

Tesis de Licenciatura

Compatibilidad vegetativa "versus" morfología y producción de toxinas en *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* aislados de maní

Novas, María Victoria

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Novas, María Victoria. (). Compatibilidad vegetativa "versus" morfología y producción de toxinas en *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* aislados de maní. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000656_Novas

Cita tipo Chicago:

Novas, María Victoria. "Compatibilidad vegetativa "versus" morfología y producción de toxinas en *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* aislados de maní". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. .

http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000656_Novas

EXACTAS
UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ciencias Biológicas

"Compatibilidad Vegetativa "versus" morfología y producción de toxinas
en *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* aislados de maní "

FCE y N BIBLIOTECA

Autora

María Victoria Novas

Director de la Tesis
Dr. Daniel Cabral

FCEN, UBA-PRHIDE, Departamento de Micología, Lab. 15

Tesis de licenciatura en Ciencias Biológicas

Marzo de 1999 **Nº 0656**

**A mi Amor
a mis papás
a mi hermano**

AGRADECIMIENTOS

A mi jefe por estos casi cuatro años de consejos, enseñanzas y entusiasmo que me permitieron crecer en mi carrera.

A la Dr. Graciela Vaamonde por facilitarme las cepas para llevar a cabo mi trabajo y por sus consejos que me fueron de gran utilidad.

A los Sres. miembros del Jurado.

A mi Amor que me acompañó desde el comienzo de este trabajo y ahora que se convirtió en mi compañero, puedo compartir con él todos mis logros.

A mis Padres que me brindaron su apoyo incondicional y que me dieron la oportunidad de dedicarme exclusivamente a mi formación profesional.

A mi hermano porque si bien vivimos en mundos diferentes nos entendemos con la mirada, y en algunos momentos poder entenderse aunque sea de esa manera es muy importante.

A Violeta por ser una abuela maravillosa que desde chiquitita me entrega todo su amor.

A mi gran amiga Marce por haberme brindado todo su apoyo durante estos largos 6 años en los que cultivamos una hermosa amistad.

A mis super amigas Andre, July, Caro y Ceci por los hermosos años que compartimos.

A mi ahijada del alma por su constante preocupación y apoyo.

A Andrea por todo su apoyo y colaboración y especialmente por su gran compañía durante este largo verano que prácticamente pasamos juntas.

A Silvia por su respaldo en todo momento, al igual que sus útiles comentarios y correcciones.

A Verito, Ceci y Vivi por los consejos no solo laborales sino más bien personales que me dieron durante todos los almuerzos que compartimos.

Al Dr. Wright por sus consejos y sus correcciones.

A Nora por toda la ayuda y consejos que me brindó, especialmente la paciencia que mostró en lo que respecta al manejo de la computadora.

A mis compañeritos Matías, Agustina, Leo y Laura por los gratos momentos que compartimos.

Al flamante Dr. Ricardo Comerio por su buena predisposición para ayudarme en todo momento.

A Pepa por su ayuda en especial en lo que respecta a la búsqueda bibliográfica.

A Paula, Alex y Andrea por sus buenas ondas.

A Silvi, Sari y Vero por las largas tardes de estudios en lo de Marce así como por las comilonas, de más está decir que todo es mucho más llevadero cuando se tiene con quien compartir.

A Luli Y Belén por éstos últimos años en los que compartimos "el dichoso flujo" y me dieron muchas fuerzas para terminar el bendito Seminario.

A Vero y Eugenia por todos sus deseos de éxitos en los breves momentos que pasamos juntas.

A Mercedes por su grata compañía, sus deseos y sus sonrisas permanentes que me respaldaron en todo momento.

ÍNDICE

RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
a- Importancia del Estudio	7
c- Control Biológico Asociado a la Compatibilidad Vegetativa	11
d- Técnica de análisis de Compatibilidad Vegetativa	12
ANTECEDENTES	15
OBJETIVOS	18
HIPÓTESIS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
A. Cepas a utilizar en el estudio	20
B. Análisis de la Compatibilidad Vegetativa	23
1. Aislamiento de los posibles mutantes	23
2. Selección de los posibles mutantes	23
3. Clasificación de los mutantes	24
4. Reconocimiento de los heterocariontes	24
I. Estudio de la autocompatibilidad	24
II. Estudio de la Compatibilidad Vegetativa entre las distintas cepas	25
C. Medición de los esclerocios	26
RESULTADOS	27
a- Obtención de los marcadores	27
1. Aislamiento de los posibles mutantes	27
2. Clasificación de los mutantes	27
b- Reconocimiento de los heterocariontes	28
1. Estudio de la autocompatibilidad	28
2. Estudio de la Compatibilidad Vegetativa entre las distintas cepas	30
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	51
BIBLIOGRAFÍA	53
ANEXO	60

RESUMEN

Se estudió la diversidad genética por medio de la técnica de compatibilidad vegetativa y la morfología de cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* aisladas de semillas de maní, provenientes de 17 localidades de la zona manisera de la Provincia de Córdoba.

Las cepas habían sido previamente agrupadas en categorías según la producción simultánea de diferentes toxinas. Una categoría de *A. flavus* resultó inusual por la producción simultánea de aflatoxinas B, G y ácido ciclopiazónico (ACP) combinación de toxinas muy rara para la especie.

Por medio de ensayos de complementación de mutantes nit-, las cepas se asignaron a Grupos de Compatibilidad Vegetativa (VCGs). En las cepas caracterizadas por ser productoras de esclerocios se midieron los diámetros de los mismos.

De las 29 cepas de *A. flavus* y 8 de *A. parasiticus* estudiadas, se identificaron 7 VCGs formados por 2 ó más cepas y 11 formados por 1 cepa cada uno. Se excluyeron 5 cepas del análisis dado que no generaron, al menos, dos tipos de mutantes. Todas las cepas productoras de esclerocios resultaron ser del tipo L.

El análisis de los resultados indica que *A. flavus* posee una alta diversidad genética en la zona manisera de Córdoba, expresada a través del elevado número de VCGs conformados, no así *A. parasiticus*. En ningún caso las cepas de ambas especies quedaron comprendidas juntas en el mismo VCG. Las cepas integrantes de cada VCG se correlacionaron con la producción de toxinas y de esclerocios. No existe correlación entre los VCGs y las localidades de las que las cepas fueron aisladas.

Las cepas atípicas que producen simultáneamente aflatoxinas B, G y ACP se restringieron a un solo VCG. Esto sugiere que pertenecen a un mismo clon, que se encuentra genéticamente aislado en la población. Teniendo en cuenta la alta correlación encontrada entre VCGs y marcadores genéticos en trabajos similares en este género, es posible que dichas cepas conformen una especie críptica.

INTRODUCCIÓN

a- Importancia del estudio:

Aspergillus Link es un género anamórfico de la Clase Deuteromycetes. Cuando presenta reproducción sexual se lo ubica junto a los Plectomycetes de la Clase Ascomycetes, dentro de los géneros *Eurotium* Link, *Neosartorya* Malloch & Cain o *Emericella* Berk.

La capacidad de las especies que lo integran para crecer en diferentes sustratos y bajo un amplio rango de condiciones ambientales, les ha permitido ser importantes colonizadores, tanto de tejido vivo como muerto, de plantas y de animales (Raper & Fennell, 1965; Diener *et al.*, 1987).

Raper & Fennell (1965) clasificaron las numerosas especies reconocidas del género en grupos. La especies dentro de un mismo grupo comparten una serie de características básicas como: esterigma uniseriado o biseriado, presencia o no de cleistotecio, forma y tamaño de las cabezas conidiales, color de la colonia, tipo de conidio, etc.

El grupo *Aspergillus flavus* Raper & Fennell está integrado por especies de gran importancia económica, que se caracterizan por la ausencia de estructuras de reproducción sexual. Entre ellas se pueden reconocer a: *A. flavus* Link, *A. parasiticus* Speare, *A. tamarii* Kita, *A. nomius* Kurtzman Horn & Hesseltine, *A. oryzae* (Ahlburg) Cohn y *A. sojae* Sakaguchi & Yamada ex Murakami, entre otras.

Las primeras cuatro, en particular *A. flavus* y *A. parasiticus*, se encuentran distribuidas en cultivos agrícolas y, por lo general, predominan en áreas tropicales y subtropicales (Miller *et al.*, 1957; Kokalis-Burelle *et al.*,

1997). En cambio *A. sojae* y *A. oryzae* son conocidas casi exclusivamente como cepas utilizadas para la producción de alimentos orientales (Wang & Hesseltine, 1982). En Japón, por ejemplo, la soja y el maíz son inoculados con *A. oryzae* para producir shoyu o salsa de soja (Moore-Landecker, 1996).

Algunos hongos sintetizan metabolitos secundarios denominados micotoxinas. Estas pueden causar síntomas de toxicidad y hasta la muerte, cuando son ingeridas por animales y/o humanos a través de alimentos.

Las aflatoxinas son micotoxinas producidas por *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*. Entre las numerosas aflatoxinas que se han identificado, las seis más comunes que se encuentran en los alimentos son: B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ y M₂. Las cuatro primeras causan toxicidad por ingestión de productos contaminados, en cambio las dos últimas son secretadas en la leche de mamíferos que han ingerido alimentos contaminados. La aflatoxina B₁ es una de las sustancias naturales cancerígenas más potentes que se conocen, causando daños en el hígado en animales domésticos y experimentales, así como en el hombre (Pedelini & Bongiovanni, 1994).

En *A. flavus* y *A. tamarii* también se detectó la producción de ácido ciclopiazónico (ACP) (Kobbe & Townsend, 1976). El ACP, por su parte, causa degeneración y necrosis del hígado, lesiones en el miocardio y efectos neurotóxicos (Huang *et al.*, 1994).

Como consecuencia, la presencia de estas toxinas en los alimentos constituye un serio peligro para la salud humana y animal. Su estabilidad frente a diversos agentes, tanto físicos como químicos, se ha convertido en una importante dificultad para su eliminación de los alimentos (Smith & Moss, 1985).

Por lo tanto, el control del problema radica en prevenir la contaminación. Los alimentos más frecuentemente contaminados son los de origen vegetal, entre ellos algunos cereales y oleaginosas, como el maíz y el maní (Cast, 1989; Diener, 1987; Kokalis-Burelle, 1997).

Es importante destacar que en muchos países, la cantidad de aflatoxinas en los alimentos se encuentran reguladas en niveles de parte por billón (Egel *et al.*, 1994). Lo que impacta a nivel económico en los países exportadores, como es el caso de la Argentina, que deben controlar la calidad de la materia prima.

Los aislamientos de *A. flavus* y *A. parasiticus* presentan gran variabilidad respecto del tipo y cantidad de aflatoxinas producidas (Horn & Greene, 1995; Vaamonde *et al.*, 1995).

Las cepas de *A. flavus* pueden producir aflatoxinas de tipo B, o ACP, o ambos, o ninguna (Pitt, 1993; Horn & Greene, 1995; Vaamonde *et al.*, 1995). Sin embargo se han registrado casos en que también se detectó la producción de aflatoxina G. Saito *et al.* (1986) describen cepas que producen solo aflatoxinas B o B y G (Cotty, 1989). También Klich y Pitt (1988) mencionan la existencia de cepas productoras de aflatoxinas B y G. Sin embargo, como posteriormente una de dichas cepas fue determinada como perteneciente a la especie *A. nomius*, esta información debe manejarse con cuidado. Blaney *et al.* (1989) registraron en seis cepas la síntesis simultánea de aflatoxina G₁ y de ACP.

Las cepas de *A. parasiticus*, por otro lado, pueden no producir aflatoxinas o producir del tipo B y G pero nunca ACP.

A. nomius se describió como una especie nueva, comparando la complementación de ADNmit con respecto a *A. flavus*, así como pequeñas diferencias morfológicas de los esclerocios y en la temperatura de creci-

miento (Kurtzman *et al.*, 1987). Su registro en la naturaleza es bajo y exhibe el mismo patrón de toxinas que *A. parasiticus*, pero morfológicamente es muy similar a *A. flavus* (Pitt, 1993).

Además de la producción de toxinas, *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*, han mostrado una gran variabilidad en caracteres morfológicos, entre los que se pueden mencionar las dimensiones de las vesículas, el color de las colonias y la formación de esclerocitos (Horn & Green, 1995; Egel *et al.*, 1994).

En *A. flavus*, se han utilizado las características de los esclerocitos para distinguir dos grupos de cepas. Las cepas "S" producen un gran número de esclerocitos pequeños (diámetro menor a 400 μ m) y gran cantidad de aflatoxinas. En las cepas "L", consideradas como típicas, los esclerocitos tienen un diámetro mayor a 400 μ m, los producen en menor cantidad que las "S", y también es menor la producción de aflatoxinas (Cotty, 1989; Bayman & Cotty, 1993; Garber & Cotty, 1997).

Tabla N°1: Comparación de caracteres morfológicos y producción de toxinas entre especies del grupo *A. flavus*.

