitud total de 1,460 pb, que incluye una región codificante, de 1,254 pb, para una proteína nativa OMT-A de 46 kDa. En la Figura 14 se ejemplifica la región del gen *omt-A* señalada por el área sombreada, los extremos no traducidos se indican en el área no sombreada.

La proteína OMT-A, está involucrada en la conversión de ST a OMST y la conversión de DHST a DHOMST en la biosíntesis de aflatoxinas de *A. parasiticus*. En la caracterización de este clon realizada por Yu y cols., en 1993 (105), indicaron que la enzima codificada por *omt-A* tiene una secuencia líder de 41 aminoácidos que

proporciona una estabilidad a la proteína en términos de actividad enzimática en extractos de *E. coli*. Esta región de 41 aminoácidos incluso juega un papel en la interacción de la proteína con la membrana, ya que posee una región hidrofóbica en la región del aminoácido 7 al 17. Esta interacción puede ser necesaria desde que el sustrato (ST y SAM) y el producto (OMST) de la enzima no son solubles en agua. Además el gen *omt-A* fue el primer reporte de un gen responsable de una actividad enzimática directamente involucrada en las etapas finales de la ruta de la biosíntesis de aflatoxinas. Recientemente se encontró que la conversión de OMST a aflatoxina es mediada por un gen (*ord1*) que codifica para una monooxigenasa CYT P-450 de 60.2 kDa y además es único para especies de hongos aflatoxigénicos (75).

Para realizar la subclonación de *omt-A* en el vector de expresión pET-30c(+), se decidió utilizar las enzimas de restricción *Bam*HI I y *Xho* I, debido a que *Eco*R I se localizó en un sitio dentro de la región codificante en la posición 1,156 (Fig. 15). En la subclonación se verificó que la secuencia quedara en marco de lectura y además de acuerdo al vector pET-30c(+), el subíndice (c) indica que expresan en marco de lectura el triplete ATC del sitio de reconocimiento de *Bam*HI I que es GGATCC. La subclonación se realizó con la cepa BL21 (Fig. 16) y la expresión con la cepa BL21(DE3) en la cual la expresión es inducida con una fuente T7 RNA polimerasa presente en esta cepa. En nuestra investigación se decidió subclonar el gen *omt-A* en el vector de expresión pET-30c(+), al inicio de la subclonación se purificó tanto el inserto como el vector a partir de geles de agarosa con el kit GeneClean® (Bio 101 Inc.), la ligación fue favorable pero al realizar la transformación con células calcio competentes así como con electrotransformación no se tenía éxito. Lo anterior debido posiblemente a que al purificar tanto el vector como el inserto con el kit GeneClean, el cual utiliza yoduro de sodio (NaI 6M), se incrementó la fuerza iónica de la solución de ligación lo que en la electroporación se produjo un arco eléctrico por el alto voltaje y dañó las células. Por lo anterior se decidió no purificar las muestras y aprovechar las diferentes resistencias a antibiótico de los dos vectores, pBluescript SK tiene el gen para resistencia a penicilina y pET-30c(+) a kanamicina. El plásmido linealizado e inserto liberado junto con vector se ligaron y la selección de las células recombinantes se realizó con base en la resistencia al antibiótico kanamicina y además se verificaba la presencia del inserto de 1,460 pb mediante digestión enzimática con *Bam*HI I y *Xho* I

En la Figura 17 se muestran los DNA de: vector pET-30c(+) en el carril 1; el vector más el inserto, carril 2 y el vector más inserto digerido con la enzima *Bam*H I y *Xho* I, carril 3. El marcador de peso molecular (m), Ladder 100 pb, en el cual el fragmento de tamaño mayor es de 2,072 pb y le sigue el de 1,500 pb. Por lo cual el inserto que se liberó con la digestión es de 1,460 pb. Con el DNA plásmido de la construcción de pET-30c(+) más *omt-A*, previamente verificada que tuviera el inserto, se realizó la transformación en la cepa de expresión BL21(DE).

6.2 Expresión del gen *omt-A*

Una vez verificada la construcción se realizó la transformación en la cepa de expresión BL21(DE3). La inducción con IPTG al 1 mM permitió identificar una proteína de un peso molecular de 26 kDa en la Figura 18, carriles 4 y 5, la cual no está presente en el carril 1 que corresponde a la cepa silvestre y en los carriles 2 y 3 que corresponde a la cepa con el plásmido sin inserto.

Debido a que la proteína eucariótica codificada por *omt-A* podría tener problemas de estabilidad, debido a toxicidad, que resulte en la pérdida en el cultivo de bacterias que contienen el plásmido, se utilizó el método de plaqueo de Suter-Crazzolaro y Unsicker, 1995 (91). Con este método se obtuvieron resultados favorables, y permitió el inicio del cultivo con una densidad óptica (OD₆₀₀) de aproximadamente 0.4. A partir de este cultivo se realizó una evaluación de tiempo y curso de la expresión, para lo que se tomaron alícuotas del cultivo desde la 0 h hasta las 6 h, y se encontró que la máxima expresión se obtiene a las 5 h de cultivo inducido (Fig. 19).

Para su purificación se obtuvo el extracto de proteínas bajo condiciones normales y desnaturalizantes con urea 6M, no obstante en las dos condiciones, la proteína de interés se localizó en la pastilla, por lo que no se logró su solubilización. Para lo anterior es necesario liberarla de la membrana mediante otras alternativas de solubilización como puede ser con Guanidina-HCl. Solubilizada la proteína, es decir liberada de la pastilla, se estará en posibilidades de pasar el extracto por la columna de afinidad y purificarla para levantar anticuerpos. Los intentos de utilizar los productos de genes asociados con la biosíntesis de aflatoxinas para producción de anticuerpos parece ser factible (85).

7. Consideraciones finales

Finalmente mediante el análisis de las secuencias de los fragmentos de DNA correspondientes a los ITS así como de los polimorfismos amplificados por la técnica de RAPD en cinco especies de *Aspergillus*, se logró probar la hipótesis de que es posible inferir sus relaciones filogenéticas al agrupar las especies de acuerdo a sus distancias evolutivas con base en el análisis de la secuencia de DNA, así como identificar similitudes y divergencias de acuerdo con los coeficientes de asociación calculados con base en los patrones electroforéticos generados por RAPD. Además los análisis de restricción de los fragmentos ITS permitió diferenciar especies, y con resultados de RAPD en aislamientos de *A. flavus* determinar un patrón electroforético específico para cepas aflatoxigénicas. En cuanto al gen *omt-A* se sentaron las bases para continuar con trabajos que permitan aprovechar los avances logrados por otros investigadores en lo referente a la clonación de genes involucrados en la ruta de la biosíntesis de aflatoxinas y que los estudios en México sean de utilidad para el diagnóstico de la contaminación de estas micotoxinas. Por lo anterior, se considera que la presente investigación logró cumplir con los objetivos planteados.

Capítulo 5

CONCLUSIONES

1. De los métodos probados, la extracción de DNA de *Aspergillus* spp, con el método de Cenis a partir de cultivos monospóricos permitió obtener DNA de calidad y en la cantidad adecuada para las reacciones de PCR.
2. En *A. flavus*, *A. chevalieri*, *A. ochraceus*, *A. niger* y *A. terreus* se amplificó un fragmento de DNA, de tamaño promedio de 600 pb que incluyó las regiones ITS1-5.8S-ITS2, mediante iniciadores complementarios a las regiones conservadas 18S y 28S de los genes que codifican para los rRNA. Existió en las cinco especies una región conservada de 198 pb, la cual se sugiere que incluye al gen 5.8S. Esta región sólo varió en *A. chevalieri* y *A. flavus* en cambio las regiones ITS fueron más variables lo que permitió la diferenciación de especies.
3. El análisis filogenético de las cinco especies, con base en la región conservada (5.8S) y variable (ITS1-5.8S-ITS2) mediante el algoritmo J. Hein, determinó un grupo con *A. ochraceus*, *A. chevalieri* y *A. niger* y otro con *A. terreus* y *A. flavus*.
4. Mediante la técnica SSCP se diferenciaron tres especies: *A. flavus*, *A. chevalieri* y *A. ochraceus* y se observó un comportamiento similar tanto en la migración como en la separación de cadenas de DNA, entre *A. terreus* y *A. niger*, cabe mencionar que estas especies presentan el mayor porcentaje de similitud (89.0) en sus secuencias ITS.
5. Mediante el análisis de restricción de los fragmentos ITS se logró diferenciar las cinco especies de *Aspergillus* en estudio, además diferentes aislamientos de la misma especie presentaron patrones electroforéticos similares. La especie *A. flavus* presentó cuatro fragmentos mediante la digestión con *Dde* I, típico para la especie.

6. El análisis de los patrones electroforéticos de RAPD en las cinco especies, permitió asociar *A. ochraceus* y *A. chevalieri*, que presentaron los mayores índices de Dice (1.0, 0.60, 0.86 y 0.80) con los cuatro iniciadores evaluados.
7. Se logró obtener un patrón electroforético común, mediante la técnica de RAPD, para las cepas aflatoxigénicas F1059 y F1273 de *A. flavus* con los iniciadores 60-10, 70-10 y 80-10 y además el mayor índice de asociación de Dice (0.71).
8. Se identificó mediante electroforesis una proteína de 26.0 kDa expresada por el gen *omt-A*, involucrado en la ruta de la biosíntesis de aflatoxinas.
9. Finalmente, las técnicas moleculares RAPD, SSCP, secuenciación y análisis de restricción del fragmento ITS, permitió inferir las relaciones filogenéticas entre cinco especies del género *Aspergillus*, así como identificar un patrón electroforético específico tanto para la especie como para cepas aflatoxigénicas.

LITERATURA CITADA

1. **Adams, R. P., T. Demeke, and H. A. Abulfatih. 1993.** RAPD DNA Fingerprints and Terpenoids: Clues to Past Migrations of *Juniperus* in Arabia and East Africa. *Theor. Appl. Genet.* **87**:22-26.
2. **Anderson, M. J., K. Gull, and D. W. Denning. 1996.** Molecular Typing by Random Amplification of Polymorphic DNA and M13 Southern Hybridization of Related Paired Isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology* **34**:87-93.
3. **Assigbetse, K. B., D. Fernandez, M. P. Dubois, and J.-P. Geiger. 1994.** Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* Races on Cotton by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis. *Phytopathology* **84**:622-626.
4. **Barbut, F., N. Mario, M. Demée, J. Gozian, and J. C. Petit. 1993.** Genomic Fingerprinting of *Clostridium difficile* isolates by Using a Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Assay. *FEMS Microbiology Letters* **114**:161-166.
5. **Bayman, P., and P. J. Cotty. 1993.** Genetic Diversity in *Aspergillus flavus*: Association with Aflatoxin Production and Morphology. *Can. J. Bot.* **71**:23-31.
6. **Bayman, P., and P. J. Cotty. 1991.** Vegetative Compatibility and Genetic Diversity in the *Aspergillus flavus* Population of a Single Field. *Can. J. Bot.* **69**:1707-1711.
7. **Bennett, J. W., and K. E. Papa. 1988.** The Aflatoxigenic *Aspergillus* spp., p. 263-268. *In: Advances in Plant Pathology.* G. S. Sidhu (ed.), vol. **6**. Academic Press, New York.
8. **Bhatnagar, D., and T. E. Cleveland. 1991.** Aflatoxin Biosynthesis: Development in Chemistry, Biochemistry and Genetics. 329:391-405. North Central Regional Research.
9. **Bhatnagar, D., T. E. Cleveland, and P. J. Cotty. 1993.** Mycolgical Aspects of Aflatoxin Formation, p. 327-345. *In: The Toxicology of Aflatoxin.* D. D. Bhatnagar, E. B. Lillehoj, and D. K. Arora (ed.), vol. **15**. American Chemical Society, Washinston, D.C., San Francisco, California.
10. **Bhatnagar, D., C. K. Ehrlich, and T. E. Cleveland. 1992.** Oxidation-Reduction Reactions, p. 255-285. *In: Handbook of Applied Mycology.* D. Bhatnagar, E. B. Lillehoj, and D. K. Arora (ed.), vol. **5**. Marcel Dekker, Inc., New York-Basel-Hong Kong.
11. **Bhatnagar, D., C. P.J., and T. E. Cleveland. 1992.** Preharvest Aflatoxin Contamination, p. 273-292. *In: Food Flavor and Safety. Molecular Analysis and Design.* A. M. Spanier, H. Okai, and M. Tamura (ed.), vol. **22**. American Chemical Society, Washington, DC., San Francisco, California.
12. **Bhatnagar, D., G. Payne, E. J. Linz, and E. T. Cleveland. 1995.** Molecular Biology to Eliminate Aflatoxins. Inform 3. Department of Agriculture, USDA.
13. **Borsuk, P., M. Gniadkowski, R. Kucharski, M. Bisko, M. Kanabus, P. P. Stepien, and E. Bartnik. 1993.** Evolutionary Conservation of the Transcribed Spacer Sequences of the rDNA Repeat Unit in Three Species of the Genus *Aspergillus*. Submitted (17-Nov-1993) Borsuk P., University of Warsaw, Department of Genetics, Al.Ujazdowskie 4, Warsaw, Pl-00478, Poland.
14. **Bretagne, S., J. M. Costa, A. M. Khuong, F. Poron, C. Cordonnier, M. Vidaud, and J. F. Feith. 1995.** Detection of *Aspergillus* Species DNA in Bronchoalveolar Lavage Samples by Competitive PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **33**:1164-1168.
15. **Brown, R. L., T. E. Cleveland, G. A. Payne, C. P. Woloshuk, and D. G. White. 1995.** Determination of Resistance to Aflatoxin Production in Maize Kernels and Detection of Fungal Colonization Using an *Aspergillus flavus* Transformant Expressing *Escherichia coli* b-Glucoronidase. *Phytopathology* **85**:983-989.