Especies	Color de la colonia	conidios	AFPA	afla B	afla G	ACP
<i>A. flavus</i>	Verde	l/pr	n	++	--(+)?	++
<i>A. parasiticus</i>	Verde oscuro	r	n	++	++	--
<i>A. nomius</i>	Verde	e	n	++	++	--
<i>A. oryzae</i>	Castaño	l/pr	c	--	--	(+)
<i>A. tamarii</i>	Marrón oscuro	r	mo	--	--	++
<i>A. sojae</i>	Marrón pálido	r	n	--	--	--

Abreviaturas: Conidios: l/pr= pared lisa a poco rugosa; r= definidamente rugosa; e: equinulada. AFPA: color del reverso de la colonia en agar de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* (Pitt *et al.*, 1983), n= anaranjada, c= crémea, mo= marrón oscuro; afla B= aflatoxina B₁ y B₂, afla G= aflatoxina G₁ y G₂; ACP: producción de ácido ciclopiazónico. (+): en un estudio 8 cepas de 16 dieron resultado positivo (Orth, 1977, en Pitt & Hocking, 1985). Tabla modificada de Samson & Frisval, 1991, en Samson *et al.*, 1996. (+)?: Son escasas las citas de producción de aflatoxinas G en *A. flavus* (Saito *et al.* 1986; Klich & Pitt, 1988; Bianey *et al.* 1989).

b- Variabilidad y compatibilidad vegetativa:

La variabilidad intraespecífica en los hongos, no está restringida a la reproducción sexual. La heterocariosis y la parasexualidad (recombinación mitótica) son dos procesos importantes en la variabilidad de la especie, en particular en las formas anamórficas, que carecen de reproducción sexual (Esser & Kuenen, 1967, en Vaillancourt & Hanau, 1994).

Los organismos incluidos en la actualidad en el Reino Fungi son haploides. Durante la reproducción sexual, en la mayoría de los Ascomycetes se produce la fusión de protoplastos (plasmogamia). Con excepción de las levaduras y algunos pocos filamentosos, esta tiene lugar entre el ascogonio y el anteridio o espermacio, lo que permite el acercamiento de los núcleos. Una vez realizado este paso, se llevan a cabo la cariogamia y meiosis.

La fusión también puede ocurrir entre estructuras no relacionadas con la reproducción sexual. Esto permite la migración de núcleos de un micelio al otro. En este caso, la fusión de las hifas se denomina anastomosis y, dependiendo de la especie, da lugar o no a los procesos de reproducción sexual.

La presencia de dos o más tipos de núcleos dentro del mismo micelio se conoce como heterocariosis. Si dos micelios genéticamente compatibles se ponen en contacto y ocurre anastomosis, la migración de núcleos de un micelio al otro, y su posterior mitosis y migración, dan origen al heterocarionte (Beadle & Coonradt, 1944; Fincham & Day, 1963; Puhalla & Mayfield, 1974; Burnett, 1975, en Vaillancourt & Hanau, 1994). Los heterocariontes pueden ser estables o transitorios. En los estables pueden o no tener lugar los eventos conocidos como parasexualidad que dan como resultado cepas haploides recombinantes. Aún cuando este proceso no ocurra, el heteroca-

rionte tiene ventajas adaptativas similares a la de un diploide, pero donde todos los genes de ambos núcleos pueden expresarse (Alexopoulos *et al.* 1996).

Tanto la plasmogamia como la anastomosis están controladas por un sistema génico complejo.

La reproducción sexual, en Ascomycetes heterotálicos, requiere de la participación de cepas genéticamente diferentes. El factor de compatibilidad sexual ("mating-type") está controlado por un locus (MAT) que especifica para dos "mating types" alternativos. El heterotalismo se denomina entonces bipolar. Dado que se impide la plasmogamia entre cepas que presentan el mismo alelo del "mating-type", es un proceso que favorece la reproducción cruzada (Alexopoulos *et al.*, 1996).

La compatibilidad vegetativa o somática está controlada por una serie de genes bi o multialélicos en los loci denominados het, vic, o VC. Este proceso impide la fusión de micelios genéticamente diferentes, es decir de aquellos que difieran en los alelos de los genes antes mencionados (Fincham & Day, 1963; Burnett, 1975; Mylyk, 1976, en Vaillancourt & Hanau, 1994). En algunas especies, como en *Neurospora crassa* Shear & Dodge, los genes del "mating-type" también controlarían, en parte, la compatibilidad vegetativa.

La incompatibilidad es una barrera, no sólo a la libre fusión de hifas, sino a la división y/o a la migración nuclear en el interior de las hifas (Fincham & Day, 1963; Burnett, 1975; Mylyk, 1976; Jacobson & Gordon, 1988; Correll *et al.*, 1987, Brooker *et al.*, 1991, en Vaillancourt & Hanau, 1994).

Nauta & Hoekstra (1994) usaron un modelo con el fin de estudiar la evolución de la incompatibilidad vegetativa en hongos asexuales. Proponen que la selección estaría actuando a través de mecanismos que protegerían la integridad génica del organismo, como ser la prevención de un conflicto entre

dos genomas nucleares diferentes, y contra la invasión de elementos citoplasmáticos como plásmidos, virus o mitocondrias.

Además de su significativa importancia genética en la naturaleza, la heterocariosis puede ser utilizada como herramienta en el laboratorio. En teoría, la observación de la formación o no del heterocarionte y sus características, puede ser utilizada en "tests" de complementación (Beadle & Coonradt, 1944, en Vaillancourt & Hanau, 1994).

Las cepas que son capaces de formar un heterocarionte se denominan "vegetativamente compatibles". Las cepas vegetativamente compatibles con otras se describen como miembros de un mismo grupo de compatibilidad vegetativa o VCG (Vaillancourt & Hanau, 1994).

En especies asexuales o en especies sexuales que se reproducen principalmente de forma asexual, los genes que gobiernan la compatibilidad vegetativa y los que determinan caracteres de tipo fenotípicos pueden quedar ligados entre si a través del tiempo evolutivo. Esto resultaría en VCGs genéticamente aislados con fenotipos específicos (Correll, 1991; Croft & Jinks, 1977; Horn *et al.*, 1996).

El agrupamiento de cepas en VCGs ha sido utilizado por los fitopatólogos para identificar razas, formas especiales, rango de hospedantes y grupos de patogenicidad. Esto se basa en la hipótesis de que las cepas dentro de alguna de estas categorías se correlacionan con uno o pocos VCGs. De esta manera se puede caracterizar al patógeno ubicándolo en un determinado VCG (Puhalla 1985; Correll *et al.*, 1987; Katan & Katan, 1988; Katan *et al.*, 1989).

La mayor parte de los estudios de poblaciones de *Fusarium* Link fueron realizados para poner a prueba este concepto (Puhalla, 1984; Katan & Katan, 1988; Jacobson & Gordon, 1988, 1991; Fiely *et al.*, 1995; Ahn, 1998).

Los VCGs constituyen una herramienta útil para determinar si los aislamientos de un determinado sitio son clones de un progenitor común, o por cuántos grupos genéticamente diferentes está compuesta la población. También se utilizan para determinar si las cepas que presentan variaciones morfológicas y/o fisiológicas inusuales tienen un origen clonal.

En un estudio sobre la estructura de la población de *Aspergillus flavus* en un campo de algodón, se utilizó la técnica de VCG como indicador de diversidad genética. Se identificó un gran número de VCGs dentro del campo, y éstos resultaron ser distintos a otros identificados en un campo cercano. También se registró que la distribución de los VCGs cambia año a año sugiriendo un alto flujo genético dentro de la población (Glass & Kulda, 1992).

Bayman & Cotty (1993) caracterizaron cepas de *A. flavus* pertenecientes a 12 VCGs, aislados de diferentes hospedantes, según la producción de aflatoxinas in vitro, morfología y polimorfismos de ADN. La producción de aflatoxina B difirió significativamente entre los VCGs. Los grupos de especies formados mediante análisis cladísticos de polimorfismos de ADN coincidieron con los VCGs. La diferenciación entre cepas L y S, se relacionó tanto con los VCGs como con los polimorfismos de ADN. Todas las cepas S formaron un grupo simple, aparentemente derivado del L.

Sin embargo en un estudio para identificar VCGs en una población de *A. flavus* de maíz, en Georgia (EE.UU.), se examinó su relación con la morfología, producción de aflatoxinas y de esclerocios, y no se encontró un patrón de asociación. Por otra parte, tampoco las cepas del mismo VCG estaban restringidas a una misma área geográfica (Papa, 1986).

Horn & Greene en 1995 aislaron, tanto de muestras de suelo como de semillas, cepas de *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. tamarii* de una plantación de maní. Mediante un estudio de compatibilidad vegetativa determinaron que la distribución de los VCGs de *A. parasiticus* y de *A. tamarii* no era al azar, probablemente como consecuencia del tipo de dispersión. Sugiriendo que cada grupo representa, en algún grado, un único clon. Posteriormente trataron de encontrar una asociación entre caracteres morfológicos y la producción de aflatoxinas con respecto a los VCGs hallados. Determinaron, en *A. flavus*, una correlación positiva entre la producción total de aflatoxinas y ACP con respecto a los VCGs (Horn *et al.*, 1996). Es decir, dentro de cada grupo se mantiene una correlación positiva en las cantidades de aflatoxinas y ACP producidas por las cepas que lo integran. Esto contrastaba con estudios previos que indicaban que no había correlación (Blaney *et al.*, 1989), o una correlación negativa (Huang *et al.*, 1994). También se determinó que, si bien todas las cepas producían esclerocios del tipo L, las diferencias de tamaño de los esclerocios entre los VCGs eran evidentes (Horn *et al.*, 1996).

c- Control biológico asociado a la compatibilidad vegetativa:

Uno de los aspectos del control biológico de patógenos es la utilización de especies competidoras diferentes a la del patógeno, o cepas hipovirulentas del mismo patógeno. En el último caso se requiere el reconocimiento de la variabilidad genética de las poblaciones del patógeno y la capacidad de la cepa hipovirulenta para diseminar el factor de hipovirulencia en la población, por medio de la anastomosis de hifas. Esta

capacidad de anastomosis va a estar regulada por las características de compatibilidad vegetativa de las cepas intervenientes. El ejemplo clásico es el de *Endothia parasitica* (Murr.) And. también conocida como *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr, agente etiológico del marchitamiento del castaño (Chesnut Blight) (Anagnostakis & Kranz, 1987; Causin *et al.*, 1995).

Si se pretende utilizar técnicas de control biológico de micotoxinas, se debe plantear un análisis biológico similar. Estos estudios requieren de la caracterización rápida y eficiente, tanto en la selección de las cepas a ser usadas como controladores, como de las características genéticas de la población en estudio (Cotty & Bayman, 1993; Garber & Cotty, 1997).

d- Técnica de análisis de compatibilidad vegetativa:

En *Aspergillus*, la reacción de compatibilidad, que da como resultado un heterocarionte estable, se determina mediante el enfrentamiento de las cepas en placas de Petri. Debido a que la reacción es de difícil detección visual, se utilizan mutantes deficientes en la asimilación de diferentes fuentes de nitrógeno (nit-). Estos mutantes son seleccionados en un medio con clorato como agente selectivo donde se desarrollarán sectores de crecimiento rápido que podrán ser identificados y aislados (Papa, 1986; Bayman & Cotty, 1991b).

Se ha propuesto que el clorato es transformado por la nitrato reductasa en un compuesto tóxico para la célula: clorito (Aberg, 1947, en Cove, 1976a). Sin embargo, a través de estudios llevados a cabo en *A. nidulans* (Eidam) Wint, se determinó que la actividad catalítica de la nitrato reductasa no estaría involucrada en este proceso. Probablemente jugaría algún papel en la mediación

de la toxicidad del clorato, dado que algunos, pero no todos los mutantes deficientes en la mencionada enzima, son resistentes al clorato. En definitiva, el mecanismo preciso es todavía incierto y puede diferir de organismo a organismo (Correll *et al.*, 1987). Cove (1976a) y Bayman & Cotty (1991b) han considerado que:

- Las células capaces de reducir nitrato a nitrito generalmente reducen clorato a clorito, el cual es tóxico y las envenena.
- Las células incapaces de reducir o asimilar nitrato, no serán envenenadas por el clorito.

Sin embargo, existen otros criterios con respecto a la acción del clorato. Klittich & Leslie (1988) en un estudio sobre *F. moniliforme* (Sheld.) emend. Snyd. & Hans., afirman que el medio no tiene por qué ser el causante de las mutaciones por sí mismo. Postulan que deben existir mecanismos genéticos que generen variabilidad, brindando a la población del patógeno la capacidad de adaptarse a presiones de selección. Tal vez, el estrés ambiental, como el crecimiento en un medio tóxico, induzca el movimiento de elementos transponibles, que causarían la elevada frecuencia de mutaciones espontáneas observadas en *F. moniliforme*.

En *Aspergillus* los tres tipos de mutantes nit- más comunes que se pueden identificar son: niaD, nirA y cnx. Los mutantes del tipo niaD carecen del gen estructural de la nitrato reductasa. Los mutantes del tipo nirA carecen de una proteína necesaria para la síntesis de la nitrato y la nitrito reductasa. Los mutantes en alguno de los varios loci cnx carecen de la producción de un cofactor portador de molibdeno, necesario para la nitrato reductasa y la xantina dehidrogenasa (Bayman & Cotty, 1991b).

Las características de los tres tipos de mutantes se encuentran resumidas en la tabla N°2:

Tabla Nº2: Tipos de mutantes nit-, sus funciones y su caracterización.

Locus	Función	Crecimiento en :			
		NH ₄	NO ₃	NO ₂	HX
niaD	Gen estructural de la nitrato reductasa	+	-	+	+
nirA	Gen de vía reguladora	+	-	-	+
Cnx ABC					
cnxE	Genes que controlan la producción de un cofactor que contiene molibdeno				
cnxF		+	-	+	-
cnxG					
cnxH					

Modificado de Klittich & Leslie (1988).

Referencias: en todos los casos el medio de cultivo es Czapek-Dox con distintas fuentes de nitrógeno. HX: hipoxantina, NH₄: amonio, NO₃: nitrato, NO₂: nitrito.

Los tres tipos de mutantes crecen con características morfológicas de tipo salvaje en NH₄: micelio aéreo profuso, de crecimiento rápido, color característico de la especie y producción de conidios. En NO₃ los mutantes desarrollan con características particulares: micelio sumergido en el medio de cultivo, crecimiento lento, hialino y con escasa o nula producción de conidios.

Al confrontarse los mutantes de dos cepas incógnitas en medio de cultivo que contiene NO₃ como fuente de nitrógeno, las cepas compatibles formarán una zona de crecimiento de tipo salvaje, capaz de asimilar el nitrato, en la intersección de las dos colonias, donde ocurre la complementación debido a la anastomosis de hifas (Horn & Greene, 1995). Sin embargo, en el caso de ser cepas incompatibles, la fusión de hifas genera la muerte de la célula heterocariótica (Leslie, 1993), lo que se observa como una línea de rechazo en la región de intersección.

ANTECEDENTES

Dado que las plantas de maní (*Arachis hypogaea* L.) producen sus frutos bajo tierra, éstos están en contacto con poblaciones de *A. flavus* y *A. parasiticus*. Bajo ciertas condiciones ambientales la semilla del maní es susceptible a ser invadida por estas especies (Horn & Greene, 1995). Dichos hongos pueden colonizar las vainas y semillas y producir aflatoxinas antes o después de la cosecha, durante el período de secado, transporte y almacenaje (Pedelini & Bongiovanni, 1994).

El maní es la cuarta semilla oleaginosa (su producción es prácticamente igual a la del girasol) en orden de importancia en cuanto a la producción mundial (Harvez, 1996).

El 99% de la producción argentina de maní se obtiene en la zona central de la Provincia de Córdoba donde se concentra su cultivo, comercialización, selección como maní confitería e industrialización. El porcentaje restante proviene de las Provincias de Corrientes y Salta. La superficie sembrada y el volumen cosechado muestran una significativa variación anual, debido a la inestable rentabilidad del cultivo frente a otros cultivos alternativos y a la elevada incidencia del clima en el rendimiento (Pedelini & Casini, 1998).

A partir de 1975 con la introducción de cambios tecnológicos se originó un rápido crecimiento en la productividad, con una tasa de crecimiento anual de 30,5 Kg./ha/año y un rendimiento promedio de 1479 Kg/ha obtenido en los últimos 16 años (Pedelini & Casini, 1998).

Las exportaciones tipo confitería rondaron en 1996 las 150.000 toneladas convirtiendo a la Argentina en el tercer exportador mundial detrás de China y EE.UU. (Harvez, 1996).

Es importante destacar la trascendencia que tienen los destinos fuera del Mercosur, ya que el recurso comercial utilizado para tratar de bajar los precios del "pellet" del maní argentino por parte de los compradores europeos es la presencia de aflatoxinas (Pedelini & Casini, 1998).

Actualmente la Comunidad Económica Europea (CEE) quiere establecer límites más bajos de tolerancia en cuanto a la concentración de aflatoxinas.

Para consumo humano en productos alimenticios, los niveles máximos admisibles de aflatoxinas propuestos ($\mu\text{g/Kg}$) son:

Para la CEE 10 $\mu\text{g/Kg}$ de aflatoxinas totales sin procesar y 4 $\mu\text{g/Kg}$ de aflatoxinas totales en productos listos para el consumo. Mientras que para la Argentina (Mercosur) el máximo de aflatoxinas totales es de 20 $\mu\text{g/Kg}$ (Anónimo, 1996).

En un trabajo previo, en el laboratorio de Microbiología de Alimentos, FCEyN, UBA, se obtuvieron aislamientos de *Aspergillus* spp. a partir de semillas de maní. Estas muestras provenían de diferentes campos de la zona manisera de la provincia de Córdoba. Un 25% de las cepas fueron identificadas como *A. parasiticus* y un 75% como *A. flavus*.

Posteriormente se determinó que las cepas de *A. flavus* diferían en cuanto a la producción de toxinas. Esta variación abarcaba desde no productoras a productoras de alguna, varias o todas las toxinas registradas para la especie (Vaamonde *et al.*, 1995).

Dentro de las cepas de *A. flavus*, cuatro con características morfológicas consideradas dentro de la variabilidad de la especie (J. Pitt, com. per.), presentaron un patrón atípico produciendo simultáneamente aflatoxinas de tipo B, G y ACP. Este patrón es distinto al que presenta *A. flavus* y también difiere del que presentan las especies *A. parasiticus* y *A. nomius*.

Según la capacidad de cada cepa de *A. flavus* y *A. parasiticus* de producir determinadas toxinas, se definieron 4 categorías (Vaamonde, com. per.):

Tabla N°3: Caracterización de las cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* según la producción simultánea de diferentes toxinas.

Categoría	Aflatoxina(B/G)	ACP
I	+	+
II	+	-
III	-	+
IV	-	-

OBJETIVOS

- Realizar un estudio preliminar, mediante la identificación de VCGs, de la variabilidad genética de las cepas aisladas de muestras de maní, de diferentes localidades de la zona manisera de la provincia de Córdoba. En particular de *A. flavus*, la de mayor incidencia en el muestreo.
- Corroborar que las cepas correspondientes a las dos especies aisladas: *A. flavus* y *A. parasiticus*, pertenecen a distintos VCGs, con el objeto de asegurar la eficacia de la técnica.
- Comprobar si existe correlación entre VCGs y el patrón de micotoxinas producidas en *A. flavus* y/o características morfológicas particulares (producción y tamaño de los esclerocios). En particular de las cuatro cepas atípicas, productoras en forma simultánea de aflatoxinas B y G y ACP.
- Comprobar si existen diferencias genéticas entre las cepas provenientes de diferentes sitios de muestreo.
- Identificar el origen clonal o no de las diferentes cepas aisladas, y particularmente de aquellas con patrones diferentes.

HIPÓTESIS

- Existe correlación entre los VCGs y las especies (cepas de diferentes especies no son compatibles).
- Existe correlación entre los VCGs y el patrón de micotoxinas producidas por *A. flavus* de la región manisera Argentina. En particular, las cepas atípicas que producen simultáneamente aflatoxinas B, G, y ACP, pertenecen a un mismo VCG diferente a los que integran el resto de las cepas.
- No existen diferencias genéticas entre las cepas provenientes de diferentes sitios de muestreo, en particular en la especie *A. flavus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

A. CEPAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO:

Se trabajó con 29 cepas de *A. flavus* y 8 de *A. parasiticus* previamente aisladas de 32 muestras de maní (Tabla N°5), procedentes de 19 localidades ubicadas en la zona manisera de la provincia de Córdoba (Figura N°1).

El muestreo fue realizado por personal de la Estación Experimental Regional Agropecuaria Manfredi (INTA). Las muestras corresponden a la cosecha 1993 y los aislamientos se realizaron durante los dos meses posteriores a su recolección. Las cepas aisladas fueron estudiadas taxonómicamente y en su capacidad toxicogénica (Vcamonde *et al.* 1995).

Dado que la combinación de aflatoxinas dentro de *A. flavus* presenta más variaciones que las estipuladas en la tabla N°3, la modificamos de tal manera que todos las categorías quedaran representadas, según se indica en la tabla N°4. Las categorías IIb y IV están conformadas exclusivamente por cepas de *A. parasiticus*. El resto de las categorías corresponden a *A. flavus*. Se destaca la categoría Ib con un patrón de producción simultánea de aflatoxinas B, G y ACP.

Tabla N°4: Caracterización de las cepas de *A. flavus* y de *A. parasiticus* según la producción simultánea de diferentes toxinas.

Categoría	Aflatoxina B	Aflatoxina G	ACP
Ia	+	-	+
Ib	+	+	+
IIa	+	-	-
IIb	+	+	-
III	-	-	+
IV	-	-	-

Tabla N°5: Datos de las cepas

Muestra	Especie	AFLA	ACP	Esclerocios	Categoría	Localidad
M1N2	A.p	-	-	-	IV	Baigorria
M2N1	A.f	+	+	+	Ia	Holmberg
M2N2	A.f	+	+(poco)	-	Ia	Holmberg
M3N1	A.p	+	-	+	IIb	Gigena
M3N1X	A.f	+	+	+	Ia	Gigena
M4N1	A.f	+	-	+	IIa	Las Perdices
M6N1	A.f	+	+	+	Ia	Río IV
10A	A.f	+	+	+	Ia	Manfredi
M10N3	A.f	+	+	+	Ia	Charras
M11N1	A.f	-	+	-	III	Villa del Rosario
M11N1X	A.f	-	+	-	III	Villa del Rosario
M11N3	A.f	+	+	+	Ia	Villa del Rosario
M12N1	A.f	+	+	+	Ia	Gral. Cabrera
M12N3	A.p	+	-	+	IIb	Gral. Cabrera
M14N1	A.f	+	+	-	Ia	Las Perdices
M14N2	A.f	+	+	-	Ia	Las Perdices
M15N1	A.p	+	-	+	IIb	Carnerillo
M15N2	A.p	+	-	+	IIb	Carnerillo
M15N3	A.f	+	+	-	Ia	Carnerillo
M21N3	A.p	+	-	-	IIb	Oliva
M22N3	A.f	-	+	+	III	Manfredi
M25N1	A.p	+	-	+	IIb	Pampayagasta
M25N3	A.p	+	-	+	IIb	Pampayagasta
M29N1	A.f	+	+	+	Ia	Villa Ascasubi
M29N3	A.f	+	-	-	IIa	Villa Ascasubi
M32N1	A.f	+	+	+	Ia	Alejandro
M34N2	A.f	-	+	-	III	La Carlota
M35N1A	A.f	-	+	-	III	Ticino
M35N1B	A.f	-	+	+	III	Ticino
M36N1	A.f	+	+	+	Ia	Matorrales
M36N2	A.f	-	+	+	III	Matorrales
M38N1	A.f	+	+	+	Ia	Colazo
M40N1	A.f	-	+	+	III	Oncativo
M11N2	A.f	+(B/G)	+	+	Ib	Villa del Rosario
M32N4	A.f	+(B/G)	+	+	Ib	Alejandro
M35N2	A.f	+(B/G)	+	+	Ib	Ticino
M38N3	A.f	+(B/G)	+	+	Ib	Colazo

Referencias: especies: A.f= *A. flavus*, A.p= *A. parasiticus*. AFLA: producción de aflatoxinas.

ACP: producción de ácido ciclopiazónico. (Vaamonde com. per.).

Categoría: clasificación realizada en la tabla N°4

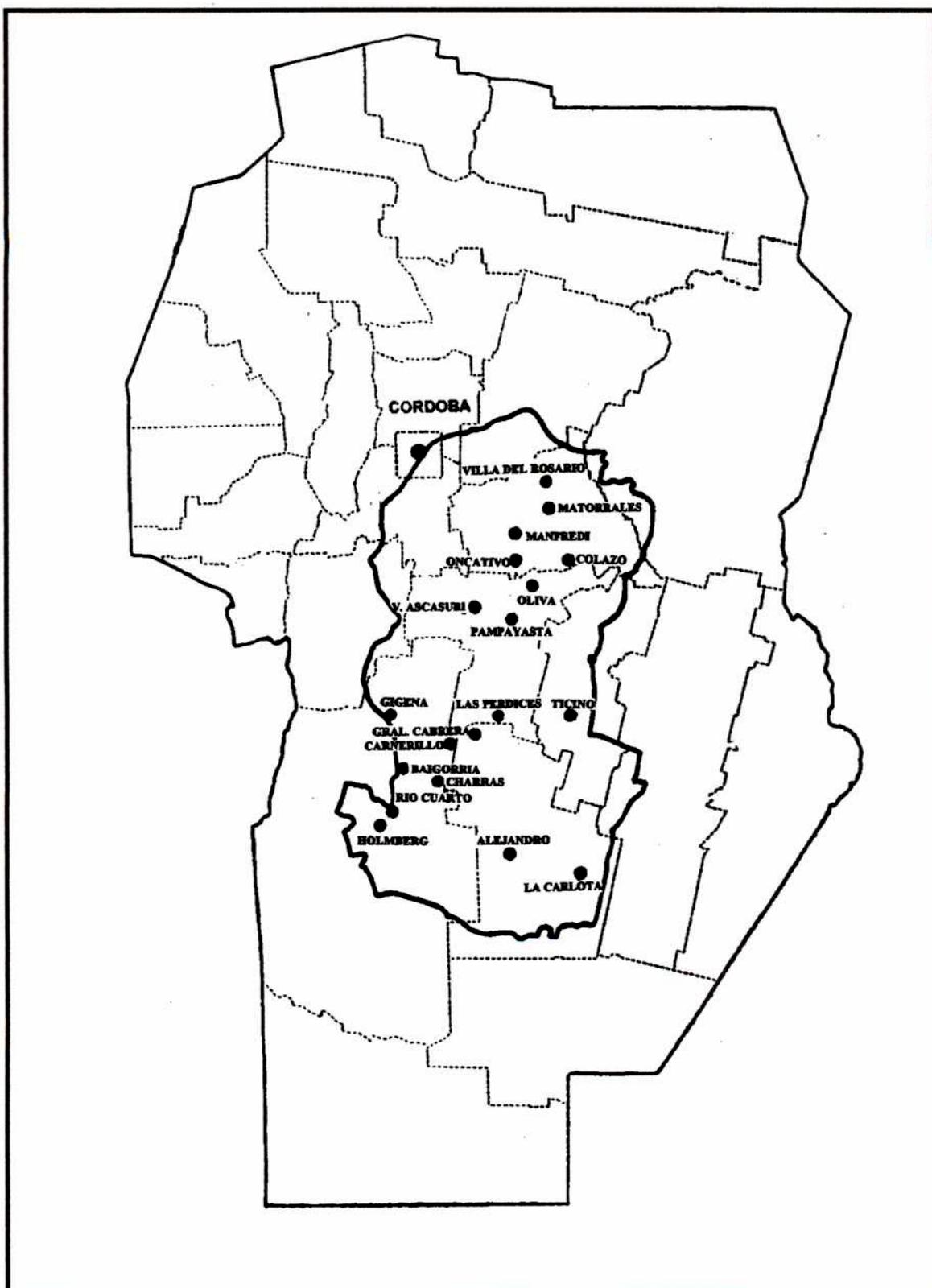


Figura N°1: Sitios de muestreo de la zona manisera de la prov. de Córdoba.
Modificado de Vaamonde et al., 1995