16. **Bu'Lock, J. D.** 1965. *The Biogenesis of Natural Products*. McGraw-Hill, London.
17. **Cary, J. W., M. Wright, D. Bhatnagar, R. Lee, and S. F. Chu.** 1996. Molecular Characterization of an *Aspergillus parasiticus* Dehydrogenase Gen, *norA*, Located on the Aflatoxin Biosynthesis Gene Cluster. *Applied and Environmental Microbiology* **62**:360-366.
18. **Cenis, J. L.** 1992. Rapid Extraction of Fungal DNA for PCR Amplification. *Nucleic Acids Research* **20**:2380.
19. **Cleveland, T. E., and D. Bhatnagar.** 1990. Evidence for de Novo Synthesis of an Aflatoxin Pathway Methyltransferase near the Cessation of Active Growth and the Onset of Aflatoxin Biosynthesis by *Aspergillus flavus* Mycelia. *Can. J. Microbiol.* **36**:1-5.
20. **Cleveland, T. E., and D. Bhatnagar.** 1992. Molecular Strategies for Reducing Aflatoxin Levels in Crops Before Harvest, p. 205-228. *In: Molecular Approaches to Improving Food Quality and Safety*. D. Bhatnagar, and T. E. Cleveland (ed.), Van Nostrand Reinhold, New York.
21. **Cotty, P. J.** 1989. Virulence and Cultural Characteristics of Two *Aspergillus flavus* Strains Pathogenic on Cotton. *Phytopathology* **79**:808-814.
22. **Cotty, R. J.** 1990. Effect of Atoxigenic Strains of *Aspergillus flavus* on Aflatoxin Contamination of Developing Cottonseed. *Plant Disease* **74**:233-235.
23. **Crisci, J. V., and A. M. F. López.** 1983. *Introducción a la Teoría Practica de la Taxonomía Numérica*. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa de Desarrollo Científico y Tecnológico., Washington, D.C.
24. **Crowhurst, R. N., B. T. Hawthorne, E. H. A. Rikkerink, and M. D. Templeton.** 1991. Differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* races 1 and 2 by Random Amplified Polymorphic DNA. *Curr. Genet.* **20**:391-396.
25. **Demeke, T., and R. P. Adams.** 1994. The Use of PCR-RAPD Analysis in Plant Taxonomy and Evolution., p. 179-191. *In: PCR Thechnology. Current Innovations*. H. G. Griffin, and A. M. Griffin (ed.), vol. 21. CRC Press., London.
26. **Desjardins, A. E., and M. T. Holn.** 1997. Mycotoxins in Plant Pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**:147-152.
27. **Detroy, R. W., and A. Ciegler.** 1971. Aflatoxin Biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*: Effect of Methionine Analogs. *Can. J. Microbiol.* **17**:569-574.
28. **Detroy, R. W., and C. W. Hesseltine.** 1968. Net Synthesis of Carbon-14-labeled Lipids and Aflatoxins in Resting Cells of *Aspergillus parasiticus*. *Dev. Ind. Microbiol.* **10**:127-133.
29. **Diener, U. L., R. J. Cole, T. H. Sanders, G. A. Payne, L. S. Lee, and M. A. Klich.** 1987. Epidemiology of Aflatoxin Formation by *Aspergillus flavus*. *Ann. Rev. Phytopathol.* **25**:249-270.
30. **Dorner, J. W., R. J. Cole, and U. L. Diener.** 1984. The Relationships of *Aspergillus flavus* And *A. parasiticus* with Reference to Production on Aflatoxins and Cyclopiazonic Acid. *Mycopathologia* **87**:13-15.
31. **Durakovic, S., T. Beritic, and J. Velikonja.** 1984. Biosynthesis and Biodegradation of Aflatoxin B1 and B2 on Maize Contaminated with Common Field and Storage Fungi. *Mikrobiologija* **21**:23-35.
32. **Egel, S. D., J. P. Cotty, and K. S. Elias.** 1994. Relationships Among Isolates of *Aspergillus* sect. *flavi* that Vary in Aflatoxin Production. *Phytopathology* **84**:906-912.
33. **Feng, G. H., and T. J. Leonard.** 1995. Characterization of the Polyketide Synthase Gene (*pksL1*) Required for Aflatoxin Biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Bacteriology* **177**:6246-6254.
34. **Flaherty, J. E., M. A. Weaver, G. A. Payne, and C. P. Woloshuk.** 1995. A β -glucuronidase Reporter Gene Construct for monitoring Aflatoxin Biosynthesis in *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology* **61**:2482-2486.

35. **Fortrum, B. A.** 1986. Effect of Environment of Aflatoxin Development in Preharvest Maize. En: Aflatoxin in Maize. A Proceedings of the Workshop. CIMMYT, UNDP y USAID México.
36. **Gallardo-Zapata, E. A.** 1998. Análisis genético de *Aspergillus* spp. mediante la amplificación al azar de DNA polimórfico. Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. (En prensa).
37. **Garber, R. C., and O. C. Yoder.** 1983. Isolation of DNA from Filamentous Fungi and Separation into Nuclear, Mitochondrial, Ribosomal, and Plasmid Components. Analytical Biochemistry 135:416-422.
38. **Geiser, D. M., W. E. Timberlake, and M. L. Arnold.** 1996. Loss of Meiosis in *Aspergillus*. Mol. Biol. Evol. 13:809-817.
39. **Goto, T., D. T. Wicklow, and Y. Ito.** 1996. Aflatoxin and Cyclopiazonic Acid production by a Sclerotium-Producing *Aspergillus tamarii* Strain. Applied and Environmental Microbiology 62:4036-4038.
40. **Grajal-Martín, M. J., C. J. Simon, and F. J. Muehlbauer.** 1993. Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) to Characterize Race 2 *Fusarium oxysporum* f sp. *pisi*. Phytopathology 83:612-614.
41. **Hamelin, R. C., G. B. Ouellette, and L. Bernier.** 1993. Identification of *Graminella abietina* races with Random Amplified Polymorphic DNA Markers. Appl. Environ. Microbiol. 59:1752-1755.
42. **Hein, J. J.** 1990. Unified Approach to Alignment and Phylogenies. Methods in Enzymology 183:626-645.
43. **Horn, P., and A. Rafalski.** 1992. Non-Destructive RAPD Genetic Diagnostic of Microspore-Derived *Brassica* Embryos. Plant Molecular Biology Reporter 10:285-293.
44. **Horng, S. J., C. Perng-Kuang, J. J. Pestrka, and J. E. Linz.** 1990. Development of a Homologous Transformation System for *Aspergillus parasiticus* with the Gene Encoding Nitrate Reductase. Mol. Gen. Genet. 224:294-296.
45. **Huang, Z., D. G. White, and G. A. Payne.** 1997. Corn Seed Proteins Inhibitory to *Aspergillus flavus* and Aflatoxin Biosynthesis. Phytopathology 87:622-627.
46. **Igloi, G. L.** 1983. A Silver Stain for the Detection of Nanogram Amounts of tRNA Following Two-dimensional Electrophoresis. Ann. Biochem. 134:184-188.
47. **Jain, A., S. Bhatia, S. S. Banga, S. Prakash, and M. Lakshmikumaran.** 1994. Potential Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Technique to Study the Genetic Diversity in Indian mustard (*Brassica juncea*) and Its Relationship to Heterosis. Theor. Appl. Genet. 88:116-122.
48. **Juan-López, M., M. Carvajal, and B. Ituarte.** 1995. Supervising Programme of Aflatoxinas in Mexican Corn. Food Additives and Contaminants 12:297-312.
49. **Kelkar, H. S., N. P. Keller, and T. H. Adams.** 1996. *Aspergillus nidulans stcP* Encodes an O-Methyltransferase That Is Required for Sterigmatocystin Biosynthesis. Applied and Environmental Microbiology 62:4296-4298.
50. **Keller, P. N., T. E. Cleveland, and D. Bhatnagar.** 1992. A Molecular Approach Towards Understanding Aflatoxin Production, p. 287-309. In: Handbook of Applied Mycology. D. Bhatnagar, E. B. Lillehoj, and D. K. Arora (ed.), vol. 5. Marcel Dekker, Inc., New York-Basel-Hong Kong.
51. **Kumeda, Y., and T. Asao.** 1996. Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacers To Differentiate Species of *Aspergillus* Section *Flavi*. Applied and Environmental Microbiology 62:2947-2952.
52. **Kurtzman, C. P., M. J. Smiley, C. J. Robenett, and D. T. Wicklow.** 1986. DNA Relatedness Among Wild and Domesticated Species in the *Aspergillus flavus* Group. Mycologia 78:955-959.

53. **Lee, S. B., and J. W. Taylo.** 1990. Isolation of DNA from Fungal Mycelia and Single Spores, p. 283-287. In: PCR Protocols. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (ed.). Academic Press, Inc., San Diego, California.
54. **Liang, S. H., C. D. Skory, and J. E. Linz.** 1996. Characterization of the Function of the *ver-1A* and *ver-1B* Genes, Involved in Aflatoxin Biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. Applied and Environmental Microbiology 62:4568-4575.
55. **Lillehoj, B. E.** 1986. The Aflatoxin-in-Maize Problem: The Historical Perspective, p. 13-32. Aflatoxin in Maize. CIMMYT, UNDP y USAID México.
56. **Mahanthi, N., D. Bhatnagar, J. W. Cary, J. Joubran, and J. E. Linz.** 1996. Structure and Function of *fas-1A*, Gene Encoding a Putative Fatty Acid Synthetase Directly Involved in Aflatoxin Biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. Applied and Environmental Microbiology 62:191-195.
57. **Martínez-Soriano, J. P., E. L. Cab-Barrera, R. Tamez-González, y D. S. Klevezas-Leal.** 1993. Detección de *Brucella abortus* por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Bioquímica 18:10-16.
58. **Martsinkovskaya, A. I., R. S. Moukhamedov, and A. A. Abdugarimov.** 1996. Potential Use of PCR-Amplified Ribosomal Integenic Secuencias for Differentiation of Varieties and Species of *Gossypium* Cotton. Plant Molecular Biology Reporter 14:44-49.
59. **Mcaplin, C. E., and B. Mannarelli.** 1995. Construction and Characterization of DNA a Probe for Distinguishing Strains of *Aspergillus flavus*. Applied and Environmental Microbiology 61:1068-1072.
60. **Melchers, W. J., P. E. Verweij, P. van den Hurk, v. B. A., B. E. De Pauw, J. Hoogkamp-Korstanje, and J. F. Meis.** 1994. General Primer-Mediated PCR for Detection of *Aspergillus* Species. J. of Clin. Microbiol. 32:1710-1717.
61. **Moller, E. M., G. Bahuweg, H. Sandermann, and H. H. Geiger.** 1992. A Simple and Efficient Protocol for Isolation of High Molecular Weight DNA from Filamentous Fungi, Fruit Bodies, and Infected Plant Tissues. Nucleic Acids Research 20:6115-6116.
62. **Moody, S. F., and B. M. Tyler.** 1990. Restriction Enzyme Analysis of Mitochondrial DNA of the *Aspergillus flavus* Group: *A. flavus*, *A. parasiticus* and *A. nomius*. Applied and Environmental Microbiology 56:2441-2452.
63. **Morales-Loredo, A., E. A. Gallardo-Zapata, D. S. Leal-Klevezas, R. S. Tamez-Guerra, M. A. Rocha-Peña, y J. P. Martínez-Soriano.** 1996. Uso de RAPD-PCR para la Diferenciación Taxonómica de *Aspergillus* spp. Revista Mexicana de Fitopatología 14:108-113.
64. **Moreno, M. E.** 1988. Manual para la Identificación de Hongos en Granos y sus Derivados, 1a. ed. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
65. **Moukhamedov, R., X. Hu, R. N. Nazar, and J. Robb.** 1994. Use of Polymerase Chain Reaction-Amplified Ribosomal Intergenic sequences for the Diagnosis of *Verticillium tricorpus*. Phytopathology 84:256-259.
66. **Nazar, R. N., X. Hu, J. Schmide, D. Gelham, and J. Robb.** 1991. Potential Use of PCR-amplified Ribosomal Intergenic Sequences in the Detection and Differentiation of *Verticillium* wilt pathogens. Physiological and Molecular Plant Pathology 39:1-11.
67. **Oard, J. H., and S. Dronavalli.** 1992. Rapid Isolation of Rice and Maize DNA for Analysis by Random-Primer PCR. Plant Molecular Biology Reporter 10:236-241.
68. **Olanya, O. M., and G. M. Hoyos.** 1997. Waste Corn as a Point Source of Inoculum for *Aspergillus flavus* in the Corn Agroecosystem. Plant Disease 81:576-581.
69. **Payne, A. G.** 1992. Aflatoxin in Maize. Cr. Rev. Plant Sc. 10:423-440.
70. **Pazoutova, S., I. Hamplova, M. Anderson, and D. W. Denning.** 1997. The presence of polyketide synthase gene as a discriminating marker between *A. terreus* and *A. flavipes* and the intraspecific variability of *A. terreus*. Biogenesis of Natural Products. Unpublished 4:20.