B. ANÁLISIS DE COMPATIBILIDAD VEGETATIVA

1. Aislamiento de los posibles mutantes:

Obtuvimos los mutantes en cajas de Petri con medio de cultivo Czapek-Dox (Cz-Dox) a las que se añadió 25g de clorato de potasio, con pH no ajustado (Bayman & Cotty, 1991a). Este medio permite obtener la mayor proporción de los distintos tipos de mutantes (Bayman & Cotty, 1991a).

Para este paso y todos los posteriores, utilizamos cajas descartables de 6 cm de diámetro.

Cove (1976b) demostró que la fuente de nitrógeno usada en el medio con clorato, afecta la frecuencia de los distintos tipos de mutantes en *A. nidulans*. Es por esto que, en los casos en que no pudimos obtener al menos dos tipos de mutantes para cada cepa, cambiamos la fuente de nitrógeno del medio de cultivo. Usamos glutamato en lugar del NO_3 , el cual proporciona, en alta frecuencia, mutantes del tipo *nirA* (Bayman & Cotty, 1991a), que es, junto con los mutantes *cnx* los que se obtienen en menor frecuencia, utilizando el medio original.

Incubamos los cultivos a 30°C en estufa y oscuridad durante 10 a 15 días. Transcurrido dicho período, examinamos los márgenes de la colonia en búsqueda de sectores de crecimiento rápido que consistieran en micelio conformado por hifas separadas entre sí.

2. Selección de los posibles mutantes:

Con la ayuda de una lupa y con una aguja tomamos la menor cantidad posible de puntas de hifas de los sectores de crecimiento rápido. De este modo se trató de aislar un único mutante y de evitar interferencias por cre-

cimiento de un micelio ocultando otro. Por ejemplo que un mutante del tipo *niaD* ocultara la presencia de un *nirA* o un *cnx*.

Sembramos los aislamientos que provenían directamente del medio selectivo en *Cz-Dox* con NH_4 ., el que añadimos como tartrato de amonio en una concentración de 0,9g/l, para asegurarnos un buen desarrollo de micelio.

Las cajas se incubaron en estufa a 30°C y oscuridad hasta observar desarrollo de micelio. Posteriormente las guardamos a 4°C en la heladera.

3. Clasificación de los mutantes:

A partir de colonias desarrolladas en cajas en medio de NH_4 , transferimos pequeños fragmentos de micelio a cajas con medio *Cz-Dox*, que contenían diferentes fuentes de nitrógeno: nitrato, nitrito e hipoxantina. Añadimos el nitrato y el nitrito como sales de sodio en una concentración de 0,3g/l y 0,7g/l respectivamente, y la hipoxantina en 0,1 g/l (Papa, 1986).

Las cajas se cultivaron por siete días de 25°C a 30°C en oscuridad. Clasificamos las colonias, según su capacidad para crecer en los distintos medios, como mutantes *nirA*, *niaD* y *cnx* (Tabla N°2).

Los mutantes nit- fueron conservadas en heladera a 4°C en cajas de Petri con medio *Cz-Dox* cuya fuente de nitrógeno era amonio.

4. Reconocimiento de los heterocariontes:

I. Estudio de autocompatibilidad:

Realizamos confrontaciones entre las diferentes clases de mutantes de la misma cepa con la finalidad de establecer si existe autocompatibilidad. Este procedimiento es esencial para corroborar la calidad de los mutantes

obtenidos para cada cepa. Los mutantes de una misma cepa deben producir el heterocarionte cuando son enfrentados.

Una vez que obteníamos un *nirA*, el tipo de mutante que aparecía en menor frecuencia, para una cepa determinada, lo confrontamos con todos los *niaD* que habíamos seleccionado hasta ese momento. De esta manera elegíamos el par de mutante, para cada cepa, que mostrara más claramente la formación del heterocarionte.

Para esto, sembramos los pares mutantes a 1cm de distancia, en cajas con Cz-Dox, con NO_3 como fuente de nitrógeno, y las incubamos a 30°C . A partir de una semana de incubación, y por un período de 10 días aproximadamente, efectuamos observaciones del tipo de crecimiento. La compatibilidad se estableció como una franja de crecimiento de tipo salvaje en la zona de contacto, mientras que la incompatibilidad como una franja de rechazo en la que no prospera ningún micelio en la misma zona.

II. Estudio de la compatibilidad vegetativa entre las distintas cepas y establecimiento de los VCGs:

Se realizaron confrontaciones inter e intraespecíficas para establecer los VCGs. Las confrontaciones se efectuaron en todas las combinaciones posibles mediante el procedimiento mencionado en el punto anterior.

Confrontamos el par de mutantes elegido para cada cepa contra el par de todas las restantes. Las confrontaciones siempre se realizaron entre dos tipos de mutantes distintos en búsqueda de la complementación. Es decir, confrontamos el *niaD* de una cepa contra el *nirA* de la otra y el *nirA* de la primera con el *niaD* de la segunda.

Obtuvimos los resultados por duplicado. Las reacciones positivas, así como las confusas fueron repetidas, por lo que en esos casos realizamos triplicados y cuadriplicados.

En función de los resultados obtenidos se establecieron los grupos de cepas pertenecientes a cada VCG.

En las cepas donde obtuvimos mutantes cnx, estos se utilizaron para corroborar los resultados anteriores.

C. MEDICIÓN DE LOS ESCLEROCIOS

Las cepas productoras de esclerocios las sembramos en cajas de Petri con medio de cultivo Czapek-Dox (3 réplicas por cepa). La incubación se realizó en oscuridad, durante 14 días a 30°.

Separamos los esclerocios del micelio mediante el raspado de la superficie del cultivo con una espátula y Tween 20 (100 µL/L).

Luego los filtramos con papel y lavamos los esclerocios repetidas veces con agua de la canilla, finalmente los secamos al aire sobre el papel de filtro.

Medimos el diámetro de 30 esclerocios por cepa con la ayuda de una lupa.

Para determinar si se trataban del tipo S o L seguimos el criterio adoptado por Cotty (1989), según el cual, las cepas que presentaron algún esclerocio mayor a los 400 µm fueron identificadas como L.

RESULTADOS

a- Obtención de los marcadores

1. Aislamiento de los posibles mutantes:

El desarrollo del micelio en el medio selectivo es lento, sumergido y hialino.

A partir de 10 días de incubación en estufa a 30°C, observamos en los bordes de la colonia, sectores de crecimiento más rápido consistentes de micelio sumergido formado por hifas separadas entre sí, con bajo grado de esporulación. Esto indica el posible desarrollo de un mutante nit.

La aparición de este tipo de crecimiento fue muy variable entre las distintas cepas. Algunas necesitaron más tiempo de incubación, (v.g. M11N2 y M1N2).

La utilización del glutamato como fuente de nitrógeno alternativa en el medio selectivo no mostró resultados positivos.

2. Clasificación de los mutantes:

Dado que heterocariontes con mutaciones en el mismo locus no muestran crecimiento de tipo salvaje, por lo menos se necesitan dos mutantes complementarios entre si para cada cepa. De las 37 cepas que utilizamos, entre las dos especies, en 5 (M1N2, M2N2, M4N1, M11N2, M21N3) no se obtuvieron al menos dos tipos de mutantes con el medio utilizado. En todos los casos el mutante que no se obtuvo fue el nirA.

De todas las cepas obtuvimos numerosos mutantes *niaD*, en tanto que solo en 32 obtuvimos *nirA*. En 13 logramos aislar mutantes *cnx*, los que resultaron ser muy buenos testigos en las confrontaciones debido a su bajo grado de esporulación y a la formación de heterocariontes de clara visualización.

Para que la observación del heterocarionte sea lo más clara posible, un buen mutante prácticamente no debería formar conidios. Sin embargo, en los casos en que la obtención de alguno de los tipos de mutantes era muy difícil, se usaron los mutantes con los que contábamos, como ocurrió, por ejemplo, con el mutante *nirA* de la cepa M12N3, que esporula más de lo deseado.

b- Reconocimiento de los heterocariontes

1. Estudio de autocompatibilidad

La formación del heterocarionte se observa como una franja de crecimiento de tipo salvaje. Esta franja produce micelio aéreo, una gran cantidad de conidios y, en ocasiones esclerocios, cuando se trata de una característica de las especies confrontadas (Figura N°2 -A-). La incompatibilidad como una zona de contacto sin crecimiento de micelio (Figura N°2 -B-).

En la mayoría de las cepas, no todos los mutantes aislados fueron capaces de formar un heterocarionte cuando se los confrontó con otros nit derivados de la misma cepa.

Todas las cepas de las que se pudo obtener como mínimo dos tipos de mutantes resultaron autocompatibles, al menos entre dos de los pares de

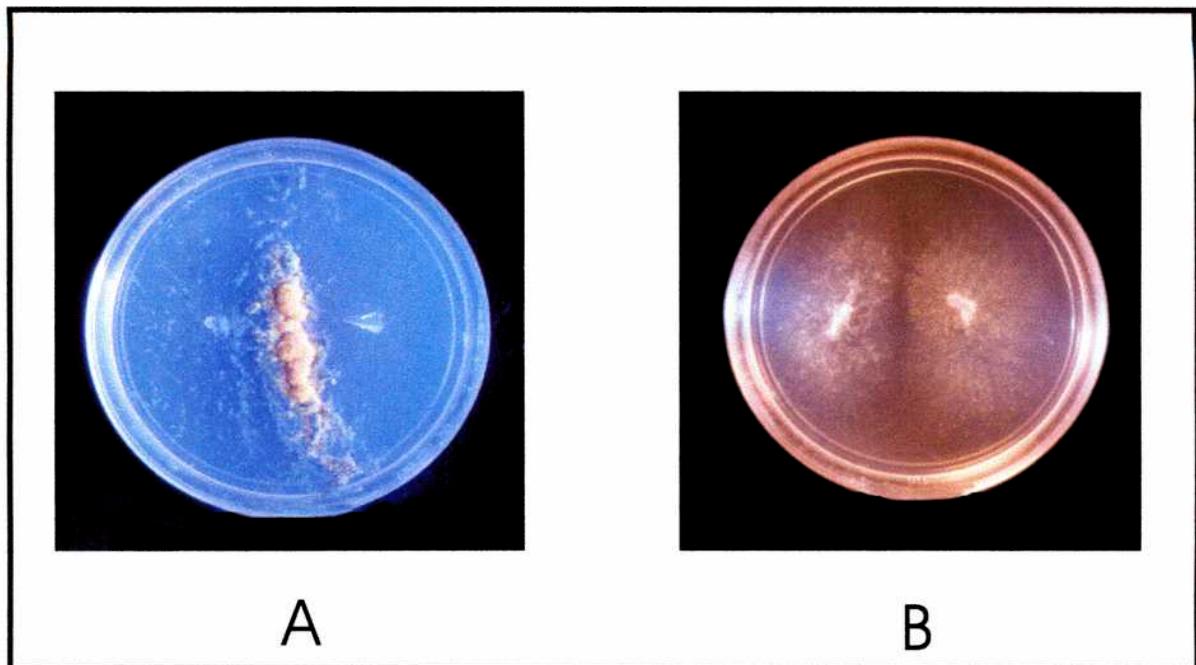


FIG. N°2: Visualización de la compatibilidad y la incompatibilidad.

Referencias: A: Cepas compatibles, se observa una franja de crecimiento tipo salvaje en la zona de contacto. B: Cepas incompatibles, se observa una zona de contacto sin desarrollo de micelio.

mutantes confrontados, que fueron los seleccionados para las confrontaciones posteriores entre cepas.

En algunos casos, cuando se reiteró la experiencia para corroborar los resultados, algunas de las confrontaciones resultaron negativas. Esto coincidió con cambios fenotípicos en alguno de los dos mutantes, expresados como aumento de la esporulación y del micelio aéreo. No obstante, consideramos el primer resultado como positivo.