71. **Perng-Kuang, C., D. Bhatnagar, E. T. Cleveland, and J. W. Bennett. 1995.** Sequence Variability in Homologs of the Aflatoxin Pathway Gene *aflR* Distinguishes Species in *Aspergillus* Section *Fluvi*. *Applied and Environmental Microbiology* **61**:40-43.
72. **Perng-Kuang, C., J. W. Cary, D. Bhatnagar, E. T. Cleveland, J. W. Bennett, J. E. Linz, C. P. Woloshuk, and G. A. Payne. 1993.** Cloning of the *Aspergillus parasiticus* *apa-2* Gene Associated with the Regulation of Aflatoxin Biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* **59**:3273-3279.
73. **Perng-Kuang, C., C. K. Ehrlich, J. Yu, D. Bhatnagar, and E. T. Cleveland. 1995.** Increased Expression of *Aspergillus parasiticus* *aflR*, Encoding a Sequence-Specific DNA-Binding Protein, Relieves Nitrate Inhibition of Aflatoxin Biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* **61**:2372-2377.
74. **Perng-Kuang, C., C. D. Skory, and J. E. Linz. 1992.** Cloning of a Gene Associated with Aflatoxin B1 Biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Curr. Genet.* **21**:231-233.
75. **Prieto, R., and C. P. Woloshuk. 1997.** *ord 1*, an oxidoreductase Gene Responsible for Conversion of O-Methylsterigmatocystin to Aflatoxin in *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**:1661-1666.
76. **Prieto, R., G. L. Yousibova, and C. P. Woloshuk. 1996.** Identification of Aflatoxin Biosynthesis Genes by Genetic Complementation in an *Aspergillus flavus* Mutant Lacking the Aflatoxin Gene Cluster. *Applied and Environmental Microbiology* **62**:3567-3571.
77. **Promega. 1994.** pGEM-T Vector System. Technical Bulletin 150. Promega.
78. **Raper, K. B., and D. L. Fennell. 1965.** The Genus *Aspergillus*, 1a. ed. The Waverly Press, Inc., Baltimore, Md.
79. **Redecker, D., H. Thierfelder, C. Walker, and D. Werner. 1997.** Restriction Analysis of PCR-Amplified Internal Transcribed Spacers of Ribosomal as a Tool for Species Identification in Different Genera of the Order Glomales. *Applied and Environmental Microbiology* **63**:1756-1761.
80. **Rodríguez-del Bosque, L. A., M. C. A. Reyes, N. S. Acosta, C. J. R. Girón, C. I. Garza, y V. R. García. 1995.** Control de Aflatoxinas en Maíz en Tamaulipas. Folleto Técnico 17. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. Centro de Investigación Regional del Noreste. Campo Experimental Río Bravo. Tamaulipas, México.
81. **Rodríguez-del-Bosque, L. A. 1996.** Impact of Agronomic Factors on Aflatoxin Contamination in Preharvest Field Corn in Northeastern Mexico. *Plant Disease* **80**:988-993.
82. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and M. T. 1989.** Molecular Cloning a Laboratory Manual, Second Edition ed, vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
83. **Scott, P. M. 1995.** Natural Toxins, p. 1-25. *In*: AOAC Official Methods of Analysis. P. M. Scott (ed.), USA.
84. **Shapira, R., N. Paster, O. Eyal, M. Menasherov, A. Mett, and R. Salomon. 1996.** Detection of Aflatoxigenic Molds in Grains by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **62**:3270-3273.
85. **Shapira, R., N. Paster, M. Menasherov, O. Eyal, A. Mett, T. Meiron, E. Kuttin, and R. Salomon. 1997.** Development of Polyclonal Antibodies for Detection of Aflatoxigenic Molds Involving Culture Filtrate and Chimeric Proteins Expressed in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**:990-995.
86. **Sheffield, V. C., D. R. Cox, and R. M. Myers. 1990.** Identifying DNA Polymorphisms by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis., p. 206-218. *In*: PCR Protocols. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (ed.). Academic Press, Inc., San Diego, California.
87. **Skory, C. D., P. Chang, J. Cary, and J. Linz. 1992.** Isolation and Characterization of a Gene from *Aspergillus parasiticus* Associated with the Conversion of

- Versicolorin A to Sterigmatocystin in Aflatoxin Biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3527-3537.
88. **Smith, B. J.** 1984. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins, p. 1-365. *In*: Proteins. J. M. Walker (ed.), vol. 1. The Humana Press Inc., Clifton, New Jersey.
89. **Sneath, P. H. D., and R. R. Sokal.** 1973. Numerical Taxonomy. The principles and practices of numerical classification. W.H. Freeman, San Francisco.
90. **Stark, A. A.** 1980. Mutagenicity and Carcinogenicity of Mycotoxins: DNA Binding as a Possible Mode of Action. *Ann. Rev. Microbiol.* **34**:235-262.
91. **Suter-Crazzolara, C., and K. Unsiker.** 1995. Improved Expression of Toxic Proteins in *E. coli*. *BioTechniques* **19**:147-149.
92. **Taylor, J. W.** 1995. Molecular Phylogenetic Classification of Fungi. *Archives of Medical Research* **26**:307-314.
93. **Trucksess, M. W., M. E. Stack, S. Nesheim, S. W. Page, R. H. Albert, T. J. Hansen, and K. F. Donahue.** 1991. Immunoaffinity Column Coupled with Solution Fluorometry or Liquid Chromatography Postcolumn Derivatization of Aflatoxin in Corn, Peanuts, and Peanut Butter: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **74**:81-88.
94. **Varga, J., E. Kevei, E. Rinyu, J. Teren, and Z. Kozakiewicz.** 1996. Ochratoxin Production by *Aspergillus* Species. *Applied and Environmental Microbiology* **62**:4461-4464.
95. **Varga, J., F. Kevei, A. Vriesema, F. Debets, Z. Kozakiewicz, and J. Croft.** 1994. Mitochondrial DNA Restriction Fragment Length Polymorphism in Field Isolates of the *Aspergillus niger* Aggregate. *Can. J. Microbiol.* **40**:612-621.
96. **White, T., J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor.** 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenies, p. 315-322. *In*: PCR Protocols. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (ed.). Academic press, San Diego, CA.
97. **Whitehead, M. P., M. T. Shieh, E. T. Cleveland, J. W. Cary, and R. A. Dean.** 1995. Isolation and Characterization of Polygalaturonase Genes (*pecA* and *pecB*) from *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology* **61**:3316-3322.
98. **Williams, J., G. K., M. Hanafey, K., A. Rafalski, J., and S. Tingey, V.** 1993. Genetic Analysis Using Random Amplified Polymorphic DNA Markers, vol. 218. Coordinating ed., J. G. K. Williams.
99. **Wilson, D. M.** 1986. Detection and Determination of Aflatoxins in Maize, p. 100-109. A proceedings of the workshop. CIMMYT, UNDP and USAID.
100. **Woloshuk, C. P., J. R. Cavaletto, and T. E. Cleveland.** 1997. Inducers of Aflatoxin Biosynthesis from Colonized Maize Kernels Are Generated By an Amylase Activity from *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* **87**:164-169.
101. **Woloshuk, C. P., K. R. Foutz, J. F. Brewer, D. Bhatnagar, T. E. Cleveland, and G. A. Payne.** 1994. Molecular Characterization of *aflR*, a Regulatory Locus for Aflatoxin Biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* **60**:2408-2414.
102. **Woloshuk, C. P., E. R. Seip, G. A. Payne, and C. R. Adkins.** 1989. Genetic Transformation System for the Aflatoxin-Producing Fungus *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology* **55**:86-90.
103. **Yap, E. P. H., and J. O. D. McGee.** 1994. Non-Isotopic Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis of PCR Products, p. 165-177. *In*: PCR Technology: Current Innovations. H. G. Griffin, and A. M. Griffin (ed.). CRC Press, Inc., USA.
104. **Ymer, S.** 1991. Heat Inactivation of DNA Ligase Prior to Electroporation Increases Transformation Efficiency. *Nucleic Acids Research* **19**:6960.
105. **Yu, J., J. W. Cary, D. Bhatnagar, T. E. Cleveland, N. P. Keller, and F. S. Chu.** 1993. Cloning and Characterization of a cDNA from *Aspergillus parasiticus* Encoding an O-Methyltransferase Involved in Aflatoxin Biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* **59**:3565-3571.

106. **Yu, J., C. Perng-Kuang, W. J. Cary, M. Wright, D. Bhatnagar, T. E. Cleveland, G. Payne, and J. E. Linz. 1995.** Comparative Mapping of Aflatoxin Pathway Gene Clusters in *A. parasiticus* and *A. flavus*. *Applied and Environmental Microbiology* **61**:2365-2371.
107. **Yu, J. H., R. A. E. Butchko, M. Fernandes, N. P. Keller, T. J. Leonard, and T. H. Adams. 1996.** Conservation of Structure and Function of the Aflatoxin Regulatory Gene *aflR* from *Aspergillus nidulans* and *A. flavus*. *Curr Genet* **29**:549-555.
108. **Yuan, G.-F., C.-S. Liu, and C.-C. Chen. 1995.** Differentiation of *Aspergillus parasiticus* from *Aspergillus sojae* by Random Amplification of Polymorphic DNA. *Applied and Environmental Microbiology* **61**:2384-2387.
109. **Zijlstra, C., M. E. A. Lever, J. B. Uenk, and V. H. C. Silfhout. 1995.** Differences Between ITS Regions of Isolates of Root-knot Nematodes *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. *Genetics* **85**:1231-1237.

FIGURAS

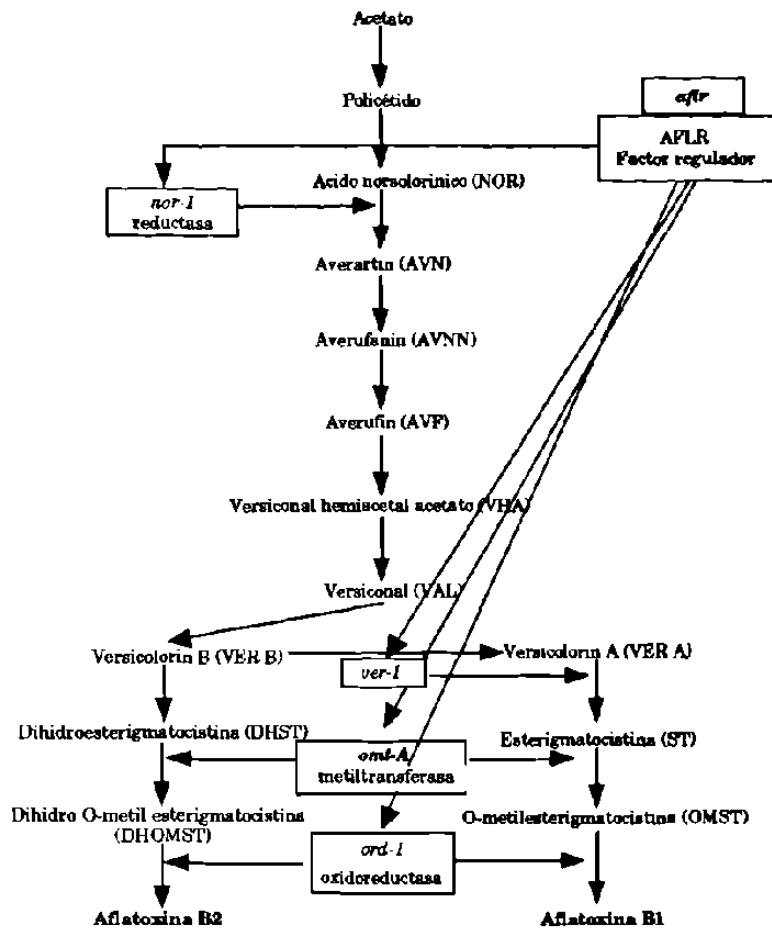


Figura 1. Biosíntesis de aflatoxinas B1 y B2. Los genes que han sido clonados a la fecha se indican en los recuadros, éstos son regulados por el factor AFLR (104).