2. Estudio de la compatibilidad vegetativa entre distintas cepas:

La formación o no del heterocarionte se determinó del mismo modo que se indica en el punto anterior.

Los resultados de las confrontaciones se muestran en la tabla N°6. En esta se indica el resultado final y no los tipos y números de mutantes que se manejaron.

De las 26 cepas de *A. flavus* utilizadas, 9 no mostraron compatibilidad con otras cepas y 17 se agruparon con una o más.

De las 6 cepas de *A. parasiticus*, 2 no mostraron compatibilidad con las cepas restantes y 4 se agruparon de a pares.

Estudiando las cepas M12N1, M6N1, M38N3, M3N1X, M34N2 y M15N1, observamos que dependiendo del par de mutantes utilizados, los resultados fueron distintos. Por ejemplo, los mutantes niaD de las cepas M6N1 y M12N1 al confrontarlos con los nirA de las cepas M38N1, M29N1 y M32N1 dan resultados positivos, mientras que los nirA de las cepas M6N1 y M12 N1 confrontados con los niaD de las tres cepas restantes dan resultados negativos (Tabla N°8). Resultados similares entre otras cepas se observan en las tablas 7, 9, 10 y 11.

Tabla N° 6: Resultados de las confrontaciones entre las cepas utilizadas en el estudio

	M11N1X	M11N1	M11N3	M36N1	M36N2	10A	M22N3	M38N1	M38N3	M40N
M11N1X										
M11N1	+									
M11N3	---	---								
M36N1	---	---	---							
M36N2	---	---	---	---						
10A	---	---	---	---	---					
M22N3	---	---	---	---	+	---				
M38N1	---	---	---	---	---	---	---			
M38N3	---	---	---	---	---	---	---	---		
M40N1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
M29N1	---	---	---	---	---	---	---	+		---
M29N3	---	---	---	+	---	---	---	---	---	---
M25N1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
M25N3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
M3N1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
M3N1X	---	---	---	+	---	---	---	---	---	---
M14N1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
M14N2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
M35N2	---	---	---	---	---	---	---	---	+	---
M35N1A	+	+	---	---	---	---	---	---	---	---
M35N1B	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
M12N1	---	---	---	---	---	---	---	+		---
M12N3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
M15N1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
M15N2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
M15N3	+	+	---	---	---	---	---	---	---	---
M10N3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
M6N1	---	---	---	---	---	---	---	+		---
M2N1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
M32N1	---	---	---	---	---	---	---	+		---
M32N4	---	---	---	---	---	---	---	---	+	---
M34N2	+	+	---	---	---	---	---	---	---	---

(+)Corresponde a la formación del heterocarionte entre las cepas confrontadas.

(--) Corresponde a la no formación del heterocarionte entre las cepas confrontadas.

Tabla N°7: Resultados de las confrontaciones entre las cepas M34N2, M35N1A, M15N3, M11N1 y M11N1X.

VCG "A"	M34N2 niaD	M35N1A niaD	M15N3 niaD	M11N1 niaD	M11N1X niaD
M34N2 nirA	+	--	--	--	--
M35N1A nirA	+	+	+	+	+
M15N3 nirA	+	+	+	+	+
M11N1 nirA	+	+	+	+	+
M11N1X nirA	+	+	+	+	+

Tabla N°8: Resultados de las confrontaciones entre las cepas M6N1, M12N1, M38N1, M29N1 y M32N1.

VCG "B"	M6N1 niaD	M12N1 niaD	M38N1 niaD	M29N1 niaD	M32N1 niaD
M6N1 nirA	+	+	---	---	---
M12N1 nirA	+	+	---	---	---
M38N1 nirA	+	+	+	+	+
M29N1 nirA	+	+	+	+	+
M32N1 nirA	+	+	+	+	+

Tabla N°9: Resultados de las confrontaciones entre las cepas M36N1 y M3N1X.

VCG "C"	M36N1 niaD	M36N1 niaD ₂	M3N1X niaD
M36N1 nirA	+	+	+
M3N1X nirA	---	---	+

Tabla N°10: Resultados de las confrontaciones entre las cepas M38N3, M32N4 y M35N2.

VCG "E"	M38N3 niaD	M32N4 niaD	M35N2 niaD
M38N3 nirA	+	---	---
M32N4 nirA	+	+	+
M35N2 nirA	+	+	+

Tabla N°11: Resultados de las confrontaciones entre las cepas M15N1 y M15N2.

VCG "F"	M15N1 niaD	M15N1cnx	M15N2 niaD
M15N1 nirA	+	+	---
M15N2 nirA	+	+	+

Tomamos el resultado positivo como criterio de inclusión dentro del grupo.

Cuando pudimos seleccionar un tercer tipo de mutante, como un cnx u otro niaD, lo utilizamos para verificar los resultados de las confrontaciones previas. De esta manera confirmamos la inclusión de las cepas M6N1, M12N1, M3N1X, y M15N1 dentro de los grupos previamente asignados.

Entre las dos especies se reconocieron 18 VCGs (Tabla N°12).

En ningún caso las cepas de las dos especies estudiadas (*A. flavus* y *A. parasiticus*) quedaron comprendidas juntas en el mismo VCG.

Todas las cepas integrantes de un mismo VCG pertenecen a la misma categoría, en cuanto a la combinación de toxinas que producen, y/o en cuanto a la producción o no de esclerocios. La única excepción se observó en el VCG A.

De las 4 cepas identificadas con características atípicas, 1 no generó, al menos, 2 tipos de mutantes por lo que fue descartada del análisis. Las 3 restantes conformaron un VCG aislado (E).

El VCG A quedó compuesto por 5 cepas. De estas 4 corresponden a la categoría III (producción de aflatoxina B), y una (M15N3) a la Ia (producción de aflatoxina B y de ACP). Las 5 son no formadoras de esclerocios y a excepción de dos que provienen de Villa del Rosario, las restantes provienen de diferentes localidades.

El VCG D quedó conformado por 2 cepas correspondientes a la categoría III. Estas cepas son productoras de esclerocios y provienen de diferentes sitios de muestreo.

Los VCGs B y C quedaron integrados por 5 y 2 cepas respectivamente. Las cepas de ambos grupos pertenecen a la categoría Ia y son productoras de esclerocios. En ambos casos las cepas provenían de diferentes localidades.

Tabla N°12: Grupos de Compatibilidad Vegetativa y características de las cepas que los integran.

VCG	ESPECIE	CEPA N°	CATEGORÍA	ESCLEROCIOS	LOCALIDAD
A	<i>A. flavus</i>	M35N1A	III	no	Ticino
		M34N2	III	no	La Carlota
		M15N3	Ia	no	Carnerillo
		M11N1	III	no	Villa del Rosario
		M11N1X	III	no	Villa del Rosario
B	<i>A. flavus</i>	M12N1	Ia	si	Gral. Cabrera
		M6N1	Ia	si	Río IV
		M32N1	Ia	si	Alejandro
		M38N1	Ia	si	Colazo
		M29N1	Ia	si	Villa Ascasubi
C	<i>A. flavus</i>	M36N1	Ia	si	Matorrales
		M3N1X	Ia	si	Gigena
D	<i>A. flavus</i>	M22N3	III	si	Manfredi
		M36N2	III	si	Matorrales
E	<i>A. flavus</i>	M32N4	Ib	si	Alejandro
		M38N3	Ib	si	Colazo
		M35N2	Ib	si	Ticino
F	<i>A. parasiticus</i>	M15N1	IIb	si	Carnerillo
		M15N2	IIb	si	Carnerillo
G	<i>A. parasiticus</i>	M3N1	IIb	si	Gigena
		M12N3	IIb	si	Gral. Cabrera
H	<i>A. flavus</i>	M2N1	Ia	si	Holmberg
I	<i>A. flavus</i>	M10A	Ia	si	Manfredi
J	<i>A. flavus</i>	M10N3	Ia	si	Charras
K	<i>A. flavus</i>	M11N3	Ia	si	Villa del Rosario
L	<i>A. flavus</i>	M14N1	Ia	no	Las Perdices
M	<i>A. flavus</i>	M14N2	Ia	no	Las Perdices
N	<i>A. parasiticus</i>	M25N1	IIb	si	Pampayagasta
O	<i>A. parasiticus</i>	M25N3	IIb	si	Pampayagasta
P	<i>A. flavus</i>	M29N3	IIa	no	Villa Ascasubi
Q	<i>A. flavus</i>	M35N1B	III	si	Ticino
R	<i>A. flavus</i>	M40N1	III	si	Oncativo

Referencias: la categoría corresponde a la clasificación dada en la tabla N°3.

Los VCGs F y G, conformados por cepas de *A. parasiticus*, se integran con dos cepas de la categoría IIb (no producción de ACP) cada uno. Las 4 cepas son productoras de esclerocios. En este caso, las dos cepas del VCG F provenían de la localidad de Carnerillo, mientras que las del VCG G corresponden a dos localidades distintas, pero muy cercanas entre sí y a la localidad de Carnerillo (Figura N°1).

Los 12 VCGs restantes están compuestos por una cepa cada uno. Corresponden a los grupos Ia, IIb y III.

Estudiamos la diversidad genética de las cepas de cada especie como el cociente entre el número de VCGs dividido el número de cepas totales (Horn & Greene, 1995). Las 26 cepas de *A. flavus* se agruparon en 13 VCGs presentando una diversidad de 0,5. Las 6 cepas de *A. parasiticus* se agruparon en 4 VCGs exhibiendo una diversidad de 0,66.

Por lo general las cepas de *A. flavus*, comprendidas dentro de un mismo VCG, procedieron de diferentes localidades y, en la mayoría de los casos, dichas localidades fueron distantes entre sí (Figura N°1).

Los resultados obtenidos de las mediciones de esclerocios indican que todas las cepas con las que contamos corresponden al tipo L (Figuras 3 y 4). Siete de las cepas consideradas como productoras de esclerocios en los estudios previos, no los produjeron bajo las condiciones de incubación que utilizamos, por consiguiente fueron descartadas del análisis. Los datos se presentan en la Tabla N°13.

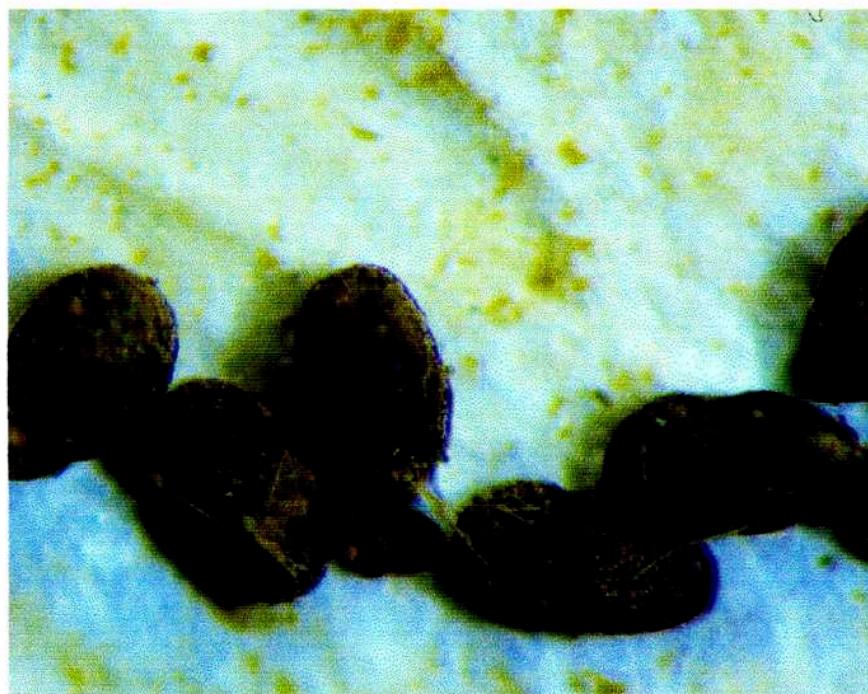
Tabla N°13: Mediciones, rango y porcentaje sobre 400 μm de los esclerocios de las cepas de *A. flavus* *.

CEPA N°	MEDICIÓN (μm) ± SD	RANGO (μm)	PORCENTAJE SOBRE 400 μm
M2N1	594 ± 124,38	360-880	96,7
M3N1X	606 ± 125,98	320-880	96,7
M6N1	388 ± 85,26	240-600	63,3
10A	618 ± 129,96	400-800	100
M10N3	627,3 ± 138,8	360-880	96,6
M11N3	454 ± 117,66	280-800	66,6
M11N2	261,3 ± 90,76	100-520	10
M12N1	398 ± 97,48	240-760	60
M22N3	266 ± 77,48	120-440	13,3
M29N1	394,67 ± 84,37	280-640	56,67
M32N1	693,33 ± 172,38	320-1000	93,3
M32N4	372,67 ± 51,76	280-480	40
M35N1B	640,6 ± 131,5	360-840	100
M35N2	338,6 ± 59,98	240-480	26,7
M36N1	665,3 ± 139,32	280-760	100
M36N2	322 ± 68,38	200-480	20
M38N1	545,3 ± 106,54	280-680	96,67
M38N3	284 ± 71,07	120-440	13,3
M40N1	269,33 ± 69,95	160-400	10

Como criterio se considera que la presencia, en una cepa, de un esclerocio de 400 μm o más indica su pertenencia al grupo del tipo L.