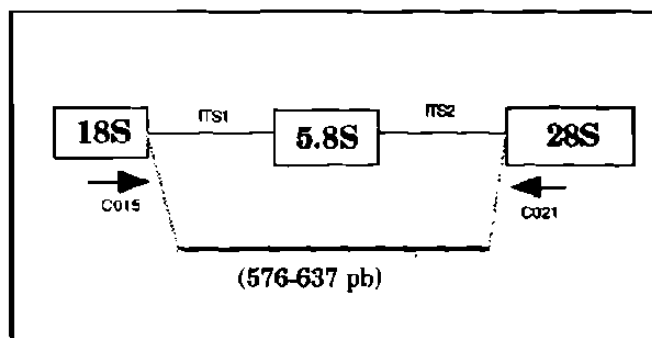


Figura 2. Posición de los iniciadores para amplificar las regiones ITS. Los iniciadores C015 y C021 se localizan en las regiones conservadas 18S y 28S y amplifican la región ITS1-5.8S-ITS2 con tamaños que variaron desde 576 a 637 pb indicados entre paréntesis.

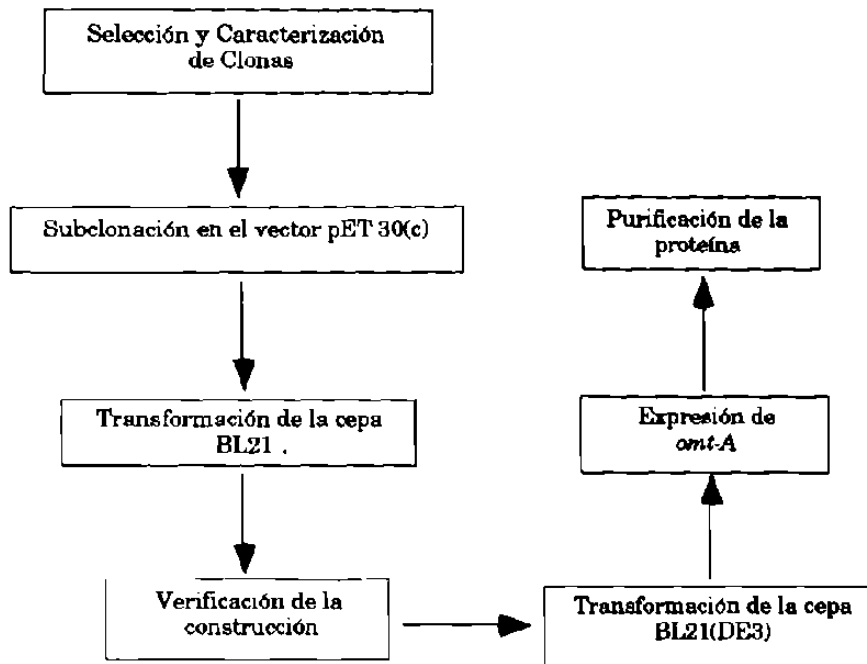


Figura 3. Expresión del gen *omt-A*. La expresión se realizó con el sistema pET-30c(+) (Novagen, Madison, Wis.).

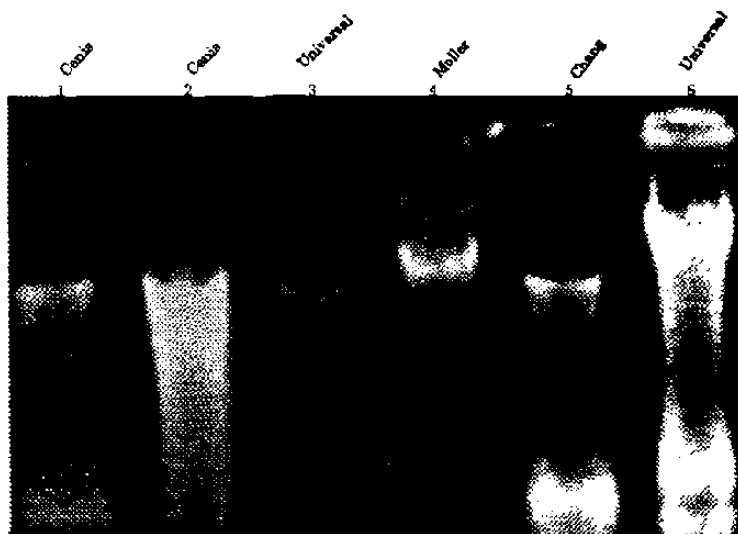


Figura 4. Comparación de diferentes métodos de extracción de DNA de *Aspergillus* sp. Fraccionamiento electroforético en gel de agarosa. El método de Cenis, carril 1 corresponde al volumen de 0.5 ml y el carril 2 al de 10 ml de medio de cultivo.

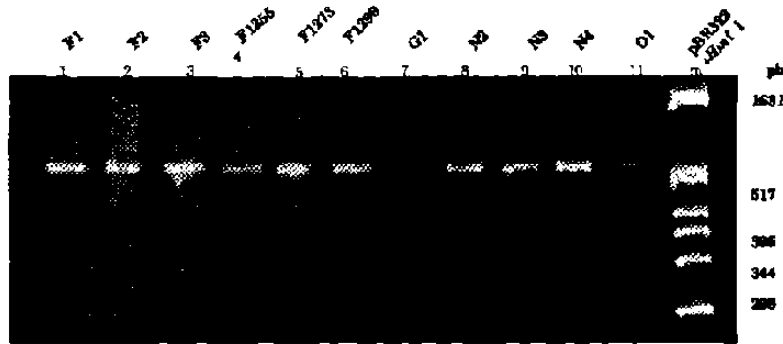


Figura 5. Amplificación de los ITS de diferentes especies de *Aspergillus*. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los fragmentos amplificados con los iniciadores C015 y C021.

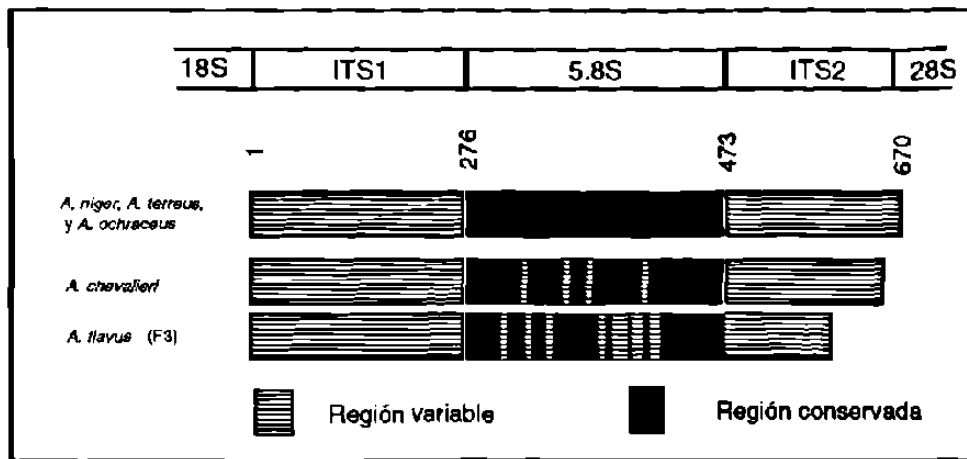


Figura 6. Representación esquemática de las secuencias ITS-PCR. Con base en el alineamiento por el método J. Hein, se encontró una región conservada de la posición 276 a la 473 para tres especies de *Aspergillus*, con excepción en *A. chevalieri* y *A. flavus* que variaron en cuatro y 11 posiciones, respectivamente.

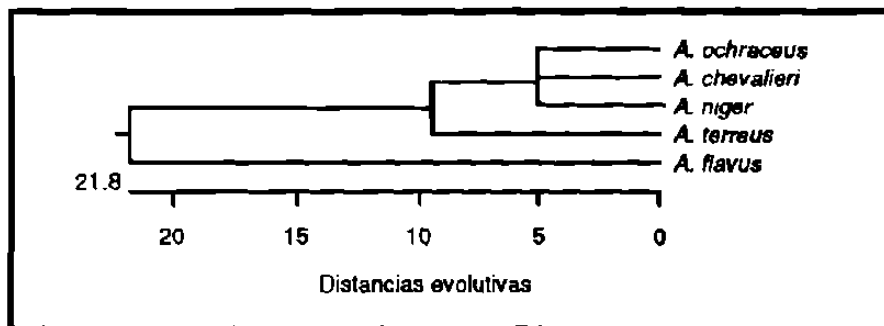


Figura 7. Arbol de las relaciones filogenéticas de las secuencias consenso 5.8S de cinco especies de *Aspergillus*. Alineamiento construido con el método J. Hein, el cual se basa en examinaciones de pares de secuencias.

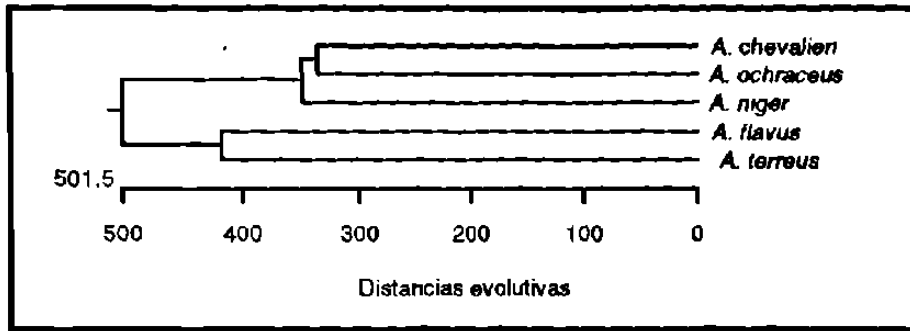


Figura 8. Arbol de las relaciones filogenéticas de las secuencias ITS de cinco especies de *Aspergillus*. Alineamiento construido con el método J. Hein, el cual se basa en examinaciones de pares de secuencias.

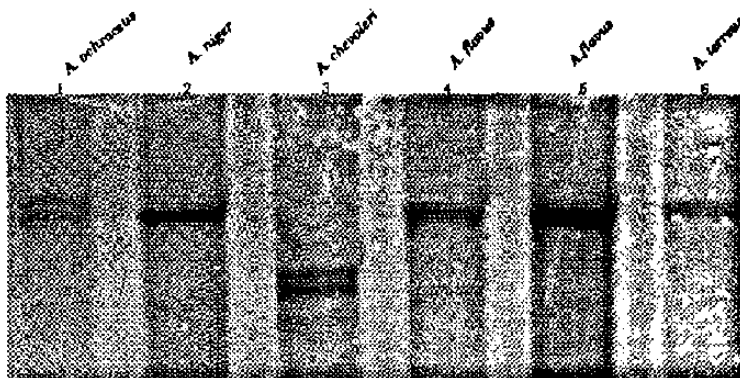


Figura 9. Polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) de los fragmentos ITS de cinco especies de *Aspergillus*. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6 %. El carril 4 y 5 corresponden a la especie *A. flavus*, aislamiento nacional y cepa de referencia, respectivamente.

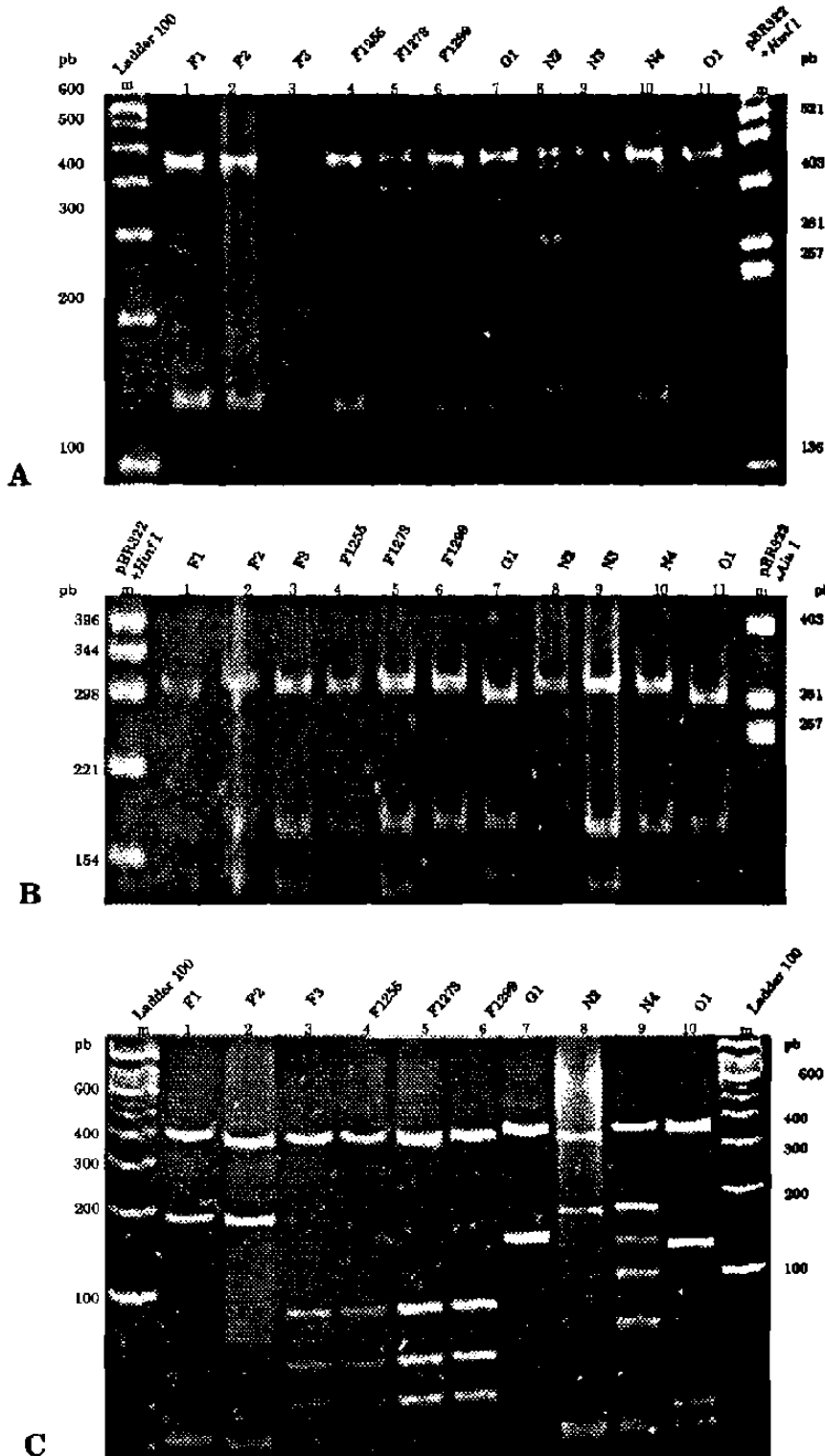


Figura 10. Patrón de restricción de los ITS con las endonucleasas *Xho* I, *Xho* I + *Eco*R I y *Dde* I. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15 %. El panel A corresponde a *Xho* I, panel B a *Xho* I + *Eco*R I y panel C a *Dde* I.

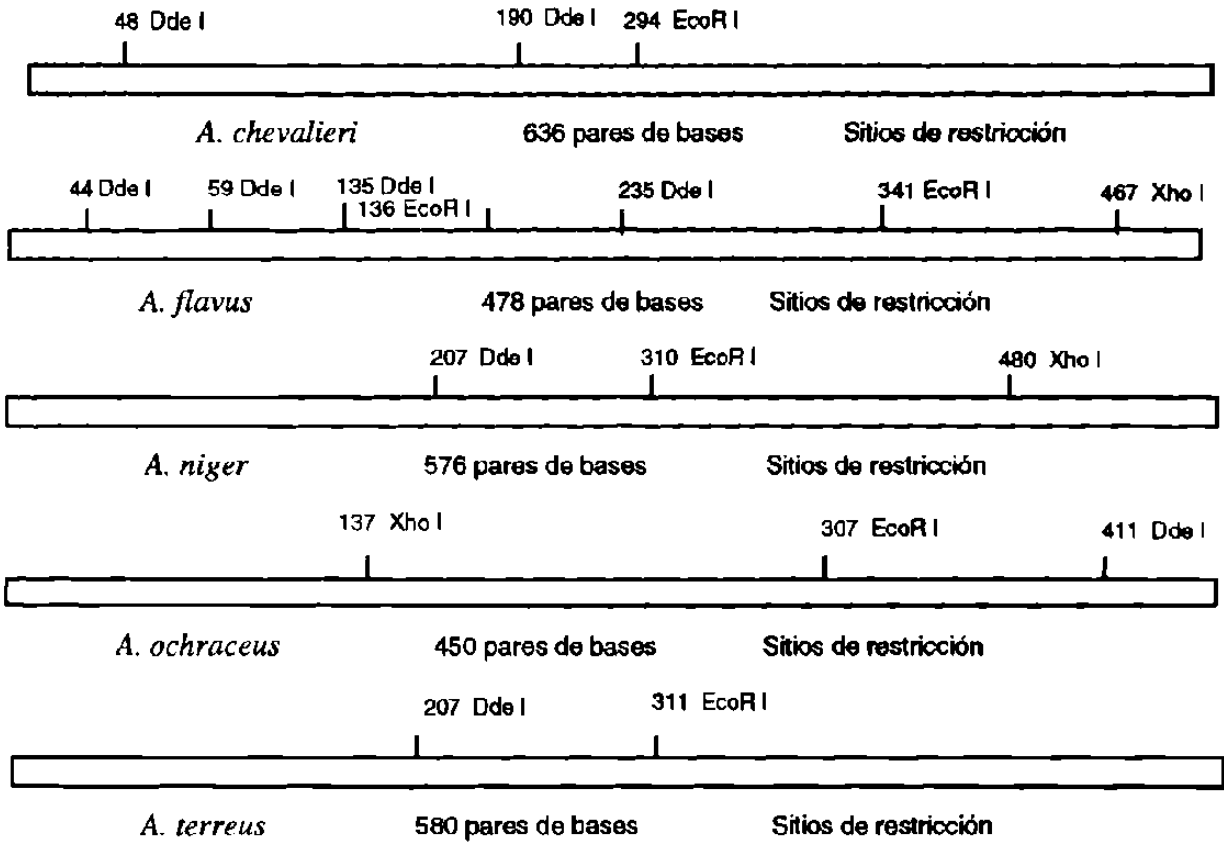


Figura 11. Sitios de restricción de las secuencias ITS en cinco especies de *Aspergillus*. Sitios generados mediante el programa computacional DNA Strider 1.1.

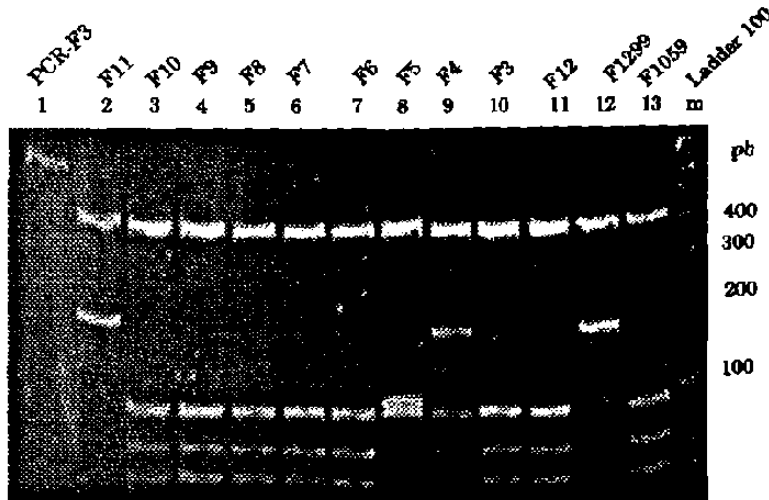


Figura 12. Patrón de restricción de ITS-PCR con la endonucleasa *Dde I* para diferentes aislamientos de *A. flavus*. El carril 1 corresponde a un fragmento sin digerir amplificado con los iniciadores C015 y C021 y los carriles 2, 8, 9 y 12 son supuestos aislamientos de *A. flavus*.

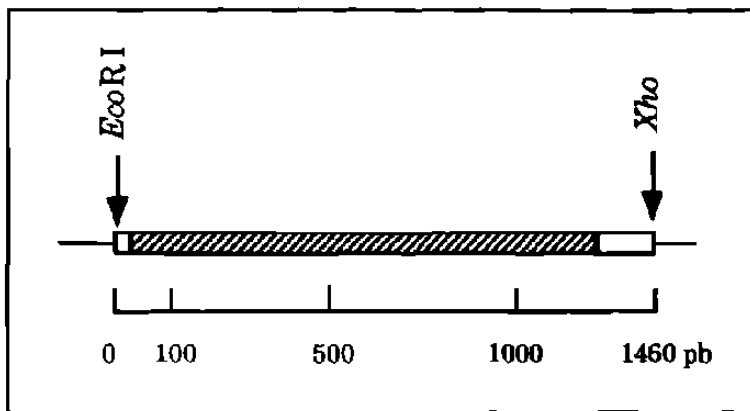


Figura 14. Mapa de restricción del clon *omt-A*. La región sombreada corresponde al gen *omt-A* con 1,254 pb y los extremos 5' y 3' están indicados por los espacios en blanco. Tomado de Yu y cols, 1993 (103).

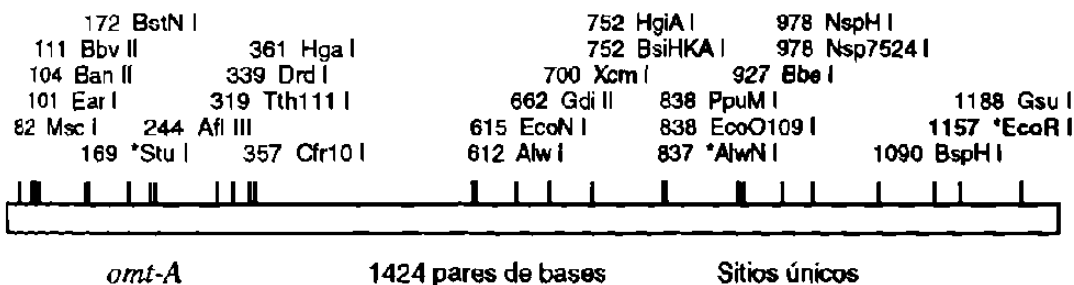


Figura 15. Sitios únicos de corte con enzimas de restricción de la secuencia del gen *omt-A*. Los sitios de restricción fueron generados mediante el programa computacional DNA Strider 1.1. Se localizó un sitio de corte para *EcoR I* en la posición 1,157, es decir dentro de la secuencia del clon *omt-A*.