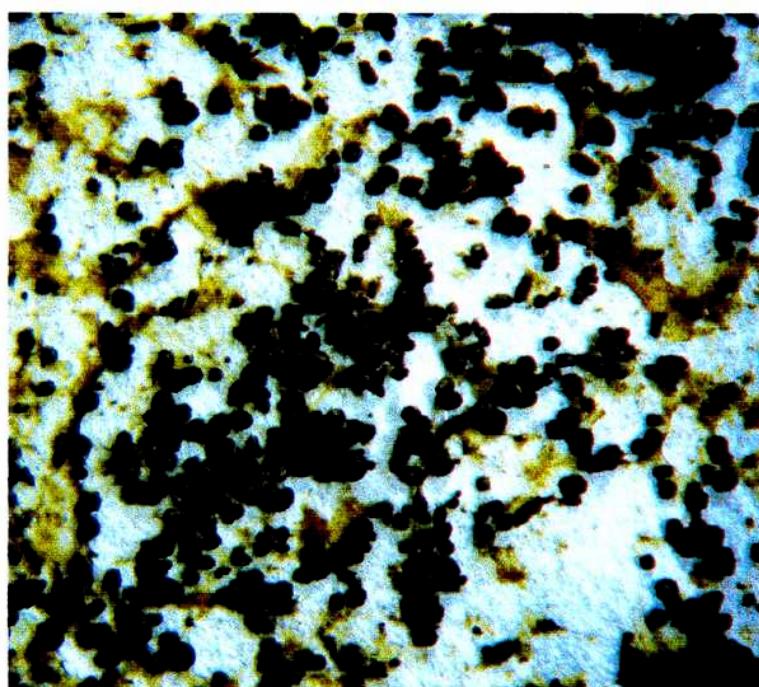
(*) 7 de las cepas consideradas como productoras en estudios previos fueron descartadas porque no los formaron en las condiciones de incubación que utilizamos.

Figura N°3



Morfología de los esclerocios de la cepa M12N1

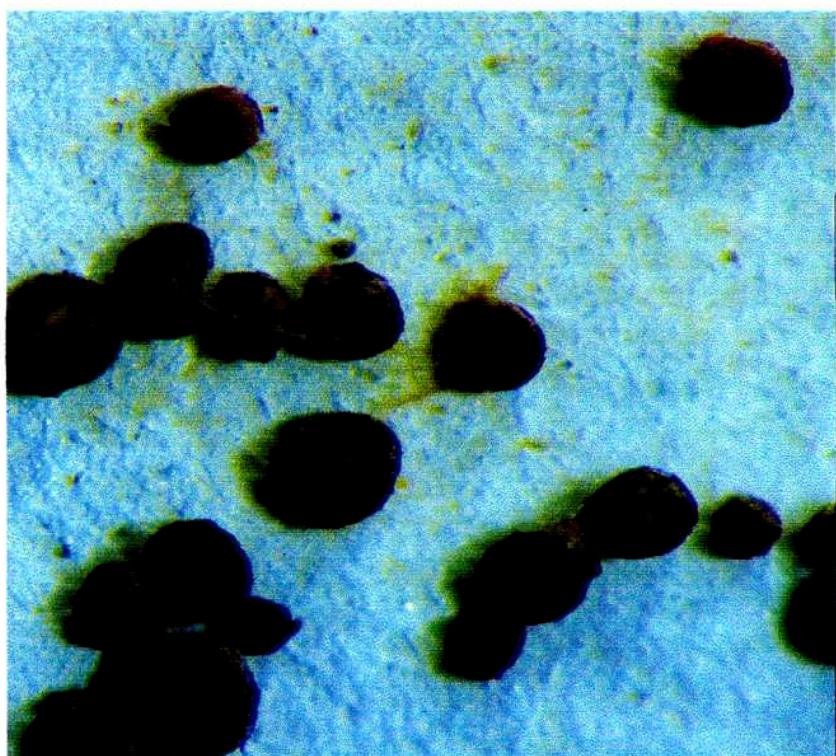
Escala: 1 — 10 mm = 234 μ m.



Morfología de los esclerocios de la cepa M2N1

Escala: 1 — 10mm = 152,3 μ m.

Figura N°4



Morfología de los esclerocios de la cepa M32N1

Escala: 1—1 10mm = 222,2 μ m



Morfología de los esclerocios de la cepa M32N4

Escala: 1—1 10mm = 1242,3 μ m

DISCUSIÓN

En ninguno de los VCGs conformados durante el estudio, las cepas de *A. flavus* y de *A. parasiticus* quedaron comprendidas en el mismo grupo. Esto concuerda con los resultados presentados por Horn & Greene (1995). Estos autores plantean que, aunque las especies *A. flavus* y *A. parasiticus* estarían estrechamente relacionadas con base en su complementariedad de ADN (Kurtzman *et al.*, 1986, 1987), la ausencia de CV entre ellas sugeriría aislamiento genético.

Los resultados de este trabajo verifican la eficacia de la técnica de CV y apoyan la hipótesis de mantener a estos organismos como especies independientes.

A lo largo del período en el que se desarrolló el trabajo, observamos que algunos mutantes, elegidos como testigos para representar una cepa determinada, readquirían los caracteres de la cepa salvaje. Consideramos que estos cambios se deben a una reversión en la mutación.

La falta de complementación entre algunos mutantes derivados de la misma cepa podría deberse a una mutación doble. Un argumento alternativo es que la resistencia al clorato resultara de la inactivación general del metabolismo del nitrógeno más que de una inactivación del mecanismo de la asimilación del nitrato (Cove, 1976a; Cove, 1979).

Los resultados obtenidos con los mutantes *nirA* de las cepas M38N3 (Tabla N°10), M3N1X (Tabla N°9), M15N1 (Tabla N°11) y M34N2 (Tabla N°7) sugieren que se trata de marcadores con deficiencias en la capacidad de formar heterocariontes.

Los resultados obtenidos con los mutantes del tipo *nirA* de las cepas M6N1 y M12N1 (Tabla N°8), pertenecientes al VCG B, al ser confrontadas con los *niaD* de las 3 cepas restantes, nos sugieren que probablemente estos no sean *nirA* y correspondan a otro tipo de mutantes. Es por esto que, de alguna manera no complementan con los *niaD* de las cepas restantes. Otra explicación sería que dichos mutantes portaran una doble mutación. Esto concuerda con Katan & Katan (1988), quienes obtuvieron resultados similares en *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr.

Gordon & Okamoto (1991) observaron incompatibilidad entre cepas de *F. oxysporum* pertenecientes al mismo VCG. Según estos autores, la necesidad del uso de mutantes, que nos permita la visualización del heterocarionte, introduce la posibilidad de que resulten interacciones negativas entre los marcadores utilizados, como consecuencia de mutaciones que no complementan, aún cuando dichas cepas en su estado salvaje pudieran ser compatibles. Concluyen que una reacción negativa en una combinación de nit no es suficiente para decidir si dos cepas son o no compatibles. La forma de evitar los falsos negativos es realizando todas las combinaciones posibles con los nit.

Brooker *et al.* (1991) obtuvieron cepas de *Colletotrichum* Corda cuyos mutantes eran incapaces de complementar con ninguno de los otros nit derivados de la misma cepa. Algunos mutantes formaban heterocariontes con solo algunas de las cepas compatibles. Ante las dificultades que estos resultados representan para un estudio poblacional, estos autores postulan los siguientes efectos prácticos. Primero la necesidad de desarrollar un "set" de testigos para cada cepa, los cuales deben presentar un rango amplio de compatibilidad. Segundo, se deberían realizar confrontaciones con varios mutantes derivados de cada cepa.

Como en nuestro trabajo realizamos la mayor cantidad de confrontaciones posibles entre todas las cepas, y en numerosos casos utilizamos más de un mutante disponible, consideramos que disminuimos la posibilidad de falsos negativos.

En varios trabajos se observó la existencia de cepas auto-incompatibles (Correll *et al.*, 1987; Jacobson & Gordon, 1988). Estas cepas dificultan el análisis de una población dado que no pueden ser asignadas a ningún VCG. Sin embargo, dichas cepas podrían ser potencialmente útiles en técnicas de ADN recombinante o en trabajos de control biológico, cuando se necesite que la cepa liberada sea incapaz de formar un heterocarionte con otra de la población (Brooker *et al.*, 1991).

Si bien contamos con, al menos, dos tipos de mutantes en la mayoría de las cepas, y en algunos casos tres, 3 cepas de *A. flavus* y 2 de *A. parasiticus* debieron ser descartadas del análisis por no cumplir dicho requisito. De las mencionadas cepas, solo obtuvimos mutantes niaD y por lo tanto no pudimos determinar si son o no auto-compatibles. Los resultados obtenidos son acordes con los registrados en otros estudios. Horn & Greene (1995) aislaron al menos dos tipos de mutantes de todas las cepas a excepción de dos de *A. tamarii*. Bayman & Cotty (1991b) descartaron 15 cepas de un total de 105. Fiely *et al.* (1995) reconocieron 157 cepas a las que no pudieron asignar a ningún VCG por la carencia de mutantes complementarios.

Según Correll *et al.* (1987), los mutantes que presentan un escaso crecimiento en hipoxantina, denominados cnx para las especies de *Aspergillus*, son los testigos más confiables en estudios de CV y sugieren el aislamiento de uno de estos mutantes para cada cepa como medio para evitar falsos negativos. Sin embargo, como ya señalamos anteriormente, son difíciles de obtener por esta técnica (Klittich & Leslie, 1988; Horn & Greene, 1995).

Estas observaciones coinciden con lo que concluimos sobre este tipo de mutante. Por un lado, el mutante cnx es el que mejor se detecta visualmente ya que es el que presenta menor grado de esporulación. Por otro, es el que aislamos en menor proporción.

Horn & Greene (1995) obtuvieron las siguientes frecuencias de cepas que generaron mutantes del tipo cnx: *A. flavus* 60% (n=83) y *A. parasiticus* 67% (n=79). Realizando comparaciones de todos los nit identificados dentro de cada especie, reconocieron que las frecuencias de los tres tipos de mutantes fueron significativamente diferentes y resumieron sus observaciones como que el número de mutantes de cada tipo obtenidos por esta técnica es el siguiente: niaD > nirA > cnx.

Sin embargo, como el número de cepas utilizadas por estos autores es muy superior al que contamos en nuestro estudio, consideramos que a pesar de que concuerden, nuestros resultados no pueden compararse adecuadamente con los suyos.

Las 26 cepas de *A. flavus* analizadas se agruparon en 13 VCGs. Estos valores dan una diversidad de 0,5, la que concuerda con los siguientes estudios realizados.

Horn & Greene (1995) obtienen un valor de 0,56 para *A. flavus* y Papa (1986) identificó una diversidad de 0,69.

En un trabajo realizado durante los años 1987, 1988 y 1989, en un campo de algodón Arizona (EE.UU.), se detectó que la diversidad de los VCGs, durante el período en el cual se llevó a cabo el estudio, osciló entre 0,15 y 0,54 Bayman & Cotty (1991b). De esta manera la diversidad también es variable en una escala temporal.

La elevada diversidad presentada por *A. flavus*, puede ser consecuencia de la gran dispersión aérea que presenta dicha especie. Esto se

sustenta sobre la consideración de *A. flavus* como la especie dominante en la infección de cultivos de frutos sobre tierra como el algodón y el maíz (Papa, 1986; Diener, 1987; Horn & Green, 1995).

Horn *et al.* (1996) postulan que la alta diversidad de VCGs encontrada en poblaciones de *A. flavus* es similar a la diversidad identificada en cepas no patogénicas del suelo correspondientes a *F. oxysporum* (Gordon & Okamoto, 1991).

Por el contrario, muchas poblaciones de *F. oxysporum*, patogénicas de plantas, presentan una diversidad de VCGs relativamente baja. Esto podría ser el resultado de la ventaja selectiva de algunos VCGs en su especificidad de hospedante (Bosland & Williams, 1987; Larkin *et al.*, 1990), o con respecto de alguna cepa particular introducida de otra región (Katan *et al.*, 1989; Pegg *et al.*, 1995).

Horn *et al.* (1996) postulan a través de la elevada diversidad encontrada en *A. flavus*, que ninguno de los VCGs estaría adaptado selectivamente para invadir los cultivos bajo condiciones de campo. La mayor presión de selección sobre esta especie podría ocurrir en respuesta a un gran número de parámetros asociados con el saprofitismo en el suelo, más que en respuesta a los requerimientos necesarios para una invasión al hospedante. El alto grado de producción de esclerocios y de aflatoxinas, entre las cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus*, sugeriría que estos caracteres podrían ser selectivamente ventajosos bajo las condiciones del sudoeste de Georgia (EE.UU.).

La diversidad de 0,66 para *A. parasiticus* puede considerarse como elevada en comparación con la detectada por otros autores. Horn & Greene (1995) obtuvieron 0,22 como valor de diversidad, siendo la nuestra muy superior a la suya, sin embargo cabe destacar que estos autores utilizaron un

mayor número de cepas que nosotros y por lo tanto, los resultados no son comparables.

Por otra parte, no fue objetivo de este trabajo estudiar la diversidad genética de *A. parasiticus*, sino que dichas cepas fueron introducidas en el estudio con el objeto de corroborar la eficiencia de la técnica de CV.