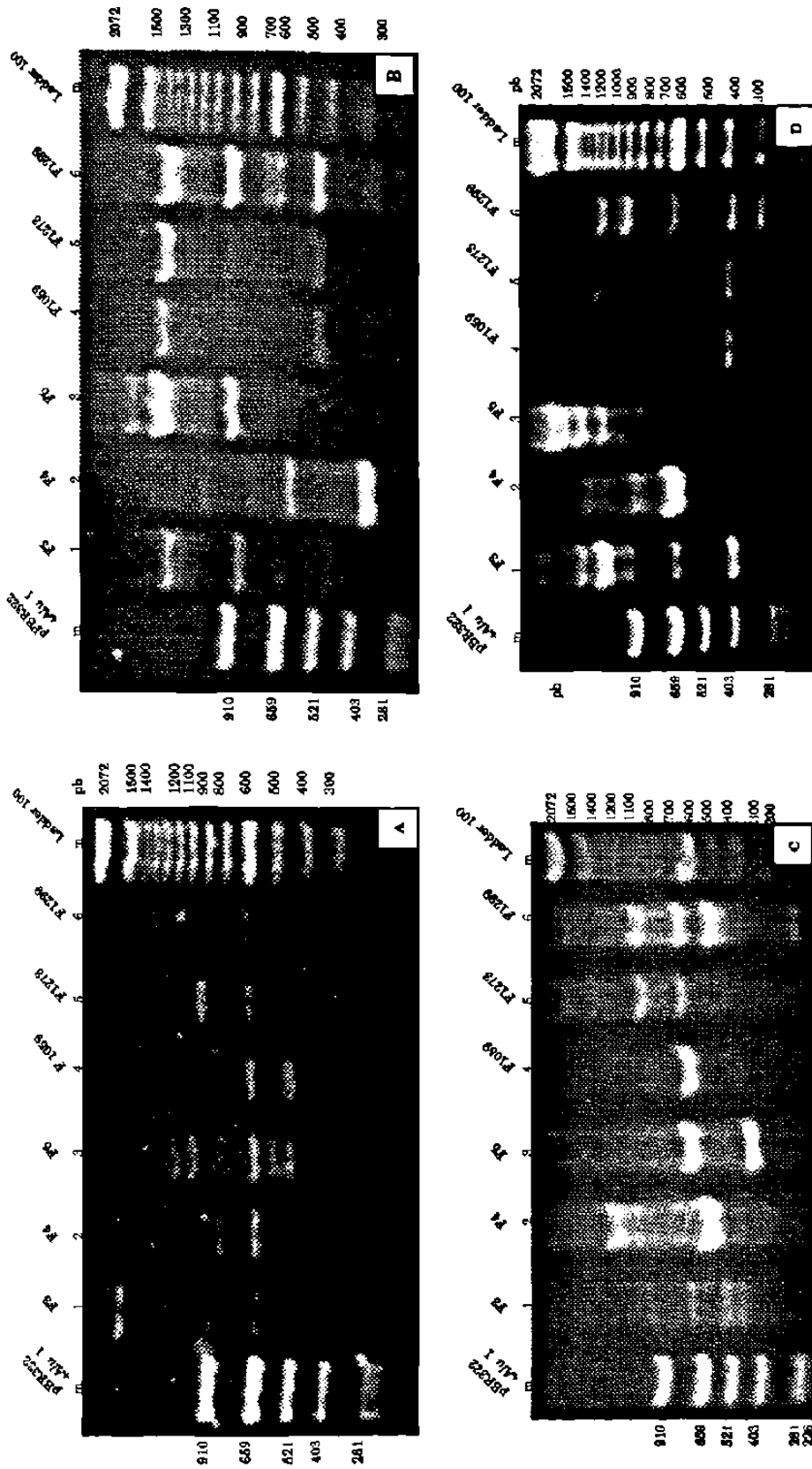


Figura 13. Patrones RAPD de seis aislamientos de *A. flavus* obtenidos con los iniciadores 50-10, 60-10, 70-10 y 80-10. Del carril 1 al 3 corresponde a cepas nacionales y del 4 al 6 a cepas de referencia. El panel A, B, C, y D corresponden a los iniciadores 50-10, 60-10, 70-10 y 80-10, respectivamente.

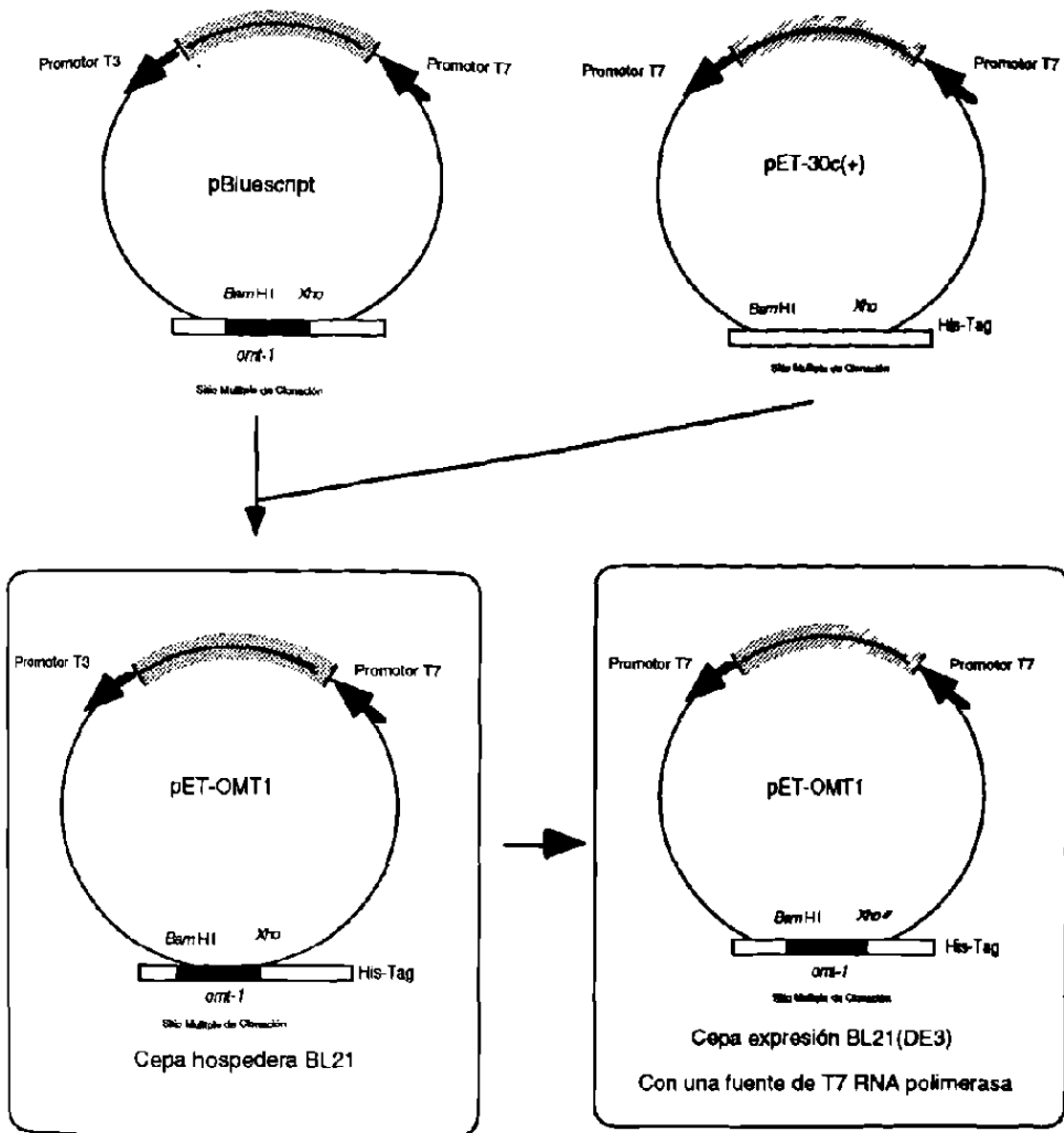


Figura 16. Subclonación del gen *omtA* en el vector de expresión pET-30c(+). El fragmento *omtA* se ligó al vector pET-30c(+) mediante la digestión de los sitios *Bam*HI y *Xho*I para generar la construcción pET-OMTA.

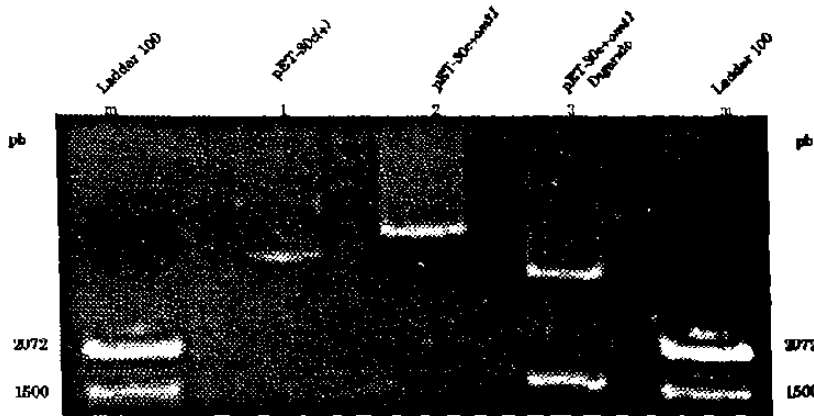


Figura 17. Productos de la digestión enzimática del vector de expresión pET-30c(+). Verificación de la subclonación del gen *omt-A* en pET-30c(+), mediante la digestión enzimática con *Bam*H I y *Xho* I en el carril 3.

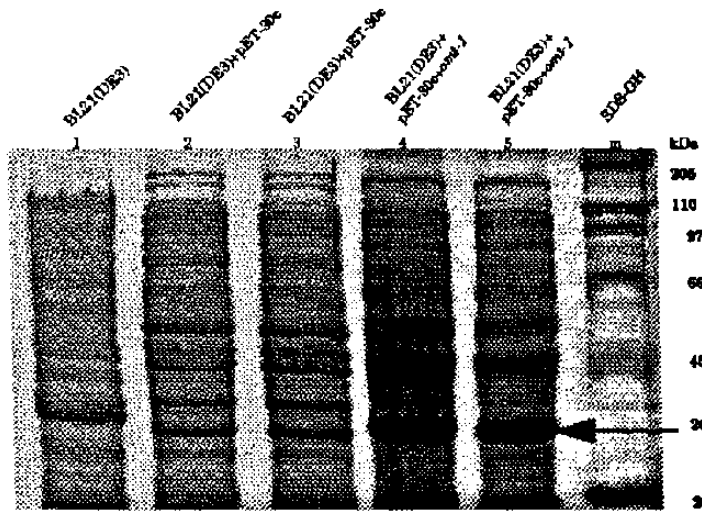


Figura 18. Electroforesis de proteínas totales de células recombinantes pET-30c(+)+*omt-A*. El carril 1 corresponde a la cepa silvestre, 2-3 a la recombinante sin inserto y 4-5 a la recombinante con el inserto *omt-A*.

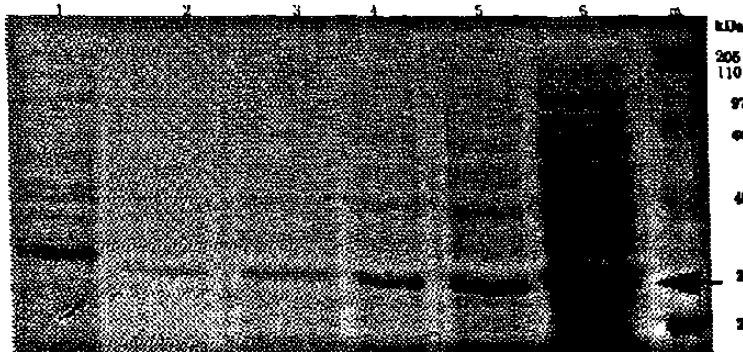


Figura 19. Tiempo y curso de la expresión de pET-30c(+)+*omt-A* en *E. coli*. El carril 1 corresponde a la cepa silvestre y del carril 2 al 6 a alícuotas secuenciales a partir de la cepa recombinante.

TABLAS

Tabla 1. Composición de bases y secuencia de los iniciadores utilizados en las reacciones de RAPD-PCR

Composición	Iniciador	Secuencia (5' a 3')
50% G-C	50-10	gtgcaatgag
60% G-C	60-10	cgcagtactc
70% G-C	70-10	catccccgaac
80% G-C	80-10	gcacccgacg

G-C = Guanina-Citosina

Tabla 2. Procedencia de cepas de *Aspergillus* spp, utilizadas en esta investigación

Clave	Cepa	Procedencia
F1	<i>A. terreus</i>	UGS-UNAM
F2	<i>A. terreus</i> M-26	CEI-UANL
F3	<i>A. flavus</i>	UGS-UNAM
F4	<i>A. flavus</i>	MM-UANL
F5	<i>A. flavus</i>	CEI-UANL
F6	<i>A. flavus</i>	Yautepec, Mor.
F7	<i>A. flavus</i>	Yautepec, Mor.
F8	<i>A. flavus</i>	Yautepec, Mor.
F9	<i>A. flavus</i>	CEI-UANL
F10	<i>A. flavus</i>	CEI-UANL
F1059	<i>A. flavus</i>	SRRC-USA
F1273	<i>A. flavus</i>	SRRC-USA
F1299	<i>A. flavus</i>	SRRC-USA
N1	<i>A. niger</i>	UGS-UNAM
N2	<i>A. niger</i>	UGS-UNAM
N3	<i>A. niger</i>	CEI-UANL
N4a	<i>A. niger</i>	CEI-UANL
N4b	<i>A. niger</i>	CEI-UANL
N5	<i>A. niger</i> M-25	CEI-UANL
O1	<i>A. ochraceus</i>	UGS-UNAM
PSUI	<i>A. parasiticus</i>	SRRC-USA
P148	<i>A. parasiticus</i>	SRRC-USA

UGS-UNAM: Unidad de Granos y Semillas, Universidad Nacional Autónoma de México.

CEI-UANL: Centro de Enfermedades Infecciosas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

MM-UANL: Micología Médica, Universidad Autónoma de Nuevo León.