La baja diversidad de la especie en cuestión, se podría explicar como consecuencia de su tipo de dispersión. *A. parasiticus* es considerada como una especie más adaptada al ambiente terrestre que *A. flavus*, dado que se lo encuentra preferentemente en semillas de maní, más que en cultivos sobre tierra (Diener *et al.* 1987).

Algo para tener en cuenta es que los valores de diversidad no son consistentemente superiores para hongos que presentan reproducción sexual en comparación con aquellos que no la presentan (Croft & Jinks, 1977; Correll *et al.*, 1986; Lamondia & Elmer, 1989). Aunque este hecho, en parte pudiera ser consecuencia de diferentes tipos de muestreos entre los estudios, sugeriría que las especies asexuales de hongos son sorprendentemente diversas (Bayman & Cotty, 1991b).

La frecuencia de anastomosis de hifas entre cepas dependerá de la diversidad de los VCGs en una región en particular (Horn & Greene, 1995). Estos autores proponen que el gran número de VCGs correspondientes a *A. flavus*, limitaría notablemente dicha anastomosis. En contraste, dada la menor diversidad identificada en *A. parasiticus*, sería más frecuente su contacto.

La parasexualidad (recombinación mitótica), que requiere como prerequisito la anastomosis de hifas seguida de la heterocariosis, ha sido demostrada en *A. flavus* y *A. parasiticus* (Papa, 1973, 1978) sólo en condiciones de laboratorio. El papel de estos procesos en la naturaleza merece más investigación (Horn & Greene, 1995).

Como surge de los resultados, todas las cepas integrantes de un mismo VCG pertenecen a la misma categoría en cuanto a la combinación de micotoxinas que producen y se correlaciona también con la producción o no de esclerocios. La única excepción es la cepa M15N3 en el VCG A. Sin embargo, la producción de una combinación de toxinas en particular, no siempre se correlaciona con la producción de esclerocios, como ocurre entre los VCGs A y D y las cepas M15N3, M14N1 y M14N2. Así también como cepas que se encuentran en VCGs comprendidos por una sola cepa (Tabla N°12). Papa (1986), no encuentra aparente relación entre la producción de aflatoxinas y de esclerocios.

Es decir que, nuestros resultados indican que la pertenencia de una cepa a un-determinado VCG, garantiza que todos sus integrantes produzcan una combinación igual de micotoxinas y produzcan o no esclerocios. Sin embargo, no existe la correspondencia inversa. Una cepa, por producir una determinada toxina y producir o no esclerocios en concordancia, no implica que deba pertenecer a un determinado VCG. Con excepción del VCG E conformado por las cepas atípicas.

Horn *et al.* (1996) encontraron que *A. flavus* y *A. parasiticus* mostraban diferencias significativas entre los VCGs con respecto a morfología y producción de toxinas. La producción de aflatoxina total y el ACP se correlacionaron positivamente en *A. flavus*. También en *A. parasiticus*, la producción total de aflatoxinas y el ácido kójico se correlacionaron positivamente. Estos autores plantean que las diferentes asociaciones entre dichas micotoxinas presentadas en otros trabajos, pueden deberse al número de cepas analizadas, las condiciones de cultivo, o a características de una población en particular.

En nuestro estudio no cuantificamos la producción de las distintas toxinas. Es por esto que no podemos establecer una relación directa entre nuestros resultados y los de Horn *et al.* (1996). Sin embargo, consideramos interesante que en ambos, de alguna forma, se correlacionan la producción de toxinas, la de esclerocios y los VCGs.

Con respecto a la presencia de cepas que se diferencien en alguna característica de las cepas restantes comprendidas en el mismo VCG, como es el caso de la M15N3 en el VCG A, Correll (1991) plantea que estas cepas pudieron haber acumulado diferencias fenotípicas, por medio de mutaciones, mientras mantenían la afiliación al mismo VCG.

A. flavus comparte con *A. parasiticus* y *A. nomius* la capacidad de producir aflatoxinas (Kurtzman *et al.*, 1987). La descripción de las diferencias entre estas especies con respecto a la producción de toxinas, está detallada en la introducción.

La comprensión de las relaciones entre las especies del grupo *A. flavus* es muy problemática debido a la considerable variación, tanto morfológica como fisiológica, que exhiben los taxones que lo componen (Kurtzman *et al.*, 1987).

Se han utilizado técnicas moleculares para clarificar las relaciones entre las especies del grupo. Kurtzman *et al.* (1986), basándose en la complementariedad del ADN, separaron *A. oryzae*, *A. parasiticus* y *A. sojae* como variedades de *A. flavus*.

En la descripción de la nueva especie *A. nomius* señalan que existe una complementación del ADN entre *A. nomius*, *A. flavus* y *A. tamarii* mayor que la encontrada habitualmente entre especies. Esto sugeriría que los tres taxones han evolucionado recientemente de un ancestro común (Kurtzman *et al.* 1987).

Sin embargo, los estudios enzimáticos llevados a cabo por Yamatoya *et al.* (en Egel *et al.* 1994), como los de Moody & Tyler (1990) sobre restricción de ADN mitocondrial y genómico, no apoyan esta propuesta y están a favor de la separación de *A. parasiticus*, *A. flavus* y *A. nomius* como taxones independientes.

Dentro de las poblaciones de *Aspergillus*, los VCGs pueden ser considerados como series de clones derivados de un ancestro común que luego se han dispersado y diferenciado (Croft & Jinks, 1977, en Horn *et al.* 1996). Esta noción de clonalidad es sustentada por la asociación de caracteres morfológicos y producción de toxinas en VCGs de *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. tamarii* encontrada por Horn *et al.* (1996). Bayman & Cotty (1993) usando la técnica de RAPD confirmaron la estrecha relación entre cepas de *A. flavus* dentro de VCGs. Jacobson & Gordon (1991) obtuvieron resultados similares en *F. oxysporum*.

El tamaño y número de los esclerocios ha sido utilizado para distinguir entre dos grupos de cepas dentro de la especie *A. flavus*, pudiéndose diferenciar las cepas S y L (Cotty, 1989). Esta división fue luego sustentada por un estudio genético de la CV y la aplicación de la técnica RAPD (Bayman & Cotty, 1993).

Las cepas L pueden producir sólo aflatoxinas B o, en su defecto no producir aflatoxina. Las cepas S producen aflatoxinas en gran cantidad, algunas sólo del tipo B y otras B y G (Cotty, 1989; Hesseltine *et al.*, 1970; Saito *et al.*, 1986).

En 1970, tres cepas caracterizadas como S fueron colocadas en un taxón sin nombre por Hesseltine *et al.* (1970) (en Egel *et al.* 1994). Dos de estas cepas fueron incorporadas en un análisis sobre las relaciones entre las cepas del grupo *A. flavus*. Estas fueron inferidas a partir de la variabilidad

de los sitios de restricción en una porción del gen Taka-amilasa A. Los resultados de un estudio fenético indicarían que las cepas S mencionadas estarían tan estrechamente relacionadas tanto con *A. flavus* como con *A. parasiticus*. Los análisis de parsimonia de los sitios de restricción, sugirieron que *A. flavus* y *A. parasiticus* habrían surgido de un ancestro común compartido con *A. nomius*, vía un intermediario S de *A. flavus* (Egel *et al.* 1994).

Cotty (1989) obtuvo resultados que concuerdan con los de Saito *et al.* (1986), según los cuales las cepas S producen las aflatoxinas en mayor cantidad que las L.

Bayman & Cotty (1993) estudiaron la distribución de los dos tipos de cepas entre los VCGs. Todos los VCGs quedaron conformados por cepas del mismo tipo con la excepción de uno solo. Por otro lado, Horn *et al.* (1996) identificaron a todas las cepas de su muestra como L. Sin embargo, existieron diferencias entre los esclerocios, que se correlacionaron con los VCGs.

Nuestros resultados indican que las cepas con las que trabajamos corresponden al tipo L (Tabla N°13), al igual que Horn *et al.* (1996). Si bien se observa, cualitativamente, una cierta relación del tamaño de los esclerocios entre las cepas dentro del mismo VCG, debido a que el número de cepas productoras es escaso para un análisis estadístico, no podemos establecer si existe correlación o no entre estos caracteres. Además, a diferencia de lo postulado por Cotty (1989), Hesseltine *et al.* (1970) y Saito *et al.* (1986) las cepas atípicas, que según lo establecido (Cotty, 1989; Bayman & Cotty, 1993; Garber & Cotty, 1997) corresponderían al grupo L, producen aflatoxinas B Y G.

La variabilidad geográfica observada entre las cepas integrantes de los VCGs de *A. flavus*, puede deberse a la capacidad de dispersión aérea que presentan las especies consideradas. Bayman & Cotty (1991b) encontraron diferencias significativas en la distribución de los VCGs de año a año en un campo de algodón en Arizona (EE. UU.) Postularon que dichos cambios podrían ser consecuencia del influjo de los conidios dispersos por el aire.

Las cepas de *A. parasiticus*, que conformaron dos VCGs, corresponden a la misma localidad o a localidades muy cercanas. Esto concuerda con la idea preponderante de que esta especie se encuentra más adaptada a la dispersión terrestre que *A. flavus* (Diener *et al.*, 1987, en Horn & Greene, 1995).

La inclusión de las tres cepas atípicas (M32N4, M35N2 y M38N3) dentro del mismo VCG, nos sugiere que estarían estrechamente relacionadas y se trataría de un mismo clon, a pesar de que fueron aisladas de sitios alejados (cfr. Figura N°1).

Si tomamos en cuenta los criterios adoptados por Kurtzman *et al.* (1987) para describir como especie nueva a *A. nomius*, y la gran correspondencia que se ha encontrado entre VCGs y ADN, podríamos postular que las cepas atípicas de nuestro estudio conforman, o una variedad dentro de *A. flavus* o una nueva especie del grupo *A. flavus*.

CONCLUSIONES

- Existe correlación entre VCGs y las cepas correspondientes a cada especie. Esto apoya la hipótesis de mantener a estos dos taxones como especies diferentes.
- Se comprueba una alta variabilidad genética en la población de cepas aisladas, sobre todo en *A. flavus*. Esta variabilidad se expresó tanto en el gran número de VCGs, como en la producción de toxinas y esclerocios.
- Se comprueba una estrecha correlación entre los VCGs identificados, la producción de aflatoxinas y de ACP, así como con la producción de esclerocios.
- Los VCGs de *A. flavus* no están necesariamente restringidos a ciertos sitios geográficos o parcelas de cultivos.
- Las cuatro cepas atípicas por la producción simultánea de aflatoxinas B, G y ACP, conformaron un grupo aislado.
- Si bien todavía es necesario estudiar un mayor número de cepas y complementar los resultados obtenidos con otras técnicas, estos apoyan la hipótesis de que las cepas atípicas podrían conformar, como en el caso de *A. nomius*, una variedad o especie diferente dentro del grupo *A. flavus*.

Objetivos a alcanzar en la continuación del estudio:

- Aumentar el número de cepas utilizadas en el estudio.
- Realizar comparaciones con cepas aisladas de los otros dos centros de cultivo en Argentina: Salta y Corrientes.
- Cuantificar la producción de toxinas para establecer si existe alguna relación entre ésta y el tamaño de los esclerocios, o algún otro carácter.
- Utilizar alguna técnica molecular para corroborar las hipótesis planteadas.

BIBLIOGRAFÍA

- ABERG, B. 1947. On the mechanism of the toxic action of chlorate and related substances upon wheat plants. *Kungl. Lantbruks Högskolans Ann.* **15**: 37-107.
- AHN, I. P., H. S. CHUNG & Y.-H. 1998. Vegetative compatibility groups and pathogenicity among isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Plant Dis.* **82**: 244-246.
- ALEXOPOULOS, C. J., MIMS, C. W. & BLACKWELL, M. 1996. *Introductory Mycology*. Fourth Edition. John Wiley & Sons, Inc. New York. 869 pp.
- ANAGNOSTAKIS, S. L. & J. KRANZ. 1987. Population dynamics of *Cryphonectria parasitica* in a mixed-hardwood forest in Connecticut. *Phytopathology* **77**:751-754.
- ANÓNIMO. 1996. Worldwide regulations for mycotoxins 1995, a compendium. FAO Food and Nutrition Paper. (Advanced copy). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.
- BAYMAN, P. & P. J. COTTY. 1991a. Improve media for selecting nitrate-nonutilizing mutants in *Aspergillus flavus*. *Mycologia* **83**: 311-316.
- _____ 1991b. Vegetative compatibility and genetic diversity in the *Aspergillus flavus* population of a single field. *Canad. J. Bot.* **69**: 1707-1711.
- _____ 1993. Genetic diversity in *Aspergillus flavus*: association with aflatoxin production and morphology. *Canad. J. Bot.* **71**: 23-31.
- BEADLE, G. W. & V. L. COONRADT. 1944. Heterokaryosis in *Neurospora crassa*. *Genetics* **29**: 291-308.
- BLANEY, B. J., M. A. KELLY, A. L. TYLER & M. D. CONNOLE. 1989. Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by Queensland isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Aust. J. Agric. Res.* **40**: 395-400.
- BOSLAND, P. W. & P. H. WILLIAMS. 1987. An evaluation of *F. oxysporum* from crucifers based on pathogenicity, isoenzyme polymorphisms, vegetative compatibility and geographic origin. *Can. J. Bot.* **65**: 2067-2073.

- BROOKER, N. L., J. F. LESLIE & M. B. DICKMAN. 1991. Nitrate-nonutilizing mutants of *Colletotrichum* and their use in studies of vegetative compatibility and genetic relatedness. *Phytopathology* **81**: 672-677.
- BURNETT, J. H. 1975. *Mycogenetics*. Wiley and Sons (Eds.). New York. pp375.
- CAST (Council for Agricultural Science and Technology) 1989. "Mycotoxins Economic and Health Risks". Report N°116, pp 38-39.
- CAUSIN, R. G. FIGIMELICA, L. MONTECCHIO & S. MUTTO ACCORDI. 1995. Vegetative compatibility and conversion to hypovirulence among Italian isolates of *Cryphonectria parasitica*.
- CORRELL, J. C. 1991. The relationship between formae speciales, races and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* **81**: 1061-1064.
- _____, J. E. PUHALLA & R. W. SCHEIDER. 1986. Vegetative compatibility groups among non-pathogenic root-colonising strains of *F. oxysporum*. *Can. J. Bot.* **64**: 2358-2361.
- _____, C. J. R. KLITTICH; & J. F LESLIE. 1987. Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology* **77**: 1640-1646.
- COTTY, P. J. 1989. Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology* **79**: 808-814.
- _____, & P. BAYMAN. 1993. Competitive exclusion of a toxicogenic strain of *Aspergillus flavus* y an atoxigenic strain. *Phytopathology* **83**: 1283-1287.
- COVE, D. J. 1976a. Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*: The selection and characterisation of chlorate resistant mutants. *Heredity*, **36**(2): 191-203.
- _____, 1976b. Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*: Studies of mutants altered in nitrate assimilation. *Mol. Gen. Genet.* **146**: 147-159.
- _____, 1979. Genetic studies of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Biol. Rev.* **54**: 291-327.

- CROFT, J. H. & J. L. JINKS. 1977. Aspects of the population genetics of *A. nidulans*. En *Genetics and physiology of Aspergillus*. J. E. Smith and J. A. Pateman (Eds.). Academic Press, London. 339-360
- DIENER, U. L., R. J. COLE, T. H. SANDERS, G. A. PAYNE, L. S. LEE & M. A. KLICH. 1987. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Annual Rev. Phytopathol.* 25: 249- 270.
- EGEL, D. S., COTTY, P. J., & ELIAS, K. S. 1994. Relationships among isolates of *Aspergillus* sect. *flavi* that vary in aflatoxin production. *Phytopathology* 84: 906-912.
- ESSER, K., & R. KUENEN. 1967. *Genetics of Fungi*. Springer-Verlag, New York. pp. 500.
- FIELY, M. B., J. C. CORRELL & T. E. MORELOCK. 1995. Vegetative compatibility, pathogenicity and virulence diversity of *Fusarium oxysporum* recovered from spinach. *Plant Dis.* 79:990-993.
- FINCHAM, J. R. S. & P. R. DAY. 1963. *Fungal Genetics Botany Monographs*. W. O. James (Ed.). Vol.4, Davis, Philadelphia. pp. 326.
- GARBER, R. K. & P. J. COTTY. 1997. Formation of sclerotia and aflatoxins in developing cotton bolls infected by the S strain of *Aspergillus flavus* and potential for biocontrol with an atoxigenic strain. *Phytopathology* 87: 940-945.
- GLASS, N.L. & G. A. KULDAU. 1992. Mating type and vegetative incompatibility in filamentous Ascomycetes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30: 201-224.
- GORDON, T. R. & D. OKAMOTO. 1991. Vegetative compatibility groupings in a local population of *F. oxysporum*. *Can. J. Bot.* 69: 168-172.
- HARVEZ, J. 1996. Análisis y perspectivas de la comercialización de maní. Informe para la Secretaría de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- HESSELTINE, C. W., O. L. SHOTWELL, M. SMITH, J. J. ELLIS, E. VANDEGRAFT & G. SHANNON. 1970. Production of various aflatoxins by strains of the *Aspergillus flavus* series. pp.202-210. En Proc. U. S.-Jpn. Conf. Toxic Micro-Org., Ist.

- HORN, B. W. & R. L. GREENE. 1995. Vegetative compatibility within populations of *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, and *A. tamarii* from a peanut field. *Mycologia*, 87(3): 324-332.
- _____, R. L. GREENE, V. S. SOVALEV, J. W. DORNER. & J. H. POWELL. 1996. association of morphology and mycotoxin production with vegetative compatibility groups in *A. flavus*, *A. parasiticus* and *A. tamarii*. *Mycologia*. 88 (4): 574-587
- HUANG, X., J. W. DORNER & FUN S. CHU. 1994. Production of Aflatoxin and Cyclopiazonic Acid by Various Aspergilli: An Elisa Analysis. *Mycotoxin Research*. 10: 101-107.
- JACOBSON, D. J. & T. R. GORDON. 1988. Vegetative compatibility and self-incompatibility within *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Phytopathology*. 78: 668-672.
- _____. 1991. *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. A Case Study of Diversity Within a Forma Specialis. *Phytopathology*. 81 (9): 1064-1067.
- KATAN, T. & J. KATAN. 1988. Vegetative-compatibility grouping of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* from tissue and rhizosphere of cotton plants. *Phytopathology* 78: 852-855.
- _____, HADAR & J. KATAN. 1989. Vegetative compatibility of *F. oxysporum* f sp. *dianthi* from carnation in Israel. *Pl. Pathol.* 38: 376-381.
- _____, R. BERLINER & J. KATAN. 1994. Vegetative compatibility in population of *Fusarium oxysporum* from wild carnation *Mycol. Res.* 98 (12): 1415-1418.
- KLICH, M. A. & J. I. PITTS. 1988. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 91: 99-108.
- KLITTICH, C. J. R. & J. F. LESLIE. 1988. Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). *Genetics*. 118: 417-423.
- KOBBE, K. C. L. B. & J. M. TOWNSEND. 1976. Production of Cyclopiazonic Acid by *Aspergillus flavus* Link. *Applied and Environmental Microbiology*. 211-212.

- KOKALIS-BURELLE, N., D. M. PORTER, R. RODRÍGUEZ-KÁBANA, D. H. SMITH & P. SUBRAHMANYAM. 1997. *Compendium of Peanut Diseases*. Second Edition. APS Press. Minnesota. pp94.
- KURTZMAN, C. P., M. J. SMILEY, C. J. ROBNETT, D. T. WICKLOW. 1986. ADN relatedness wild and domesticated species in the *Aspergillus flavus* group. *Mycologia* **78**: 955-959.
- _____, HORN, B. W. & C. W. HESSELTINE. 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Antonie van Leeuwenhoek*. **53**: 147-158.
- LAMONDIA, J. A. & W. H. ELMER. 1989. Pathogenicity and vegetative compatibility among isolates of *F. oxysporum* and *F. moniliforme* colonising asparagus tissues. *Can J. Bot.* **67**: 2420-2424.
- LARKIN R. P., D. L. HOPKINS & F. N. MARTIN. 1990. Vegetative compatibility within *F. oxysporum* f. sp. *niveum* and its relationships to virulence, aggressiveness, and race. *Can. J. Bot.* **36**: 352-358.
- LESLIE, J.F. 1993. Fungal vegetative compatibility. *Annual Rev. Phytopathol.* **31**: 127-150.
- MILLER, J. H., J. E. GIDDENS & A. A. FOSTER. 1957. A survey of the fungi of forest and cultivated soils of Georgia. *Mycologia* **49**:779-808.
- MOODY, S. F. & 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**(8): 2441-2452.
- MOORE-LANDECKER, E. 1996. *Fundamentals of the Fungi*. Fourth Edition. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey. 574 pp.
- MYLYK, O. M. 1976. Heteromorphism for heterokaryon incompatibility genes in natural populations of *Neurospora crassa*. *Genetics* **83**: 275-284.
- NAUTA, M. J. & R. F. HOEKSTRA. 1994. Evolution of vegetative incompatibility in filamentous Ascomycetes. I. Deterministic models. *Evolution*. **48**(4) 979-995.

- ORTH. 1977. Mycotoxins of *Aspergillus oryzae* strains for use in the food industry as starters and enzyme producing molds. *Ann. Nutr. Aliment.* **31**: 617-624.
- PAPA, K. E. 1973. The parasexual cycle in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, **65**: 1201-1205.
- _____. 1978. The parasexual cycle in *Aspergillus parasiticus*. *Mycologia*, **70**: 766-773.
- _____. 1986. Heterokaryon incompatibility in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, **78**: 98-101.
- PEDELINI, R. & R. BONGIOVANNI. 1994. En M. A. Bragachini (Ed.) Maní. *Implantación, Cuidados Culturales, Cosecha, Secado y Almacenaje*. Comunicación INTA Manfredi. pp. 153
- _____. & C. CASINI. 1998. Manual del maní. 3º Edición. E. E. A. Manfredi INTA. pp. 79.
- PEGG, K. J., R. G. SHIVAS, N. Y. MOORE & S. BENTLEY. 1995. Characterization of a unique population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causing *Fusarium* wilt in Cavendish bananas at carnarvon, Australia. *Aust. J. Agric. Res.* **46**: 167-178.
- PITT, J. I. 1993. Corrections to Species Names in Physiological Studies on *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Food Protection*. **56** (3): 265-269.
- _____. & A.D. HOCKING. 1985. *Fungi and Food Spoilage*. Academic Press, Sydney , Australia.: 259-311.
- PUHALLA, J.E. 1984. A visual indicator of heterokaryosis in *Fusarium oxysporum* from celery. *Can. J. Bot.* **62**: 540-545.
- _____. 1985. Classification of strains of *Fusarium* on the basis of vegetative compatibility. *Canad. J. Bot.* **63**: 179-183.
- _____. & J. E. MAYFIELD. 1974. The mechanism of heterokaryotic growth in *Verticillium dahliae*. *Genetics* **76**: 411-422.

- RAPER, K. B. & D. L. FENNELL. 1965. *The genus Aspergillus*. Williams and Wilkins (Eds.). Baltimore, Maryland. 686pp.
- SAITO, M., O. TSURUTA, P. SIRIACHA, S. KAWASUGI, M. MANABE & D. BUANGSUWON. 1986. Distribution and aflatoxin productivity of the atypical strains of *Aspergillus flavus* isolated from soils in Thailand. *Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol.* 24: 41-46.
- SAMSON, R. A. & FRISVAL, 1991. Current taxonomic concepts in *Penicillium* and *Aspergillus*. pp 405-439. En *Cereal Grain, Mycotoxin, Fungi and Quality in drying and storage*. ed. J. Chelkowski (Ed.) Elsevier. Amsterdam.
- _____, S. H. ELLEN, C. F. JENS & O. FILTENBORG. 1996. *Introduction to food-born fungi*. Centraalbureau Voor Schimmelcultures. Baarn. 322 pp.
- SMITH, J. E. & M. O. MOSS. 1985. *Mycotoxins. Formation, Analysis and Significance*. John Wiley ans Sons (Ed.), pp133-140.
- VAAMONDE, G. Micotoxinas. Toxicología de Alimentos. 1995. Editorial Hemisferio Sur.
- _____, C. DEGROSSI, R. COMERIO & V. FERNANDEZ PINTO. *Aspergillus flavus y A. parasiticus en maní cultivado en la provincia de Córdoba (Argentina) : Características diferenciales y capacidad aflatoxicogénica*. 1995. *Bol. Soc. Arg. Bot.*, 30(3-4):191-198.
- VAILLANCUORT, L. J. & R. M. HANAU. 1994. Nitrate-nonutilizing mutants used to study heterokaryosis and vegetative compatibility in *Glomerella graminicola* (*Colletotrichum graminicola*). *Experimental Mycology*. 18: 311-319.
- WANG, H. L. & C. W. HESSELTINE. 1982. Oriental fermented foods. Pp 492-538. En G. Reed (Ed.), *Prescott and Dunn's Industrial Microbiology*. AVI Publ. Co., Westport, Connecticut.
- YAMATOYA, K., J. SIGIYAMA & H. KURIASHI. 1990. Electrophoretic comparison of enzymes as a chemotaxonomic aid among *Aspergillus* taxa: (2) *Aspergillus* section *Flavi*. pp.395-405 in: *Modern Concepts in Penicillium and Aspergillus Classification*. R. A. Samson and J. I. Pitt, eds. Plenum Press, New York.

ANEXO

Solución Czapek-Dox. La siguiente fórmula fue adaptada por Dox (1910) de la de Czapek (1902-1903).

Agua	1000 ml
Na NO ₃	3 gr
K ₂ HPO ₄	1 gr
MgSO ₄ 7 H ₂ O	0,5 gr
KCl 0,	5 gr
FeSO ₄	0,01 gr
Sacarosa	30 gr
Agar	15 gr

Los restantes medios utilizados en este estudio fueron variantes del medio Czapek-Dox en los que se modificó la fuente de nitrógeno.

En cada uno de ellos NaNO₃ fue reemplazado por:

NaNO ₂	0,7g/l
Tartrato de amonio	0,9g/l
Hipoxantina	0,1g/l



María Victoria Novas
Tesista



Dr. Daniel Cabral
Director

Andrea Romero
Dra. Andrea Romero


Dra. María Delia Bertoni


Dra. Cecilia Comas