SRRC-USA: Southern Regional Research Center, United States of America

Tabla 3. Comparación de métodos de extracción de DNA.

Características	Cenis 1	Cenis 2	Möller	Universal	Chang
Volumen de micelio (ml)	0.5	10	250	10	10
Contaminación	Baja	Baja	Alta	Baja	Alta
Liofilización	No	No	Sí	No	Sí
Fenolización	No	No	No	Sí	Sí
Período incubación	No	No	Sí	No	Sí
Tiempo extracción	Corto	Corto	Largo	Corto	Medio
Cantidad DNA (μ g)	3	25	100	25	25

Cenis 1. Volumen 0.5 ml de medio de cultivo

Cenis 2. Volumen de 10 ml de medio de cultivo

Tabla 4. Secuencias del fragmento de DNA ITS1-5.8S-IT2 de cinco especies de *Aspergillus*, obtenidas mediante el método Sanger.**Secuencia *A. terreus***

CCGCGGGATTCAAGGTTTCGGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGTCTTTATGG
 CCCAACCTCCCACCCGCTGACTATTGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCAGCGTTGCTGGCCGCC
 GGGGGGCGACTCGCCCCGGGCCCGTGCCCGCCGGAGACCCCAACATGAGCCCTGTTCTGAAAGCTT
 GCAGTCTGAGTGTGATTC'TTTGCAATCAGTTAAAAC'TTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATC
 GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTT
 GAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAG
 CCCGGCTTGTGTGTTGGGCCTCGTCCCCGGCTCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGCAGCGGGCCGACCCG
 CGTCCGGTCCCTCGAAGCGTTATGGGGCTTCGTCTTCCGCTCCGTAAGCCSGCCGGCGCCCGCCGACG
 CATTATTTGCAACTTGT'TTTTTCCAGTTTGACTCCGATCAGGTT

Secuencia *A. flavus* (H142)

CCCAACCTCCCACCCGCTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGTCATGGCCGCCGGG
 GGCGTCAGCCCCGGGCCCGCGCCCGGAGACACCACGAACCTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAG
 TTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAAC'TTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAAC
 GCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTCAGAAATTCGATGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACAT
 TGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTG
 TGTGTTGGGTCTGTCGTCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCAAGGCAGCGGGCCGACCCGCGTCCGA
 TCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGC

Secuencia *A. flavus* (F3)

GAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCCGGCCGCCATGGCCCGGGATTCAAGGTTTCCGTANGTGAA
 CCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTTTACTGT
 ACC'TTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCATTCATGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCGCGCCC
 GCCGAAACACCACGAACCTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAA
 ACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAANAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGT
 GAATTGCAGAAATTCGATGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTCGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGG
 CATGCCTGTCCGAACGTCATTGCTGCCCATCAAACACGCTTGTGTGTTGGGTCTCTCCCTCTCGGGG
 GGGACAGGCC

Continuación Tabla 4. Secuencias del fragmento de DNA ITS1-5.8S-IT2 de cinco especies de *Aspergillus*, obtenidas mediante el método Sanger.

Secuencia *A. ochraceus*

CCGCGGGATTTCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTG
GAAAGAATGGTTGGAAAACGTCGGCAGGCGCCGGCCAATCCTACAGAGCATGTGACAAAGCCCCATA
CGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCCGCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCCCGGAGAGGGGGACGGCG
ACCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCCGGAATACCA
GGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCA
TTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTTGTTGAAAGTTTAACTGATTGCAT
TCAATCAACTCAGACTGCACGCTTTCAGACAGTGTTCGTGTTGGGGTCTCCGGCGGGCACGGGCCCG
GGGGCAGAAGCGCCCCCGGCGGCCGACAAGCGGGCGGCCCGCGAAGCAACAGGGTTACAATARA
CACGATGGAGTTGGCCAAAGACCGCACTCGTATGATCTCGCAGTCACTACGAACTGATCACTAT
CGCGCTGCAGTCACATATGA

Secuencia *A. niger*

CCGCGGGATTCAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCAGTGCGGGTCCCTTTGGG
CCCAACCTCCCATCCGTGTCTATTGTACCCTGTGTGCTTCGGCGGGCCCCCGCCCTTGTCCGGCCCGG
GGGGCGCCTCTGCCCGCCGGGCCGTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAACACTGTCTGAAAGCGT
GCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCG
ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTG
AACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGC
CCGGCTTGTGTGTTGGGTGCGCGTCCCCCTCTCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCCACC
GCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACATGCTCTGTAAGATTGGCCGGC
GCCTGCCGACGTTTCCAACCATTCCTTCCAGGTTGACCTCCGGATCAGGT

Secuencia *A. chevalieri*

CCGCGGGATTCAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAGTGAGGGTCCCTCGGG
GCCCAACCTCCCACCCGTGTATACCGTACCTTGTGTGCTTCGGCGAGCCCGCCCCCTTTTCTTTTAG
GGGGCACAGCGCTCGCCGGAGACACCAACGTGAACACTGTCTGAAGTCTTGTGCTCTGAGTCGATTG
TATCGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA
AATGCGATAATTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCACCC
CCTGGTATTCGGGGGGTATGCCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGG
GTCGTCTCCCCCCCCCAGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCACCAGCGTCCGGTCCCTCGA
ACGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTTGTAGGCCCGGCCGGCTGCTGGCCGACGCTGAAAAGCAACC
AACTATTTTCCAGGTTGACTCGGATCAGGTAGGATACCCGCTGAACTTAACMTATCAATAAGC
GAATCACTAGTGCGGCGCCTGCAGGTCGACATATGGG

Tabla 5. Alineamiento de bases del fragmento ITS de cinco especies de *Aspergillus* con el método J. Hein.

	10	20	30	40	50	60	70		
<i>chevalieri</i>	C-----	-----	-----	CGCG--	GGATTCAAGGTTTC	CCGTAGGTGAA		29	
<i>niger</i>	C-----	-----	-----	CGCG--	GGATTCAAGGTTTC	GTAGGTGAA		29	
<i>terreus</i>	C-----	-----	-----	CGCG--	GGATTCAAGGTTTC	CCGTAGGTGAA		29	
<i>A. ochraceus</i>	T-----	-----	-----	-----	CATATGTGACTGCAGCGGC	CATAGTGATCAG		32	
<i>A. flavus</i> (F3)	GAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGCCGCCATGGCCGC					GGATTCAAGGTTTC	CCGTANGTGAA	67	

	CCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGC GGGTCTPTT---GGG-CCCAACCTCCCA CGTGTATTATGTAC								
	80	90	100	110	120	130	140		
<i>chevalieri</i>	CCTGCGGAAGGATCATTACTGAGTGAGGGTCCCTC		---GGGCCCCAACCTCCCA	CCCCGTGTATACCGTAC				96	
<i>niger</i>	CCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGC GGGTCTPTT		---GGG-CCCAACCTCCCA	TCCGTGTCTATGTAC				95	
<i>terreus</i>	CCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGC GGGTCTPTA		---TGG-CCCAACCTCCCA	C GTGACTATTGTAC				95	
<i>A. ochraceus</i>	TTCGTAGTGACTGCGAGATCATA	CGAGTGC GGGTCT	---TTGGCCAA	---CTCCATCGTGTATTGTAA				95	
<i>A. flavus</i> (F3)	CCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTCTTAGCGAG		---CCCAACCTCCCA	CCCGTGTACTGTAC				136	

	CTT-GTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGC---TTGTTGGCCCGGGGGG-CGC T CTGC CGGGCCC								
	150	160	170	180	190	200	210		
<i>chevalieri</i>	CTT-GTTGCTTCGGCGAGCCCGCCCC		---CT-TTTTCTTTTAGGGG	---CAC				142	
<i>niger</i>	CCT-GTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGC		---TTGTGGCCCGGGGGGGCGCT	---CTGCCCCCGGGCC				159	
<i>terreus</i>	CTT-GTTGCTTCGGCGGGCCCGCCA		---GGTGTGCTGGCCCGGGGGG	---CGACTCGCCCGGGCC				158	
<i>A. ochraceus</i>	CCT-GTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGC		---TTGTGGCCCGGGGGG	---CGCTT-CTGCCCCCGGGCC				158	
<i>A. flavus</i> (F3)	CTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCA		---TTCATGGCCCGGGGGG	---T-CTCAGCCCGGGCC				195	

	GTGCCCGCCGGAGACCCCAACAGAACACTGT CTGAAAGCGTCAGTCTGAGTTGATTG AAT GCAAT								
	220	230	240	250	260	270	280		
<i>chevalieri</i>	GCGCTCGCCGGAGACACCAACGTGAACACTGT		---CTGAAAGCTTTGTCGTCTGAGTTCGATTG					210	
<i>niger</i>	GTGCCCGCCGGAGACCCCAACAGAACACTGT		---CTGAAAGCGTCAGTCTGAGTTGATTG					226	
<i>terreus</i>	GTGCCCGCCGGAGACCCCAACATGAGCCCTGT		---TCTGAAAGCTTGCAGTCTGAGTGTGATTCTTT					227	
<i>A. ochraceus</i>	GTGCCCGCCGGAGACCCCAACAGAACACTGT		---CTGAAAGCGTCAGTCTGAGTTGATTG					225	
<i>A. flavus</i> (F3)	GCGCCCGCCGGAAC---ACCACGAACTCTGT		---CTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATC					260	

	CAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAAT								
	290	300	310	320	330	340	350		
<i>chevalieri</i>	CAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAAT							280	
<i>niger</i>	CAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAAT							296	
<i>terreus</i>	CAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAAT							297	
<i>A. ochraceus</i>	CAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAAT							295	
<i>A. flavus</i> (F3)	CAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAANAACGCAGCGAAATGCGATAAAT							330	

	AATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGC TGGTATTCCGGGG								
	360	370	380	390	400	410	420		
<i>chevalieri</i>	AATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGC							350	
<i>niger</i>	AATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCC							366	
<i>terreus</i>	AATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCC							367	
<i>A. ochraceus</i>	AATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCC							365	
<i>A. flavus</i> (F3)	AGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCC							400	

Continuación.....Tabla 5. Alineamiento de bases de del fragmento ITS de cinco especies de *Aspergillus* con el método J. Hein.

	GGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGCTGTGTGTGTGGGTGCG C GTC CCCTCTC	
	430 440 450 460 470 480 49	
chevalieri	GGTATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTGTGTGTGTGGGTGCTCCTCCCCCCCCC	420
niger	GGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGCTGTGTGTGTGGGTGCG CCGTCCCCCTCTC	435
terreus	GGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGCTGTGTGTGTGGGC - TCGTCCCCGGCTC	435
A. ochraceus	GGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGCTGTGTGTGTGGGTGCG-C GTCCCCCTCTC	434
A. flavus (F3)	GGCATGCCTGTCCGAACGTCATTGCTGCCCATCAAACAGCTGTGTGTGTGGGTC--TCTCC-- --CTC	463
CGGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCGCGTCCGGTCCCTCGAG CGTATGGGGCTTTGTGCAC		
	500 510 520 530 54 55 560	
chevalieri	CAGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCGCGTCCGGTCCCTCGAA--CGTATGGGGCTTTGTGCAC	488
niger	CGGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCGCGTCCGATCCCTCGAG--CGTATGGGGCTTTGTGCAC	5 3
terreus	CCGGGGGACGGGCCCCGAAAG--CAGCGGGCGGCACCGCGTCCGGTCCCTCGAAGCGTTATGGGGCTTCGTCTT	5 4
A. ochraceus	CGGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCGCGTCCGATCCCTCGAG CGTATGGGGCTTTGTGCAC	5 2
A. flavus (F3)	TCGGGG-----	471
CTGCTCT-GTAGGATTGGCCGGC-GCCTGCCGACGT-----TTTCCAACCAT TTTTTCAGGTT		
	570 580 590 600 610 620 63	
chevalieri	CCGCTCTTGTAGGCCCGGCCGGCTGCTGGCCGACGC-----TGAAAAGCAACCAACTATTTTTCAGGTT	553
niger	ATGCTCT-GTAAGATTGGCCGGC-GCCTGCCGACGT-----TTTCCAACCAT-----TCTTTCAGGTT	560
terreus	CCGCTCC-GTAAG-CCSGCCGGC-GCCCGCCGACGCATTTATTTGCAACTTG-----TTTTTTCAGGTT	565
A. ochraceus	ATGCTCT-GTAGGATTGGCCGGC-GCCTGCCGACGT-----TTTCCAACCAT-----TCTTTCAGGTT	559
A. flavus (F3)	-----	471
GACCTCGGATCAGGTTXX		
	640 650 660 670 680 690 700	
chevalieri	GAC-TCGGATCAGGTAGG-ATACCCGCTGAACTTAA-CMTATCAATAAGCGAATCACTAGTGCCGGCGCCT	620
niger	GACCTCCGGATCAGGT	576
terreus	TGACTCCGATCAGGTT	581
A. ochraceus	GACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGAATCCC- - - - -	617
A. flavus (F3)	-----GGACAGGCC	479
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX		
	710	
chevalieri	GCAGGTCGACATATGGG	637
niger		576
terreus		581
A. ochraceus	-----GCGG	620
A. flavus (F3)		479

Nota. Las regiones consenso corresponden a las áreas oscuras

Tabla 6. Porcentajes de similitud y divergencia para cinco especies de *Aspergillus* obtenidos mediante el método J. Hein.

	<i>A. chevalieri</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. terreus</i>
<i>A. chevalieri</i>	***	84.0	87.0	80.0	86.0
<i>A. flavus</i>	53.1	***	87.0	76.0	86.0
<i>A. niger</i>	29.5	39.4	***	88.0	89.0
<i>A. ochraceus</i>	34.1	53.2	20.0	***	80.0
<i>A. terreus</i>	33.6	42.2	16.5	53.2	***

Por ciento de similitud en la parte superior de los asteriscos
 Por ciento de divergencia en la parte inferior de los asteriscos

Tabla 7. Fragmentos obtenidos mediante la digestión con *Xho* I.

Tamaño (pb)	460	430	250	160	130
<i>A. terreus</i>	+	-	-	-	+
<i>A. flavus</i>	+	-	-	-	+
<i>A. chevalieri</i>	+	+	+	+	-
<i>A. niger</i>	+	-	-	-	+
<i>A. ochraceus</i>	+	-	-	-	+

+ presencia de fragmento
 - ausencia de fragmento

Tabla 8. Fragmentos obtenidos mediante la digestión con *Xho* I + *Eco*R I.

Tamaño (pb)	300	160	130
<i>A. terreus</i>	+	+	+
<i>A. flavus</i>	+	+	+
<i>A. chevalieri</i>	+	+	+
<i>A. niger</i>	+	+	+
<i>A. ochraceus</i>	+	+	+

+ presencia de fragmento
 - ausencia de fragmento

Tabla 9. Fragmentos obtenidos (pb/pb) mediante análisis de restricción de acuerdo al programa computacional DNA Strider 1.1

Especie	<i>Eco</i> R I	<i>Xho</i> I	<i>Dde</i> I
<i>A. terreus</i>	310/270		206/374
<i>A. flavus</i>	341/136	463/11	44/59/135/239
<i>A. chevalieri</i>	293/343		47/142/447
<i>A. niger</i>	309/267	479/97	206/370
<i>A. ochraceus</i>	306/144	136/314	410/40

Tabla 10. Fragmentos obtenidos mediante la digestión con *Dde* I.

Tamaño(pb)	400	390	190	180	140	120	100	90	60	30	10
<i>A. terreus</i>		+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. flavus</i>		+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>A. chevalieri</i>	+		-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. niger</i>	+			+	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. ochraceus</i>	+		-	-	+	-	-	-	-	+	-

+ presencia de fragmento
- ausencia de fragmento

Tabla 11. Matriz de fragmentos amplificados en cinco especies de *Aspergillus*.

Iniciador 50-10

Fragmento	<i>A. flavus</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. chevalieri</i>	<i>A. terreus</i>	<i>A. niger</i>
1	0	0	0	1	0
2	0	1	1	*	0
3	0	1	1	*	0
4	1	1	1	0	0
5	0	0	0	1	0
6	1	0	0	1	0
7	0	1	1	0	1
8	1	0	0	1	0
9	1	0	0	*	0
10	*	1	1	0	0
11	1	1	1	1	0
12	0	1	1	,	0
13	1	0	0	0	0

Continuación..... Tabla 11. Matriz de fragmentos amplificados en cinco especies de *Aspergillus* spp.

Iniciador 60-10

Fragmento	<i>A. flavus</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. chevalieri</i>	<i>A. terreus</i>	<i>A. niger</i>
1	1	0	0	0	0
2	*	1	*	1	*
3	1	*	0	0	0
4	1	*	0	1	0
5	1	1	1	0	0
6	0	0	0	1	0
7	1	1	0	0	1
8	1	0	0	0	0
9	1	0	0	0	0
10	1	1	1	1	0
11	1	1	0	0	0

Iniciador 70-10

Fragmento	<i>A. flavus</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. chevalieri</i>	<i>A. terreus</i>	<i>A. niger</i>
1	0	0	0	1	0
2	0	1	1	1	1
3	0	0	0	*	1
4	0	1	1	1	0
5	0	1	1	1	1
6	0	1	1	1	0
7	0	1	1	*	0
8	0	0	1	0	0
9	0	1	1	0	0
10	1	*	1	0	0
11	0	0	0	1	0
12	1	0	0	0	0

Iniciador 80-10

Fragmento	<i>A. flavus</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. chevalieri</i>	<i>A. terreus</i>	<i>A. niger</i>
1	1	0	0	1	0
2	0	0	1	0	0
3	1	0	0	1	0
4	0	0	0	1	1
5	*	1	1	1	*
6	0	1	1	0	0
7	0	0	*	1	0
8	0	0	0	1	0
9	0	0	1	0	0
10	0	0	1	0	0

1 = Fragmento presente

0 = Fragmento ausente

* = Fragmento no amplificado intensamente.

Tabla 12. Índices de similitud de Dice con base en los patrones electroforéticos generados con RAPD-PCR (iniciador 50-10).

	<i>A. flavus</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. chevalieri</i>	<i>A. terreus</i>	<i>A. niger</i>
<i>A. flavus</i>	1.0				
<i>A. ochraceus</i>	0.63	1.0			
<i>A. chevalieri</i>	0.63	1.0	1.0		
<i>A. terreus</i>	0.82	0.53	0.53	1.0	
<i>A. niger</i>	0.18	0.22	0.22	0.20	1.0

Tabla 13. Índices de similitud de Dice con base en los patrones electroforéticos generados con RAPD-PCR (iniciador 60-10).

	<i>A. flavus</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. chevalieri</i>	<i>A. terreus</i>	<i>A. niger</i>
<i>A. flavus</i>	1.0				
<i>A. ochraceus</i>	0.88	1.0			
<i>A. chevalieri</i>	0.57	0.60	1.0		
<i>A. terreus</i>	0.62	0.67	0.75	1.0	
<i>A. niger</i>	0.20	0.25	0.0	0.0	1.0

Tabla 14. Índices de similitud de Dice con base en los patrones electroforéticos generados con RAPD-PCR (iniciador 70-10).

	<i>A. flavus</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. chevalieri</i>	<i>A. terreus</i>	<i>A. niger</i>
<i>A. flavus</i>	1.0				
<i>A. ochraceus</i>	0.22	1.0			
<i>A. chevalieri</i>	0.20	0.86	1.0		
<i>A. terreus</i>	0.00	0.62	0.53	1.0	
<i>A. niger</i>	0.00	0.44	0.36	0.60	1.0

Tabla 15. Índices de similitud de Dice con base en los patrones electroforéticos generados con RAPD-PCR (iniciador 80-10).

	<i>A. flavus</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. chevalieri</i>	<i>A. terreus</i>	<i>A. niger</i>
<i>A. flavus</i>	1.0				
<i>A. ochraceus</i>	0.00	1.0			
<i>A. chevalieri</i>	0.00	0.80	1.0		
<i>A. terreus</i>	0.50	0.25	0.22	1.0	
<i>A. niger</i>	0.00	0.00	0.00	0.29	1.0

Tabla 16. Matriz de fragmentos amplificados en seis aislamientos de *A. flavus*.

Iniciador 50% G-C

Fragmento	F3	F4	F5	SRRC1059	SRRC1273	SRRC1299
1	1	0	0	0	0	*
2	0	0	1	0	0	0
3	0	0	1	1	0	0
4	1	1	1	0	0	1
5	1	1	1	1	1	1
6	0	0	1	0	0	0
7	0	0	1	1	1	*

Iniciador 60% G-C

Fragmento	F3	F4	F5	SRRC1059	SRRC1273	SRRC1299
1	0	0	1	0	0	0
2	1	0	1	1	1	1
3	0	1	*	0	0	0
4	1	*	1	0	1	1
5	0	0	0	0	0	1
6	0	0	0	0	0	1
7	0	1	0	0	0	0
8	0	0	0	1	1	1
9	0	1	0	0	0	*

Iniciador 70% G-C

Fragmento	F3	F4	F5	SRRC1059	SRRC1273	SRRC1299
1	0	*	*	0	1	1
2	*	0	0	0	1	0
3	0	1	0	0	0	0
4	*	1	0	0	1	1
5	0	0	1	1	1	1
6	1	1	0	0	0	1
7	1	0	0	0	0	0
8	0	0	1	0	0	0
9	*	0	0	0	0	1
10	1	0	0	0	0	0

Iniciador 80% G-C

Fragmento	F3	F4	F5	SRRC1059	SRRC1273	SRRC1299
1	0	0	1	0	0	0
2	1	*	1	0	0	1
3	1	1	1	1	1	1
4	1	0	0	1	1	1
5	1	1	0	0	0	1
6	1	0	0	1	1	1
7	0	0	*	0	0	1

1 = Fragmento presente

0 = Fragmento ausente

* = Fragmento no amplificado intensamente.

Tabla 17. Índices de similitud de Dice de seis aislamientos de *A. flavus* (iniciador 50-10).

	F3	F4	F5	1059	1273	1299
F3	1.0	0.75	0.5	0.57	0.57	0.88
F4	0.25	1.0	0.33	0.40	0.40	0.85
F5	0.50	0.67	1.0	0.40	0.40	0.29
1059	0.43	0.60	0.60	1.0	1.0	0.67
1273	0.43	0.60	0.60	0.00	1.0	0.67
1299	0.12	0.15	0.71	0.33	0.33	1.0

Parte superior del triángulo Índices de Similitud
 Parte inferior del triángulo Índices de Disimilitud

Tabla 18. Índices de similitud (Dice) de seis aislamientos de *A. flavus* (iniciador 60-10).

	F3	F4	F5	1059	1273	1299
F3	1.0	0.33	0.40	0.40	0.40	0.33
F4	0.67	1.0	0.00	0.00	0.00	0.00
F5	0.60	1.00	1.0	0.67	0.67	0.57
1059	0.60	1.00	0.33	1.0	1.00	0.86
1273	0.60	1.00	0.33	0.00	1.0	0.86
1299	0.67	1.00	0.43	0.14	0.14	1.0

Parte superior del triángulo Índices de Similitud
 Parte inferior del triángulo Índices de Disimilitud

Tabla 19. Índices de similitud (Dice) de seis aislamientos de *A. flavus* (iniciador 70-10).

	F3	F4	F5	1059	1273	1299
F3	1.0	0.40	0.00	0.00	0.40	0.55
F4	0.60	1.0	0.29	0.00	0.50	0.67
F5	1.00	0.71	1.0	0.50	0.57	0.50
1059	1.00	1.00	0.50	1.0	0.40	0.33
1273	0.60	0.50	0.43	0.60	1.0	0.67
1299	0.45	0.33	0.50	0.67	0.33	1.0

Parte superior del triángulo Índices de Similitud
 Parte inferior del triángulo Índices de Disimilitud

Tabla 20. Índices de similitud (Dice) de seis aislamientos de *A. flavus* (iniciador 80-10).

	F3	F4	F5	1059	1273	1299
F3	1.0	0.67	0.50	0.57	0.57	0.91
F4	0.33	1.0	0.57	0.33	0.33	0.60
F5	0.50	0.43	1.0	0.40	0.40	0.44
1059	0.43	0.67	0.60	1.0	1.00	0.50
1273	0.43	0.67	0.60	0.00	1.0	0.50
1299	0.09	0.40	0.56	0.50	0.50	1.0

Parte superior del triángulo Índices de Similitud
 Parte inferior del triángulo Índices de Disimilitud

Tabla 21 Comparación de los índices de similitud (Dice) obtenidos con cuatro iniciadores en aislamientos de *A. flavus*

Aislamientos	50-10	60-10	70-10	80-10	Media
Similitud cepas de México	0.53	0.24	0.23	0.58	0.40
Similitud cepas aflatoxi.	0.78	0.91	0.47	0.67	0.71
Disimilitud entre cepas Mex. vs aflatoxi.	0.48	0.66	0.59	0.49	0.56
Similitud F3 vs aflatoxi.	0.67	0.38	0.32	0.68	0.51
Similitud F4 vs aflatoxi.	0.42	0.0	0.39	0.42	0.31
Similitud F5 vs aflatoxi.	0.36	0.64	0.52	0.41	0.48

